

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Marija D. Stevanović

**UTICAJ AKTIVNE SUPSTANCE I  
FORMULISANIH PREPARATA  
KLOMAZONA NA AKVATIČNE  
ORGANIZME**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Marija D. Stevanović

**EFFECTS OF CLOMAZONE ACTIVE  
SUBSTANCE AND ITS FORMULATED  
PRODUCTS ON AQUATIC ORGANISMS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Poljoprivredni fakultet – Beograd

Mentor: dr Dragica Brkić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije: dr Slavica Gašić, naučni savetnik  
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Ivana Teodorović, redovni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu – Prirodno-matematički fakultet

dr Vesna Poleksić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Božidar Rašković, docent  
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Dragici Brkić na dragocenoj pomoći, podršci i korisnim savetima prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost na ukazanom poverenju, beskrajnom strpljenju i razumevanju dugujem dr Slavici Gašić. Zahvalna sam zbog podrške i nesebične pomoći koju mi je pružila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.*

*Najsrdajnije zahvaljujem prof. dr Ivani Teodorović na angažovanju i usmeravanju tokom svih faza izrade rada, kao i otvorenim vratima Laboratorije za ekotoksikologiju (Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad).*

*Veoma sam zahvalna članovima komisije prof. dr Vesni Poleksić i docentu dr Božidaru Raškoviću na stručnoj pomoći, korisnim savetima i primedbama.*

*Na nesebičnoj pomoći, uloženom trudu i znanju zahvalnost želim da izrazim i prof. dr Klara Hilscherova (Research Center for Toxic Compounds in the Environment).*

*Veliko hvala dr Nešku Neškoviću i dr Radenku Stepiću na pruženoj prilici da budem deo naučne zajednice i ukazanom poverenju.*

*Zahvaljujem svim kolegama iz Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine na pomoći i razumevanju, a zahvalnost bih još izrazila kolegama: dr Tanji Tunić i dr Varji Knežević (Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad), i Marek Pipal i Marie Mlnarićova (Research Center for Toxic Compounds in the Environment) na saradnji i podršci u eksperimentalnom radu, ali i lepim trenucima druženja koje smo zajedno podelili.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na podršci, strpljenju i razumevanju koje su mi pružili tokom svih ovih godina.*

# UTICAJ AKTIVNE SUPSTANCE I FORMULISANIH PREPARATA KLOMAZONA NA AKVATIČNE ORGANIZME

## REZIME

Herbicidi su najčešće korišćena grupa pesticida, a nakon dospevanja u vodenu sredinu mogu ispoljiti štetno delovanje na neciljne organizme. Na tržištu se nalaze različite formulacije pesticida koje sadrže iste aktivne supstance, pri čemu se postavlja pitanje uticaja oblika formulacije na toksičnost herbicida za neciljne organizme. U okviru ove doktorske disertacije ispitivan je i upoređivan uticaj tehničke supstance i formulisanih preparata klomazona – Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS na različite organizme vodene sredine, nakon čega je urađena procena rizika.

Delovanje klomazona na primarne producente urađeno je ispitivanjima na dve vrste akvatičnih makrofita – *Lemna minor* i *Myriophyllum aquaticum*. Preparat Rampa<sup>®</sup> EC ispoljio je veću toksičnost za vrstu *L. minor*, dok je GAT Cenit 36 CS bio toksičniji za *M. aquaticum*. Ipak, za oba preparata veća inhibicija rasta registrovana je kod ukorenjene vrste *M. aquaticum*, što potvrđuje uvođenje ove makrofite u procenu rizika od herbicida.

Ispitivanja na beskičmenjacima (*Daphnia magna*), embrionima riba (*Danio rerio*) i žaba (*Xenopus laevis*) ukazala su na veću toksičnost preparata Rampa<sup>®</sup> EC u odnosu na tehničku supstancu i drugi preparat. U studijama sa vrstama *D. rerio* i *X. laevis* pored toksičnosti utvrđivan je i teratogeni potencijal tehničke supstance klomazon i oba ispitivana preparata. Ujedno, ovo je prvi rezultat o embriotoksičnosti, kako aktivne supstance, tako i preparata klomazona. Kod izlaganih jedinki registrovani su teratogeni efekti, kao što su: kraniofacijalne i deformacije kičme, pojava edema, smanjen porast (dužina). Kod embriona *D. rerio* izlagnih tehničkoj supstanci i preparatima registrovan je uticaj na motorne neurone, a kašnjenje u razvoju utvrđeno je kod izlaganja tehničkoj supstanci i preparatu Rampa<sup>®</sup> EC. Iz odnosa teratogenosti i toksičnosti kod embriona dve vrste utvrđen je indeks teratogenosti (TI) koji je ukazao da tehnička supstanca ima

veći teratogeni, a preparat Rampa<sup>®</sup> EC toksični potencijal. Preparat GAT Cenit 36 CS nije ispoljio toksično ni teratogeno delovanje u ispitivanjima sa vrstom *X. laevis*, dok je za vrstu *D. rerio* ispoljio teratogeno delovanje. Rezultati ispitivanja na *D. rerio* ukazuju na najverovatniji mehanizam delovanja klomazona - remećenje metabolizma piruvata, koje dovodi do produženja ili prekida embriogeneze. Da bi se sa velikom sigurnošću govorilo o mehanizmu delovanja klomazona potrebna su dalja opsežna ispitivanja.

*In vitro* ispitivanja sa ćelijskom linijom RTgill-W1 ukazala su na citotoksičnost tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC, dok preparat GAT Cenit 36 CS nije ispoljio citotoksično delovanje. Najveću osetljivost ispoljio je esej sa bojom alamar plavo, koji ukazuje na smanjanje metaboličke aktivnosti ćelije. Visok stepen korelacije utvrđen je između smrtnosti embriona *D. rerio* i citotoksičnosti tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC.

Komparativnih studija toksičnosti klomazona ranije nije bilo, a ovo je prvi rezultat o razlikama u toksičnosti dva različito formulisana preparata na bazi ove aktivne supstance. Rezultati ispitivanja pokazali su da je preparat formulisan u obliku koncentrata za emulziju (Rampa<sup>®</sup> EC) kod većine vrsta ispoljio veću, a suspenzija kapsula (GAT Cenit 36 CS) manju toksičnost u odnosu na tehničku supstancu klomazon. Ovi rezultati ukazuju da preparati koji sadrže istu aktivnu supstancu, u istoj koncentraciji, a formulisani su na različite načine, mogu da ispolje različite toksične efekte na neciljne organizme i životnu sredinu. Procena rizika urađena na osnovu toksičnosti utvrđene u ispitivanjima tokom realizacije ove disertacije i literaturnih podataka, kao i izloženosti izračunate za aktivnu supstancu prema preporuci o količini primene u našoj zemlji, ukazala je da je rizik od primene klomazona za organizme vodene sredine prihvatljiv.

**Ključne reči:** klomazon, formulacije pesticida, *Lemna minor*, *Myriophyllum aquaticum*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, RTgill-W1, procena rizika

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitofarmacija

**UDK:** 632.954:574.5(043.3)

# EFFECTS OF CLOMAZONE ACTIVE SUBSTANCE AND ITS FORMULATED PRODUCTS ON AQUATIC ORGANISMS

## ABSTRACT

Herbicides are the most widely used group of pesticides, but they are able to cause adverse effects on non-target organisms after reaching water bodies. Different formulations using the same active ingredient are often available, which raises an issue of potential influence of different types of formulations on herbicide toxicity to non-target organisms. Experiments were conducted as part of this doctoral dissertation to evaluate the toxicity of technical clomazone and its two formulated products: Rampa<sup>®</sup> EC and GAT Cenit 36 CS, to several aquatic organisms, and to assess the risks involved in their use.

Clomazone effects on primary producers were assessed by examining two species of aquatic macrophytes – *Lemna minor* and *Myriophyllum aquaticum*. The Rampa<sup>®</sup> EC product demonstrated a higher toxicity to *L. minor*, while GAT Cenit 36 SC was more toxic to *M. aquaticum*. However, the rooted species *M. aquaticum* showed a greater inhibition of growth, considering both products, which supports introduction of this macrophyte in risk assessment protocols for herbicides.

Experiments with aquatic invertebrate (*Daphnia magna*), fish (*Danio rerio*) and frog (*Xenopus laevis*) embryos revealed a higher toxicity of Rampa<sup>®</sup> EC than the technical ingredient and the other product. In experiments with *D. rerio* and *X. laevis*, teratogenic potential of the clomazone technical substance and both investigated products was determined in addition to toxicity assessment. The present investigation was also the first report on embryotoxicity caused by both clomazone active substance and its different products. Diverse teratogenic effects, such as craniofacial and spine deformities, edema and growth reduction (length), were found in exposed individuals. A significant effect on motoneurons was noted in *D. rerio* embryos exposed to the technical substance and both products, while underdevelopment was observed only in



embryos exposed to the technical substance and Rampa<sup>®</sup> EC. The teratogenicity index (TI) calculated based on teratogenicity and toxicity ratio for embryos of both species indicated that clomazone technical substance has a greater teratogenic potential, while Rampa<sup>®</sup> EC has a higher toxic potential. In experiments with *X. laevis*, embryos showed no teratogenic or toxic effects of the product GAT Cenit 36 CS, while teratogenic potential was shown in the species *D. rerio*. The results of the *D. rerio* test indicate that the most likely mode of action of clomazone is disruption of pyruvate metabolism, which leads to an extension or interruption of embryogenesis. In order to discuss the exact mode of action of clomazone, further extensive testing is required.

*In vitro* testing with the RTgill-W1 cell line highlighted cytotoxicity of the technical substance and Rampa<sup>®</sup> EC, while no cytotoxic potential was observed in experiments with GAT Cenit 36 CS. The most sensitive was alamar blue assay, which indicates a decrease in metabolic activity of the cell. A high degree of correlation was revealed between the death of *D. rerio* embryos and cytotoxicity of the technical substance and Rampa<sup>®</sup> EC product.

Comparative studies of clomazone toxicity have not been performed earlier, and this is the first result of experiments showing differences in toxicity between two differently formulated products containing this active ingredient. The results of the present study showed that the emulsion concentrate product (Rampa<sup>®</sup> EC) exhibited higher toxicity than the clomazone technical substance in most of the tested species, while the capsule suspension (GAT Cenit 36 CS) was less toxic. It indicated that different products containing the same active ingredient (equal contents) may have different impact on non-target species and the environment. Risk assessment based on the toxicity data determined in experiments conducted for the present dissertation and literature data, and on exposure calculated for the active ingredient based on recommendations for application rates in our country, indicated that the risk that clomazone poses for aquatic organisms is acceptable.

**Keywords:** clomazone, pesticide formulation, *Lemna minor*, *Myriophyllum aquaticum*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, RTgill-W1, risk assessment

**Area of science:** Agricultural sciences

**Specific field:** Pesticide science

**UDC:** 632.954:574.5(043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	4
2.1. Herbicidi, sudbina i dospevanje u vode	4
2.2. Procena rizika za akvatične organizme	7
2.3. Klomazon	15
2.3.1. Opšta svojstva, ponašanje i sudbina i detekcija klomazona u vodama	15
2.3.2. Formulacije klomazona	18
2.3.3. Uticaj klomazona na akvatične organizme	20
2.4. Osobine test organizama	24
2.4.1. Vrste roda <i>Lemna</i>	25
2.4.2. Vrste roda <i>Myriophyllum</i>	27
2.4.3. Vrste roda <i>Daphnia</i>	29
2.4.4. Embrioni vrste <i>Danio rerio</i>	31
2.4.5. Embrioni vrste <i>Xenopus laevis</i>	34
2.4.6. Čelijska linija poreklom iz škrge <i>Oncorhynchus mykiss</i> (RTgill-W1)	37
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	42
<b>4. MATERIJAL I METODE</b>	44
4.1. Ispitivana tehnička supstanca i preparati	44
4.2. Priprema rastvora i kvantitativno određivanje klomazona	44
4.3. Eksperimenti sa akvatičnim organizmima	46
4.3.1. Inhibicija rasta vrste <i>Lemna minor</i>	46
4.3.1.1. Test organizam	46
4.3.1.2. Eksperimentalna postavka	46
4.3.2. Inhibicija rasta vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i>	49
4.3.2.1. Test organizam	49
4.3.2.2. Eksperimentalna postavka	49
4.3.3. Akutna imobilizacija vrste <i>Daphnia magna</i>	51
4.3.3.1. Test organizam	51
4.3.3.2. Eksperimentalna postavka	52
4.3.4. Akutna toksičnost za embrione <i>Danio rerio</i>	54
4.3.4.1. Test organizam	54
4.3.4.2. Eksperimentalna postavka	55
4.3.5. Ispitivanje teratogeneze embriona žabe – <i>Xenopus</i> (FETAX)	57
4.3.5.1. Test organizam	57

4.3.5.2. Eksperimentalna postavka	59
4.4. <i>In vitro</i> eseji procene citotoksičnih efekata za ćelijsku liniju RTgill-W1 ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	60
4.4.1. Ćelijska linija i održavanje	60
4.4.2. Eksperimentalna postavka	61
4.5. Procena rizika za akvatične organizme	63
4.6. Statistička analiza	65
<b>5. REZULTATI</b>	69
5.1. Ispitivanje uticaja tehničke supstance klomazon i dva komercijalna preparata na akvatične makrofite	69
5.1.1. Inhibicija rasta vrste <i>Lemna minor</i>	69
5.1.2. Inhibicija rasta vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i>	78
5.1.3. Poređenje osetljivosti dve vrste akvatičnih makrofita prema tehničkoj supstanci i preparatima klomazona	88
5.2. Ispitivanje akutne toksičnosti tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona za vrstu <i>Daphnia magna</i>	89
5.3. Ispitivanje akutne toksičnosti tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona za embrione <i>Danio rerio</i>	92
5.4. Ispitivanje teratogenih efekata tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona za embrione <i>Xenopus laevis</i>	103
5.5. Ispitivanje citotoksičnih svojstava tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona	112
5.6. Procena rizika za akvatične organizme od primene klomazona	116
5.6.1. Prvi nivo stepenaste procene rizika (Tier I)	116
5.6.2. Drugi nivo stepenaste procene rizika – SSD (Tier II)	124
<b>6. DISKUSIJA</b>	126
6.1. Nestandardni testovi rađeni sa klomazonom i njihov doprinos u proceni efekata	126
6.1.1. <i>Myriophyllum aquaticum</i> kao dodatna vrsta u proceni toksičnosti herbicida i regulatora rasta	126
6.1.2. Ispitivanje embriotoksičnosti klomazona	129
6.1.2.1. Testovi sa vrstom <i>Danio rerio</i>	129
6.1.2.2. Testovi sa vrstom <i>Xenopus laevis</i>	134
6.1.3. <i>In vitro</i> ispitivanja sa ćelijskom linijom RTgill-W1	136
6.2. Komparativna toksičnost aktivne supstance i preparata na bazi klomazona	139
6.3. Ekološka procena rizika	144
<b>7. ZAKLJUČAK</b>	147

**8. LITERATURA**

150

**PRILOZI**

**BIOGRAFIJA**

**IZJAVE**

δ-ALA-D	δ-aminolevulinska kiselina
3R koncept	Zamena, smanjenje i unapređenje eksperimenata sa životinjama ( <i>Replacement, Reduction and Refinement of animal tests</i> )
AB	Alamar plavo
AChE	Acetilholin esteraza
AdaM	Veštački hranjivi rastvor za dafnije ( <i>Artificial Daphnia Medium</i> )
AF	Faktor procene ( <i>Assessment Factor</i> )
ALT	Alanin transferaza
AMEG	Savetodavna grupa za akvatične makrofite ( <i>Advisory Group in Aquatic Macrophyte Ecotoxicology</i> )
AST	Aspartat transferaza
BJ	Broj jedinki
CAS broj	Broj u registru Američkog hemijskog društva ( <i>Chemical Abstract Service</i> )
CAT	Katalaza
CFD	Kraniofacijalne deformacije ( <i>Craniofacial Deformities</i> )
CFDA-AM	5-karboksifluorescein diacetat acetoksimetil estar
chl $a$	Hlorofil $a$
chl $b$	Hlorofil $b$
CS	Formulacija pesticida u obliku suspenzije kapsula
CYP1A1	Citohrom P450 1A1 enzim
DDT	Deformacije digestivnog trakta
DIS	Dužina biljke iznad sedimenta
DK	Deformacije kičme
DMSO	Dimetil sulfoksid ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
DT <sub>50</sub>	Vreme poluraspada (poluživota) ( <i>Degradation Time-50</i> )
DU	Ukupna dužina biljke

DVR	Deformacije vrha repa
DXP	Deoksiksiluloza 5-fosfat
DXR	Deoksiksiluloza 5-fosfat reduktaza
DXS	Deoksiksiluloza 5-fosfat sintetaza
E	Edemi
EC	Formulacija pesticida u obliku koncentrata za emulziju
EC <sub>10</sub>	Efektivna koncentracija test supstance koja izaziva 10% efekata na posmatrano svojstvo
EC <sub>50</sub>	Efektivna koncentracija test supstance koja izaziva 50% efekata na posmatrano svojstvo
EFSA	Evropska agencija za bezbednost hrane ( <i>European Food Safety Authority</i> )
ERA	Ekološka procena rizika ( <i>Ecological Risk Assessment</i> )
EW	Formulacija pesticida u obliku emulzije ulje u vodi
FBS	Fetalni goveđi serum ( <i>Fetal Bovin Serum</i> )
FC	Facijalne deformacije ( <i>Facial Deformities</i> )
FET	Testovi embriotoksičnosti na ribama ( <i>Fish Embryo Test</i> )
FETAX	Test teratogeneze embriona žabe <i>Xenopus</i> ( <i>Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus</i> )
FOCUS	Forum za koordinaciju modela sudbine pesticida i njihovu upotrebu ( <i>FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their USE</i> )
FU	Fluorescentne jedinice ( <i>Fluorescence Unit</i> )
G3P	Gliceraldehid 3-fosfat
GPX	Glutation peroksidaza
GST	Glutation S-transferaza
HC <sub>5</sub>	Koncentracija test supstance štetna za 5% izloženih vrsta ( <i>Hazardous concentration</i> )
hpf	Časovi nakon oplodnje ( <i>hours post fertilisation</i> )

HPLC-DAD	Tečna hromatografija sa DAD detektorom - diodnim nizom ( <i>High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection</i> )
HT <sub>50</sub>	Srednje vreme izvaljivanja, vreme nakon oplodnje kada je izvaljeno 50% izlaganih larvi ( <i>Hatching Time</i> )
HQ	Koeficijent hazarda ( <i>Hazard Quotient</i> )
HRAC	Komisija za rezistentnost herbicida ( <i>Herbicide Resistance Action Committee</i> )
IC <sub>50</sub>	Koncentracija test supstance koja dovodi do 50%-tne inhibicije rasta
IPP	Izopentenil pirofosfat
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju ( <i>International Organization for Standardization</i> )
IU	Međunarodna jedinica ( <i>International Unit</i> )
kDa	Kilo-dalton
K <sub>ow</sub>	Podeoni koeficijent n-oktanol/voda
L-15	Leibovic hranljivi rastvor ( <i>Leibovitz's medium</i> )
L-15/ex	Leibovic hranljivi rastvor bez FBS
LC <sub>50</sub>	Koncentracija test supstance koja je letalna za 50% populacije
LOEC	Najniža koncentracija test supstance koja izaziva statistički značajan efekat ( <i>Lowest Observed Effect Concentration</i> )
LOQ	Granica kvantifikacije ( <i>Limit of quantification</i> )
ME	Formulacija pesticida u obliku mikroemulzije
MEP	Ne-mevalonski ili metileritrol 4-fosfat put ( <i>Methylerythrol 4-Phosphate</i> )
MK	Masa korena
MS <sub>v</sub>	Sveža masa
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat



NM	Neispunjen mehur
NOEC	Maksimalna koncentracija test supstance koja ne izaziva statistički značajan efekat ( <i>No Observed Effect Concentration</i> )
NR	Neutralno crveno ( <i>Neutral Red</i> )
OECD	Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj ( <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
OD	Okularne deformacije ( <i>Ocular Deformities</i> )
PAH	Policiklični aromatični ugljovodonici ( <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i> )
PBS	Fosfatni pufer ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDA	Detektor sa fotodiodnim nizom ( <i>Photodiode Array Detector</i> )
PEC	Predviđene koncentracije test supstance u životnoj sredini ( <i>Predicted Environmental Concentration</i> )
PJ	Površina jedinki
PNEC	Predviđene koncentracije test supstance bez efekata ( <i>Predicted No Effect Concentration</i> )
RAC	Regulatorno prihvatljive koncentracije ( <i>Regulatory Acceptable Concentrations</i> )
RECETOX	Istraživački centar za toksične supstance u životnoj sredini ( <i>REsearch CEnter for TOXic Compunds in the Environment</i> )
RGR	Specifična stopa rasta ( <i>Relative Growth Rate</i> )
SAD	Sjedinjene Američke Države
SETAC	Međunarodno udruženje za ekotoksikologiju i hemiju ( <i>Society of Environmental Toxicology and Chemistry</i> )
SF	Faktor sigurnosti ( <i>Safety Factor</i> )
SOD	Superoksid dismutaza ( <i>Superoxide Dismutase</i> )
SSD	Raspodela osetljivosti vrsta ( <i>Species Sensitivity Distribution</i> )
SSLRC	Centar za ispitivanje zemljišta ( <i>Soil Survey and Land Research Centre</i> )

TBARS	Reaktivne vrste tiobarbiturne kiseline ( <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> )
TER	Odnos toksičnosti i izloženosti ( <i>Toxicity to Exposure Ratio</i> )
TI	Indeks teratogenosti ( <i>Teratogenicity Index</i> )
TK/TD modeli	Toksiko-kinetički/Toksiko-dinamički modeli
US EPA	Američka agencija za zaštitu životne sredine ( <i>United States Environmental Protection Agency</i> )
UV	Ultraljubičasta ( <i>Ultraviolet</i> )
Y	Prinos ( <i>Yield</i> )
WP	Formulacija pesticida u obliku kvašljivog praška ( <i>Wettable Powder</i> )
ZC	Formulacija pesticida u obliku mešavine koncentrovane suspenzije i suspenzije kapsula

## 1. UVOD

Porast broja stanovnika dovodi do konstantne potrebe za povećanjem produktivnosti biljne proizvodnje, a veoma važnu ulogu u postizanju tog cilja imaju pesticidi, hemijska ili biološka sredstva za zaštitu bilja. Pored nesporno pozitivnih mogu imati i neželjene efekte, a ulažu se veliki naponi kako bi se, pre stavljanja u promet, izvršila pravilna procena koristi koju nam upotreba pesticida donosi i potencijalnih neželjenih efekata na čoveka i životnu sredinu.

Budući da su sintetisani tako da budu toksični, da u životnu sredinu dospevaju ciljano i u velikim količinama, pesticidi predstavljaju veoma važnu grupu zagađujućih supstanci. Pripadaju supstancama koje su veoma strogo zakonski regulisane i u okviru Evropske unije njihovo stavljanje u promet definisano je Uredbom 1107/2009 (EC, 2009), a u našoj zemlji Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, 41/09). Aktivne supstance se, pre stavljanja u promet, prevode u pogodan oblik, odnosno formulišu u finalne proizvode. Oni sadrže jednu ili više aktivnih supstanci i manji ili veći broj pomoćnih supstanci čijom primenom se povećava efektivnost, ali najčešće poboljšava i čitav niz drugih poželjnih svojstava formulacije (Kowles, 2005). Imajući u vidu da se za pesticide primenjuje regulatorni pristup prevencije rizika, pre stavljanja u promet aktivne supstance prolaze detaljna ispitivanja toksikoloških, ekotoksikoloških, fizičko-hemijskih i drugih svojstava. Detaljna ispitivanja svojstava formulisanih proizvoda često izostaju i kada god je moguće izjednačavaju se sa svojstvima aktivnih supstanci koje ulaze u njihov sastav. Kada je reč o vodenoj sredini, za potrebe registracije herbicida i regulatora rasta detaljna ispitivanja formulisanih proizvoda rade se ukoliko nije moguće predvideti toksična svojstva preparata na osnovu svojstava aktivne supstance, ukoliko se preparat primenjuje direktno na vodenu površinu, ili ukoliko ne postoje podaci o sličnom proizvodu na osnovu kojih se može izvršiti ekstrapolacija.

Za aktivne supstance, kao i za sredstva za zaštitu bilja, primenjuje se preventivna ekološka procena rizika (eng. *Ecological Risk Assessment* - ERA), koja predstavlja procenu potencijalnog negativnog delovanja na populacije, zajednice i ekosisteme, pre stavljanja u promet. Kako bi se omogućila pouzdana procena dugotrajnih efekata na neciljne vrste, prirodne populacije i ekosisteme konstantno se radi na iznalaženju novih metoda koje se primenjuju u ekološkoj proceni rizika. U tom cilju Evropska agencija za

bezbednost hrane (eng. European Food Safety Authority - EFSA) je u revidiranom vodiču za stepenasto organizovanu procenu rizika od pesticida za vodene ekosisteme u blizini obradivih površina dala predlog dodatnih vrsta za ispitivanje efekata herbicida (EFSA, 2013).

Klomazon je aktivna supstanca iz grupe izoksazolidinona i nalazi se u širokoj primeni kod nas i u svetu. Dobra rastvorljivost i niz drugih fizičko-hemijskih svojstava ukazuju da ima potencijal za zagađenje voda (Van Scoy i Tjeerderma, 2014). Osim za potrebe zakonske regulative (DAR, 2006), malo istraživača bavilo se ispitivanjem toksičnih svojstava ove aktivne supstance i preparata koji je sadrže za akvatične organizme. Procena rizika, takođe, rađena je u okviru procesa registracije i stavljanja u promet i ne obuhvata ni jedno od predloženih dodatnih ispitivanja (EFSA, 2007). Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su neke od ovih nestandardnih testova. Budući da je vrsta *Lemna minor*, u određenom broju slučajeva, ispoljila nedovoljnu osetljivost, kao dopunska vrsta u ERA za vodenu sredinu od herbicida i regulatora rasta predložene su vrste roda *Myriophyllum*. Rezultati ispitivanja toksičnosti klomazona za akvatične makrofite dobijeni u okviru ove disertacije idu u prilog ovog predloga. Takođe, ispitivanjima embriotoksičnosti na vrstama *Danio rerio* i *Xenopus laevis*, pored toksičnosti i smrtnog ishoda, dobijena su dragocena saznanja o subletalnim promenama do kojih je izlaganje klomazonu i preparatima na bazi ove supstance dovelo. Na osnovu tih saznanja, pored efekata na jedinkama, mogu se izvući i zaključci o efektima na populacije ovih vrsta. Iako nemaju mesta u ERA, u okviru ove disertacije obuhvaćeni su i *in vitro* testovi, imajući u vidu njihov značaj (samostalno i/ili u kombinaciji sa drugim metodama) u rasvetljavanju potencijalnog mehanizma delovanja supstance na ćelijskom nivou, što je bio slučaj i u ovim istraživanjima.

Toksičnost preparata (smeše), nakon procesa formulisanja, često nije ista kao toksičnost čiste aktivne supstance (Howe et al., 2004; Beggel et al., 2010; Puglis i Boone, 2011; Mesnage et al., 2014). Rezultati ovih istraživanja treba da omoguće bolje sagledavanje uticaja aktivne supstance klomazon i različito formulisanih preparata na odabrane predstavnike ekosistema. Imajući u vidu značaj i složenost njihovog uticaja na neciljne organizme dobijeni rezultati treba da doprinesu potpunijem uvidu u procese koji nastaju njihovim prisustvom u životnoj sredini. Komparativnih studija toksičnosti aktivne

supstance i preparata klomazona nema, a ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije ukazaće, sa stanovišta zaštite životne sredine, na značaj izbora određenog oblika formulisanog preparata za primenu.

## **2. PREGLED LITERATURE**

U okviru ovog poglavlja obuhvaćen je predmet istraživanja disertacije sa posebnim osvrtom na sudbinu i ponašanje herbicida nakon dospevanja u životnu sredinu, ekološku procenu rizika od njihove upotrebe, kao i na test organizme akvatične sredine koji su korišćeni tokom izrade ove disertacije.

