

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Anđelina Z. Tatović

UTICAJ PASTRMSKOG RIBNJAKA NA  
ANTIOKSIDATIVNI STATUS ODABRANIH  
VRSTA AKVATIČNIH BESKIČMENJAKA

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

*Anđelina Z. Tatović*

**TROUT FARM EFFECT ON THE  
ANTIOXIDATIVE STATUS OF SELECTED  
MACROINVERTEBRATE SPECIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

**Mentori:**

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

Dr Dejan Mirčić, docent, Državni univerzitet u Novom Pazaru

**Članovi komisije:**

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

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

Dr Milenka Božanić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Biološki 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).

Pisanje zahvalnice je vrlo nezahvalno, jer iako volim igru rečima, njima ne mogu da iskažem emocije. Ovo će biti sena prave zahvalnosti koju osećam prema vama koji ste bili uz mene na ovom putu, vi, divni ljudi, kojima sam beskrajno zahvalna.

Pre svega, želim da se zahvalim svojoj mentorki, **prof. dr Ivani Živić**. Hvala na pruženoj podršci, toleranciji i razumevanju. Zahvalna sam na iskrenim razgovorima, dobronamernim savetima i na svakoj pruženoj šansi. Jedno veliko hvala što ste sve ovo vreme verovali u mene i što ste mi omogućili da započnem, ali i da privedem kraju ovaj proces. Hvala što nas, sve članove Vašeg tima, štitate kao sopstvenu decu, što, znate već, često u šali kažem. Hvala na svemu napisanom i izostavljenom, na svemu što smo prošle i onome što nas čeka.

Hvala mom komentoru **dr Dejanu Mirčiću**, koji je uvek bio raspoložen da odgovori na svako moje pitanje i da mi objasni sve što mi je nejasno. Hvala na lepoj, iskrenoj i lagodnoj komunikaciji i saradnji.

Veliku zahvalnost dugujem **prof. dr Zoranu Markoviću**, koji mi je takođe pružio šansu da započnem svoj naučni rad. Hvala što ste bili pre svega čovek i što ste mi pružili podršku i sigurnost onda kada mi je to bilo potrebno. Hvala na lepo provedenim danima i zanimljivim razgovorima na Radmilovcu sa Vama i članovima Vašeg tima (**Boža, Marko, Dača, Ljubica, Zorica, Vukašin, Stefan** i ostali), kojima sam takođe duboko zahvalna na srdačnosti, gostoprimstvu i pozitivnosti, koju do sada u toj meri nisam srela.

Hvala **dr Katarini Stojanović** i **dr Milenki Božanić**, za svu pruženu pomoć, za nesebično preneseno znanje i za korisne savete. Kaća, hvala ti na posvećenosti i velikom uloženom trudu prilikom čitanja mog doktorata, kao i na sugestijama koje su mi bile dragocene. Kaća i Miko, dugujem vam veliko hvala za druženje, za beskrajne razgovore, za strpljenje i za vetar, a često i uragan, u leđa kada god mi je bio potreban. Hvala za jednu divnu saradnju, za lep odnos pun razumevanja i mnogo više od toga. Neizmerno mi značite.

Profesoru **dr. Mladenu Kučiniću** zahvalna sam na mnogo čemu. Hvala što ste mi bili podrška na konferencijama. Učinili ste ih tada podnošljivim, a sada već i smešnim.

Neizmerno mi je drago što sam imala priliku da Vas upoznam. Vaš hipi duh obogaćuje sve oko Vas i boji atmosferu šarenim bojama. Iz Vas zrači dobrota i ljubav prema svetu, prema prirodi, prema nauci i prema ljubavi uopšte. Ne drže Vas ni vreme ni mesto, a ni Vi njih. Pokazali ste mi kako čovek, iako uspešan, ostaje dosledan sebi i svojim principima, prkoseći zlu. Na putu ka cilju često sretnemo ljude i naučimo lekcije bitnije od samog cilja. Malobrojni su takvi, ali zbog toga su i vredni. Hvala Vam što ste jedan od njih.

Veliku zahvalnost dugujem **prof. dr Miroslavu Živiću**, koji mi je bezrezervno pomogao, kako na terenu, tako i u statističkoj obradi podataka i izradi dobrog dela same teze. Hvala što ste sve ovo vreme, kao i moja mentorka, bili na raspolaganju za moje nedoumice i probleme.

Hvala kolegi **dr Vanji Marković** za izdvojeno vreme provedeno u diskusiji dobijenih rezultata. Hvala ti, Vanja, što si uvek tu da nesebično pomogneš. Hvala za svaki dragoceni savet, za reči ohrabrenja, za iskrenost i ljudskost. Hvala što si naš tim učinio jačim i boljim.

Hvala kolegi **dr Borisu Novakoviću** na ogromnoj podršci i divnom iskustvu na konferenciji u Rumuniji. Takođe hvala na pruženoj pomoći i savetima u rešavanju mojih nedoumica tokom doktorskih studija.

Hvala **dr Nikoli Vesoviću** što je odvojio vreme da napravi fotografije *Ephemere danice* i *Ecdyonurusa venosusa*, kao i za korisne sugestije.

Hvala dvema Majama (**Maji Dakić** i **dr Maji Vrbici**) i bibliotekarki **Milici** koje mi ulepšavaju dane proveden u biblioteci. Hvala vam što ste pozitivne, pune razumevanja i spremne da pomognete kad god zatreba. Hvala što tmurne dane činite vedrim.

Zahvalnost je teško izmeriti rečima, ali sada bih sigurno upotrebila superlativ, jer ću pomenuti „moje ljude“. Oni su uz mene uvek, na njih se oslanjam kada mi je najteže, sa njima se osećam najlepše. Sigurna sam da bez njih ne bih pisala ovu (ne)zahvalnicu.

*Veliko hvala mojim roditeljima – mami Mileni i tati Zoranu, koji su bili požrtvovani i omogućili mi da studiram ono što volim. Hvala što ste mi pružili podršku i bili oslonac u teškim trenucima. Bakama i deda neizmerno hvala na bezuslovnoj ljubavi i pomoći, posebno tokom prvih godina doktorskih studija, kada mi je bilo skoro pa neizvodljivo da nastavim. Puno ste doprineli mom uspehu.*

*Posebno mesto u mom životu imaju moje sestre - Bilja i Jeka. One me saslušaju, oraspolože i daju mi polet energije da nastavim gde posustanem. Hvala vam što ste uvek uz*

*mene. Hvala mojim zetovima Nenadu i Nikoli, hvala vam najiskrenije na svemu što ste učinili za mene tokom izrade disertacije.*

*Hvala mojoj divnoj drugarici **dr Danici Pavlović**, što je uvek bila tu da me sasluša i posavetuje i ulepša mi dan, godinu i deceniju.*

*Moj najdraži **ujko Miloše**, hvala ti što si mi bio zaleđina, uzor i pojam ljudskosti. Bio i bićeš. Nosim te sa sobom zauvek. Hvala **ujni Žani i braći Matiji i Aleksi** što su poput tebe, dobri ljudi, i što su uvek bili tu za mene.*

*Hvala mom **svekr**u i **svekr**vi koji su čuvajući unuka meni omogućili da nesmetano pišem tezu.*

*Neizmerno sam zahvalna **svom mužu, Ognjenu**, koji je sa mnom bio više u zlu, nego u dobru u proteklom periodu. Pokazao mi je šta znači požrtvovanost i ljubav. Bio mi je oslonac, prijatelj, podrška i mnogo više od toga. Moje potrebe si stavio ispred svojih. Potvrdio si ono u šta nisam ni sumnjala. Hvala ti, Ogi, beskrajno hvala tebi i našem **sinu Alekseju** koji je mom životu dao novi smisao. Vi mi dajete motivaciju da istrajem i da svakim danom budem bolja verzija sebe.*

*Beskrajno hvala mojoj kumi i najboljem prijatelju već više od dve decenije – **mojoj Tijani**. Ti me najbolje poznaješ i nesebično voliš. Hvala ti što si uz mene u teškim trenucima, a bilo ih je tokom doktorskih studija. Uvek si me bodrila i gurala napred. Reči su nedovoljne, ali tebi nisu potrebne, jer znaš. Hvala ti, Tićo, ogromno hvala za sve. I ovoga puta bila si u pravu. Mogla sam ja to.*

*Autor*

# Utjecaj pastrmskog ribnjaka na antioksidativni status odabranih vrsta akvatičnih beskičmenjaka

## Sažetak

Akvatične biocenoze mogu biti pod uticajem različitih stresora, čiji intenzitet varira kako prostorno, tako i vremenski. Kako bi se stekao kompletan uvid u stanje ekosistema, u programe monitoringa, pored praćenja abiotičkih komponenti, neophodno je uključiti i biotičku komponentu. U tu svrhu koriste se bioindikatori. Pojedine grupe akvatičnih beskičmenjaka poseduju specifične morfološke i funkcionalne karakteristike, koje ih čine pogodnim bioindikatorima.

Cilj doktorske disertacije je praćenje uticaja ispusnih voda pastrmskih ribnjaka na analizirane biomarkere (promena aktivnosti glutacion-peroksidaze (GPx), promena aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) promena aktivnosti katalaze (CAT) i promena koncentracije glutaciona (GSH)) odabranih vrsta makrozoobentosa: *Ecdyonurus venosus*, *Ephemera danica* i *Gammarus dulensis*, kao i analiza uticaja sredinskih faktora na strukturu i dinamiku zajednica makrozoobentosa.

Hidrobiološka istraživanja su sprovedena na reci Crnici i reci Skrapež tokom 2015. i 2016. godine (zima). Lokaliteti su odabrani na osnovu pozicija u odnosu na ribnjak (kontrolni- iznad ribnjaka, i tri lokaliteta nizvodno od ribnjaka).

Na osnovu dobijenih rezultata analiziranih biomarkera kod vrste *E. danica*, konstatovan je najjači efekat ribnjaka na promenu aktivnosti GPx, koji ukazuje na najveći stepen longitudinalnih promena i uticaj pastrmskog ribnjaka u letnjem i jesenjem periodu. Na aktivnost SOD uticaj ribnjaka se praktično nije ispoljio. Aktivnost CAT nije detektovana, a promena koncentracije GSH ne pokazuje ni longitudinalnu ni sezonsku konzistentnost.

Analiza koinercije (CIA) je pokazala da postoji statistički vrlo značajna ( $P < 0,001$ ) ko-struktura između korelacijske matrice PCA (analiza glavnih komponenti) fizičkih i hemijskih parametara vode i korelacijske matrice PCA antioksidativnih enzima *E. danica* i strukture i sastava zajednice makrozoobentosa u reci Crnici. Ovom analizom je takođe potvrđeno da su kod elemenata strukture zajednice makrozoobentosa reke Crnice i elemenata antioksidativne zaštite larvi *E. danica* sezonske promene izraženije od longitudinalnih. U

slučaju sezonskih promena ispitivanih biomarkera, najizraženije su tokom jeseni, kada je prisutan sinergistički uticaj sredinskih stresora.

Kada su u pitanju parametri strukture zajednice makrozoobentosa, ispusne vode ribnjaka u reci Crnici ispoljavaju dejstvo pre svega na indekse koji reaguju na promene u sastavu zajednice na nivou vrste - indeks saprobnosti (SI) ili familije- *Average Score Per Taxon* (ASPT) i modifikovani *Modified Average Score Per Taxon Score present-only* (MASPT<sub>PO</sub>) i na brojnost jedinki vrsta *E. danica* i *G. dulensis*.

Istraživanje uticaja ribnjaka na antioksidativni sistem zaštite vrste *Ecdyonurus venosus* pokazalo je da karakteristike vodotoka imaju bitan uticaj na ispitivane biomarkere, pri čemu je odsustvo promene aktivnosti SOD i promene koncentracije GSH najverovatnije posledica bujičnog toka reke Crnice. Kao najosetljiviji biomarker i kod ove vrste izdvaja se promena aktivnosti GPx. Analiza varijanse je pokazala statistički značajno variranje između lokaliteta reke Crnice jedino u slučaju aktivnosti GPx enzima.

Kod larvi *E. venosus* uzorkovanih u reci Skrapež jednofaktorska analiza varijanse je pokazala da u slučaju sva tri biomarkera dolazi do statistički značajnih variranja između ispitivanih lokaliteta, dok je LSD test pokazao da u slučaju sva tri biomarkera kod larvi *E. venosus* postoji razlika između kontrolnog i prvog nizvodnog lokaliteta, što je posledica dejstva ribnjaka.

Rezultati analiziranih biomarkera kod vrste *Gammarus dulensis* pokazali su da se aktivnosti analiziranih antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx, GST i GR) menjaju i sezonski i longitudinalno, pri čemu su longitudinalne promene zavisne od sezone u kojoj su praćene.

Najizraženije promene aktivnosti enzima kod *G. dulensis* dešavaju se tokom jeseni, kada se aktivnosti četiri od pet ispitivanih enzima (SOD, CAT, GPx i GR) smanjuju na prvom nizvodnom lokalitetu ispod ribnjaka (CR2). Aktivnosti ovih enzima su potisnute usled dejstva kombinacije promenjenih sredinskih faktora, pri čemu veliki uticaj imaju povećane koncentracije teških metala u sedimentu na lokalitetu CR2 tokom jesenje sezone. Na kontrolnom lokalitetu (CR1), vrednosti su u pozitivnoj korelaciji sa izmerenim aktivnostima na CR4 lokalitetu, a u negativnoj korelaciji sa zabeleženim aktivnostima praćenih enzima na CR2 lokalitetu, što ukazuje na to da je izvor koji utiče na aktivnost praćenih enzima smešten između CR1 i CR2 lokaliteta, a to je pastrmski ribnjak, tačnije njegove ispusne vode.



Analizom rezultata sprovedenih istraživanja konstatovano je da je najosetljiviji biomarker kod sve tri vrste vodenih beskičmenjaka promena aktivnosti glutation-peroksidaze, dok je zajedničko za antioksidativni sistem zaštite dve ispitivane vrste insekata, odsustvo aktivnosti katalaze, koje se može povezati sa filolgenetskom pozicijom reda Ephemeroptera.

**Ključne reči:** pastrmski ribnjak, *Ephemera danica*, *Ecdyonurus venosus*, *Gammarus dulensis*, makrozoobentos, biomarkeri, antioksidativna zaštita, biotički indeksi

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Entomologija

## Abstract

Aquatic ecosystems can be influenced by various stressors, whose intensity varies spatially and temporally. To gain a complete insight into the state of the ecosystem, monitoring programs need to include not only abiotic components but also the biotic component. Bioindicators are used for this purpose. Some groups of aquatic invertebrates possess specific morphological and functional characteristics that make them suitable bioindicators.

The aim of the dissertation is to monitor the impact of effluents from trout farms on analyzed biomarkers (changes in the activity of glutathione peroxidase (GPx), changes in the activity of superoxide dismutase (SOD), changes in the activity of catalase (CAT), and changes in the concentration of glutathione (GSH) of selected macrozoobenthos species: *Ecdyonurus venosus*, *Ephemera danica*, and *Gammarus dulensis*. The analysis also includes studying the influence of environmental factors on the structure and dynamics of macrozoobenthos communities.

Hydrobiological research was conducted on the Crnica River during 2015 (spring, summer, and autumn) and 2016 (winter), and on the Skrapež River (spring 2015). The sites were selected based on their location in relation to trout farms (control – upstream of the farm, and three sites downstream from the farm).

Based on the results of analyzed biomarkers in *E. danica* larvae, it was observed that the most sensitive to the effects of the effluents is the change in GPx activity, indicating the highest degree of longitudinal changes and the impact of the trout farm in the summer and autumn periods. Longitudinal changes of SOD activity are practically absent, especially in autumn. CAT activity was not detected, while changes in GSH concentration showed neither longitudinal nor seasonal consistency.

A coinertia analysis (CIA) showed a statistically significant ( $P < 0.001$ ) co-structure between the PCA correlation matrix of physical and chemical water parameters and the PCA correlation matrix of *E. danica* antioxidative enzymes and the structure and composition of the macrozoobenthos community in the Crnica River. This analysis confirmed that seasonal changes are more pronounced than longitudinal ones in the elements of the structure of the macrozoobenthos community of the Crnica River and the elements of antioxidant protection of *E. danica* larvae. The seasonal changes in the studied biomarkers are most pronounced in the autumn, when the synergistic influence of environmental stressors is present.

Concerning the parameters of the macrozoobenthos community structure, trout farm effluents on the Crnica River primarily affect indices that respond to changes in community composition at the species level - saprobity index (SI) or family order - *Average Score Per Taxon* (ASPT), and modified *Modified Average Score Per Taxon - present only* (ASPTpo), as well as the abundance of *E. danica* and *G. dulensis* individuals.

The study of the trout farms impacts on the antioxidative system of *Ecdyonurus venosus* showed that the characteristics of watercourses significantly influenced the investigated biomarkers, with the absence of changes in SOD activity and GSH concentration most likely due to the torrential flow of the Crnica River. The most sensitive biomarker in this species is the change in GPx activity. The analysis of variance showed a statistically significant difference between the Crnica River sites only in the case of GPx activity.

In the larvae of *E. venosus* sampled in the Skrapež River, a one-factorial analysis of variance showed statistically significant variations between the studied sites for all three biomarkers, while the LSD test indicated a difference between the control and the first downstream site for all three biomarkers showed that there was a difference between the control and the first downstream site for all three biomarkers, which is a consequence of the fish farm influence.

Results of analyzed biomarkers in *Gammarus dulensis* samples showed that the activities of analyzed antioxidative enzymes (SOD, CAT, GPx, GST, and GR) change both seasonally and longitudinally, with longitudinal changes depending on the monitored season. The most pronounced changes in enzyme activities in *G. dulensis* occur during autumn, when the activities of four out of five examined enzymes (SOD, CAT, GPx, and GR) decrease at the first downstream site below the fish farm (CR2). The activities of these enzymes are suppressed due to the combination of altered environmental factors, with increased concentrations of heavy metals in the sediment at the CR2 site during the autumn season having a significant impact. On the control site (CR1), values are positively correlated with measured activities at the CR4 site and negatively correlated with recorded activities of the examined enzymes at the CR2 site, indicating that the source affecting enzyme activities is located between the CR1 and CR2 sites, namely the trout farm, specifically its effluents.

The analysis of the results of the studies carried out showed that the most sensitive biomarker for all three species of aquatic invertebrates is the change in glutathione peroxidase activity, while the absence of catalase activity is common to the antioxidative defense system

of the two examined insect species, which can be related to the phylogenetic position of the order Ephemeroptera.

**Keywords:** trout farms, *E. danica*, *E. venosus*, *G. dulensis*, macrozoobenthos, biomarkers, antioxidative defense, biotic indices

**Academic Expertise:** Biology

**Field of Academic Expertise:** Entomology

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Biomonitoring i bioindikatori</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Ephemeroptera kao bioindikatori .....	4
1.1.1.1. Larva <i>Ephemera danica</i> (Müller, 1764), model organizam – opšte karakteristike.....	5
1.1.1.2. Larva <i>Ecdyonurus venosus</i> (Fabricius, 1775), model organizam – opšte karakteristike .....	6
1.1.2. Amphipoda kao bioindikatori .....	8
1.1.2.1. <i>Gammarus dulensis</i> (S. Karaman, 1929), model organizam – opšte karakteristike .....	9
<b>1.2. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i oksidativni stres</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3. Antioksidativni sistem zaštite</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4. Biomarkeri</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5. Uticaj ispusnih voda pastrmskih ribnjaka na tekućice</b> .....	<b>17</b>
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Opšte i hidromorfološke karakteristike istraživanog područja, ribnjaka i lokaliteta na reci Crnci</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2. Opšte i hidromorfološke karakteristike istraživanog područja, ribnjaka i lokaliteta na reci Skrapež</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3. Merenje fizičkih i hemijskih parametara vode</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4. Hemijska analiza sedimenta</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5. Uzorkovanje i priprema homogenata i određivanje specifičnih aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije glutaciona</b> .....	<b>31</b>
3.5.1. Određivanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD) .....	32
3.5.2. Određivanje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze (GPx).....	32
3.5.3. Određivanje koncentracije glutaciona (GSH) .....	32

3.5.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation-transferaze (GST).....	33
3.5.5. Određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze (GR).....	33
<b>3.6. ANALIZA ZAJEDNICE MAKROZOOBENTOSA .....</b>	<b>33</b>
3.6.1. Prikupljanje i identifikacija uzoraka makrozoobentosa .....	33
3.6.2. Ekološke analize zajednica makroinvertebrata .....	34
<b>3.7. STATISTIČKE ANALIZE PODATAKA.....</b>	<b>36</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1. Fizički i hemijski parametri reke Crnice .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Fizički i hemijski parametri reke Skrapež.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3. Hemijski sastav sedimenta reke Crnice .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4. Struktura i sastav zajednice makrozoobentosa reke Crnice .....</b>	<b>45</b>
4.4.1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Crnice.....	45
4.4.2. Rezultati ekoloških analiza .....	47
4.4.3. Uticaj ribnjaka i sezonske promene analiziranih ekoloških parametara zajednice makrozoobentosa reke Crnice .....	53
4.4.4. Multivarijantna analiza abiotičkih faktora vode i ekoloških parametara zajednica makrozoobentosa .....	55
4.4.5. Multivarijantna analiza hemijskog sastava sedimenta i ekoloških parametara zajednice makrozoobentosa .....	57
<b>4.5. Pregled antioksidativnih statusa pojedinačnih model organizama .....</b>	<b>59</b>
4.5.1. Analiza elemenata antioksidativne zaštite <i>Ephemera danica</i> .....	59
4.5.2. Zavisnost promene aktivnosti antioksidativnih enzima <i>Ephemera danica</i> od abiotičkih parametara vode reke Crnice .....	60
4.5.3. Zavisnost promene aktivnosti antioksidativnih enzima <i>Ephemera danica</i> od hemijskog sastava sedimenta reke Crnice .....	61
4.5.4. Analiza elemenata antioksidativne zaštite <i>Ecdyonurs venosus</i> i uticaj ispusnih voda ribnjaka na hemizam u recipijentima.....	61

4.5.5. Analiza elemenata antioksidativne zaštite <i>Gammarus dulensis</i> .....	64
4.5.6. Zavisnost promene aktivnosti antioksidativnih enzima <i>Gammarus dulensis</i> od abiotičkih parametara vode reke Crnice .....	66
4.5.7. Uticaj hemijskih parametara sedimenta na promene aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima <i>Gammarus dulensis</i> .....	70
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>72</b>
5.1. Uticaj efluenata iz ribnjaka i drugih sredinskih faktora na abiotičke parametre reke Crnice .....	76
5.2. Uticaj efluenata iz ribnjaka na abiotičke parametre reke Skrapež .....	78
5.3. Uticaj ispusnih voda ribnjaka na sastav i strukturu zajednice makroinvertebrata u reci Crnci .....	79
5.4. Uticaj efluenata iz ribnjaka na ispitivane biomarkere larvi <i>Ephemera danica</i> .....	81
5.5. Uticaj efluenata iz ribnjaka na ispitivane biomarkere <i>Ecdyonurus venosus</i> .....	85
5.6. Uticaj efluenata iz ribnjaka na ispitivane biomarkere <i>Gammarus dulensis</i> .....	87
5.7. Uticaj fizičkih i hemijskih parametara vode recipijenta na ispitivane biomarkere kod vrste <i>Gammarus dulensis</i> .....	90
5.8. Uticaj hemijskog sastava sedimenta na ispitivane biomarkere kod <i>Gammarus dulensis</i> .	91
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>94</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>99</b>
<b>8. PRILOG</b> .....	<b>120</b>





## ***1.Uvod***

## 1. UVOD

Reke su oduvek imale veliki značaj za ljude, još od nastanka ljudske vrste. Od davnina ljudi su se okupljali oko reka koristeći njihove prirodne resurse – pijaću vodu, vodu za navodnjavanje i ribu za ishranu, pa su oko reka stvorene prve civilizacije. Još iz doba Paleolita postoje nalazi, simboli koji veličaju vodu. Veliki značaj koji su ljudi pridavali vodi ogleda se i u gotovo svim religijama, jer je ona ta koja pročišćava i daje život. Voda je tokom ljudske istorije eksploatisana, ali čuvana i poštovana. I danas, ljudi i dalje u najvećoj meri zavise od vode, ali ono što se promenilo je čovekov odnos prema njoj. Eksploatacije prirodnih resursa reka je sve intenzivnije, a negativni uticaj čoveka na ove fragilne ekosisteme je sve izraženiji. Bez obzira na veliki procenat vode na planeti (71%) najveći procenat slatke vode od 2,5% je nedostupan živom svetu (plitka podzemna voda ili je zaleđena u glečerima i ledu) (Vörösmarty i sar., 2010).

Usled povećanog rasta ljudske populacije, povećava se i potreba za eksploatacijom prirodnih resursa, što se negativno odražava na reke, koje spadaju u najugroženija staništa (Vörösmarty i sar., 2005; Walsh, 2005). Urbanizacija, industrijalizacija, razvoj poljoprivrede i socio-ekonomski razvoj doveli su do degradacije rečnih ekosistema. Slatkovodni vodeni tokovi su izloženi direktnom antropogenom uticaju, koji negativno utiče na kvalitet vode, biodiverzitet i ekološko stanje (Søndergaard and Jeppesen, 2007). Odlaganje raznih tipova otpada u vodene tokove i poljoprivreda sa intenzivnom upotrebom pesticida dovode do eutrofikacije i kontaminacije vodenih ekosistema. Izgradnjom brana i rezervoara modifikuje se vodeni tok, pa se naj taj način menjaju i njegove ekološke karakteristike (Benetti i sar., 2012). Uticaj čoveka se negativno odražava na biodiverzitet slatkovodnih zajednica, a posebno na strukturu zajednica makrozoobentosa, među kojima su mnoge vrste visoko osetljive na zagađenje i uništavanje staništa. Pa tako, sa povećanjem zagađenja smanjuje se ukupan broj vrsta, a povećava se broj jedinki koje pripadaju tolerantnim vrstama i na taj način se ukupan diverzitet smanjuje. Alarmantan je podatak da je skoro 33% akvatičnih insekata pred izumiranjem upravo zbog zagađivanja i uništavanja njihovog staništa (Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019). Trend narušavanja lotičkih ekosistema ne jenjava, šta više sve je intenzivniji. Vodi, nekada naizgled neograničenom obnovljivom resursu, neophodna je zaštita i konzervacija. (Walsh, 2005). Tekuće su posebno osetljive na antropogeni uticaj (Power i sar., 1988). U poslednjih 50 godina, fokus mnogih istraživanja usmeren je na uticaj raznih

antropogenih stresora i na potencijalne načine obnove degradiranih ekosistema. U Evropi, usvajanjem dokumenta Okvirne direktive o vodama – Water Frame Directive (WFD, 2000), ovaj fokus je još više intenziviran. Okvirna direktiva o vodama nalaže da sva prirodna vodena tela dostignu dobar ekološki status. Direktivom se predlaže pet ekoloških klasa i upotreba bioindikatora kako bi se opisala odstupanja od prvobitnog stanja ekosistema. Obnova i održavanje dobrog ekološkog stanja ekosistema tekućice postali su bitni ciljevi rečnog menadžmenta i biomonitoring programa (Karr, 1991; Rapport, 1991; Søndergaard i Jeppesen, 2007). Osnovni cilj biomonitoring programa je da na osnovu praćenja jedinki, vrsta, populacija i/ili zajednica u svojim prirodnim ekosistemima detektuje promene izazvane sredinskim faktorima i predvidi dalje reakcije na nivou jedinke, vrste, zajednice ili ekosistema. Na taj način se može sprečiti dalji negativni sredinski uticaj i, što je najbitnije, sačuvati vodeni ekosistemi, jer “Sačuvati vodu znači sačuvati život“.

### **1.1. Biomonitoring i bioindikator**

Usled sve intenzivnijeg antropogenog uticaja na vodene ekosisteme, glavni izazov današnjice predstavlja obnavljanje i očuvanje ovih ekosistema. Poseban prioritet imaju tekućice koje predstavljaju stanište za retke vrste i za koje je karakteristično prisustvo velikog broja vrsta, gde je potrebno uložiti dodatan napor za neophodnu zaštitu ekosistema (Lock i Goethals, 2011). Pre zaštite, neophodno je steći uvid u stanje vodenih ekosistema, pa zatim započeti proces monitoringa.

S obzirom na to da su akvatični ekosistemi pod uticajem različitih stresora, čiji intenzitet varira prostorno i vremenski, monitoring slatkovodnih ekosistema treba da obuhvati fizičke, hemijske i biološke parametre, kako bi se stekao pravi uvid u stanje ekosistema. Merenjem fizičkih i hemijskih parametara dobijaju se informacije o trenutnom stanju sredine – u trenutku uzorkovanja. Biološki parametri daju informacije o dugoročnom, kumulativnom dejstvu polutanata, pa pružaju jasnu sliku o stanju vodenih tela kako u kraćem, tako i u dužem vremenskom periodu (Kripa i sar., 2013, Uherek i Pinto Gouveia, 2014, Fierro i sar., 2017). Bioindikator se može definisati i kao vrsta ili grupa vrsta koje reflektuju abiotičko ili biotičko stanje sredine, odnosno odražavaju uticaj sredinskih promena na stanište, zajednicu ili ekosistem (Uherek i Pinto Gouveia, 2014). Kod takvih organizama prate se promene na biohemijskom, fiziološkom ili bihevioralnom nivou, koje mogu da ukažu na promene u ekosistemu. Efikasni bioindikator su brojni, imaju ograničene disperzivne sposobnosti i reaguju na predvidljiv način na sredinske promene (Thomas, 1993). Kao bioindikator stanja

tekućica najčešće se koriste bentosne makroinvertebrate. Zbog svoje ograničene pokretljivosti, velike brojnosti i diverziteta, kao i različite osjetljivosti na polutante smatraju se odličnim bioindikatorima tekućih voda (Soofiani i sar., 2012, Kripa i sar., 2013, Uherek i Pinto Gouveia, 2014). Ograničena pokretljivost, između ostalog čini ih posebno pogodnim za istraživanje uticaja ribnjaka na reke, jer omogućava praćenje uticaja zagađivača duž longitudinalnog profila (uzvodno i nizvodno od ribnjaka) (Soofiani i sar., 2012).

Upotreba akvatičnih organizama u monitoringu traje decenijama. Kolkwitz i Marsson (1909) prvi uvode pojam saprobnog sistema. Saprobní pristup datira još od polovine 19. veka (Hassal, 1850; Cohn, 1853), dok je saprobní sistem procene kvaliteta vode tekućica u upotrebi više od 100 godina (Kolkwitz & Marsson, 1902, 1908, 1909). Saprobnim sistemom se prati organsko zagađenje, kao i odgovor akvatičnih zajednica na njega. Njegova relativno laka primena omogućila je da ovaj sistem zaživi, pa se široko upotrebljavao još od polovine prošlog veka. Tada je kvantifikovan kroz saprobne indekse (Pantle i Buck, 1955; Zelinka i Marvan, 1961). Uzimajući u obzir mane saprobnog sistema (identifikacija do nivoa vrste, registrovanje jednog tipa zagađivača, itd.), danas je retko samostalno u upotrebi, dok se sve više koriste indeksi diverziteta, biotički indeksi, indeksi dominantnosti, trofički indeksi (Bain i sar., 2000). Indeksi diverziteta prate celokupni diverzitet (Shannon i Wiener, 1949), ili analiziraju dve komponente diverziteta: broj vrsta i ujednačenost brojnosti (Simpson, 1949). Biotički indeksi predstavljaju kombinaciju indeksa diverziteta i saprobnih indeksa (Živić i sar., 2018). Zbog razlika u tekućicama različitih zemalja, kao i zbog biogeografskog rasprostranjenja vrsta, biotički indeksi se primenjuju samo regionalno (Živić i sar., 2018, Božanić, 2019). Tako je biotički indeks *Biological Monitoring Working Party Score* (BMWP), podlegao modifikacijama kako bi svoju primenu našao u različitim zemljama. (Španija, Argentina, Poljska, Tajland, Paisley i sar., 2014).

Nekoliko grupa akvatičnih insekata su u širokoj upotrebi za monitoring akvatičnih ekosistema (Uherek i Pinto Gouveia, 2014). Jedna od najosetljivijih grupa među makroinvertebratama su larve Ephemeroptera (Lock i Goethals, 2011), pa je ovaj red jedan od najčešćih bioindikatora zagađenja vode.

### 1.1.1. Ephemeroptera kao bioindikatori

Ephemeroptera su jedna od najraznovrsnijih grupa makrozoobentosa sa globalnim rasprostranjenjem, zauzimajući širok spektar ekoloških niša. Ovom redu pripada preko 3000 vrsta iz 42 familije i preko 400 rodova na globalnom nivou (Barber-James i sar., 2007). U Srbiji ovaj red broji oko 45 taksona (vrsta i rodova) iz 8 familija (Petrović i sar., 2015). Pripadnici ovog reda imaju bitnu ulogu u skoro svim netaknutim tekućicama, a njihove larve čine značajan deo materijala uzorkovanog tokom procesa biomonitoringa (Bauernfeind i Moog, 2000). Poseduju brojne osobine zbog kojih se često koriste kao bioindikatori sredinskih promena izazvanih antropogenim uticajem (Landa i Soldán, 1995b; Petrović i sar., 2015). Žive u skoro svim tipovima slatkovodnih ekosistema, gde naseljavaju različita staništa: organsku materiju u raspadanju, sediment, submerznu vegetaciju, delove tekućica sa jakom strujom i mirnu vodu. Većina su detritivori ili omnivori, što znači da se hrane delimično homogenizovanom materijom u kojoj su polutanti ravnomerno raspoređeni (Landa i Soldán, 1995a). Njihova visoka osetljivost na sredinske promene čini ih primarnim kandidatima za procenu kvaliteta voda i sredinskih uticaja na akvatične ekosisteme (Kerans i Karr, 1994).

Ephemeroptera su hemimetabolni insekti sa veoma dugim larvalnim razvićem (od nekoliko meseci do nekoliko godina), pa su uočljivi dugoročni kumulativni uticaji polutanata (Landa i Soldán, 1995a). Nakon larvalnog sledi stadijum nimfe, koji je takođe akvatičan. Nakon poslednjeg nimfalnog stadijuma, a pre adultnog, javlja se stadijum subimago koji je karakterističan samo za red Ephemeroptera. Sličan je adultnom stadijumu, ali je polno nezreo. Njegova krila i abdomen prekrivena su sitnim vodoopornim mikrotrihama, koje mu pomažu da napusti vodu nakon eklozije. Adulti žive vrlo kratko, od nekoliko časova do nekoliko nedelja. Njihova uloga je kopulacija, koja se odvija u vazduhu, nakon čega mužjaci odmah uginu, dok ženke ugibaju nakon ovipozicije (Barber-James i sar., 2007; Bauernfeind i Soldán, 2013). Produkcija jaja je velika, a na stopu rasta jaja utiču biotički i abiotički faktori. Većina larvi je stenovalentna u pogledu tolerancije na rastvoreni kiseonik, pH, temperaturu vode, tip supstrata, veličinu tekućice i vodenu struju. Zbog toga su osetljive na eutrofikaciju, sedimentaciju, priliv nutrijenata, hemijsko zagađenje i na druge antropogene uticaje koji utiču na kvalitet vode. Organizmi Ephemeroptera imaju različite nivoe tolerancije na polutante, ali generalno se smatraju netolerantnim na zagađenje (Alhejoj, 2014). Zbog svog načina života, dužine larvalnog razvića, tipa ishrane, osetljivosti na polutante, brojnosti na ispitivanim lokalitetima i ostalim biondiatorskim svojstvima, za ovo istraživanje kao model organizmi

odabrani su predstavnici rodova *Ephemera* – *Ephemera danica* i roda *Ecdyonurus* – *Ecdyonurus venosus*.

#### **1.1.1.1. Larva *Ephemera danica* (Müller, 1764), model organizam – opšte karakteristike**

*E. danica* je vrsta sa zapadnopalearktičkim rasprostranjenjem (Bauernfeind i Soldán, 2013). Larve su česte i brojne u peskovitom ili šljunkovitom dnu reka i jezera širom Evrope gde vode ubušujući način života (Macan, 1979).

Opis larve: Dužina tela je od 14 do 22 mm (Slika 1). Na glavi između ocela se nalazi upadljiva tamna šara, u obliku trougla ili slova T, koja povezuje lateralne sa frontalnom ocelom. Na tri torakalna segmenta nalaze se ekstremiteti za hodanje i kopanje. Abdomen je građen od deset segmenata, obojen je svetlo krem do žućkasto, sa crnim šarama koje predstavljaju taksonomski karakter. Na prvom i drugom tergitu sa bočne strane se nalazi tamna tačka, dok su treći, četvrti i peti tergumi bez tamnih obeležja. Šesti tergite ima par paramedijalnih uzdužnih pruga, a sedmi, osmi i deveti tergiti se karakterišu širokim crnim prugama i paramedijalnim parom kraćih, crnih uzdužnih linija. Sa lateralne strane abdomena nalaze se trahealne škrge. Na poslednjem segmentu abdomena nalaze se dva cerka, između kojih se pruža kaudalni filament (Bauernfeind i Soldán, 2013).

Biologija larve: Naseljavaju ritralnu zonu reka i potoka, kao i obalsku zonu oligotrofnih jezera (Macan, 1979). Uglavnom žive u vodama koje su na granici između oligo i beta mezasaprobnih, dok pojedine populacije tolerišu čak i alfa mezosaprobne uslove (Bauernfeind i Soldán, 2013). Mogu se naći i u visoko alkalnim vodama, čija pH vrednost iznosi od 7,9 do 8,5 (100-240 ml/l CaCO<sub>3</sub>) (Whelan, 1980). Prema načinu života, larve *E. danica* spadaju u ubušujući tip. Ubušivanje predstavlja bihevioralnu adaptaciju lotičkih slatkovodnih invertebrata na uticaj vodene struje, a ovakvo ponašanje im omogućavaju morfološke adaptacije (Lopez-Rodriguez i sar., 2009). One se ubušuju u supstrat praveći kanale u obliku slova „U“. Prilikom ubušivanja pokreti nogu nisu koordinisani i potpomognuti su delovima usnog aparata, koji je u tu svrhu modifikovan. Dodaci na proraksu i glavi im olakšavaju ceo proces. Pri ovakvim pokretima stvara se strujanje vode koje obliva i pokreće trahealne škrge, što omogućava disanje i ishranu filtriranjem (Bauernfeind i Soldán, 2013; Sartori i Brittain, 2015). Hrane se organskim detritusom, pa su osetljive na promene u supstratu i prisustvo polutanata, što ih čini odličnim bioindikatorima (Landa i Soldán, 1995b).



**Slika 1.** Larva *Ephemera danica* (foto Nikola Vesović)

#### **1.1.1.2. Larva *Ecdyonurus venosus* (Fabricius, 1775), model organizam – opšte karakteristike**

Vrsta *E. venosus* pripada rodu *Ecdyonurus* (Eaton, 1868) koga čini 31 vrsta sa evropskim rasprostranjenjem, od kojih bar 15 naseljava centralnu Evropu (Bauernfeind, 1997). Široko je prihvaćen kao bioindikator voda dobrog kvaliteta, a prema Walshu (2005) ključni je bioindikator u tekućicama. Smatra se osjetljivim taksonom na toksične materije, nisku koncentraciju kiseonika, zasipanje staništa i eutrofikaciju. Jedan je od najkorisnijih indikatora organskog zagađenja jer je široko rasprostranjen u čistim vodama. Naseljava i male i velike tekućice, sa tvrdom do umereno kiselom vodom, brzotekuće vode i sve delove tekućica izuzev najsporijih delova toka (Walsh, 2005).

Opis larve: Dužina tela iznosi od 10 do 17 mm (Slika 2). Telo je svetlo braon, sa tamno braon šarama. Oblik pronotuma i broj čekinja na prosteki su bitni taksonomski karakteri kod ove vrste. Pronotum je duži i manje zaobljen nego kod drugih pripadnika roda *Ecdyonurus*. Broj čekinja na prosteki je uvek veći od deset (Walsh, 2005). Čekinjne na femurima su duge i zašiljene. Posteolateralne bodlje na abdominalnom sternumu su jake i duge. Tarsusi imaju jednu tamnu šaru u vidu trake, distalno. Tarsalne kandžice obično sadrže

dva, eventualno tri zubića. S obzirom na to da žive ispod kamenja u tekućicama gde je struja izražena, larve poseduju morfološke adaptacije. Telo, a posebno glava i unutrašnji segmenti nogu, su dorzo-ventralno spljošteni (Statzner i Holm, 1982). Glava je velika i zaobljena, a sa dorzalne strane glave se nalaze oči. Prvih sedam abdominalnih segmenata nosi sedam pari škrge, koje se sastoje od tanjiraste baze i puno filamenata. Na desetom segmentu abdomena nalaze se dva cerka i središnji kaudalni filament (Macan, 1979; Bauernfeind i Soldán, 2013).