### **2.1. Herbicidi, sudbina i dospevanje u vode**

Stalna potreba za povećanjem produktivnosti i obezbeđenjem potrebnih količina poljoprivrednih proizvoda zadovoljavajućeg kvaliteta čini upotrebu pesticida nezaobilaznom merom moderne poljoprivrede (Rice et al., 2007). Pesticidi su biološki aktivne supstance namenjene za primenu u poljoprivrednoj proizvodnji da bi se sprečili ili ograničili štetni efekti bioloških agenasa, kao što su neželjene biljne vrste, štetočine, prouzrokovajući biljnih bolesti itd. Najmanje dve osobine ih veoma razlikuju od drugih hemikalija koje se nalaze u životnoj sredini; dizajnirani su tako da budu toksični i namerno i ciljano se primenjuju i dospevaju u životnu sredinu.

Trenutno su, u zemljama Evropske unije, za primenu u poljoprivredi odobrene 492 aktivne supstance, na osnovu kojih je formulisano nekoliko hiljada sredstava za zaštitu bilja (EC, 2018). Procenjuje se da godišnja potrošnja pesticida na svetskom nivou iznosi četiri miliona tona, a da od te količine manje od 1% dospe do ciljnog organizma, dok ostatak dospeva u životnu sredinu (Gavrilescu, 2005; Arias-Estévez et al., 2008; Ortiz-Hernández et al., 2013). Dakle, dobrobit koju primena pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji donosi često je praćena rizikom od neželjenih posledica po životnu sredinu (Nešković i Vojinović, 1987; Brkić i sar., 2009). Naime, kada se pesticidno jedinjenje nađe u životnoj sredini, njegova sudbina zavisi od mnogobrojnih fizičkih, hemijskih i bioloških procesa, koji se mogu grupisati u tri celine: adsorpcija, degradacija i transport. Adsorpcija predstavlja vezivanje pesticida za mineralnu i organsku materiju zemljišta. Značajan faktor kod adsorpcije predstavljaju fizičko-hemijska svojstva pesticida, pre svega rastvorljivost u vodi, podeoni koeficijent n-oktanol/voda ( $K_{ow}$ ) i stepen disocijacije (Arias-Estévez et al., 2008; Wauchope et al., 2002). Utvrđeno je da je stepen vezivanja pesticida za zemljište u negativnoj korelaciji sa njihovom rastvorljivošću u vodi, odnosno pozitivno korelisano sa  $K_{ow}$  (Wauchope et al., 2002).

Degradacija pesticida obuhvata procese hemijske, fotohemijske i mikrobiološke razgradnje pesticida do netoksičnih metabolita ili osnovnih elemenata (Vargas, 1975; Wauchope et al., 2002; Solomon et al., 2013). Pokazatelj degradacije je vreme poluraspada (vreme poluživota) koje se definiše kao vreme potrebno da se koncentracija pesticida smanji na polovinu početne vrednosti i označava se sa  $DT_{50}$  (eng. *Degradation Time-50*) (Wauchope et al., 2002). Transport pesticida predstavlja kretanje pesticida u životnoj sredini i obuhvata procese isparavanja, spiranja, ispiranja i usvajanja od strane biljke. Značajan uticaj na transport pesticida imaju procesi adsorpcije i degradacije. Interakcija ovih procesa, u kombinaciji sa fizičko-hemijskim svojstvima pesticida, rezultira njihovom pojavom u svim delovima životne sredine – vazduhu, zemljištu i vodi (Arias-Estévez et al., 2008; Teodorović i Kaišarević, 2015). Smatra se da od ukupno primenjene količine pesticida, oko 2% završi u površinskim vodama (Sauco et al., 2010). Dospevanje u vazduh zavisi, pre svega, od napona pare, tako da pesticidi sa visokim naponom pare, sa tretiranih površina ili zemljišta isparavanjem dospevaju u vazduh (Walker, 2008).

Pesticidno jedinjenje sa mesta primene može biti transportovano u bližu ili dalju okolinu, što za posledicu može imati delovanje na neciljne organizme (Rice et al., 2007). Iako je razvojem tehnologije došlo do otkrivanja novih aktivnih supstanci pesticida koje se odlikuju niskom toksičnošću i minimalnim štetnim efektima za neciljne organizme, a koje se primenjuju u smanjenim količinama, u primeni su još uvek mnoga jedinjenja koja nemaju ova svojstva (Gavrilescu, 2005; Arias-Estévez et al., 2008).

Herbicidi, koji se primenjuju u cilju suzbijanja korova pre nicanja, ili u različitim fazama rasta, su najčešće korišćena grupa pesticida sa učešćem od oko 40% u ukupnoj godišnjoj svetskoj potrošnji (Grube et al., 2012). Najveći deo herbicida utroši se za potrebe poljoprivredne proizvodnje, ali značajne količine primenjuju se i u šumarstvu, zatim za suzbijanje korova pored puteva i održavanje zelenih površina, kao što su parkovi, golf i drugi sportski tereni (Solomon et al., 2013; Park et al., 2017). Herbicidi u vode mogu dospeti direktno, usled suzbijanja akvatičnih korovskih vrsta (kanali, pirinčana polja), ali i indirektno transportom sa tretiranih površina (Solomon et al., 2013). Transport herbicida u površinske i podzemne vode najvećim delom odvija se

procesima spiranja i ispiranja sa poljoprivrednih površina (Wauchope et al., 2002; Gavrilesco, 2005; Botelho et al., 2012; Teodorović i Kaišarević, 2015). Manji deo herbicida u vodu dospeva zanošenjem kapi prilikom primene (drift), atmosferskom depozicijom, pranjem opreme i radnih odela, usled curenja i prosipanja, ili nepravilnim odlaganjem ambalaže (Fogg et al., 2003; Teodorović i Kaišarević, 2015). Osim toga, često krajnji korisnici pesticida nisu upoznati sa rizicima koje njihova primena nosi i ne poštuju sve mere predostrožnosti i preporuke vezane za način primene zbog čega se ovaj problem dodatno produbljuje (Damalas i Eleftherohorinos, 2011). Ostaci pesticida u vodi utiču na njen kvalitet, a u zavisnosti od koncentracije i dužine zadržavanja mogu negativno uticati na zdravlje ljudi, osetljive organizme i akvatične ekosisteme (Carter, 1999; Rice et al., 2007). Zbog ireverzibilnih promena detektovanih u akvatičnim ekosistemima širom sveta, sa stanovišta zaštite životne sredine, održavanje kvaliteta vodnih resursa jedan je od najvećih izazova (Botelho et al., 2012). Zbog uglavnom male toksičnosti za sisare, herbicidima (izuzev biocida) kao zagađujućim supstancama u životnoj sredini ranije se nije posvećivalo dovoljno pažnje (Walker, 2008). Praćenjem ostataka pesticida bavi se veliki broj istraživača koji su u više navrata utvrdili prisustvo herbicida u površinskim i podzemnim vodama pri čemu su najčešće detektovana jedinjenja iz grupa triazinskih i anilidnih jedinjenja (Gašić et al., 2002; Cerejeira et al., 2003; Arias-Estévez et al., 2008; Dougherty et al., 2010; Reilly et al., 2012; De Liguoro et al., 2014; Köck-Schulmeyer et al., 2014). Herbicidi sa velikim potencijalom dospevanja do voda odlikuju se mobilnošću kroz zemljišni profil, perzistentnošću, rastvorljivošću i umerenim vezivanjem za organsku materiju. Ako se uzme u obzir da se poljoprivredne površine često nalaze u blizini rečica, reka i jezera, moguća izloženost ovih ekosistema herbicidima je velika (Botelho et al., 2012). U zavisnosti od fizičko-hemijskih svojstava, nakon dospevanja u vodenu sredinu herbicidne supstance se vezuju za suspendovane čestice u rastvoru, akumuliraju u sedimentu, bivaju usvojene od strane akvatičnih organizama, ili ostaju na površini vode (hidrofobne supstance). Dalji transport odvija se difuzijom u vodotokovima ili putem organizama koji su ih usvojili, a usled kompleksnih interakcija u okviru lanca ishrane, čitav ekosistem može biti narušen (Damalas i Eleftherohorinos, 2011; Botelho et al., 2012).

Aktivne supstance pesticida se obično ne koriste kao čiste već se mešaju sa pomoćnim supstancama da bi se dobili proizvodi pogodni za primenu koji u tom obliku dospevaju



u životnu sredinu. Ovo praktično znači da se u životnoj sredini, pored aktivne supstance pesticida, mogu naći i brojne pomoćne supstance čija su fizičko-hemijska, toksikološka i ekotoksikološka svojstva veoma različita.

## **2.2. Procena rizika za akvatične organizme**

Prema definiciji ekološka procena rizika (ERA) predstavlja procenu verovatnoće da se negativni ekološki efekti mogu pojaviti, ili se pojavljuju, kao posledica izlaganja jednom ili većem broju stresora (US EPA, 1992). Sa regulatornog aspekta, ekološka procena rizika omogućava procenu verovatnoće i razmere štetnih efekata hemijskih i fizičkih agenasa na populacije, zajednice i ekosisteme. Imajući u vidu broj različitih stresora, ali i broj različitih vrsta u prirodi, osnovni zadatak ERA je ekstrapolacija rezultata ekotoksikoloških testova na više nivoe biološke organizacije. Na osnovu prirode posmatranog procesa ekološka procena rizika može biti preventivna (prediktivna), kada se procenjuje potencijalni efekat supstanci pre njihovog stavljanja u promet, ili retrospektivna kada se procenjuje efekat hemijskih supstanci, koje se već nalaze u primeni, na životnu sredinu. Preventivna ekološka procena rizika je jedan od osnovnih postupaka u kontroli i održivoj upotrebi sredstava za zaštitu bilja, biocida i industrijskih hemikalija, u cilju prevencije neprihvatljivog rizika za populacije neciljnih vrsta i ekosisteme. Oslanja se na rezultate standardizovanih ekotoksikoloških testiranja na odabranim, reprezentativnim vrstama vodene i terestrične životne sredine u cilju utvrđivanja efekata do kojih bi hemikalija dovela, ukoliko bi dospela u neki ekološki sistem. Retrospektivna procena rizika predstavlja procenu stanja životne sredine i povezivanja utvrđenih ekoloških efekata sa prethodnom/trenutnom izloženosti stresoru. Retrospektivna ekološka procena rizika bavi se procenom efekata hemikalije koja je već dospela u ekosistem, i kao takva može biti preciznija i pouzdanija od preventivne procene rizika (Teodorović i Kaišarević, 2015).

Ekološka procena rizika je veoma složen proces, a može se podeliti u četiri ključne celine (van Leeuwen i Hermens, 2001):

- identifikacija opasnosti (hazarda),
- procena efekata (procena odnosa koncentracije/doze i odgovora/efekta),
- procena izloženosti i

- karakterizacija rizika.

**Identifikacija opasnosti** obuhvata utvrđivanje intrinzičnih štetnih svojstava koje supstance imaju, odnosno utvrđivanje potencijala za izazivanje štetnih efekata, pod određenim uslovima izloženosti. Uključuje prikupljanje i evaluaciju podataka o vrstama efekata različitih hemikalija i uslovima izloženosti, koji mogu dovesti do pojave štetnih efekata, odnosno predstavlja verovatnoću nastanka štete usled izloženosti, što razlikuje opasnost od rizika (van Leeuwen i Hermens, 2001).

**Procena efekata** je procena odnosa između doze/koncentracije i pojave i jačine efekta. Uključuje karakterizaciju kvantitativnog odnosa između stepena izloženosti i pojave štetnih efekata. Za procenu se koriste podaci iz laboratorijskih i terenskih ispitivanja, različitih epidemioloških studija ekosistema. Procena ekoloških efekata počinje ocenom efekata, a dalje sledi analiza ekološkog odgovora (utvrđivanje efekata uzrokovanih promenom nivoa stresora) i povezivanje efekata sa ekološkim ciljevima. Većina informacija o odnosu doza – odgovor odnosi se na efekte na pojedinačnim organizmima, jer su informacije o zavisnosti doze i odgovora kod populacija, zajednica ili ekosistema teško merljive zbog izražene kompleksnosti (Newman i Unger, 2003; Foudoulakis, 2006). Odnos stresor – odgovor može biti izražen višestruko i to: u funkciji intenziteta (doza, koncentracija), vremena (srednje letalne doze/koncentracije za 24, 48, 72, 96 h) ili prostora. Za potrebe procene rizika koriste se informacije o srednjim letalnim ( $LC_{50}$ ), efektivnim/inhibitornim koncentracijama ( $EC_{50}/IC_{50}$ ), maksimalnim koncentracijama bez efekta (NOEC – *No Observed Effect Concentration*) (Beyer et al., 2014; FOCUS, 2015; Papadakis et al., 2015). Preporuka Evropske agencije za bezbednost hrane je da uz NOEC vrednosti bude prikazana i  $EC_{10}$  vrednost, jer NOEC može zavisiti od eksperimentalnog dizajna, dok je  $EC_{10}$  izračunata na osnovu dozno zavisne krive (EFSA, 2013).

**Procena izloženosti** je predviđanje ili merenje vremenske i prostorne distribucije hemikalija i njihove interakcije sa ekološkom komponentom od značaja. Pod distribucijom stresora podrazumeva se način transporta od izvora (mesta oslobađanja u prirodi) do mesta njegovog delovanja u ekološkom sistemu. Ovo je najnepouzdaniji korak u proceni rizika zbog nedostatka informacija vezanih za emisiju hemikalija, iz tačkastih ili iz difuznih izvora zagađenja. Razlike u abiotičkim faktorima, kao što su

klimatski faktori (temperatura, vlažnost, brzina vetra, padavine), hidrološki, geološki (tipovi zemljišta), ali i abiotičkim uslovima (razlike u strukturi i funkciji ekosistema) takođe doprinose nepozdanosti (van Leeuwen i Hermens, 2001). Prilikom procene izloženosti veoma je važno uzeti u obzir i koncentraciju, dužinu i učestalost izlaganja. Dužina izlaganja izražava se kao vremenski period u toku kojeg je zajednica izložena stresoru, prisutnom u koncentraciji koja prelazi prag osetljivosti (Newman i Unger, 2003).

**Karakterizacija rizika**, kao poslednji i ključni korak procene rizika, obuhvata procenu prirode, učestalosti i intenziteta negativnih efekata koji se verovatno mogu dogoditi u delovima životne sredine pod definisanim uslovima izloženosti; objedinjuje sve informacije dobijene u prethodnim koracima i na osnovu njih predviđa učestalost, prirodu i veličinu rizika. Preciznoj i pouzdanoj karakterizaciji rizika doprinose jasno definisani ciljevi zaštite (van Leeuwen i Hermens, 2001).

Ekološka procena rizika od hemikalija se zasniva na koeficijentu hazarda (eng. HQ – *Hazard Quotient*) koji predstavlja odnos procenjenog nivoa izloženosti i potencijalnog efekta na biološke sisteme utvrđenih u laboratorijskim uslovima, odnosno  $HQ = PEC/PNEC$  (Suter II, 2006).

Predviđena koncentracija u životnoj sredini – PEC (eng. *Predicted Environmental Concentrations*) procenjuje se na bazi ponašanja, sudbine i primene pesticida (EFSA, 2013). Prema Uredbi 1107/2009 procedura za registraciju pesticida predviđa korišćenje matematičkih modela za izvođenje PEC vrednosti. U tom cilju Evropska Komisija je osnovala radnu grupu FOCUS Surface Water Working Group (eng. *FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their USE*) čiji je osnovni cilj ustanovljavanje procedura i modela za izračunavanje PEC vrednosti u površinskim vodama (FOCUS, 2015). Program FOCUS<sub>sw</sub> (eng. *sw - surface water*) na osnovu definisanih mogućih scenarija relevantnih za poljoprivrednu proizvodnju, svojstava aktivne supstance, vremena, načina i količine primene predviđa PEC vrednosti za četiri nivoa procene rizika. Prva dva nivoa procene rizika predstavljaju najgori mogući scenario, dok je u modelovanju za treći i četvrti nivo procene rizika uključeno više faktora koji utiču na sudbinu supstance u životnoj sredini, pa su predviđene vrednosti realnije (EFSA, 2004). Veći broj istraživača ukazao je na povećane koncentracije pesticida (insekticidi i

fungicidi) u površinskim vodama u odnosu na PEC vrednosti dobijene modelovanjem u programu FOCUS, pa je revizija ove metodologije u bliskoj budućnosti očekivana (Knäbel et al., 2012; 2014; 2016; Pereira et al., 2017; EFSA, 2018).

Vrednost predviđene koncentracije bez efekta (eng. PNEC - *Predicted No Effect Concentration*) se izvodi iz rezultata najosetljivijeg ekotoksikološkog testa uz primenu faktora sigurnosti (eng. SF – *Safety Factor*).

Prema vodiču za procenu rizika, od sredstava za zaštitu bilja, za organizme akvatične sredine prihvatljivost rizika je definisana veličinom TER (eng. TER – *Toxicity to Exposure Ratio*), koja se izvodi iz odnosa toksičnosti (LC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, NOEC) i nivoa izloženosti (PEC), a omogućava kvantitativnu procenu akutnog i hroničnog rizika. Definisan je prag ili granična vrednost (eng. *trigger*) za svaku grupu organizama sa kojim se poredi TER, pa za akutne testove prag iznosi 100, a za hronične 10. Ukoliko je vrednost TER-a veća od propisane granične vrednosti, odnosno praga, smatra se da nema rizika od štetnog delovanja hemikalije i nije potrebna procena rizika višeg nivoa; ako je TER manja od praga rizik je neprihvatljiv (EC, 2002).

U cilju usaglašavanja procene rizika za akvatične organizme sa Uredbom 1107/2009 i novim naučnim saznanjima, EFSA je uradila reviziju ovog dokumenta i objavila vodič za stepenasto organizovanu procenu rizika od pesticida za vodene ekosisteme u blizini obradivih površina (EFSA, 2013). Prema smernicama ovog vodiča rizik se procenjuje utvrđivanjem Regulatorno prihvatljivih koncentracija (eng. RAC – *Regulatory Acceptable Concentrations*), koje su proizvod toksičnosti i definisanih faktora procene (AF – *Assessment Factor*) (Tabela 1). Ukoliko je vrednost RAC veća od PEC vrednosti rizik koji primena ispitivane supstance nosi za životnu sredinu je neprihvatljiv.

**Tabela 1.** Testovi koji se sprovode u cilju procene rizika od herbicida i njihove osnovne karakteristike (EFSA, 2013)

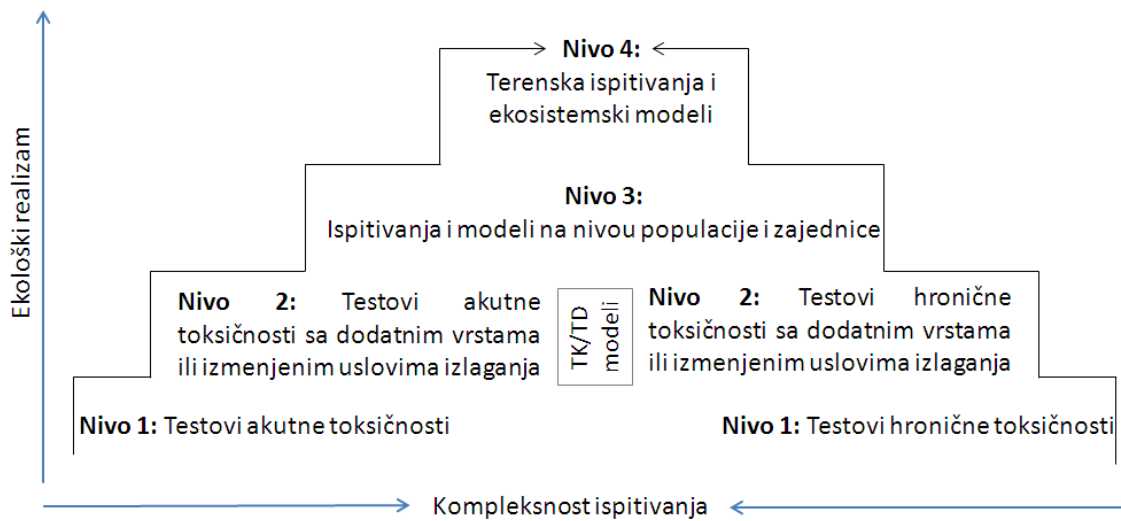
Organizam	Tip eksperimenta	Dužina izlaganja	Parametar	AF (Trigger)
<b>Ribe</b>	Akutni	96 h	LC <sub>50</sub>	100
	Hronični	21 dan	NOEC	10
	Rani životni stadijumi		EC <sub>10</sub>	10
<b>Dafnije</b>	Akutni	48 h	EC <sub>50</sub>	100
	Hronični	21 dan	EC <sub>10</sub> , NOEC	10
<b>Alge</b>	Kratkotrajni	72-120 h	E <sub>b</sub> C <sub>50</sub> E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	10
<b>Biljke</b>	Kratkotrajni	7-14 dana	E <sub>b</sub> C <sub>50</sub> E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	10

r – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu relativne stope rasta

b – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu prinosa

Prema vodiču za stepenasto organizovanu procenu rizika od pesticida za vodene ekosisteme u blizini obradivih površina (EFSA, 2013) preporuka je i uključivanje vodozemaca u procenu rizika, ali samo ispitivanja stadijuma vezanih za vodenu sredinu, dok će terestrični stadijumi biti obuhvaćeni vodičem za procenu rizika za vodozemce i gmizavce. Ovaj vodič je u fazi izrade, a prema Naučnom mišljenju o proceni rizika od pesticida za vodozemce i gmizavce (EFSA, 2018) ispitivanje efekata obuhvatiće sve razvojne stadijume, kako vezane za vodenu, tako i terestričnu sredinu. Test teratogeneze embriona žabe *X. laevis* jedan je od malobrojnih standardizovanih testova ispitivanja toksičnosti hemiklija za vodozemce. Iako naučna zajednica za procenu efekata hemikalija kao najreprezentativnije izdvaja testove celog životnog ciklusa (preporuka je test ispitivanja rasta i razvoja larvi vodozemaca (LAGDA) sa vrstom *Xenopus tropicalis*), naglašeno je i da kombinovanje rezultata testova na vodenim i terestričnim stadijumima ne treba zanemariti.

Fokus revidiranog vodiča je stepenasta struktura procene rizika i definisanje procene efekata po nivoima, dok metodologija procene izloženosti još uvek ostaje nepromenjena (FOCUS). Stepenasta struktura podrazumeva četiri nivoa procene, tako da ispitivanje efekata ide od jednostavnijih (laboratorijski testovi) ka složenim (viši nivo ekološkog realiteta) (Slika 1).



**Slika 1.** Šematski prikaz stepenaste strukture procene akutnih (leva strana) i hroničnih (desna strana) efekata kod izlaganja pesticidima (EFSA, 2013).

Za sredstva za zaštitu bilja određuju se akutni i hronični efekti/rizici. Nivoi 1 i 2 procene efekata zasnivaju se na laboratorijskim testovima toksičnosti na pojedinačnim vrstama, ali za bolju procenu rizika od vremenski varijabilnih izloženosti procena na nivou 2 može biti upotpunjena toksikokinetičkim/toksikodinamičkim modelima. Nivo 3 (eksperimenti i modeli na nivou populacije i zajednice) i nivo 4 (terenska ispitivanja i ekosistemske modeli) mogu se odnositi na kombinaciju eksperimentalnih podataka i modelovanja kako bi se procenili efekti na nivou populacije i zajednice u relevantnom prostorno-vremenskom okviru. U skladu sa šemama procene efekata, treba odrediti regulatorno prihvatljive koncentracije i porediti ih sa predviđenim koncentracijama u životnoj sredini u površinskim vodama ( $PEC_{sw}$ ). Na prvom nivou procene RAC vrednosti se zasnivaju na standardnim rezultatima testova toksičnosti, na drugom nivou procene na standardnim i dodatnim laboratorijskim testovima na pojedinačnim vrstama da bi se dobile geometrijske sredine (eng. *geomean*) ili krive raspodele osetljivosti vrsta (eng. *SSD – Species Sensitivity Distribution*) ili na testovima sa izmenjenim uslovima izloženosti. Metod *SSD* se koristi kada je dostupno minimum osam podataka o toksičnosti za primarne producente i beskičmenjake, ili šest za ribe i/ili vodozemce. Na osnovu dobijenih  $HC_5$  vrednosti (koncentracija štetna za 5% izloženih vrsta) i korigovanog faktora procene može se izračunati RAC, a dalje poređenjem sa *PEC* vrednostima uraditi procena rizika. Ukoliko je dostupno manje podataka koristi se

pristup Geomean. Vrednosti RAC utvrđene na trećem nivou procene rizika zasnivaju se na rezultatima mikro i/ili mezokosmos studija.

Aktivne supstance sa pesticidnim dejstvom pripadaju grupi supstanci koje su strogo zakonski regulisane i za njih se, kao i za sredstva za zaštitu bilja, kako je već naglašeno, primenjuje preventivna ERA, odnosno procena njihovog štetnog delovanja pre stavljanja u promet. U okviru Evropske unije stavljanje u promet definisano je Uredbom 1107/2009 (EC, 2009), a u našoj zemlji Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, 41/09). Politika smanjenja rizika od primene pesticida za zdravlje ljudi i životnu sredinu definisana je Direktivom 2009/128/EC.

Pre stavljanja u promet aktivne supstance prolaze veoma detaljna ispitivanja toksikoloških, ekotoksikoloških, fizičko-hemijskih i drugih svojstava koja su, na nivou Evropske unije, regulisana Uredbom 283/2013 (EC, 2013a), a u našoj zemlji Pravilnikom o sadržini i načinu postupanja sa dokumentacijom za procenu aktivne supstance, odnosno osnovne supstance i metodama za ispitivanje aktivne supstance, odnosno osnovne supstance (Sl. glasnik RS, 69/12). Ova ispitivanja za cilj imaju utvrđivanje mogućeg štetnog delovanja na čoveka i neciljne organizme, zagađenje površinskih ili podzemnih voda usled spiranja, ispiranja i zanošenja kapi prilikom tretiranja i dr. Stavljanje u promet proizvoda (sredstava za zaštitu bilja), na nivou Evropske unije, regulisano je Uredbom 284/2013 (EC, 2013b), a u našoj zemlji Pravilnikom o sadržini i načinu postupanja sa dokumentacijom za procenu sredstava za zaštitu bilja i metodama za ispitivanje sredstava za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, 69/12). U skladu sa ovom Uredbom detaljna ispitivanja efekata na akvatične organizme rade se za proizvode čija se toksična svojstva ne mogu predvideti na osnovu svojstava aktivne supstance, ukoliko se primenjuju na vodenim površinama, ili ukoliko ne postoje podaci o sličnom proizvodu na osnovu kojih se može izvršiti ekstrapolacija.

Procena delovanja pesticida na različite organizme u životnoj sredini je integralni deo procesa registracije pesticida. Naime, rezultati svih ispitivanja potrebnih za registraciju pesticida objedinjuju se i sagledavaju u procesu ekološke procene rizika. Ekološka procena rizika od pesticida obuhvata ispitivanja na akvatičnim organizmima (alge, biljke, beskičmenjaci, ribe), terestričnim kičmenjacima (ptice i sisari), pčelama i drugim korisnim artropodama, neciljnoj mezo i mikro fauni (kišne gliste i ostale neciljne vrste

mezo i mikro faune), neciljnim terestričnim biljkama i mikroorganizmima zemljišta, a za cilj ima predviđanje mogućnosti negativnog delovanja određenog stresora na neciljne organizme i njihove prirodne populacije, ili ekološki uticaj u definisanim uslovima (EFSA, 2013).

Uredbom 1107/2009 definisano je da se interakcija između aktivne supstance, zaštitnog sredstva (protektanta), sinergista i koformulanta mora uzeti u obzir prilikom evaluacije i autorizacije sredstava za zaštitu bilja. Takođe, standardni zahtevi za sredstva za zaštitu bilja, dati u Regulativi 284/2013, obuhvataju i sve informacije o potencijalno neprihvatljivim efektima na životnu sredinu, biljke i biljne proizvode, kao i poznate ili očekivane kumulativne i sinergističke efekte.

Za procenu opasnosti smeša (što se odnosi i na sredstva za zaštitu bilja) može se koristiti pristup procene smeše, ili pristup procene pojedinačnih sastojaka, u zavisnosti od raspoloživih podataka o toksičnosti sa kojima raspolažemo. Za pristupe zasnovane na komponentama, neophodni su podaci koji govore o odnosu doza-odgovor za specifične toksične efekte pojedinačnih sastojaka. Kombinovani efekti smeša mogu biti aditivni, manji (antagonizam, inhibicija) ili veći od aditivnih (sinergizam, potencijacija) (EFSA, 2015; 2015a).

U okviru ekološke procene rizika od pesticida za potrebe registracije neretko se dešava da se toksična svojstva preparata izjednačavaju sa toksičnim svojstvima aktivne supstance, pa se procena rizika za aktivnu supstancu odnosi i na preparat, bez procene svojstava pomoćnih supstanci koje se koriste u postupku formulisanja preparata (Mesnage et al., 2014). Ovo je posebno značajno kad postoji veći broj različitih formulacija na bazi iste aktivne supstance, odnosno kad se u različitim formulacijama nalaze različite pomoćne supstance – koformulanti. Njihova toksična svojstva se mogu značajno razlikovati, što svakako utiče na toksična svojstva formulacija, tako da i njihovi efekti na neciljne vrste i životnu sredinu mogu biti veoma različiti. Jasno je da procena rizika koja se zasniva na aktivnoj supstanci nije dovoljno pouzdana ni preventivna kada su u pitanju efekti i toksičnost različito formulisanih sredstava za zaštitu bilja na bazi te supstance.

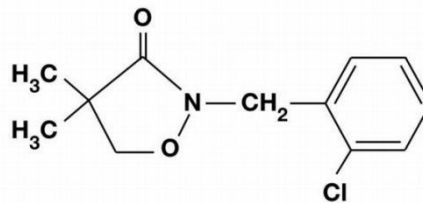


Sa druge strane, delovanje jedne ili više aktivnih ili pomoćnih supstanci je veoma teško predvideti; razlike u ispoljavanju pojedinačnih u odnosu na efekte smeša, kao i pojava potencijacije, antagonističkih, sinergističkih ili aditivnih efekata predmet su istraživanja brojnih autora (Kortenkamp et al., 2009; Beyer et al., 2014; Kortenkamp, 2014).

## 2.3. Klomazon

### 2.3.1. Opšta svojstva, ponašanje i sudbina i detekcija klomazona u vodama

Klomazon (IUPAC: 2-(2-hlorbenzil)-4,4-dimetil-1,2-oksazolidin-3-on; Slika 2) je selektivni, zemljišni herbicid iz grupe izoksazolidinona. Prvi put je registrovan za primenu 1986. godine (US EPA, 2007a). Nalazi se u Aneksu I Regulative 1107/2009 i u primeni je u 26 zemalja Evropske unije (EC, 2018), ali i u mnogim drugim zemljama širom sveta.



**Slika 2.** Strukturna formula klomazona.

Biljke ga usvajaju korenom i izdankom, a ksilemom se kreće naviše u ostale biljne delove (MacBean, 2012). Mehanizam delovanja klomazona je inhibicija obrazovanja izoprenoida, u koje spadaju fotosintetski pigmenti, karotenoidi, prenosioci elektrona (plastohinoni), tokoferol i hormoni (giberelin). Nakon aktivacije klomazona u ćeliji i prevođenja u 5-keto klomazon {2-[(2-hlorfenil)metil]-4,4-dimetil-3,5-izoksazolidindion} dolazi do inhibicije formiranja izopentenil pirofosfata (IPP) u okviru ne-mevalonskog ili metileritrol 4-fosfat (MEP) puta. Klomazon deluje na početnu reakciju između gliceraldehid 3-fosfata i piruvata, tako što inhibira aktivnost enzima deoksiksiluloze 5-fosfat sintetaze (DXS), koja zajedno sa deoksiksiluloza 5-fosfat reduktazom (DXR) katališe proces formiranja deoksiksiluloza 5-fosfata (DXP) i metileritrol 4-fosfata (MEP) (Ferhatoglu i Barrett, 2006). Spada u inhibitore biosinteze karotenoida (HRAC), a na osetljivim biljkama izaziva karakteristične simptome u vidu izbeljivanja listova (bele, žute ili svetlo zelene regije).

Klomazon se primenjuje za suzbijanje jednogodišnjih travnih (*Sorghum halepense*, *Digitaria sanguinalis*, *Setaria spp.*, *Echinochloa crus-galli*) i širokolisnih (*Stellaria media*, *Thlaspi arvense*, *Abutilon theophrasti*, *Sinapis arvensis*, *Chenopodium album*) korova u usevima soje, graška, paprike, kupusa, duvana, kukuruza, pirinča, krompira, tikve, dinje, lubenice, uljane repice, šećerne trske i pamuka (Zanella et al., 2000; US EPA, 2009; MacBean, 2012; Van Scoy i Tjeerdema, 2014). U Srbiji je registrovan za suzbijanje korova u usevima soje, uljane repice i duvana, a može se primeniti pre setve uz obaveznu inkorporaciju ili posle setve, a pre nicanja biljaka (Spasić, 2016). Prema podacima Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA, 2007b) godišnja potrošnja klomazona iznosi  $\approx 500.000$  kg, od čega se najveće količine primene u usevima pirinča (45%) i soje (25%).

Klomazon se odlikuje dobrom rastvorljivošću u vodi (1102 mg/l; 23 °C), a prema klasifikaciji SSLRC (eng. *Soil Survey and Land Research Centre*) pripada grupi umereno mobilnih supstanci u zemljištu (AERU, 2017). Na osnovu degradacije u zemljištu, vodi i sedimentu ( $DT_{50\text{zemljište}}=27-153$  d,  $DT_{50\text{voda}}=40-70$  d,  $DT_{50\text{sediment}}=1000$  d) prema Uredbi 1107/2009 klasifikuje se kao perzistentna supstanca (EFSA, 2007; EC, 2009; MacBean, 2012). U vodenom rastvoru je stabilan pri različitim pH vrednostima i veoma malo podleže fotohemijskoj degradaciji. Najznačajniji metaboliti detektovani u vodi su – N-[(2-hlorbenzil)]-3-hidroksi-2,2-dimetilpropanamid i N-[(2-hlorbenzil)-2-metil propanamid, oba manje toksična od klomazona (EFSA, 2007).

Dobra rastvorljivost i relativno niska vrednost podeonog koeficijenta oktanol/voda ( $K_{ow}=2,5$ ) ukazuju na moguću pojavu klomazona u podzemnim i površinskim vodama i potencijal za zagađenje voda za piće (Van Scoy i Tjeerdema, 2014), što je poslednjih godina veći broj istraživača i potvrdio (Zanella et al., 2002; Quayle et al., 2006; Marchesan et al., 2007; Becker et al., 2009; Saucó et al., 2010; Lazartigues et al., 2013; Hug et al., 2014).

Grupa autora iz Australije pratila je sadržaj, brzinu razgradnje i opadanje koncentracije klomazona do nivoa bezbednih za akvatičnu životnu sredinu u pirinčanim poljima (Quayle et al., 2006). Klomazon je primenjen na malim parcelama u količini od 0,5 l/ha (preparat Magister<sup>®</sup>, 480 g a.s. /l) i maksimalna izmerena koncentracija klomazona iznosila je 202  $\mu\text{g/l}$ . Četiri dana posle primene koncentracija je opala na 83  $\mu\text{g/l}$ , a

utvrđeno je da je nakon 18 dana koncentracija klomazona bila dovoljno niska da nije predstavljala rizik po akvatične organizme (3 µg/l). Takođe, u okviru istog istraživanja utvrđeno je da je DT<sub>50</sub> klomazona u vodi 7,2 dana.

Zanella et al. (2002) pratili su ostatke klomazona u rekama Brazila u oblastima gde je proizvodnja pirinča intenzivna. Klomazon je registrovan u čak 90% uzoraka iz reka koje su bile u blizini pirinčanih polja sa ukupnim sadržajem u intervalu 0,3-1,7 µg/l. Ostaci klomazona (0,2-0,9 µg/l) detektovani su u uzorcima čak i 130 dana nakon primene.

Na osnovu trogodišnjeg ispitivanja sadržaja klomazona, propanila i kvinkloraka u rekama Brazila (Rio Grande do Sur), najčešće detektovan herbicid bio je klomazon (reka Vacacaí 30% uzoraka, reka Vacacaí-Mirim 27% uzoraka), sa ukupnim sadržajem u intervalu 0,4-8,9 µg/l (Marchesan et al., 2007). Takođe, autori zapažaju da je povećanje sadržaja klomazona direktno povezano sa povećanjem količine padavina.

Becker et al. (2009) merili su sadržaj pesticida (imidaklopid, atrazin, simazin, hlorspirifos, flumetralin, klomazon i iprodion) u oblastima sa visokim i niskim antropogenim delovanjem. Poređenjem dobijenih rezultata utvrdili su da je u oblasti sa intenzivnim antropogenim delovanjem sadržaj klomazona bio statistički značajno veći (1,7 µg/l nasuprot 0,2 µg/l).

Osim u površinskim (slatkim) vodama, grupa autora ispitivala je prisustvo herbicida u priobalju Atlantika, u oblasti Urugvaja gde je intenzivna poljoprivredna proizvodnja (Sauco et al., 2010). U studiji prostorne distribucije klomazona analizirani su uzorci iz kanala Anreoni (1,5 km udaljeno od ušća), ušća kanala i Atlantskog okeana, i okeana (13 km od mesta ulivanja). Najveća izmerena koncentracija klomazona bila je u uzorcima iz kanala (0,4 µg/l), nešto manja bila je na samom ušću (0,2 µg/l), dok u morskoj vodi klomazon nije detektovan.

Praćenjem sadržaja sulfonil urea u površinskim vodama Kanade (Ontario), grupa autora je detektovala ostatke klomazona tokom dvogodišnjih ispitivanja (Struger et al., 2011), a sadržaj ostataka se kretao u intervalu 2,8-17,1 ng/l. Lazartigues et al. (2013) su analizom sedimenta pet jezera iz regiona severne Francuske utvrdili prisustvo 13 pesticida, među kojima se našao i klomazon. Takođe, ostaci klomazona registrovani su

u uzorcima otpadne vode fabrike za prečišćavanje otpadnih voda u Nemačkoj (1 mg/l) (Hug et al., 2014).

Zbog prisustva velikog broja toksičnih supstanci u površinskim vodama širom sveta javila se potreba za razvojem efikasne metode za njihovo prečišćavanje. Abramović et al. (2013) bavili su se metodom prečišćavanja vode zasnovanoj na fotokatalitičkoj degradaciji klomazona. Uzorci površinskih voda iz Dunava i Tise (Segedin), zatim podzemne vode iz Novog Sada (Štrand) i termalne vode (Segedin) izlagani su sunčevoj svetlosti (fotoliza), UV zračenju i sunčevoj svetlosti u prisustvu katalizatora TiO<sub>2</sub>. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da se fotokatalitička degradacija klomazona u prisustvu katalizatora pod dejstvom UV zračenja može uspešno koristiti za prečišćavanje vode. Smanjenje toksičnosti prečišćene vode potvrđeno je *in vitro* izlaganjem ćelija H-4-II-E (linija iz jetre pacova) i MRC-5 (linija iz pluća čoveka).

### **2.3.2. Formulacije klomazona**

Aktivne supstance se pre stavljanja u promet formulišu, odnosno transformišu u pogodan oblik za primenu. Ovako dobijeni proizvodi mogu biti mešavine jedne ili više aktivnih supstanci i manjeg ili većeg broja pomoćnih supstanci, čijom primenom se povećava efikasnost, stabilnost ali i niz drugih poželjnih svojstava formulacija, kao što su: smanjenje depozicije pesticida na neciljne površine, poboljšavanje zadržavanja na ciljnim organizmima, usvajanje i translokacija (Knowles, 2005; Gašić i Orešković, 2006; Arias-Estévez et al., 2008; Solomon et al., 2013). Formulacije pesticida predstavljaju fizičke smeše aktivnih i pomoćnih supstanci i mogu biti dizajnirane na različite načine. Fizička i hemijska svojstva pesticida uglavnom opredeljuju oblik formulacije, ali neke aktivne supstance imaju takva svojstva da mogu biti formulisane na više načina. Odabrani oblik formulacije je veoma važan jer utiče na biološke karakteristike preparata. Pokazalo se da formulacije kod kojih je aktivna supstanca prisutna u rastvornom obliku često imaju bolju biološku efikasnost (Seaman, 1990). Tokom vremena formulacije pesticida su se razvijale tako da su se poslednjih godina na tržištu pojavili različito formulisani proizvodi koji zadovoljavaju pooštrene zahteve regulatornih tela sa jedne i tržišta, sa druge strane.

Klomazon se u svetu primenjuje formulisan u obliku suspenzije kapsula (CS), koncentrata za emulziju (EC), kvašljivog praška (WP) i mikroemulzije (ME), dok je kod nas u primeni u obliku suspenzije kapsula (CS), koncentrata za emulziju (EC), emulzije ulje u vodi (EW) i mešavine koncentrovane suspenzije i suspenzije kapsula (ZC) (MacBean, 2012; Spasić, 2016). Sve navedene formulacije klomazona mogu se podeliti na bazi agregatnog stanja na tečne (EC, ME, CS, EW, ZC) i čvrste (WP).

Koncentrati za emulzije (EC) predstavljaju tečne formulacije starije generacije, koje sadrže aktivnu supstancu, organski rastvarač i jedan ili više emulgatora; primenjuju se nakon mešanja sa vodom pri čemu nastaju emulzije ulja u vodi. To su jednostavni sistemi koji imaju brojne prednosti zbog kojih su veoma popularni i nalaze široku primenu. Sa druge strane, suspenzije kapsula (CS) predstavljaju formulacije novije generacije i spadaju u sisteme sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance. Formulirane su kao stabilne suspenzije kapsula najčešće u vodi, a dizajnirane su tako da je aktivna supstanca locirana unutar kapsule i da difunduje kroz zid kapsule u funkciji vremena. Kontrolisano otpuštanje aktivne supstance podrazumeva njeno oslobađanje u određenoj koncentraciji i trajanju dok se ne postigne željeni efekat. Kada se radi o starim tipovima formulacija, kao što su koncentrati za emulzije, onda obično inicijalni nivo aktivne supstance koji se oslobađa pri primeni, značajno prevazilazi minimalnu koncentraciju potrebnu za postizanje željenog efekta. Kod formulacija sa kontrolisanim otpuštanjem inicijalni nivo aktivne supstance se podešava tako da oslobođena koncentracija aktivne supstance bude nešto iznad minimalne koncentracije potrebne za ispoljavanje željenog efekta, a da deluje do kraja željenog perioda efikasnosti (Tsuji, 1987). Suspenzije kapsula predstavljaju veoma kompleksne sisteme za čije je formulisanje potreban veliki broj pomoćnih supstanci. Pomoćne supstance mogu biti biološki ili hemijski aktivne supstance, a ponekad mogu dovesti do povećanja toksičnosti formuliranih preparata za neciljne organizme, u odnosu na čiste aktivne supstance (Jarvinen i Tanner, 1982; Howe et al., 2004; Bringolf et al., 2007; Beggel et al., 2010; Puglis i Boone, 2011; Demetrio et al., 2012; Mesnage et al., 2014). Negativno dejstvo na ekosisteme i životnu sredinu pomoćne supstance mogu ispoljiti direktno ili posredno prolongiranjem vremena delovanja i degradacije pesticida (van der Werf, 1996; Cox i Sorgan, 2006). Dakle, prilikom izbora pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav formulacija mora da se vodi računa o njihovim biološkim, toksikološkim, kao i o

fizičko hemijskim svojstvima (Gašić i Elezović, 1993). Ipak, za potrebe registracije pesticida ispituju se svojstva aktivnih supstanci dok se uticaj pomoćnih supstanci, ili njihova interakcija sa aktivnom supstancom tek od nedavno uzimaju u obzir.

### 2.3.3. Uticaj klomazona na akvatične organizme

Osim za potrebe zakonske regulative (DAR, 2006), uticaj klomazona ispitan je na akvatičnim primarnim producentima (alga - *Raphidocelis subcapitata*, makrofite - *Lemna* sp., *Azolla caroliniana*), akvatičnim beskičmenjacima (*Chironomus tepperi* i *Daphnia similis*) i ribama adultnog stadijuma (*Cyprinus carpio*, *Rhamdia quelen* i *Megaleporinus obtusidens* – stari naziv *Leporinus obtusidens*). Iako je ispitan uticaj klomazona na flotantne akvatične makrofite, testovi na ukorenjenim makrofitama su u potpunosti izostali. Takođe, ispitivanja embriotoksičnosti i morfoloških promena kod riba i vodozemaca, kao i *in vitro* ispitivanja nisu rađena.

Prema Pravilniku o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje UN (Sl. glasnik RS, 52/17), klomazon je klasifikovan i obeležen kao veoma toksičan po živi svet u vodi sa dugotrajnim posledicama (sa odgovarajućim obaveštenjima o opasnosti vezanim za akutne i hronične efekte – H400 i H410). Najosetljiviji ispitivani organizam je dijatomeja *Navicula pelliculosa* sa  $EC_{50}=0,136$  mg/l (NOEC=0,05 mg/l), dok je vrsta *R. subcapitata* (stari nazivi *Selenastrum capricornutum* i *Pseudokirchneriella subcapitata*) ispoljila manju osetljivost ( $EC_{50}=2,0$  mg/l). Iako je ukazano na nedostatke vrsta roda *Lemna* kao reprezentativnih predstavnika za sve akvatične makrofite, ispitivanja toksičnosti klomazona, za potrebe registracije, urađena su samo na ovoj vrsti (*Lemna gibba*  $EC_{50}=34,0$  mg/l). Na vrstu *Daphnia magna* klomazon deluje štetno ( $IC_{50}=12,7$  mg/l), ali vrednost NOEC za reprodukciju pri hroničnoj ekspoziciji iznosi 2,2 mg/l. Račić *Mysidopsis bahia* ispoljio je veću osetljivost od *D. magna*; klomazon na ovu vrstu deluje veoma toksično sa  $EC_{50}=0,57$  mg/l. Akutna toksičnost klomazona za kalifornijsku pastrmku (*Onchorhynchus mykiss*) je 15,5 mg/l, dok NOEC vrednosti pri akutnoj (96 h) i produženoj ekspoziciji (21 dan) iznose 1,0 i 2,3 mg/l. Prema podacima Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA, 2007a) klomazon je štetan za slatkovodne ribe (*O. mykiss*  $LC_{50}=19$  mg/l; *Lepomis macrochirus*  $LC_{50}=34$  mg/l) i akvatične

makrofite (*Lemna minor*  $EC_{50}=55,6$  mg/l; *L. gibba*  $EC_{50}=35,0$  mg/l), a toksičan za slatkovodne beskičmenjake (*D. magna*  $LC_{50}=5,2$  mg/l).

Ispitivanjem toksičnosti herbicida sa različitim mehanizmima delovanja na vrstu *Lemna paucicostata*, Michel et al. (2004) navode da je klomazon štetan za ovu vrstu, a  $EC_{50}$  iznosi 126,1  $\mu$ M (30,2 mg/l).

Silva et al. (2012) ispitivali su uticaj herbicida na akvatičnu makrofitu *A. caroliniana*. Nakon sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama klomazona utvrđena je  $EC_{50}$  (129,6 mg/l) i izveden zaključak da klomazon ne deluje toksično na ovu vrstu.

Ista grupa autora postavila je komparativnu studiju osetljivosti dve vrste akvatičnih makrofita prema preparatu klomazona formulisanom u obliku koncentrovane emulzije (Gamit<sup>®</sup> 500 CE) (Della Vechia et al., 2016). Poređenje srednjih efektivnih koncentracija za vrstu *L. minor* ( $EC_{50}=10,2$  mg/l) i *A. caroliniana* ( $EC_{50}>100$  mg/l) ukazano je na razlike u osetljivosti ove dve vrste, kao i to da je *L. minor* pogodnija vrsta kao bioindikator zagađenja vodene sredine.

Ispitivanjem uticaja klomazona na neciljne akvatične beskičmenjake (*C. tepperi*) u poljskim i laboratorijskim uslovima bavili su se Burdett et al. (2001). Klomazon u koncentraciji 0,5 mg/l (Command<sup>®</sup> 480 EC; FMC International A.G.) nije doveo do promena u razviću jedinki ili dužini krila, ali je registrovano blago kašnjenje u izletanju. U uslovima polja, pri izlaganju koncentracijama klomazona relevantnim za primenu, nije registrovan negativan uticaj na *C. tepperi*, ali je uočeno smanjenje mase makrofita.

Jonsson et al. (1995) ispitivali su toksičnost klomazona za algu *R. subcapitata*, makrofitu *Lemna valdiviana* i kladoceru *Daphnia similis*. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je najosetljivija bila alga ( $EC_{50}=11,2$  mg/l), zatim kladocera ( $EC_{50}=13,8$  mg/l), dok je akvatična makrofitu bila najmanje osetljiva ( $EC_{50}=31,7$  mg/l).

Toksičnost klomazona za akvatične organizme najčešće je ispitivana na ribama. Istraživanja su bila usmerena na ispitivanje toksičnosti i metaboličkih poremećaja usled izlaganja preparatu Gamit<sup>®</sup> 500 CE. Gotovo sve studije urađene su za tri vrste: *C. carpio*, *R. quelen* i *M. obtusidens*.

Veći broj istraživača bavio se ispitivanjem uticaja klomazona na metaboličke procese i opravak soma (*R. quelen*) (dos Santos Miron et al., 2005; Crestani et al., 2007; Becker et al., 2009; Menezes et al., 2011). U studiji ispitivanja uticaja klomazona, kvinkloraka i metsulfurona na smrtnost i aktivnost acetilholin esteraze (AChE) vrste *R. quelen*, klomazon se izdvojio kao najtoksičniji od tri ispitivane supstance ( $LC_{50}=7,3$  mg/l). Takođe, utvrđeno je smanjenje aktivnosti AChE u mozgu za 83%, a u mišićnom tkivu za čak 89% (dos Santos Miron et al., 2005). Uticaj izlaganja jedinki *R. quelen* različitim koncentracijama klomazona relevantnim za pirinčana polja (0,5 i 1 mg/l) u trajanju od 192 časa (sa oporavkom od 192 h) pratili su Crestani et al. (2006; 2007). U moždanom i mišićnom tkivu registrovano je smanjenje aktivnosti AChE, a u jetri redukcija indeksa lipidne peroksidacije (meren kao TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) i aktivnosti katalaze (CAT). Takođe, utvrđena su odstupanja nivoa glikogena i glukoze u jetri i mišićnom tkivu, i povećanje sadržaja alanin transferaze (ALT) i aspartat transferaze (AST) u jetri i plazmi. Ipak, nakon oporavka u trajanju od 96 časova za sve biohemijske parametre utvrđen je oporavak, izuzev ALT i AST u jetri. Takođe, utvrđene su i reverzibilne promene na jetri (vakuolizacija hepatocita) na osnovu kojih su autori zaključili da klomazon može značajno narušiti dobrobit riba, čineći ih osetljivim i prema drugim stresorima u životnoj sredini. Menezes et al. (2011) takođe su, nakon utvrđivanja oksidativnog stresa i poremećaja metaboličkih parametara (TBARS, GST, SOD) registrovali oporavak jedinki vrste *R. quelen*.

Becker et al. (2009) izlagali su jedinke *R. quelen* rečnoj vodi poreklom iz dve oblasti koje se razlikuju u intenzitetu antropogenog uticaja, u trajanju od 30 dana. Analizom vode iz te dve oblasti utvrđen je značajno veći sadržaj klomazona i imidakloprida u oblastima sa intenzivnom poljoprivredom. Kod riba izlaganih vodi iz oblasti intenzivne poljoprivredne proizvodnje utvrđeni su poremećaji u metaboličkoj aktivnosti ćelija – sadržaj glukoze bio je smanjen u plazmi, glikogen je bio povećan u jetri, a smanjen u bubrezima. Takođe, kod ovih jedinki je utvrđen povećan sadržaj mlečne kiseline u mišićima, što može da bude pokazatelj remećenja metaboličkog trošenja energije.

Uticaj klomazona na hematološke i histopatološke promene kod vrste *R. quelen*, u oblastima sa različitim antropogenim pritiskom (oblast intenzivne nasuprot oblasti bez poljoprivredne proizvodnje), ispitivali su i Brum et al. (2014). Kod jedinki iz obe oblasti



registrovana je pojava histopatoloških promena na jetri i škragama, ali sa malim razlikama u učestalosti pojavljivanja promena. Nivo monocita je bio značajno povećan kod jedinki iz oblasti sa intenzivnom poljoprivredom, dok se ostali hematološki nalazi nisu značajno razlikovali za jedinke iz dve oblasti.

Slična studija o uticaju klomazona na oksidativni stres i biohemijske parametre urađena je i sa vrstom *M. obtusidens* (Moraes et al., 2007; dos Santos Miron et al., 2008). Moraes et al. (2007) pokazali su da izlaganje klomazonu u koncentraciji 0,5 mg/l dovodi do oksidativnog stresa, poremećaja aktivnosti AChE (smanjenje u moždanom, a povećanje u mišićnom tkivu), povećanje TBARS i smanjenje aktivnosti CAT. U ispitivanjima koja su sprovedi dos Santos Miron et al. (2008) potvrđena je pojava oksidativnog stresa, ali i delimičan oporavak do kojeg dolazi 192 h nakon uklanjanja stresora. Za razliku od Moraes et al. (2007), u ovom istraživanju aktivnost AChE bila je redukovana u svim tkivima (moždano, mišićno i srčano) i nivo TBARS u jetri i mišićnom tkivu bio je značajno umanjen.

Izlaganjem šarana (*C. carpio*) klomazonu u koncentraciji 0,5 mg/l registrovane su razlike metaboličkih parametara kod dva tipa izlaganja – u laboratorijskim i uslovima polja (Cattaneo et al., 2012). Jedinke izlagane u laboratorijskim uslovima ispoljile su smanjenu aktivnost AChE nakon sedmodnevnog izlaganja, dok kod jedinki izlaganih u uslovima polja promena nije bilo. U uslovima polja klomazon je bio prisutan u vodi do 14 dana posle primene, a metaboličke promene (smanjenje aktivnosti CAT i GST, i povećanje sadržaja TBARS) ukazale su na oksidativni stres i dugoročne posledice izlaganja klomazonu. Menezes et al. (2014) su takođe ispitivali uticaj klomazona na šarana, ali samo u laboratorijskim uslovima. Nakon sedmodnevne izloženosti jedinki različitim koncentracijama klomazona (2,5; 5; 10; 20 mg/l) registrovana je smanjena aktivnosti  $\delta$ -aminolevulinske kiseline ( $\delta$ -ALA-D) u škragama, povećana sinteza proteina u jetri, i povećan nivo glikogena u jetri, a smanjen u mišićnom tkivu. Ova studija potvrdila je prethodne tvrdnje da izloženost riba klomazonu vodi oksidativnom stresu.

Pereira et al. (2013) ispitivali su uticaj klomazona formulisanog u obliku koncentrovane emulzije (Gamit<sup>®</sup> CE) na slatkovodnu vrstu *Prochilodus lineatus*. Jedinke su izlagane klomazonu u koncentracijama 1, 5 i 10 mg/l, u trajanju od 96 h. Praćeni su hematološki (hemoglobin, hematokrit, crvena krvna zrnca, ukupni telesni hemoglobin) i biohemijski

parametri [AChE, glutation S-transferaza (GST), glutation peroksidaza (GPX) i CAT]. Hematološki parametri ukazali su na stanje slično anemiji, a biohemijski na oksidativni stres i neurotoksični potencijal klomazona.