Biologija: Larve naseljavaju epiritralne do hiporitralne zone reka sa kamenitim dnom, a mogu se naći i u obalskoj zoni oligotrofnih jezera. Naseljavaju kamenita staništa sa jakom do umerenom strujom, a plivaju samo povremeno aktivno. Najveću brojnost dostižu u planinskim regionima na 400 metara nadmorske visine, gde preferiraju krečnjačke zone. Sinhronizovanim pokretima škrge prave strujanje vode ka dorzalnoj strani abdomena i cercima, pa ovakvim ventilacionim pokretima snabdevaju škrge većom koncentracijom kiseonika (Bauernfeind i Soldán, 2013). Larve *E. venosus* se hrane perifitonom, koga aktivno pasu, i organskim detritusom, a pokazuju i tendenciju ka oportunističkom načinu ishrane. Njihova ishrana zavisi od hrane koja je dostupna u određenoj sezoni i u trenutku hranjenja. Usni aparat je dobro prilagođen za ispašu i struganje supstrata (Walsh, 2005).



**Slika 2.** Larva *Ecdyonurus venosus* (foto Nikola Vesović)



### 1.1.2. Amphipoda kao bioindikatori

Red Amphipoda je brojna i raznovrsna grupa makroinvertebrata. Obuhvata više od 10 000 vrsta, od kojih je većina marinskih, a nešto manje slatkovodnih i terestričnih (Živić i Tomanović, 2012). Ovi rakovi legu jaja i nemaju larvalni stadijum. Telo je podeljeno na cefalotoraks, koga čine glava i jedan ili dva grudna segmenta, abdomen i telzon. Bočno je spljošteno i nema karapaks. Drugi i treći par grudnih ekstremiteta se nazivaju gnatopode i modifikovani su za hvatanje plena, a poslednja tri para su usmerena ka nazad i služe za plivanje, zarivanje ili skakanje (Živić i Tomanović, 2012). Slatkovodni predstavnici se mogu naći u epibentosu, bentosu i u podzemnim vodama. Širom sveta poznato je oko 2000 vrsta slatkovodnih Amphipoda, od kojih 70% naseljava Palearktiku (Altermatt i sar., 2014). Predstavljaju bitnu komponentu slatkovodnih ekosistemima, jer imaju ključnu ulogu u razlaganju detritusa, a takođe su i bitan izvor hrane za predatore. Ovaj takson poseduje nekoliko osobina zahvaljujući kojima se vrlo često koristi u programima biomonitoringa i u ekotoksikološkim testovima. Amphipoda su usko specijalizovani u odabiru niša, brojačno su dominantni na svojim staništima, tolerantni su na različite fizičko-hemijske parametre supstrata i vode, imaju relativno ograničenu disperziju i mobilnost. Žive direktno u kontaktu sa sedimentom, pa su osetljivi na polutante, a imaju i sposobnost akumulacije toksičnih materija (Thomas, 1993; Alonso i sar., 2010; De-la-Ossa-Carretero i sar., 2012; Glazier, 2014). Zajedno sa kladocerama (npr. *Daphnia*), amfipode se svrstavaju u jedne od najosetljivijih predstavnika makroinvertebrata kako na prisustvo metala, tako i na organske zagađivače (Chaumot i sar., 2015).

Skoro polovina svih slatkovodnih bentosnih Amphipoda pripada superfamiliji Gammaroidea (Glazier, 2014). Rod *Gammarus* predstavlja raznovrsnu grupu amfipodnih rakova. Čini ga preko 200 vrsta. Naseljavaju skoro ceo Holarktički region (izuzev jugozapadnog dela Severne Amerike), gde žive uglavnom u izvorima, ali i u rekama, jezerima, obalskim lagunama i marinskoj litoralnoj zoni (Hou i Sket, 2016). Predstavljaju dominantne vrste makroinvertebrata kada je u pitanju biomasa u mnogim tekućicama (Chaumot i sar., 2015). U izvorskim proširenjima tekućica mogu se naći u vrlo velikom broju ispod kamenja i opalog lišća (Hou i Sket, 2016). Predstavljaju bitne ključne vrste slatkovodnih ekosistema. Kao sekači i detritivori doprinose ciklusu razlaganja materije. Mogu biti i karnivori, hraneći se sitnim beskičmenjacima i lešinama. Zbog svoje široke rasprostranjenosti, značaja u lancu ishrane i osetljivosti na polutante, smatraju se bitnim bioindikatorima za procenu kvaliteta vode. Vrste ovog reda imaju širok trofički repertoar i

sposobnost migracije sa tendencijom ka driftu, što im omogućava da lako kolonizuju ekosisteme. Imaju visok reproduktivni kapacitet i veliki broj potomaka koji su relativno dugoživeći (od 1 do 2 godine) (Gerhardt i sar., 2011). Gamaride su osetljive na širok spektar hemijskih stresora, pa se poslednjih decenija vrlo često koriste u biomonitoringu slatkovodnih ekosistema i kao model organizmi u ekotoksikološkim testovima (Chaumot i sar., 2015). Pogodni su kako za terenska, tako i za laboratorijska ekotoksikološka istraživanja, a takođe se koriste kao model organizmi u biomonitoringu za procenu uticaja efluenata (Gerhardt i sar., 2011; Chaumot i sar., 2015). Kao model organizam za istraživanje u okviru ove doktorske disertacije odabrana je vrsta *Gammarus dulensis*, zbog svih navedenih osobina koje deli sa ostalim predstavnicima roda *Gammarus*, ali i zbog velike brojnosti na ispitivanim lokalitetima.

#### **1.1.2.1. *Gammarus dulensis* (S. Karaman, 1929), model organizam – opšte karakteristike**

S obzirom na to da je rod *Gammarus* najpleziomorfiji takson među amfipodama, vrste ovog roda imaju vrlo sličan habitus, razlikujući se samo po neznatnim aberacijama u obliku i proporciji tela (Hou i Sket, 2016). *Gammarus dulensis*, kao i ostali predstavnici gamarida ima bočno spljošteno i lučno savijeno telo, koje se sastoji od cefalotoraksa, abdomena sastavljenog od šest segmenata i malog telzona. Imaju sedam pari torakalnih nogu prilagođenih za plivanje i za hodanje. Kada se kreću koriste noge i pokrete celog tela, koje savijaju, a kada plivaju često se okrenu lateralno ili leđno, pa ih nazivaju i bočni plivači. Na glavi se nalazi dva para antena pri čemu je prvi par duži, i dobro razvijene oči. Boja tela zavisi od sredine u kojoj žive i varira od svetložute do braon (Živić i Tomanović, 2012).

Opis: Dužina tela iznosi do 12 mm (Slika 3). Boja je žućkasta. Prisustvo ili odsustvo seta je bitan dijagnostički karakter ove vrste. Telo je glatko, metazomalni segmenti slabo setozni, glatki. Kod mužjaka, prvi par antena retko dostiže polovinu dužine tela i slabo je setozan, dok kod ženki oba para antena sadrže nešto više seta. Drugi segment mandibularnog palpusa mužjaka ima 4 do 6 seta na proksimalnom, i 6 do 9 seta na distalnom delu. Gnatopode 1 i 2 su umereno setozne, a sete su posatvljene pravo. Kod mužjaka, pereopode na 6. i 7. abdominalnom segmentu sa unutrašnje strane imaju sete tj. modifikovane su za nošenje jaja. Kod ženki pereopode 3 i 4 imaju guste sete, čija je dužina veća od prečnika segmenta na kome se nalaze. Pereiopoda 3 mužjaka je slabo do umereno setozna, a sete ponekad dostižu dužinu dijametra segmenta na kome se nalaze. Sete na pereiopodi 4 mužjaka

su nešto kraće od onih na prethodnoj pereopodi. Urozomalni segmenti mužjaka nisu uzdignuti, a na njima se nalaze jedna dorzomedijalna i dve dorzolateralne grupe bodlji i seta. Sete su jednake dužine kao bodlje ili duže. Dužina režnjeva telzona mužjaka je više nego duplo veća od širine. Ponekad se sete i bodlje mogu naći na dorzalnoj strani režnja (Karaman i Pinkster, 1987).



**Slika 3.** *Gammarus dulensis* (foto Katarina Stojanović)

## 1.2. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i oksidativni stres

U reaktivne kiseonične vrste (ROS) spadaju slobodni radikali i reaktivne kiseonične vrste (Valavanidis i sar., 2006). Slobodni radikali su atomi ili molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u valentnom omotaču (Gupta i sar., 2005). Pošto sadrže nesparene elektrone, oni su nestabilni, kratkoživeći i visoko reaktivni. Da bi postali stabilni, slobodni radikali stupaju u reakciju sa najbližim stabilnim molekulom uzimajući od njega elektron. Gubitkom elektrona taj molekul postaje slobodni radikal, čime započinje lančana reakcija. Sa fiziološkog aspekta najbitnije reaktivne kiseonične vrste u biološkim sistemima su: slobodni superoksidni anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrogen peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), singletni kiseonik ( $O_2$ ) i lipidni peroksidi (LOOH) (Bagnyukova i sar., 2006; Gupta i sar., 2005,

Lushchak, 2007). Zbog velikog potencijala da izazovu oksidativna oštećenja bitnih ćelijskih biomakromolekula, superoksidni anjon i hidroksil radikal su najviše izučavane ROS. Superoksidni anjon ( $O_2^{\cdot-}$ ) oksiduje određene antioksidanse kao što su vitamini (tokoferol i askorbat), kateholamine i tiole i inaktivira pojedine enzime, kao što je katalaza (CAT) (Valavanidis i sar., 2006). Hidroksil radikal, sa dužinom života od nekoliko nanosekundi, je najbitniji slobodni radikal od velike biološke i toksikološke važnosti zbog svog moćnog oksidativnog potencijala i neselektivne reaktivnosti sa ćelijskim komponentama, kao što su membranski lipidi, enzimski proteini i DNK.

U biološkim sistemima ROS nastaju endogeno, kao produkti normalnog ćelijskog metabolizma i egzogeno, pod uticajem sredinskih stresora. Endogeno nastaju kao sporedni produkti aerobnog metabolizma, parcijalnom redukcijom kiseonika. Tokom aerobne respiracije, za potpunu redukciju molekulskog kiseonika u mitohondrijama neophodna su četiri elektrona, pri čemu nastaje voda. Međutim, parcijalnom redukcijom kiseonika samo jednim elektronom, nastaje superoksidni anjon ( $O_2^{\cdot-}$ ). Hidrogen peroksid se formira dodavanjem jednog elektrona superoksidnom anjonu ili redukcijom molekulskog kiseonika pomoću dva elektrona. Zatim, redukcijom vodonik peroksida jednim elektronom nastaju hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) i hidroksilni anjon ( $OH^-$ ). Lanac se završava dodavanjem jednog elektrona hidroksilnom anjonu, pri čemu se formira voda (Livingstone, 2003; Winston, 1991; Winston i Di Giulio, 1991). Preko 90% kiseonika koji organizmi unose koristi se za proizvodnju energije u elektron-transportnom lancu putem mehanizma četiri elektrona, a manje od 10% unetog kiseonika se redukuje jednim elektronom, pri čemu nastaju ROS (Lushchak, 2011). Koenzim Q i Kompleks III su glavna mesta u mitohondrijskom elektron-transportnom lancu gde molekulski kiseonik reaguje sa elektronima i nastaje  $O_2^{\cdot-}$  (Lushchak, 2011). Osim navedenog, postoje i drugi endogeni izvori ROS u ćelijama. Triptofan dioksidgenaza, ksantin oksidaza i citohrom P450 reduktaza uglavnom proizvode  $O_2^{\cdot-}$ , a oksidaze amino kiselina i glukoze produkuju  $H_2O_2$  (Valavanidis i sar., 2006). Bitan izvor ROS je i katabolizam ćelijskih i stranih komponenti pomoću citohroma P450 u endoplazmatičnom retikulumu (Lushchak, 2011). Egzogeno, reaktivne kiseonične vrste nastaju pod dejstvom različitih sredinskih stresora, kao što su različiti polutanti, pesticidi, lekovi i promene sredinskih faktora (temperatura, kiseonika, pH, koncentracije kiseonika, itd.).

Kada su prisutne u umerenim koncentracijama, reaktivne kiseonične vrste učestvuju u normalnim fiziološkim procesima. Međutim, sredinski stresori uzrokuju povećanu produkciju

ROS, pa tako visoke koncentracije prooksidanata stupaju u reakciju sa ćelijskim makromolekulima, kao što su lipidi, proteini i ugljeni hidrati, i na taj način negativno utiču na ćelijski metabolizam, njegovu regulaciju i na ćelijske komponente. Kako bi se zaštitili, aerobni organizmi su tokom evolucije razvili antioksidativni sistem zaštite, čija je uloga da koncentraciju ROS u organizmu drži pod kontrolom.

Koncentracija ROS je dinamičan parametar zbog svoje konstantne produkcije i eliminacije. U normalnim uslovima, količina produkovanog približno je jednaka količini eliminisanog ROS, odnosno postoji ravnoteža između produkcije prooksidanata i njihove eliminacije antioksidativnim sistemom zaštite. Kada se ta ravnoteža naruši nastaje oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje kada je stabilna koncentracija ROS privremeno ili trajno povećana. Ovakvo stanje izaziva destabilizaciju membrane lizozoma, lipidnu peroksidaciju i oštećenje proteina i DNK unutar ćelija (Stoliar i Luschak, 2012; Mirčić i sar., 2016). Promene u ćelijskim komponentama indukovane oksidativnim stresom utiču na modifikaciju metaboličkih procesa, što uzrokuje fiziološke i patološke promene u organizmima (Mustafa i sar., 2015). Kada se poveća koncentracija ROS, antioksidativni mehanizam zaštite se aktivira, i, ako je dovoljno efikasan, nivo ROS se brzo vraća u normalu, pa se takvo privremeno povećanje koncentracije ROS naziva akutni oksidativni stres. Kada antioksidativnom sistemu treba više vremena da uspostavi ravnotežu i vrati koncentraciju ROS na stabilan nivo, oksidativni stres traje duže, pa se takvo stanje naziva hronični oksidativni stres (Lushchak, 2011).

### **1.3. Antioksidativni sistem zaštite**

Kod akvatičnih organizama, mnogi prirodni i antropogeni faktori (ksenobiotici) mogu da indukuju disbalans između produkcije ROS i njihove eliminacije, izazivajući oksidativni stres. Da bi se organizam zaštitio od posledica oksidativnog stresa, javlja se metabolički odgovor koji uključuje komponente antioksidativnog sistema odbrane (Berra i sar., 2004). Indukcija antioksidativnog sistema se može smatrati adaptivnim odgovorom na izmenjene sredinske uslove, dok inhibicija može da bude znak ćelijskog oštećenja ili toksičnosti biodostupnih ksenobiotika u zavisnosti od njihovih koncentracija (Ferreira i sar., 2005).

Istraživanja o antioksidativnom sistemu zaštite kod insekata na globalnom nivou počela su ranih devedesetih godina dvadesetog veka (Ahmad i Pardini, 1990), ali u poređenju sa sisarima, ovakva istraživanja su oskudna (Olsen i sar., 2001; Berra i sar., 2004; Choi i sar., 2004; Barata i sar., 2005; Shonouda i sar., 2016; Bianchini i sar., 2017; Sanz i sar., 2017).

U Srbiji, istraživanja o antioksidativnom sistemu zaštite kod insekata su malobrojna (Mirčić i sar., 2016; Radojević i sar., 2017; Božanić, 2019; Božanić i sar., 2018; Radojević i sar., 2019), dok se u većoj meri izučava antioksidativni sistem zaštite Mollusca (Borković i sar., 2005; Despotović i sar., 2012; Vranković i sar., 2012; Vranković i sar., 2015; Vranković i sar., 2016; Vranković i sar., 2018).

Antioksidativni sistem zaštite insekata sličan je kao kod drugih eukariota (Sanz i sar., 2010). Čine ga antioksidanti male molekulske mase i antioksidanti velike molekulske mase. Antioksidanti male molekulske mase (neenzimatski antioksidanti, obuhvataju one koji se rastvaraju u vodi, kao što su redukovani glutation i askorbinska kiselina (vitamin C) i one koji se rastvaraju u lipidima – karotenoidi (uključujući  $\beta$ -karoten), retinol (vitamin A),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) (Winston i Di Giulio, 1991; Valavanidis i sar., 2006; Stoliar i Lushchak, 2012). Oni uglavnom deluju kao “sakupljači” slobodnih radikala. Grupu antioksidanata velike molekulske mase čine specifični i nespecifični proteini (Lushchak, 2011). U specifične proteine spadaju antioksidativni enzimi: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPX), DT-diaforaza (DDT), glutation-reduktaza (GR), glutation-transferaza (GST) i glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH) (Winston i Di Giulio, 1991; Bagnyukova i sar., 2006; Valavanidis i sar., 2006; Sanz i sar., 2010; Lushchak, 2011). Nespecifični antioksidanti velike molekulske mase su proteini (metalotioneini i feritin) koji se vezuju za jone metala (najčešće gvožđe i bakar) i na taj način sprečavaju štetu koju bi ROS izazvale. Stabilna koncentracija antioksidanata je obezbeđena ravnotežom između njihove apsorpcije/sinteze, transporta, metabolizma, inaktivacije i ekskrecije. Većina antioksidanata se sintetiše u telu životinja, a neke, kao što su tokoferol i karotenoidi, životinje unose hranom. Produkcija antioksidanata obično zadovoljava potrebe organizma i podvrgnuta je aktivnoj regulaciji (Lushchak, 2011). Regulacija se vrši preko mehanizama za indukciju ekspresije gena odgovornih za sintezu antioksidativnih enzima (Matés, 2001).

Promene aktivnosti antioksidativnih enzima – superoksid-dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) glutation-peroksidaze (GSH-Px) i promena koncentracije glutationa (GSH) se veoma često koriste kao biomarkeri u istraživanjima sredinskih uticaja (Winston i Di Giulio, 1991; Valavanidis i sar., 2006; Stoliar i Lushchak, 2012; Vranković i sar., 2012; Vranković, 2015, 2016; Mirčić i sar., 2016).

Superoksid-dismutaza (SOD) je enzim prve linije odbrane od ROS. Funkcioniše tako što superoksidni anjon radikal konvertuje u vodonik peroksid pri čemu se oslobađa

molekularni kiseonik (McCord i Fridovich, 1969). U zavisnosti od metaloprostetične grupe koju sadrži i položaja u ćeliji, postoji pet formi superoksid dismutaze: NiSOD, MnSOD, CuZnSOD, FeSOD i ECSOD (Halliwell i Gutteridge, 2000).

Glutation-peroksidaza (GSH-Px) predstavlja tetramerni enzim koji u okviru svojih aktivnih mesta sadrži jedinstvenu aminokiselinu selenocistein. Koristeći tiole male molekulske mase, kao što je glutation (GSH), redukuje vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i lipidne perokside nastale kao produkt peroksidacije fosfolipida do odgovarajućih alkohola. Do sada su opisane četiri forme glutacion-peroksidaze: GSH-Px-1, GSH-Px-2, GSH-Px-3 i GSH-Px-4 (Birben i sar., 2012). Glutation-peroksidaza ima visok afinitet prema supstratu ( $H_2O_2$ ), pa efikasnije funkcioniše pri niskim koncentracijama vodonik peroksida (Klimova i sar., 2020)

Katalaza (CAT) katalizuje razlaganje vodonik peroksida do molekularnog kiseonika i vode. Za razliku od GSH-Px, katalaza ima nizak afinitet prema supstratu, pa se najefikasnije razlaganje vodonik peroksida katalazom dešava pri njegovim visokim koncentracijama (Klimova i sar., 2020). Katalaza se smatra senzitivnim SOS biomarkerom, koji rano reaguje na prisustvo zagađivača. Kod organizama koji žive na zagađenim lokalitetima ona pokazuje nižu aktivnost u odnosu na one sakupljene na referentnim mestima (Klimova i sar., 2020). Ovaj enzim može biti inhibiran singletnim kiseonikom, superoksidnim anjonom i peroksil radikalima (Montserrat i sar., 2003).

Glutation (GSH) je najzastupljeniji tiol u eukariotskim ćelijama. Ovaj tripeptid (L-glutamiril-cisteinil-glicin) se sastoji od glutaminske kiseline, cisteina i glicina. Sadrži četiri funkcionalne grupe sa sulfidnim delom koji je zadužen za reaktivnost i odbranu ćelije od ROS (Hellou i sar., 2012). Među neenzimatskim komponentama antioksidativnog sistema zaštite, glutacion se najviše koristi kao biomarker. U ćeliji su zastupljene dve forme glutaciona: oksidovani (GSSG) i redukovani (GSH). Ove dve forme zajedno održavaju ćelijsku redoks homeostazu, regulišu proteinske funkcije kroz S-glutationilaciju i služe kao signalni molekuli koji direktno aktiviraju ekspresiju gena. Ove bitne funkcije su dinamično regulisane intracelularnom koncentracijom i distribucijom GSH (Jiang i sar., 2017). Glutation u svojoj redukovanoj formi se smatra najbitnijim antioksidantom koji štiti ćelijsku membranu od lipidne peroksidacije tako što uklanja kiseonične radikale. Glutation služi i kao kofaktor za nekoliko enzima antioksidativnog sistema zaštite, kao što su glutacion-peroksidaze i glutacion-transferaze, koji vrše detoksifikaciju i ekskreciju različitih toksičnih jedinjenja (Regoli i

Principatto, 2005). Glutation takođe ima ulogu u vraćanju vitamina C i E u svoje aktivne forme i štiti ćeliju od apoptoze (Birben i sar., 2012).

Glutation-S-transferaza (GST) predstavlja enzim koji katalizuje konjugaciju redukovano glutationa (GSH) sa širokim spektrom lipofilnih toksikanata, koji poseduju elektrofilna mesta. Tako dobijeni konjugati se dalje transformišu u metabolite rastvorljivije u vodi, što olakšava njihovu ekskreciju. Na taj način GST štiti ćeliju od njihovih negativnih uticaja (Lee, 1991). Određene glutacion-transferaze katalizuju reakciju dehidrohlorinacije, pri čemu se redukovani glutation koristi kao kofaktor, a ne u funkciji stvaranja konjugata. Takođe, glutacion-transferaze učestvuju i u pasivnom, nekatalitičkom vezivanju za supstrate i sekvencijama, što sprečava vezivanje ksenobiotika za odgovarajuće proteine. Kod eukariota i aerobnih prokariota, glutacion-transferaze se dele u četiri glavne proteinske familije: citozolski GST, mitohondrijalni GST, mikrozomalni GST, i bakterijski Fosfomicin-rezistentni protein, od kojih su citozolski i mikrozomalni GST prisutni kod artropoda (Koirala i sar., 2022).

Glutation-reduktaza (GR) se smatra sekundarnim antioksidativnim enzimom. Ovaj enzim ne deluje direktno na ROS, već regeneriše redukovanu formu glutationa, koji predstavlja koreaktant u GPx katalizovanim reakcijama, pa na taj način omogućava funkcionisanje ovog enzima (Wang i sar. 2001; Couoto i sar., 2016).

#### **1.4. Biomarkeri**

Biomarkeri predstavljaju promene na biohemijskom, ćelijskom, fiziološkom ili bihevioralnom nivou, koja može biti merena u tkivima, ćelijama ili u celom organizmu, a ukazuje na izloženost i/ili efekat jednog ili više hemijskih polutanata (Conti, 2008). Takođe, biomarker se može definisati i kao bilo koji vidljiv ili merljiv funkcionalni odgovor na uticaj jednog ili više polutanata koji se ispoljava na gorepomenutim nivoima (Van Gestel i Van Brummelen, 1996). Mogu se smatrati i indikatorima toksičnosti (Ferreira i sar., 2005) jer ukazuju na izloženost različitim polutantima, kao i kakv je njihov efekat na organizme (Berra i sar., 2004). Postoji nekoliko podela biomarkera. Jedna od njih je podela na biomarkere izlaganja i biomarkere efekta. Biomarkeri izlaganja mogu biti ksenobiotici, njihovi metaboliti ili produkti interakcije ksenobiotika sa molekulom ili ćelijom, koji se mere na nivou organizma ili u okviru neke od njegovih subjedinica (Monserrat i sar., 2003). Biomarkeri izlaganja predstavljaju odgovor organizma, na njegovim različitim nivoima strukturalne organizacije, na izloženost hemijskom jedinjenju ili skupu hemijskih jedinjenja (Conti, 2008).



Ovi biomarkeri ne daju informaciju o toksikološkom uticaju na organizam. Na primer, u ovu grupu biomarkera spada inhibicija plazma esteraza (butirilholinestaraze (BchE) i karboksilesteraze (CbE) izazvana organofosfornim insekticidima. Inhibicija ovih enzima nema štetan uticaj na organizam. Biomarkeri efekta obuhvataju odgovore povezane i sa izlaganjem kontaminantu i sa toksičnim uticajem kontaminanta. Oni se mogu definisati kao bilo koja biohemijska, fiziološka ili bihevioralna promena koja utiče na ceo organizam (Monserrat i sar., 2003). Na primer, dejstvo organofosfornih insekticida (Ops) i karbamata (CBs) izaziva inhibiciju acetilholinesteraze (AchE), što ima izrazito negativan efekat na nervni sistem mnogih organizama (Conti, 2008). Sa toksikološkog aspekta, bitna je podela biomarkera na specifične i nespecifične. Nespecifični biomarkeri predstavljaju odgovore organizma na različitim niovima (genetičkom, molekularnom, ćelijskom, fiziološkom ili bihevioralnom) koji nisu izazvani samo jednom klasom kontaminanata, dok su specifični biomarkeri fiziološki i biohemijski odgovori organizma izazvani tačno određenom klasom polutanata. Nespecifični biomarkeri reaguju na isti način na različite klase kontaminanata (Monserrat i sar., 2003; Conti, 2008). Kada postoji ograničena informacija o unosu ili tipu polutanata u životnoj sredini, najbolje je primeniti nespecifične biomarkere, kao što su parametri oksidativnog stresa i antioksidanata, u cilju procenjivanja stanja životne sredine. Među njima, merenje aktivnosti antioksidativnih enzima se često koristi kao osetljivi biomarker zagađenja akvatične sredine (Monserrat i sar., 2003).

Bitno svojstvo biomarkera je da ukazuju na promene na nivou organizma sa lokalizovanim toksičnim efektom mnogo pre nego što se uticaj polutanta ispolji na nivou populacije. Utvrđivanje odgovora organizama na sredinske stresore upotrebom biomarkera oksidativnog stresa, predstavlja najadekvatniju metodu za otkrivanje ranog uticaja zagađivača (Lam i Gray, 2003; Choi, 2004; Conti, 2008; Stoliar i Luschak, 2012; Hook i sar., 2014) uz mogućnost da se predvide efekti na nivou populacije iz reakcije jedinke.

U svetu se već decenijama primenjuje praćenje biomarkera kod akvatičnih organizama radi rane detekcije negativnih uticaja sredinskih stresora na nivou jedinke. U Srbiji, studije biomonitoringa tekućica do nedavno su obuhvatale samo praćenje promena u strukturi i funkciji zajednica makrozoobentosa zajedno sa praćenjem promena fizičkih i hemijskih parametara vode, dok je korišćenje biomarkera tek poslednjih godina, iako u slabijoj meri nego u svetu, postalo aktuelno u Srbiji.

### 1.5. Uticaj ispusnih voda pastrmskih ribnjaka na tekućice

Akvakultura je grana ribarstva koja se najbrže razvija od svih sektora koji se bave produkcijom hrane životinjskog porekla, sa potencijalom da se takav razvoj nastavi i u budućnosti. Proces produkcije zavisi od bioloških, tehničkih, ekonomskih, institucionalnih i sredinskih faktora, koji su u velikoj meri pod kontrolom čoveka (Guillen i sar., 2019). Posmatrano na globalnom nivou, najveći deo akvakulture zastupljen je u zemljama u razvoju (Boyd, 2003). Produkcija akvakulture u Evropi tokom 2014. godine iznosila je 3192 miliona tona, sa vrednošću od 14,73 milijarde američkih dolara, što predstavlja 3,16 procenata svetske akvakulturne produkcije kada je u pitanju masa. Prema podacima FAO iz 2015. godine, akvakulturna masena produkcija se u periodu od 10 godina, od 2005. do 2015. godine, povećala za 40 %, a njena vrednost se uvećala čak 114%. Većinu (58, 1%) ukupne evropske akvakulturne produkcije čine salmonidne vrste riba (atlantski losos i kalifornijska pastrmka) (Clarke i Bostock, 2017).

U Srbiji, broj pastrmskih ribnjaka je u stalnom porastu. U periodu od deset godina (od 1990. do 2000. godine), njihov broj se udvostručio, a godišnja produkcija je iznosila i do 2000 tona ribe, od čega 75% konzumne pastrmke (Marković i sar., 2007). Isti trend zadržan je i kasnije, pa se tako proizvodnja konzumne pastrmke u periodu od 2008. do 2021. godine kretala između 736 tona (u 2014.) i 2.079 tona u 2019. godini (Marković, 2022.). Prema dostupnim podacima, pastrmski ribnjaci u Srbiji zauzimaju površinu od oko 14 ha (Marković i Poleksić, 2011), a postoje potencijali povećanja ovih površina od 3 do 5 puta (Marković i sar., 2011). Sa intenziviranjem produkcije riba povećava se i količina riblje hrane, ali i otpadnih materija u recipijentima, uključujući organske supstance, nutrijente i suspendovane čvrste materije, što direktno utiče na koncentraciju kiseonika, eutrofikaciju i turbiditet vode (Lin i Yi, 2003; Pulatsu i sar., 2004) tekućica. Produkti metabolizma i ostaci hrane povećavaju koncentraciju rastvorenih nutrijenata i čvrstih materija u recipijentima, što dovodi do povećane potrošnje kiseonika čija koncentracija na taj način može da bude smanjena do kritičnog nivoa za akvatične organizme (Soofiani i sar., 2012). Samo 20 do 50% azota iz riblje hrane se inkorporira u biomasu ribe, dok se ostatak efluentima izbacuje u vodeni tok gde veliki deo biva nataložen u sediment, pa na taj način direktno negativno utiče na ceo ekosistem, a posebno na bentosne organizme (Martinez-Porchas i Martinez-Cordova, 2012).

Pastrmski ribnjaci se grade nizvodno od izvora ili u gornjim delovima vodenog toka, jer pastrmka zahteva hladnu, nezagađenu i dobro aerisanu vodu. Uticaj na životnu sredinu

zavisi od veličine ribnjaka, prisustva i tipa sistema za prečišćavanje vode, sastava i strukture riblje hrane, kao i od karakteristika same tekućice, kao što su nagib, kapacitet i broj pritoka (Živić i sar., 2009). Osim promene u koncentraciji kiseonika, organske supstance koje se ulivaju u reku, u kombinaciji sa navedenim faktorima, izazivaju i druge fizičke i hemijske promene faktora vodenog toka, kao što su promena koncentracije amonijaka, fosfata i, sumpora (Mirčić i sar., 2016). Ove promene negativno utiču na kvalitet vode, a samim tim i na životnu zajednicu akvatičnih ekosistema. Zaštita vodenih ekosistema od negativnog uticaja pastrmskih ribnjaka kroz zakonske regulative je neophodna, a predstavlja zabrinjavajući problem u zemljama u razvoju, gde su ove regulative neadekvatne ili uopšte ne postoje (Živić i sar., 2009). Da bi se to postiglo, potrebno je sprovoditi monitoring, koji će nam pružiti uvid u stanja vodenih ekosistema na kojima se ribnjaci nalaze.

## ***2. Ciljevi istraživanja***

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Doktorska disertacija: „Uticaj pastrmskog ribnjaka na antioksidativni status odabranih vrsta akvatičnih beskičmenjaka“ napisana je u skladu sa sledećim ciljevima:

- Praćenje uticaja ispusnih voda pastrmskog ribnjaka, tokom različitih sezona, na reci Crnici na odabrane biomarkere kod larvi vrste *Ephemera danica* i jeidnki - *Gammarus dulensis*.
- Praćenje uticaja efluenata pastrmskih ribnjaka na reci Crnici i reci Skrapež na nivo aktivnosti enzima antioksidativnog sistema kod larvi *Ecdyonurus venosus*.
- Utvrđivanje interspecijskih razlika u vrednostima parametara antioksidativnog sistema zaštite kod larvi vrsta *Ephemera danica*, *Ecdyonurus venosus* i vrste *Gammarus dulensis*.
- Određivanje klasa kvaliteta vode recipijenta pre i posle ispusta efluenata iz ribnjaka merenjem fizičkih i hemijskih parametara i korišćenjem makroinvertebrata kao bioindikatora.
- Ispitivanje prisustva teških metala u sedimentu reke Crnice i ispitivanje njihovog potencijalnog uticaja na sistem antioksidativne zaštite *Ephemera danica* i *Gammarus dulensis*.
- Analiza uticaja sredinskih faktora na strukturu i dinamiku zajednica makrozoobentosa reke Crnice.

### ***3. Materijal i metode***

### **3. MATERIJAL I METODE**

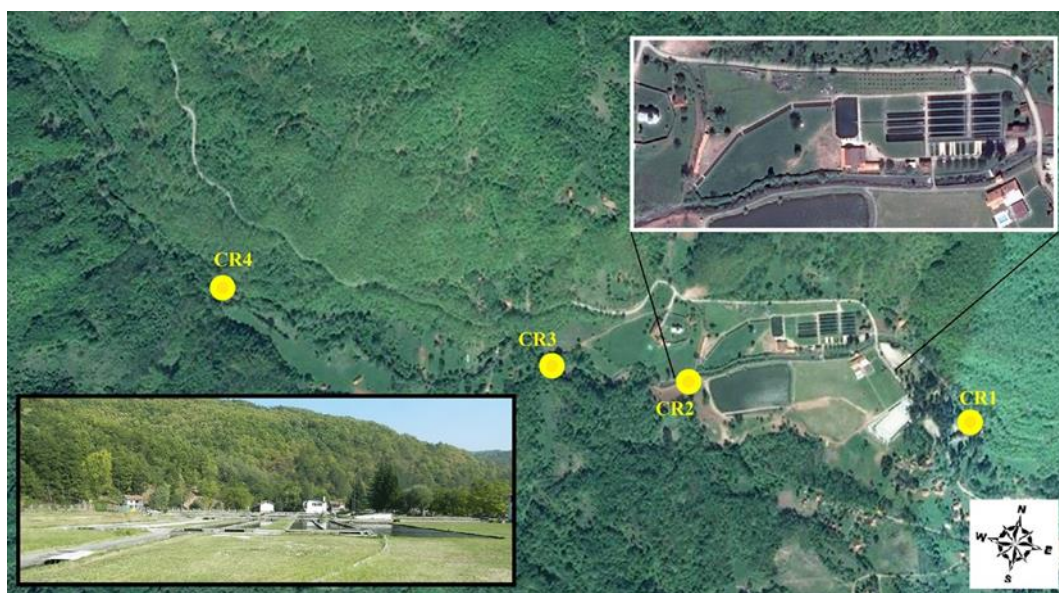
#### **3.1. Opšte i hidromorfološke karakteristike istraživanog područja, ribnjaka i lokaliteta na reci Crnici**

Uticaj pastrmskog ribnjaka za potrebe ove teze na antioksidativni sistem zaštite odabranih vrsta beskickmenjaka praćen je na dve reke – Crnica (istočna Srbija) i Skrapež (zapadna Srbija).

Crnica je jedna od najznačajnijih desnih pritoka Velike Morave, duga 28,6 km. Površina sliva iznosi 338 km<sup>2</sup> (Gavrilović i Dukić, 2002). Izvire u vidu vrela u Sisevačkom basenu na zapadnoj strani Kučaja. Dolina joj je kompozitna. Na svom toku dugom 28,6 km, prolazi kroz Davidovački fluvijalni basen, useca duboke klisure u krečnjaku i gabru, a u Veliku Moravu se uliva zapadno od Paraćina. Srednji protok reke je 2,5 m<sup>3</sup>/s. U slivu dominiraju sedimentne stene. Najzastupljeniji su krečnjaci, koji zauzimaju oko 34% površine sliva. Prosečni pad sliva (196,7) omogućava stvaranje bujičarskih talasa (Gavrilović i Dukić, 2002).

Crnica ima pluvio-nivalni režim sa centralno-evropskom varijantom. Usled prolećnih kiša i otapanja snega, najveći vodostaji zabeleženi su u proleće. U martu, Crnica najviše vode dobija otapanjem snega sa nižih, centralnih delova sliva, dok je najviši aprilski vodostaj posledica otapanja snega u višim delovima sliva, što je praćeno prolećnim kišama. Za vreme prolećnih kiša Crnica ima karakter prave planinske reke sa pojavom bujičarskih talasa. Iako se maksimum padavina javlja u junu, vodostaj tada opada zbog vegetacije, koja upija znatan deo padavina, korišćenja vode za navodnjavanje i visokih temperatura koje pospešuju ispravanje. Sa daljim porastom temperature i smanjenjem padavina tokom letnjih meseci, vodostaj opada. Opadanje vode u reci nastavlja se do oktobra, kada je vodostaj najmanji. Razlog je smanjenje količine padavina, jer u oktobru sliv primi najmanju količinu padavina tokom godine. Krajem oktobra, jesenje padavine uzrokuju porast nivoa vode. Vodostaj raste i tokom zimskih meseci, sve do aprila, kada dostiže svoj maksimum. Količina padavina raste od oktobra do decembra, a zatim opada do februara. U tom periodu reka dobija značajnu količinu vode od kraških izvora (vrela), pa u toku zimskih meseci nivo vode u Crnici raste sve do aprilskog maksimuma (Milić, 2006).

Istraživanja makroinvertebrata u reci Crnici obavljena su sezonski (april, jul i oktobar 2015. i u januaru 2016. godine). Na Crnici, pastrmski ribnjak “Sisevac” je smešten u neposrednoj blizini izvora, u podnožju Kučajskih planina (Slika 4). Bavi se proizvodnjom kalifornijske pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) – mlađi i konzumne ribe. Tip ribnjaka je protočni sa betonskim bazenima. Proizvodna površina je 4200 m<sup>2</sup>. Sastoji se od 43 betonska bazena različitih dimenzija raspoređenih u 5 baterija. Proizvodni kapacitet je 70 tona konzumne kalifornijske pastrmke. Od 2007. godine ribnjak je implementiran ISO 9001 i HACCP standard. Riba je, tokom perioda istraživanja hranjena ekstrudiranom hranom (Skreting OPTILINE HE 3P GAL) sa niskim sadržajem fosfata 0,9%, i sa 42 do 44 % proteina. Za potrebe procene uticaja ribnjaka na sastav i strukturu makrozoobentosa, korišćena je procena masa riba kroz protok ( $m_f/Q$ , Stojanović, 2017).



**Slika 4.** Izgled pastrmskog ribnjaka na reci Crnici i pozicija lokaliteta na kojima su obavljena istraživanja (Stojanović, 2017)

Na reci Crnici odabrana su četiri lokaliteta na kojima je vršeno uzorkovanje (Slika 4): CR1, CR2, CR3 i CR4. Upotrebom GPS uređaja (Geko 201, Garmin) dobijeni su podaci o nadmorskoj visini, geografskoj dužini i geografskoj širini lokaliteta.

**Lokalitet CR1** – 43°57.327N, 21°35.406E, nadmorska visina 348m. Nalazi se 250 metara uzvodno od ribnjaka i predstavlja kontrolni lokalitet. Sa leve strane na obali se nalazi livadska vegetacija, a sa desne strane je šuma. Supstrat čini oko 60 % kamenje, 30 % šljunak i 10 % stene. Od vodene vegetacije prisutne su alge, makrofite i mahovine.





**Slika 5.** Izgled lokaliteta CR1 (foto Katarina Stojanović)

**Lokalitet CR2** – 43°57.296N, 21°34.91E, nadmorska visina 342 m. Lokalitet se nalazi 20 metara nizvodno od ribnjaka. Oko 70% supstrata je krupno kamenje od 5-20 cm. Supstrat čini oko 15% šljunak i 10% pesak. Priobalna vegetacija je žbunovita (šibljaci). Od vodene vegetacije prisutne su alge i makrofite.



**Slika 5.** Izgled lokaliteta CR2 (foto Katarina Stojanović)

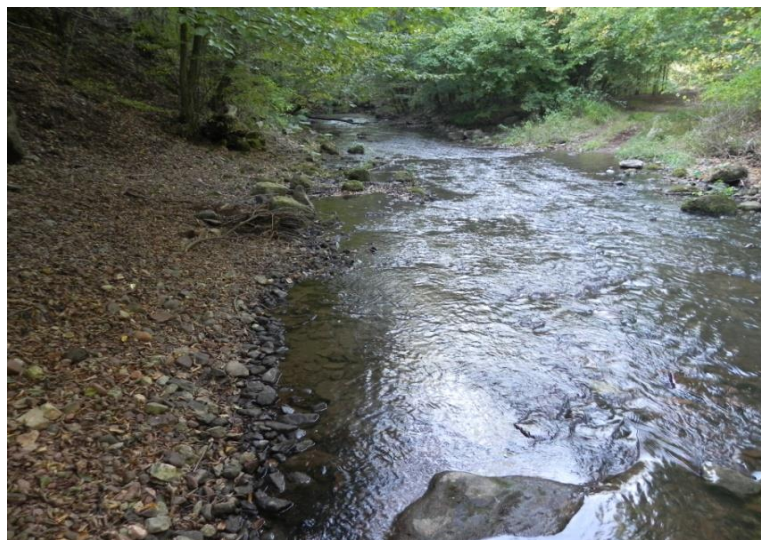
**Lokalitet CR3** – 43°57.279N, 21°34.688E, nadmorska visina 340 m. Lokalitet je 400 metara nizvodno od CR2 lokaliteta. Oko 80 % supstrata je kamenje veličine 5-20 cm, 10 % je

sitan šljunak i 10 % malo krupniji šljunak. Sa leve strane obale se nalazi šuma, a sa desne strane je livada. Vodenu vegetaciju čine alge i makrofite.