Paralelnu studiju uticaja klomazona na oksidativni stres kod vrsta *C. carpio* i *R. quelen*, i uloge ishrane na bazi difenil diselenida na redukciju istog, ispitivali su Menezes et al. (2013). Jedinke su u toku 192 časa bile izlagane klomazonu u koncentraciji od 1 mg/l (Gamit® CE), nakon čega je pojava oksidativnog stresa utvrđena kod vrste *R. quelen*, ali ne i kod *C. carpio*. Ipak, kod grupe jedinki kojima je u ishranu bio uključen difenil diselenid registrovan je ublažen efekat klomazona, odnosno parametri oksidativnog stresa (TBARS, protein karbonil, tiol, GPX i askorbinska kiselina) statistički su se značajno razlikovali od grupe sa klomazonom bez difenil diselenid. Slično istraživanje izveli su i Murussi et al. (2015). Dokazali su da je aktivnost AChE kod jedinki *C. carpio* bila povećana u mišićnom tkivu, dok je kod jedinki *R. quelen* povećanje registrovano i u moždanom tkivu. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) kod *C. carpio* opala je, dok je kod *R. quelen* bila značajno povećana. Uticaj klomazona na sadržaj TBARS u jetri bio je ujednačen, i kod obe vrste je registrovana značajna redukcija. U saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima, i u ovoj studiji je veću osetljivost ispoljila vrsta *R. quelen*.

Ispitivanjem uticaja tehničke supstance klomazon i preparata formulisanog na bazi ove aktivne supstance sa nanočesticama kao nosačem (hitozan-alignat) na jetru punoglavca vrste *Lithobates catesbeianus* bavili su se de Oliveira et al. (2016). Klomazon, primenjen u obliku tehničke supstance i preparata (0,5 mg/l), doveo je do lipidoze – nakupljanja lipida u citoplazmi hepatocita.

#### **2.4. Osobine test organizama**

Ekotoksikologija i procena rizika za životnu sredinu najvećim delom su usmerene na ispitivanje uticaja hemikalija na životinje, naročito na kičmenjake. Sa druge strane, relativno malo pažnje povećuje se biljakama koje, kao primarni producenti (niži trofički nivo) ekosistema čine njegov neodvojiv deo (Walker, 2008). Osim što su izvor hrane za mnoge vrste, biljke služe i kao stanište i zaklon za nemali broj vrsta, pa njihovo uklanjanje iz akvatičnih sistema posredno utiče i na životinje (Cedergreen et al., 2004; Rosenkrantz et al., 2013; Solomon et al., 2013). Nakon uginuća biljaka, usled raspada

organske materije, može doći do značajnog opadanja nivoa kiseonika i ugrožavanja opstanka drugih vrsta. Ovakav indirektan uticaj na druge vrste posledica je direktnog uticaja na biljke, koji se najčešće dešava usled ciljnog suzbijanja neželjenih vrsta u površinskim vodama (Solomon et al., 2013).

#### **2.4.1. Vrste roda *Lemna***

Vrste iz porodice Lemnaceae su monokotiledone, flotantne, neukorenjene, vaskularne makrofite koje naseljavaju tropsku i umerenu zonu. Porodica obuhvata pet rodova (*Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia*, i *Wolffiella*) i ukupno broji 37 vrsta širom sveta (Lemon i Posluszany, 2000; Les et al., 2002; Keppeler, 2009).

*L. minor* L., sočivica je sitna biljka, koja se odlikuje kratkim generacijskim periodom i specifičnom morfologijom. Telo biljke (engleski *frond*), a pod tim se podrazumeva talus, ima 3-5 nerava i nije jasno diferencirano na list i stablo (Landolt, 1975; Lemon i Posluszany, 2000; Keppeler, 2009). Najpre se telo biljke izjednačavalo sa listom, međutim kako list nema sposobnost razmnožavanja i obrazovanja pupoljaka ova hipoteza je odbačena. Zastupana je i teorija da je telo biljke zapravo stablo, međutim kasnije je utvrđeno da su u bazalnom delu tela biljke ćelije stabla, a distalno ćelije lista. Za razliku od nekih flotantnih hidrofita koje imaju jako razvijen korenov sistem, vrste roda *Lemna* imaju redukovani korenov sistem sa samo jednim korenčićem (Landolt, 1986 – cit. Lemon i Posluszany, 2000; Stevanović i Janković, 2001). Obrazuju kolonije koje se sastoje od dve ili više svetlo zelenih jedinki, veličine 2-4 mm (Wang, 1990).

Sočivica se odlikuje gotovo isključivim vegetativnim razmnožavanjem, sa superprodukcijom mladih jedinki, dok je generativno razmnožavanje retko. Ove biljke imaju dve lateralne reproduktivne kesice/džepa koje se radijalno pružaju iz čvora (centralni deo), a u kojima se obrazuju vegetativni organi za razmnožavanje. U kesicama roditeljske biljke se obrazuju vegetativni pupoljci koji rastu u novu jedinku. Nove jedinice ostaju vezane za roditeljsku biljku neko vreme, a onda se odvajaju postajući nezavisne jedinice, iste forme, strukture i sposobnosti za razmnožavanje kao roditeljska biljka (Landolt, 1986 – cit. Lemon i Posluszany, 2000).

Naseljavaju slatkovodne i brakične sporotekuće i stajaće vode bogate hranljivim materijama tropske do umerene zone. Zbog svoje široke rasprostranjenosti (Afrika,

Azija, Evropa, Severna Amerika) možemo reći da je kosmopolitska vrsta. Optimum rasta postiže pri temperaturi u intervalu 20-28 °C, u blago kiselim do neutralnim vodama (pH 5,0-7,5) (Landolt, 1975; van der Heide et al., 2006). Prema navodima van der Heide et al. (2006) *L. minor* se može naći u vodama sa temperaturom od 6,2 °C do preko 33 °C. Predstavlja važan izvor hrane većem broju vrsta riba i ptica, a osim toga stanište je za akvatične beskičmenjake.

Zbog visokog reproduktivnog potencijala brzo osvajaju nove vode. Vreme potrebno da se broj jedinki duplira je u intervalu 1,3-2,8 dana. U eutrofnim vodama jezera i bara jedinke formiraju gust sklop (Wang, 1990; Driever et al., 2005; Parlak i Yilmaz, 2013). U takvim sistemima biodiverzitet je obično mali, jer voda postaje anoksična za ribe i makrofaunu (Driever et al., 2005). Zabeleženi su i pomori riba usled prenamnoženja sočivice i algi u ekosistemima (Wang, 1990).

*L. minor* je standardni test organizam za ispitivanje uticaja hemikalija na akvatične makrofite (OECD, 2006; Belgers et al., 2007), a prema Uredbi 1107/2009 (EC, 2009) ukoliko je sredstvo za zaštitu bilja herbicid, regulator rasta ili supstanca koja ispoljava herbicidnu aktivnost obavezno je uraditi testiranje sa ovom vrstom. Pogodna je kao test organizam zbog male veličine, brzog vegetativnog razmnožavanja, lakoće dobijanja genetički uniformnih kolonija i velike osetljivosti prema zagađujućim supstancama (de Kruijf et al., 1988; Dalton et al., 2013), posebno na isparljive hemikalije koje se zadržavaju na granici dve faze (voda-vazduh). Uprkos pretežno vegetativnom razmnožavanju utvrđene su značajne genotipske i fenotipske varijacije populacija *L. minor* (de Kruijf et al., 1988; Wang, 1990; Dalton et al., 2013). Ove razlike, dalje, mogu biti ograničavajući faktor kod ekstrapolacije laboratorijskih na poljske uslove u okviru ekološke procene rizika. Takođe, često se postavljalo pitanje da li je ova vrsta reprezentativan predstavnik za sve akvatične makrofite – flotantne, emerzne i submerzne.

Pregledom efekata herbicida na alge i akvatične makrofite na osnovu laboratorijskih i poljskih ogleda utvrđeno je da su, u najvećem broju slučajeva, podaci iz laboratorijskih uslova izvedeni na algama i vrstama roda *Lemna* (korigovane faktorom sigurnosti 10) dovoljno prediktivne za efekte utvrđene u uslovima polja (Brock i Van den Brink, 2000 – cit. Knauer et al., 2006). Međutim, u određenom broju slučajeva (npr. auksin

simulatori) ova vrsta nije dovoljno osetljiva, pa se preporučuje uključivanje još neke vrste u procenu rizika. Cedergreen et al. (2004) navode da vrste roda *Lemna* kao monokotile neće ispoljiti isti stepen osetljivosti prema herbicima koji se koriste za suzbijanje dikotiledonih biljaka, a kojih je u zaštiti bilja veliki broj. Manja osetljivost ove vrste objašnjava se i time što je ova vrsta flotanatna i kao takva izložena je delovanju herbicida samo dorzalnom stranom tela, dok je površina izloženosti emerznih i submerznih jedinki daleko veća (Knauer et al., 2006; Tunić et al., 2015). Pored načina i dužine izloženosti i usvajanja supstance, razlike u osetljivosti pripisuju se još i razlikama u dužini generacijskog vremena, koje je značajno duže kod submerznih, ukorenjenih makrofita, zatim kratkom životnom ciklusu i stopi oporavka, kao i rastu u kolonijama (Hanson et al., 2003 - cit. Tunić et al., 2015). Usled nedostatka standardizovanih test metoda ukorenjene submerzne akvatične makrofite retko su bile korišćene za potrebe ispitivanja. Sa druge strane, ove vrste su veoma važan deo akvatičnih ekosistema i imaju značajnu ulogu u kruženju hranljivih supstanci, fizičkim procesima stabilizacije sedimenta, hrana su određenom broju organizama i stanište brojnim vrstama akvatičnih beskičmenjaka i perifitona (Hanson et al., 2003; Belgers et al., 2007; Burešova et al., 2013; Tunić et al., 2015).

#### **2.4.2. Vrste roda *Myriophyllum***

Korišćenje ukorenjenih vrsta makrofita za ispitivanje uticaja pesticida ima prednost u odnosu na testove izvedene sa vrstama roda *Lemna*, jer omogućavaju merenje ekološki relevantnijih parametara, kao što su npr. broj korenčića, dužina korena, broj bočnih izdanaka, dužina glavnog izdanka. Kao dopunska vrsta predložene su vrste roda *Myriophyllum* jer su veoma osetljive prema supstancama čiji je mehanizam delovanja inhibicija fotosinteze (Knauer et al., 2006; Teodorović et al., 2012). Članovi međunarodnog udruženja za ekotoksikologiju i hemiju (SETAC - *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) i savetodavne grupe za akvatične makrofite (AMEG – *Advisory Group in Aquatic Macrophyte Ecotoxicology*), kao i brojni autori (Knauer et al., 2008; Maltby et al., 2010; Tunić et al., 2015) zbog osetljivosti, ponovljivosti i pouzdanosti predlažu vrstu *Myriophyllum aquaticum* kao dopunski test model za procenu rizika od herbicida i regulatora rasta.

Rod *Myriophyllum* pripada porodici Haloragaceae, veoma je bogat i broji preko 60 vrsta (Hussner et al., 2009; Moody i Les, 2010; Hussner et al., 2012). *Myriophyllum* sp. su dikotiledone, submerzne ili emerzne, ukorenjene makrofite širokog areala rasprostranjenja (Moody i Les, 2010).

*M. aquaticum* (Velloso) Verdcourt je emerzna vrsta, najvećim delom je uronjena u vodu, dok se izdanici nalaze iznad površine vode i mogu rasti do 0,4 m iznad vode. Stabljike su u osnovi debljine 4-5 mm, člankovite i duge do 2 m. Po 4-6 perastih listova raspoređeno je na nodusu, a između submerznih i emerznih listova utvrđen je dimorfizam. Submerzni listovi su veće površine (35-40 mm dugi i 8-12 mm široki) i sastoje se iz 25-30 resa dužine do 7 mm. Emerzni listovi su svetlije zeleni, uspravni pri vrhu i malo manji od submerznih (25-35 mm dugi i 7-8 mm široki) sa 24-36 resa dugih 4,5-5,5 mm (Hussner et al., 2012). Adventivni korenovi obično rastu iz nodusa koji su bliže sedimentu, ali je kod puzećih jedinki utvrđena sposobnost puštanja korenja iz svih nodusa na stablu. Rast korena zavisi od dubine vode u kojoj se nalazi. Pri isušivanju tla intenzivan je verikalni rast korena (>1 cm/dan), dok je u optimalnim vodnim uslovima rast korena usmeren horizontalno. Gustina korena proporcionalna je, a dubina obrnuto proporcionalna, sadržaju dostupnih hranljivih materija (Hussner et al., 2009; Wersal i Madsen, 2011).

*M. aquaticum* je dvodoma vrsta, međutim čak i u nativnim područjima muške jedinke obično nisu prisutne, a plodonošenje je veoma retko (Orchard, 1979 – cit. Hussner et al., 2012). U introdukovanim oblastima prisutne su samo ženske biljke i širi se isključivo vegetativnim putem, ožiljavanjem fragmenata stabla, ili rizomima (You et al., 2013). Imaju visok stepen regeneracije, koja je moguća čak i iz jednog lista u roku od par nedelja, mada je najčešća iz fragmenta stabla sa nodusom (Guillarmod, 1979; Hussner, 2009; Hussner et al., 2012). Fragmentisani delovi i vegetativni organi za razmnožavanje mogu biti raznošeni vodom, usvajajući hranljive materije adventivnim korenovima, dok biljka ne dođe u kontakt sa sedimentom i ukoreni se (You et al., 2013).

*M. aquaticum* je autohtona biljna vrsta centralnog dela Južne Amerike. U Evropu i SAD je introdukovana krajem 19-og ili početkom 20-og veka kao ukrasna biljka, odakle se dalje širi u Afriku, Aziju, Novi Zeland i Australiju. Naseljava delove sa nižom nadmorskom visinom, mada je u Brazilu registrovana na visini od 1900 m, a u Peru

3250 m (Hussner et al., 2009; 2012; You et al., 2013; Hussner et al., 2017). Ova vrsta naseljava sporotekuće ili stajaće vode (jezera, kanali, bare, potoci), bogate hranljivim materijama. Preferira vodu dubine do 1 m, ali raste i u vodama dubine veće od 2 m. U plitkim vodama se ukorenjava i živi kao emerzna, dok u dubokim vodama, bogatim organskim supstancama, može preživeti kao flotantna vrsta. Nakon unošenja u nove oblasti veoma brzo ih osvaja, zahvaljujući vegetativnom razmnožavanju, visokoj regenerativnoj sposobnosti i eurivalentnosti prema nivou vode (Hussner et al., 2009; Wersal i Madsen, 2011). Ukoliko su uslovi povoljni može obrazovati gustu mrežu izdanaka po površini, što dovodi do zasenjivanja i redukcije sadržaja kiseonika do manje od 1 mg/l (Hussner, 2009). Takođe, utvrđeno je da deo biljaka može ostati vitalan i nekoliko meseci nakon mehaničkog uklanjanja, ukoliko su biljke ostavljene na gomilama pored reke (Guillarmod, 1979).

Optimum rasta postiže u vodama temperature u opsegu 16-23 °C (<http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=401>), ali se može naći u vodama sa temperaturom 2-30 °C (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/34939#tab1-nav>). Preferira tople vode blago bazne reakcije (pH=7-9), ali može preživeti kratkotrajne hladnoće. Prezimljava ili kao submerzna jedinka ili u obliku rizoma u sedimentu, i može preživeti ispod leda do šest nedelja (Hussner, 2009; Hussner et al., 2012). Sa rastom počinje kad temperatura pređe 8 °C, a pored temperature vode veliki uticaj na rast ima osvetljenost (Wersal et al., 2011).

#### **2.4.3. Vrste roda *Daphnia***

Ispitivanje uticaja pesticida na akvatične beskičmenjake integralni je deo procesa registracije pesticida, kao i procene rizika od njihove upotrebe. *Daphnia* – vodena buva, je rod planktonskih račića koji pripada klasi Branchiopoda (red Cladocera, infrared Anomopoda) i familiji Daphniidae, sa preko 100 vrsta širom sveta. Naziv vodena buva nastao je kao posledica njihovog karakterističnog plivanja, koje nalikuje skoku buve (Ebert, 2005; Smirnov, 2014a). Za potrebe ekotoksikoloških ispitivanja, vrste roda *Daphnia* se veoma često koriste kao test organizmi, a najčešće korišćena vrsta je *D. magna* (Straus, 1820).

Telo im je obloženo nekalcifikovanim hitinskim oklopom – karapaksom. Imaju deset pari dodataka: antene, antenule, maksile, madibule i pet udova koji čine aparat za hranjenje i disanje. Antene im služe za kretanje, a na kraju abdomena nalazi se par seta. Odrasle jedinke su veličine od 1 do 5 mm. Prisutan je polni dimorfizam; mužjaci su sitniji od ženki, a razlikuju se još po dužim antenulama, drugačijem post-abdomenu i prvom paru nogu na kojem je kuka koja im služi da se zakače za ženku (Ebert, 2005).

Životni ciklus karakteriše aseksualna reprodukcija i obrazovanje partenogenetskih jaja koja se nalaze u jajčanoj kesi ispod karapaksa, na dorzalnoj strani ženke. Jaja se izležu, neonate ostaju u komori, a nakon tri dana majka odbacuje egzokelet (presvlači se) i oslobađa mlade jedinke. U toku života *D. magna* može da proizvede i do 100 neonata. Pored aseksualne reprodukcije, u nepovoljnim uslovima jedinke prelaze na biseksualni tip reprodukcije. Partenogenetske ženke rađaju mužjake i ženke, a zatim dolazi do oplodnje jaja i obrazovanja efipija. Efipije su melanizovane kapsule koje sadrže par mirujućih jaja i štite ih od nepovoljnih uticaja spoljašnje sredine – isušivanja, smrzavanja i prolaska kroz digestivni trakt predatora. Obrazovanje efipija ima sezonski karakter, a jaja mogu ostati dormantna duži niz godina. Faktori koji utiču na pojavu biseksualne reprodukcije su: fotoperiod, dostupnost hrane i gustina populacije (Kleiven et al., 1992; Alekseev i Lampert, 2001; Ebert, 2005; Ignace et al., 2011; Smirnov, 2014b). Efipije *D. magna* imaju bodlje duž dorzalne ivice i dve duge niti (Hanski i Ranta, 1983), a njihova uloga u raznošenju i kolonizaciji novih voda veoma je bitna.

Vrste roda *Daphnia* nastanjuju gotovo sve slatkovodne sisteme – od velikih jezera, do malih, privremenih bazena nastalih zadržavanjem vode. Kvalitet vode koju nastanjuju može varirati. Za rast i razvoj vrste *D. magna* optimalna je neutralna do blago bazna reakcija vode (pH=7,2-8,0), ali većina vrsta može opstati i pri pH 6,5-9,5. Odgovara im salinitet do 5% (1,5 g/l), međutim *D. magna* toleriše i brakične vode slanoće 6,0 g/l (Ebert, 2005). Rast i sazrevanje neometano je u okviru temperaturnog opsega 11-30 °C. Pri temperaturi 35 °C *D. magna* uginjava, dok je donja granica tolerancije približna 0 °C (Smirnov, 2014c). Dužina života, takođe je usko povezana sa temperaturom vode. Tako, *D. magna* pri temperaturi 28 °C živi 25 dana, međutim kada temperatura padne na 18 ili 10 °C živi 42, odnosno 88 dana (Smirnov, 2014d).



Hrane se algama i bakterijama veličine 10-50  $\mu\text{m}$ , filtrirajući vodu pomoću filopoda (phylopods) – pljosnatih, listolikih nogu. Za razvoj im je potreban unos polinezasićenih masnih kiselina i sterola, stoga je u ishrani najznačajniji fitoplankton. Boja im zavisi od dostupnosti i izvora hrane; ako se hrane algama žućkasto-zelenkaste su, a ako im je ishrana bakterijska boja im je bela do ružičasta. Predstavljaju jednu od osnovnih karika u lancu ishrane akvatičnih ekosistema, primarni su konzumenti i regulatori brojnosti fitoplanktona i bakterija, i hrana za veliki broj vrsta riba (Crosby i Tucker, 1966; Ebert, 2005; Freese i Martin-Creuzburg, 2013). Takođe, važno je pomenuti i da obogaćuju vodu organskom materijom (Smirnov, 2014d).

#### **2.4.4. Embrioni vrste *Danio rerio***

Pored ispitivanja na akvatičnim beskičmenjacima, testovi akutne toksičnosti sa ribama neodvojivi su deo identifikacije opasnosti i procene rizika u procesu registracije pesticida i biocida (Scholz et al., 2009; Braunbeck et al., 2015). Klasični testovi na ribama kojima se meri letalni efekat, delovanje na reprodukciju i porast jedinki nisu dovoljno osetljivi kada je praćenje drugih važnih fizioloških funkcija riba u pitanju, pa brojni ekotoksikološki efekti mogu biti potcenjeni korišćenjem samo klasičnih testova (Weicher et al., 2017). Zbog toga, ali i zbog etičkog aspekta, smanjenja troškova i smanjenja zagađenja velikom količinom kontaminirane vode koja se koristi u klasičnim testovima, velika je potreba za razvijanjem novih, alternativnih metoda. U tom cilju godinama unazad radi se na iznalaženju strategije i metoda koje će omogućiti uključivanje *in vitro* ćelijskih i/ili embrio ispitivanja toksičnosti za predviđanje akutnih efekata (Nagel, 2001; Scholz et al., 2009).

Testovi embriotoksičnosti (FET – *eng. Fish Embryo Test*) u poslednjoj deceniji postali su značajan instrument procene akutne toksičnosti hemikalija i otpadnih voda. Inicijalno ovaj test zamišljen je kao ogled 48-časovnog izlaganja embriona u okviru koga bi se pratila smrtnost (koagulacija, nedostatak somita, otkucanja srca, neodvajanje repa i ostale promene koje vode uginuću jedinke). Nakon iscrpnog rada i unapređenja postojeće metodologije, finalna verzija standardizovane metode (OECD 236) predstavlja 96-časovno izlaganje, u toku koga se pored smrtnosti prati i niz subletalnih efekata i teratogenog potencijala hemikalija (OECD, 2013; Braunbeck et al., 2015). Životinje koje se ne hrane samostalno (nego iz žumanceta) nisu obuhvaćene Direktivom

2010/63/EU (EC, 2010), pa je postavljanje i usvajanje metode embriotoksičnosti u saglasnosti sa postulatom 3R (zamena, smanjenje i unapređenje eksperimenata sa životinjama – eng. *Replacement, Reduction and Refinement of animal tests*). Najčešće korišćena vrsta u ove svrhe je zebrica, *D. rerio* (Nagel, 2001; Belanger et al., 2013).

*D. rerio* (Hamilton, 1822) je vrsta slatkovodne ribe iz porodice Cyprinidae (red Cypriniformes), najbrojnije familije slatkovodnih riba (220 rodova, 2420 vrsta), poreklom iz jugoistočne Azije i Indije (Gerhard et al., 2002; Nelson, 2006; Mayden et al., 2007; Spence et al., 2008; de Esch et al., 2012).

Karakteristične ih mali rast, prisustvo „danionin useka” u ventromedijalnoj margini donje vilice i karakteristična obojenost u vidu naizmeničnih pruga svetle i tamne boje koje se pružaju od škrga do repnog peraja. Telo im je vretenasto, lateralno spljošteno. Usta su blago iskošena nagore, sa donjom vilicom isturenijom u odnosu na gornju. Polni dimorfizam je prisutan; ženke su krupnije od mužjaka, zaokrugljenijih stomaka i imaju analnu kvržicu (papilu). Slične su obojenosti, mada mužjaci imaju više žutog pigmenta i duža analna peraja (Spence et al., 2008).

Polnu zrelost dostižu za tri meseca (pri temperaturi 25,5 °C), a prema nekim tvrdnjama sazrevanje više zavisi od rasta nego od starosti. U laboratorijskim uslovima ženke mogu da se mreste na svaka dva-tri dana, proizvodeći nekoliko stotina jaja (ikre) koje mužjaci oplode u vodi (Lawrence, 2007; Scholz et al., 2008; Spence et al., 2008). U prirodi mrešćenje je sezonskog karaktera, retko dostignu dva reproduktivna ciklusa u toku jedne godine (López-Olmeda i Sánchez-Vázquez, 2011). Kod laboratorijskih populacija mrešćenje je inicirano fotoperiodom, a u prirodi i sezonskim periodima velikih kiša. Jaja su im relativno krupna (prečnik 0,7 mm), oplodnja je spoljašnja, a kako je omotač (horion) proziran razvoj embriona je moguće posmatrati pod mikroskopom (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008). Razvoj embriona je detaljno proučen, opisan i definisan po fazama (Kimmel et al., 1995); veoma je brz – mozak, srce, jetra, bubrezi, gastrointestinalni trakt, kosti, mišići i senzorni sistem potpuno su funkcionalni samo pet dana nakon oplodjenja (Spence et al., 2008; de Esch et al., 2012). Izvaljivanje embriona počinje 48-72 hpf (časa nakon oplodnje – eng. *hours post fertilisation*) (28 °C), a zavisi od debljine horiona i mišićne aktivnosti embriona – faktora koji su varijabilni.

Rast je najintenzivniji tokom prva tri meseca života, nakon čega se usporava, i u potpunosti prestaje nakon 18 meseci. Takođe, rast se povezuje sa periodom visokih temperatura (34 °C) i sa dostupnošću hrane tokom monsunskih meseci. Jedinke su u proseku dužine 3-5 cm (Nagel, 2001; Spence et al., 2007; 2008). Prosečan životni vek iznosi od 3,5 do preko 5 godina (Gerhard et al., 2002).

Nastanjuju spore i stajaće vode, ivične delove potoka i kanala, česte su u bistrim, plitkim jezerima bogatim akvatičnom vegetacijom i povezanim sa pirinčanim poljima (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008; López-Olmeda i Sánchez-Vázquez, 2011). Preferiraju blago alkalne vode (pH≈8,0) velike tvrdoće (>100 mg/L CaCO<sub>3</sub>). Euritermne su i mogu opstati u vodama velikih temperaturnih variranja – od 6 °C tokom zimskih meseci do preko 41 °C leti, sa optimumom u intervalu 24-30 °C. Najčešće žive u malim jatima (5-20 jedinki). Tendencija javljanja u pirinčanim poljima povezuje se sa upotrebom đubriva i gustom populacijom zooplanktona, koji je u osnovi ishrane zebrice. *D. rerio* je omnivorna vrsta i pored zooplanktona, hrani se još i insektima, u manjoj meri fitoplanktonom, biljakama, jajima beskičmenjaka, paucima, itd. (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008).

Jedna u nizu prednosti FET testa u odnosu na standardni akutni je i mogućnost merenja razvojnih parametara i deformacija. Do sada je veliki broj autora pratio deformacije kičme (lordozu, skoliozu, deformacije kičmenog stuba), peraja (deformacije/izostanak obrazovanja), kraniofacijalne promene (defekti i oticanje očiju, deformacije vilice, deformacije mozga, uvećanje glave), promene grudnog koša (veličina i rad srca, poremećaj srčane cevi, uvećanje grudne regije i hemoragije), i abdomena (uvećanje organa, izrasline/tumori, proširenje abdomena), i poremećaje rasta *D. rerio* usled delovanja pesticida. Neurotoksičnost je proučavana praćenjem lokomotornih sposobnosti i razvoja (Cook et al., 2005; Stehr et al., 2006; Domingues et al., 2011; Raftery et al., 2014; Pamanji et al., 2015). Značajno je i to što dovoljno visoke koncentracije kontaminanata mogu da dovedu do pojave karakterističnih fenotipskih efekata na osnovu kojih se mogu prepoznati specifični fiziološki i molekularni mehanizmi delovanja (Lema et al., 2007).

*D. rerio* FET model je najperspektivniji alternativni model za proveru teratogenosti, ne samo za ribe, već i za sisare (Lammer et al., 2009; Weigt et al., 2012; Scholz et al.,

2013; Braunbeck et al., 2015). Pogodnost ovog modela kao alternative konvencionalnim metodama leži i u fiziološkoj i genetičkoj homologiji sa ljudima. Strukturna organizacija i sistem organa nalik su ostalim kičmenjacima, uključujući i čoveka, što čini *D. rerio* pogodnim modelom za ispitivanje supstanci koje utiču na normalan razvoj. Pogodne su za izvođenje testova, sitne su i veoma plodne, a odgajivanje je jednostavno i jeftino. Na osnovu praćenih razvojnih deformacija i izmerene smrtnosti u toku eksperimenta može se odrediti teratogeni potencijal ispitivane supstance. Sve ovo zajedno čini embrione *D. rerio* najisplativijim *in vivo* modelom za ispitivanje uticaja hemikalija (Cook et al., 2005; Scholz et al., 2008; de Esch et al., 2012; Chakravarthy et al., 2014). Takođe, ovo je vrsta kičmenjaka kod kojih je razvoj najbolje opisan; definisano je više stotina mutacija koje dovode do poremećaja u razvoju.