**Slika 7.** Izgled lokaliteta CR3 (foto Katarina Stojanović)

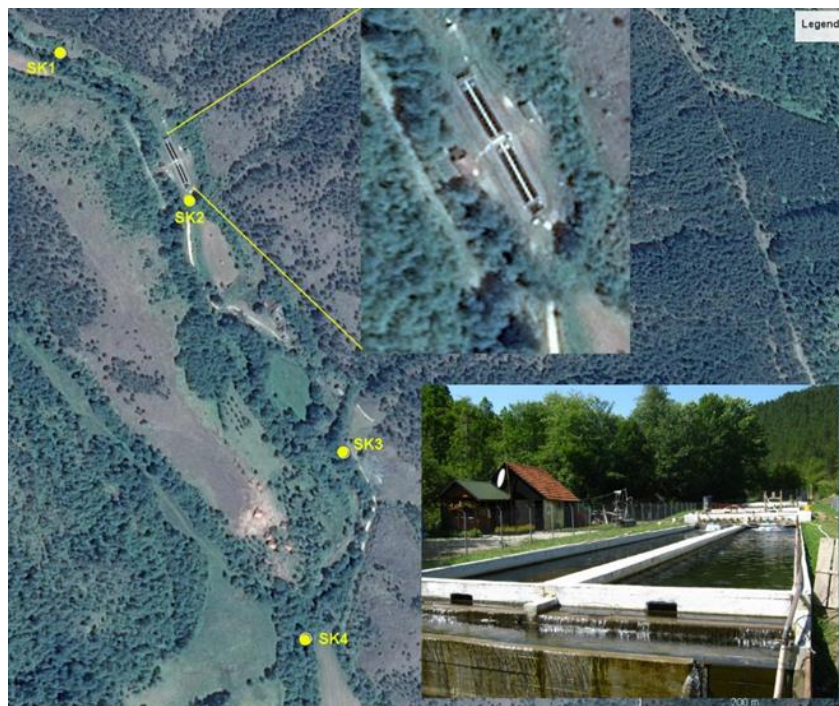
**Lokalitet CR4** – 44°03'40.9"N, 19°50'28.1"E, nadmorska visina 336 m. Lokalitet se nalazi na udaljenosti od 900 metara od trećeg lokaliteta. Oko 65% supstrata je krupnije kamenje veće od 20 cm. 15% je sitan šljunak i pesak, a ostatak je sitnije kamenje. Priobalna vegetacija je šuma. Pokrovnost mahovinama je oko 60%.



**Slika 8.** Izgled lokaliteta CR4 (foto Katarina Stojanović)

### **3.2. Opšte i hidromorfološke karakteristike istraživanog područja, ribnjaka i lokaliteta na reci Skrapež**

Reka Skrapež protiče kroz zapadnu Srbiju. Leva je pritoka Đetinje. Njena dužina toka iznosi 48 km, a površina sliva 743 m<sup>2</sup>. Nastaje ispod vrha Povlena na 1130 m nadmorske visine od više stalnih i povremenih izvorišnih krakova. Najveći izvorišni krak je Taorsko kraško vrelo, koje se nalazi na desnoj strani doline srednjeg toka reke. Kada je u pitanju geološki sastav sliva reke Skrapež, on je složen, ali najzastupljenije su metamorfne stene, koje čine skoro celu desnu stranu sliva. Sliv se karakteriše umereno-kontinentalnom klimom sa prosečnom godišnjom temperaturom od 11°C. Srednja godišnja visina padavina iznosi 750mm. Najviši vodostaj reka Skrapež dostiže u martu, kada su učestale prolećne kiše i otapanje snega, a najniži u septembru, kada je smanjena količina padavina i povećano isparavanje (Kovačević-Majkić, 2009; Božanić, 2019). Pastrmski ribnjak „Kraj vodenice“ izgrađen je na levoj obali reke Skrapež, 2km nizvodno od Taorskih vrela. Čine ga 4 bazena koji se snabdevaju vodom zajedničkim zatvorenim betonskim kanalom dužine 220m. Maksimalna količina vode koju ribnjak može da primi i ispusti u sekundi iznosi 500 litara. Ukupna proizvodna površina ribnjaka iznosi 588m<sup>2</sup> (Božanić, 2019). U aprilu 2015. godine, kada je vršeno uzorkovanje, količina ribe (*Oncorhynchus mykiss*) u ribnjaku iznosila je 1t.



**Slika 9.** Izgled pastrmskog ribnjaka na reci Skrapež i pozicija lokaliteta na kojima su obavljena istraživanja (Božanić, 2018)

Na reci Skrapež odabrana su četiri lokaliteta na kojima je vršeno jednosezonsko uzorkovanje, u aprilu 2015. godine: SK1, SK2, SK3 i SK4. **Lokalitet SK1** - 44°04'00.8"N, 19°50'13.3"E, nadmorska visina 348 m. Nalazi se 180 metara uzvodno od ribnjaka i predstavlja kontrolni lokalitet. Sa obe strane obale nalazi se šumska i zeljasta vegetacija, a sa desne strane je šuma. Supstrat čini oko 70 % kamenje, 10 % šljunak i 20 % sitno kamenje.



**Slika 10.** Izgled lokaliteta SK1 (Foto Milenka Božanić)

**Lokalitet SK2** - 44°03'55.9"N, 19°50'21.2"E, nadmorska visina 566 m. Lokalitet se nalazi 30 metara nizvodno od ribnjaka. Na levoj obali je livada, a na desnoj je zeljasta vegetacija. Oko 70 % supstrata je krupno kamenje obraslo mahovinom, a 30 % čini mulj. Na ovom lokalitetu zastupljene su makrofite, čijem rastu pogoduju efluenti koji se izbacuju iz ribnjaka.



**Slika 11.** Izgled lokaliteta SK2 (Foto: Milenka Božanić)

**Lokalitet SK3** - 44°03'47.8"N, 19°50'28.6"E, nadmorska visina 552 m. Lokalitet je 300 metara nizvodno od SK2 lokaliteta. Oko 70% supstrata je kamenje do 20 cm, 5% je kamenje veće od 20cm, a ostatak čini šljunak i pesak. Na obe obale raste drvenasta i zeljasta vegetacija.



**Slika 12.** Izgled lokaliteta SK3 (Foto Milenka Božanić)

**Lokalitet SK4** - 44°03'40.9"N, 19°50'28.1"E, nadmorska visina 550 m. Lokalitet se nalazi na udaljenosti od 300 metara od trećeg lokaliteta. Oko 80% supstrata je kamenje od 5 do 20 cm, a 20% je šljunak i pesak. Priobalna vegetacija je uglavnom zeljasta, ali je prisutna i drvenasta.



**Slika 13.** Izgled lokaliteta SK4 (Foto: Milenka Božanić)

### **3.3. Merenje fizičkih i hemijskih parametara vode**

Direktno na terenu mereni su sledeći fizički parametri vode: temperatura vode (WT), brzina (V) i protok (Q), kao i dubina (h) i širina (l) rečnog korita. Temperatura vode merena je pomoću MULTI 340i/SET uređaja (WTW, Germany). Merenje je vršeno spuštanjem sonde ispod površine vode, nakon čega je izmerena vrednost očitavana sa displeja. Na ispitivanim lokalitetima, dubina i širina rečnog korita mereni su metrom na svim mestima gde se razlikuje supstrat rečnog dna. Širina rečnog korita izmerena je od leve do desne obale. Na mestima gde je merena dubina toka postavljen je brzinometar (GEOPACKS Stream Flowmeter, UK) pomoću koga je određena brzina toka. Nakon jednog minuta od postavljanja brzinometra na dno korita sa displeja je očitavan broj obrtaja. Brzina toka (V) je izračunata pomoću sledeće formule:

$$V \text{ (m/s)} = 0.000854C + 0.05; \text{ gde „C“ označava broj obrtaja.}$$

Na osnovu podataka o brzini toka, dubini i širini rečnog korita izračunat je protok (Q) na način prethodno opisan u literaturi (Stojanović, 2017; Vranković i sar., 2018). Zastupljenost tipa podloge je na svakom lokalitetu procenjena vizuelno u skladu sa metodom Paunovića (2007).

Kada su u pitanju hemijski parametri, direktno na terenu mereni su: pH, elektroprovodljivost (ec) izražena u  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , koncentracija kiseonika (DO) izražena u mg/l, i zasićenost vode kiseonikom DO izražena u %. Merenje je vršeno upotrebom MULTI 340i/SET uređaja. Na svakom lokalitetu na dubini od 30 cm od površine vode napunjene su polietilenske boce od 500 ml. Uzeti uzorci vode su u roku od 24 časa odneti na hemijsku analizu vode u laboratoriju Agencije za zaštitu životne sredine u Beogradu, gde su primenjene standardne metode za analizu sledećih hemijskih parametara (SRPS ISO/IEC 17025:2006, ISO/IEC 17025:2005, <http://www.sepa.gov.rs>): tvrdoća vode (WH), alkalitet (AL), ukupni alkalitet (TA), koncentracija amonijaka ( $\text{NH}_3$ ) i amonijum jona ( $\text{NH}_4^+$ ), nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ), ukupni azot (Nt), organski azot ( $\text{N}_{\text{org}}$ ), ortofosfati ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), ukupni fosfor (P), sulfati ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), biološka potrošnja kiseonika ( $\text{BOD}_5$ ), hemijska potrošnja kiseonika (COD) i sadržaj ukupnog organskog ugljenika (TOC).

### **3.4. Hemijska analiza sedimenta**

Uzorci sedimenta (10 cm od površine) sakupljeni su sa svih lokaliteta pomoću Van Veen-ovog bagera zahvatne površine  $260 \text{ cm}^2$ . Direktno na terenu, uzorci (po 1000 g) su stavljeni u boce i smešteni u prenosivi kontejner u kome su transportovani u laboratoriju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu, gde su čuvani na temperaturi od  $4^\circ\text{C}$  do daljih analiza.

Pre analize, uzorci su liofilizirani, fino usitnjeni do puderaste strukture, nakon čega su prosejani kroz laboratorijsko sito promera okaca  $63 \mu\text{m}$ . Digestija je vršena prema metodu koji su opisali Thevenon i Poté (2012). Metoda je podrazumevala tretiranje uzoraka (0,5 g) smešom  $\text{HF-HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$  (Sigma Aldrich) i digestiju u mikrotalasnom digestoru (ETHOS 1, Advanced Microwave Digestion System, MILESTONE, Italy). Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, digestovani uzorci su razblaženi destilovanom vodom do ukupne zapremine od 25 ml. Svo plastično i stakleno laboratorijsko posuđe je tretirano azotnom kiselinom 15 minuta, a zatim isprano destilovanom vodom pre upotrebe. Kao inertan gas korišćen je argon visoke čistoće. Analize su izvršene primenom tehnike indukovano kuplovane plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP/ OES, Thermo Scientific iCAP 6500 Duo Instrument, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK), a podrazumevale su detekciju i merenje koncentracije sledećih elemenata: antimon (Sb), arsen (As), kadmijum

(Cd), hrom (Cr), bakar (Cu), živa (Hg), olovo (Pb), mangan (Mn), nikal (Ni), stroncijum (Sr), selen (Se), cink (Zn), gvožđe (Fe), fosfor (P) i sumpor (S).

### 3.5. Uzorkovanje i priprema homogenate i određivanje specifičnih aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije glutaciona

Na svakom lokalitetu, po sezoni, uzorkovano je po 20-25 larvi *Ephemera danica* i *Ecdyonurus venosus* (larve IV stupnja) i 56 do 72 jedinki mužjaka *Gammarus dulensis*, stim da u pojedinim sezonama nije bilo dovoljno jedinki (larve poslednjeg stupnja) potrebnih za analizu antioksidativnih enzima (u proleće nisu nađene jedinke *G. dulensis*, a nasuprot tome *E. venosus* je uzorkovana samo u proleće). Od ukupnog broja sakupljenih gamarusa, za analizu svakog enzima je korišćeno 7 do 9 mužjaka *G. dulensis* (prosečne dužine od 10,30 do 11 mm), sa svakog lokaliteta i u svakoj sezoni kako bi se izbegao efekat veličine jedinki i reprodukcije na biohemijske odgovore.

Svi uzorci organizama su sakupljeni kvalitativnim metodama pomoću bentosnih sita i pinceta. Odmah nakon uzorkovanja uzorci su smešteni u kriokontejner sa tečnim azotom u kom su transportovani do laboratorije Odeljenja za biohemiju i fiziologiju insekata Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, gde su izmerene na vagi preciznosti 0.0001 g (AE 163; Mettler-Toledo International) i čuvane na -80 °C.

Da bi se odredila **aktivnost ispitivanih antioksidativnih enzima i koncentracije glutaciona** korišćeni su homogenati celih jedinki (100 g svežeg uzorka). Uzorci su homogenizovani pomoću homogenajzera (IKA-Werke) u 2 ml saharoznog pufera (0.25 M saharoza, 0.05 M tris-HCl, 1mM etilendiamintetraacetilna kiselina; pH 7.4) na ledu (3 ciklusa po 10 sekundi na 2000 rpm). Homogenati su zatim sonifikovani pomoću sonifikatora (HD2070, Bandelin, Berlin, Germany) u tri ciklusa u trajanju od 15 sekundi i centrifugirani na ultracentrifugi (Beckman L7-55) 100 minuta na 37000 g i 4 °C.

Nakon dodatka 5% sulfosalicilne kiseline (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), deo sonifikovanih homogenata je izdvojen da bi se odredila koncentracija ukupnog glutaciona i centrifugiran na 5000 rpm (centrifuga model 5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany) tokom 10 minuta. Izdvojeni su supernatanti i zamrznuti na -80 °C do daljih analiza.

Koncentracija proteina je određena pomoću Bradfordove metode (Bradford, 1976), a kao standard korišćen je goveđi serum albumin.



### **3.5.1. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD)**

Aktivnost superoksid dismutaze određena je prema metodi Misra i Fridovich (1972). Ova metoda se zasniva na svojstvu ovog enzima da sprečava autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u baznoj sredini. Pri konvertovanju adrenalina u adrenohrom oslobađaju se superoksidni anjon radikali, koji ubrzavaju reakciju autooksidacije. Stopa autooksidacije adrenalina određena je spektrofotometrijski na osnovu promene svetlosne apsorpcije na talasnoj dužini od 480 nm i temperaturi od 25°C, pri čemu su uzorak i adrenalin u karbonatnom puferu pH 10,2 (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 0,1 mM EDTA). Jedinica aktivnosti superoksid dismutaze je količina enzima potrebna da izazove 50% inhibicije autooksidacije adrenalina, a izražava se kao specifična aktivnost (jedinica po miligramu proteina – U/mg).

### **3.5.2. Određivanje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze (GPx)**

Aktivnost glutation-peroksidaze je određena na osnovu metode Tamura i sar. (1982). Metoda se zasniva na kuplovanju enzimske reakcije. Prvo se vrši oksidacija redukovano glutationa (GSH) u oksidovani oblik (GSSG). Ovu reakciju katalizuje glutation-peroksidaza, a supstrat je t-butil hidroperoksid. Zatim dolazi do kuplovanja, kada se redukovani glutation vraća u svoju oksidovanu formu pomoću glutation-reduktaze, pri čemu se oksiduje nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). Stopa smanjenja apsorbanse NADPH merena na frekvenciji od 340 nm tokom oksidacije NADPH u NADP<sup>+</sup>, direktno je proporcionalna aktivnosti GPx. Aktivnost GPx se izražava kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u jednoj minuti (nmol NADPH/min).

### **3.5.3. Određivanje koncentracije glutationa (GSH)**

Koncentracija glutationa je određena prema metodi koju je opisao Griffith (1980). Ova metoda se zasniva na reakciji GSH sa DTNB (5,5 ditio-bis-2 nitrobenzoičnom kiselinom), poznatom i kao Elmanov reagens. Kao produkti ove reakcije nastaju TNB (2-nitro-5-tiobenzoična kiselina), koja ima maksimalnu apsorbanču na 412nm, i oksidovani glutation-TNB produkt (GSH-TNB). Stopa stvaranja TNB, merena spektrofotometrijski na 412 nm, direktno je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Disulfidni produkt (GSH-TNB) se zatim redukuje pomoću glutation-reduktaze u prisustvu NADPH, pa se na taj način GSH reciklira i vraća ponovo u reakciju. S obzirom na to da glutation-reduktaza redukuje GSSG formirajući dva molekula GSH, količina ukupnog glutationa predstavlja sumu redukovano i oksidovanog glutationa u uzorku. Ukupni glutation se izražava u nmol/g tkiva.

### **3.5.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation-transferaze (GST)**

Aktivnost glutation-transferaze (GST) merena je primenom protokola koji su opisali Habig i sar. (1974), pri čemu je kao supstrat korišćen 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). Reakcija se odvijala na 340nm, a enzimatska aktivnost izražena je kao nmol GSH/min/mg proteina. Enzimatski esej izveden je pomoću spektrofotometra (Shimadzu Corporation, model UV-1800 240 V IVDD).

### **3.5.5. Određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze (GR)**

Aktivnost glutation-reduktaze merena je pomoću NADPH i oksidovanog glutationa (GSSG), koji je korišćen kao supstrat primenom kolorimetrijske metode opisane od strane Glatzle i sar. (1974). Jedna jedinica aktivnosti GR definisana je kao oksidacija 1nmol NADPH po minute na 25 C i pH=7,6.

## **3.6. ANALIZA ZAJEDNICE MAKROZOOBENTOSA**

### **3.6.1. Prikupljanje i identifikacija uzoraka makrozoobentosa**

Uzorkovanje makrozoobentosa, u periodu april, jul i oktobar 2015. i januar 2016. godine, vršeno je na sva četiri odabrana lokaliteta, na istraživanim rekama, pomoću Surberove mreže zahvatne površine 300 cm<sup>2</sup> i promera okaca 250 µm. Prilikom svakog uzorkovanja, na svakom od lokaliteta uzeta su po tri poduzorka. Postavljanjem horizontalnog preklopnog rama na dno rečnog korita suprotno rečnom toku omogućeno je sakupljanje jedinki makrozoobentosa u mrežu. Nakon pet minuta mreža se vadi iz vode i ispira, pa na taj način sve jedinke makrozoobentosa sakupljene u mreži bivaju sprane u kolektorsku mrežicu. Iz kolektorske mrežice uzorak se smešta u plastične boce i fiksira 96% alkoholom do dalje analize u laboratoriji Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde se organizmi makrozoobentosa odvajaju od mulja i detritusa, kako bi se izvršila identifikacija.

Na svim lokalitetima uzorkovano je po 5-7 jedinki sva tri model organizma radi identifikacije, koja je urađena u laboratoriji Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta u Beogradu, pomoću Zeiss Discovery V8 stereomikroskopa (Carl ZEISS GmbH, Austrija) uz upotrebu ključeva za identifikaciju dve vrste efemeroptera (Nilsson, 1996; Bauernfeind i Soldán, 2012) i dijagnostičkih karaktera koje su predložili Karaman i Pinkster (1987) u slučaju vrste *G. dulensis*.

Takođe, svi ostali prikupljeni organizmi makrozoobentosa identifikovani su u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu, Biološkog fakulteta. Za identifikaciju jedinki do nivoa vrste, familije ili roda upotrebljena je odgovarajuća literatura (Rozkošny, 1980; Edington i Hildrew, 1981; Pillot, 1984 a, b; Karaman i Pinkster, 1987; Nilsson, 1996; Waringer i Graf, 1997; Glöer i Meier-Brook, 1998; Soldán i Landa, 1999; Zwick, 2004; Lechthaler i Stockinger, 2005; Pillot, 2009; Bauernfeind i Soldán, 2012) i ZEISS Discovery V8 i BRESSER Science ETD-101 stereomikroskop.

### 3.6.2. Ekološke analize zajednica makroinvertebrata

Ekološke analize, koje su se koristile za procenu stepena antropogenog uticaja, tačnije uticaja pastrmskog ribnjaka na zajednicu makroinvertebrata u reci Crnici, podrazumevale su izračunavanje saprobnog indeksa, indeksa diverziteta i biotičkih indeksa. Dodatno je u ekološkoj analizi korišćena brojnost jedinki *Ephemera danica* kao i procentualno učešće Ephemeropetra u zajednici makrozoobentosa (Eph%). Svi parametri ekoloških analiza su izračunati pomoću Sigma plot 12 software (Systat Software Inc., USA).

Indeksi diverziteta predstavljaju matematičke izraze koji obuhvataju tri komponente strukture zajednice makroinvertebrata: bogatstvo vrsta (broj prisutnih vrsta), ujednačenost (uniformnost u distribuciji jedinki među vrstama) i brojnost (ukupan broj prisutnih organizama). Na osnovu indeksa diverziteta se procenjuje odgovor zajednice makroinvertebrata na stanje ekosistema. Ekosistemi koji nisu pod antropogenim pritiskom se karakterišu velikim diverzitetom ili bogatstvom vrsta, uniformnom distribucijom jedinki među vrstama, i umerenim do visokim brojem jedinki. Nasuprot tome, u sredinama koje su pod stresom usled organskog zagađenja, zajednice makroinvertebrata reaguju tako što se broj osetljivih vrsta smanjuje, pa je smanjen diverzitet, distribucija jedinki među vrstama nije ujednačena, a broj tolerantnih organizama se povećava (Metcalf, 1989). Najčešće korišćen indeks diverziteta je Šenonov indeks (Shannon i Wiener, 1949). Obuhvata kvalitativnu komponentu (bogatstvo vrsta – S i ujednačenost u distribuciji jedinki) i kvantitativnu komponentu, za čije izračunavanje se koristi Simpsonov indeks. Šenonov indeks se izražava preko H (maksimalni mogući diverzitet), čija minimalna vrednost može iznositi 0, a maksimalna vrednost predstavlja logaritam od ukupnog broja vrsta u uzorku (S). Što je vrednost H veća, veći je diverzitet, a stanje ekosistema je bolje. Simpsonov indeks

dominantnosti (Simpson, 1949) predstavlja verovatnoću da dve nasumično odabrane jedinice iz zajednice pripadaju različitim vrstama, a njegove vrednosti se kreću od 0 do 1.

Biotički indeksi predstavljaju matematički izraz kojim se određuje kvalitet voda, a zasnovan je na osetljivosti i bogatstvu prisutnih taksona. Za ovo istraživanje korišćeni su ASPT (Average Score per Taxon) i MASPT<sub>po</sub> (modifikovani ASPT<sub>po</sub>) biotički indeksi (Chesters, 1980) koji podrazumevaju identifikaciju taksona do nivoa familije. ASPT indeks predstavlja prosečnu osetljivost familija prisutnih u uzorku, a izračunava se tako što se vrednost BMWP indeksa podeli sa ukupnim brojem brojem prisutnih familija u uzorku. Niske vrednosti ukazuju na zagađenu sredinu, dok više (veće od 6) ukazuju na čistu sredinu (Tabela 1).

**Tabela 1.** Kvalitet vode određen na osnovu vrednosti ASPT indeksa

Vrednost ASPT indeksa	Kvalitet vode
>6	Čista voda
5-6	Sumnjiv kvalitet
4-5	Umereno zagađenje
<4	Ozbiljno zagađenje

Prema pravilniku o nacionalnoj listi indikatora indeks saprobnosti ([www.sepa.gov.rs](http://www.sepa.gov.rs)) – SI definiše se kao biološki indikator statusa voda koji se koristi za ocenu nivoa organskog zagađenja. Prema istom pravilniku, Indeks saprobnosti (SI) se određuje prema metodi Pantle i Buck (1955). Na osnovu vrednosti indeksa saprobnosti, može se odrediti kvalitet vode i saprobiološka zona kojoj pripada (Tabela 2). Što je vrednost indeksa veća, to je kvalitet vode lošiji.

**Tabela 2.** Klasifikacija saprobioloških zona na osnovu vrednosti indeksa saprobnosti po Pantle Buck-u

Saprobiološka zona	Oznaka zone	Indeks saprobnosti
oligosaprobna	o	1,5
betamezosaprobna	$\beta$	2,5
alfamezosaprobna	$\alpha$	3,5
polisaprobna	p	3,5-4

Za procenu brojnosti larvi vrste *E. danica* korišćen je  $E_{ab}$ , koji se izražava kao broj jedinki po kvadratnom metru ( $\text{ind}/\text{m}^2$ ). Osim brojnosti larvi *E. danica*, procenjeno je i procentualno učešće Ephemeropetra u zajednici makrozoobentosa ( $E_{ph}\%$ ).

### 3.7. STATISTIČKE ANALIZE PODATAKA

Dobijeni podaci o aktivnosti antioksidativnih enzima izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Kako bi se uzela u obzir prostorna i sezonska varijabilnost podataka dobijenih analizom biomarkera kod uzoraka *E. danica* i *G. dulensis*, oni su poređeni pomoću dvofaktorske analize varijanse (two-way ANOVA), dok su dobijene vrednosti aktivnosti antioksidativnih enzima kod uzoraka *E. venosus* poređene statistički primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) praćene LSD testom. Za poređenje razlika između aktivnosti antioksidativnih enzima kod jedinki *G. dulensis* između parova lokaliteta korišćeni su t-testovi. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) korišćena je i za poređenje dobijenih podataka o abiotičkim faktorima vode u odnosu na kontrolni lokalitet i u odnosu na lokalitet neposredno ispod ribnjaka. Za sva parna poređenja korišćen je Holm-Sidak test. Jačina korelacije između parova varijabli određena je primenom Pirsonovog koeficijenta korelacije, pri čemu su rezultati bili statistički značajni za vrednost P manju od 0,05. Sigma Plot 12 softver (Systat Software Inc., USA) je korišćen za sve testove.

Podaci o sredinskim parametrima (fizički i hemijski parametri vode i hemijski parametri sedimenta) analizirani su zajedno sa podacima o korišćenim biomarkerima primenom analize koinercije, CIA (Dolédec i Chessel, 1994). Ova analiza omogućava

simultanu ordinaciju dve matrice podataka koje karakteriše isti broj redova. Ose koinercije su izračunate maksimiziranjem kovarijanse faktorijskih skorova dobijenih nezavisnim analizama dve ulazne tabele analizom glavnih komponenti (PCA) korelacione matrice. MonteCarlo permutacioni test je korišćen za proveru značajnosti ko-strukturere između dva seta podataka dobijenih CIA analizom. CIA je urađena primenom ADE4 softvera (Thioulouse i sar., 1997).

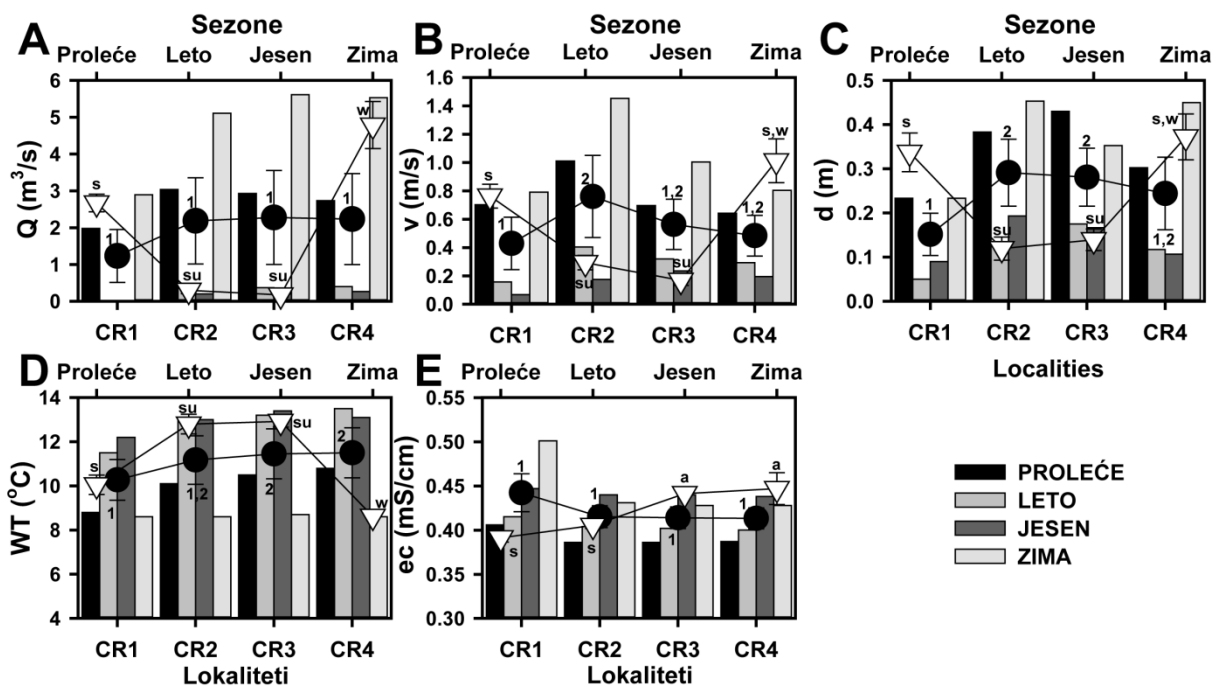
Da bi se opisao odnos između parametara hemijskog sastava sedimenta i biotičkih parametara (koji podrazumevaju ekološke parametre zajednice makrozoobentosa i antioksidativne enzime) korišćena je analiza glavnih komponenti (PCA) korelacione matrice. Analiza glavnih komponenti je izvršena pomoću XLSTAT (verzija 7.5.2) softvera (Addinsoft).

## ***4.Rezultati***

## 4. REZULTATI

### 4.1. Fizički i hemijski parametri reke Crnice

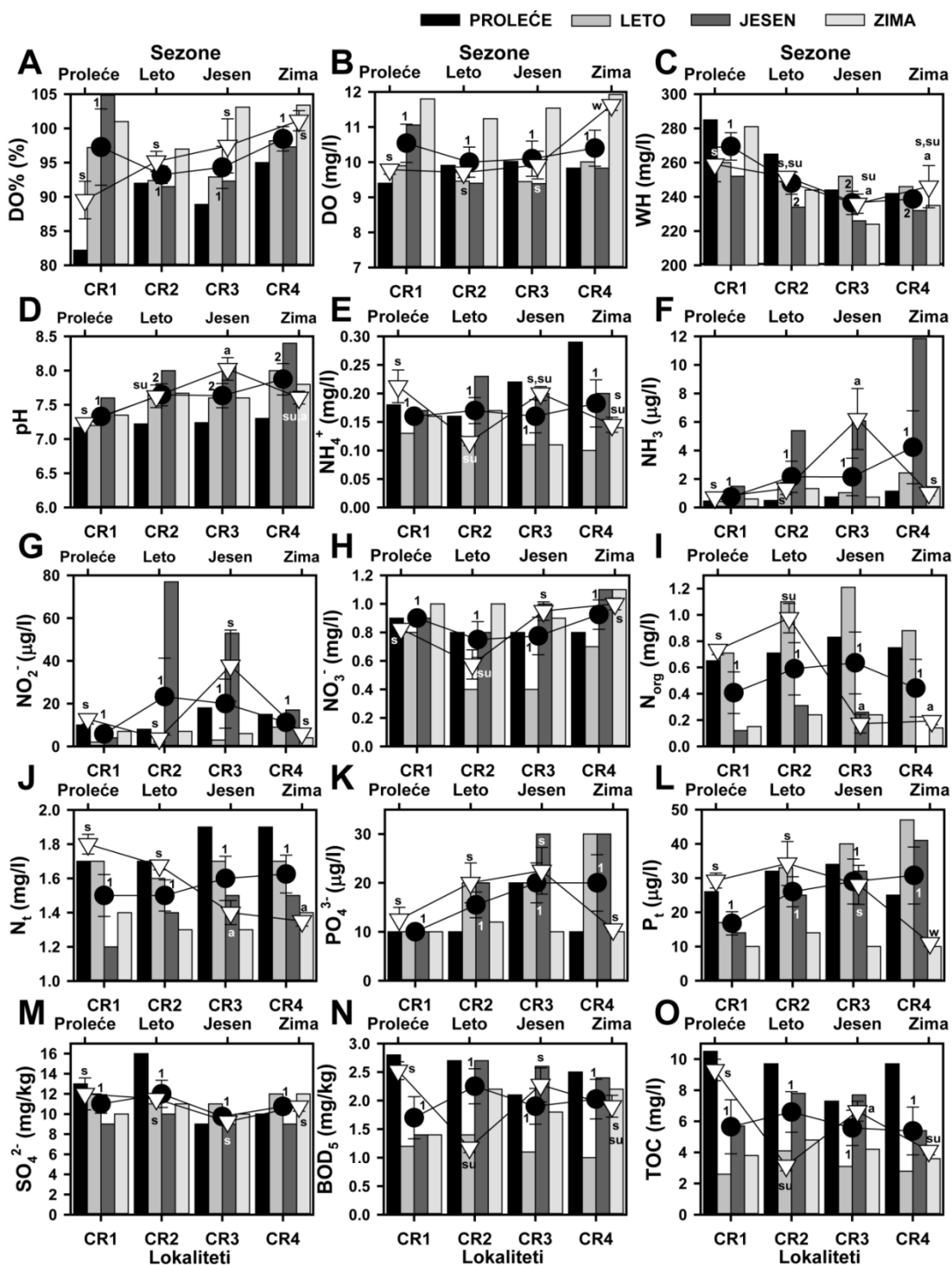
Ako se analiziraju fizički (Slika 14) i hemijski parametri vode reke Crnice (Slika 15), može se uočiti da fizičke parametre karakteriše značajnija varijabilnost. Tako dolazi do statističkog značajnog porasta brzine, dubine i temperature vode na lokalitetu CR<sub>2</sub> u odnosu na kontrolni lokalitet (Slika 14 B, C, D). Statistička značajnost u slučaju brzine se gubi već na CR<sub>3</sub>, u slučaju dubine na CR<sub>4</sub>, dok temperatura vode ostaje statistički značajno viša i na CR<sub>4</sub>. Sezonske varijacije su još izraženije. Protok (Q), brzinu (v), i dubinu (d) vode karakteriše statistički značajan minimum, a tw maksimum u leto i jesen. Ovi ekstremi su najizraženiji u slučaju Q (Slika 14A) vrednosti u jesen su čak 27 puta manje nego u zimu), koji karakterišu i značajno veće vrednosti u zimu nego u proleće.



**Slika 14.** Vrednosti hidroloških i fizičkih parametara vode (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) merenih na četiri lokaliteta (CR1, CR2, CR3 i CR4) i u četiri sezone (proleće, leto, jesen i zimu) duž reke Crnice. Linije na vrhu svakog histograma predstavljaju vrednosti parametra na lokalitetima (puni krugovi) ili u sezonama (prazni trouglovi). Prosečne vrednosti parametara na različitim lokalitetima i iz različitih sezona koji se značajno razlikuju obeleženi su različitim brojevima (1,2,3,4) i odgovarajućim slovima (s- proleće, su- leto, a- jesen, w- zima).



I hemijske parametre vode karakterišu izraženije sezonske nego longitudinale varijacije. Tako samo u slučaju tvrdoće vode (WH) i pH dolazi do statistički značajnog pada, odnosno porasta na lokalitetima nizvodno od kontrolnog (Slika 15C, D). Iako izostaje statistička značajnost na nizvodnim lokalitetima u odnosu na kontrolni lokalitet, dolazi do jasnog porasta vrednosti u slučaju koncentracije amonijaka ( $\text{NH}_3$ ), organskog azota ( $\text{N}_{\text{org}}$ ), ortofosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), ukupnog fosfora ( $\text{P}_t$ ), i biološke potrošnje kiseonika ( $\text{BOD}_5$ ) (Slika 15 F, I, K, L, N) ili pada u slučaju zasićenosti vode kiseonikom ( $\text{DO}\%$ ) i koncentracije rastvorenog kiseonika (DO) (Slika 15 A, B). Ove promene su pre svega uslovljene vrednostima ovih parametara u leto i/ili jesen, dok je izostanak statističke značajnosti posledica izostanka promene ili suprotnosmernim promenama u proleće i/ili zimu. Za razliku od uočenih promena hemijskog sastava sedimenta koje su strogo lokalizovane na CR<sub>2</sub>, promene ispitivanih hemijskih parametara vode ne karakteriše oporavak sa izuzetkom  $\text{DO}\%$ ,  $\text{N}_{\text{org}}$  i  $\text{BOD}_5$ .



Slika 15. Vrednosti hemijskih parametara vode merenih na četiri lokaliteta (CR1, CR2, CR3, i CR4) i u četiri sezone (proleće-sp, leto-s, jesen-a i zima-w) duž reke Crnice. Linije na vrhu svakog histograma predstavljaju vrednosti parametra na lokalitetima (zatvoreni krugovi) ili u sezonama (otvoreni trouglovi). Prosečne vrednosti parametara na različitim lokalitetima i iz različitih sezona koji se značajno razlikuju obeleženi su različitim brojevima (1,2,3,4) i odgovarajućim slovima (s, su, a, w)

#### 4.2. Fizički i hemijski parametri reke Skrapež

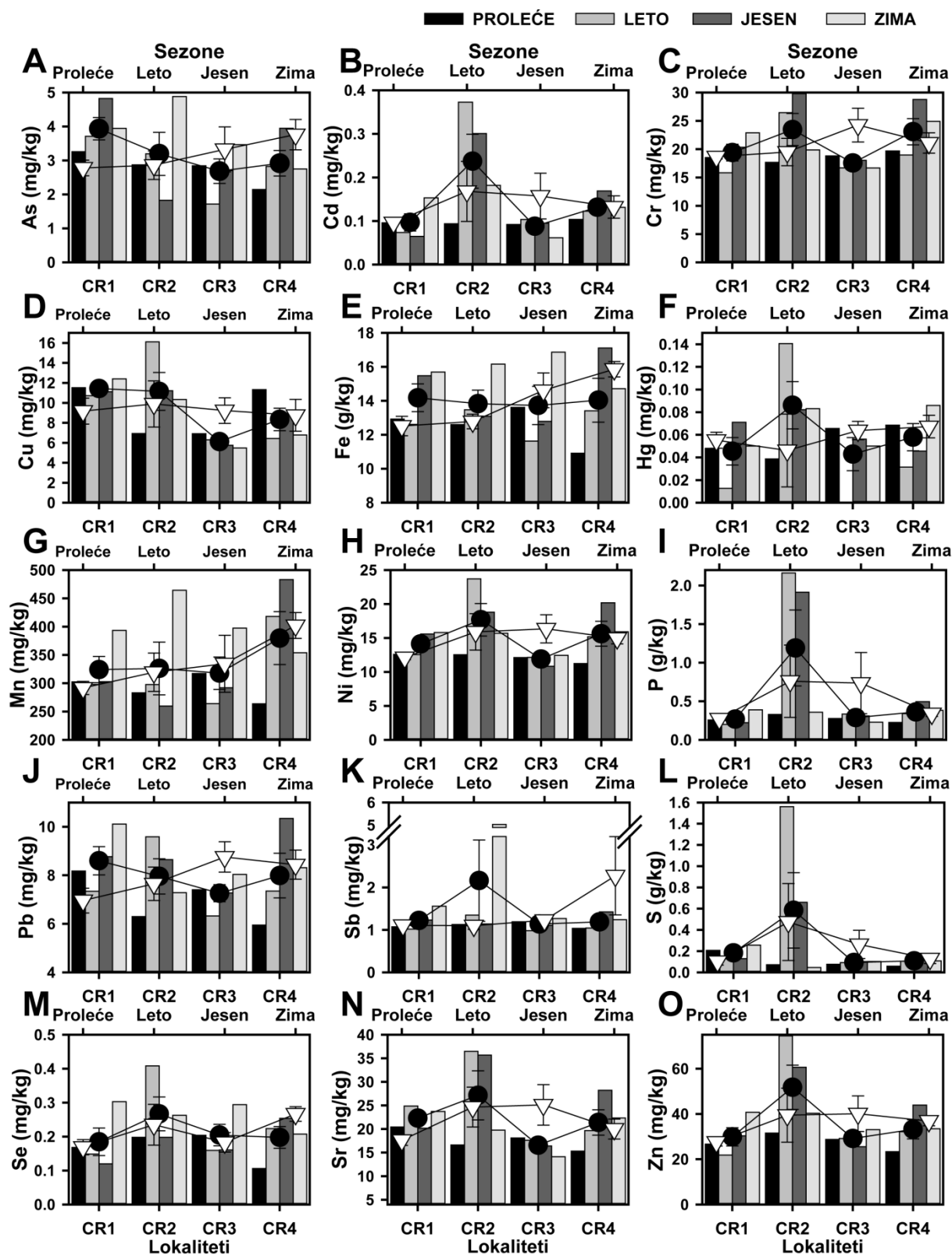
Vrednosti fizičkih i hemijskih parametara reke Skrapež i Crnice merenih tokom proleća na istraživanim lokalitetima prikazane su u Tabeli 3. Analizirajući promene njihovih vrednosti duž lokaliteta vidimo da je najveći uticaj ribnjak ispoljio na sledeće abiotičke parametre reke Skrapež: koncentraciju rastvorenog kiseonika, koncentracija nitrata, nitrita, sulfata, amonijum jona i ukupni organski ugljenik, dok se od prolećnih vrednosti abiotičkih parametara reke Crnice izdvaja protok, čije vrednosti su nekoliko puta veće od onih merenih u reci Skrapež (Tabela 3).

**Tabela 3.** Vrednosti abiotičkih parametara vode na lokalitetima duž reka Skrapež i Crnica u proleće

	WT (°C)	DO% (%)	DO (mg/l)	AL (mmol/l)	WH (mg/l)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	TA (mg/l)	pH	ec (μS/cm)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	N <sub>org</sub> (mg/l)	N <sub>t</sub> (mg/l)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/l)	P <sub>t</sub> (mg/l)	Ca <sup>2+</sup> (mg/l)	Mg <sup>2+</sup> (mg/l)	Cl <sup>-</sup> (mg/l)
<b>SK1</b>	13.4	88.7	9.28	3.7	204	224	184	8.28	323	0.10	0.006	0.6	1.24	2.1	0.01	0.017	66	12	2
<b>SK2</b>	13.5	82.4	8.60	3.9	218	235	193	8.09	326	0.21	0.009	1.1	0.83	2.2	0.01	0.035	71	12	2
<b>SK3</b>	13.3	87.2	8.85	3.8	199	236	192	8.19	326	0.22	0.005	0.6	1.25	2.1	0.03	0.070	64	11	2
<b>SK4</b>	12.9	88.1	8.96	3.8	208	234	192	8.25	325	0.21	0.008	0.7	1.27	2.2	0.02	0.049	67	12	1
<b>CR1</b>	8.8	82.2	9.40	5.0	285	303	249	7.17	406	0.18	0.010	0.9	0.65	1.7	0.01	0.026	109	4	1
<b>CR2</b>	10.1	92.0	9.91	4.4	265	266	218	7.22	386	0.16	0.008	0.8	0.71	1.7	0.01	0.032	101	4	1
<b>CR3</b>	10.5	88.9	10.02	4.4	244	270	221	7.24	386	0.22	0.018	0.8	0.83	1.9	0.02	0.034	93	4	1
<b>CR4</b>	10.8	95.0	9.83	4.4	242	271	222	7.30	387	0.29	0.015	0.8	0.75	1.9	0.01	0.025	92	4	1

### **4.3. Hemijskog sastava sedimenta reke Crnice**

Analiza hemijskog sastava sedimenta pokazuje da nijedan od ispitivanih elemenata ne karakterišu statistički značajne razlike kako između sezona tako i između lokaliteta (slika 16). Međutim, u slučaju kadmijuma (Cd), hroma (Cr), nikla (Ni), stroncijuma (Sr), cinka (Zn) (Slike 16B, C, H, N, O) i posebno sumpora (S) i fosfora (P) (Slika 16I, L) može se uočiti značajan porast koncentracije u toku leta i jeseni, a u slučaju bakra (Cu), selena (Se) i žive (Hg) (Slika 16D, F, M), samo u toku leta na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka (CR2). Ovaj porast je ograničen i prostorno (samo na CR2) i vremenski (samo na pomenute sezone) usled čega izostaju statistički značajne promene koncentracije ovih elemenata.



**Slika 16.** Vrednosti parametara hemijskog sastava sedimenta merenih na četiri lokaliteta (CR1, CR2, CR3 i CR4) i u četiri sezone (proleće, leto, jesen i zimu) duž reke Crnice. Linije na vrhu svakog histograma predstavljaju vrednosti parametra na lokalitetima (puni krugovi) ili u sezonama (prazni trouglovi).

#### 4.4. Struktura i sastav zajednice makrozoobentosa reke Crnice

Analiza parametara zajednice makrozoobentosa reke Crnice podrazumevala je određivanje faunističkog (kvalitativnog) sastava, određivanje različitih indeksa diverziteta, biotičkih i saprobnog indeksa tj. metričkih osobina zajednice u cilju procene sredinskih uticaja, pre svega ribnjaka, na zajednicu makrozoobentosa. Takođe, prikazana je multivarijantna analiza abiotičkih faktora vode, hemijskog sastava sedimenta i odabranih metričkih osobina, odnosno indeksa, koja je podrazumevala primenu analize koinercije CIA i PCA analizu.

##### 4.4.1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Crnice

U reci Crnici tokom četiri sezone, na četiri lokaliteta identifikovano je ukupno 46 taksona, od kojih je 29 identifikovano do nivoa vrste, 1 do grupe vrsta, 14 do nivoa roda, 1 do nivoa familije i 1 do nivoa reda (Prilog 1).

U zajednicama makrozoobentosa dominantan udeo imale su larve različitih redova insekata. Najraznovrsniji red bio je Ephemeroptera sa 13 identifikovanih taksona. Zatim slede Trichoptera sa 8, i Diptera sa 7 identifikovanih taksona. Red Plecoptera zastupljen je sa 4, a red Coleoptera sa 3 taksona. U okviru filuma Mollusca i Annelida identifikovana su po 2 taksona. Iz subfiluma Crustacea zabeležena su 4 taksona. Po jedan takson identifikovan je iz reda Odonata, i iz filuma Plathyhelminthes. Vodene grinje, Hydracarina, nadjene su samo na jednom lokalitetu – CR1 u malom broju i nije vršena dalja identifikacija.

U zajednici makrozoobentosa reke Crnice, najraznovrsniji red je Ephemeroptera sa 13 identifikovanih taksona medju kojima je 10 identifikovano do nivoa vrsta i 3 do nivoa roda (Prilog 1). U okviru ovog reda najraznovrsnija je familija Baetidae sa 6 determinisanih vrsta, zatim Heptageniidae sa 5, a najmanje raznovrsne familije su Ephemeridae i Ephemerellidae sa po jednom identifikovanim vrstom. Tri taksona (*Baetis melanonyx*, *Baetis lutheri* i *Epeorus* sp.) nadjena su samo na jednom – CR4 lokalitetu. *Baetis melanonyx* i neidentifikovani pripadnici roda *Epeorus* (izuzev *Epeorus assimilis*) nadjeni su samo na CR4 u leto i to u malom broju. *Baetis lutheri* zastupljen je takodje samo na CR4 lokalitetu, ali u svim sezonama, pri čemu najveću brojnost dostiže u leto. *E. assimilis* nadjen je na CR3 i CR4 u proleće i na CR2, CR3 i CR4 u zimu. Na svim lokalitetima prisutni su: *Baetis rhodani*, *Baetis vernus*, *Ephemera danica*, *Ecdyonurus* sp. i *Rhithrogena semicolorata* gr., pri čemu su *Baetis*

*rhodani*, *Ephemera danica* i *Ecdyonurus sp.* prisutni u svim sezonama. *Ephemerella ignita* bila je zastupljena samo tokom leta, na lokalitetima nizvodno od ribnjaka (CR2, CR3 i CR4), što je povezano sa životnim ciklusom ove vrste (Maitland, 1965).

Drugi po raznovrsnosti je red Trichoptera sa 8 identifikovanih taksona, od kojih 6 do nivoa vrste i 2 do nivoa roda (Prilog 1). Među Trichopterama najveća raznovrsnost zabeležena je u okviru familije Hydropsychidae (3), zatim slede podjednako raznovrsne Rhyacophilidae (2) i Limnephilidae (2), a najmanje raznovrsna je familija Sericostomatidae sa jednom identifikovanom vrstom.

U okviru reda Diptera (Prilog 1) identifikovane su 3 vrste, 3 roda i 1 familija (Chironomidae). Obe vrste iz familije Athericidae, *Atherix ibis* i *Atherix marginata*, nadjene su samo na CR4 lokalitetu - *Atherix ibis* samo tokom leta, a *Atherix marginata* tokom leta i zime. *Dicranota bimaculata* je bila prisutna samo u letnjoj sezoni i to na CR1 lokalitetu u malom broju. Malobrojni pripadnici roda *Limnophila* nadjeni su samo na CR3 lokalitetu tokom zime. Predstavnici roda *Simulium* bili su deo zajenice makroinvertebrata reke Crnice samo tokom leta i to na lokalitetima nizvodno od ribnjaka (CR2, CR3 i CR4). Ujedno, kvantitativno posmatrano, ubedljivo najveću brojnost pripadnici roda *Simulium* dostižu na CR2 lokalitetu (1210 jedinki). To su najverovatnije vrste adaptirane na veće organsko zagađenje i visoke koncentracije azota, fosfora i sumpora, pa su brojne na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka. Njihova brojnost je skoro pet puta manja na CR3 u odnosu na CR2, a minimum dostiže na CR4 lokalitetu, koji je i najudaljeniji od ribnjaka. Rod *Tipula* zabeležen je jedino tokom zime, u malom broju na lokalitetima CR3 i CR4. U ovom istraživanju nije radjena identifikacija Chironomida do nivoa vrste, pa nije realno prikazano stanje kada je u pitanju raznovrsnost reda Diptera, za koji bi se očekivalo da je najraznovrsniji u okviru ispitivane zajednice makrozoobentosa reke Crnice (Stojanović, 2017).

Red Plecoptera bio je zastupljen sa 4 taksona od kojih su dva determinisana do nivoa vrste i dva do nivoa roda (Prilog 1). Predstavnici roda Brachyptera nadjeni su samo u zimu na jednom lokalitetu (CR1), izuzev vrste *Brachyptera risi*, koja je bila zastupljena i u proleće na prva tri lokaliteta. Preostala dva taksona – *Leuctra sp* i *Diura bicaudata* pronađena su samo na CR4 lokalitetu, *Leuctra sp.* u zimu, a *Diura bicaudata* u proleće.

U okviru reda Coleoptera determinisana su 3 taksona (2 vrste i 1 rod). Sva tri predstavnika tvrdokrilaca su zastupljena na CR4 lokalitetu u leto, od kojih su pripadnici roda *Limnius* nadjeni samo tada, dok su *Elmis aenea* i *Hydraena gracilis* nadjeni i tokom zime na

CR1 i CR2 (*E. aenea*), ili samo na CR2 (*H. gracilis*) lokalitetu. Najmanje raznovrstan red insekata sa samo jednim identifikovanim taksonom je red Odonata. *Cordulegaster annulatus* nadjen je samo na CR3 lokalitetu (Prilog 1) tokom zime u malom broju.

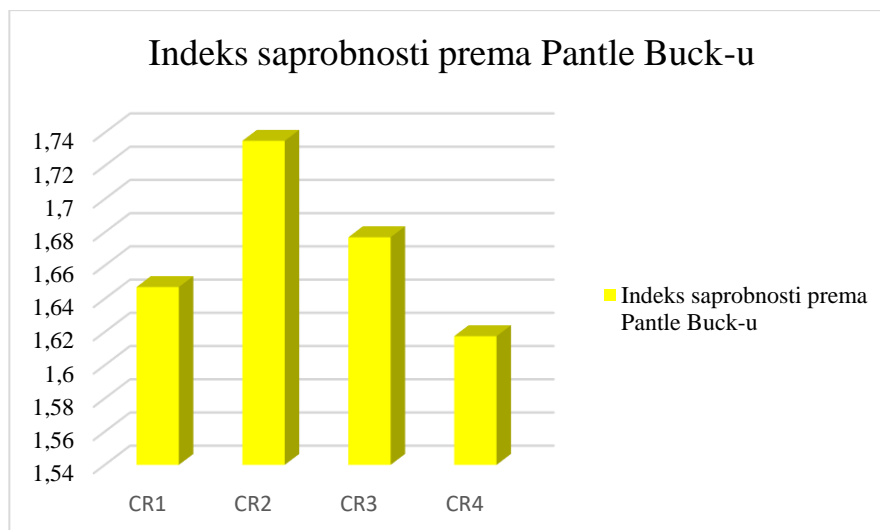
U okviru neinsekatskih grupa (Prilog 1), najraznovrsniji i najbrojniji su Crustacea sa 4 identifikovana taksona. Oni su bili prisutni u svim sezonama i na svim lokalitetima. Mekušci su bili zastupljeni sa po jednim identifikovanim taksonom puževa – *Lymnaea* sp. i školjki – *Pisidium* sp. Oba taksona su nadjena samo na CR3 lokalitetu tokom zime. Od pljosnatih crva identifikovan je samo jedan takson (*Dugesia lugubris*). Ova vrsta je bila prisutna u svim sezonama izuzev proleća. U leto je bila prisutna na drugom i četvrtom lokalitetu, u jesen na svim lokalitetima, pri čemu je najbrojnija bila na prvom, a u zimu pronadjena je na prvom i trećem lokalitetu. Iz filuma Annelida pronadjen je jedan predstavnik pijavica - *Erpobdella octoculata*, samo na CR2 lokalitetu tokom jeseni, što nije iznenadjujuće imajući u vidu da ova vrsta živi u organski zagađenim vodama (Murphy and Learner, 1982). Od člankovitih crva bili su prisutni i predstavnici reda Oligochaeta, koji nisu dalje identifikovani. Vodene grinje su zastupljene samo na CR1 lokalitetu u proleće, u malom broju i nisu dalje identifikovane.

#### 4.4.2. Rezultati ekoloških analiza

##### a) Analiza indeksa saprobnosti prema Pantle Buck-u

Analizirajući dobijene srednje vrednosti indeksa saprobnosti prema Pantle i Buck-u (1955) (Grafik 1) jasno uočavamo maksimum na CR2 lokalitetu (1,735), dok nizvodno njegove vrednosti pravilno opadaju, dostižući minimum na CR4 lokalitetu (1,617). Sudeći prema dobijenim vrednostima saprobnog indeksa prema Pantle i Buck-u (1955), voda na svim lokalitetima se klasifikuje kao betamezosaprobna (Tabela 2), pri čemu se u okviru same klase vode može uočiti razlika između prvog, gde je najbolji kvalitet vode, i drugog lokaliteta (Grafik 1), gde je najlošiji kvalitet vode, što je jasan pokazatelj uticaja ribnjaka na kvalitet vode, koja se nizvodno pogoršava.

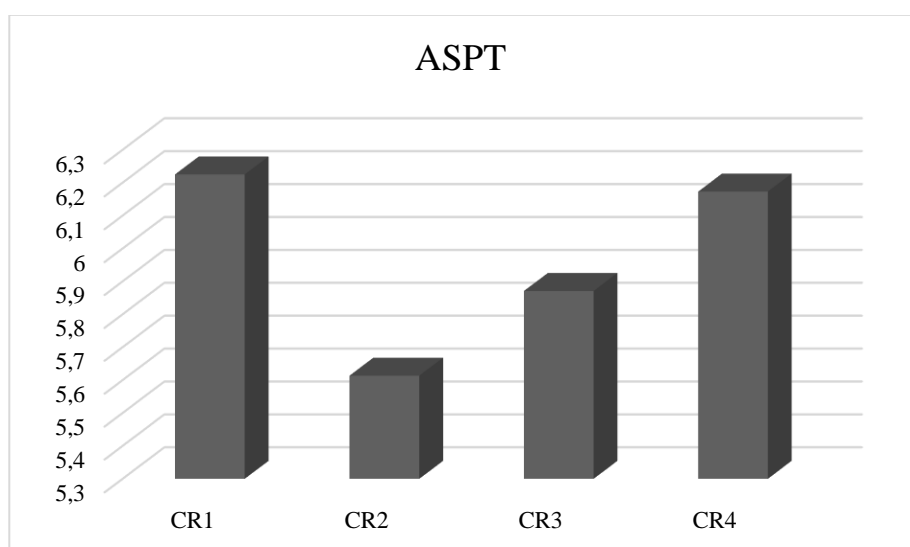




**Grafik 1.** Vrednosti saprobnog indeksa po Pantle Buck-u na istraživanim lokalitetima

### b) Analiza biotičkog ASPT indeksa

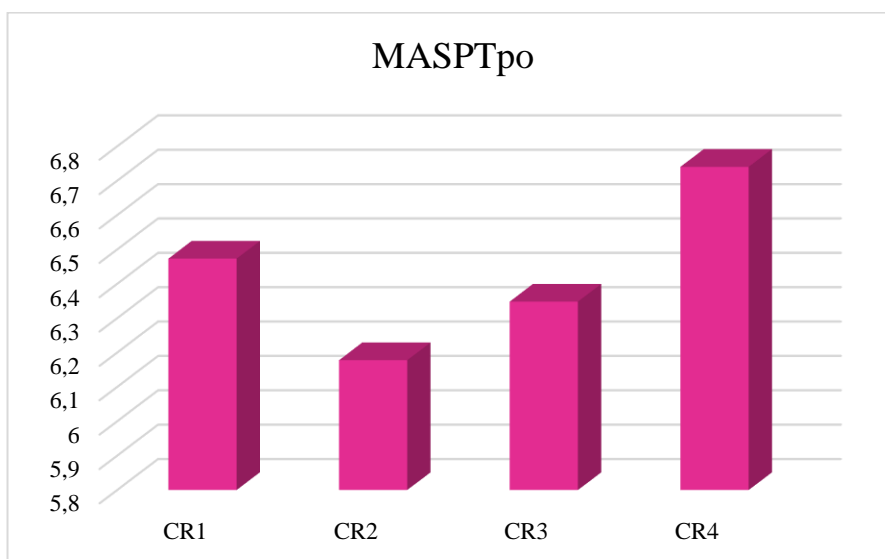
Analizirajući srednje vrednosti ASPT indeksa vidimo da je najniža na CR2, a najviša na prvom lokalitetu (Grafik 2). CR1 i CR4 lokalitet karakterišu približne, maksimalne vrednosti koje ukazuju da je voda čista, dok su na CR2 lokalitetu minimalne srednje vrednosti odnosno voda je sumnjivog kvaliteta. Najveća razlika između srednjih vrednosti ASPT indeksa zabeležena je između CR1 i CR2 lokaliteta, što opet ukazuje na vidljiv uticaj ispusnih voda ribnjaka.



**Grafik 2.** Vrednosti biotičkog ASPT indeksa na istraživanim lokalitetima

### c) Analiza biotičkog MASPTpo indeksa

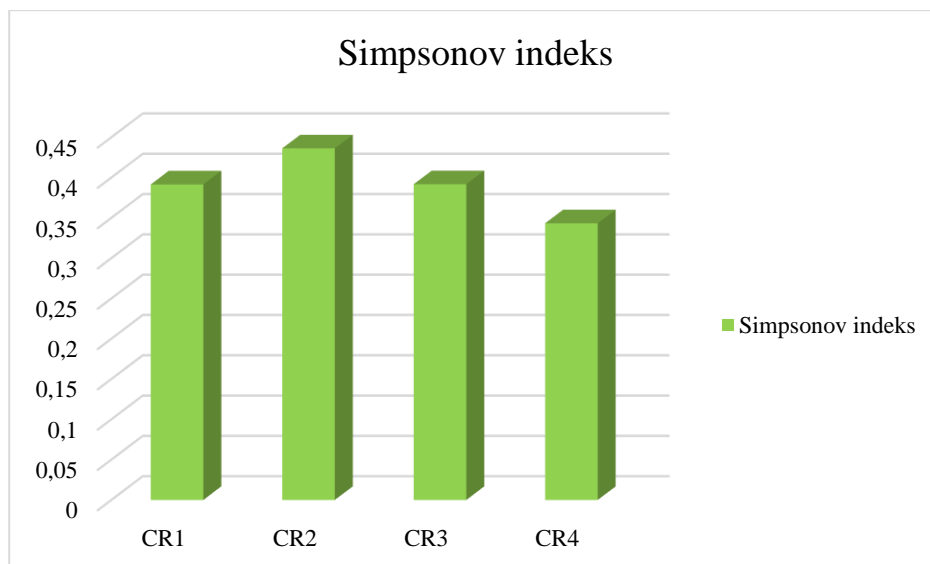
Srednje vrednosti MASPTpo indeksa prate isti trend longitudinalnih promena kao srednje vrednosti ASPT indeksa, izuzev maksimuma, koji kod MASPT nije na CR1, nego na CR4 (6,740, Grafik 3). Minimum je, kao i kod ASPT, na lokalitetu CR2 (Grafik 3). Vrednosti ovog indeksa su na svim lokalitetima nešto više u poređenju sa ASPT indeksom, dok su kao i kod ASPT-a, prolećne vrednosti praktično identične na sva četiri lokaliteta. Na osnovu dobijenih srednjih vrednosti ovog indeksa, voda na svim lokalitetima je dobrog kvaliteta (Grafik 3).



**Grafik 3.** Vrednosti biotičkog MASPTpo indeksa na istraživanim lokalitetima

### d) Analiza Simpsonovog indeksa dominantnosti

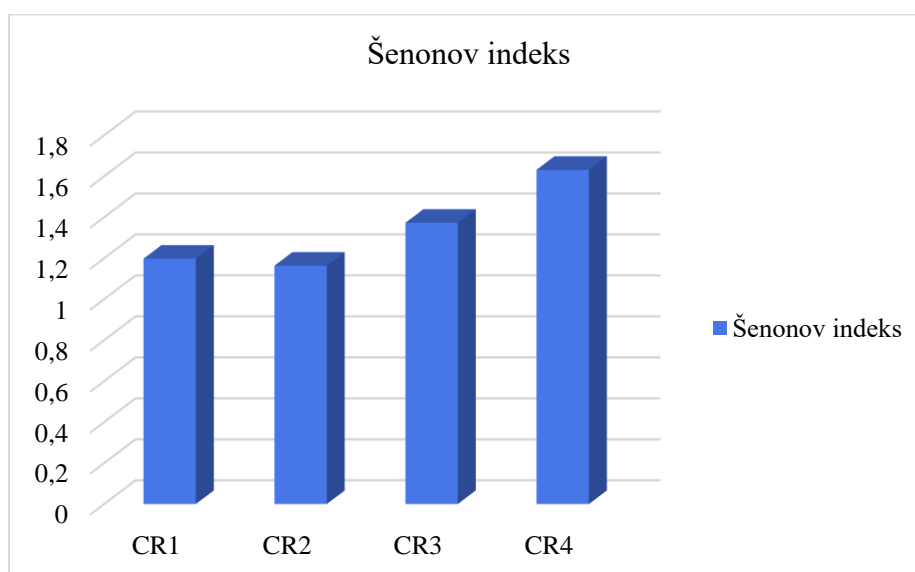
Srednja vrednost Simpsonovog indeksa dominantnosti najveća je na CR2 (0,436, Grafik 4), što ukazuje na najmanji diverzitet vrsta na ovom lokalitetu, što je očekivana posledica dejstva efluenata iz ribnjaka. Vrednost Simpsonovog indeksa opada nizvodono, što ukazuje da se diverzitet vrsta povećava. Najmanja srednja vrednost ovog indeksa je na CR4 lokalitetu (0,343, Grafik 4), pa je na ovom lokalitetu najveći diverzitet vrsta.



**Grafik 4.** Prosečne vrednosti Simpsonovog indeksa dominantnosti na istraživanim lokalitetima

#### e) Analiza Šenonovog indeksa diverziteta

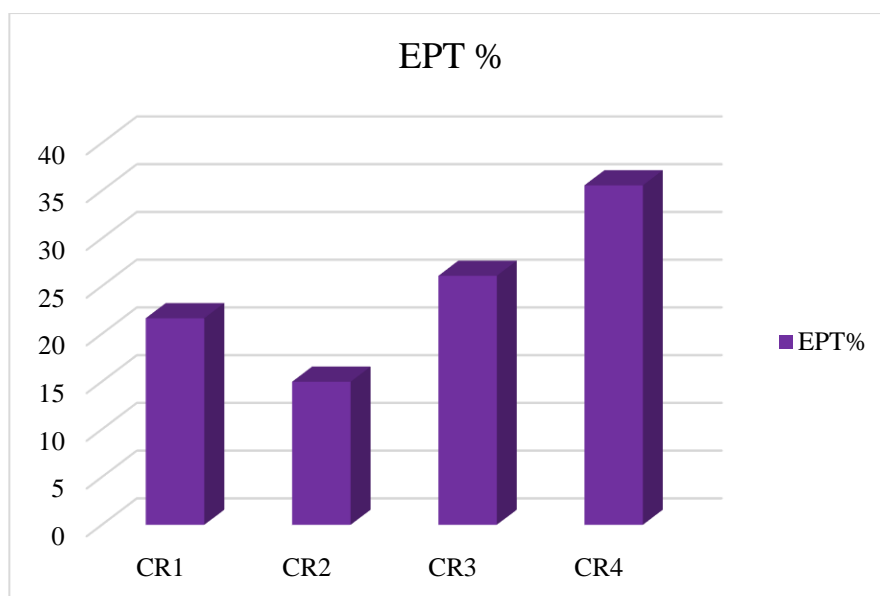
Vrednosti Šenonov indeksa takođe potvrđuje da je diverzitet najmanji na CR2 lokalitetu (1,197, Grafik 5), a da se nizvodno njegova vrednost povećava, da bi na CR4 diverzitet vrsta dostigao maksimum (1,531, Grafik 5). Pritom, prosečna vrednost Šenonovog indeksa na prvom lokalitetu je neznatno veća u poredjenju sa vrednošću na CR2 lokalitetu (Grafik 5).



**Grafik 5.** Prosečne vrednosti Šenonovog indeksa na istraživanim lokalitetima

### f) Procentualna zastupljenost EPT taksona u zajednici makrozoobentosa (EPT%)

Analizirajući dobijene podatke o prosečnoj procentualnoj zastupljenosti EPT taksona u zajednici makrozoobentosa na istraživanim lokalitetima, vidimo da je najmanji procenat zabeležen na CR2 lokalitetu (14,989, Grafik 6), što je očekivana posledica dejstva ribnjaka. Na nizvodnim lokalitetima prosečna procentualna zastupjenost EPT taksona raste i maksimum dostiže na CR4 (35,562, Grafik 6). Ubedljivo najviše vrednosti ovog biotičkog parametra na svim lokalitetima izuzev poslednjeg, zabeležene su u leto, pri čemu maksimum dostiže na CR3 (60,76, Grafik 6). Minimalna procentualna zastupljenost na svim lokalitetima je zabeležena u jesen.

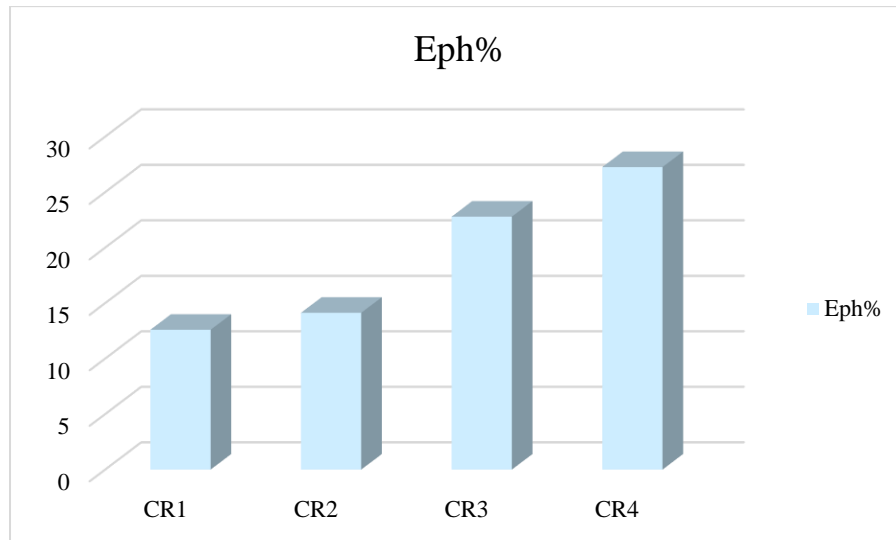


**Grafik 6.** Procentualna zastupljenost EPT taksona u zajednici makrozoobentosa (EPT%)

### g) Procentualna zastupljenost Ephemeroptera u zajednici makrozoobentosa (Eph%)

Prosečna vrednost procentualne zastupljenosti Ephemeroptera u zajednici makroinvertebrata najmanja je na CR1 lokalitetu (12,594, Grafik 7), odakle gradacijski raste do CR4 lokaliteta, gde dostiže maksimum (27,254, Grafik 7). Ako uporedimo Grafik 6. sa Grafikom 7. možemo da primetimo da se trendovi promena prosečnih vrednosti od lokaliteta CR2, preko CR3 do CR4 praktično ne razlikuju, a da je uočljiva razlika između CR1 i CR2 lokaliteta, gde je kod EPT% parametra na CR1 zabeležena veća prosečna vrednost od one na CR2, dok je kod vrednosti Eph% obratno (Grafik 6 i Grafik 7). Razlog je brojnost jedne vrste Plecoptere - *Brachyptera risi*. Ona u

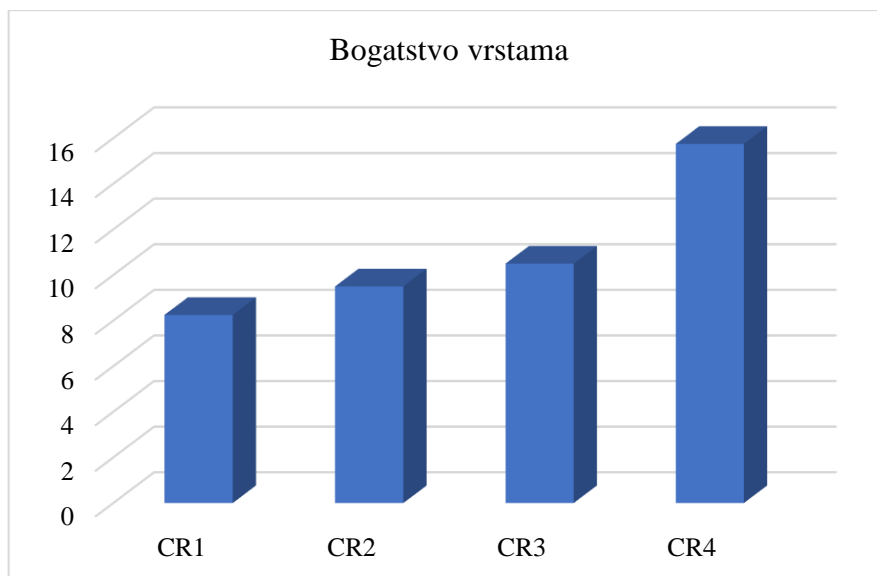
proleće dostiže maksimalnu brojnost na CR1 lokalitetu (1.174 jedinki), koja je skoro 78 puta veća od njene brojnosti na CR2 lokalitetu tokom proleća (75 jedinki). Takođe na lokalitetu CR1 tokom zime njena brojnost (od 200 jedinki) nije zanemarljiva. CR1 lokalitet se odlikuje kamenitim supstratom (60%), što ga, između ostalog, čini pogodnim staništem za ovu vrstu (Madsen, 1969), a velika brojnost tokom proleća i zime povezana je sa njenim životnim ciklusom (Fenoglio i sar, 2008).



**Grafik 7.** Prosečna procentualna zastupljenost Ephemeroptera u zajednici makrozoobentosa na istraživanim lokalitetima

#### **h) Bogatstvo vrstama**

Kroz sve sezone, najbogatija vrstama bila je zajednica zoobentosa na lokalitetu CR4, a izraženi maksimum (24, Garfik 8) zabeležen je tokom leta na ovom lokalitetu. Najmanja prosečna vrednost bogatstva vrstama zabeležena je na CR1 lokalitetu (8,25, Garfik 8), zahvaljujući minimalnim prolećnim (6) i jesenjim (4) vrednostima. Tokom zime izjednačena je raznovrsnost na CR1 i CR2 (10), dok je jedino u leto najmanja raznovrsnost zabeležena na CR2 lokalitetu (10).



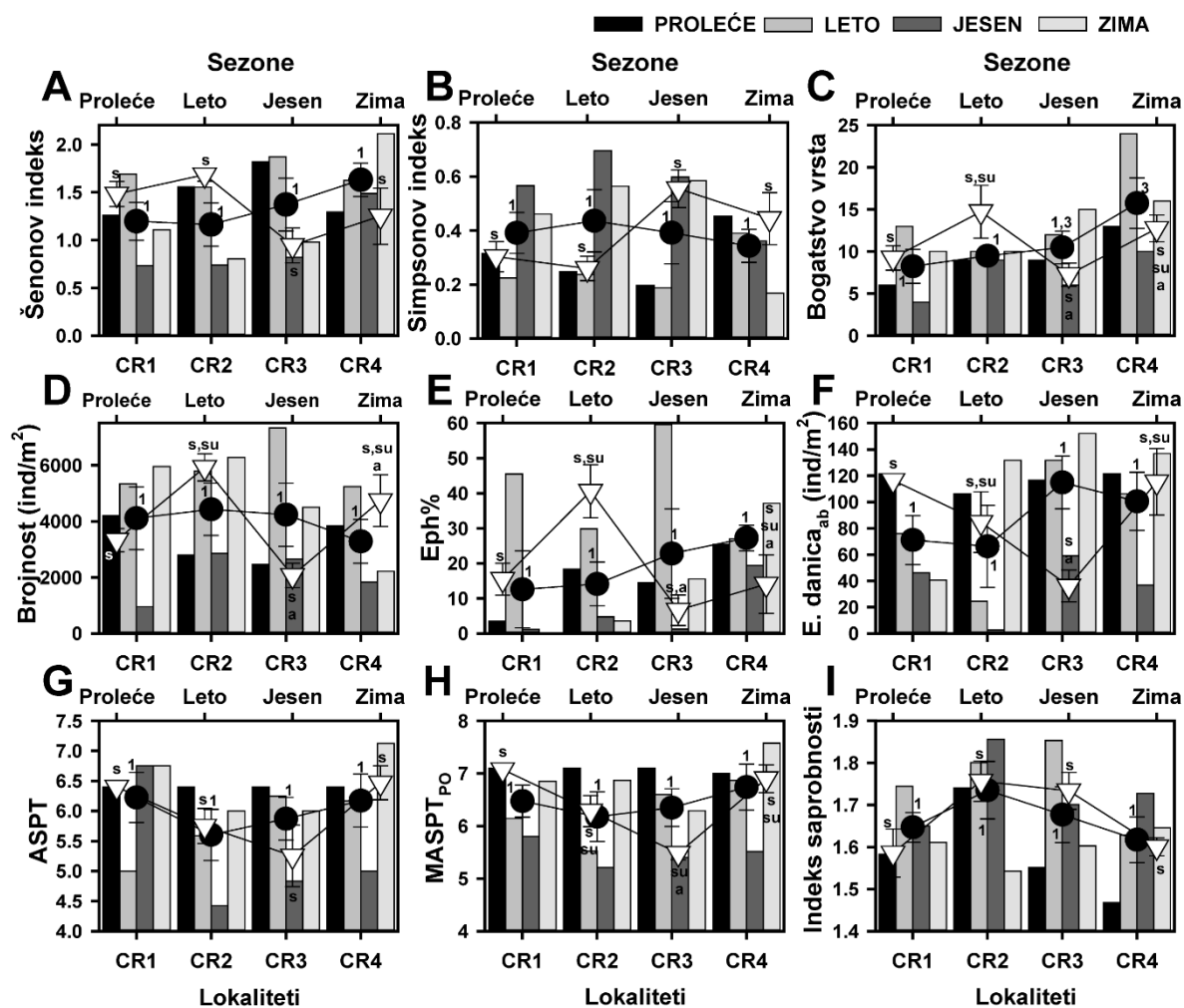
**Grafik 8.** Prosečne vrednosti bogatstva vrsta u zajednici makrozoobentosa na istraživanim lokalitetima

#### 4.4.3. Uticaj ribnjaka i sezonske promene analiziranih ekoloških parametara zajednice makrozoobentosa reke Crnice

U slučaju parametara strukture i sastava zajednice makrozoobentosa ne postoje statistički značajne razlike između lokaliteta (Slika 17). Ako se analizira uticaj ribnjaka on se može uočiti eventualno u slučaju saprobnog indeksa (SI) koji na CR<sub>2</sub> dostiže uočljiv maksimum (Slika 17I, Grafik 1) i ASPT gde na istom lokalitetu dostiže minimum (Slika 17G, Grafik 2). Od proleća do jeseni efekat ribnjaka se uočava i na brojnost *E. danica* koja na CR<sub>2</sub> dostiže minimum, ali visoke vrednosti u zimu na CR<sub>2</sub> i niske na CR<sub>1</sub>, uslovljavaju izostanak minimuma srednje vrednosti na CR<sub>2</sub> (Slika 17F).

Kada su u pitanju sezonske promene, parametre strukture i sastava zajednice makrozoobentosa karakteriše preovlađujući obrazac promena u kome jesenje vrednosti predstavljaju jedan od ekstrema i to maksimum u slučaju Simpsonovog indeksa diverziteta (Slika 17B), a u svim ostalim slučajevima (Slika 17A, C-H) sa izuzetkom Indeksa saprobnosti (Slikak 17I), minimum. Kod većine parametara letnje vrednosti predstavljaju drugi maksimum (Slika 17 A-E), dok su zimske i prolećne vrednosti približno jednake. U slučaju tri parametra (brojnosti *E. danica* - Ed<sub>ab</sub>), ASPT i modifikovanog ASPT indeksa (MASPT<sub>PO</sub>) vrednosti u proleće i zimu su opet podjednake, ali ovaj put maksimalne (Slika 17F-H).

Izuzetak od ovog obrasca je Indeks saprobnosti gde se baš kao i kod  $t_w$  i  $PO_4^{3-}$  maksimum dostiže u jesen i leto, a minimumi u zimu i proleće (Slika 17I).

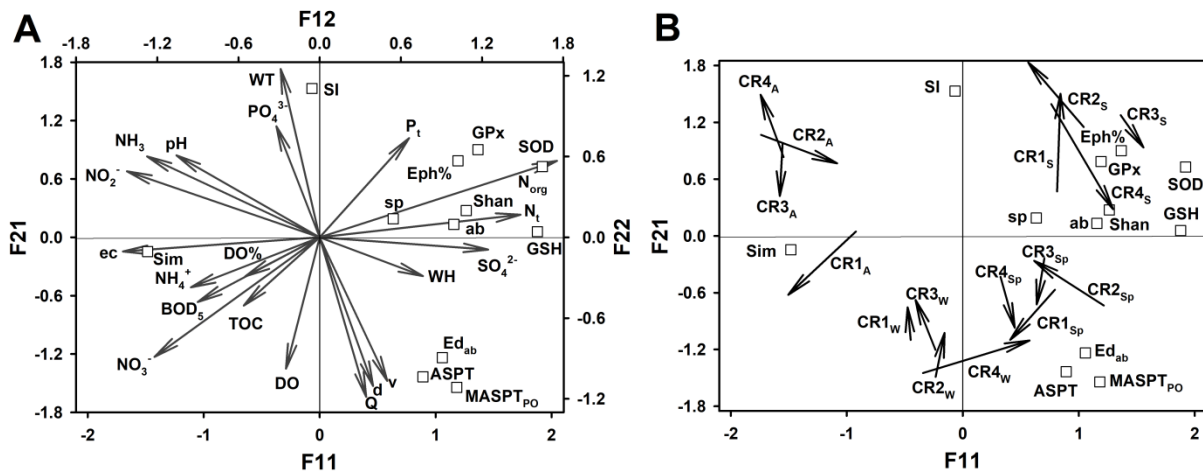


**Slika 17.** Vrednosti parametara zajednice makrozoobentosa (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) na četiri lokaliteta (CR1, CR2, CR3 i CR4) duž reke Crnice tokom četiri sezone (proleće, leto, jesen i zima). Linije na vrhu svakog histograma predstavljaju vrednosti parametra na istraživanom lokalitetu (zatvoreni krugovi) ili sezona (otvoreni trouglovi). Prosečne vrednosti parametara na različitim lokalitetima i iz različitih sezona koji se značajno razlikuju obeleženi su različitim brojevima (1,2,3,4) i odgovarajućim slovima (s, su, a, w).

#### 4.4.4. Multivarijantna analiza abiotičkih faktora vode i ekoloških parametara zajednica makrozoobentosa

Kako bi se ispitaio uticaj abiotičkih (fizičkih i hemijskih) parametara vode na biotičku komponentu, korišćena je koinerciona analiza CIA. CIA biotičkih faktora i abiotičkih faktora vode ukazuje na izraženija sezonska od longitudinalnih variranja vrednosti hemijskih parametara vode, jer su položaji uzorkovanja u odnosu na abiotičke faktore vode (počeci strelica) jasno grupisani prema sezonama, a ne prema lokalitetima (Slika 18B). Pri tome, duž F1 ose koja objašnjava najveći deo kostrukture (57%) proleće i zima se nalaze između leta i jeseni, što znači da su između sezona najveće razlike između leta i jeseni, a najmanje između zime i proleća. Kod zimskih i prolećnih uzorkovanja praktično nema razlike između lokaliteta čiji su položaji grupisani gotovo u jednoj tački. Kod uzoraka uzetih tokom proleća u reci Crnici analiza glavnih komponenti nije ukazala na vidljiv uticaj ribnjaka na hemijske činioce vode (Slika 18), pošto su ispitivani lokaliteti poređani duž F1 ose koja opet opisuje najveći deo varijabilnosti (62%) u pravilnom nizvodnom nizu od CR1 na pozitivnom kraju do CR3 i CR4 na njenom negativnom kraju. Nasuprot tome, u slučaju leta, a posebno jeseni došlo je do izdvajanja duž F2 ose kontrolnog lokaliteta u odnosu na one nizvodno od ribnjaka. Za razliku od fizičkih faktora ne može se uočiti preovlađujući obrazac sezonskih promena hemijskih parametara vode što ukazuje i na različite uzroke uočenih promena. Tako, pH, NH<sub>3</sub>, i NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dostižu maksimume u jesen (Slika 15 D, F, G), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BOD<sub>5</sub> i TOC dostižu minimum, a N<sub>org</sub> maksimum u leto (Slika 15 E, H, N, O, I), dok DO i P<sub>t</sub> dostižu ekstremne vrednosti u zimu (Slika 15 B, L). Samo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> deli isti obrazac sezonskih promena kao i fizički parametri vode sa maksimumom dostignutim u leto i jesen (Slika 15K).