Veći broj istraživača dokazao je jaku pozitivnu korelaciju rezultata dobijenih standardnim akutnim i testiranjima embriotoksičnosti sa *D. rerio* (Nagel, 2001; Lammer et al., 2009; Scholz et al., 2009; Blenager et al., 2013). Ipak, nekoliko faktora još uvek ograničava potpunu primenu FET testa, i to:

1. Supstance sa molekulskom masom većom od 3 kDa ne mogu proći kroz horion,
2. Određene neurotoksične supstance manje su toksične za embrionalni stadijum, u odnosu na odrasle jedinke i
3. Ograničena sposobnost biotransformacije ranih embrionalnih stadijuma (Braunbeck et al., 2015).

#### **2.4.5. Embrioni vrste *Xenopus laevis***

Kad je zaštita životne sredine u pitanju vodozemcima, u odnosu na druge grupe organizama, se posvećivalo daleko manje pažnje u prošlosti. Ipak, progresivno opadanje brojnosti njihovih prirodnih populacija privuklo je pažnju stručne javnosti. Po nekim procenama trećini vrsta vodozemaca prethodi istrebljenje, a kao jedan od razloga navodi se uvođenje pesticida u životnu sredinu (Stuart et al., 2004; Hayes et al., 2006; McCallum, 2007; Mikó et al., 2017). Veoma permeabilna koža, vezanost za vodu tokom razmnožavanja i ključnih razvojnih stadijuma čine ih grupom podložnom dejstvu zagađujućih supstanci. Značajno je napomenuti i to da većina vrsta polaže jaja u plitkim barama šumskih i poljoprivrednih oblasti u kojima je sadržaj pesticida obično viši u

odnosu na veće vodene površine (Howe et al., 2004; Hayes et al., 2006; Kang et al., 2009). Negativan uticaj pesticida na rast, razvoj i biohemijske procese kod različitih vrsta vodozemca više puta je registrovan (Osano et al., 2001; Bonfanti et al., 2004; Howe et al., 2004; Hayes et al., 2006; McCoy et al., 2008; Oka et al., 2008; Kang et al., 2009; Lenkowski et al., 2010).

*X. laevis* (Daudin 1802), afrička kandžasta žaba je jedna od najpoznatijih invazivnih vrsta žaba. Pripada rodu *Anura*, familiji *Pipidae* (podfamilija *Xenopodinae*) koja obuhvata pet rodova sa ukupno 30 vrsta. Karakteriše ih odsustvo jezika. Nativna je vrsta sub-saharske Afrike, a introdukovane populacije registrovane su u Evropi, Aziji, Severnoj i Južnoj Americi (Lobos i Jaksic, 2005; Eggert i Fauquet, 2006; Measey et al., 2012). Slučajno i ciljno unošenje u nenativnim područjima direktno je vezano za standardizaciju ove vrste kao test organizma, najpre za potrebe utvrđivanja gestacije, a kasnije bioloških istraživanja (Measey i Tinsley, 1998; Gurdon i Hopwood, 2000; Fouquet i Measey, 2006; Harland i Grainger, 2011).

*X. laevis* je jedan od najbolje izučenih eksperimentalnih modela sa kompletno sekvencioniranim genomom (Session et al., 2016), mada je ekologija u prirodnom staništu slabo opisana.

Zbog mnogih morfoloških adaptacija, smatrano je da je *X. laevis* potpuno akvatična vrsta, međutim zabeležene su terestrijalne migracije (Lobos i Jaksic, 2005; Eggert i Fauquet, 2006; Fouquet i Measey, 2006). Adaptacije na vodenu sredinu obuhvataju senzorne organe sa lateralne strane i složen sistem komunikacije sa jedinstvenim mehanizmom proizvodnje zvuka i fonotakse kod ženki. Vokalna komunikacija jako je izražena u toku sezone parenja i zvuk seksualno aktivnih jedinki značajno se razlikuje od onih koje nisu aktivne. Mužjaci su seksualno aktivni u proseku šest meseci, dok su ženke u tom periodu kratko i asinhrono aktivne (Tobias et al., 2004; 2010). Bledo braonkasta jaja (prečnika 1,15 mm) položena su pojedinačno ili u grupama od po nekoliko na akvatične biljke, stene ili druge strukture tla (Duellman et al., 2003; Crayon, 2005). Tokom jednog ciklusa ženka može da položi nekoliko hiljada jaja, koje mužjak oplodi u vodi. Rani razvoj je veoma intenzivan – od prve ćelijske deobe do punoglavca dolazi za 36 časova (Wallingford et al., 2010). Tada se kreću pomoću repa, a kako nisu vešti plivači podložni su napadu predatora (Hoff i Wassersung, 1986).

Stadijum punoglavca, u laboratorijskim uslovima, traje 10-12 nedelja (Crayon, 2005). Tokom hormonski inicirane metamorfoze prolazi kroz promene svih značajnih sistema organa, uključujući modifikacije gastro-intestinalnog trakta, morfologije glave i kompletnog uvlačenja repa. U toj fazi prestaje da se kreće pomoću repa i počinje da koristi udove. Metamorfoza obuhvata i promenu niše, tako što od herbivora prelazi na predatorski način ishrane (Walsh et al., 2008). U optimalnim uslovima *X. laevis* sazreva u roku od osam meseci, a sezona parenja može biti produžena (McCoid i Fritts, 1995 – cit. Measey i Tinsley, 1998). Veoma su dugovečne, sa registrovanom dužinom života od 15 godina u laboratoriji (Flower, 1936 – cit. Measey et al., 2012).

Prisutan je polni dimorfizam, ženke su krupnije od mužjaka, u proseku za 25%. Prosečna dužina tela ženki je 57-147 mm, dok su mužjaci dugi 45-97 mm (Duellman et al., 2003; Evans et al., 2011). Telo im je spljošteno, a male, okrugle oči smeštene su na vrhu glave. Koža im je glatka, pokrivena bogatim mukoznim slojem, a kožne izlučevine značajan su mehanizam borbe protiv predatora. Prednji udovi su mali, između tankih prstiju nema plovnih kožica, dok su zadnji udovi dugi i snažni, sa plovnim kožicama između prstiju. Na tri središnja prsta imaju kandže – crne, konusne vršne kape, po čemu su i dobile naziv. Obojenost sa dorzalne strane kreće se od zelenkasto-sivkaste do zelenkasto-braonkaste, a sa ventralne strane boja je bledo-žučkasata (Duellman et al., 2003; Crayon, 2005; Maddin et al., 2009).

Oba pola tokom godine žive na istom prostoru (Tobias et al., 2010). Ishrana se razlikuje u odnosu na razvojni stadijum. Tako, ishrana punoglavca se bazira na filtriranju vode i konzumaciji fitoplanktona – algi, protozoa i bakterija (Schoonbee et al., 1992). Odrasle jedinke se hrane akvatičnim beskičmenjacima, mada ni konzumacija sitnije ribe nije neobična, a u nedostatku hrane izlaze na suvo i hrane se terestričnim insektima. Predatori su jaja riba, a zabeležena je i pojava kanibalizma jaja i punoglavaca. Registrovani su i slučajevi hranjenja na uginulim životinjama – pticama, zečevima, vodenoj voluharici (Measey, 1998). Način ishrane rezultat je adaptacije na vodenu sredinu i razlikuje se u odnosu na terestrične vrste. Kako vrsta *X. laevis* nema jezik, prisutni su hiobranhijalni pumpajući pokreti koji omogućavaju uvlačenje plena u usta. Vilice su opskrbljene zubima, a kandže im pomažu u komadanju većeg plena (Avila i Frye, 1978; Measey et al., 2012). Detekcija plena je takođe karakteristična; oči su im

adaptirane za vid na suvom, a i orijentacija ukazuje da imaju malu ulogu kod detekcije plena u vodenoj sredini. Sa lateralne strane tela imaju veoma osetljive senzorne organe koji se pružaju preko glave i trupa, i za koje se smatra da su od ključnog značaja za detekciju plena (Elepfandt, 1996 – cit. Measey, 1998).

Izražena je velika plastičnost u odnosu na zahteve prema staništu (hrana, vegetacija, salinitet, protok i temperatura vode), pa je preciznu karakterizaciju najpogodnijeg staništa teško utvrditi. Naseljava sve vode – reke, jezera, močvare, poplavljene jame, jarkove i bunare. Ipak, najveća gustina kolonija registrovana je u stalnim i mirnim, eutrofnim vodama bez riba, sa mekim tлом i submerznom vegetacijom koje ne smrzava u hladnijem delu godine (Duellman et al., 2003; Crayon, 2005). Prema navodima Schoonbee et al. (1992) naseljavaju vode temperaturnog opsega 8-27 °C, neutralne do alkalne reakcije (pH 7-10). Iako je vrsta koja živi u vodi, utvrđeno je da može izdržati sušni period uvlačeći se u blato i ulazeći u stanje mirovanja (estivacija) i može preživeti bez hrane do 12 meseci. Ima veliku tolerancu prema salinitetu i uslovima sa smanjenom količinom kiseonika (Jokumsen i Weber, 1980). Zanimljivo je da ima sposobnost zadržavanja uree u ciju regulacije osmolariteta, što joj omogućava kolonizaciju brakičnih voda (Crayon, 2005). Larve i adulti su euritermalni i kroz metamorfozu prolaze u velikom temperaturnom opsegu (Walsh et al., 2008).

#### **2.4.6. Čelijska linija poreklom iz škrge *Onchorhynchus mykiss* (RTgill-W1)**

Značajan doprinos zameni akutnih testova toksičnosti na ribama je uvođenje čelijskih kultura i ispitivanje citotoksičnosti. U ekotoksikološkim istraživanjima, utvrđivanje efekata kod čelijskih linija podjednako je važno kao i postavka ogleada s eksperimentalnim životinjama, jer svaka interakcija hemikalije i biološkog sistema počinje delovanjem na čelijskom nivou. Razumevanje ovih efekata vodi otkrivanju mehanizma delovanja toksičnih supstanci i dijagnostikovanju toksičnih efekata na višim nivoima biološke organizacije. Osnovna prednost *in vitro* alternative ogleada se u mogućnosti utvrđivanja cito- i genotoksičnog potencijala hemikalija, brzo, bez uključivanja i žrtvovanja životinja, i bez velikih troškova (Fent, 2001; Castaño et al., 2003; Bols et al., 2005; Castaño i Gómez-Lechón, 2005; Tan et al., 2008; Pandey i Guo, 2014).

Citotoksičnost se najčešće izražava merenjem različitih parametara: ćelijske smrti, vijabiliteta, morfologije, metabolizma, vezivanja/odvajanja od zidova bunara, integriteta ćelijske membrane, rasta ili proliferacije (Fent, 2001; Castaño i Gómez-Lechón, 2005; Tan et al., 2008). Castaño et al. (1996) navode da je najbolje pratiti više parametara, jer osetljivost jednog parametra u odnosu na ostale može biti naznaka specifičnog mehanizma delovanja.

Ćelije koje se koriste za ispitivanje citotoksičnosti mogu biti iz primarnih ćelijskih kultura ili ćelijskih linija. Primarne ćelijske kulture su sveže ćelije izolovane iz ciljnog tkiva. Kratkog su životnog veka (~48 h) i neophodni su specifični uslovi odgajivanja, a česta zagađivanja i teškoće izolovanja dovoljne količine dovele su do razvijanja trajnih ćelijskih linija (Lee et al., 2009). Osetljivost primarnih ćelijskih kultura je varijabilna i zavisi od fiziološkog stanja organizma iz kog se vrši izolacija i kvaliteta metode izolovanja (Castaño et al., 2003). Ćelijske linije, sa druge strane, nastaju održavanjem i daljim gajenjem (presejavanjem) primarnih ćelijskih kultura *in vitro*. U zavisnosti od broja presejavanja ćelijske linije mogu biti finitnog (ograničen broj presejavanja) ili trajnog (neograničen broj presejavanja) karaktera (Lee et al., 2009). Najveći nedostatak trajnih ćelijskih linija je sklonost ka gubitku metaboličke aktivnosti detoksikacije toksikanta. Takođe, citotoksični odgovor može zavisiti od sastava medijuma, temperature odgajivanja i dužine ekspozicije (Fent, 2001). Poređenjem odgovora primarnih ćelijskih kultura i ćelijskih linija utvrđena je slaba korelacija, a kao faktor koji najviše doprinese ovim razlikama izdvojena je veća metabolička aktivnost primarnih ćelijskih kultura. I pored pretpostavke da su ćelijske linije manje diferencirane od primarnih ćelijskih kultura, jednostavnije su za rad, varijabilnost im je manja i predstavljaju sistem koji je lakše standardizovati. *In vitro* ispitivanja još uvek nisu implementirana u regulatornom aspektu, a najveća prepreka je manja osetljivost u odnosu na *in vivo* ispitivanja (Castaño et al., 1996; Güllden et al., 2005; Braunbeck et al., 2015). Ipak, dobru pozitivnu korelaciju između standardnih testova akutne toksičnosti i citotoksičnog odgovora ćelijskih linija potvrdio je veći broj autora (Caminada et al., 2006; Tanneberg et al., 2013). Kramer et al. (2009) su smanjenu osetljivost ćelija u odnosu na standardne testove akutne toksičnosti pripisali izboru ćelija koje ne oponašaju specifične mehanizme delovanja i smanjenoj biodostupnosti izabranih



supstanci. Prema njihovoj pretpostavci preciznije IC<sub>50</sub> vrednosti bile bi dobijene ukoliko bi se testiranje uradilo na seriji ćelija koje pokrivaju različite mehanizme delovanja.

Nekada su za potrebe praćenja kvaliteta vode korišćene ćelije sisara (Dayeh et al., 2002). Proučavanjem ćelija riba ustanovljena je sličnost u ćelijskim mehanizmima sa ćelijama sisara, ali i niz osobina specifičnih za ribe koje ne bi mogle da budu ispitane korišćenjem ćelija sisara. Poređenjem citotoksičnosti ćelija riba i sisara više istraživača izvelo je zaključak da je osetljivost ovih linija u istom opsegu (Castaño et al., 2003; Gülden et al., 2005). Ćelijske linije riba su lakše za rukovanje od ćelija sisara jer se održavaju na nižoj temperaturi (<30 °C) i zato što su izolovane linije (RTG-2 i PLHC-1) za čije odgajivanje nije neophodan goveđi serum (eng. FBS – *Fetal Bovine Serum*) (Fent, 2001). Castaño et al. (2003) navode da je zbog ovih osobina, kao i mogućnosti direktnog ispitivanja uzoraka iz životne sredine različitog osmolariteta, za specifične testove pogodnije koristiti ćelije riba u odnosu na ćelijske linije sisara.

Škrge su multifunkcionalni organ koji je odgovoran za razmenu gasova, transport jona, održavanje kiselo-bazne ravnoteže, osmoregulaciju, izlučivanje viška azota i metabolita. Takođe, škrge su prvo mesto kontakta sa toksičnim supstancama iz vode, osnovni put unosa i često ciljni organ za letalna oštećenja (Castaño et al., 2003). Primarno mesto akutnog delovanja neke zagađujuće supstance je ćelijska membrana ili neka od vitalnih funkcija epitelnih ćelija, koja dovodi do poremećaja funkcionisanja ćelije i organizma i potencijalnog uginuća jedinke (Tanneberg et al., 2013). Smrtni ishod testova toksičnosti sa ribama često je posledica strukturnih oštećenja ili narušavanja neke od funkcija škrge (Castaño et al., 2003). Upravo zbog toga je razvijanje ćelijskih linija poreklom iz škrge riba bio neophodan korak za dalje unapređivanje i razumevanja delovanja toksičnih supstanci.

Ispitivanjima sa ćelijskom linijom RTgill-W1 poreklom iz škrge kalifornijske pastrmke (*O. mykiss*) moguće je detektovati i kvantifikovati nekoliko tipova ćelijskih oštećenja i vijabiliteta ćelije (Tanneberg et al., 2013). Ćelijska linija RTgill-W1 je trajna epitelna ćelijska linija (Bols et al., 1994). Upotrebom ove linije meri se bazalna citotoksičnost, odnosno narušavanje ćelijskih aktivnosti zajedničkih za sve, ili skoro sve ćelije (Dayeh et al., 2009). Prednost korišćenja RTgill-W1 ćelijske linije još se ogleda i u mogućnosti

izlaganja u medijumu tipa L15-ex koji se sastoji iz soli, glukoze i piruvata, a bez FBS što omogućava potpunu biodostupnost testirane supstance (Tanneberg et al., 2013).

Kod odabira parametra za praćenje citotoksičnosti veoma je važno da pored relevantnosti, pouznanosti i osetljivosti određivanje istog bude jednostavno, brzo i ekonomično (O'Brien et al., 2000). Dobar primer pogodnih metoda za utvrđivanje parametara citotoksičnosti je korišćenje specifičnih boja i fluorimetrijsko određivanje odgovora ćelije na prisustvo toksikanta. Tako se boja alamar plavo uspešno koristi za određivanje narušavanja metaboličke aktivnosti, 5-karboksifluorescein diacetat acetoksimetil ester (CFDA-AM) za integritet ćelijske membrane, a neutralno crveno za narušavanje lizozoma. Jedna od prednosti ovih metoda je u tome što je dovoljan jedan test za merenje svih parametara. Alamar plavo je komercijalni preparat plave, nefluorescentne boje resuzarina. Resuzarin u ćeliju ulazi u nefluorescentnom obliku, ali nakon redukcije u ćeliji prelazi u fluorescentni oblik, ružičaste obojenosti – rezorufin. Najpre se polazilo od pretpostavke da se ova redukcija dešava isključivo u mitohondrijama, međutim utvrđeno je da su za redukciju odgovorni enzimi diaforaze koji su zastupljeni i u mitohondrijama i u citoplazmi (O'Brien et al., 2000). Stoga, smanjenje redukcije boje alamar plavo ukazuje na remećenje ćelijskog metabolizma. Boja CFDA-AM je esterazni supstrat koji se u nefluorescentnom obliku dodaje ćelijama. Nakon ulaska u ćeliju nespecifične ćelijske esteraze je prevode u fluorescentni oblik (5-karboksifluorescein) u kom polako napušta ćeliju (Schirmer et al., 1997). Smanjenje fluorescencije CFDA-AM ukazuje na remećenje integriteta ćelijske membrane. Dayeh et al. (2005) navode da smanjenje fluorescencije u izuzetnim slučajevima može biti rezultat specifičnog delovanja toksične supstance na ćelijske esteraze, ostavljajući membranu intaktnu. Metoda sa neutralno crvenom bojom bazira se na akumulaciji boje u lizozomima vitalnih ćelija, a supstance koje dovode do oštećenja membrana inhibiraju proces akumulacije boje (Borenfreund i Puerner, 1985; Fent, 2001). Iako se boja akumulira u lizozomima, treba imati na umu da je za usvajanje i zadržavanje neophodna intaktna membrana, dovoljno energije, i funkcionalna organela. U skladu sa tim neki autori smatraju da se ovom metodom prate sva tri ćelijska parametra (Dayeh et al., 2005).

Ekotoksikološki efekti toksične supstance zavise od ekspozicije i biodostupnosti, usvajanja i metaboličkih procesa, koncentracije u ćeliji, mehanizma delovanja i odnosa toksičnog i protektivnog ćelijskog odgovora. Još jedan ograničavajući faktor upotrebe ćelijskih linija je i taj što se u ovim ispitivanjima zaobilaze značajni biološki procesi kao što su: distribucija toksične supstance u tkivima i biotransformacija koja se dešava u biološkim sistemima (Fent, 2001).

Ponovljivost, brzina izvođenja i ekonomičnost ogleda sa ćelijskim linijama, kao i mogućnost korelacije sa standardnim testovima toksičnosti su osobine zbog kojih je ovaj model pogodna alternativa eksperimentima sa životinjama (Caminada et al., 2006).

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je ispitivanje toksičnosti tehničke supstance i dva različito formulisana preparata klomazona na organizme vodene sredine. Preparati korišćeni za ova ispitivanja pripadaju staroj i novoj generaciji sredstava za zaštitu bilja: koncentrat za emulziju (EC) i suspenzija kapsula (CS), a oba su, kod nas i u svetu, ravnopravno u primeni. Ispitivanja su obuhvatila složenu bateriju testova na vrstama koje pripadaju različitim trofičkim nivoima i nišama, a zatim je na osnovu dobijenih rezultata i preporučene primene u našoj zemlji izvršena procena rizika od klomazona za akvatične organizme.

Program istraživanja zahtevao je ispunjenje sledećih ciljeva:

- Utvrđivanje uticaja aktivne supstance klomazon, kao i dva različito formulisana preparata sa istim sadržajem klomazona, na akvatične primarne producente;
- Utvrđivanje interspecijske osetljivosti za dve vrste akvatičnih makrofitu;
- Utvrđivanje uticaja klomazona i ispitivanih preparata za akvatične beskičmenjake (*Daphnia magna*), embrione riba (*Danio rerio*) i žaba (*Xenopus laevis*);
- Utvrđivanje embriotoksičnog i teratogenog potencijala klomazona i preparata za embrione riba i žaba, i razlika u toksičnosti između aktivne supstance i preparata;
- Doprinos utvrđivanju mehanizma delovanja klomazona;
- Utvrđivanje citotoksičnog potencijala tehničke supstance i oba preparata za ćelijsku liniju RTgill-W1 (ćelije škrge *Oncorhynchus mykiss*);
- Utvrđivanje da li i koliko *in vitro* metode mogu da se primene u višestepenom pristupu procene rizika od pesticida za organizme vodene sredine, odnosno da doprinesu 3R konceptu (utvrđivanje podobnosti ćelijske linije kao alternative testovima toksičnosti sa ribama);
- Procena rizika od klomazona za organizme u vodi, na osnovu rezultata dobijenih tokom ovih istraživanja, literaturnih podataka i preporučene količine primene u našoj zemlji, i utvrđivanje distribucije osetljivosti vrsta.

Dobijeni rezultati treba da pruže jasan uvid u uticaj koji aktivna supstanca i preparati imaju na akvatičnu zajednicu kao deo životne sredine. Realizacija postavljenih ciljeva doprineće rasvetljavanju mehanizma delovanja klomazona, kao i razlika u rizicima koje nosi primena različito formuliranih preparata na bazi iste aktivne supstance. Uporednim ispitivanjima toksičnog delovanja aktivne supstance i dva preparata, standardnim i nestandardnim testovima, videće se da li je procena rizika koja se zasniva samo na aktivnoj supstanci dovoljno pouzdana i preventivna i kada su efekti i toksičnost različitih formulacija u pitanju.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Ispitivana tehnička supstanca i preparati

U radu je korišćena tehnička supstanca klomazon (2-(2-hlorbenzil)-4,4-dimetil-1,2-oksazolidin-3-on; CAS broj 81777-89-1) proizvođača Shenzhen Yancheng Chemicals Co., Kina. Tehnička supstanca je prozirno-žute boje, u obliku viskozne tečnosti. Deklarisana čistoća tehničke supstance iznosila je 95% (min.), dok je analizom po modifikovaj metodi Niell et al. (2010) utvrđen sadržaj klomazona od 95.3%. Pored tehničke supstance, paralelno su ispitivana i dva komercijalna preparata na bazi ove supstance – Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS. Rampa<sup>®</sup> EC je preparat proizvođača „Galenika - Fitofarmacija“, Beograd – Zemun, dok je GAT Cenit 36 CS proizvod firme „GAT Microencapsulation“, Ebenfurth, Austrija (Tabela 2). Sadržaj klomazona u preparatima je proveren modifikovanom metodom Niell et al. (2010) i potvrđen je sadržaj koji su deklarirali proizvođači.

**Tabela 2.** Osnovne karakteristike ispitivanih preparata

Tip formulacije:	RAMPA <sup>®</sup> EC	GAT CENIT 36 CS
	Koncentrat za emulziju	Suspenzija kapsula
Aktivna supstanca:	Klomazon	Klomazon
Deklarisani sadržaj klomazona:	360±18 g/l	360±18 g/l
Izgled:	Tečnost, braon-žute boje	Tečnost braon boje
Miris:	Na rastvarače	Na aromatična jedinjenja
Gustina (20 <sup>0</sup> C):	0,99 g/cm <sup>3</sup>	1,05±0,08 g/cm <sup>3</sup>
Tačka paljenja:	52 °C	> 100 °C
pH (1% disperzija):	5	6-8

### 4.2. Priprema rastvora i kvantitativno određivanje klomazona

Postupak pripreme serije različitih koncentracija tehničke supstance i preparata klomazona kojima su bili izlagani test organizmi bio je isti za sve eksperimente. Najpre je pripremana najviša ispitivana koncentracija mešanjem tehničke supstance/preparata u medijumu (Stainberg/Smart&Barco/AdaM/ISO/FETAX), bez dodavanja rastvarača. Zatim su od najviših ispitivanih koncentracija uzimani alikvoti i dodavanjem potrebne količine medijuma pripremani su rastvori nižih koncentracija. Kao kontrola je korišćen standardni medijum bez dodatka herbicida ili rastvarača.

Provera pripremljenih rastvora radi utvrđivanja sadržaja aktivne supstance za sva ispitivanja vršena je pre postavke eksperimenata. Kod ispitivanja sa vrstama *Lemna minor* i *Myriophyllum aquaticum* koncentracije su određivane i prilikom promene rastvora, a pored analize svežih rastvora, sadržaj aktivne susptance određivan je i u rastvorima nakon trodnevne izloženosti.

Za utvrđivanje sadržaja klomazona u tehničkoj supstanci i preparatima korišćen je analitički standard klomazona (CAS broj 81777-89-1), proizvođača Sigma Aldrich.

Sadržaj klomazona u tehničkoj supstanci, preparatima, koncentratima, kao i radnim rastvorima određivan je metodom tečne hromatografije sa visokim pritiskom i UV detekcijom (HPLC-DAD Agilent Series sa PDA detektorom, 220nm), prema metodi Niell et al. (2010). Uzorci su rastvarani u acetonitrilu i analizirani. Korišćena je kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150x4.6 mm, 5 µm, Agilent) na temperaturi od 30 °C, protok je iznosio 1 ml/min, zapremina injektiranja 20 µl, a retenciono vreme 5,6 min. Mobilna faza je bila sledećeg sastava: (A) acetonitril i (B) voda/0.1% mravlja kiselina. Početni udeo acetonitrila bio je 48% (0-7 min), zatim rastao 48-80% (7-9 min), 80% (9-11 min) i na kraju se vraćao na početnu vrednost (48%, 11-16 min). Granica kvantifikacije (LOQ – eng. *Limit of quantification*) bila je 0,5 mg/l. Klomazon iz uzoraka je identifikovan poređenjem UV spektra i retencionog vremena sa standardom (Sigma Aldrich) i kvantifikovan očitavanjem sa kalibracione krive (0.5-10 mg/l).

Pripremljeni rastvori za eksperimente sa vrstama *Lemna minor* i *Myriophyllum aquaticum* analizirani su u Laboratoriji za hemiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, dok su ispitivanja rastvora korišćenih u ostalim eksperimentima analizirani u Laboratoriji RECETOX (REsearch CEnter for TOXic Compunds in the Environment) na Prirodno-matematičkom fakultetu Masarik Univerziteta u Brnu (Republika Češka).

### 4.3. Eksperimenti sa akvatičnim organizmima

#### 4.3.1. Inhibicija rasta vrste *Lemna minor*

Ispitivanja na vrsti *L. minor* izvedena su u Laboratoriji za toksikologiju na Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun.