**Slika 18.** Uticaj fizičkih i hemijskih parametara vode na biotičke faktore A) Biplot prezentacija analize koinercije (CIA) 20 sredinskih i 12 biotičkih parametara iz 16 uzoraka (četiri lokaliteta: CR1-CR4, četiri sezone: proleće – Sp, proleće – S, jesen – A, i zima – W). Ordinacioni dijagram 20 normalizovanih sredinskih varijabli (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) u CIA je predstavljen sivim strelicama i projektovan na F12xF22 ravan. Pozicije biotičkih parametara (beli kvadrati) su prikazane u CIA F11xF21 ravni B) Biplot prezentacija analize koinercije (CIA) 12 biotičkih parametara (beli kvadrati) i standardizovanih CIA rezultata za sredinske parametre i aktivnosti antioksidativnih enzima larvi *Ephemera danica* za svaki uzorak (crne strelice). Početak strelice smešta uzorak prema sredinskim parametrima, a vrh strelice raspoređuje je prema aktivnostima antioksidativnih enzima kod larvi *E. danica*.

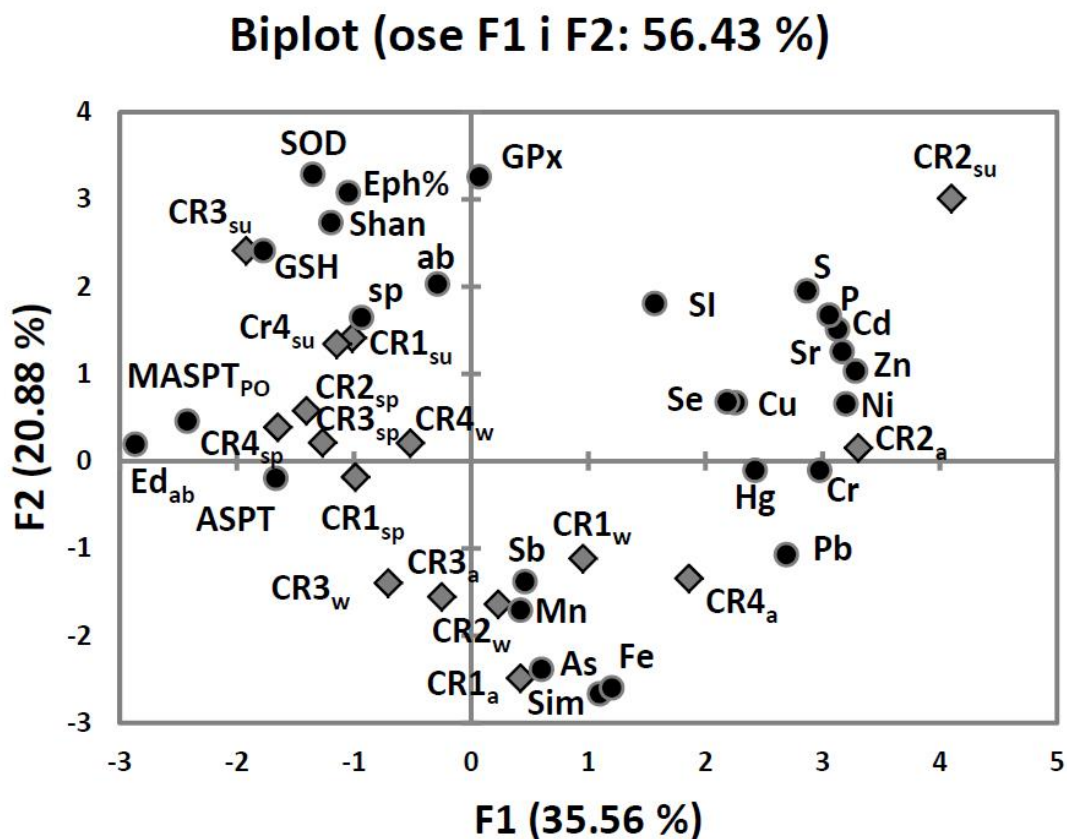
Kao što je prikazano na slici (Slika 18B) vrhovi strelica koje određuju položaj biološke komponente uzorkovanja u CIA, kao i njihovi počeci koji određuju abiotičku komponentu, jasno su grupisani prema sezonama, a ne prema lokalitetima i u slučaju elemenata strukture i sastava zajednice makrozoobentosa sezonska varijabilnost je veća nego longitudinalna, baš kao što je već objašnjeno za prethodno navedene hemijske i fizičke parametre. CIA analiza je i u ovom slučaju pokazala da su najveće sezonske razlike između letnjih i jesenjih vrednosti parametara strukture i sastava zajednica makrozoobentosa, dok su najmanje između prolećnih i zimskih uzoraka.

Takođe, CIA je pokazala da postoji statistički visoko značajna kostruktura između PCA korelacione matrice abiotičkih parametara vode i PCA korelacione matrice elemenata antioksidativne odbrane larvi *E. danica* i ekoloških parametara zajednica makrozoobentosa ( $P < 0.001$ , Slika 18). Jačina kostrukture potvrđena je relativno visokim vrednostima korelacionih koeficijenata duž F1 ose (0.89) i F2 ose (0.8). Imajući u vidu već opisan raspored uzorkovanja koja su gotovo u potpunosti grupisana prema sezonama uzorkovanja (Slika 18B) obe ose prevashodno opisuju sezonsku varijabilnost. Tako je F1 osa razlika između letnjih na njenom pozitivnom kraju i jesenjih uzoraka na njenom negativnom kraju, dok je F2 osa razlika između toplih i sušnih sezona (leto i jesen) na pozitivnom kraju i hladnih i vlažnih

sezona (proleće i zima) na negativnom kraju. U izvesnoj meri F2 osa opisuje i longitudinalnu varijabilnost u letnjim i posebno jesenjim mesecima jer je CR1 lokalitet jasno izdvojen duž ove ose od lokaliteta nizvodno od ribnjaka u ovim sezonama (Slika 18B). Biotički parametri su jasno vezani za jednu od osa. Tako je većina parametara strukture zajednica makrozoobentosa (Šenonov indeks (Shan), brojnost jedinki (ab), procenat zastupljenosti EPT taksona (EPT%), saprobnost (sp), Simpsonov indeks dominantnosti (Sim)) vezana za F1 osu i u skladu s tim statistički su značajno korelisani sa abiotičkim faktorima vezanim za F1 osu, pre svih sa  $N_t$ ,  $N_{org}$ ,  $NO_3^-$  i  $ec$  čiji vektori imaju najveću projekciju na F1 osu. Biotički parametri koji su jasno vezani za F2 osu su SI,  $Ed_{ab}$ , ASPT i  $ASPT_{PO}$ , (Slika 18A) i oni su prevashodno statistički značajno korelisani sa fizičkim faktorima vode (Q, v, d i TW), ali i sa  $NH_3$ , dok je ASPT statistički značajno korelisan i sa DO,  $NO_2^-$  i  $PO_4^{3-}$ . Pomenute abiotičke faktore pored obrasca sezonski specifičnog za F2 osu karakteriše i uočljiv porast na CR2 u odnosu na CR1, što u slučaju hemijskih faktora implicira uticaj otpadnih voda ribnjaka.

#### 4.4.5. Multivarijantna analiza hemijskog sastava sedimenta i ekoloških parametara zajednice makrozoobentosa

Da bi se ispitaio i upoređio uticaj hemijskog sastava sedimenta sa jedne, abiotičkih parametara vode sa druge strane, na ekološke parametare zajednica makrozoobentosa korišćena je CIA. Za razliku od abiotičkih parametara vode, ova analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna veza između hemijskog sastava sedimenta i pomenutih biotičkih parametara. Stoga je korišćena PCA korelacionog matriksa da bi se uočila eventualna međuzavisnost (Slika 19). Kako je najveći broj hemijskih elemenata grupisan na pozitivnom kraju F1 ose koja opisuje najveći deo uočene varijabilnosti (35.56%), to se može očekivati da promene biotičkih parametara koji su vezani za negativni kraj F1 ose (brojnost jedinki *E. danica*  $Ed_{ab}$ ,  $ASPT_{PO}$  i u manjoj meri ASPT) ili za njen pozitivan kraj (SI) budu uslovljene promenama u hemijskom sastavu sedimenta. To je i pokazano, naime, promene  $Ed_{ab}$  su statistički značajno negativno korelisane sa promenama u koncentracije Sr ( $R=-0.767$ ,  $P<0.001$ ), Cr ( $R=-0.656$ ,  $P=0.006$ ), Pb ( $R=-0.640$ ,  $P=0.008$ ), Ni ( $R=-0.637$ ,  $P=0.008$ ), P ( $R=-0.635$ ,  $P=0.008$ ), Zn ( $R=-0.609$ ,  $P=0.012$ ), Cd ( $R=-0.603$ ,  $P=0.013$ ), S ( $R=-0.577$ ,  $P=0.019$ ) i Cu ( $R=-0.557$ ,  $P=0.025$ ), dok SI i  $ASPT_{PO}$  karakteriše pozitivna, odnosno negativna korelacija sa P i Sr ( $R=0.567$ ,  $P=0.022$  i  $R=0.574$ ,  $P=0.020$ , odnosno  $R=-0.549$ ,  $P=0.027$  i  $R=-0.552$ ,  $P=0.027$ ). Ostali biotički parametri su vezani za pozitivan kraj F2 ose što ukazuje na odsustvo uticaja hemijskog sastava sedimenta na njihove promene.



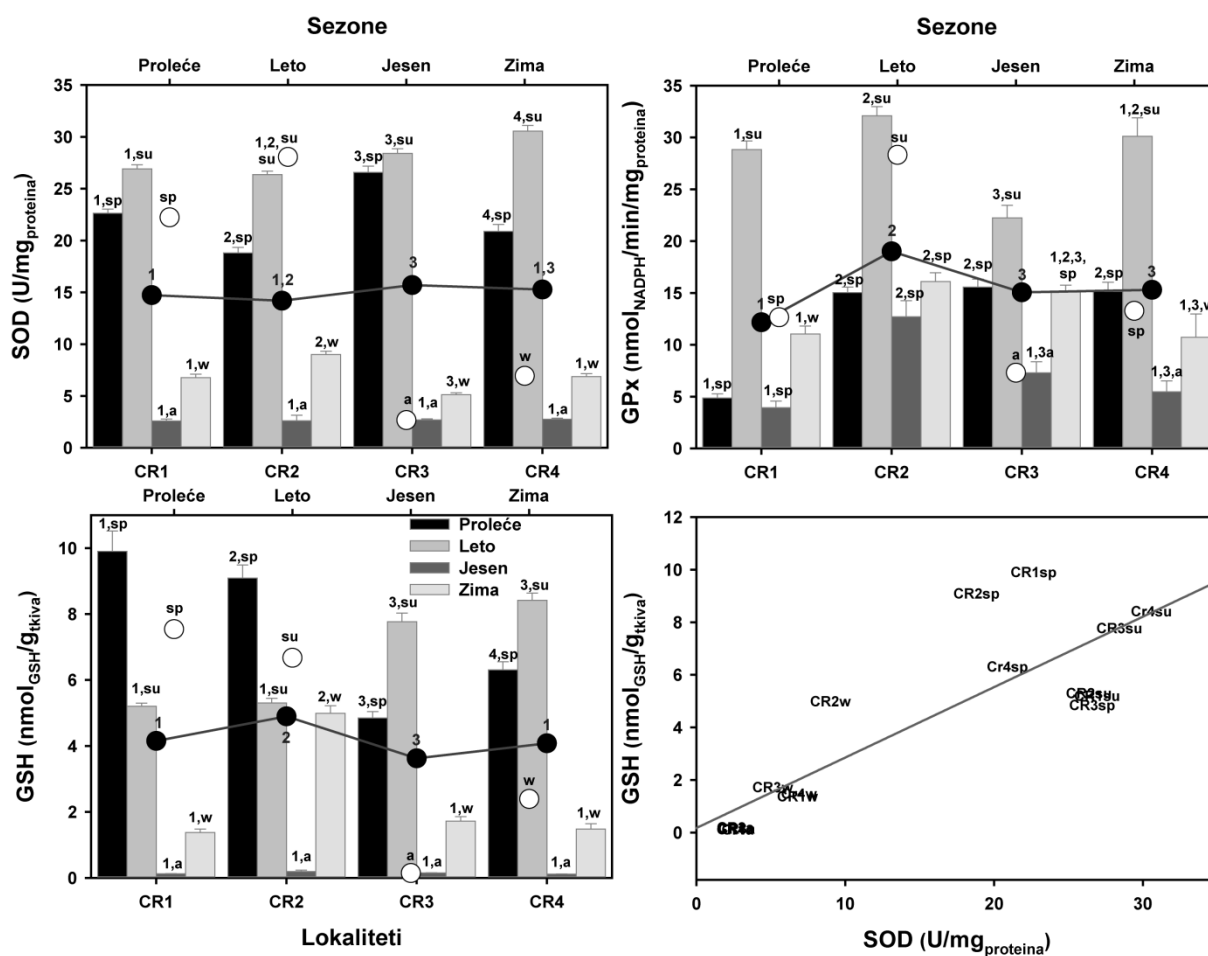
**Slika 19.** Biplot prezentacija PCA analize korelacione matrice parametara hemijskog sastava sedimenta (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) i biotičkih parametara iz 16 uzoraka (četiri lokaliteta: CR1-CR4; četiri sezone uzorkovanja: proleće–sp, leto–s, jesen–a, i zima–w).

PCA analiza elementarnog sastava sedimenta i biotičkih faktora (Slika 19) ukazuje na to da su pojedini elementi (Cd, Cr, Ni, Sr, Zn) (Slike 19B, C, H, N, O) i posebno sumpora (S) i fosfora (P) (Slika 19I, L) jasno izdvojeni na pozitivnom kraju F1 ose i grupisani sa položajima letnjeg (CR2<sub>su</sub>) i jesenjeg aspekta (CR2<sub>a</sub>) lokaliteta CR2, što ukazuje da su uočene promene posledice delovanja pastrmskog ribnjaka čije se vode ulivaju u Crnicu 20m uzvodno od lokaliteta CR2.

## 4.5. Pregled antioksidativnih statusa pojedinačnih model organizama

### 4.5.1. Analiza elemenata antioksidativne zaštite larvi *Ephemera danica*

Dvofaktorska analiza varijanse pokazuje da sve elemente antioksidativne zaštite *E. danica* (Slika 20) karakteriše velika konzistentnost i sličan obrazac sezonskih promena, kao i većinu parametara strukture i sastava zajednice. Sa maksimumom u leto i izraženim minimumom u jesen (naročito u slučaju GSH). Kod SOD i GSH prolećne vrednosti približne su letnjim i mnogo su veće od zimskih (Slika 20A,C), dok su kod GPx prolećne i zimske vrednosti gotovo identične i nalaze se između letnjih i jesenjih (Slika 20B). Iz navedenih razloga, SOD i GSH karakteriše veoma visoka pozitivna korelacija ( $R=0.845$ ,  $P<0.001$ , Slika 20D), dok nešto niža, ali i dalje visoko značajna korelacija karakteriše i aktivnosti SOD i GPx ( $R=0.725$ ,  $P=0.002$ ). Longitudinalne promene su najizraženije i najkonzistentnije u slučaju GPx čija je aktivnost na CR2 u svim sezonama statistički značajno veća u odnosu na kontrolni lokalitet. Do potpunog oporavka u aktivnosti GPx dolazi u leto i jesen već na CR3, u zimu tek na CR4, dok u proleće on u potpunosti izostaje (Slika 20B). Longitudinalne promene aktivnosti SOD praktično izostaju, naročito u jesen (Slika 20A). Statistički značajne promene koncentracije GSH izostaju u jesen, dok su u ostalim godišnjim dobima nekonzistentne. Tako su u leto veće na CR1 i CR2 u odnosu na CR3 i CR4, u jesen je situacija obratna, dok u zimu dostiže maksimum na CR2 (Slika 20C).



**Slika 20.** Promene prosečnih aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) (A) i glutation-peroksidaze (GPx)(B), i prosečna koncentracija ukupnog glutationa (GSH)(C) kod larvi *E.danica* (n=10) na četiri lokaliteta (CR1, CR2, CR3 i CR4) duž reke Crnice tokom četiri sezone (proleće, leto, jesen i zima). Linije na vrhu svakog histograma predstavljaju prosečne aktivnosti enzima na istraživanim lokalitetima (puni krugovi) ili sezona (prazni krugovi). Uzorci sa različitih lokaliteta uzorkovani u istoj sezoni koji se značajno razlikuju obeleženi su različitim brojevima (1,2,3,4). Uzorci iz različitih sezona uzorkovani na istom lokalitetu koji se značajno razlikuju obeleženi su različitim slovima (proleće–sp, leto–s, jesen–a, i zima–w). D) Uticaj promena aktivnosti SOD na koncentraciju GSH tokom istraživanog perioda na istraživanim lokalitetima na reci Crnici. Crna puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka (R=0.845, P<0.001).

#### 4.5.2. Zavisnost promene aktivnosti antioksidativnih enzima *Ephemera danica* od abiotičkih parametara vode reke Crnice

Da bi se analizirao uticaj abiotičkih parametara vode na elemente sistema antioksidativne zaštite larvi *E. danica* korišćena je CIA. Kao što je već pomenuto, CIA je pokazala da postoji statistički visoko značajna kostruktura između PCA korelacione matrice abiotičkih parametara vode i PCA korelacione matrice elemenata antioksidativne odbrane

larvi *E. danica* i ( $P < 0.001$ , Slika 18). Vrednosti korelacionih koeficijenata duž obe ose su relativno visoke - F1 osa 0.89 i F2 osa 0.8. Obe ose prvenstveno opisuju sezonsku varijabilnost, s tim što F2 osa u određenoj meri opisuje i longitudinalnu varijabilnost tokom leta i jeseni, jer je tada CR1 lokalitet jasno izdvojen duž ove ose od ostalih lokaliteta (Slika 18B). Svi elementi antioksidativne zaštite vezani su za F1 osu i u skladu s tim statistički značajno korelisani sa abiotičkim faktorima vezanim za F1 osu pre svih sa  $N_t$ ,  $N_{org}$   $NO_3^-$  i  $ec$  čiji vektori imaju najveću projekciju na F1 osu. Od elemenata antioksidativne odbrane unekoliko se izdvaja aktivnost GPx jer je karakteriše najveća projekcija na F2 osu, što ukazuje, kao što je već rečeno na najveći stepen longitudinalnih promena i uticaj efekata ribnjaka u letnjim i jesenjim mesecima. Takođe, za razliku od SOD i GSH, GPx karakteriše statistički značajna korelacija sa  $BOD_5$  i TOC.

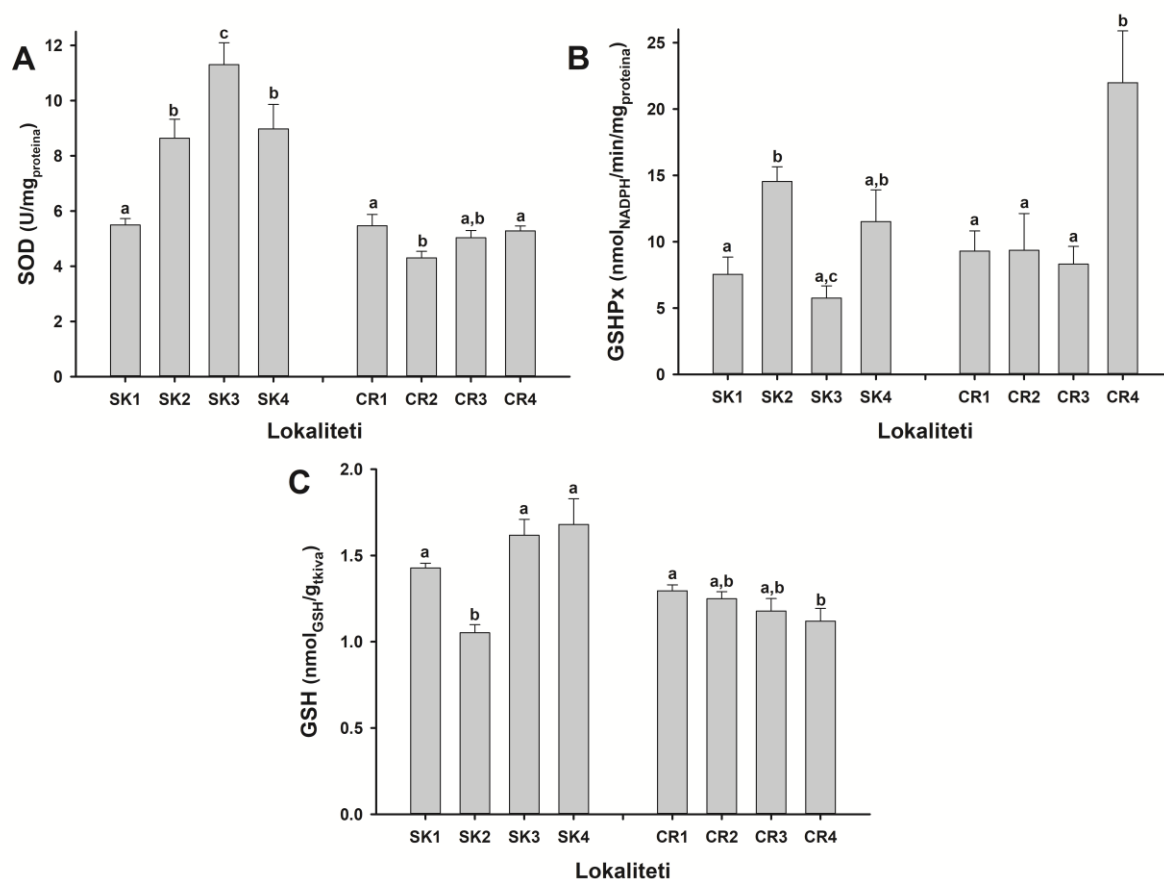
#### **4.5.3. Zavisnost promene aktivnosti antioksidativnih enzima *Ephemera danica* od hemijskog sastava sedimenta reke Crnice**

Za razliku od abiotičkih parametara vode, CIA je pokazala da ne postoji statistički značajna veza između hemijskog sastava sedimenta i biotičkih parametara, pa je korišćena PCA korelacionog matriksa da bi se uočila eventualna međuzavisnost (Slika 19). Najveći broj hemijskih elemenata grupisan je na pozitivnom kraju F1 ose koja opisuje najveći deo uočene varijabilnosti (35.56%), dok su SOD, GPx i GSH vezani za pozitivan kraj F2 ose, što ukazuje na odsustvo uticaja hemijskog sastava sedimenta na njihove promene. Izuzetak je koncentracija Fe koja je vezana za negativan kraj F2 ose, pa pokazuje negativnu korelaciju sa SOD ( $R = -0.626$ ,  $P = 0.009$ ) i GSH ( $R = -0.561$ ,  $P = 0.022$ ). Pored toga promene koncentracije GSH su statistički značajno korelisane i sa koncentracijama Pb ( $R = -0.577$ ,  $P = 0.019$ ) i Cr ( $R = -0.507$ ,  $P = 0.045$ ).

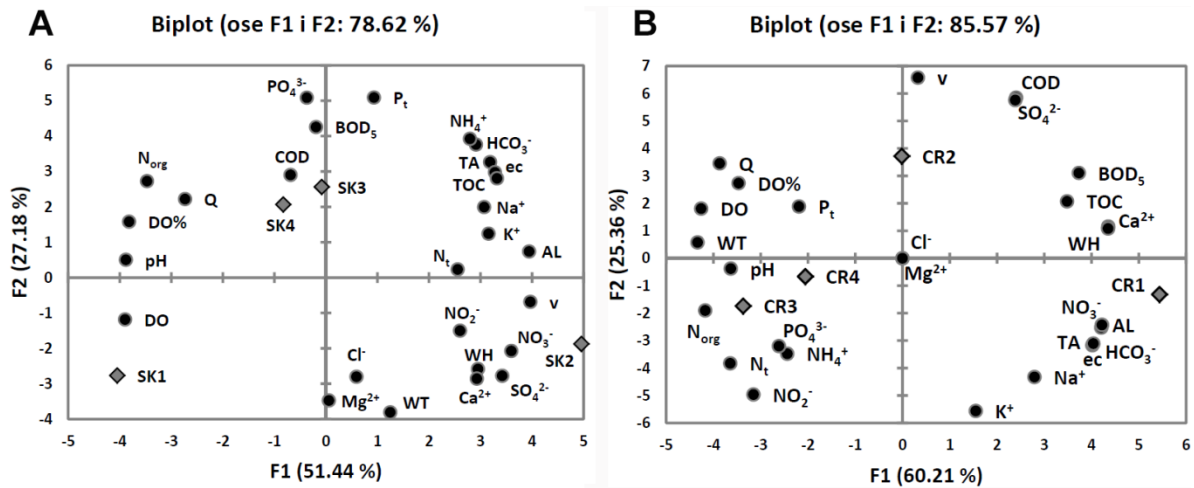
#### **4.5.4. Analiza elemenata antioksidativne zaštite *Ecdyonurus venosus* i uticaj ispusnih voda ribnjaka na hemizam u recipijentu**

U slučaju model organizma *E. venosus*, izvršena je analiza biomarkera, uz istovremenu analizu promena fizičkih i hemijskih parametara vode, samo u prolećnoj sezoni (Tabela 3) jer u preostale tri nije bilo dovoljno jedinki za pravljenje homogenata. Kako bi se ipak procenile bioindikatorske osobine ove vrste, izvršeno je poređenje dobijenih rezultata za isti model organizam i istu sezonu u dve reke (Crnice i Skrapeža).

Aktivnost ispitivanih molekularnih biomarkera kod vrste *E. venosus* (Slika 21 A, B, C) prati efekte ribnjaka na hemizam vode na Skrapežu. Naime, PCA analiza glavnih komponenti abiotičkih činilaca vode na ispitivanim lokalitetima na reci Skrapež (Slika 22 A) pokazuje jasan uticaj ribnjaka pošto su lokaliteti uzvodno od ribnjaka, SK1 i neposredno nizvodno od ribnjaka, SK2 na suprotnim stranama F1 ose koja objašnjava najveći deo varijabilnosti (48%), dok se preostala dva nizvodna lokaliteta SK3 i SK4 nalaze između njih, što ukazuje na oporavak od uticaja ribnjaka. Abiotički činoci vode na koje je ribnjak ispoljio najjači uticaj su: smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika i povećanje koncentracija nitrata, nitrita, sulfata, amonijum jona i ukupnog organskog ugljenika (Slika 22).



**Slika 21.** Uticaj pastrmskih ribnjaka na izabrane komponente sistema antioksidativne zaštite. Aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) (A), glutation-peroksidaze (GPx) (B) i koncentracija ukupnog glutationa (GSH) (C) kod larvi *Ecdyonurus venosus* na istraživanim lokalitetima duž reka Skrapež i Crnica. Dobijeni podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška. Stubovi obeleženi različitim slovima (a, b ili c) su statistički različiti, dok oni obeleženi istim slovom nisu.



**Slika 22.** Uticaj pastrmskih ribnjaka na abiotičke parametre vode. Biplot PCA korelacione matrice fizičkih i hemijskih parametara (crni krugovi) (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) na istraživanim lokalitetima duž reka Skrapež (A) i Crnica (B) (sivi dijamanti).

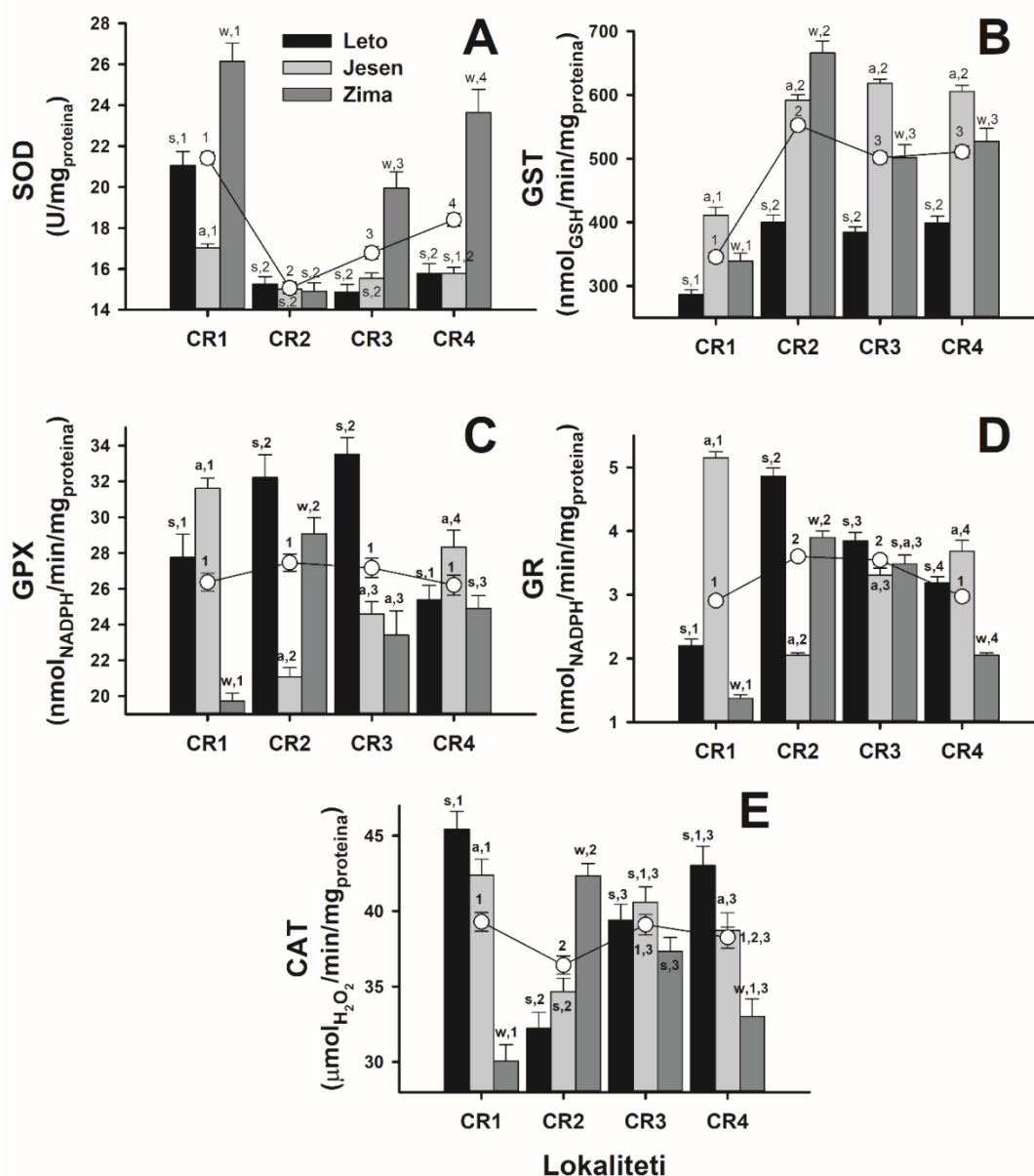
Jednofaktorska analiza varijanse (slika 21) pokazala je da u slučaju sva tri molekularna obeleživača kod uzoraka *E. venosus* sakupljenih u reci Skrapež dolazi do statistički značajnih variranja između ispitivanih lokaliteta i to: za aktivnost superoksid dismutaze (SOD),  $F=10,91$ ,  $P<0,001$ , za aktivnost glutacion-peroksidaze (GPx),  $F=4,23$ ,  $P=0,016$  i za koncentraciju glutaciona (GSH),  $F=4,87$ ,  $P=0,008$ . Pri tome je LSD test kojim su poređene parovi lokaliteta pokazao da u slučaju sva tri molekularna markera postoji razlika između SK1 i SK2, te u slučaju SOD i GPx dolazi do porasta aktivnosti na SK2, dok koncentracija GSH opada na SK2, što jasno ukazuje da su uočene statistički značajne promene posledica dejstva ribnjaka. U slučaju SOD porast se nastavlja i na SK3 ( $P=0,017$ ), dok na SK4 dolazi do statistički značajnog pada u odnosu na SK3 ( $P=0,026$ ). Ovakve promene aktivnosti SOD su snažno pozitivno korelisane sa promenama ukupne koncentracije fosfora ( $R=0,989$ ,  $P=0,011$ ). Aktivnost GPx opada na SK3 ( $P=0,008$ ), da bi ponovo porasla na SK4 ( $P=0,012$ ), što je u korelaciji sa promenama koncentracije nitrita ( $R=0,997$ ,  $P=0,011$ ) i ukupne tvrdoće vode ( $R=0,968$ ,  $P=0,032$ ). Koncentracija GSH se na SK3 i SK4 vraća na vrednosti na kontrolnom lokalitetu.

U reci Crnici analiza varijanse (Slika 21) je pokazala statistički značajno variranje između ispitivanih lokaliteta samo u slučaju aktivnosti GPx ( $F= 6,80$   $P<0.01$ ), dok je u slučaju SOD i GSH ono izostalo. Međutim, aktivnost GPx na prva tri lokaliteta je praktično identična, dok na CR4 dolazi do velikog porasta, koji ne može biti posledica delovanja ribnjaka.



#### 4.5.5. Analiza elemenata antioksidativne zaštite *Gammarus dulensis*

Aktivnosti antioksidativnih enzima *G. dulensis* karakteriše i longitudinalna i sezonska varijabilnost (Slika 23). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da postoji statistička značajnost ( $P < 0,001$ ) kod interakcije između longitudinalnih i sezonskih uticaja kod svih ispitivanih enzima, što znači da longitudinalne promene aktivnosti enzima pokazuju jaku zavisnost od sezone u kojoj su mereni. Dvofaktorska analiza varijanse je takođe pokazala statističku značajnost ( $P < 0,001$ ) glavnih uticaja sezonskih i longitudinalnih promena aktivnosti svih antioksidativnih enzima izuzev GPx ( $P = 0,246$ ) u slučaju longitudinalnih promena.



**Slika 23.** Aktivnosti antioksidativnih enzima kod *Gammarus dulensis* (n=8) na četiri istraživana lokaliteta (CR1, CR2, CR3, and CR4) duž reke Crnice tokom tri sezone uzorkovanja (leto, jesen i zima). (A) Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD); (B) Aktivnost glutation-transferaze (GST); (C) aktivnost glutation-peroksidaze (GPX); (D) aktivnost glutation-reduktaze (GR); aktivnost katalaze (CAT) (prosečna vrednost  $\pm$  standardna greška). Uzorci sa različitih lokaliteta uzorkovani u istoj sezoni koji se značajno razlikuju obeleženi su različitim brojevima (1, 2, 3, 4). Uzorci iz različitih sezona uzorkovani na istom lokalitetu označeni su različitim slovima (leto–s, jesen–a, i zima–w). Linija na vrhu svakog histograma predstavlja prosečnu aktivnost enzima na istraživanim lokalitetima.

Kada su u pitanju longitudinalne promene, antioksidativni enzimi se dele u dve grupe. Prvu grupu čine SOD (Slika 23A) i CAT (Slika 23E), čije se aktivnosti smanjuju na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka (CR2) u poređenju sa referentnim lokalitetom (CR1), a zatim se

postepeno oporavljaju na nizvodnim lokalitetima CR3 i CR4. Kada je u pitanju aktivnost SOD, ona dostiže maksimum tokom zime na referentnom lokalitetu (CR1), dok najmanje variranje aktivnosti pokazuje na CR4 lokalitetu. Najmanja aktivnost SOD zabeležena je tokom jeseni na lokalitetima koji su pod najvećim uticajem ribnjaka CR2 i CR3. Nasuprot tome, aktivnost CAT je dostigla maksimum tokom zime na lokalitetima CR2 i CR3, a tokom leta na CR1 i CR4. Sezonske varijacije aktivnosti antioksidativnih enzima generalno dostižu maksimum u jesen, a minimum u zimu. U drugu grupu spadaju GST (Slika 23B), GPx (Slika 23C) i GR (Slika 23D). Za ovu grupu je zajednički trend povećanja aktivnosti na CR2 u poređenju sa referentnim lokalitetom, pri čemu dolazi do postepenog nizvodnog oporavka na lokalitetima CR3 i CR4.

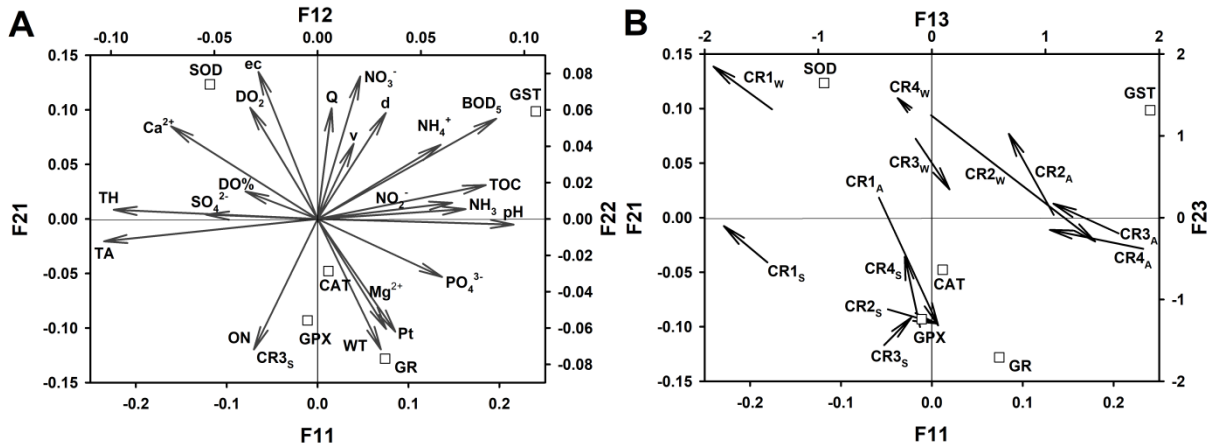
Sezonske varijacije pokazuju dve osnovne karakteristike. Naime, za sve ispitivane enzime, sezonske promene aktivnosti na referentnom lokalitetu su u pozitivnoj korelaciji sa onima na CR4 lokalitetu, a u negativnoj sa onima na CR2 lokalitetu. Trend longitudinalnih promena GST, GPx i GR je sličan u leto i zimu (Slika 23B-D), a potpuno je suprotan za GPx i GR u jesen, kada su njihove aktivnosti dostigle minimum umesto maksimum na CR2 (Slikag 23C i D). Jedino su se aktivnosti SOD i GST konzistentno menjale pod uticajem različitih sredinskih faktora, smanjivanje (SOD, Slika 23A) i povećavanje (GST, Slika 23B) na CR2 u svim sezonama. Statistički značajna korelacija postoji samo između aktivnosti GPx i GR ( $P = 0,002$ ) i između SOD i GR ( $P = 0,02$ ). Aktivnosti SOD i GST su pokazale dodatni zajednički obrazac tokom leta i jeseni, kada nije postojala razlika u njihovoj aktivnosti na lokalitetima nizvodno od ribnjaka, dok je kod zimskih uzoraka postojala jasna i statistički značajna razlika (izuzev za aktivnost GST između CR3 i CR4). Longitudinalni trend promena aktivnosti enzima tokom zime je bio najuniformniji, pri čemu su aktivnosti CAT, GR, GPx i GST snažno pozitivno korelisane, dok su aktivnosti svih enzima negativno korelisane sa aktivnošću SOD.

#### **4.5.6. Zavisnost promene aktivnosti antioksidativnih enzima *Gammarus dulensis* od abiotičkih parametara reke Crnice**

Kako bi se ispitao uticaj fizičko – hemijskih parametara vode reke Crnice na elemente antioksidativne odbrane *G. dulensis*, korišćena je CIA. Ova analiza je pokazala da postoji statistički značajna ( $P < 0,042$ ) kostruktura između PCA korelacione matrice aktivnosti antioksidativnih enzima i PCA korelacione matrice podataka o fizičko – hemijskim parametrima vode. Grafičku prezentaciju posmatrane kostrukture predstavljaju dve

faktorijalne ose, koje objašnjavaju skoro celu (96 %) kostrukтуру (F1 = 58%, F2 = 39%). Jačina kostrukture potvrđena je relativno visokim vrednostima korelacionih koeficijenata duž F1 ose (0,82) i F2 ose (0,68).

Analiza pozicije uzoraka u odnosu na abiotičke faktore (Slika 24B) pokazuje da su duž F13 ose referentni uzorci iz svake sezone (CR1w, CR1a, CR1s) jasno odvojeni u odnosu na uzorke uzorkovane u istoj sezoni na lokalitetima nizvodno od ribnjaka (CR2, CR3 i CR4). Pozicije lokaliteta nizvodno od ribnjaka uzorkovane u istoj sezoni su grupisane zajedno. To znači da su najveće promene za sve merene parametre zabeležene između CR1 i CR2 lokaliteta, a nizvodni oporavak, sa izuzetkom TOC, je generalno slab. Abiotički parametri povezani sa F1 osom su karakterisani smanjenjem (TA, tvrdoća vode (WH),  $\text{Ca}^{2+}$ ) ili povećanjem (pH, TOC,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{BOD}_5$ ,  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ ) na CR2 u poređenju sa CR1 lokalitetom. Statistički značajne promene su zabeležene samo za one najbliže povezane sa F12 osom, a to su TA i pH između CR1 i svih nizvodnih lokaliteta,  $\text{Ca}^{2+}$  između CR1 sa jedne strane i CR3 i CR4 sa druge strane, i TOC između CR2 sa jedne strane i CR1 i CR4 sa druge strane.



**Slika 24.** Uticaj fizičkih i hemijskih parametara vode na enzime antioksidativne zaštite *Gammarus dulensis*. A) Biplot prikaz koinercione analize (CIA) 22 sredinska parametra i aktivnosti pet antioksidativnih enzima iz 12 uzoraka (četiri lokaliteta: CR1-CR4, uzorkovano tokom četiri sezone: leto-S, jesen-A i zima-W). Ordinacioni dijagram 22 normalizovane sredinske promenljive (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) u CIA je predstavljen sivim strelicama u CIA je predstavljen sivim strelicama i projektovan na F12xF22 ravan. Pozicije aktivnosti antioksidativnih enzima (beli kvadrati) su prikazane u CIA F11xF21 ravni (za skraćenice pogledati poglavlje Materijal i metode) B) Biplot prezentacija analize koinercije (CIA) aktivnosti pet enzima antioksidativne zaštite (beli kvadrati) i standardizovanih CIA rezultata za sredinske parametre i aktivnosti antioksidativnih enzima *Gammarus dulensis* za svaki uzorak (crne strelice) projektovani na F13xF23 ravan. Početak strelice smešta uzorak prema sredinskim parametrima, a vrh strelice raspoređuje je prema aktivnostima antioksidativnih enzima.

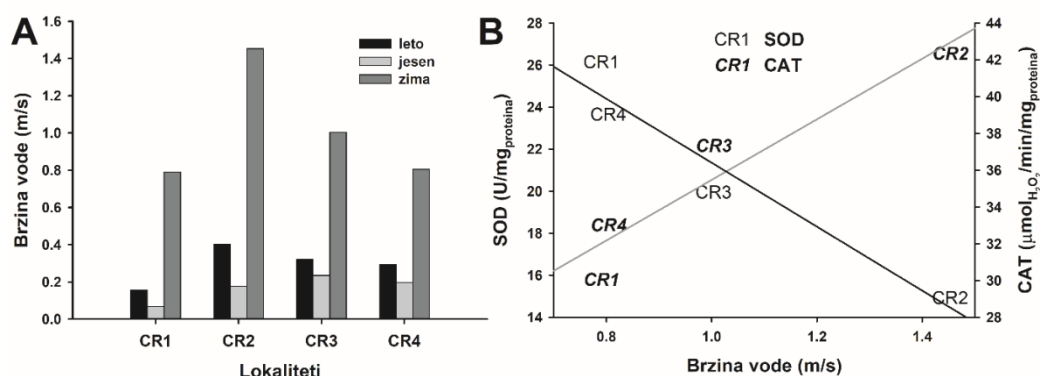
Za razliku od F13 ose, kojom su predstavljene longitudinalne promene abiotičkih parametara, F23 osa je osa sezonskih promena. Uzorci su poređani hronološki u odnosu na abiotičke faktore duž F23 ose, počevši od letnjih na početku, ka jesenjim u sredini, do zimskih na pozitivnom kraju F23 ose. Parametre snažno povezane sa F22 osom karakterišu sezonske promene u većoj meri nego longitudinalne i, bez izuzetka, odsustvo statistički značajnih longitudinalnih promena. Većina ovih parametara pokazuje statistički značajan maksimum ( $\text{DO}_2$ , Q i V) ili minimum (WT, TP,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) u zimu, sa relativno sličnim letnjim i jesenjim vrednostima. Manje parametara je bilo povezano sa F22 osom, s obzirom na to da su maksimalne (ON) ili minimalne (EC i  $\text{NO}_3^-$ ) vrednosti dostigli tokom leta. Parametri pozicionirani u sredini F22 ose pokazuju ili maksimalne ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ , pH, TOC,  $\text{BOD}_5$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) ili minimalne ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) vrednosti tokom jeseni.

Rezultati analize koinercije ukazuju na distribuciju aktivnosti enzima u tri grupe. Duž F11 ose, SOD je povezan sa negativnim krajem, GST sa pozitivnim krajem, dok se treća grupa, koja se sastoji od CAT, GPx i GR, nalazi u sredini (Slika 24). S obzirom na to da je F11 osa reprezentativna za longitudinalne promene, suprotne pozicije SOD i GST su posledica sezonski konzistentnih, a longitudinalno suprotnosmernih promena njihove

aktivnosti (Slika 24). Kao što je već viđeno, CAT, GPx i GR nemaju takvu konzistentnost zbog zimskih (CAT) ili jesenjih (GPx i GR) promena u longitudinalnom trendu promena njihovih aktivnosti, pa se nalaze u centru F11 ose. Kada je u pitanju F21 osa, zadužena za sezonske promene, SOD i GST su smešteni na njenom pozitivnom kraju, jer su njihove zimske vrednosti uglavnom značajno veće od letnjih, dok su CAT, GPx i GR, zbog svojih suprotnih sezonskih trendova, gusto grupisani na njenom negativnom kraju.

CIA je pokazala da su na aktivnost SOD najveći uticaj imale promene  $DO_2$ , EC,  $Ca^{2+}$ , WT, TP,  $Mg^{2+}$  i  $PO_4^{3-}$  (Slika 24). To potvrđuje i statistički značajna povezanost između aktivnosti GST i svih pomenutih abiotičkih parametara izuzev EC i  $Mg^{2+}$ . Na aktivnost GST najviše su uticale promene sledećih parametara:  $BOD_5$ , TOC, pH,  $NH_4^+$ ,  $NH_3$ ,  $NO_2$ , TH i TA. Rezultati CIA su potvrđeni statistički značajnom korelacijom između promene aktivnosti GST i svih pomenutih abiotičkih parametara osim  $NO_2^-$ . Enzimi iz treće grupe (GPx, GR i CAT) nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa analiziranim abiotičkim parametrima, izuzev negativne korelacije aktivnosti GPx sa EC. To ukazuje da je njihova pozicija na CIA grafikonu, ako se uzmu u obzir sve sezone, pod većim uticajem aktivnosti SOD i GST, nego abiotičkih parametara.

Korelaciona analiza zimskih uzoraka izdvaja brzinu vode kao parametar čije longitudinalne promene tokom ove sezone pokazuju jaku korelaciju sa promenama ispitivanih enzima ( $R > 0,82$ ) i statistički su značajne u slučaju SOD ( $P = 0,036$ ) i CAT ( $P = 0,048$ ) (Slika 25).



**Slika 25.** Brzina vode reke Crnice. (A) Sezonske promene brzine vode na istraživanim lokalitetima (CR1, CR2.

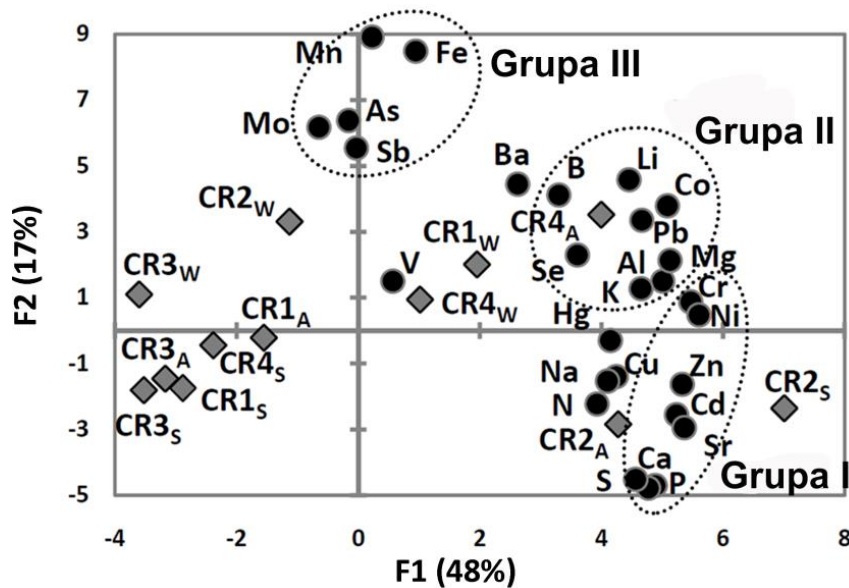
CR3 i CR4) na reci Crnici; (B) uticaj promene brzine vode na aktivnosti SOD i CAT tokom ispitivanih sezona na istraživanim lokalitetima reke Crnice. PUNE linije predstavljaju linearno uklapanje podataka ( $R = 0.964$ ,  $F = 26.2$ ,  $P = 0.036$  and  $R = 0.952$ ,  $F = 19.3$ ,  $P = 0.048$ ).

#### 4.5.7. Uticaj hemijskog sastava sedimenta na promene aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima *Gammarus dulensis*

Rezultati uticaja hemijskog sastava sedimenta reke Crnice, na osnovu analize koinercije su pokazali da ne postoji statistički značajna kostruktura ( $P = 0,932$ ) između PCA korelacionog matriksa aktivnosti antioksidativnih enzima i PCA korelacionog matriksa hemijskih parametara sedimenta.

U PCA elementarnog hemijskog sastava sedimenta (Slika 26), dve faktorijalne ose objašnjavaju 65% ukupne varijabilnosti, pri čemu F1 osa objašnjava 48%. Kao i u slučaju fizičkih i hemijskih parametara vode, F1 osa je zadužena za longitudinalne promene, ali se trendovi promena razlikuju. Letnji CR2 i jesenji CR4 uzorci su jasno odvojeni na pozitivnom kraju F1 ose od ostalih letnjih i jesenjih uzoraka, koji su pozicionirani na njenom negativnom kraju. Na pozitivnom kraju F2 ose, koja objašnjava sezonske promene, nalaze se zimski uzorci, dok su letnji na njenom negativnom kraju.

Analizirani hemijski elementi sedimenta mogu se ugrubo podeliti u tri grupe (Slika 26). Prvu grupu karakteriše izraženi maksimum na CR2 lokalitetu u leto i jesen, potpuni oporavak na CR3 i CR4 do referentnih vrednosti tokom ovih sezona, i potpuno odsustvo maksimuma na CR2 tokom zime. Prema opisanom trendu sezonskih i longitudinalnih promena, nijedan element iz ove grupe nije pokazao statistički značajne sezonske promene (sudeći po dvofaktorskoj ANOVA analizi), dok je samo Cd pokazao statistički značajan porast na CR2 lokalitetu u odnosu na CR1 ( $P = 0,044$ ) i CR3 ( $P = 0,047$ ).



**Slika 26.** PCA biplot prikaz parametara hemijskog sastava sedimenta u svim analiziranim uzorcima (četiri lokaliteta: CR1-CR4, uzorkovano tokom četiri sezone: leto-S, jesen-A i zima-W). Hemijski elementi su grupisani u tri grupe i povezani tačkastim elipsama u zavisnosti od obrasca longitudinalnih i sezonskih promena.

Treća grupa hemijskih parametara sedimenta karakteriše se maksimalnim vrednostima na prva tri lokaliteta tokom zime, potpunim odsustvom maksimuma na CR2 tokom leta i jeseni, i visokim i relativno konstantnim koncentracijama na CR4.

Druga grupa hemijskih parametara sedimenta deli neke od karakteristika sa prvom i trećom grupom. Oni zadržavaju maksimalne vrednosti na CR2 tokom leta i jeseni, ali je amplituda manja u poređenju sa jesenjim maksimumom na CR4. Tokom zime maksimalne vrednosti dostižu na CR1. Sudeći po dvofaktorskoj ANOVA analizi, nijedan element iz druge i treće grupe ne karakterišu statistički značajne sezonske i longitudinalne promene.

Poređenje pozicija letnjih i jesenjih uzoraka hemijskog sastava sedimenta na PCA grafikonu sa promenama aktivnosti ispitivanih enzima tokom ove dve sezone ukazalo je na postojanje upečatljive sličnosti u slučaju aktivnosti CAT, koja dostiže izraziti minimum na CR2, a njene aktivnosti na CR3 i CR4 su mnogo bliže vrednostima na CR1 (Slika 26). Kao posledica toga, aktivnosti CAT u letnjim i jesenjim uzorcima pokazuju snažnu i statistički značajnu negativnu korelaciju sa koncentracijama elemenata iz prve grupe: Zn, Cd, P, S, Ca, Cr, Ni i Sr.



## ***5. Diskusija***

## 5. DISKUSIJA

Na osnovu sprovedenih ispitivanja uticaja efluenta pastrmskih ribnjaka na promene aktivnosti analiziranih antioksidativnih enzima kod odabranih vrsta akvatičnih beskičmenjaka, možemo konstatovati da su se praćeni biomarkeri pokazali kao efikasni za ranu detekciju prisustva zagađivača i promene sredinskih faktora. Među njima, kao najosetljiviji biomarker kod sve tri vrste pokazala se promena aktivnosti GPx, što znači da ovaj enzim čini prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa kod ispitivanih artropoda. Do istog zaključka, da GPx ima ključnu ulogu u antioksidativnom sistemu zaštite vrste *Tanytarsus minutipalpus*, došli su Bianchini i saradnici (Bianchini i sar., 2017) ispitujući uticaj dnevnih varijacija sredinskih faktora na metabolizam i antioksidativnu odbranu larvi ove vrste hironomida. Iako se smatra da su SOD i CAT dva glavna antioksidativna enzima, koji prvi reaguju u odbrani od slobodnih radikala kod insekata (Sanz i sar., 2010), to u našem istraživanju nije bio slučaj. Naime, kod *E. danica* i *E. venosus* nije detektovana aktivnost katalaze, dok je kod vrste *G. dulensis* aktivna, ali njena aktivnost je pod jakim uticajem teških metala, pa se tokom leta i jeseni pod njihovim uticajem smanjuje. Razlog zašto katalaza nije pokazala nikakvu aktivnost kod ispitivanih vrsta akvatičnih insekata, nismo mogli da utvrdimo. Naime, i u nedavno sprovedenim istraživanjima Božanić i sar. (2018), koji su ispitivali sezonski uticaj ribnjaka na aktivnost antioksidativnih enzima *E. danica*, su takođe uočili odsustvo aktivnosti katalaze. Martinez-Alvarez i sar. (2005), navode da antioksidativni enzimi i njihova aktivnost mogu da budu povezani sa filogenetskom pozicijom, pri čemu filogenetski stariji organizmi pokazuju manju aktivnosti pojedinih enzima. Odsustvo aktivnosti CAT i smanjenje aktivnosti SOD uočene su i u eritrocitima ajkule *Scyliorhinus canicula*, što autor dovodi u vezu sa taksonomskom pozicijom ove primitivne riblje vrste, navodeći da ova riba ima primitivni antioksidativni sistem (Rudneva, 1997). Poznato je da red Ephemeroptera spada u filogenetski stare organizme (Barber-James i sar., 2008), a prema Edmunds i McCafferty (1988), Ephemeroptera su najprimitivniji i najstariji red insekata. Takođe, vrstu *E. danica* karakteriše nizak antioksidativni kapacitet (Sanz i sar., 2017), što može da ukaže na primitivnost antioksidativnog sistema ove vrste, pa je moguće da je i u ovom slučaju to razlog odsustva aktivnosti katalaze kod ove vrste. Pored toga, efikasnost katalaze zavisi od vrste i od tipa stresora (Osman, 2007). Drugo moguće objašnjenje je da je katalaza inaktivirana povećanom koncentracijom superoksidnog radikala, koju SOD, kod obe vrste, nije efikasno eliminisao. Naime, Kono i Fridovich (1982) su dokazali da superoksidni

radikal može da inaktivira katalazu. Povećana koncentracija ovog radikala je verovatno posledica njegovog neadekvatnog eliminisanja pomoću SOD.

U slučaju promene aktivnosti SOD enzima, rezultati su pokazali da su kod larvi *E. danica* u svim sezonama zabeležene minimalne longitudinalne promene aktivnosti ovog enzima. Kod vrste *G. dulensis* longitudinalne promene aktivnosti SOD karakterišu smanjenje aktivnosti na CR2 u svim sezonama, dok se jedino kod vrste *E. venosus* aktivnost SOD povećava nizvodno od ribnjaka na reci Skrapež. S obzirom na zabeležene promene aktivnosti SOD, moguće je da je ovaj biomarker osetljiviji kod *E. venosus* u poređenju sa druge dve vrste, ali svakako su neophodna dodatna istraživanja, koja bi potvrdila ovu pretpostavku. Takođe, uočeno je da je kod uzoraka *E. venosus* i *G. dulensis* uočena značajna pozitivna korelacija između promena aktivnosti SOD i koncentracije ukupnog fosfora u reci Skrapež (*E. venosus*) i reci Crnici (*G. dulensis*), na osnovu čega se može zaključiti da fosfor ima bitan uticaj na promenu aktivnosti SOD kod ovih artropoda.

Kada su u pitanju sezonske promene aktivnosti ispitivanih enzima, one su u jesen najizraženije i kod *E. danica* i kod *G. dulensis*. Specifična kombinacija i interakcija sredinskih faktora, pogotovo na CR2 lokalitetu, kao posledica dejstva ribnjaka, tokom ove sezone imala je jak uticaj na kapacitet većine antioksidativnih enzima za neutralizaciju ROS, što je uzrokovalo smanjenje njihovih aktivnosti i dalju akumulaciju ROS. Kao krajnji rezultat, ovakav negativan uticaj se odrazio na brojnost *E. danica* i *G. dulensis* koja je drastično smanjena tokom ove sezone pogotovo na CR2 lokalitetu. Brojnost larvi *E. danica* je statistički značajno negativno korelisana sa koncentracijom  $\text{NH}_3$  i koncentracijama teških metala: Cr, Ni, Pb, Sr, Zn, Cd i Cu. Osim na brojnost larvi *E. danica*, kada su u pitanju parametri strukture zajednice makrozoobentosa reke Crnice, ribnjak je ispoljio jasan uticaj i na SI, ASPT i  $\text{MASPT}_{\text{PO}}$ . Iako ne postoje statistički značajne razlike između lokaliteta kod analiziranih metričkih osobina zajednice makrozoobentosa, kod saprobnog indeksa uticaj ribnjaka je vidljiv u njegovoj uočljivoj maksimalnoj vrednosti na CR2 lokalitetu, dok se uticaj ribnjaka kod biotičkih indeksa ASPT i  $\text{MASPT}_{\text{PO}}$  ispoljava kroz minimalne vrednosti na CR2 lokalitetu. Kod vrste *G. dulensis* uočena je visoka korelacija između aktivnosti CAT i teških metala Zn, Cd, P, S, Ca, Cr, Ni i Sr, a kod vrste *E. danica* koncentracija Fe pokazuje statistički značajnu negativnu korelaciju sa aktivnošću SOD, dok je koncentracija GSH statistički značajno povezana sa koncentracijama Pb i Cr. Jasno je da teški metali imaju uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima ispitivanih vrsta akvatičnih beskičmenjaka, međutim

njihovi pragovi tolerancije kada su u pitanju koncentracije pojedinačnih teških metala nisu dovoljno istraženi.

Kada je u pitanju osetljivost biomarkera, kod dva model organizama *G. dulensis* i *E. danica*, kao najosetljiviji biomarkeri, tokom jeseni (kada su najizraženiji sredinski uticaji) izdvojili su se SOD i GPx. Tako se, kod vrste *G. dulensis* aktivnost SOD, kao i ostalih enzima (četiri od pet), smanjuje na CR2 lokalitetu tokom jeseni. U slučaju *E. danica*, aktivnost SOD pokazuje manju osetljivost od aktivnosti GPx, jer pod sinergističkim uticajem polutanata aktivnost SOD ispoljava najmanje longitudinalne promene u jesen, za razliku od aktivnosti GPx, koja se povećava na CR2, kao što je i očekivano. Kod vrste *G. dulensis* aktivnost SOD se konstantno smanjivala na CR2 lokalitetu, u svim ispitivanim sezonama, a aktivnost GPx se povećavala na CR2, sa izuzetkom jesenjih promena, kada se i ona smanjila. Nesumnjivo je da je promena aktivnosti GPx i kod vrste *G. dulensis* najosetljiviji biomarker. Ako uporedimo promene aktivnosti GPx kod tri ispitivane vrste akvatičnih artropoda, možemo zaključiti da obe vrste akvatičnih insekata ispoljavaju veću osetljivost kada je u pitanju ovaj biomarker u poređenju sa *G. dulensis*, iako je i kod ove gamaride zapažena visoka osetljivost ovog biomarkera na sredinske stresore. U prilog tome ide i činjenica da se tokom jeseni, kada je dejstvo stresora najintenzivnije, aktivnost GPx kod *E. danica* statistički značajno povećala na CR2, dok se kod *G. dulensis* značajno smanjuje u poređenju sa kontrolnim lokalitetom tokom ove sezone. Od sredinskih faktora, bitno je napomenuti da se protok izdvaja kao jedan od bitnijih činilaca kada je u pitanju uticaj ribnjaka na reci Crnici kod sve tri vrste.

Za procenu intenziteta uticaja efluenata pastrmskog ribnjaka na vodotok reke Crnice, korišćenjem odnosa mase riba kroz protok ( $m_f/Q$ ), konstatovan je da se najveći uticaj ispoljava u jesen, a potom u leto, kada je protok nizak, dok je najmanji uticaj ribnjaka tokom proleća i zime, kada su zabeležene visoke vrednosti protoka. Kod *E. venosus*, u reci Crnici, uticaj ribnjaka u potpunosti izostaje zbog visokih vrednosti protoka u tokom proleća. Kod *E. danica* i *G. dulensis* uticaj protoka na merene aktivnosti antioksidativnih enzima se ispoljava najviše tokom leta i jeseni, kada je izražen i sinergistički efekat brojnih sredinskih faktora. Tokom zime na reci Crnici dolazi do značajnog povećanja protoka, čije su zimske vrednosti bile čak 25 puta veće od jesenjih. Očekivano, tada su longitudinalne promene aktivnosti ispitivanih enzima kod *E. danica* minimalne. Slično je zabeleženo i kod larvi *E. venosus* uzorkovanih u proleće na reci Crnici, kada su vrednosti protoka takođe bile visoke, a ribnjak nije ispoljio uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima. Kod uzoraka *G. dulensis*,

uzorkovanih u zimskom periodu, ipak su uočljive longitudinalne promene aktivnosti antioksidativnih enzima, pri čemu se aktivnost SOD smanjuje na CR2, dok se aktivnost svih ostalih ispitivanih enzima povećava na CR2. Na osnovu toga mogli bismo da pretpostavimo da je vrsta *G. dulensis* manje osetljiva na uticaj protoka od *E. danica* i *E. venosus*. Kada uporedimo promene prolećnih aktivnosti antioksidativnih enzima kod dve ispitivane vrste insekata, možemo da primetimo da je protok imao manji uticaj na vrstu *E. danica*, kod koje ipak postoje longitudinalne promene aktivnosti antioksidativnih enzima tokom ove sezone, te se jasno uočava uticaj ribnjaka, što kod *E. venosus* nije slučaj.

Radi detaljnije diskusije, u nastavku teze data je odvojena diskusija za svaki od analiziranih abiotičkih i biotičkih parametara i model organizma.

### **5.1. Uticaj efluenata iz ribnjaka i drugih sredinskih faktora na abiotičke parametre reke Crnice**

U ovom istraživanju sezonske promene abiotičkih i biotičkih faktora dominiraju nad longitudinalnim, što ukazuje na diskretan uticaj ribnjaka „Sisevac“ na reku Crnicu. Kada su u pitanju abiotički faktori, uticaj ribnjaka je najizraženiji na hemijski sastav sedimenta u reci Crnici, pri čemu je prostorno (CR2 lokalitet) i vremenski (leto i jeseni) ograničen. U slučaju hemijskih parametara vode, on se ispoljava na DO, DO%, PO<sub>4</sub>, P<sub>t</sub>, BOD<sub>5</sub>, NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i pH najintenzivnije tokom jeseni, a u nešto manjoj meri i tokom leta. Uticaj koji azotna i fosforna jedinjenja, kao i teški metali imaju na živi svet, a, kako će se ispostaviti, i na analizirane biomarkere, je jako bitan.

Tokom jeseni, osim efluenata iz ribnjaka, značajan uticaj na ispitivane biomarkere ispoljavaju pojedini abiotički parametri (protok, temperatura vode, pH vode, prisustvo organske materije), koji u ovoj sezoni dostižu svoje ekstremne vrednosti. Ako uz to uzmemo u obzir izražen zajednički uticaj pojedinačnih sredinskih faktora tokom jeseni, onda se stvara sinergistički efekat uticaja navedenih činilaca, koji bi se mogao ispoljiti ne samo na ispitivane biomarkere, već i na nivou populacije. Naime, u jesen su zabeležene najveće vrednosti pH, NH<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, što je verovatno jedan od uzroka jesenjeg minimuma aktivnosti elemenata antioksidativne zaštite. Poznato je da efluenti iz ribnjaka izazivaju povećanje koncentracije organskih polutanata neposredno ispod ulivanja u recipijent, samim tim i porast koncentracija azotnih jedinjenja (Mirčić i sar., 2016). Međutim, maksimalne koncentracije amonijaka i

nitrita u recipijentu, zabeležene su u jesen, i značajno su veće od onih izmerenih u ostalim sezonama. Sa longitudinalnog aspekta, značajno visoke vrednosti ovih hemijskih parametara su na trećem, a maksimalne na četvrtom lokalitetu, što najverovatnije nije posledica dejstva ribnjaka u ovoj sezoni, jer bi, u tom slučaju, maksimalne vrednosti pomenutih parametara bile na CR<sub>2</sub> lokalitetu, neposredno ispod ribnjaka. PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> takođe dostiže visoke vrednosti u jesen, približne letnjim, sa maksimumom na CR<sub>3</sub>. Bitno je pomenuti i da su minimalne vrednosti protoka zabeležene upravo u jesen na svim lokalitetima, koje su značajno niže u odnosu na one izmerene u ostalim sezonama. Takođe, u ovoj sezoni izmerene su visoke temperature, približne ili čak više od letnjih, najniže vrednosti brzine, kao i niski vodostaj. U jesen su i pH vrednosti ubedljivo najviše u odnosu na ostale sezone na svim lokalitetima. Uzimajući u obzir navedene promene fizčkih i hemijskih parametara u jesen, ali i sredinske promene karakteristične za ovu sezonu, minimalne aktivnosti elemenata antioksidativne zaštite mogu biti posledica toksičnog uticaja azotnih jedinjenja prisutnih u recipijentu.

Osim ispusnih voda ribnjaka, sezonske promene sredinskih faktora tokom jeseni takođe mogu da utiču na promene koncentracije azotnih jedinjenja. Naime, tokom jeseni opada lišće sa okolne vegetacije, koja je prisutna na svim lokalitetima. Lišće i druge organske materije dospevaju u vodu, čime se povećava količina organske materije. Prilikom razgradnje organske materije, velika količina amonijaka se akumulira u sedimentu (Hargreaves, 1998). Poznato je da su koncentracije NH<sub>4</sub><sup>+</sup> i NH<sub>3</sub> u ekvilibrijumu i da zavise od temperature i pH, pa tako sa povećanjem vrednosti pH i temperature, smanjuje se koncentracija NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, dok raste koncentracija NH<sub>3</sub> (Camargo i Alonso, 2006; Mirčić i sar., 2016). Nejonizovani amonijak (NH<sub>3</sub>) je veoma toksičan za akvatične životinje (Constable i sar., 2003), a može da bude toksičan i za nitrificirajuće bakterije i da na taj način inhibira proces nitrifikacije, što može da izazove povećanu akumulaciju nitrita (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) u vodi (Camargo i Alonso, 2006). Takođe, amonijak dospeva u vodu i atmosferskom depozicijom, spiranjem iz atmosfere (Kelso i sar., 1999), a poznato je da smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima može da bude posledica akutnog uticaja amonijaka (Wang i sar., 2010). U prisustvu drugih hemijskih polutanata, kao što su teški metali, amonijak može da poveća toksičnost, odnosno dolazi do ispoljavanja sinergističkog efekta polutanata (Camargo i Alonso, 2006), što povećava njegov negativan uticaj na akvatične organizme. Verovatno je to i bio slučaj u jesenjem periodu, s obzirom na to da je i u jesen (pored leta) detektovan značajan porast koncentracija Cd, Cr, Ni, Sr i Zn u sedimentu reke Crnice. Negativan fiziološki uticaj amonijaka može da uzrokuje smanjen fekunditet, redukovanu ishranu, preživljavanje pa i smanjenje populacija akvatičnih životinja

(Constable i sar., 2003; Alonso i Camargo, 2004). Tokom jeseni su zabeležene i maksimalne koncentracije nitrita. Oni predstavljaju intermedijerne produkte dekompozicije organske materije. Nastaju u procesu nitrifikacije, oksidacijom amonijaka pomoću nitrificirajuće bakterije *Nitrosomonas*, dok njihovu oksidaciju do nitrata vrši *Nitrobacter*. Prisustvo nitrita u vodi ukazuje na nekompletnu oksidaciju proteina i aktivan rast bakterija, što znači da je aktivna razgradnja organske materije u toku. Povećana koncentracija nitrita je pokazatelj organskog zagađenja (Rosenau, 1935). Koncentracija nitrita u vodi takođe zavisi od pH – kada se pH povećava, povećava se i koncentracija nitrita. Njihova toksičnost na akvatične životinje se ispoljava tako što menjaju formu pigmentata zaduženih za prenos kiseonika i na taj način uzrokuju hipoksiju, a na kraju uginuće vodenih organizama (Camargo i Alonso, 2006). Među vodenim invertebratama, Ephemeroptera su jedna od najosetljivijih grupa na toksičnost nitrita (Camargo i Alonso, 2006). U skladu sa tim, rezultati Kelso i sar. (1999a), koji su ispitivali toksičnost nitrita na slatkovodnim invertebratama, pokazali su da su predstavnici Ephemeroptera (rodovi *Ephemerella* i *Hexagenia*) visoko osetljivi i jedni od najosetljivijih među ispitivanim invertebratama.

## 5.2. Uticaj efluenta iz ribnjaka na abiotičke parametre reke Skrapež

Na reci Skrapežu, ribnjak je ispoljio najveći uticaj na koncentracije nitrata, nitrita i sulfata, čije je najveće povećanje zabeleženo na lokalitetu SK2, neposredno ispod ribnjaka. Koncentracija nitrata na SK2 je skoro dva puta veća od one na kontrolnom lokalitetu. Međutim, ona ne prelazi 2 mg/l, što je gornja granica do koje koncentracija nitrata ne utiče na osetljive slatkovodne vrste (Camargo i sar., 2005). Vrednosti TOC značajno rastu nizvodno, sa najvećim variranjem između SK1 i SK2 lokaliteta, što znači da je neposredno ispod ribnjaka povećana količina organske materije što je i potvrđeno rezultatima, jer se BPK<sub>5</sub> povećava nizvodno od ribnjaka, dok se koncentracija rastvorenog kiseonika smanjuje. Van der Geest i saradnici (2002) su zaključili da postoji interakcija između različitih sredinskih polutanata i drugih ograničavajućih faktora, a posebno koncentracije kiseonika. Larve efemeroptere *Ephemera virgo* koje su izložili niskoj koncentraciji kiseonika bile su značajno osetljivije na polutante. S obzirom da se često poklapaju niske koncentracije kiseonika sa visokom koncentracijom polutanata u akvatičnim sistemima, pod ovakvim uslovima

višestrukog stresa negativni efekti zagadjivača na akvatične organizme mogu da budu neočekivano visoki (van der Geest i sar., 2002).

Zabeleženo je i da se koncentracija ukupnog fosfora povećava nizvodno od ribnjaka. Na SK2 je skoro 2 puta povećana u odnosu na kontrolni lokalitet, a na SK3 koncentracija ukupnog fosfora dodatno raste dostižući vrednost 2 puta veću nego na SK2, da bi se na poslednjem lokalitetu smanjila. Fosfor je, pored azota, esencijalni nutrijent u akvatičnim sistemima, koji, ako je zastupljen u visokim koncentracijama, može da izazove eutrofikaciju, što dalje ima za posledicu smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika i negativan uticaj na akvatične organizme (Jones, 2008). Koncentracije fosfora između 0,01 i 0,02 mg/l se smatraju kritičnim vrednostima iznad kojih se ubrzava eutrofikacija u površinskim vodama (Daniel i sar., 1998). Ove vrednosti su prekoračene na sva tri lokaliteta nizvodno od ribnjaka. Međutim, ovakvo povećanje koncentracije fosfora verovatno nije samo posledica dejstva ribnjaka, pošto hrana koja je korišćena za ishranu riba u ribnjaku na Skrapežu ima nizak sadržaj fosfata (0,9%). Značajna količina fosfora dospeva u akvatične ekosisteme sa okolnog zemljišta tokom erozivnih procesa i pojave bujica, koje su povezane sa precipitacijom (Daniel i sar., 1998). Proces erozije je razvijen u čitavom slivu reke Skrapež, a pojave bujica su veoma česte, posebno u proleće (Gavrilović, 1995), pa je značajno povećana koncentracija fosfora u reci verovatno posledica spiranja fosfora sa okolnog zemljišta, odnosno agrokulturnih površina koje se nalaze u okolini Skrapeža. Koncentracija nitrata se takođe menja nizvodno – raste na SK2, potom se smanjuje na SK3, pa ponovo raste na SK4.

### **5.3. Uticaj ispusnih voda ribnjaka na sastav i strukturu zajednice makroinvertebrata u reci Crnici**

Što se tiče parametara strukture zajednice makrozoobentosa, ribnjak ispoljava dejstvo pre svega na indekse koji reaguju na promene u sastavu zajednice na nivou vrste (indeks saprobnosti, SI) ili porodice (biotički indeksi ASPT i ASPTPO), za koje je i očekivano da su najosetljiviji na organsko zagađenje (Barata i sar., 2005), kao i na brojnost *E. danica*. Pri tome je opadanje brojnosti *E. danica* u leto i jesen pre svega posledica povećanja koncentracije teških metala u sedimentu sa čijom koncentracijom je snažno negativno korelisana. Poznato je da povećana koncentracija teških metala u akvatičnoj sredini vodi ka smanjenju diverziteta i brojnosti makroinvertebrata (Sola i Prat, 2006). Teški metali su često veoma toksični za živi svet. Oni su veoma grupa ksenobiotika zbog svoje visoke toksičnosti i dugog opstanka u



akvatičnoj sredini. (Yahya i sar., 2018). Kada su u pitanju longitudinalne promene brojnosti *E. danica*, minimalne vrednosti su zabeležene na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka tokom leta i jeseni. Ako uzmemo u obzir da je samo tokom ove dve sezone na ovom lokalitetu izmerena visoka koncentracija teških metala u sedimentu, možemo da zaključimo da je *E. danica* veoma osetljiva na prisustvo teških metala. To je i očekivano, s obzirom na to da sediment predstavlja krajnji repozitorijum za teške metale iz efluenata (Yahya i sar., 2018), pa je tako *E. danica* zbog svog načina života i ishrane direktno izložena njegovom uticaju. Za maksimalne vrednosti Simpsonovog indeksa i minimalne vrednosti ostalih parametara strukture zajednice makrozoobentosa, sa izuzetkom indeksa saprobnosti, tokom jeseni bitan je već pomenuti sinergistički efekat navedenih polutanata i fizičkih i hemijskih parametara vode tokom ove sezone, koji je verovatno ispoljio uticaj ne samo na antioksidativnu odbranu *E. danica*, već i na promenu strukture zajednice makroinvertebrata, odnosno smanjenje diverziteta tokom jeseni. Uzimajući u obzir značajnu korelaciju biotičkih indeksa sa fizičkim parametrima vode (Q, v, d i TW), azotnim komponentama i  $PO_4^{3-}$ , a o promenama ovih parametara u jesen je već diskutovano, ovakav scenario je vrlo verovatan. S druge strane, promene u indeksu saprobnosti su pre svega posledica promena u hemizmu vode, koncentracije  $NH_3$  na prvom mestu, ali i koncentracije  $PO_4^{3-}$ . Na promene indeksa saprobnosti pored navedenih hemijskih parametara utiče i temperatura (Yorulmaz i sar., 2015), pa tako u skladu sa temperaturnim promenama, dostiže maksimum u leto i jesen, a minimum u proleće i zimu.

Sezonski uticaji na sastav i strukturu zajednice makroinvertebrata su bitan faktor prilikom primene procesa biomonitoringa (Chi i sar., 2017). Protok, temperatura vode, koncentracija rastvorenog kiseonika, i životne istorije beskičmenjaka mogu biti uzroci sezonske varijabilnosti kada su u pitanju biotički indeksi (Stark i sar., 2009). Na skoro sve aspekte životne istorije makroinvertebrata, a posledično i na njihovu distribuciju i brojnost, utiču temperatura vode, tip i sastav supstrata, sredinski uslovi i dostupnost hrane (Chi i sar., 2017). Biotički indeksi, koji odražavaju strukturu zajednice, mogu da variraju u odgovoru i na promene protoka (Stark i sar., 2009). Shodno tome, najviše vrednosti protoka, dubine i brzine zabeležene u proleće i zimu, ali i visoke vrednosti DO tokom proleća i njegove maksimalne vrednosti u zimu, a takođe i odsustvo povećane koncentracije teških metala tokom ovih sezona su najverovetnije uzroci maksimalnih vrednosti Edab, ASPT i MASPTPO u ovim sezonama. Ako uzmemo u obzir da u slučaju parametara strukture i sastava zajednice makrozoobentosa nema statistički značajnih razlika između lokaliteta (osim u slučaju SI i

ASPT, gde primećujemo maksimum, odnosno minimum na CR<sub>2</sub>, i brojnosti *E. danica*), možemo zaključiti da uticaj ribnjaka na većinu parametara strukture i sastava zajednice makroinvertebrata uglavnom nije uočljiv, već da je sezonski uticaj dominantan, pa se na taj način mogu objasniti maksimalne letnje vrednosti navedenih parametara. Takođe, Stark i sar. (2009) su zaključili da svi analizirani indeksi pokazuju statistički značajno sezonsko variranje u tekućicama sa čvrstim dnom, što je slučaj i sa rekom Crnicom.

#### **5.4. Uticaj efluenata iz ribnjaka na ispitivane biomarkere larvi *Ephemera danica***

Na osnovu dobijenih rezultata analiziranih biomarkera u telu larvi vrste *E. danica*, možemo da konstatujemo da je najosetljiviji na uticaj efluenata iz ribnjaka „Sisevac“ promena aktivnosti GPx, dok se kod SOD efekat ribnjaka praktično ne uočava. Kod katalaze aktivnost nije detektovana, dok se koncentracija glutaciona nekonzistentno menjala. U ovom istraživanju sezonske promene analiziranih biomarkera su izraženije od longitudinalnih, pri čemu svi analizirani elementi antioksidativne zaštite pokazuju zajednički trend promene aktivnosti, pa tako minimum aktivnosti dostižu u jesen, a maksimum u leto. Uobičajeno je da aktivnost antioksidativnih enzima raste pod uticajem sredinskih stresora, kako bi organizam bio zaštićen od njihovih negativnih uticaja. Međutim, oksidativni stres visokog intenziteta može da utiče na inhibiciju ili smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima. Aktivnost SOD tokom jeseni je jako niska i praktično se ne menja duž lokaliteta. GPx, kao osetljiviji biomarker, pokazuje očekivane longitudinalne promene sa maksimumom na CR<sub>2</sub>, ali i najnižu aktivnost u ovoj sezoni, dok je u slučaju koncentracije GSH izmeren najizraženiji minimum u jesen. Ako intenzitet stresa prevazilazi kapacitet antioksidativnih enzima da eliminišu povećanu koncentraciju ROS pod uticajem jakog oksidativnog stresa, ovakvo povećanje produkcije ROS može da izazove njihovu inaktivaciju ili smanjenu aktivnost (Valko i sar., 2007; Birben i sar., 2012; Li i sar., 2013; Halliwell i Gutteridge 2015; Vranković i sar., 2018). Inhibicija antioksidativnih enzima može se javiti pod različitim uslovima, uključujući izloženost različitim polutantima, teškim metalima, i, uopšteno jakom oksidativnom stresu. Ovi faktori mogu poremetiti normalno funkcionisanje antioksidativnih enzima, što dovodi do njihove inhibicije (Valko i sar., 2007; Birben i sar., 2012; Li i sar., 2013; Halliwell i Gutteridge 2015). Konkretno, inhibicija antioksidativnih enzima kao što su superoksid-dismutaza, katalaza i/ili glutation-peroksidaza može se javiti kada postoji prekomerna proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) ili kada dolazi do interferencije sa aktivnim

mestima enzima zbog prisustva toksičnih supstanci (Valko i sar., 2007; Birben i sar., 2012; Li i sar., 2013; Halliwell i Gutteridge 2015). Sinergistički efekti polutanata i fizičkih i hemijskih parametara vode u jesen su najverovatnije izazvali prekomernu produkciju ROS, pa su minimalne vrednosti parametara antioksidativne zaštite tokom ove sezone posledica oksidativnog stresa visokog intenziteta, koji je uzrokovao inhibiciju, odnosno značajno smanjenje njihove aktivnosti. Takođe, veoma nizak antioksidativni kapacitet *E. danica* uzrokuje visok oksidativni disbalans kod ove vrste (Sanz i sar., 2017). Ovaj podatak ukazuje na njenu podložnost uticaju oksidativnog stresa, pa i, kao što je ovde slučaj, značajnom smanjenju aktivnosti antioksidativnih enzima. Štaviše, u istom radu, rezultati Sanz i sar. (2017) su pokazali da *E. danica* prirodno pokazuje jako visoke vrednosti oksidativnog oštećenja. U prilog navedenom idu i naši podaci o brojnosti *E. danica*. Naime, najniža brojnost ove vrste zabeležena je upravo u jesen, kada je bila značajno niža u odnosu na ostale sezone, što ukazuje na negativne efekte oksidativnog stresa visokog intenziteta.