##### 4.3.1.1. Test organizam

Laboratorijska kultura biljne vrste *L. minor* poreklom je sa prirodnog staništa Specijalnog rezervata prirode „Koviljsko-petrovaradinski rit”. Pre početka eksperimenata biljke su prošle period adaptacije u odgovarajućem hranljivom rastvoru i standardnim laboratorijskim uslovima. Biljke su gajene u plastičnim posudama u Steinberg hranljivom rastvoru (ISO 20079, 2005; Tabela 3), na temperaturi  $24 \pm 2$  °C i konstatnom osvetljenju intenziteta  $85-135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Sastav hranljivog rastvora Steinberg (ISO 20079, 2005)

	Sastav	mg/l destilovane vode
Makroelementi		
Stok rastvor 1	KNO <sub>3</sub>	17,50
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,50
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63
Stok rastvor 2	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5,00
Stok rastvor 3	Ca(NO <sub>3</sub> ) x 4H <sub>2</sub> O	14,75
Mikroelementi		
Stok rastvor 4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120,00
Stok rastvor 5	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	180,00
Stok rastvor 6	NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	44,00
Stok rastvor 7	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	180,00
Stok rastvor 8	FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	760,00
	EDTA dinatrijum hidrat	1500,00

##### 4.3.1.2. Eksperimentalna postavka

Ispitivanje inhibicije rasta *L. minor* izvedeno je prema standardnoj metodi OECD 221 (2006). U ispitivanjima sa tehničkom supstancom i preparatima klomazona korišćeni su rastvori istih koncentracija aktivne supstance (Tabela 4). Nakon pripreme, po 150 ml rastvora/Steinberg medijuma (OECD 221, 2006) je odmereno u staklene čaše zapremine



250 ml i tri kolonije (3 i 4 jedinke po koloniji) sočivice stavljene su na sedmodnevno izlaganje (Slika 3).



**Slika 3.** Vrsta *Lemna minor* u testu sa tehničkim klomazonom

Prilikom postavke eksperimenta broj izlaganih jedinki je bio ujednačen u tretmanima i kontroli; za tehničku supstancu iznosio je 10, a za preparate 11. Eksperimentalna postavka je podrazumevala tri ponavljanja po test tretmanu i 4-6 ponavljanja kontrolnih tretmana. Jedinke su izlagane u semi-statičkim uslovima, pri temperaturi  $24\pm 2$  °C i konstantnom osvetljenju. Rastvori tehničke supstance/preparata i Steinberg medijum su menjani dva puta tokom perioda izlaganja, trećeg i petog dana.

**Tabela 4.** Nominalne koncentracije tehničke supstance i preparata u testovima inhibicije rasta *Lemna minor* i *Myriophyllum aquaticum*

Aktivna supstanca	Radni material	mg a.s./l ISO
Klomazon	Tehnička supstanca	3,3; 10; 30; 90; 270; 810
	Rampa <sup>®</sup> EC	3,3; 10; 30; 90; 270; 810
	GAT Cenit 36 CS	3,3; 10; 30; 90; 270; 810

U cilju merenja inhibicije rasta *L. minor* pod uticajem tehničke supstance klomazon i preparata Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS praćeni su sledeći parametri: broj jedinki (BJ), sveža masa (MSv), biljna površina (PJ) i sadržaji hlorofila *a* (chl*a*) i *b* (chl*b*). Inhibicija rasta parametara BJ, MSv i PJ izražena je dvojako – preko specifične stope rasta (RGR – eng. **Relative Growth Rate**) i prinosa (Y – eng. **Yield**).

Nultog, trećeg i poslednjeg (7) dana izlaganja sočivice beleženi su BJ, MSv i PJ. Jedinke su prebrojavane, a MSv je, nakon uklanjanja viška tečnosti, određivana merenjem na analitičkoj vagi. Čaše sa biljnim materijalom su fotografisane uvek sa iste udaljenosti (15 cm) u improvizovanoj komori. Fotografije su zatim obrađene (Adobe Photoshop, ver. cs. 6) i na osnovu proporcije površine jedinki i vodenog ogledala u pikselima i poznate površine posude (38,485 cm<sup>2</sup>) utvrđivana je površina biljnog materijala (cm<sup>2</sup>). Prinos (Y) i relativna stopa rasta (RGR) na osnovu svih parametara su izračunate za period 0-3, 3-7, kao i kumulativno 0-7 dana.

Prema metodi (OECD, 2006) kriterijum za validnost testa je udvostručenje broja kontrolnih frondova za manje od 2,5 dana (60 h), što odgovara specifičnoj stopi rasta od 0,275/dan. Vreme dupliranja izračunato je prema sledećoj formuli:

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

gde je: Td – vreme dupliranja,  $\mu$  – specifična stopa rasta.

Sadržaj hlorofila utvrđen je prema modifikovanoj metodi Wellburn-a (1994). Nakon merenja mase biljaka, sve jedinke su prebačene u epruvete, u koje je prethodno dodato po 10 ml metanola, i sadržaj je promešan. Biljke u metanolu čuvane su u komori sa kontrolisanim uslovima podešenoj na 4 °C, jer se ekstrakcija odvija na hladnom i u mraku do očitavanja na spektrofotometru. Tokom trodnevne ekstrakcije epruvete sa biljkama i metanolom su konstantno mešane (IKA<sup>®</sup> KS 130 basic orbitalni šejker). Nakon perioda ekstrakcije apsorbancija je očitavana na talasnim dužinama: 666 nm (chl<sub>a</sub>) i 653 nm (chl<sub>b</sub>).

### 4.3.2. Inhibicija rasta vrste *Myriophyllum aquaticum*

Ispitivanja na vrsti *M. aquaticum* izvedena su u Laboratoriji za ekotoksikologiju na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

#### 4.3.2.1. Test organizam

Laboratorijska kultura vrste *M. aquaticum* nabavljena je od Bavarske agencije za zaštitu životne sredine. Biljke su gajene u standardnom veštačkom sedimentu (ISO 16191, 2013) i zalivane razblaženim Steinberg medijumom (1:1v/v, Steinberg medijum: destilovana voda), pri konstantnom osvetljenju ( $60-70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) i temperaturnom režimu ( $24\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 4.3.2.2. Eksperimentalna postavka

Ispitivanja toksičnosti tehničke supstance klomazon i preparata za *M. aquaticum* izvršena su prema radnoj verziji protokola OECD (OECD Ring test protokol 2011), od kog je nakon analize rezultata internacionalnog testa kalibracije metode (Ratte i Ratte, 2014) proizišao protokol OECD 239 (2014) za testiranje na vrsti *Myriophyllum spicatum*. Jedinke *M. aquaticum* su, nakon trodnevnog perioda adaptacije, izlagane tehničkoj supstanci i preparatima klomazona u trajanju od sedam dana. Tehnička supstanca i preparati su pripremljeni u istom rasponu koncentracija i bili ujednačeni sa serijom koncentracija u eksperimentima sa biljnom vrstom *L. minor* radi lakšeg poređenja efekata (Tabela 4).

Na plastičnim činijama sa sedimentom obeleženo je pet mesta radi jasnog razlikovanja biljaka i mogućnosti praćenja individualnog rasta. Sa biljaka iz laboratorijske kulture odsecani su zdravi vršni delovi dužine  $6\pm 1$  cm. Odsečeni biljni delovi su zasađeni u standardni sintetički sediment, na dubinu od oko 3 cm. Činije sa veštačkim sedimentom i biljkama su zatim postavljene u staklene čaše od 2 L i nalivene su sa po 1,8 L Smart & Barko hranljivog rastvora (OECD 239, 2014; Slika 4), čiji je sastav prikazan u Tabeli 5. Pored posuda namenjenih za kontrolu i tretmane postavljeno je i pet dodatnih posuda.

**Tabela 5.** Sastav hranljivog rastvora Smart & Barko (OECD 239, 2014)

Sastav	mg/l destilovane vode
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	91,70
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	69,00
$\text{NaHCO}_3$	58,40
$\text{KHCO}_3$	15,40

**Slika 4.** Vrsta *Myriophyllum aquaticum* u ekperimentalnoj postavci sediment voda

Radi stimulisanja rasta korena i privikavanja na promenu hranljivog medijuma i sistem voda-sediment, biljke su pre početka eksperimenta podvrgnute trodnevnoj adaptaciji. Kada je adaptacioni period završen iz kontrolnih i činija određenih za tretmane uklonjene su dve od pet biljaka, a ostavljene su tri najsličnije biljke, kako bi se obezbedila uniformnost početnog biljnog materijala. Nakon odabira tri biljke koje će biti uključene u eksperiment, hranljivi medijum u kom su biljke bile u toku perioda adaptacije je zamenjen rastvorima klomazona i preparata. Kontrola je postavljena u šest, a tretmani u tri ponavljanja. Biljke su izlagane delovanju tehničke supstance i preparata u periodu od sedam dana u statičkim uslovima, pri svetlosnom režimu 16 h osvetljenosti i 8 h u mraku i temperaturi  $22 \pm 2$  °C.

U cilju utvrđivanja inhibicije rasta *M. aquaticum* pod uticajem tehničke supstance klomazon i preparata Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS praćeni su sledeći parametri: ukupna dužina biljke (DU), dužina biljke iznad sedimenta (DIS), sveža masa biljaka

(MSv), sveža masa korena (MK) i sadržaji hlorofila *a* (chl*a*) i *b* (chl*b*). Inhibicija rasta parametara DU, DIS i MSv izražena je preko RGR i Y.

Kako bi bilo moguće praćenje destruktivnih parametara (DU, MSv), nultog dana eksperimenta ovi parametri mereni su na biljkama iz dodatnih posuda. Nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona kontrolne i biljke iz tretmana uklonjene su iz sedimenta i izmerena im je DU, MSv, kao i MK. Poređenjem ovih vrednosti i srednjih vrednosti parametara izmerenih iz dodatnih posuda na početku ekspozicionog perioda izračunata je inhibicija rasta za period 0-7 dana. Određivanje inhibicije rasta na osnovu parametra DIS urađeno je na osnovu merenja biljaka nultog, trećeg i sedmog dana izlaganja. Prinos (Y DIS) i relativna stopa rasta (RGR DIS) za period 0-3, 3-7, kao i kumulativno 0-7 dana izračunate su na osnovu merenja istih biljaka (individualni rast).

Kriterijumi validnosti testa, u vreme izvođenja eksperimenata, nisu bili definisani protokolom. Radnom verzijom protokola bilo je propisano granično variranje vrednosti parametra MSv (30%) početnog biljnog materijala.

Sadržaji chl*a* i chl*b* određeni su prema metodi Wellburn-a (1994), opisanoj kod ispitivanja sa vrstom *L. minor*.

#### **4.3.3. Akutna imobilizacija vrste *Daphnia magna***

Ispitivanja na vrsti *D. magna* izvedena su u Laboratoriji RECETOX na Prirodno-matematičkom fakultetu Masarik Univerziteta u Brnu.

##### **4.3.3.1. Test organizam**

Populacija vrste *D. magna* korišćena u ispitivanjima odgajana je u hranljivom rastvoru AdaM (Klüttgen i sar., 1994; Tabela 6). Jedinke su uzgajane u staklenim akvarijumima (10 l), sa aeracijom, u uslovima svetlosnog režima 16 h svetlosti i 8 h u mraku i temperaturi 20±2 °C. Tri puta nedeljno novorođene jedinke su odvajane od starijih, a tom prilikom jedinke su hranjene svežim koncentratom algi *Pseudokirchneriella subcapitata*.

**Tabela 6.** Sastav AdaM standardnog hranljivog rastvora za gajenje zooplanktona (Klüttgen et al., 1994)

	Sastav	mg/l destilovane vode
Stok rastvor 1	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	117,6
Stok rastvor 2	NaHCO <sub>3</sub>	25,2
Stok rastvor 3	SeO <sub>3</sub>	0,07
Stok rastvor 4	morska so	333

#### 4.3.3.2. Eksperimentalna postavka

Ispitivanje toksičnosti aktivne supstance klomazon i dve formulacije za *D. magna* urađeno je prema standardnoj metodi OECD 202 (2004). Rastvori ispitivanih koncentracija pripremani su mešanjem aktivne supstance i preparata u hranljivom rastvoru AdaM, bez dodavanja rastvarača. Nakon pripreme radnih koncentracija (Tabela 7) mlade jedinke (starosti do 24 h) su odvojene od starijih i po 25 je stavljeno u rastvore odvojene za pred-ekspoziciju.

**Tabela 7.** Nominalne radne koncentracije tehničke supstance i preparata u testovima imobilizacije *Daphnia magna*

Aktivna supstanca	Radni materijal	mg a.s./l AdaM
Klomazon	Tehnička supstanca	10; 20; 30; 40; 50; 60; 80; 100
	Rampa <sup>®</sup> EC	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30
	GAT Cenit 36 CS	0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100

U staklene čaše od 50 ml odmereno je po 25 ml rastvora odgovarajuće koncentracije i kontrolnog medijuma, a zatim je iz pred-ekspozicionih posuda prebačeno po 5 jedinki (Slika 5). Tretmani u svim eksperimentima, kao i kontrola, postavljani su u pet ponavljanja. Da bi bilo sprečeno isparavanje (nakon što su jedinke stavljene na ekspoziciju) čaše su prekrivene prijanjajućom folijom. Postavka eksperimenata završena je stavljanjem svih čaša u prostoriju sa kontrolisanim uslovima, temperaturom 20±2 °C i fotoperiodom 16:8 h (svetlost:tama). Izloženost eksperimentalnih životinja tehničkoj supstanci i preparatima u statičkim uslovima trajala je 48 h, a imobilizacija je beležena dvokratno (24 i 48 h). Ispitivanja toksičnosti tehničke supstance urađena su u dva, a preparata u tri nezavisna eksperimenta izvedena u različito vreme.



**Slika 5.** Eksperimentalna postavka ispitivanja akutne toksičnosti sa vrstom *Daphnia magna*

Preliminarnim ispitivanjima različitih koncentracija tehničke supstance i preparata određivan je opseg efektivnih koncentracija kojima se postiže imobilizacija 50% jedinki. Prema standardu predložena je granična koncentracija 100 mg/l ili koncentracija na gornjoj granici rastvorljivosti. Gornja granična koncentracija u preliminarnim eksperimentima, a kasnije i testovima sa tehničkom supstancom i preparatima, bila je 100 mg aktivne supstance/l medijuma, a jedan od razloga je mala verovatnoća pojave ovako visoke koncentracije u životnoj sredini. Za tehnički klorazon je u dva preliminarna ogleđa testirano pet koncentracija (0,1; 1; 5; 10; i 100 mg/l i 10; 20; 35; 50; i 70 mg/l), a za konačne ogleđe taj opseg je proširen. Na početku ispitivanja sa preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS preliminarnim ispitivanjima testirano je osam koncentracija (10; 20; 30; 40; 50; 60; 80 i 100 mg/l).

Broj imobilisanih jedinki registrovan je nakon izlaganja u trajanju od 24 i 48 h. Na osnovu procenta imobilizacije izračunate su srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ) za oba perioda. Poređenjem imobilizacije jedinki iz tretmana i kontrole je utvrđena statistička značajnost.

Kriterijumi validnosti testa (OECD, 2004) su: a) da udeo imobilisanih jedinki u kontrolnoj grupi bude manji od 10%, i b) da sadržaj rastvorenog kiseonika bude  $\geq 3$  mg/l ( $>40\%$ ).

#### 4.3.4. Akutna toksičnost za embrione *Danio rerio*

Ispitivanja na ribama ranog životnog stadijuma izvedena su u Laboratoriji RECETOX na Prirodno-matematičkom fakultetu Masarik Univerziteta u Brnu.

##### 4.3.4.1. Test organizam

Embrioni *D. rerio* dobijeni su od mužjaka i ženki starijih od tri meseca. Jedinke su bile odgajane u akvarijumima sa vodom za piće iz vodovoda ( $\text{CaCO}_3$  100-180 mg/l,  $\text{NO}_3^-$  10-25 mg/l, pH 7,0-7,2), pri temperaturi  $26 \pm 1$  °C (održavanje temperature u sobi za odgajivanje) i svetlosnim režimom 14 h svetla i 10 h tame. Snabdevenost kiseonikom obezbeđena je upotrebom vazdušnih pumpi (proizv. Eheim). Ribe su hranjene kombinacijom sveže (*Artemia salina*) i sušene hrane (Spirulina, Sera; Gammarus, Dajana; Tubifex, Easyfish; Flake food, Sera).

Veće pre postavljanja ogleđa parovi za razmnožavanje odvajani su u zasebne akvarijume zapremine 10 l. Akvarijumi su bili ispunjeni mešavinom destilovane i vodovodne vode (u odnosu 1:1), a na dno je postavljena posuda za sakupljanje embriona, sa zelenilom i mrežom (Slika 6).



**Slika 6.** Akvarijumi za razmnožavanje sa posudom za sakupljanje embriona

Posuda sa embrionima uklanjana je ujutru, odmah nakon razmnožavanja, embrioni su zatim ispirani i prebačeni u test rastvor (ISO 7346-3, 1996; Tabela 8). Svi embrioni su



pregledani pod stereomikroskopom (OLYMPUS SZ61, Japan), oplođena, vitalna jaja odvojena i eksperiment postavljen ne kasnije od 3 hpf.

**Tabela 8.** Sastav standardnog test rastvora za testiranja toksičnosti za slatkovodne vrste riba (ISO 7346-3, 1996)

	Sastav	mg/l destilovane vode
Koncentrat 1	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	294,0
Koncentrat 2	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	123,3
Koncentrat 3	NaHCO <sub>3</sub>	64,7
Koncentrat 4	KCl	5,7

#### 4.3.4.2. Eksperimentalna postavka

Eksperimenti su izvedeni prema standardnoj metodi OECD 210 (2013), sa modifikacijama. Prema smernicama metode, za vrstu *D. rerio* preporučena dužina izlaganja je 30 dana nakon izvaljivanja, u semi-statičkom ili protočnom sistemu. Modifikacija metode sastojala se u skraćanju ovog perioda na 120 hpf u statičkom sistemu izlaganja. U cilju određivanja krajnjih koncentracija čiji će efekti biti ispitivani izvedena je serija preliminarnih eksperimenata. Četiri koncentracije tehničke supstance klomazon testirane su u preliminarnim ispitivanjima (6,3; 25; 50 i 100 mg/l), a zbog smrtnosti u najnižoj ispitivanoj koncentraciji opseg je proširen i definisane su krajnje koncentracije (Tabela 9). Opseg ispitivanih koncentracija preparata Rampa<sup>®</sup> EC u preliminarnim testovima bio je istovetan konačnim koncentracijama tehničke supstance. Svi embrioni izlagani koncentraciji  $\geq 25$  mg/l su uginuli, pa je preliminarni test ponovljen sa korigovanim koncentracionim opsegom (1,6; 3,1; 6,2; 9,4; 12,5 i 18,8 mg/l). Kako u tretmanima sa dve najniže ispitivane koncentracije smrtnosti nije bilo, a u tretmanima sa  $\geq 12,5$  smrtnost je bila 100%, definisan je krajnji koncentracioni opseg ispitivanja (Tabela 9). Kod ispitivanja sa preparatom GAT Cenit 36 CS koncentracioni opseg preliminarnih i krajnjih ispitivanja nije se razlikovao (Tabela 9). Čak i kada smrtnost svih jedinki nije postignuta kod izlaganja tretmanu sa 100 mg/l, koncentracije nisu povećavane (mala je verovatnoća nalaženja ovako visokih koncentracija u životnoj sredini).

**Tabela 9.** Nominalne radne koncentracije tehničke supstance i preparata u testovima embriotoksičnosti za *Danio rerio*

Aktivna supstanca	Radni materijal	mg a.s./l ISO
Klomazon	Tehnička supstanca	3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100
	Rampa <sup>®</sup> EC	4; 8,15; 9,33; 10,67; 12; 16
	GAT Cenit 36 CS	25; 50; 75; 100

Tretmani u svim eksperimentima, kao i kontrola, su postavljeni u tri ponavljanja. U svaki sud (šolja za kristalizaciju od 80 ml) odmereno je po 40 ml rastvora odgovarajuće koncentracije i kontrolnog medijuma i zatim je dodato po 20 embriona. Sudovi su, zatim, pokriveni sahatnim staklima da bi se izbeglo povećanje koncentracije usled isparavanja test rastvora. Postavka eksperimenata završena je stavljanjem svih sudova u komoru sa kontrolisanim uslovima, temperaturom  $27 \pm 1$  °C i fotoperiodom 14:10 h (svetlo:tama). Izloženost eksperimentalnih životinja tehničkoj supstanci i preparatima u statičkim uslovima prekinuta je 120 hpf, a smrtnost i morfološke promene praćene su svakodnevno. Ispitivanja embriotoksičnosti tehničke supstance i preparata urađena su u dva nezavisna eksperimenta izvedena u različito vreme.

Smrtnost, morfološke promene i teratogenost (svako odstupanje od normalnog razvoja) praćeni su svakodnevno pregledom pod stereomikroskopom (OLYMPUS SZ61, Japan). Spontane kontrakcije repa praćene su kod embriona starosti 22 h. Svi embrioni su snimljeni (uEYE-1440, IDS Technologies), a nakon toga je pažljivim brojanjem registrovan broj spontanih pokreta svake jedinke tokom dva minuta. U ovoj fazi razvoja svi embrioni kod kojih je registrovano kašnjenje u razvoju  $\geq 4$  h označeni su kao nerazvijeni i utvrđena je učestalost pojave ovakvih jedinki. Istovremeno, beležen je i broj jedinki normalnog razvoja kod kojih su spontane kontrakcije u potpunosti izostale. Srčani ritam meren je kod 48 hpf embriona direktnom opservacijom tokom 20 s. Broj izvaljenih embriona registrovan je svakodnevno, počevši od 48 hpf, a na osnovu procenta izvaljenih embriona u svakom ponavljanju utvrđeno srednje vreme izvaljivanja embriona (HT<sub>50</sub>). Pojava edema praćena je kod embriona starosti 96 i 120 h. Kraniofacijalne deformacije, odustvo/neispunjenost mehura i deformacije kičme i vrha repa, praćene su kod jedinki starosti 120 h. Na kraju eksperimentalnog perioda sve jedinke su anestetizirane trikain metansulfonatom (MS222, CAS broj 886-86-2, Sigma

Aldrich; 150 mg/l), prebačene u metilcelulozu (CAS broj 9004-67-5), pozicionirane lateralno (Slika 7) i fotografisane (PROMICRA, Republika Češka). Dužina svake jedinke, od glave do kraja repa (bez kaudalnog peraja), merena je pomoću softvera QuickPhoto Micro 2.3.

Kriterijum prihvatljivosti testa prema metodi (OECD, 2013) ispunjen je ukoliko je preživljavanje u kontroli  $\geq 70\%$ , koncentracija rastvorenog kiseonika  $\geq 60\%$  i temperatura tokom testa konstantna ( $26 \pm 1,5$  °C).



**Slika 7.** Jedinke *Danio rerio* (120 hpf) lateralno pozicionirane u metilcelulozi

#### **4.3.5. Ispitivanje teratogeneze embriona žabe – *Xenopus* (FETAX)**

Ispitivanja na vrsti *Xenopus laevis* izvedena su u Laboratoriji RECETOX na Prirodno-matematičkom fakultetu Masarik Univerziteta u Brnu.

##### **4.3.5.1. Test organizam**

Laboratorijsku populaciju *X. laevis* činili su polno zreli mužjaci i ženke, starosti minimum tri godine. Po dva mužjaka i dve ženke odgajani su u kadicama zapremine 14 l, u dechlorisanoj vodovodnoj vodi ( $\text{CaCO}_3$  100-180 mg/l,  $\text{NO}_3^-$  10-25 mg/l, pH 7,0-7,2), pri temperaturi  $19 \pm 2$  °C (održavanje temperature sobe za odgajivanje) i svetlosnom režimu 12:12 h (svetlost/tama). Životinje su hranjene tri puta nedeljno mlevenim iznutricama.

U cilju obezbeđivanja embriona za eksperimente i uspešne reprodukcije, parovi su podvrgnuti hormonskoj stimulaciji (Slika 8a). Injektiranje gonadotropina (Pregnyl, proizvođač N.V. Organon, Holandija) direktno u jajnike ženki i semenike mužjaka rađeno je u dva navrata – 7 do 10 dana pre postavljanja eksperimenta (pred-stimulacija) i 12 h pre sakupljanja embriona (stimulacija). U pred-stimulaciji injektirano je 150 IU hormona za ženke i 75 IU hormona za mužjake, a u stimulaciji 300 i 150 IU. Nakon stimulacije, pojedinačni parovi su prebačeni u zasebne kadice zapremine 12 l, ispunjene FETAX test rastvorom (ASTM, 1991; Tabela 10) bazne reakcije (pH=9,2). Na dno kadice postavljena je mreža za sakupljanje embriona, temperatura je regulisana grejačima (21 °C) (Aquale AQn 50), a zasićenost kiseonikom aeratorima (Eheim Air pump 200) (Slika 8b).



**Slika 8.** (a) Hormonska stimulacija odraslih jedinki vrste *Xenopus leavis* injektiranjem gonadotropina u jajnike/semenike i (b) ležuci parovi 12 h nakon stimulacije u tankovima za razmnožavanje

**Tabela 10.** Sastav FETAX (*Frog Embryo Toxicity Assay Xenopus*) test rastvora (ASTM, 1991)

Supstance	mg/l destilovane vode
NaCl	625
NaHCO <sub>3</sub>	96
KCl	30
CaCl <sub>2</sub>	15
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	60
MgSO <sub>4</sub>	75

Dvanaest sati nakon stimulacije parovi su uklonjeni iz kadica i pristupljeno je prikupljanju embriona. Embrioni su pregledani pod stereomikroskopom (OLYMPUS, Japan) i nakon što je utvrđeno da je deoba ćelija počela, pipetom su sakupljena vitalna jaja i eksperimenti postavljeni ne kasnije od 7 hpf. Vitalnim jajima su smatrani svi embrioni kod kojih se jasno videla marginalna zona između animalnog (tamno siva regija, gornji deo blastocela) i vegetativnog pola (bela regija, donji deo blastocela).

#### 4.3.5.2. Eksperimentalna postavka

Eksperimenti su izvedeni prema standardnoj metodi ASTM (1991). Tretmani svih eksperimenata postavljeni su u tri, a kontrole u šest do osam ponavljanja. U svaki sud (petri šolje od 25 ml) odmereno je po 10 ml rastvora odgovarajuće koncentracije tehničke supstance/preparata i kontrolnog medijuma i prebačeno po 25 embriona. Nakon toga šolje su pokrивane poklopcima, kako bi se izbegle promene u koncentraciji rastvora usled isparavanja, a zatim prebačene u komoru sa kontrolisanim uslovima, temperaturom  $21 \pm 2$  °C i fotoperiodom 12:12 h (svetlo:tama). Izlaganje embriona *X. laevis* tehničkoj supstanci i preparatima u semi-statičkim uslovima (zamena rastvora na 24 h) je trajalo 96 h, a smrtnost i morfološke promene praćene su svakodnevno. Ispitivanja embriotoksičnosti tehničke supstance i dva preparata klomazona urađena su postavkom dva nezavisna eksperimenta izvedena u različito vreme.

Prva serija oglada bila je postavljena u šest istih koncentracija za tehničku supstancu i preparate (3,1; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 mg/l). Na osnovu rezultata dobijenih proverom toksičnosti tehničke supstance i preparata promenjen je opseg koncentracija (Tabela 11). Kao i u ispitivanjima sa vrstama *D. magna* i *D. rerio* gornja granica ispitivanih koncentracija nije prelazila 100 mg/l.

**Tabela 11.** Nominalne radne koncentracije tehničke supstance i preparata u testovima embriotoksičnosti za *Xenopus laevis*

Aktivna supstanca	Radni material	mg a.s./l FETAX rastvora
Klomazon	Tehnička supstanca	25; 35; 45; 60; 75; 100
	Rampa <sup>®</sup> EC	12,5; 18; 25; 30; 38; 50
	GAT Cenit 36 CS	3,1; 6,3; 12,5; 25; 50; 100

Smrtnost, morfološke promene i teratogenost praćeni su svakodnevno pregledom pod stereomikroskopom. Pojava edema registrovana je kod jedinki starosti 72 i 96 h, dok su aksijalne (kićma, rep i peraja) i druge deformacije (facijalne, okularne, digestivne i pojava plihova) registrovane kod embriona 96 hpf. Na kraju eksperimentalnog perioda sve jedinke su anestetizirane trikain metansulfonatom (MS222, 600 mg/l), a zatim fotografisane (PROMICRA, Republika Ćeška). Dućina svake jedinke, od glave do kraja repa, merena je pomoću softvera QuickPhoto Micro 2.3.