Što se tiče ostalih sezona, antioksidativni enzimi SOD i GPx dostižu svoje maksimalne vrednosti tokom leta. Povećanje temperature stimuliše sve metaboličke procese, pri čemu dolazi do povećanog unosa kiseonika, što uzrokuje povećanu produkciju ROS, kao sporednog produkta intenzifikacije metabolizma, a kao posledica nastaje oksidativni stres (Martinez-Alvarez i sar., 2005; Luschak i sar., 2011). U slučaju SOD, aktivnost u proleće je takođe visoka, približna letnjoj, i znatno veća od zimske, što je u skladu sa temperaturnim promenama. Buchner i sar. (1996) su pokazali da je aktivnost SOD zavisna od temperature, tj. da se sa povećanjem temperature povećava aktivnost SOD kod vrste polihete *Arenicola marina*. Osim temperature, bitan faktor za aktivnost antioksidativnih enzima je i dostupnost hrane (Borković-Mitić i sar., 2011; Wojtal-Frankiewicz i sar., 2017). U proleće i leto, ishrana je intenzivnija, pa se stoga povećava aktivnost SOD. U slučaju GPx, aktivnosti u proleće i zimu karakterišu približne vrednosti. Ovo možemo pripisati uticaju hemijskih parametara, jer vrednosti ovih parametara, generalno, pokazuju isti trend, tj. približne vrednosti u proleće i zimu, a GPx pokazuje veću osetljivost od SOD na iste.

Analizom dobijenih rezultata ovog istraživanja možemo da konstatujemo da je promena aktivnosti GPx najosetljiviji biomarker, koji ukazuje na najveći stepen longitudinalnih promena i uticaj pastrmskog ribnjaka u letnjem i jesenjem periodu. Poznato je da GPx ima zaštitnu ulogu kada je u pitanju oksidacija lipida (sprečava oksidaciju lipida) (Brigelius-Flohe, 1999). *E. danica* ima veoma visok procenat lipida, zbog svog dugog larvalnog razvića, kada akumulira energetske rezerve, koje koristi u adultnom stadijumu kada

se ne hrani. Stoga je logično da je kod ove vrste GPx najosetljiviji biomarker. Aktivnost GPx u svim sezonama je statistički značajno veća na CR<sub>2</sub> u odnosu na ostale lokalitete, gde se uobičajeno ispoljava najjači uticaj ribnjaka u odnosu na kontrolni lokalitet. Ovo je u skladu sa rezultatima Božanić i sar. (2018), koji su ispitivali uticaj pastrmskog ribnjaka na antioksidativni sistem larvi *E. danica* na reci Skrapež. Oni su uočili isti trend promene aktivnosti GPx i takođe zaključili da je GPx najosetljiviji biomarker kod ove vrste.

Aktivnost SOD, kao što je pomenuto, pokazuje izraženije sezonske od longitudinalnih promena. U proleće se uočava snižena koncentracija ovog enzima na CR<sub>2</sub> u odnosu na kontrolni lokalitet, što nije očekivana reakcija na uticaj polutanata na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka. Isti trend promene aktivnosti SOD, primetili su Božanić i sar. (2018) i Vranković i sar. (2012), kada je aktivnost SOD na kontrolnom lokalitetu bila viša od one na lokalitetu neposredno ispod izvora zagađenja. Ovi autori navode da su ovakve promene moguća posledica povećanja koncentracije superoksidnog radikala na drugom lokalitetu u odnosu na kontrolni, kao posledica normalnih fizioloških procesa. U našem istraživanju možemo da primetimo da promene DO% pokazuju suprotni trend longitudinalnih promena u odnosu na aktivnost SOD tokom proleća, dok su promene koncentracije olova (Pb) u skladu sa longitudinalnim promenama SOD tokom ove sezone. Uočeno je takođe, da promene u koncentraciji kiseonika imaju bitan uticaj na aktivnost ovog enzima i kod druge ispitivane vrste *G. dulensis* (videti poglavlje 5.7.). Pozitivna korelacija između aktivnosti SOD i koncentracije Pb uočena je i u istraživanju Długosz i sar. (2005), na osnovu čega su zaključili da Pb može da indukuje oksidativni stres. Fe<sup>2+</sup> u našem istraživanju pokazuje negativnu korelaciju sa aktivnošću SOD, što je u skladu sa rezultatima Taiwo i sar. (2014), koji su ispitivali uticaj teških metala na aktivnost SOD i koncentraciju GSH kod žabe *Hoplobatrachus occipitalis*. Enzimi koji imaju metale na, ili blizu svojih aktivnih mesta, što je slučaj sa SOD, su posebno osetljivi na oksidaciju katalizovanu metalom (Stadtman, 1990; Birben i sar, 2012). Oksidativna modifikacija ovih enzima može da inhibira njihove aktivnosti (Birben i sar., 2012). Vodonik peroksid u prisustvu Fe<sup>2+</sup> može da bude konvertovan u visoko reaktivan hidroksil radikal putem Fentonove reakcije (Fernandez i sar., 2009). Vodonik peroksid nastaje endogeno - kao produkt aktivnosti SOD konvertovanjem superoksidnog radikala, i egzogeno - fotooksidativnim reakcijama pod dejstvom UV zraka (Borgeras i sar., 2000). UV indukovano stvaranje vodonik peroksida je intenzivno pri visokim temperaturama i niskim vodostajima (Buchner i sar., 1996; Borgeras i sar., 2000), koji su zabeleženi u leto i jesen na svim lokalitetima, a upravo u ovim sezonama aktivnost SOD praktično ne pokazuje

longitudinalne promene. Jedino u zimu, kada su niske temperature, aktivnost SOD se pravilno menja duž lokaliteta, sa očekivanim maksimumom na CR<sub>2</sub>.

Delovanjem GPx ili CAT, vodonik peroksid se eliminiše. GPx je odgovorna za detoksifikaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri niskim koncentracijama, dok CAT preuzima ulogu kada je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prisutan u visokim koncentracijama, a GPx zasićena supstratom (Halliwell i Gutteridge, 1999, Łukaszewicz-Hussain i Moniuszko-Jakoniuk, 2004). S obzirom na to da je CAT deaktivirana, vrlo je moguće da aktivnost GPx nije bila dovoljna da eliminiše u potpunosti visoke koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pa je u reakciji sa Fe<sup>2+</sup> nastao hidroksil radikal (OH·). Hidroksil radikal je ekstremno reaktivan, a svojim delovanjem izaziva oštećenja DNK, lipidnu peroksidaciju, oštećenja proteina i deaktivaciju enzima (Winston i Di Gulio, 1991). Casano i sar. (1997) su pokazali da OH, a takođe i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> imaju bitnu ulogu u inhibiciji i degradaciji SOD u hloroplastima pšenice izloženim svetlosti. Ma i sar. (2017) su, ispitujući inhibitore antioksidativnih enzima, potvrdili da su dve od tri forme SOD (Cu/Zn-SOD i Fe-SOD) osetljive na dejstvo vodonik peroksida kao inhibitora. Stoga, vrlo je moguće da su ove reaktivne kiseonične vrste (OH· i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ispoljile svoja inhibitorska svojstva na aktivnost SOD, pa da zato izostaju longitudinalne promene u leto i jesen.

Promene koncentracije GSH ne pokazuju ni sezonsku, ni longitudinalnu pravilnost, a ni značajnu korelaciju sa aktivnošću GPx. U istraživanju Wojtal-Frankiewicz i sar. (2017), koji su ispitivali uticaj sezonskih promena na parametre antioksidativne zaštite kod zebaste školjke (*Dreissena polymorpha*), takođe su zabeležene značajno niže koncentracije GSH u jesen (tokom septembra), nego u leto (tokom jula). Za razliku od rezultata našeg istraživanja, u ovom slučaju koncentracija GSH je u negativnoj korelaciji sa GPx, kao i u radovima (Łukaszewicz-Hussain and Moniuszko-Jakoniuk, 2004; Despotović i sar., 2012; Božanić i sar., 2018). Negativna korelacija između ova dva elementa antioksidativne odbrane je očekivana, jer GPx koristi GSH kao kofaktor pri svojoj aktivnosti, pa se sa povećanjem aktivnosti GPx smanjuje koncentracija GSH (Birben i sar., 2012). Međutim, teški metali imaju sposobnost da se vezuju za sulfhidrilne grupe proteina, kao što je GSH, što utiče na njegovu aktivnost i menjanje strukture. GSH, zajedno sa metalotioneinima, ima ključnu ulogu u detoksifikaciji teških metala, što ima značajan uticaj na promenu njegove koncentracije (Jozefczak i sar., 2012; Saad i sar., 2016). Štaviše, s obzirom na to da su u našem istraživanju promene koncentracije GSH značajno korelisane sa koncentracijama Pb i Cr, očigledno je da su ovi metali imali najveći uticaj na promene koncentracije ovog antioksidanta. To je u skladu sa rezultatima Samuel i sar. (2015), koji su ispitivali uticaj teških metala na produkciju

glutationa kod ribe *Clarias gariepinus*, i takođe ustanovili značajnu korelaciju između koncentracija Pb i Cr kojima su ribe bile izložene i koncentracije GSH, dok su Taiwo i sar. (2014) zaključili da je pored aktivnosti SOD, i promena koncentracije GSH kod žabe *Hoplobatrachus occipitalis* povezana sa akumulacijom teških metala na pojedinim lokacijama. Takođe, Lushchak i sar. (2011) ukazuju na značajnu ulogu GSH u detoksifikaciji Cr. U našem istraživanju GSH pokazuje snažnu pozitivnu korelaciju sa SOD, što je u skladu sa rezultatima Božanić i sar. (2018), koji su kod *E. danica*, zapazili istu korelaciju, pa je moguće da je to karakteristika vrste.

### 5.5. Uticaj efluenta iz ribnjaka na ispitivane biomarkere *Ecdyonurus venosus*

Istraživanje uticaja ribnjaka na analizirane biomarkere vrste *Ecdyonurus venosus* pokazalo je da karakteristike vodotoka imaju bitan uticaj na promene aktivnosti praćenih enzima (SOD, GPx) i koncentracije glutaciona (GSH), pri čemu se kao najosetljiviji biomarker izdvaja promena aktivnosti GPx.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da na SK2 lokalitetu, na kom je najizraženiji uticaj ribnjaka, aktivnosti oba enzima i SOD i GPx su u porastu, dok je na SK3 i SK4 uočen obrnuti trend aktivnosti ova dva enzima - na SK3 aktivnost SOD se povećava, a aktivnost GPx smanjuje, a na SK4 smanjenu aktivnost SOD prati povećana aktivnost GPx. GPx je odgovorna za detoksifikaciju vodonik peroksida kada je prisutan u malim koncentracijama, dok se pri visokim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dešava saturacija GPx supstratom, pa tada deluje CAT, koja ne može dostići zasićenje vodonik peroksidom (Łukaszewicz-Hussain and Moniuszko-Jakoniuk, 2004). Verovatno je na SK2, gde se ispoljava najjači uticaj ribnjaka, došlo do brzog povećanja koncentracije superoksidnog radikala usled jakog uticaja sredinskog stresora, što je uzrokovalo povećanje aktivnosti SOD, ali da povećana aktivnost nije bila dovoljno efikasna da detoksifikuje takvo brzo povećanje koncentracije ovog radikala. Iz toga se može zaključiti da koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije bila previše visoka, pa da je povećana aktivnost GPx bila dovoljna za njegovu eliminaciju na SK2 lokalitetu. Na SK3 se povećava aktivnost SOD, što dovodi do povećanja koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pa se smanjuje aktivnost GPx. Ovakva pretpostavka je zasnovana na rezultatima do kojih su došli Łukaszewicz-Hussain i Moniuszko-Jakoniuk (2004) ispitujući promene aktivnosti GPx, GR, CAT i nivoa GSH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u jetri pacova nakon akutne intoksifikacije organofosfatnim insekticidom. Oni su uočili

statistički značajnu negativnu korelaciju između koncentracije  $H_2O_2$  i aktivnosti GPx, i pozitivnu korelaciju između koncentracije  $H_2O_2$  i aktivnosti CAT. Na ovaj način je moguće objasniti korelaciju aktivnosti SOD i GPx na svim lokalitetima koji su istraživani u ovom radu.

Trend promene aktivnosti SOD i GPx posmatran u odnosu na lokalitete je u snažnoj korelaciji sa promenom fosfora i nitrita duž lokaliteta. Mirčić i saradnici (2016) su ispitivali uticaj ribnjaka na aktivnost antioksidativnih enzima SOD i CAT kod larvi *Dinocras megacephala*. Rezultati tog istraživanja su, nasuprot našim, pokazali da je najveća aktivnost SOD na prvom lokalitetu nizvodno od ribnjaka. Međutim, u njihovom istraživanju PCA analiza nije pokazala statistički značajne korelacije između SOD i hemijskih parametara vode (Mirčić i sar., 2016). Nasuprot tome, naši rezultati pokazuju da su promene aktivnosti SOD snažno pozitivno korelisane sa promenama ukupne koncentracije fosfora ( $R=0.989$ ,  $P=0,011$ ), a promene aktivnosti GPx su u korelaciji sa promenama koncentracije nitrita ( $R=0.997$ ,  $P=0,011$ ) i ukupne tvrdoće vode ( $R=0.968$ ,  $P=0,032$ ). Stoga, možemo da zaključimo da ovi hemijski parametri vode imaju veliki uticaj na aktivnost ispitivanih enzima larvi *E. venosusa* u reci Skrapež. U prilog tome ide i istraživanje Kelsa i saradnika (1999) koji su primenili testove toksičnosti nitrita na rodove *Ephemerella* sp. i *Hexagenia* sp. Obe grupe su pokazale visoku osetljivost. Štaviše, u poređenju sa drugim ispitivanim invertebratama, one su među najosetljivijima na toksičnost nitrita (Alonso i Camargo, 2006).

Kada je reč o promenama koncentracije glutationa (GSH) verovatno je smanjenje na SK2, posledica značajno povećane aktivnosti GPx jer je poznato da za svoju aktivnost GPx koristi tiole male molekulske mase, kao što je GSH (Birben i sar., 2012). Despotović i saradnici (2012) su takođe uočili da je smanjena koncentracija GSH u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem aktivnosti GPx kod puževa *Viviparus acerosus* sakupljenih tokom septembra. Međutim, koncentracija glutationa se na SK3 i SK4 vraća na vrednosti na kontrolnom lokalitetu. Brojna istraživanja pokazuju da ne postoji pravilnost kada je u pitanju promena koncentracija GSH u uslovima oksidativnog stresa. Łukaszewicz-Hussain i Moniuszko-Jakoniuk (2004) su u svom istraživanju potvrdili prethodno navedeno. U jetri pacova nakon intoksifikacije organofosfatnim insekticidom oni su uočili negativnu korelaciju između koncentracije GSH i aktivnosti GPx pri nižim dozama insekticida, dok je pri većim dozama korelacija između koncentracije GSH i aktivnosti GPx bila pozitivna. Uzroci variranja koncentracije glutationa tokom oksidativnog stresa su povećana sinteza GSH, koja predstavlja

adaptivni mehanizam, i/ili gubitak GSH, koji je posledica njegove oksidacije usled dejstva GPx (Łukaszewicz-Hussain i Moniuszko-Jakoniuk, 2004).

U reci Crnici, za razliku od reke Skrapež, nije uočen uticaj ribnjaka ni na hemijske parametre vode (što je verovatno bujičnog toka reke Crnice tokom proleća), ni na ispitivane molekularne biomarkere kod vrste *E. venosus*. Rezultati su pokazali da se jedino aktivnost GPx menja. GPx na prva tri lokaliteta je praktično identična, dok na CR4 dolazi do velikog porasta. Značajan porast aktivnosti GPx na poslednjem lokalitetu je najverovatnije posledica povećane koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koja u ovom slučaju nije posledica aktivnosti SOD, jer se aktivnost ovog enzima ne menja značajno duž lokaliteta. Povećanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> možemo objasniti karakteristikama lokaliteta CR4, na kom dominiraju plitka priobalska i lentična područja. Naime, u takvim plitkim vodenim područjima solarna radijacija dovodi do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji nastaje kao posledica formiranja kiseoničnog radikala usled dejstva UV zračenja (Buchner i sar., 1996), odnosno kao posledica fotooksidativnih reakcija koje se dešavaju pri UV zračenju (Borgeraas i Hessen, 2000). S obzirom na to da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> predstavlja supstrat za dejstvo GPx, povećana aktivnost ovog enzima na CR4 je posledica povećane koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dakle, možemo konstatovati da ni promena aktivnosti GPx nije posledica dejstva ribnjaka, ali je promena aktivnosti GPx najosetljiviji biomarker.

#### **5.6. Uticaj efluenta iz pastrmskog ribnjaka na ispitivane biomarkere *Gammarus dulensis***

Uticaj pastrmskog ribnjaka na reci Crnici na biološki odgovor u vidu promene aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx, GST i GR) ispitivan je na uzorcima *G. dulensis*. Rezultati su pokazali da se aktivnosti ispitivanih enzima menjaju i sezonski i longitudinalno. S obzirom na postojanje statistički značajne interakcije između sezonskih i longitudinalnih promena, longitudinalne promene aktivnosti svih ispitivanih enzima pokazale su jaku zavisnost od sezone u kojoj su merene.

Kada je u pitanju trend longitudinalnih promena aktivnosti antioksidativnih enzima, aktivnosti SOD i CAT se smanjuju na lokalitetu CR2 u poređenju sa referentnim lokalitetom, dok se aktivnosti GST i GR povećavaju na CR2 u odnosu kontrolni lokalitet. Na osnovu toga SOD i CAT se, kao što je već pomenuto, mogu svrstati u prvu grupu, a GST i GR u drugu grupu. Kod uzoraka *G. dulensis*, maksimalnu aktivnost SOD dostiže u zimu na lokalitetima najmanje izloženim stresoru - CR1 i CR4. Najmanja aktivnost SOD zabeležena je u jesen na



lokalitetima CR2 i CR3, koji su pod najvećim uticajem pastrmskog ribnjaka. Aktivnost CAT je dostigla maksimum tokom zime na lokalitetima CR2 i CR3, a tokom leta na CR1 i CR4. To je u skladu sa istraživanjem Paital i Chainy (2013) za čije istraživanje je kao model organizam korišćena vrsta krabe *Scylla serrata*. Analiza aktivnosti GST kod *G. dulensis* pokazala je da sa povećanjem distance od stresora, odgovor ovog enzima izostaje. Do sličnih rezultata došli su i Bouzahouanea i sar. (2018), koji su pokazali neobjašnjivu aktivnost između referentnog i zagađenog lokaliteta. Kada su u pitanju sezonske varijacije aktivnosti ovog enzima, one dostižu maksimum u jesen, a minimum u zimu (Braghirolli i sar., 2016). GST ima bitnu ulogu u antioksidativnoj odbrani kada drugi enzimi pokazuju slabu aktivnost (Sheehan i Power, 1999). Navedeno može biti podržano činjenicom da su na CR2 lokalitetu, tokom sve tri sezone, aktivnosti SOD i CAT (posebno tokom leta i jeseni) bile niske kod analiziranih uzoraka *G. dulensis*. GR i GPx karakteriše sličan trend sezonske promene aktivnosti.

Očekivano je da se sa menjanjem sredinskih faktora, menja i aktivnost antioksidativnih enzima kako bi se organizam zaštitio od negativnih uticaja. Međutim, aktivnost SOD kod *G. dulensis* iz reke Crnice konstantno pokazuje suprotno ponašanje. CAT prati isti trend kao SOD u leto i jesen, a u jesen je isti slučaj i sa aktivnostima GR i GPx. To znači da kada intenzitet stresa premaši kapacitet enzima da detoksifikuje slobodne radikale, njihov višak može da izazove inaktivaciju enzima. Takvo ponašanje je najizraženije u jesen, kada se aktivnosti četiri od pet ispitivanih enzima (SOD, CAT, GPx i GR) smanjuju na CR2 lokalitetu, što znači da su aktivnosti enzima potisnute usled dejstva kombinacije promenjenih sredinskih faktora, karakterističnih za ovu sezonu (Slika 23A, C, D i E). Kada su u pitanju zglavkari, izloženost teškim metalima može da utiče na promenu aktivnosti antioksidativnih enzima, u zavisnosti od koncentracije i trajanja izlaganja (Duman i Kar, 2015; Lei i sar., 2011). Razlog bi mogao da bude povećanje koncentracije metala, s obzirom na to da su Migula i sar. (2004) zabeležili da pojedine ose izložene kompleksnim smešama metala pokazuju tendenciju ka smanjivanju aktivnosti SOD, CAT i GPx. Kod *G. dulensis* aktivnost GPx je generalno bila viša (u jesen i zimu) od aktivnosti CAT (u zimu) na CR2 lokalitetu u poređenju sa kontrolnim, CR1 lokalitetom. S obzirom na to da je aktivnost SOD bila smanjena na CR2 lokalitetu u odnosu na CR1 lokalitet tokom svih sezona, možemo pretpostaviti da je aktivnost GPx ili indukcija CAT prvi enzimatski odgovor na oksidativni stres kod *G. dulensis*. U skladu sa tim su nalazi Duman i sar (2015), koji su došli do zaključka da enzim GPx čini prvu liniju antioksidativne odbrane kod *Gammarus pulex*. Lijun i sar. (2015) su vršili istraživanje na kineskim skakavcima, a rezultati su pokazali da je kod ovih

zglavkara CAT prvi enzim koji odgovara na oksidativni stres. U ovom istraživanju osetljivost enzima na inaktivaciju je bila prilično drugačija:  $GST < GPX \approx GR < CAT < SOD$ . Međutim, životinje mogu da se prilagode na uslove sa niskom koncentracijom polutanata, pa, pod ovakvim okolnostima, promene sezonskih faktora mogu da imaju veći uticaj na odgovor biomarkera nego variranje zagađenja (Stoliar and Lushchak, 2012).

SOD i CAT tokom leta i jeseni karakteriše očekivana kooperativna aktivnost, ali to nije uvek slučaj. Barata i sar. (2005) su primetili da aktivnosti SOD i CAT pokazuju drugačije odgovore pri izloženosti Cd i Cu kod vrste *Daphnia magna*. Aktivnost SOD se značajno povećala pri izloženosti visokim koncentracijama Cd, a marginalno povećanje je ispoljila pri izloženosti najvišim koncentracijama Cu. Sa druge strane, aktivnost CAT se značajno povećala pri izloženosti Cu, dok se u prisustvu Cd značajno smanjila kod vrste *D. magna*. Slične rezultate su dobili i Tatar i sar. (2018). Ovi autori su zaključili da jedinke *G. pulex* koje su bile duže izložene komunalnim otpadnim vodama pokazuju veće aktivnosti SOD i niže aktivnosti CAT od jedinki koje su kraće vreme bile pod dejstvom ovog polutanta. Ovakav rezultat može da posluži kao objašnjenje za nesimultanu aktivnost SOD i CAT tokom zime kod *G. dulensis* (Slika 23A i E). Naime, oba enzima su vremenski-zavisni, pri čemu SOD prednjači sa detoksifikacijom oksiradikala, a prati ga odgovarajuće povećanje aktivnosti CAT.

Osim redukcije  $H_2O_2$ , GPx katalizuje i redukciju lipidnih peroksida. U ovom istraživanju, rezultati pokazuju smanjenje aktivnosti SOD, CAT i GPx kod *G. dulensis* u jesen na svim lokalitetima nizvodno od referentnog (Slika 23A, C i E). Smanjena aktivnost enzima može biti posledica negativnog uticaja povećanja supstrata ili oštećenja izazvana modifikacijom ROS (Carvalho i sar., 2012). Smanjenje aktivnosti CAT i GPx uzrokuju povećanje koncentracije  $H_2O_2$ , koji ubrzava konverziju  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ .  $Fe^{2+}$  služi kao supstrat za hidroksil radikal, pa nastaje reakcija koja vodi ka ubrzanoj lipidnoj peroksidaciji (Halliwell i Gutteridge, 1995).

Već je bilo reči o tome da smanjena aktivnost SOD može da izazove ćelijska oštećenja zbog viška  $O^{2-}$  (Ozmen i sar., 2004). Stoga se može očekivati da su povećane koncentracije  $H_2O_2$  i  $O^{2-}$  tokom jeseni imale negativan uticaj na preživljavanje jedinki *G. dulensis*. Analiza sezonske i longitudinalne dinamike brojnosti *G. dulensis* ide u prilog ovakvoj pretpostavci. Brojnost tokom jeseni na CR2 lokalitetu dostiže jasan minimum (1400 jedinki po  $m^2$ ), što nije bio slučaj sa referentnim lokalitetom (3000 jedinki po  $m^2$ ) ili na CR4 (2250 jedinki po  $m^2$ ), gde je enzimsko aktivnost uveliko oporavljena.

Za razliku od SOD i CAT, promena aktivnosti GR je pratila promenu aktivnosti GPx, kao što je i očekivano (Stoliar i Lushchak, 2012). Povećana aktivnost GR zabeležena kod *G. dulensis* na tri nizvodna lokaliteta ukazuje na aktivnu ulogu ovog enzima u uklanjanju ROS. U skladu sa rezultatima ovog istraživanja, Kumari i sar. (2014) i Monferrán i sar. (2011) pokazali su da je akvatična fauna na lokalitetima zagađenim metalima ispoljila povećanu aktivnost GR.

Glutation S transferaze spadaju u grupu visoko rasprostranjenih enzima koji katalizuju konjugaciju glutationa sa ksenobiotcima, pa na taj način stvaraju manje toksične molekule (Olsen i sar., 2001). Stoga, indukcija glutacione transferaze ukazuje na prisustvo različitih ksenobiotika, kao što su metali (Carvalho i sar., 2012) i organski polutanti (Livingstone, 1998). U ovom istraživanju, indukcija aktivnosti GST na nizvodnim lokalitetima u svim sezonama može da ukazuje na postojanje procesa detoksifikacije, koji imaju ulogu u zaštiti tkiva od oštećenja izazvanim različitim polutantima.

Na osnovu analize aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima, može se pretpostaviti da su njihova sezonska i longitudinalna variranja pod uticajem različitih sredinskih stresora, među kojima je povećanje koncentracije metala u reci Crnici jedan od dominantnijih. Zato su merene sezonske i longitudinalne promene fizičkih i hemijskih parametara vode, kao i hemijskog sastava sedimenta, kako bi se ispitaio njihov uticaj na promene aktivnosti antioksidativnih enzima.

### **5.7. Uticaj fizičkih i hemijskih parametara recipijenta na ispitivane biomarkere kod vrste *Gammarus dulensis***

Najveće promene za sve merene fizičke i hemijske parametre vode reke Crnice zabeležene su između kontrolnog lokaliteta i CR2 lokaliteta, što znači da su takve promene posledica uticaja efluenta pastrmskog ribnjaka. Kada su u pitanju sezonske promene, zimske promene u poređenju sa drugim sezonama su najizrazitije, pri čemu su najuočljivije kod Q, V i DO<sub>2</sub>, koji dostižu maksimum, i kod WT, TP, Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, koje karakteriše minimum u ovoj sezoni. Uzrok velike zimske promene je najverovatnije izrazito povećanje vrednosti protoka (Q) na svim lokalitetima tokom zime, čije su zimske vrednosti bile čak 25 puta veće u odnosu na jesenje. Posledica je potpuno odsustvo uticaja pastrmskog ribnjaka na pomenute parametre, što je posebno primetno kod DO<sub>2</sub> i TP, kao i nedostatak statističke značajnosti kada je u pitanju uticaj ribnjaka.

Kod CIA, najveći uticaj na aktivnosti enzima bi trebalo da imaju abiotički parametri predstavljeni strelicama čiji su vrhovi usmereni u pozitivnom ili negativnom smeru. Uzimajući u obzir jačinu asocijacije, prosečne vrednosti parametara, amplitude njihovih promena, kao i očekivanu osetljivost *G. dulensis* na njih, DO<sub>2</sub> i TP su najverovatnije uzroci zabeleženih promena aktivnosti SOD. Prethodno je pokazano da narušen balans u snabdevanju kiseonikom utiče na nivo kiseonika u tkivima, a takvo stanje utiče na antioksidativni sistem (Oliveira i sar., 2010).

Kada je u pitanju uticaj abiotičkih parametara na aktivnost GST, ako pri proceni uzmemo u obzir iste kriterijume kao za SOD, najveći uticaj su imali BOD<sub>5</sub> i TOC. Za razliku od SOD, GST reaguje na povećan stres (povećanje vrednosti BOD<sub>5</sub> i TOC) povećanjem svoje aktivnosti. Promene pH vrednosti takođe bi mogle imati značajan uticaj, s obzirom na to da katalitička efikasnost i sposobnost vezivanja enzima zavisi od promena pH, kao i biodostupnost različitih polutanata, a posebno metala (Carvalho i Fernandes, 2008).

Enzimi koji su svrstani u treću grupu (GPx, GR i CAT) nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa ispitivanim abiotičkim parametrima. Ova grupa enzima je pod većim uticajem SOD i GST nego praćenih abiotičkih parametara.

Ako se slika 23 analizira detaljno može se videti da postoje značajne razlike između trenda promena aktivnosti antioksidativnih enzima u leto i jesen, dok se tokom zime njihova aktivnost menja na sličan način, koji se značajno razlikuje od jesenjih promena. To ukazuje na prisustvo dominantnog stresora različitog od onoga koji utiče na SOD i GST. Slika 21 pokazuje sezonske promene V duž reke, sa najvišim vrednostima tokom zime. Zabeleženo je ekstremno povećanje vrednosti V na CR2 lokalitetu, koje se gradacijski smanjuje nizvodno, da bi na CR4 WV dostigla referentne vrednosti (Slika 21). Korelaciona analiza zimskih uzoraka je pokazala da su longitudinalne promene V tokom zime u jakoj korelaciji sa promenama svih enzima.

### **5.8. Uticaj hemijskog sastava sedimenta na ispitivane biomarkere kod vrste *Gammarus dulensis***

Za mnoge toksične materije, sediment predstavlja ne samo primarni repozitorijum, nego i glavni izvor kontaminacije akvatičnog lanca ishrane. Zato je bitno ispitati sastav sedimenta i odrediti koncentracije mogućih toksičnih elemenata. Sediment apsorbuje

polutante iz vode, tako smanjujujući njihovu koncentraciju u vodenom telu, pa je fokus stavljen na elementarni sastav sedimenta.

Na osnovu rezultata koinercione analize konstatovano je da je uticaj promena hemijskog sastava sedimenta na ispitivane biomarkere mnogo manji u odnosu na uticaj koji imaju fizički i hemijski parametri vode. Međutim, ne može se isključiti uticaj na pojedinačne enzime, pogotovo što promene hemijskih i fizičkih parametara vode ne mogu da objasne promene aktivnosti CAT, GR i GPx u letnjim i jesenjim uzorcima.

Analizirani hemijski parametri se i ovde dele u tri grupe (Slika 26). Prvu grupu, kao što je pomenuto, karakteriše izraženi maksimum na CR2 lokalitetu u leto i jesen, potpuni oporavak na CR3 i CR4 do referentnih vrednosti tokom ovih sezona, i potpuno odsustvo maksimuma na CR2 tokom zime. Promena parametara prve grupe je pod jakim uticajem efluenta pastrmskog ribnjaka, jer potpuno nestaje tokom visokog zimskog protoka. Za razliku od hemijskih parametara vode, uticaj ribnjaka je ograničen samo na CR2 lokalitet. Ovakav uticaj je posledica jasno vidljivih ostataka riblje hrane, koji prekrivaju veliki deo sedimenta tokom leta i jeseni. Takođe, tokom leta i jeseni su zabeležene visoke koncentracije sumpora i fosfora u sedimentu, koji su glavni konstituenti riblje hrane.

Treća grupa hemijskih parametara sedimenta karakteriše se maksimalnim vrednostima na prva tri lokaliteta tokom zime, potpunim odsustvom maksimuma na CR2 tokom leta i jeseni, i visokim i relativno konstantnim koncentracijama na CR4. Stoga, CR4 je verovatno druga tačka zagađenja, najverovatnije neorganske prirode, jer nisu prisutne visoke koncentracije fosfora i sumpora. Koncentracije ovih elemenata nisu pod uticajem ribnjaka, verovatno zbog njihovih niskih koncentracija u ribljoj hrani. Zimski maksimum može biti posledica visokog protoka vode, koja je nosila i deponovala sediment iz gornjih delova reke, koji su bogatiji ovim elementima.

Elementi druge grupe dele određene karakteristike prve i treće grupe. Oni su prisutni u ribljoj hrani u dovoljnoj meri da bi održali letnji i jesenji maksimum na CR2 lokalitetu, ali imaju manju amplitudu u poređenju sa jesenjim maksimumom na CR4. Uticaji uzvodnih depozita su jasno vidljivi na CR1, koga karakteriše zimski maksimum.

Aktivnost CAT tokom leta i jeseni dostiže izraziti minimum na CR2 lokalitetu, dok su vrednosti na CR3 i CR4 približne onima na CR1 lokalitetu. Aktivnost CAT tokom leta i jeseni pokazala je jaku i statistički značajnu negativnu korelaciju sa koncentracijama elemenata prve grupe: Zn, Cd, P, S, Ca, Cr, Ni i Sr. Koncentracije svih navedenih elemenata su povišene

usled uticaja pastrmskog ribnjaka, pa su vrlo verovatno odgovorni za indukciju promena aktivnosti u letnjim i jesenjim uzorcima. Među njima, samo koncentracije Cr i Ni prelaze vrednosti nivoa praga uticaja (TEL -threshold effect level) tokom leta i jeseni na CR2 prema USEPA (1999). Prema Sediment Quality Guidelines predloženim od strane USEPA (2000), sediment na CR2 lokalitetu se karakteriše kao neznatno zagađen Cr i Ni, dok je prema Consensus-Based Sediment Quality Guidelines (CBS QG) [SQG (2003)] on umereno zagađen niklom. Stoga, Cr i Ni predstavljaju bitne stresore, koji utiču na aktivnost CAT na CR2 lokalitetu tokom leta i jeseni. Iako ne postoje podaci o njihovom uticaju na aktivnost CAT, poznato je da Cr, kada je prisutan u visokim koncentracijama, ima negativan uticaj na akvatične organizme, kao što su genotoksičnost i oksidativna oštećenja (Lushchak i sar., 2008; Velma i Tchounwou, 2013).

Smernice za kvalitet sedimenta, iako veoma korisne, ne mogu biti diferencijalni kriterijum kada su u pitanju mogući uticaji polutanta na aktivnost određenog antioksidativnog enzima, jer uticaji na aktivnosti antioksidativnih enzima nisu korišćeni prilikom njihovih definisanja. Zato uticaji ostalih elemenata iz prve grupe na aktivnost CAT ne mogu biti isključeni, iako njihove koncentracije ne prelaze TEL vrednosti. Ovo se posebno na odnosi na Cd i Zn, koji pokazuju veoma visoku korelaciju sa aktivnošću CAT. U drugim istraživanjima, u rekama i jezerima, Cd je predstavljen kao element višeg ekološkog rizika od drugih metala, jer ga karakteriše visok koeficijent toksičnosti čak i u niskim koncentracijama (Zheng i sar., 2010; Fu i sar., 2009). Dakle, osim Cr i Ni, Cd se takođe može smatrati jednim od stresora koji utiču na aktivnost CAT.

Zanimljivo je da CAT (kao i SOD) reaguje na promene sredinskih faktora smanjenjem aktivnosti u leto i jesen kada su stresori teški metali, a kada je u pitanju uticaj nekoliko faktora tokom zime, ispoljava potpuno suprotno ponašanje u odnosu na druge dve sezone. Izgleda da je WV ključni faktor koji utiče na odgovor antioksidativnih enzima, koji se povećava ili smanjuje u zavisnosti od intenziteta. Između aktivnosti GR i GPx i hemijskog sastava sedimenta nije uspostavljena veza, pa njihove promene pod uticajem merenih abiotičkih parametara ostaju neobjašnjene.

## ***6. Zaključci***

## ZAKLJUČCI

Predmet doktorske disertacije je uticaj ispusnih voda pastrmskih ribnjaka na odabrane vrste makrozoobentosa: *Ecdyonurus venosus*, *Ephemera danica* i *Gammarus dulensis*, a zaključci do kojih smo došli tokom istraživanja su:

➤ **Analiza fizičkih i hemijskih parametara vode i hemijskog sastava sedimenta reke Crnice pokazala je da:**

- Fizičke parametre reke Crnice karakterišu izraženije sezonske od longitudinalnih promena, pri čemu su naekstremnije sezonske promene karakteristične za jesenje vrednosti protoka, koje su 27 puta manje od zimskih.
- Analiza koinercije (CIA) pokazala je da hemijske parametre vode reke Crnice karakterišu izraženije sezonske od longitudinalnih promena.
- Tokom proleća, PCA analiza je pokazala da ne postoji vidljiv uticaj ribnjaka na hemijske parametre vode reke Crnice.

Za hemijski sastav sedimenta reke Crnice je karakteristično odsustvo statistički značajnih sezonskih i longitudinalnih promena. Povećanje koncentracija Cd, Cr, Ni, Sr, Zn, S, P, Cu, Se i Hg ograničeno je vremenski i prostorno (tokom jeseni na lokalitetu CR2), zbog čega izostaje statistička značajnost sezonskih i longitudinalnih promena.

➤ **Uticaj ispusnih voda ribnjaka na sastav i strukturu zajednice makroinvertebrata reke Crnice ogleda se u sledećem:**

- Analizom CIA je utvrđeno da su kod elemenata strukture zajednice makrozoobentosa reke Crnice sezonske promene vrednosti izraženije od longitudinalnih.
- Sezonske varijacije vrednosti ASPT, MASPT<sub>PO</sub>, i Ed<sub>ab</sub> na CR2 pokazuju statistički značajnu negativnu korelaciju sa vrednostima m<sub>f</sub>/Q<sub>2</sub> (R=-0.951, P=0.049, R=-0.955, P=0.045, i R=-0.962, P=0.038), što ukazuje na uticaj ribnjaka na navedene parametre strukture zajednice makrozoobentosa.
- Uticaj ribnjaka je vidljiv u slučaju indeksa saprobnosti (SI), čije vrednosti dostižu maksimum na CR2 i u slučaju ASPT, koji dostiže minimum na CR2 lokalitetu.



- Brojnost larvi *E. danica*,  $Ed_{ab}$  od proleća do jeseni takođe podleže uticaju ribnjaka.
- **Na osnovu antioksidativnog odgovora larvi *Ephemera danica* na uticaj efluenata iz ribnjaka zaključeno je da:**
- Aktivnost SOD kod *E. danica* karakterišu izraženije sezonske od longitudinalnih promena. Letnje vrednosti su maksimalne, a jesenje minimalne, dok su prolećne približne letnjim i mnogo veće od zimskih. Longitudinalne promene praktično odsustvuju, posebno u jesen. U proleće aktivnost SOD je veća na kontrolnom u odnosu na CR2 lokalitet, gde je minimalna u odnosu na ostala tri lokaliteta. Tokom leta maksimum aktivnosti SOD dostiže na CR4 lokalitetu, a minimum na kontrolnom. Zimske promene aktivnosti SOD karakteriše maksimum na CR2 lokalitetu.
  - Longitudinalne promene aktivnosti GPx kod vrste *E. danica* su najpravilnije i najizraženije. Aktivnost ovog enzima je statistički značajno veća na CR2 lokalitetu u odnosu na kontrolni lokalitet tokom svih sezona. Tokom leta i jeseni potpuni oporavak aktivnosti GPx dešava se na CR3 lokalitetu, tokom zime na CR4, a u proleće oporavak izostaje.
  - Statistički značajne promene koncentracije GSH kod *E. danica* u jesen odsustvuju, dok su u ostalim sezonama nekonzistentne. Tokom leta, na CR3 i CR4 koncentracije GSH su više u odnosu na one izmerene na CR1 i CR2, u jesen je obrnuta situacija, a tokom zime maksimum dostiže na CR2.
  - Za aktivnost SOD i koncentraciju GSH kod *E. danica* karakteristična je veoma visoka pozitivna korelacija ( $R=0.845$ ,  $P<0.001$ ), a nešto niža, ali značajna korelacija, postoji i između aktivnosti SOD i GPx ( $R=0.725$ ,  $P=0.002$ ).
- **Analiza antioksidativnog odgovora larvi *Ecdyonurus venosus* na uticaj efluenata iz ribnjaka ukazala je da:**
- Kod larvi *E. venosus* uzorkovanih u reci Skrapež jednofaktorska analiza varijanse je pokazala da u slučaju sva tri biomarkera dolazi do statistički značajnih variranja između ispitivanih lokaliteta i to: za aktivnost superoksid dismutaze (SOD),  $F=10,91$ ,  $P<0,001$ , za aktivnost glutacion-peroksidaze (GPx),  $F=4,23$ ,  $P=0,016$  i za koncentraciju glutaciona (GSH),  $F=4,87$ ,  $P=0,008$ .

- LSD test kojim su poređeni parovi lokaliteta pokazao je da u slučaju sva tri biomarkera kod larvi *E. venosus* postoji razlika između kontrolnog i prvog nizvodnog lokaliteta, što je posledica dejstva ribnjaka.
  - Promene aktivnosti SOD kod larvi *E. venosus* su snažno pozitivno korelisane sa promenama ukupne koncentracije fosfora ( $R=0.989$ ,  $P=0,011$ ), a promene aktivnosti GPx su u korelaciji sa promenama nitrita ( $R=0.997$ ,  $P=0,011$ ) i ukupne tvrdoće vode ( $R=0.968$ ,  $P=0,032$ ).
  - U uzorcima *E. venosus* iz reke Crnice analiza varijanse je pokazala statistički značajno variranje između ispitivanih lokaliteta samo u slučaju aktivnosti GPx ( $F= 6,80$   $P<0.01$ ), koja se na prva tri lokaliteta ne menja, a na CR4 naglo raste.
  - Odsustvo uticaja efluenata pastrmskog ribnjaka na reci Crnici na abiotičke parametre vode i analizirane biomarkere kod larvi *E. venosus* je posledica visokog protoka tokom proleća.
- **Na osnovu antioksidativnog odgovora *Gammarus dulensis* na uticaj efluenata iz ribnjaka zaključeno je da:**
- Rezultati analiziranih biomarkera kod uzoraka *G. dulensis* pokazali su da se aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx, GST i GR) menjaju i sezonski i longitudinalno.
  - Dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) ukazuje na postojanje statistički značajne ( $P < 0,001$ ) interakcije između longitudinalnih i sezonskih uticaja kod svih ispitivanih biomarkera vrste *G. dulensis*, kao i na postojanje statističke značajnosti ( $P < 0,001$ ) sezonskih i longitudinalnih promena aktivnosti svih antioksidativnih enzima izuzev GPx ( $P = 0,246$ ) u slučaju longitudinalnih promena.
  - Najizraženije promene aktivnosti enzima kod *G. dulensis* dešavaju se tokom jeseni, kada se aktivnosti četiri od pet ispitivanih enzima (SOD, CAT, GPx i GR) smanjuju na CR2 lokalitetu, što znači da su aktivnosti enzima potisnute usled dejstva kombinacije promenjenih sredinskih faktora, pri čemu veliki uticaj imaju povećane koncentracije teških metala na CR2 lokalitetu tokom ove sezone.
  - Aktivnost SOD kod *G. dulensis* u svim sezonama svoj maksimum dostiže na referentnom, CR1, lokalitetu, a minimum na CR2. Zatim se gradacijski

oporavlja nizvodno. Minimalne aktivnosti SOD zabeležene su u jesen na lokalitetima koji su pod najvećim uticajem ribnjaka – CR2 i CR3, dok maksimalnu aktivnost SOD dostiže tokom zime na CR1 i CR4 lokalitetima, koji su pod najmanjim uticajem ribnjaka.

- Aktivnost CAT kod *G. dulensis*, kao i SOD, tokom leta i jeseni svoj maksimum dostiže na referentnom lokalitetu, a minimum na CR2 lokalitetu, oporavljajući se nizvodno. U zimu aktivnost CAT pokazuje obrnuti trend od SOD, dostižući minimum aktivnosti na CR1, a maksimum na CR2 lokalitetu.
- Aktivnosti GPx, GSH i GR kod *G. dulensis* prate zajednički trend promene, koji karakteriše povećanje aktivnosti na CR2 u odnosu na CR1, sa postepenim oporavkom nizvodno.
- Sezonske promene aktivnosti svih ispitivanih enzima kod *G. dulensis* na referentnom, CR1, lokalitetu su u pozitivnoj korelaciji sa izmerenim aktivnostima na CR4 lokalitetu, a u negativnoj korelaciji sa zabeleženim aktivnostima praćenih enzima na CR2 lokalitetu. Na osnovu toga možemo zaključiti da je izvor koji utiče na aktivnost praćenih enzima smešten između CR1 i CR2 lokaliteta, a to je, po svemu sudeći, pastrmski ribnjak, tačnije njegovi efluenti.

## ***7. Literatura***

**LITERATURA**

- Ahmad, S., & Pardini, R. S. (1990). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(4), 401-413.
- Alhejoj, I., Salameh, E., & Bandel, K. (2014). Mayflies (Order Ephemeroptera): an effective indicator of water bodies conditions in Jordan. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 2(10), 361.
- Alonso, A., & Camargo, J. A. (2004). Toxic effects of unionized ammonia on survival and feeding activity of the freshwater amphipod *Eulimnogammarus toletanus* (Gammaridae, Crustacea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 1052–1058.
- Alonso, A., & Camargo, J. A. (2006). Toxicity of nitrite to three species of freshwater invertebrate. *Environmental Toxicology*, 21, 90-94.
- Alonso, Á., De Lange, H. J., & Peeters, E. T. (2010). Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology*, 19(1), 133-140.
- Altermatt, F., Alther, R., Fišer, C., Jokela, J., Konec, M., Küry, D., ... & Westram, A. M. (2014). Diversity and distribution of freshwater amphipod species in Switzerland (Crustacea: Amphipoda). *PloS One*, 9(10), e110328.
- Bagnyukova, T. V., Chahrak, O. I., & Lushchak, V. I. (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 78, 325–331.
- 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., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., & Porte, C. (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress

- in the trichoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*, 74, 3–19.
- Barber-James, H. M., Gattolliat, J. L., Sartori, M., & Hubbard, M. D. (2008). Global diversity of mayflies (*Ephemeroptera*, *Insecta*) in freshwater. In H. J. Martin-Smith & P. JB. Hart (Eds.), *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 339-350). Springer, Dordrecht.
- Bauernfeind, E. R. N. S. T. (1997). Discriminating characters in central European species of *Ecdyonurus Eaton*. *Ephemeroptera & Plecoptera. Biology–Ecology–Systematics*. Mauron+ Tinguely & Lachat, SA, Fribourg (Switzerland), 418-426.
- Bauernfeind, E., & Moog, O. (2000). Mayflies (*Insecta: Ephemeroptera*) and the assessment of ecological integrity: a methodological approach. In P. D. Boon, B. R. Davies, & G. E. Petts (Eds.), *Assessing the Ecological Integrity of Running Waters* (pp. 71-83). Springer, Dordrecht.
- Bauernfeind, E., & Soldan, T. (2013). *The Mayflies of Europe (Ephemeroptera)*. Brill.
- Benetti, C. J., Pérez-Bilbao, A., & Garrido, J. (2012). Macroinvertebrates as indicators of water quality in running waters: 10 years of research in rivers with different degrees of anthropogenic impacts. In K. Voudouris (Ed.), *Ecological Water Quality – Water Treatment and Reuse* (pp. 28). Intech Press.
- 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. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.*, 40(3), 169-180.
- Bianchini, L. F., Wood, C. M., Bergman, H. L., Johannsson, O. E., Laurent, P., Chevalier, C., ... & Bianchini, A. (2017). Metabolism and antioxidant defense in the larval chironomid *Tanytarsus minutipalpus*: adjustments to diel variations in the extreme conditions of Lake Magadi. *Biology Open*, 6, 83-91.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

- Borgeraas, J., & Hessen, D. O. (2000). UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. *Journal of Plankton Research*, 22, 1167–1183.
- Borković, S. S., Šaponjić, J. S., Pavlović, S. Z., Blagojević, D. P., Milošević, S. M., Kovačević, T. B., ... & Saičić, Z. S. (2005). The activity of antioxidant defence enzymes in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141, 366-374.
- Bouzahouane, H., Barour, C., Sleimi, N., & Ouali, K. (2018). Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *Stramonita haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere*, 207, 725-741.
- 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.
- Božanić, M. (2019). Monitoring the effects of trout farms on the antioxidative enzyme activity level in *Ephemera danica* larvae (Insecta, Ephemeroptera) [Doctoral dissertation, University of Belgrade].
- 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.
- Braghirolli, F. M., Oliveira, M. R., & Oliveira, G. T. (2016). Seasonal variability of metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyaella kaingang* (Crustacea, Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 177-184.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 951-965.
- 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.
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831–849.
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267.
- Carvalho, C. S., & Bernusso, V. A., Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>.
- Carvalho, C. S., & Fernandes, M. N. (2008). Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.04.016>.
- Casano, L. M., Gómez, L. D., Lascano, H. R., González, C. A., & Trippi, V. S. (1997). Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiology*, 38, 433–440.
- Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., & Maltby, L. (2015). Gammarids as reference species for freshwater monitoring. In M. Solé & L. Maltby (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology* (pp. 253-280). Academic Press.
- Chesters, R. (1980). Biological monitoring working party. The 1978 National Testing Exercise. *Department of the Environment Water Data Unit, Technical memorandum*, 19, 1-37.
- Chi, S., Li, S., Chen, S., Chen, M., Zheng, J., & Hu, J. (2017). Temporal variations in macroinvertebrate communities from the tributaries in the Three Gorges River Catchment, China. *Revista Chilena de Historia Natural*, 90, 6.



- Choi, J. (2004). Biomarkers In Environmental Monitoring And Its Application In *Chironomus Spp.* In S. K. Hong et al. (Eds.), *Ecological Issues in a Changing World* (pp. 167–177). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2689-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2689-8_13)
- Cohn, F. (1853). Über lebende Organismen im Trinkwasser. *Günsberg's Zeitschrift für Klinische Medizin*, 4, 229–237.
- Constable, M., Charlton, M., Jensen, F., McDonald, K., Craig, G., & Taylor, K. W. (2003). An ecological risk assessment of ammonia in the aquatic environment. *Human Ecology Risk Assessment*, 9(3), 527–548.
- Conti, M. E. (2008). Biomarkers for environmental monitoring. *WIT Transactions on State-of-the-Art in Science and Engineering*, 30.
- Daniel, T. C., Sharpley, A. N., & Lemunyon, J. L. (1998). Agricultural phosphorus and eutrophication: A symposium overview. *Journal of Environmental Quality*, 27, 251-257.
- De-la-Ossa-Carretero, J. A., Del-Pilar-Ruso, Y., Giménez-Casalduero, F., Sánchez-Lizaso, J. L., & Dauvin, J. C. (2012). Sensitivity of amphipods to sewage pollution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 96, 129-138.
- 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.
- Długosz, A., Liebhart, J., Piotrowska, D., Dor, A., & Liebhart, E. (2005). Markers of oxidative balance and concentration of selected metals in pollinotics. *Przegl Lek*, 62, 1328-31.
- Duman, F. A. T. İ. H., & Kar, M. (2015). Evaluation of effects of exposure conditions on the biological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(2), 437-444.

- Edmunds, G. F., & McCafferty, W. P. (1988). The mayfly subimago. *Annual Review of Entomology*, 33, 509–529.
- Fernandez, C., Miguel, E. S., & Fernandez-Briera, A. (2009). Superoxide dismutase and catalase: tissue activities and relation with age in the long-lived species *Margaritifera margaritifera*. *Biolog Res*, 42, 57-68.
- Fenoglio, S., Bo, T., López-Rodríguez, J., & de Figueroa, J. T. (2008). Nymphal biology of *Brachyptera risi* (Morton, 1896)(Plecoptera: Taeniopterygidae) in a North Apennine stream (Italy). *Entomologica Fennica*, 19(4), 228-231.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., & Reis-Henriques, M. A. (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*, 71, 39–48.
- Fierro, P., Valdovinos, C., Vargas-Chacoff, L., Bertrán, C., & Arismendi, I. (2017). Macroinvertebrates and fishes as bioindicators of stream water pollution. In H. Tutu (Ed.), *Water Quality* (pp. 23-38). Intechopen.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515-18517.
- Fu, C., Guo, J., Pan, J., Qi, J., & Zhou, W. (2009). Potential ecological risk assessment of heavy metal pollution in sediments of the Yangtze River within the Wanzhou Section, China. *Biological Trace Element Research*, 129, 270–277. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8300-y>
- Gavrilović, L., & Dukić, D. (2002). *Reke Srbije*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Gerhardt, A., Bloor, M., & Mills, C. L. (2011). Gammarus: important taxon in freshwater and marine changing environments. *International Journal of Zoology*, 2011.
- Glatzle, D., Vuilleumier, J. P., Weber, F., & Decker, K. (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, 30, 665-667.
- Glazier, D. S. (2014). Amphipoda. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09437-9>

- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, *106*, 207-212.
- Guillen, J., Asche, F., Carvalho, N., Polanco, J. M. F., Llorente, I., Nielsen, R., ... & Villasante, S. (2019). Aquaculture subsidies in the European Union: Evolution, impact and future potential for growth. *Marine Policy*, *104*, 19-28.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*(1), 136-147.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, *249*(22), 7130-7139.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. In B. Halliwell & J. M. C. Gutteridge (Eds.), *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed., pp. 1–25). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press.
- Hargreaves, J. A. (1998). Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, *166*(1), 181–212. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00298-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00298-1)
- Hassal, A. (1850). A microscopic examination of the water supplied to the inhabitants of London and suburban districts. London.
- Hellou, J., Ross, N. W., & Moon, T. W. (2012). Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(6), 2007–2023.
- 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. <https://doi.org/10.1002/ieam.1530>
- Hou, Z., & Sket, B. (2016). A review of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda): The family extent, its evolutionary history, and taxonomic redefinition of genera. *Zoological Journal of the Linnean Society*, *176*(2), 323-348.

- Hyne, R. V., & Maher, W. A. (2003). Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 366-374.
- Jiang, X., Chen, J., Bajić, A., Zhang, C., Song, X., Carroll, S. L., ... & Wang, J. (2017). Quantitative real-time imaging of glutathione. *Nature Communications*, 8(1), 1-13.
- Jones, A. S. (2008). Estimating total phosphorus and total suspended solids loads from high-frequency data (Master's thesis). Utah State University, Logan, UT. Retrieved from <http://digitalcommons.usu.edu/etd/205>
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3145-3175.
- Karaman, G. S., & Pinkster, S. (1987). Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda): Part III. Gammarus balcanicus-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 57(2), 207-260.
- Karr, J. R. (1991). Biological integrity: A long-neglected aspect of water resource management. *Ecological Applications*, 1, 66-84.
- Kelso, B. H. L., Glass, D. M., & Smith, R. V. (1999a). Toxicity of nitrite in freshwater invertebrates. In W. S. Wilson, A. S. Ball, & R. H. Hinton (Eds.), *Managing risks of nitrates to human and the environment* (pp. 175-188). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Kelso, B. H. L., Smith, R. V., & Laughlin, R. J. (1999). Effects of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 61-66.
- Kerans, B. L., & Karr, J. R. (1994). A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecological Applications*, 4(4), 768-785.

- Kolkwitz, R., & Marsson, M. (1902). Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitteilungen aus der Königlichen Prüfungsanstalt für Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung Berlin, 1*, 33–72.
- Kolkwitz, R., & Marsson, M. (1908). Ökologie der pflanzlichen Saprobien. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 26a*, 505–519.
- Kolkwitz, R., & Marsson, M. (1909). Ökologie der tierischen Saprobien. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 2*, 126–152.
- Kovačević-Majkić, J. (2009). Hidrogeorafska studija reke Skrapež. Beograd: Geografski institut „Jovan Cvijić” SANU.
- Kumari, K., Khare, A., & Dange, S. (2014). The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium-induced toxicity in the fish *Labeo rohita*. *BioMed Research International, 2014*.
- Karr, J. R. (1991). Biological integrity: A long-neglected aspect of water resource management. *Ecological Applications, 1*, 66–84.
- Kelso, B. H. L., Glass, D. M., & Smith, R. V. (1999). Toxicity of nitrite in freshwater invertebrates. In W. S. Wilson, A. S. Ball, & R. H. Hinton (Eds.), *Managing risks of nitrates to human and the environment* (pp. 175–188). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Kelso, B. H. L., Smith, R. V., & Laughlin, R. J. (1999). Effects of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology, 65*(1), 61–66.
- Kerans, B. L., & Karr, J. R. (1994). A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecological Applications, 4*(4), 768–785.
- Kolkwitz, R., & Marsson, M. (1902). Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitteilungen aus der Königlichen Prüfungsanstalt für Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung Berlin, 1*, 33–72.
- Kolkwitz, R., & Marsson, M. (1908). Ökologie der pflanzlichen Saprobien. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 26a*, 505–519.

- Kolkwitz, R., & Marsson, M. (1909). Ökologie der tierischen Saprobien. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 2, 126–152.
- Kovačević-Majkić, J. (2009). Hidrogeorafska studija reke Skrapež. Beograd: Geografski institut „Jovan Cvijić” SANU.
- Kumari, K., Khare, A., & Dange, S. (2014). The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium-induced toxicity in the fish *Labeo rohita*. *BioMed Research International*, 2014.
- Clarke, R., & Bostock, J. (2017). Regional review on status and trends in aquaculture development in Europe-2015. Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- Klimova, Y. S., Chuiko, G. M., Pesnya, D. S., & Ivanova, E. S. (2020). Biomarkers of oxidative stress in Freshwater Bivalve mollusks. *Inland Water Biology*, 13(4), 674–683.
- Kripa, P. K., Prasanth, K. M., Sreejesh, K. K., & Thomas, T. P. (2013). Aquatic macroinvertebrates as bioindicators of stream water quality - a case study in Koratty, Kerala, India. *Research Journal of Recent Sciences*, 2, 217–222.
- Lam, P. K., & Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2), 182–186.
- Landa, V., & Soldán, T. (1995a). Mayflies as bioindicators of water quality and environmental change on a regional and global scale. *Corkum LD; Ciborowski JJH. Current Directions in Research on Ephemeroptera. Canadian Scholars' Press, Inc. Toronto*, 21-29.
- Landa, V., & Soldán, T. (1995b). Aquatic insects (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera): A comparison from the bioindication point of view. In *8th International Bioindicators Symposium* (Vol. 98).

- Lei, W., Wang, L., Liu, D., Xu, T., & Luo, J. (2011). Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*, *84*(5), 689–694.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., & Wang, H. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, *6*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Lijun, L., Xuemei, L., Yaping, G., & Enbo, M. (2005). Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *20*, 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.04.001>
- Lin, C. K., & Yi, Y. (2003). Minimizing environmental impacts of freshwater aquaculture and reuse of pond effluents and mud. *Aquaculture*, *226*(1–4), 57–68.
- Livingstone, D. R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *120*(1), 43–49.
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Veterinaire*, *154*, 427–430.
- Lock, K., & Goethals, P. L. (2011). Distribution and ecology of the mayflies (*Ephemeroptera*) of Flanders (Belgium). In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, *47*(2), 159–165.
- Lopez-Rodriguez, M. J., Tierno de Figueroa, J. M., & Alba-Tercedor, J. (2009). Life history of two burrowing aquatic insects in southern Europe: *Leuctra geniculata* (Insecta: Plecoptera) and *Ephemera danica* (Insecta: Ephemeroptera). *Aquatic Insects*, *31*(2), 99–110.
- Łukaszewicz-Hussain, A., & Moniuszko-Jakoniuk, J. (2004). Liver catalase, glutathione peroxidase and reductase activity, reduced glutathione and hydrogen peroxide levels in acute intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide. *Polish Journal of Environmental Studies*, *13*(3), 303–309.

- Lushchak, V. I. (2007). Free radical oxidation of proteins and its relationship with the functional state of organisms. *Biochemistry (Moscow)*, 72, 809–827.
- Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Nykorak, M. Z., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2008). The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione. *Aquatic Toxicology*, 87, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.007>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30.
- Ma, X., Deng, D., & Chen, W. (2017). Inhibitors and activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In *Enzyme Inhibitors and Activators*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68946>
- Macan, T. T. (1979). A key to the nymphs of British *Ephemeroptera*. *Freshwat. Biol. Ass. Sc. Publ*, 20, 1–80.
- Madsen, B. L. (1969). Reactions of *Brachyptera risi* (Morton) (Plecoptera) nymphs to water current. *Oikos*, 20(1), 95–100. <https://doi.org/10.2307/3543748>
- Manickavasagam, S., Sudhan, C., & Aanand, S. (2019). Bioindicators in the aquatic environment and their significance. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 34(1/2), 73–79.
- Marković, Z., Poleksić, V., & Mitrović Tutundžić, V. (2007). Aquaculture in Serbia. In *Proceedings, III International Conference "Fishery,"* Belgrade, Serbia, February 1–3, 2007 (pp. 35–40).
- Marković, Z., & Poleksić, V. (2011). Ribarstvo u Srbiji (Fishery in Serbia). Prof. dr Zoran Marković, Beograd, 1–289.
- Marković, Z., Stanković, M., Dulić, Z., Živić, I., Rašković, B., Spasić, M., & Poleksić, V. (2011). Aquaculture and fishery in Serbia-status and potentials. *Conference proceedings V International conference "Aquaculture & Fishery, Institute of*



- animal science Faculty of Agriculture University of Belgrade – Serbia, June, 1 – 3. 2011, Belgrade Serbia, 36–40.*
- Marković, Z. (2022). Aquaculture in Serbia. *Veterinarski Glasnik*, 76(2), 168–175.
- Martinez-Alvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 75–88.
- Martinez-Porchas, M., & Martinez-Cordova, L. R. (2012). World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal*, 2012.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6055.
- Metcalfe, J. L. (1989). Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: History and present status in Europe. *Environmental Pollution*, 60(1–2), 101–139.
- Migula, P., Laszczyca, P., Augustyniak, M., Wilczek, G., Rozpedek, K., Kafel, A., & Woloszyn, M. (2004). Antioxidative defence enzymes in beetles from a metal pollution gradient. *Biologia-Bratislava*, 59(5), 645–654.
- Milić G. (2006). Reka Crnica – Morfohidrološki prikaz. *Beograd*, 1–12. Available at: <http://www.sgd.org.rs/publikacije/zemlja%20i%20judi/56/2006%20-%20Goran%20Milic%20-%20Reka%20Crnica%20-%20morfohidroloski%20prikaz.pdf>
- Mirčić, D., Stojanović, K., Živić, I., Todorović, D., Stojanović, D., Dolićanin, Z., & Perić-Mataruga, V. (2016). The trout farm 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, 3170–3175.
- Monferrán, M. V., Galanti, L. N., Bonansea, R. I., Amé, M. V., & Wunderlin, D. A. (2011). Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Journal of Environmental Monitoring*, 13(2), 398–409.

- Monserrat, J. M., Geracitano, L. A., & Bianchini, A. (2003). Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems.
- Mustafa, S. A., Kariab, S. S., Davies, S. J., & Jha, A. N. (2015). Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. *Mutagenesis*, 30(1), 107–116.
- Oliveira, M., Ahmad, I., Maria, V. L., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2010). Antioxidant responses versus DNA damage and lipid peroxidation in golden grey mullet liver: A field study at Ria de Aveiro (Portugal). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 454–463. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9491-8>.
- Olsen, T., Ellerbeck, L., Fisher, T., & Callaghan, A. (2001). Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1725–1732. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200815>
- Ozmen, I., Bayir, A., Cengiz, M., Sirkecioglu, A. N., & Atamanalp, M. (2004). Effects of water reuse system on antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). *Veterinarni Medicina*, 49(10), 373.
- 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.
- Paital, B., & Chainy, G. B. N. (2013). Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87, 33–41.
- 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.

- 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.
- Power, M. E., Stout, R. J., Cushing, C. E., Harper, P. P., Hauer, F. R., Matthews, W. J., ... Wais De Badgen, I. R. (1988). Biotic and abiotic controls in river and stream communities. *Journal of the North American Benthological Society*, 7(4), 456–479.
- Pravilnik o nacionalnoj listi indikatora zaštite životne sredine — Indikator. Retrieved from [sepa.gov.rs](http://sepa.gov.rs)
- Pulatsu, S., Rad, F., Aksal, G., Aydin, F., Benil, A. C., & Topcu, A. (2004). The impact of rainbow trout farm effluents on water quality of Karasu stream, Turkey. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 4, 9–15.
- 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 ribnjaka. In *XI Simpozijum entomologa Srbije 2017, sa međunarodnim učešćem* (pp. 88–89). Goč.
- Rapport, D. J. (1991). Myths in the foundations of economics and ecology. *Biological Journal of the Linnaean Society*, 44, 185–202.
- 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(2), 143–164.
- Rosenau, M. J. (1935). *Preventive Medicine and Hygiene* (6th ed.). New York: Appleton-Century.
- Rudneva, I. I. (1997). Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comp Biochem Physiol*, 118(C), 255–260.
- Saad, A. A., El-Sikaily, A., & Kassem, H. (2017). Metallothionein and glutathione content as biomarkers of metal pollution in mussels and local fishermen in Abu Qir Bay,

- Egypt. *Journal of Health & Pollution*, 6(12), 50–60. doi:10.5696/2156-9614-6-12.50
- Samuel, P. O., Adakole, J. A., & Suleiman, B. S. (2015). Effects of some heavy metal pollutants on glutathione production in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in an in situ bio-assay in River Galma, Kaduna State, Nigeria.
- Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232, 8-27.
- Sanz, A., López-Rodríguez, M. J., García-Mesa, S., Trenzado, C., Ferrer, R. M., & Tierno de Figueroa, J. M. (2017). Are antioxidant capacity and oxidative damage related to biological and autecological characteristics in aquatic insects? *Journal of Limnology*, 76(1), 170–181.
- Sanz, A., Trenzado, C. E., López-Rodríguez, M. J., Furné, M., & Tierno de Figueroa, J. M. (2010). Study of antioxidant defense in four species of Perlodea (Insecta, Plecoptera). *Zoological Science*, 27, 952-958.
- Sartori, M., & Brittain, J. E. (2015). Order Ephemeroptera. In J. H. Thorp & A. P. Covich (Eds.), *Thorp and Covich's freshwater invertebrates* (pp. 873-891). Academic Press.
- Sheehan, D., & Power, A. (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 123(3), 193–199.
- Shonouda, M. L., El-Samad, L. M., Mokhamer, H., & Toto, N. (2016). Use of oxidative stress and genotoxic biomarkers of aquatic beetles *Anaceana globulus* (Coleoptera: Hydrophilidae) as biomonitors of water pollution. *Journal of Entomology*, 13, 122–131.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
- Søndergaard, M., & Jeppesen, E. (2007). Anthropogenic impacts on lake and stream ecosystems, and approaches to restoration. *Journal of Applied Ecology*, 44, 1089–1094. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01426.x
- Soofiani, N. M., Hatami, R., Hemami, M. R., & Ebrahimi, E. (2012). Effects of trout farm effluent on water quality and the macrobenthic invertebrate community of the Zayandeh–Roud River, Iran. *North American Journal of Aquaculture*, 74(2), 132–141.

- Solà, C., & Prat, N. (2006). Monitoring metal and metalloid bioaccumulation in *Hydropsyche* (Tricoptera, Hydropsychidae) to evaluate metal pollution in a mining river: Whole body versus tissue content. *Science of the Total Environment*, 359, 221–231.
- Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology & Medicine*, 9(4), 315–325.
- Statzner, B., & Holm, T. F. (1982). Morphological adaptations of benthic invertebrates to stream flow—an old question studied by means of a new technique (Laser Doppler Anemometry). *Oecologia*, 53(3), 290–292.
- Stoliar, O. B., & Lushchak, V. I. (2012). Environmental pollution and oxidative stress in fish. In V. Lushchak (Ed.), *Oxidative stress - environmental induction and dietary antioxidants*. InTech.
- Stojanović, K. Z. (2017). Influence of trout farms on macrozoobentos communities with special emphasis on larvae of the genus *Baetis* (Ephemeroptera, Insecta). Doctoral dissertation. Belgrade: Faculty of Biology, University of Belgrade.
- Stojanović, K., Živić, M., Dulić, Z., Marković, Z., Krizmanić, J., Milošević, Dj., Miljanović, B., Jovanović, J., Vidaković, D., & Živić, I. (2017). Comparative study of the effects of a small-scale trout farm on the macrozoobenthos, potamoplankton, and epilithic diatom communities. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189, 403.
- Tamura, M., Oschino, N., & Chance, B. (1982). Some characteristics of hydrogen and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *Journal of Biochemistry*, 92, 1019-1031.
- Tandon, V., Gupta, B. M., & Tandon, R. (2005). Free radicals/reactive oxygen species. *JK-Practitioner*, 12(3), 143-148.
- Taiwo, I. E., Amaeze, N. H., Imbufe, A. P., & Adetoro, O. O. (2014). Heavy metal bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in the wild African tiger frog, *Hoplobatrachus occipitalis*. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8, 6–15.
- Tatar, S., Cिकcikoglu Yildirim, N., Serdar, O., Yildirim, N., & Ogedey, A. (2018). The using of *Gammarus pulex* as a biomonitor in ecological risk assessment of secondary effluent from municipal wastewater treatment plant in Tunceli, Turkey. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 24(3), 819-829.

- Thevenon, F., & Poté, J. (2012). Water pollution history of Switzerland recorded by sediments of the large and deep Perialpine Lakes Lucerne and Geneva. *Water Air Soil Pollution*, 223, 6157–6169.
- Thomas, J. D. (1993). Biological monitoring and tropical biodiversity in marine environments: A critique with recommendations, and comments on the use of amphipods as bioindicators. *Journal of Natural History*, 27(4), 795-806.
- Uherek, C. B., & Gouveia, P. B. F. (2014). Biological monitoring using macroinvertebrates as bioindicators of water quality of Maroaga stream in the Maroaga Cave System, Presidente Figueiredo, Amazon, Brazil. *International Journal of Ecology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308149>.
- USEPA. (1999). US Environmental Protection Agency: Screening level ecological risk assessment protocol for hazardous waste combustion facilities. *Append. E: Toxic. Ref. Values 313 (Table E-3)*.
- USEPA. (2000). US Environmental Protection Agency: Prediction of Sediment Toxicity Using Consensus-based Freshwater Sediment Quality Guidelines. *Great Lakes Program office*. Chicago, Illinois. EPA 905/R-00/007, June 2000, pp. 28. Retrieved from <https://www.cerc.usgs.gov/pubs/center/pdfdocs/91126.pdf>.
- 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, 178–189.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Van Gestel, C. A. M., & Van Brummelen, T. C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5(4), 217-225.
- Velma, V., & Tchounwou, P. B. (2013). Oxidative stress and DNA damage induced by chromium in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Biomarker Insights*, 8, BMI.S11456. <http://dx.doi.org/10.4137/BMI.S11456>.
- Vörösmarty, C., Lévêque, C., Revenga, C., Bos, R., Caudill, C., Chilton, J., Douglas, E., Meybeck, M., Prager, D., Balvanera, P., Barker, S., Maas, M., Nilsson, C., Taikan Oki, T., Reidy, C., Rijsberman, F., Costanza, R., & Jacobi, P. (2005). Millennium

- Ecosystem Assessment (MEA). Fresh Water. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. *Washington (DC): Island Press*, 7(1), 167 – 201.
- Vörösmarty, C., McIntyre, P., Gessner, M., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S., Sullivan, C., Liermann, C., & Davies, P. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 468(7321), 334-334.
- 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(4), 477-485.
- Vranković, J. (2015). Environmental impact on the antioxidant responses in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Veneroida: Corbiculidae) from the Danube River. *Italian Journal of Zoology*, 82(3), 378-386.
- Vranković, J. (2016). Age-related changes in antioxidant and glutathione S-transferase enzyme activities in the Asian clam. *Biochemistry (Moscow)*, 81(3), 339–349.
- 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.
- Walsh, A. (2005). Reference conditions and eutrophication impacts in Irish Rivers: Meeting the requirements of the water framework directive.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Li, W., & Lu, J. (2010). Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 189–195.
- 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. Retrieved from [http://ec.europa.eu/environment/water/waterframework/index\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/water/waterframework/index_en.html)
- Whelan, K. F. (1980). Some Aspects of the Biology of *Ephemera Danica* Müll (*Ephemeridae: Ephemeroptera*) in Irish Waters. In *Advances in Ephemeroptera biology* (pp. 187-199). Springer, Boston, MA.
- Winston, G. W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 100, 173–176.

- Winston, G. W., & Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, *19*, 137–161.
- Wojtal-Frankiewicz, A., Bernasińska, J., Frankiewicz, P., Gwozdziński, K., & Jurczak, T. (2017). The role of environmental factors in the induction of oxidative stress in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Ecology*, *51*, 289-306.
- Yahya Al N, Mohamed S K, & Mohamed A G. (2018). Environmental Pollution by Heavy Metals in the Aquatic Ecosystems of Egypt. *Open Access Journal of Toxicology*, *3*(1), 555603.
- Yorulmaz, B., Sukatar, A., & Barlas, M. (2015). Comparative analysis of biotic indices for evaluation of water quality of Esen river in South-West Anatolia, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, *24*.
- Zelinka, M., & Marvan, P. (1961). Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie*, *57*(3), 389-407.
- Zheng, L., Liu, G., Kang, Y., & Yang, R. (2010). Some potential hazardous trace elements contamination and their ecological risk in sediments of western Chaohu Lake, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, *166*, 379–386. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1009-3>
- 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.
- Živić, I., & Tomanović, Ž. (2012). *Praktikum iz sistematike beskičmenjaka*. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 1-210.



## ***8. Prilog***

**Tabela 1.** Kvalitativan sastav makrozoobentosa reke Crnice

	Taksoni	Taksonomska pripadnost	CR1	CR2	CR3	CR4
	<b>Platyhelminthes</b>					
1.	<i>Dugesia lugubris</i> (Schmidt, 1861)	Turbellaria - Dugesiidae	+	+	+	+
	<b>Mollusca</b>					
2.	<i>Lymnaea</i> sp.	Gastropoda - Lymnaeidae			+	
3.	<i>Pisidium</i> sp.	Bivalvia - Sphaeriidae			+	
	<b>Annelida</b>					
4.	<i>Erpobdella octoculata</i> (Linnaeus, 1758)	Hirudinea - Erpobdellidae		+		
5.	Oligochaeta	Oligochaeta	+	+		
	<b>Crustacea</b>					
6.	<i>Gammarus balcanicus</i> (Schaferna, 1922)	Amphipoda - Gammaridae	+	+	+	+
7.	<i>Gammarus fossarum</i> (Koch, 1836)	Amphipoda - Gammaridae	+	+	+	+
8.	<i>Gammarus dulensis</i>	Amphipoda – Gammaridae	+	+	+	+
9.	<i>Gammarus</i> sp.	Amphipoda – Gammaridae	+	+	+	+
	<b>Insecta – Odonata</b>					
10.	<i>Cordulegaster annulatus</i> (Latreille, 1804)	Odonata - Cordulegasteridae			+	
	<b>Insecta – Ephemeroptera</b>					
11.	<i>Baetis alpinus</i> (Pictet, 1843)	Ephemeroptera - Baetidae		+	+	+
12.	<i>Baetis rhodani</i> (Pictet, 1843)	Ephemeroptera - Baetidae	+	+	+	+
13.	<i>Baetis lutheri</i> (Müller-Liebenau, 1967)	Ephemeroptera - Baetidae				+
14.	<i>Baetis vernus</i> (Curtis, 1834)	Ephemeroptera - Baetidae	+	+	+	+
15.	<i>Baetis melanonyx</i> (Pictet, 1843)	Ephemroptera - Baetidae				+
16.	Baetis sp.	Ephemeroptera - Baetidae	+	+	+	+
17.	<i>Ecdyonurus venosus</i> (Fabricius, 1775)	Ephemeroptera - Heptageniidae				+

18.	<i>Ecdyonurus</i> sp.	Ephemeroptera -Heptageniidae	+	+	+	+
19.	<i>Epeorus assimilis</i> (Eaton, 1885)	Ephemeroptera -Heptageniidae		+	+	+
20.	<i>Epeorus</i> sp.	Ephemeroptera -Heptageniidae				+
21.	<i>Rhitrogena semicolorata</i> gr.	Ephemeroptera -Heptageniidae	+	+	+	+
22.	<i>Ephemera danica</i> (Müller, 1764)	Ephemeroptera - Ephemeridae		+	+	+
23.	<i>Ephemerella ignita</i> (Poda, 1761)	Ephemeroptera - Ephemerellidae		+	+	+
<b>Insecta – Plecoptera</b>						
24.	<i>Brachyptera risi</i> (Morton, 1896)	Plecoptera - Taeniopterigidae		+	+	+
25.	<i>Brachyptera</i> sp.	Plecoptera - Taeniopterigidae	+			
26.	<i>Leuctra</i> sp.	Plecoptera - Leuctridae				+
27.	<i>Diura bicaudata</i> (Linnaeus, 1758)	Plecoptera - Perlodidae				+
<b>Insecta - Coleoptera</b>						
28.	<i>Hydraena gracilis</i> (Germar, 1823)	Coleoptera - Hydraenidae		+		+
29.	<i>Elmis aenea</i> (Mueller, 1806)	Coleoptera - Elmidae	+	+		+
30.	<i>Limnius</i> sp.	Coleoptera - Elmidae				+

<b>Insecta - Diptera</b>			
31.	<i>Atherix ibis</i> (Fabricius, 1798)	Diptera - Athericidae	+
32.	<i>Atherix marginata</i> (Fabricius, 1781)	Diptera - Athericidae	+
33.	<i>Dicranota bimaculata</i> (Schummel, 1829)	Diptera - Tipuloidea - Pedicidae	+
34.	<i>Tipula</i> sp.	Diptera - Tipulidae	+ +
35.	<i>Simulium</i> sp.	Diptera - Simuliidae	+ + +
36.	<i>Limnophila</i> sp.	Diptera - Limoniidae	+
37.	Fam. Chironomidae	Diptera - Chironomidae	+ + + +
<b>Insecta - Trichoptera</b>			
38.	<i>Anabolia nervosa</i>	Trichoptera - Limnephilidae	+
39.	<i>Hydropsyche angustipennis</i> (Curtis, 1834)	Trichoptera - Hydropsychidae	+
40.	<i>Hydropsyche pellucidula</i> (Curtis, 1834)	Trichoptera - Hydropsychidae	+
41.	<i>Hydropsyche</i> sp.	Trichoptera - Hydropsychidae	+ + + +
42.	<i>Rhyacophila nubila</i> (Zetterstedt, 1840)	Trichoptera - Rhyacophilidae	+
43.	<i>Rhyacophila obliterated</i> (McLachlan, 1863)	Trichoptera - Rhyacophilidae	+ + + +
44.	<i>Sericostoma personatum</i> (Kirby & Spence, 1826)	Trichoptera - Sericostomatidae	+
45.	<i>Limnephilus</i> sp.	Trichoptera - Limnephilidae	+ + +
46.	<b>Arachnida - Hydracarina</b>		+

## BIOGRAFIJA AUTORA

Anđelina (Zoran) Tatović (devojačko Radojević), rođena je 19. juna 1990. u Gornjem Milanovcu. Niže razrede Osnovne škole “Arsenije Čarnojević” završila je na Rudniku, a više razrede Osnovne škole “Kralja Aleksandra Karađorđevića I” pohađala je u Gornjem Milanovcu, gde 2009. Završava i srednju školu – Gimnaziju opšteg smeru “Takovski ustanak”.

Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2009. godine, a diplomirala je 2013. godine sa prosekom 9.34. Iste godine upisuje master studije, koje završava 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,90. Doktorske studije upisala je 2014. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Entomologija. U periodu od 2014. do 2018. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2018. godine zaposlena je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, a od 2023. godine je istraživač saradnik.

Bila je učesnik jednog nacionalnog projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Unapređenje proizvodnih kapaciteta šarana (*Cyprinus carpio* L) programima ishrane i selekcije” (TR 31075). Učestvovala je i u realizaciji projekta finansiranog od strane Raford fondacije: “Towards in situ and ex situ conservation of the European mudminnow (*Umbra krameri*) in Serbia” (ID:33514-1). Samostalno ili u koautorstvu objavila je 3 naučna rada i 9 saopštenja na domaćim ili inostranim konferencijama. Udata je i ima jedno dete.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Анђелина Татовић

Број индекса: Б3044/2014

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

#### **Утицај пастрмског рибњака на антиоксидативни статус одабраних врста акватичних бескичмењака**

- 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.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Анђелина Татовић

Број индекса: Б3044/2014

Студијски програм: Биологија

Наслов рада: “**Утицај пастрмског рибњака на антиоксидативни статус одабраних  
врста акватичних бескичмењака**”

Ментор: Проф. др Ивана Живић\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_