Prema smernicama metode eksperiment je prihvatljiv i validan ako su ispunjeni sledeći kriterijumi: udeo uginulih i/ili deformisanih jedinki u kontroli <10%, razvojni stadijum embriona na poćetku eksperimenta je od “8 blastula” (5 hpf) do “11 gastrula” (11 hpf), i pH vrednost ratvora u intervalu 6,5-9.

#### **4.4. *In vitro* eseji procene citotoksićnih efekata za ćelijsku liniju RTGill-W1 (*Oncorhynchus mykiss*)**

Ispitivanja na ćelijskoj liniji RTgill-W1 izvedena su u Laboratoriji RECETOX na Prirodno-matematićkom fakultetu Masarik Univerziteta u Brnu.

##### *4.4.1. Ćelijska linija i odrćavanje*

Ćelijska linija RTgill-W1 poreklom je od epitelnih ćelija škrge kalifornijske pastrmke (Bols et al., 1994). Ćelije su odrćavane u sterilnim 75 cm<sup>2</sup> flašama (flaskovima) za odgajivanje. Nakon zasejavanja ćelije su rasle 7-10 dana u L-15 medijumu, obogaćenim sa 5% FBS i gentamicinom. Nakon dostizanja konfluentnosti (gustina pokrivenosti dna flaše 80-90%) ćelije su presejavane (1:2) u nove flaše (Schirmer et al., 1997). Pre presejavanja sve flaše su pregledane pod mikroskopom radi provere potencijalnog zagađenja. Zatim je, pod sterilnim uslovima, uklonjen stari medijum, a ćelije su isprane fosfatnim puferom (PBS). Nakon ispiranja, dodat je tripsin (CAS L11-002, PAA; 1 ml) koji je neophodan za odvajanje ćelija od zidova flaša (<5 min) i razbijanje klastera. Delovanje tripsina zaustavljeno je dodavanjem L-15 medijuma (10 ml), suspenzija ćelija je podeljena u dva jednaka alikvota, raspoređena u dve flaše i ćuvana u komori sa regulisanim uslovima (20 °C) za dalje korišćenje.

#### 4.4.2. Eksperimentalna postavka

Vijabilitet ćelija RTgill-W1, kao pokazatelj citotoksičnosti tehničke supstance i dva preparata klomazona, meren je na osnovu tri eseja citotoksičnosti. Esej sa bojom alamar plavo (AB; CAS broj DAL1100, Invitrogen) indikator je metaboličke aktivnosti, a zasniva se na redukciji nefluorescentnog resuzarina (boja AB) do fluorescentnog oblika rezorufina. Redukcija se obavlja delovanjem enzima diaforaza, u mitohondrijama i citoplazmi, a smanjenje fluorescencije ukazuje na opadanje metaboličke aktivnosti ćelije. Esej sa bojom 5-karboksifluorescein diacetat acetoksimetil estar (CFDA-AM) (supstrat estra) indirektno ukazuje na narušavanje integriteta ćelijske membrane. Naime, nefluorescentni CFDA-AM (CAS broj C1345, Invitrogen) se, nakon ulaska u ćeliju, nespecifičnim esterazama prevodi u fluorescentni oblik u kom napušta ćeliju (5-karboksifluorescein), a smanjenje fluorescencije indikator je narušavanja integriteta ćelijske membrane. Esej sa bojom neutralno crveno (NR; CAS broj N2889, Sigma Aldrich) indikator je narušavanja lizozoma. Ovaj esej zasniva se na akumulaciji boje u lizozomima vitalnih ćelija, pa smanjenje akumulacije ukazuje na poremećaj membrane lizozoma.

Eseji su rađeni po smernicama standardne operativne procedure CS-02 (Tanneberger and Knöbel, 2014) ustanovljene u okviru projekta CEIISens (<http://cefic-iri.org/projects/eco8-development-of-a-strategy-to-predict-acute-fish-lethality-using-fish-cell-lines-and-fish-embryos/>) kao internacionalni test kalibracije metode (ring test) provere citotoksičnosti za RTgill-W1 ćelije (Tanneberger et al., 2013). Protokol ISO/CD 21115 (Determination of acute toxicity of chemicals and water samples to a fish gill cell-line RTgill-W1) još uvek je u fazi pripreme.

Dan pre početka izlaganja ćelije gustine  $3,5 \times 10^5$  su zasejane u mikrotitar ploče (96-bunarčića) u 200  $\mu$ l L-15 medijuma i stavljene na inkubaciju u komoru sa kontrolisanim uslovima (20 °C, u mraku) kako bi se vezale za zidove. Ćelije su dodate u sve, izuzev bunarčića u prvom redu, u koje je dodata ista zapremina L-15 medijuma (slepa proba). Dimetil sulfoksid (DMSO) čistoće 99,9% (CAS broj 67-68-5, Sigma Aldrich) korišćen je kao pozitivna kontrola (10 i 20% rastvor).

Sledećeg dana L-15 medijum sukcijom je uklonjen iz svih bunarčića, ćelije su isprane medijumom, i započeto je postavljanje eksperimenta. Za ekspoziciju ćelija korišćen je L-15 medijum bez FBS (L-15/ex). U kontrolne i bunarčiće sa slepom probom dodat je L-15/ex, a pripremljene serije koncentracija tehničke supstance i preparata dodate su u odgovarajuće redove. Nakon toga mikrotitar ploče su prekrivene adhezivnom folijom, uvijene u aluminijumsku foliju i prebačene u komoru sa kontrolisanim uslovima u trajanju od 24 h (20 °C, u mraku). Ispitivanja citotoksičnosti tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS urađena su postavkom tri nezavisna eksperimenta u različito vreme.

Koncentracioni opseg u preliminarnim ogledima bio je isti za tehničku supstancu i dva preparata (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; i 100 mg/l). Kod ispitivanja sa tehničkom supstancom opseg ispitivanih koncentracija je proširen, i nakon drugog testiranja definisan (Tabela 12). I kod ispitivanja sa preparatom Rampa<sup>®</sup> EC krajnje koncentracije (Tabela 12) određene su nakon još jedne eksperimentalne postavke (2,4; 3,8; 6,1; 9,8; 15,6; i 25 mg/l). Kod ispitivanja sa preparatom GAT Cenit 36 CS koncentracioni opseg preliminarnih i krajnjih ispitivanja nije se razlikovao.

**Tabela 12.** Nominalne radne koncentracije tehničke supstance i preparata u testovima citotoksičnosti za ćelije linije RTgill - W1

Aktivna supstanca	Radni materijal	mg a.s./l L-15/ex
Klomazon	Tehnička supstanca	23,2; 32,5; 45,6; 63,8; 89,3; 125
	Rampa <sup>®</sup> EC	2,2; 2,8; 3,6; 4,7; 6,2; 8
	GAT Cenit 36 CS	3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100

Nakon 24-časovnog izlaganja ćelija tehničkoj supstanci i preparatima klomazona citotoksičnost je utvrđena pomoću tri eseja sa fluorescentnim indikator bojama. Boje su dodavane na isti set ćelija (sve tri boje, sukcesivno) (Boaru et al., 2006), a citotoksičnost je određena fotometrijski merenjem fluorescencije tri boje: AB, CFDA-AM i NR.

Boje AB i CFDA-AM pripremane su i primenjene zajedno u PBS (ukupna zapremina rastvora boja 100 µl/bunarčiću) u koncentraciji 5% (v/v) i 4µM, redom (Schirmer et al., 1997). Nakon dodavanja boja ćelije su vraćene u komoru sa kontrolisanim uslovima 30 min, a zatim je merena fluorescencija na 493/541 nm (eskcitacija/emisija) za CFDA-



AM i 530/595 nm za AB. Rastvor boja je zatim odbačen, a u svaki bunarčić dodato je po 100 µl rastvora boje NR u PBS-u koncentracije 1,5% (v/v) i ćelije su vraćene na inkubaciju u trajanju od 60 min (Dayeh et al., 2003). Pre merenja fluorescencije na 530/645 nm boja je odbačena, ćelije tretirane fiksativom, a nakon njegovog uklanjanja puferom za liziranje.

#### 4.5. Procena rizika za akvatične organizme

Procena rizika bazirala se na poređenju toksičnosti klomazona za akvatične organizme i ekspozicije na osnovu predviđenih koncentracija supstance u životnoj sredini (PEC) generisanih u programu FOCUS SWASH 5,3 (EC, 2002).

Ispitivanjima u okviru ove disertacije prikupljeni su podaci o toksičnosti tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS za akvatične organizme. Osim ovih podataka, za potrebe procene rizika, korišćeni su još i podaci Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA, 2007) o toksičnosti aktivne supstance. U obzir su uzeti samo slatkovodni organizmi. Kod ispitivanja sa akvatičnim makrofitama inhibicija rasta merena je preko više parametara (*Lemna*: BJ, PJ, MSv; *Myriophyllum*: DS, DU, MSv, MK), a u procenu rizika uključena je najniža izračunata IC<sub>50</sub> vrednost.

U programu FOCUS moguće je izračunati PEC vrednosti za četiri nivoa procene rizika. Prva dva nivoa predstavljaju najgore moguće scenarije, dok su treći i četvrti nivo realističniji i njihovo izračunavanje zasniva se na specifičnim pojedinostima poljoprivredne prakse različitih delova Evrope. U programu nije bilo moguće uraditi izračunavanje PEC vrednosti za preparate, jer nisu bili dostupni podaci o vrsti i sadržaju pomoćnih materija u ispitivanim preparatima. Na taj način procena rizika od upotrebe različito formulisanih preparata bazira se na toksičnosti samih preparata, ali PEC vrednosti generisanih na osnovu svojstava aktivne supstance, odnosno PEC vrednosti su iste za oba tipa formulacija.

Za potrebe procene rizika od klomazona za akvatične organizme, rađene u ovoj disertaciji, bilo je potrebno utvrditi PEC za tri nivoa procene rizika. Prema preporukama u našoj zemlji (Spasić, 2016) klomazon se primenjuje inkorporacijom u zemljište pre setve ili tretiranjem zemljišta pre nicanja biljaka, u usevima soje ili uljane repice, sa količinom primene od 270 g a.s./ha. Vrednosti PEC izračunate su na osnovu primene

klomazona tretiranjem zemljišta (jedan tretman), u usevu soje. U modelovanje za PEC vrednosti prvog nivoa procene rizika uključeni su podaci o fizičko-hemijskim svojstvima aktivne supstance: rastvorljivost (1100 mg/l),  $DT_{50}$  voda (52 dana) i  $K_{oc}$  (286). Udaljenost parcele od vodene površine (prema propozicijama programa) je 1m, a osobine vodene površine su: dubina – 30 cm, visina sedimenta – 5 cm, sadržaj organske materije sedimenta – 5%, gustina sedimenta – 0,8 kg/l. Drift je iznosio 2,8% primenjene količine, a kao glavni putevi dospevanja herbicida naznačeni su spiranje i ispiranje (10% od primenjene količine, ukupno). Kod računanja PEC vrednosti drugog nivoa procene rizika još je obuhvaćeno: zadržavanje na biljci (*interception* - 0%), region i vreme primene (južna Evropa, proleće) i  $DT_{50}$  u zemljištu i sedimentu ( $DT_{50}$  zemljište: 167 dana;  $DT_{50}$  sediment: 1000 dana). Udeo supstance koji driftom dospeva do vode je isti kao kod modelovanja PEC prvog nivoa, dok spiranjem i ispiranjem u vodenu sredinu dospeva 4% od primenjene količine.

Kod generisanja PEC vrednosti trećeg nivoa procene rizika, kao realističnijeg slučaja, u obzir su uzeti: mogući putevi dospevanja pesticida u vode, biljna kultura koja se tretira, površinske vode (jezera, kanali, potoci), klimatski uslovi (padavine i temperatura), topografija, sastav zemljišta i poljoprivredna praksa. Od deset scenarija definisanih na osnovu različitih tipova zemljišta, klime i karakteristika reljefa širom Evrope, za zadati kriterijum zaštite useva soje, ponuđena su dva scenarija – R3 (Bolonja) i R4 (Roujan). Kod oba ponuđenja scenarija dospevanje herbicida u vode odvija se kombinacijom spiranja i drifta. Karakteristike scenarija (R3 i R4) su: prosečna prolećna i jesenja temperatura  $>10$  °C, prosek godišnjih padavina 600-1000 mm, nagib terena 4-10% i zemljišta sastava gline i praškaste ili umerene ilovače, sa malim sadržajem organske materije (FOCUS, 2015).

Nakon što su prikupljeni podaci o toksičnosti i izloženosti, urađena je stepenasta procena rizika za akvatične ekosisteme u blizini obradivih površina na dva nivoa. Prvi nivo procene rizika urađen je na dva načina: a) preko odnosa toksičnosti i izloženosti (TER), i b) preko regulatorno prihvatljivih koncentracija (RAC), a drugi modelovanjem distribucije osetljivosti vrsta (SSD).

Vrednosti TER predstavljaju količnik srednjih efektivnih/imobilizacionih/letalnih koncentracija ( $EC_{50}/IC_{50}/LC_{50}$ ) i predviđenih koncentracija u životnoj sredini – PEC.

Dalje je poređenjem dobijenih TER vrednosti sa graničnim vrednostima propisanim za različite vrste i tipove ispitivanja (akutno/hronično) (EC, 2002) utvrđen rizik koji upotreba klomazona nosi za akvatične organizme.

Kod upotrebe drugog modela, RAC vrednosti dobijene su tako što je toksičnost korigovana definisanim faktorom procene (*assessment factor* – AF) (EFSA, 2013), koji kod akutnih ispitivanja iznosi 100, a kod hroničnih i ispitivanja sa akvatičnim makrofitama i algama 10. Poređenjem dobijenih RAC sa PEC vrednostima utvrđen je rizik koji primena klomazona nosi za akvatične organizme.

Model distribucije osetljivosti vrsta (SSD) izveden je na osnovu rezultata o toksičnosti klomazona za vrste *L. minor* i *M. aquaticum* dobijenih u okviru ove disertacije i literaturnih podataka (Jonsson et al., 1995; Michel et al., 2004; EFSA, 2007; Silva et al., 2012) korišćenjem softvera ETX 2.1 (RIVM, Holandija). Izračunate su hazardne koncentracije za određenu frakciju vrsta vodenih biljaka (5%), a upotrebom korigovanog faktora procene (AF=3) izračunate su RAC vrednosti.

#### 4.6. Statistička analiza

Statistička obrada podataka urađena je primenom softverskog paketa Graph Pad Prizm verzija 5.0 (Graph Pad Software, USA) i STATISTICA 7 (StatSoft, USA). Vrednosti IC<sub>50</sub>, IC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub> i LC<sub>50</sub> su izračunate preko dozno zavisne nelinearne logaritamske regresione krive (log logistički model), na osnovu vrednosti izmerenih koncentracija. Vrednosti dobijene na osnovu dva ili više nezavisnih eksperimenata izračunate su objedinjeno, nakon što je dokazano da se kontrolne grupe, i vrednosti EC/LC<sub>50</sub> pojedinačnih eksperimenata, nisu statistički značajno razlikovale.

Procentualna vrednost inhibicije rasta makrofita (*L. minor* i *M. aquaticum*) izračunata je iz odnosa RGR i/ili Y tretmana i kontrole. Vrednost RGR izračunata je prema sledećoj formuli:

$$RGR = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$$

gde je: RGR – relativna stopa rasta, N<sub>j</sub> – mereni parametar na kraju testa, N<sub>i</sub> – mereni parametar na početku testa, t<sub>j</sub> – vreme kraja testa, t<sub>i</sub> – vreme početka izvođenja testa.

Inhibicija rasta (%) na osnovu relativne stope rasta izračunata je prema formuli:

$$I_r = \frac{RGR_C - RGR_T}{RGR_C} \cdot 100$$

gde je:  $I_r$  (%) – procenat inhibicije rasta parametra,  $RGR_C$  – relativna stopa rasta kontrole,  $RGR_T$  – relativna stopa rasta za određenu koncentraciju tretmana.

Inhibicija rasta na osnovu vrednosti prinosa određena je prema formuli:

$$I_y = \frac{b_C - b_T}{b_C} \cdot 100$$

gde je:  $I_y$  (%) – procenat inhibicije rasta parametra,  $b_C$  – razlika krajnje i početne vrednosti parametra u kontrolnoj grupi,  $b_T$  – razlika krajnje i početne vrednosti parametra za određeni tretman.

Nakon ekstrakcije hlorofila apsorbancija je očitavana na talasnim dužinama: 666 nm (hlorofil *a*) i 653 nm (hlorofil *b*), a koncentracije hlorofila *a* i *b* izračunate su prema sledećim formulama:

$$C_{Chl\ a} = 15.65 \cdot A_{666} - 7.34 \cdot A_{653}$$

$$C_{Chl\ b} = 27.05 \cdot A_{653} - 11.21 \cdot A_{666}$$

$$C_{Chl\ total} = C_{Chl\ a} + C_{Chl\ b}$$

Preračunavanje koncentracije hlorofila, izražene u  $\mu\text{g/ml}$  u  $\text{mg/g}$  sveže biljne mase obavljeno je prema formuli:

$$C = \frac{c \cdot V \cdot R}{m \cdot 1000}$$

gde je:  $C$  – koncentracija pigmenta ( $\text{mg/g}$ ),  $c$  – koncentracija pigmenta ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $V$  – ukupna zapremina ekstrakta (ml),  $R$  – faktor razblaženja (ukoliko je ekstrakt razblaživan),  $m$  – masa svežeg uzorka (g), 1000 – faktor za prevođenje  $\mu\text{g}$  u  $\text{mg}$ .

Pre analize varijanse (ANOVA) normalnost je ispitana primenom D'Agostino-Pirsonovog testa.

Jednofaktorska ANOVA urađena je radi poređenja efekata tretmana i kontrole kod vrsta: *L. minor*, *M. aquaticum*, *D. rerio* (spontane kontrakcije, rad srca i dužina jedinki) i *X. laevis* (dužina jedinki). Kada je utvrđeno da razlike postoje, kao post-test za poređenje grupa korišćen je Dunnet-ov (multiple comparison) test. Ukoliko podaci nisu imali normalnu raspodelu rađena je neparametarska jednofaktorska analiza varijanse po metodi Kruskal – Wallis-a. U tom slučaju poređenje grupa rađeno je Dunn-ovim metodom.

Kod određivanja značajnih razlika između tretmana i kontrolne grupe za smrtnost i teratogene efekte (u eksperimentima sa *D. rerio* i *X. laevis*) korišćen je Hi kvadrat test (Fisher exact). Vrednosti NOEC i LOEC određene su Dunnet-ovim testom (kada nije ispunjen uslov normalne distribucije eksperimentalnih podataka poređenja grupa su urađena metodom Dunn-a) i Fisher-ovim egzaktnim testom.

Srednje vreme izvaljivanja (HT<sub>50</sub>) embriona *D. rerio* izračunato je preko nagiba dozno zavisne nelinearne logaritamske regresione krive (log normalni model).

Kod ispitivanja sa vrstama *D. rerio* i *X. laevis* na osnovu odnosa EC<sub>50</sub> i LC<sub>50</sub> vrednosti izračunat je indeks teratogenosti, prema formuli:

$$TI = \frac{EC_{50}}{LC_{50}}$$

gde je: TI – indeks teratogenosti, EC<sub>50</sub> – srednja efektivna koncentracija za pojavu deformacija nakon izlaganja u trajanju od 96/120 časova, LC<sub>50</sub> – srednja smrtna koncentracija nakon izlaganja u trajanju od 96/120 časova.

Dvofaktorska analiza varijanse korišćena je za poređenje efekata između tehničke supstance i preparata kod vrsta: *L. minor*, *M. aquaticum*, *D. magna*, *D. rerio* i *X. laevis*. Transformacija podataka rađena je prema formuli:

$$X = \sqrt{(Xi + b)}$$

Gde je: X – transformisana vrednost, Xi – procenat praćenog efekta normalizovan u odnosu na kontrolu, b – korektivni faktor. Kada je utvrđeno da razlike između grupa

postoje, za dalje poređenje razlika između tretmana sa tehničkom supstancom i preparatima korišćen je Duncan-ov post-test.

Kod utvrđivanja citotoksičnosti na osnovu očitavanih sirovih vrednosti fluorescentnih jedinica (FU) izračunat je vijabilitet ćelija. Vijabilitet ćelija izražen je kao procenat kontrolnih ćelija. Pre računanja vijabiliteta ćelija urađena je korekcija očitavanih FU kontrolnih i bunarčića tretmana, tako što im je oduzeta srednja vrednost FU bunarčića iz slepe probe. Vijabilitet ćelija (% kontrole) izračunat je prema sledećoj formuli:

$$Iv = \frac{FU_T}{FU_C} \cdot 100$$

gde je:  $Iv$  – vijabilitet ćelija kao procenat kontrole,  $FU_T$  – vrednost fluorescentnih jedinica tretiranih ćelija umanjen za FU slepe probe,  $FU_C$  – vrednost fluorescentnih jedinica kontrolnih ćelija umanjen za FU slepe probe.

## 5. REZULTATI

U okviru ovog poglavlja prikazani su rezultati ispitivanja toksičnosti tehničke supstance i dva preparata na bazi klomazona na akvatične organizme. Ispitivanja su urađena na dve vrste makrofita: *Lemna minor* i *Myriophyllum aquaticum*, kladoceri *Daphnia magna*, embrionima ribe *Danio rerio*, embrionima žabe *Xenopus laevis* i epitelnim ćelijama škrga *Oncorhynchus mykiss* (ćelijska linija RTGill-W1). Takođe, prikazani su rezultati procene rizika na osnovu preporučenih količina primene klomazona u našoj zemlji i objedinjenih rezultata toksičnosti dobijenih u okviru ispitivanja, za potrebe ove doktorske disertacije, i literaturnih podataka.

Kriterijumi validnosti testova, navedeni u okviru poglavlja 4, bili su ispunjeni, te rezultate eksperimenata možemo smatrati pouzdanim (Prilog 1).

Hemijskom analizom potvrđeno je da izmerene koncentracije tehničke supstance i preparata GAT Cenit 36 CS u medijumu nisu značajno odstupale od nominalnih (<20%), dok su izmerene koncentracije aktivne supstance bile više (20-25%) u tretmanima sa preparatom Rampa® EC (Prilog 2-7). Prikazane LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> vrednosti izračunate su na osnovu izmerenih vrednosti aktivne supstance, a vrednosti nominalnih i merenih koncentracija prikazane su u tabelama rezultata. Poređenja efekata između tehničke supstance i preparata urađena su na osnovu merenih koncentracija, za tretmane sa približnim ili istim koncentracijama.

### 5.1. Ispitivanje uticaja tehničke supstance klomazon i dva komercijalna preparata na akvatične makrofite

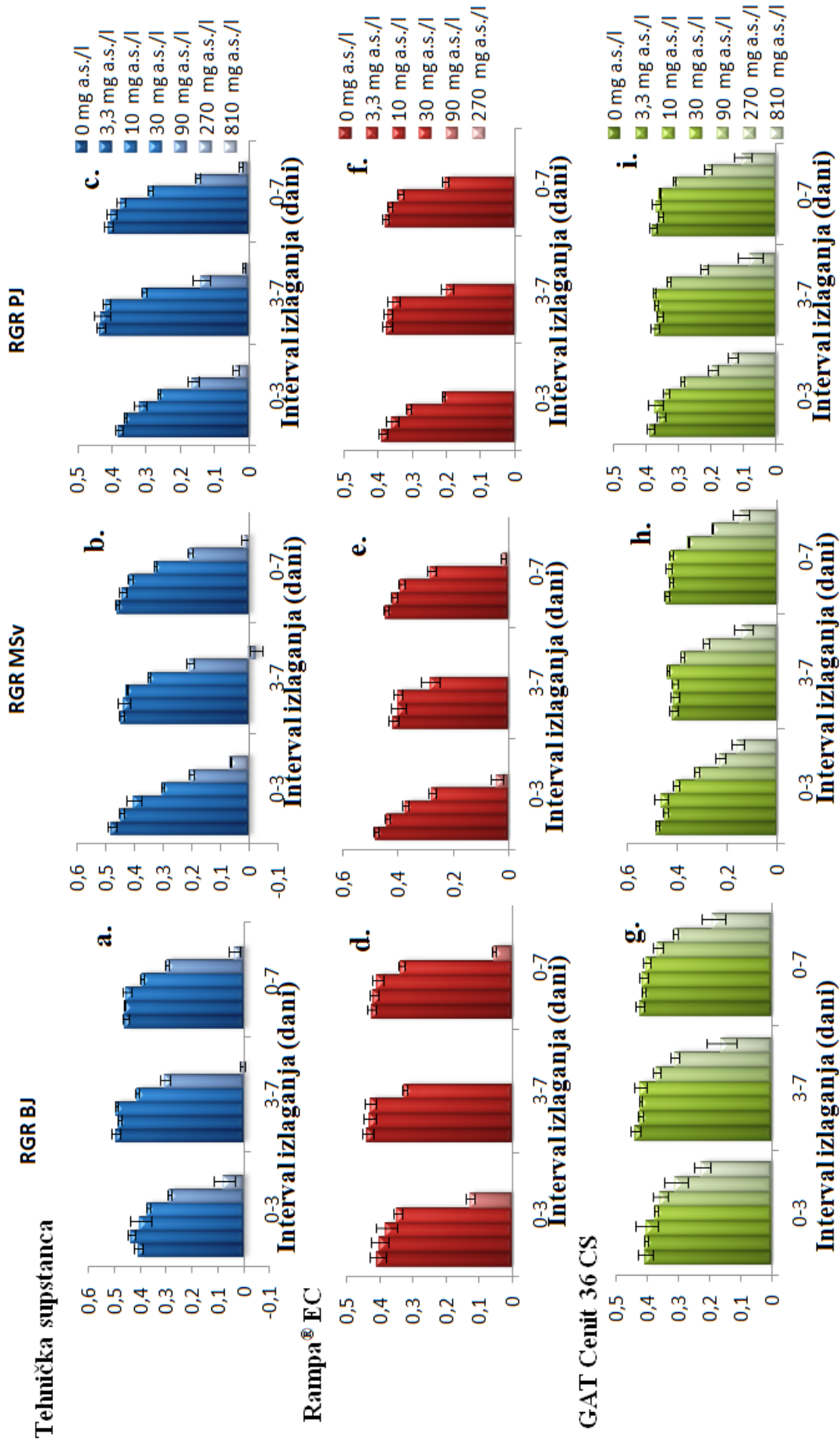
#### 5.1.1. Inhibicija rasta vrste *Lemna minor*

U ispitivanjima inhibicije rasta biljne vrste *L. minor* usled izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima na bazi klomazona, utvrđen je njihov negativan uticaj na sve ispitivane parametre (Grafikon 1). Statistički značajno ( $p < 0,01$ ) smanjenje stope rasta kolonije, na osnovu sveže mase (RGR MSv) nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci registrovano je u svim ispitivanim tretmanima. Slično, kod kolonija izlaganih preparatu Rampa® EC statistički značajna inhibicija rasta u odnosu na kontrolu registrovana je u

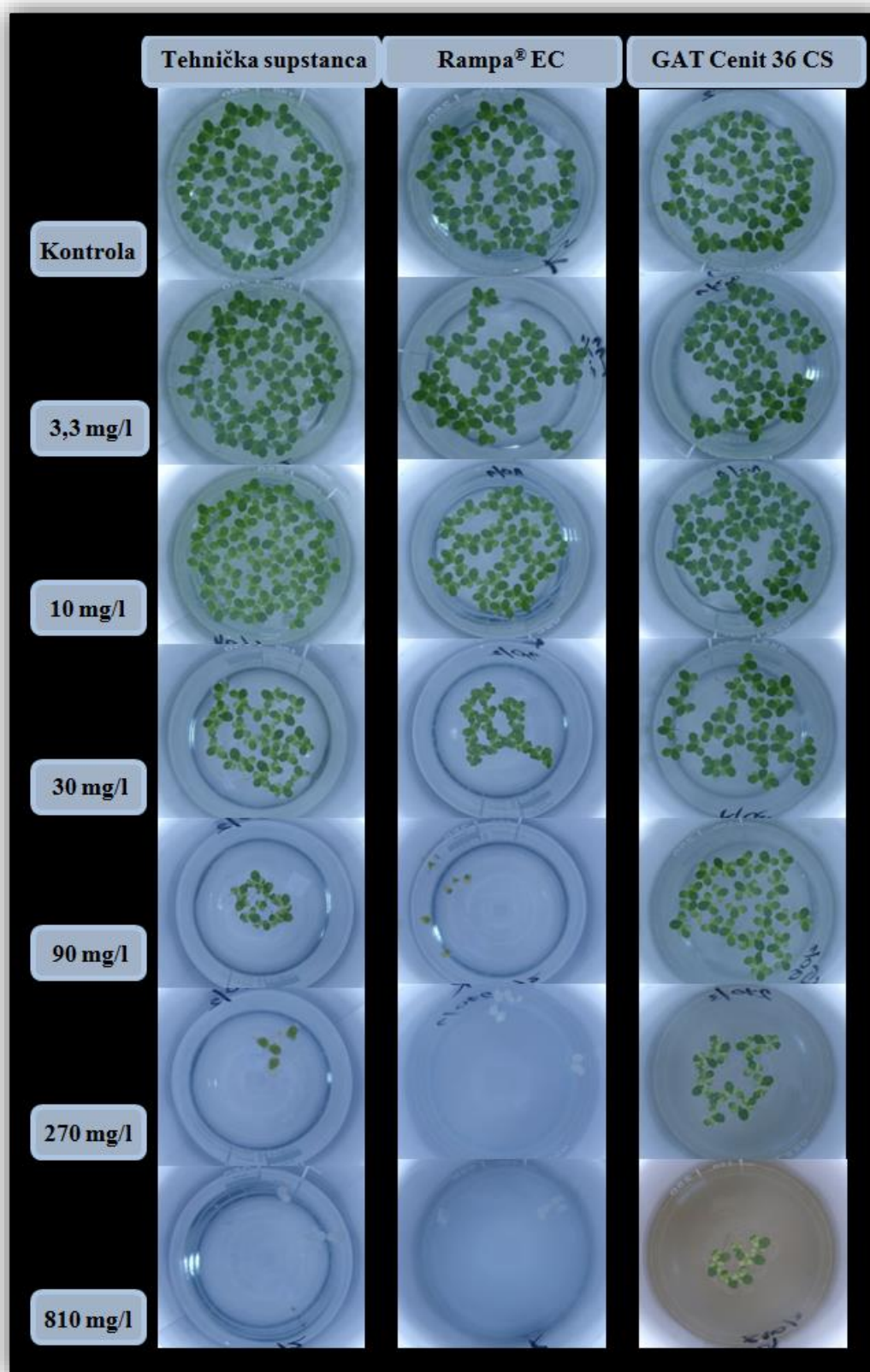
svim tretmanima, dok je kod jedinki izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS značajno smanjenje stope rasta utvrđeno počevši od tretmana sa 90 mg/l (Prilog 2, Tabela P2 a, b). Intervalnim praćenjem rasta (0-3 i 3-7 dana izlaganja) utvrđeno je smanjenje intenziteta inhibicije rasta *L. minor* u funkciji vremena (na osnovu MSv i PJ) (Grafikon 1). Ovo smanjenje utvrđeno je u tretmanima sa nižim koncentracijama tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC i u svim, izuzev tretmana sa najvišom ispitivanom koncentracijom preparata GAT Cenit 36 CS.

Vizuelnim pregledom, na kraju perioda izlaganja, razlike u odnosu na kontrolne biljke najpre su uočene u tretmanima sa 10 mg/l tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC, i 30 mg/l preparata GAT Cenit 36 CS (Slika 9). Uočene promene bile su u vidu blage hloroze. Sa porastom koncentracije izlaganja smanjenje brojnosti kolonije pratilo je deformisanje kolonija (ispupčavanje), a u tretmanima sa tehničkom supstancom i preparatom Rampa<sup>®</sup> EC parcijalno do potpuno izbeljivanje.





**Grafikon 1 (a-i).** Testovi inhibicije rasta vrste *Lemna minor*. Relativna stopa rasta, na osnovu broja (BJ – a, d, g), sveže mase (MSV– b, e, h) i površine jedinki (PJ – c, f, i) nakon izlaganja tehničkoj supstanci klorazon i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS tokom intervala 0-3 i 3-7 dana, kao i kumulativno 0-7 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.

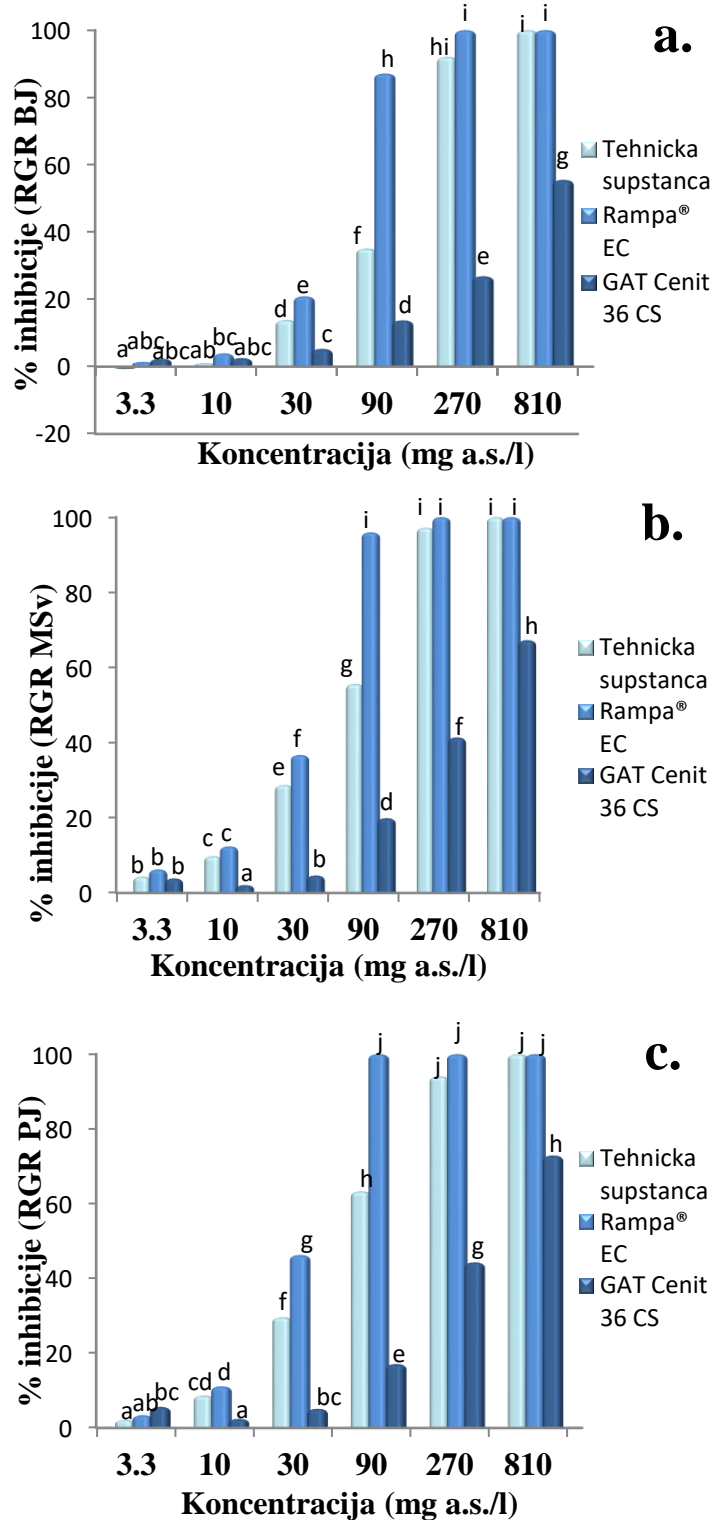


**Slika 9.** Izgled kolonija *Lemna minor* nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona.

Sadržaj fotosintetskih pigmenata, kao dodatni praćeni parametar, ispoljio je manju osetljivost prema tehničkoj supstanci i preparatima u odnosu na parametre rasta. Statistički značajno manji sadržaj hlorofila *a* (chl *a*) kod kolonija izlaganih tehničkoj supstanci i preparatu Rampa<sup>®</sup> EC utvrđen je počevši od tretmana sa 30 mg/l, dok kod kolonija izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolu nije bilo (Prilog 2, Tabela P3). Nešto veći uticaj tehničke supstance i preparata kloramazona utvrđen je za hlorofil *b* (chl *b*), sa statistički značajno manjim sadržajem u odnosu na kontrolu počevši od tretmana sa 10 mg/l tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC, odnosno 90 mg/l preparata GAT Cenit 36 CS.

Na osnovu procenata inhibicije stope rasta *L. minor* (RGR BJ, MSV, PJ) poređeni su efekti tehničke supstance i formulisanih preparata. Rezultati dvofaktorske analize varijanse ukazali su na statistički značajnu razliku u intenzitetu inhibicije, kako između tehničke supstance i preparata, tako i između dva različito formulisana preparata.

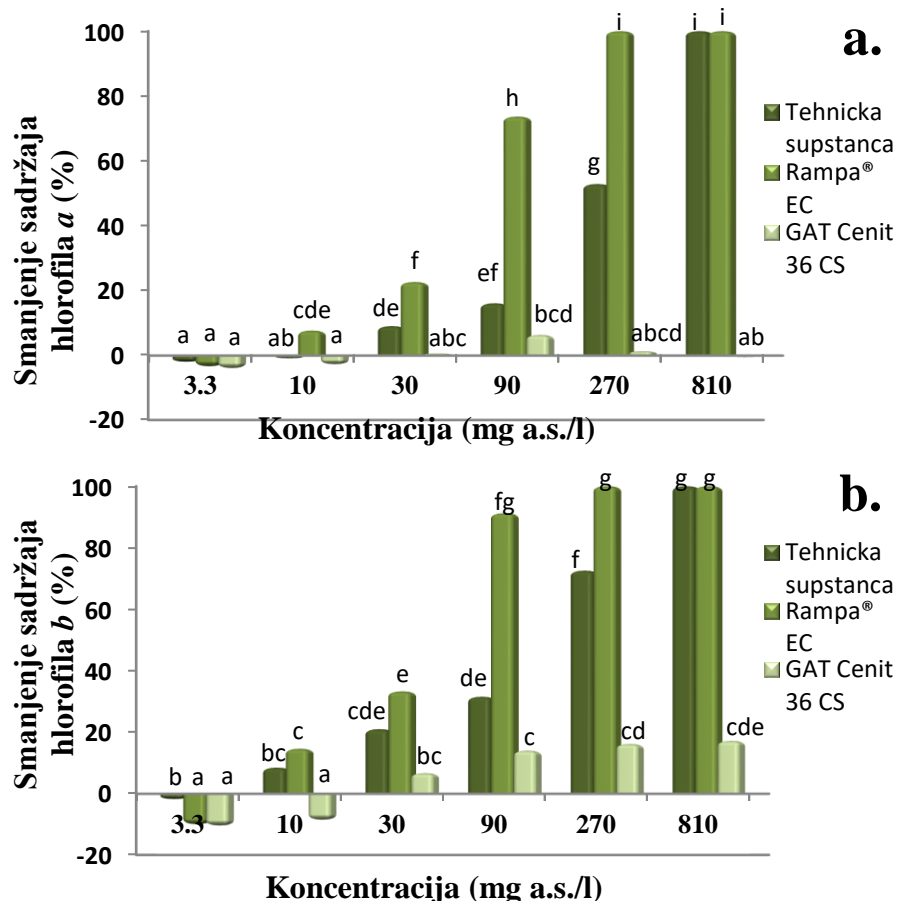
Već pri koncentraciji izlaganja 10 mg/l razlike u intenzitetu inhibicije rasta *L. minor* (RGR MSV i PJ) utvrđene su između tehničke supstance i preparata GAT Cenit 36 CS (Grafikon 2). Sa porastom koncentracije razlike intenziteta inhibicije registrovane su između tehničke supstance i oba preparata. U tretmanima sa 30 i 90 mg/l preparat Rampa<sup>®</sup> EC doveo je do statistički značajno veće inhibicije rasta u odnosu na tehničku supstancu, dok je preparat GAT Cenit 36 CS u svim tretmanima sa koncentracijom  $\geq 30$  mg/l doveo do značajno manjeg intenziteta inhibicije rasta. Rezultati su bili ujednačeni za sve praćene parametre, jedina razlika utvrđena je kod poređenja inhibicija rasta na osnovu broja jedinki u tretmanu sa 10 mg/l, gde razlika u intenzitetu inhibicije između tehničke supstance i preparata GAT Cenit 36 CS nije bilo.



**Grafikon 2 (a-c).** Poređenje intenziteta inhibicije (%) rasta *L. minor*, na osnovu a) broja (RGR BJ), b) sveže mase (RGR MSv) i c) površine jedinki (RGR PJ) nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Slično razlikama u intenzitetu inhibicije parametara rasta *L. minor*, preparat Rampa® EC ispoljio je najveći uticaj na smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata. Statistički značajno veće smanjenje sadržaja chl *a*, u odnosu na tehničku supstancu i preparat GAT Cenit 36 CS registrovano je počevši od tretmana sa 10 mg/l (Grafikon 3). Izuzetak je isti intenzitet smanjenja sadržaja chl *a* između preparata Rampa® EC i tehničke supstance u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom. U svim tretmanima preparat GAT Cenit 36 CS nije značajno uticao na smanjenje sadržaja chl *a*. Razlike u intenzitetu smanjenja sadržaja chl *b* između tehničke supstance i preparata Rampa® EC bile su statistički značajne jedino u tretmanima sa 90 i 270 mg/l. Smanjenje sadržaja chl *b* pod uticajem preparata GAT Cenit 36 CS, kao i kod sadržaja chl *a*, bilo je statistički značajno manje u poređenju sa tehničkom supstancom i preparatom Rampa® EC.



**Grafikon 3 (a, b).** Poređenje smanjenja sadržaja (%) fotosintetskih pigmenata, a) hlorofila *a* i b) hlorofila *b* nakon sedmodnevnog izlaganja vrste *Lemna minor* tehničkoj supstanci i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Poređenjem srednjih inhibitornih koncentracija ( $IC_{50}$ ) svih praćenih parametara utvrđen je najosetljiviji pokazatelj toksičnosti. Za tehničku supstancu i dva preparata najniža  $IC_{50}$  utvrđena je za inhibiciju rasta na osnovu površine jedinki (PJ). Kod kolonija izlaganih tehničkoj supstanci i preparatu GAT Cenit 36 CS ova vrednost bila je statistički značajno manja od  $IC_{50}$  vrednosti izračunate na osnovu broja jedinki (BJ), dok je kod izlaganja preparatu Rampa® EC bila niža u odnosu na broj (BJ) i svežu masu jedinki (MSv) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Srednje inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$ ) i koncentracije koje dovode do inhibicije rasta 10% ( $IC_{10}$ ) (sa 95% intervalima poverenja), najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat (NOEC) i najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajan efekat (LOEC) kod vrste *Lemna minor* nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS

<i>L. minor</i>	mg a.s./l	Stopa rasta (0-7)		
		RGR BJ	RGR MSv	RGR PJ
<b>Tehnički klomazon</b>	$IC_{50}^a$	99,2 ± 4,4 <sup>D</sup> (90,6 – 108,5)	59,9 ± 4,5 <sup>C</sup> (52,8 – 68,0)	54,0 ± 4,4 <sup>C</sup> (50,3 – 58,0)
	$IC_{10}^a$	36,3 (30,4-43,4)	13,9 (10,4-18,7)	12,8 (10,8-15,1)
	NOEC	10 <sup>b</sup> (8,2 <sup>a</sup> )	<3,3 <sup>b</sup> (3,0 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,0 <sup>a</sup> )
	LOEC	30 <sup>b</sup> (31,5 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,0 <sup>a</sup> )	10 <sup>b</sup> (8,2 <sup>a</sup> )
<b>Rampa® EC</b>	$IC_{50}^a$	51,3 ± 4,3 <sup>E</sup> (48,8 – 54,0)	38,7 ± 4,5 <sup>D</sup> (34,8 – 43,0)	33,3 ± 4,4 <sup>C</sup> (30,9 – 36,0)
	$IC_{10}^a$	24,1 (22,3-26,1)	16,4 (13,0-20,6)	14,2 (11,5-17,5)
	NOEC	10 <sup>b</sup> (10,9 <sup>a</sup> )	<3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )
	LOEC	30 <sup>b</sup> (32,8 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )	10 <sup>b</sup> (10,9 <sup>a</sup> )
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	$IC_{50}^a$	643,9 ± 4,6 <sup>D</sup> (536,5 – 772,7)	369,7 ± 4,5 <sup>C</sup> (328,0 – 416,7)	321,0 ± 4,5 <sup>C</sup> (285,6 – 360,7)
	$IC_{10}^a$	66,2 (45,7-86,5)	41,3 (31,6-53,8)	47,3 (36,4-61,7)
	NOEC	30 <sup>b</sup> (28,6 <sup>a</sup> )	30 <sup>b</sup> (28,6 <sup>a</sup> )	30 <sup>b</sup> (28,6 <sup>a</sup> )
	LOEC	90 <sup>b</sup> (85,9 <sup>a</sup> )	90 <sup>b</sup> (85,9 <sup>a</sup> )	90 <sup>b</sup> (85,9 <sup>a</sup> )

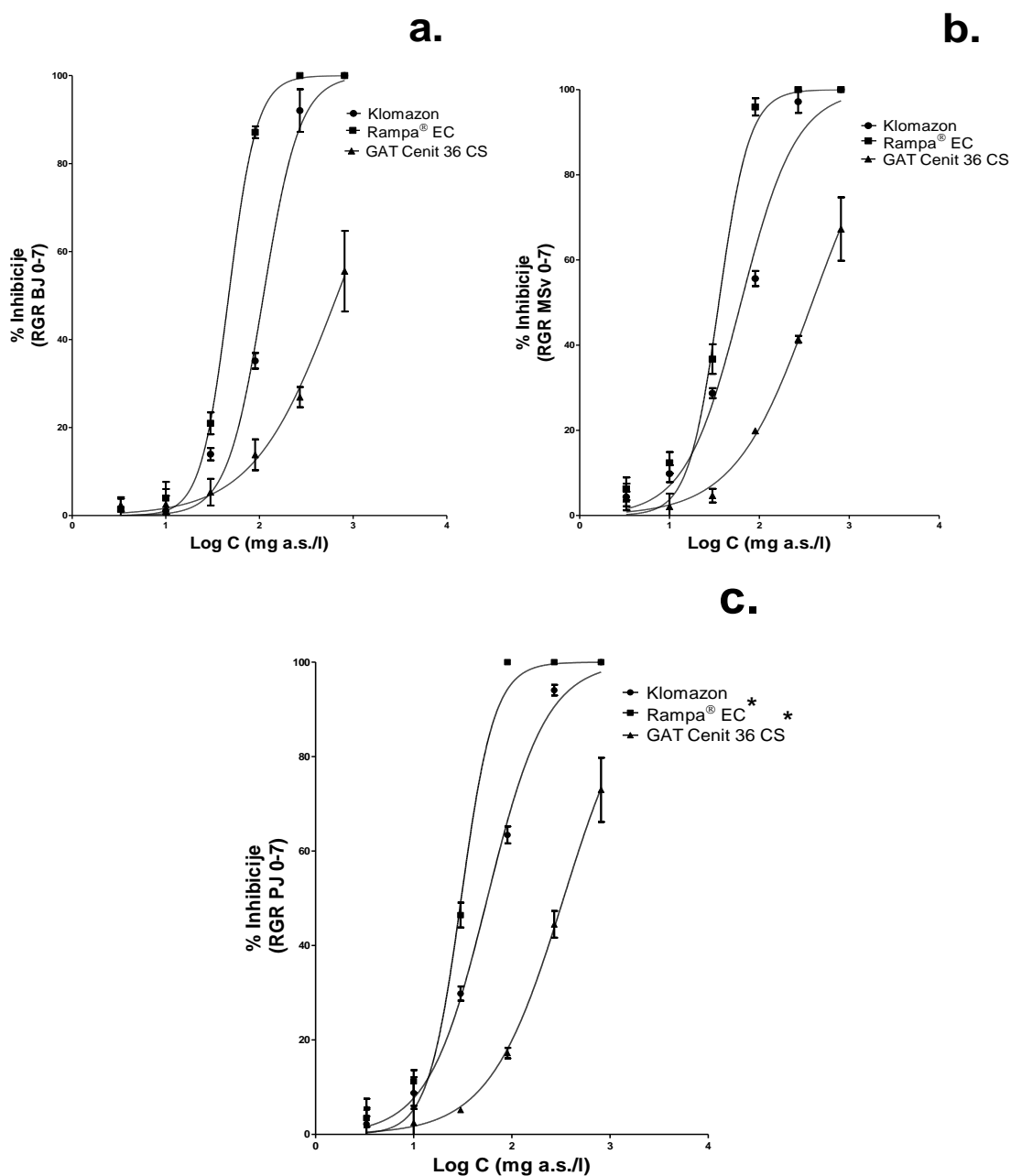
$IC_{50}$  vrednosti dobijene su iz jednog eksperimenta i prikazane su sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja (95%)

Ista slova u redu označavaju da nema statistički značajnih razlika između  $IC_{50}$  vrednosti

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

Poređenje i potencijalne razlike u toksičnosti između tehničke supstance i dva preparata utvrđene su na osnovu  $IC_{50}$  vrednosti najosetljivijeg parametra (Grafikon 4c).



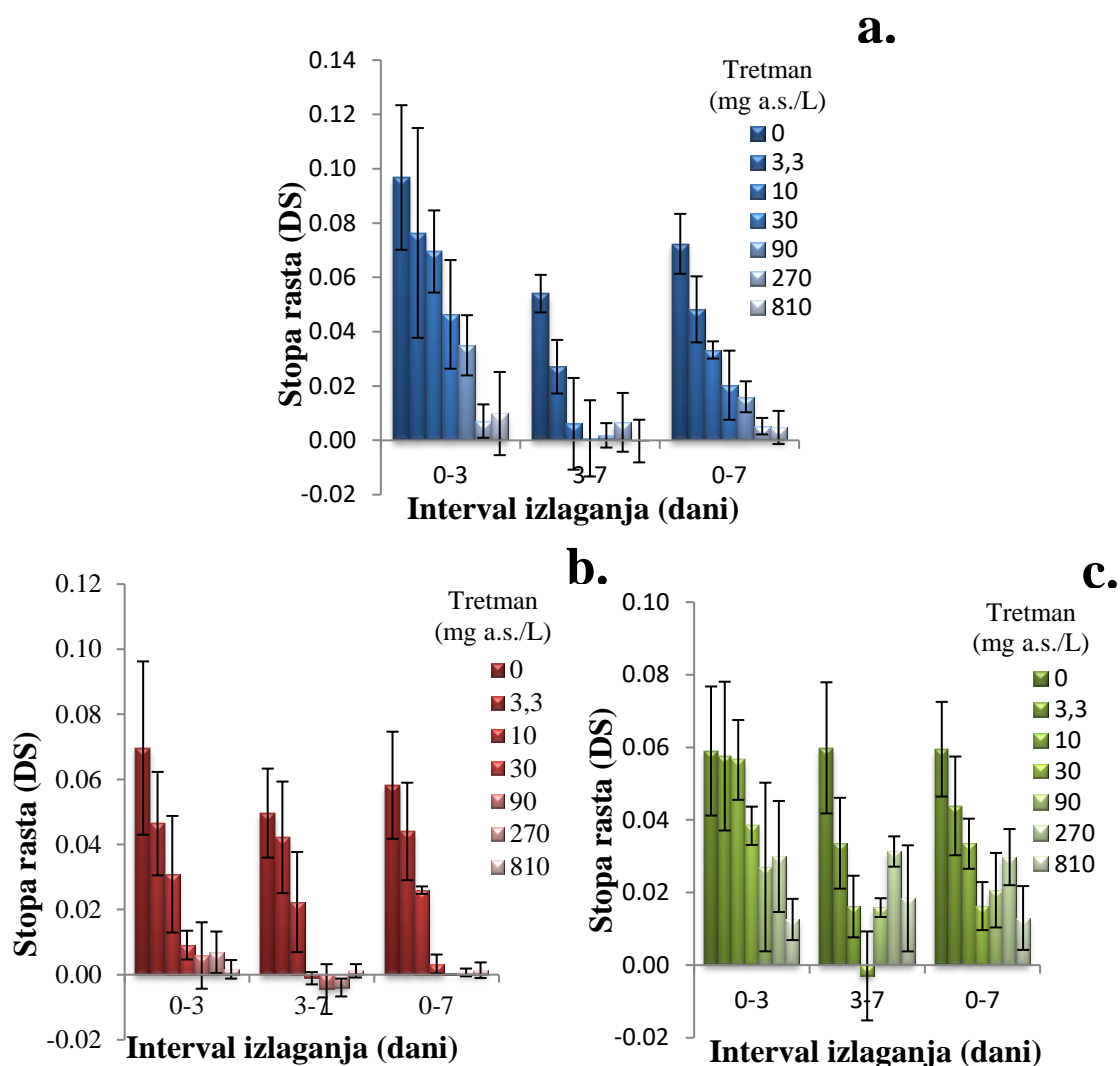
**Grafikon 4 (a-c).** Regresione krive dozne zavisnosti inhibicije rasta (%) *Lemna minor* na osnovu broja (BJ), sveže mase (MSv) i površine jedinki (PJ) nakon sedmodnevne izloženosti tehničkom klomazonu i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu devijaciju. \* - statistički značajna razlika  $IC_{50}$  najosetljivijeg parametra ( $p < 0,01$ ), u odnosu na tehničku supstancu.

Preparat Rampa<sup>®</sup> EC ispoljio je statistički značajno veću, a preparat GAT Cenit 36 CS značajno manju toksičnost u odnosu na tehničku supstancu.

### **5.1.1. Inhibicija rasta vrste *Myriophyllum aquaticum***

Slično uticaju na vrstu *L. minor*, kod izlaganja jedinki *M. aquaticum* tehničkoj supstanci i preparatima registrovana je inhibicija rasta. Trend smanjenja stope rasta *M. aquaticum*, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (RGR DS) razlikovao se za dva intervala izlaganja tehničkoj supstanci – 0-3 i 3-7 dana. Nakon izlaganja u periodu 0-3 dana eksperimenta statistički značajno smanjenje stope rasta u odnosu na kontrolu registrovano je počevši od tretmana sa 90 mg/l (Grafikon 5a; Prilog 3, Tabela P4 a, b). Posmatrano kumulativno (0-7 dana izlaganja), sa povećanjem koncentracije izlaganja progresivno se smanjuje stopa rasta, a statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolu registrovano je u svim ispitivanim tretmanima. Kod jedinki izlaganih preparatu Rampa<sup>®</sup> EC smanjenje stope rasta za dva intervala izlaganja bilo je ujednačeno (Grafikon 5b). Ipak, u tretmanima sa koncentracijom  $\geq 30$  mg/l registrovan je potpun izostanak rasta (interval 3-7 dana). Na kraju perioda izlaganja, posmatrano kumulativno (0-7 dana izlaganja) statistički značajno smanjenje stope rasta, u odnosu na kontrolu, izostalo je jedino u tretmanu sa najnižom ispitivanom koncentracijom (Prilog 3, Tabela P4 a, b). Nakon trodnevnog izlaganja preparatu GAT Cenit 36 CS (interval 0-3 dana) registrovano je progresivno smanjenje stope rasta sa povećanjem koncentracije izlaganja, statistički značajno počevši od tretmana sa 90 mg/l ( $p < 0,05$ ). U drugom intervalu izlaganja stopa rasta u svim tretmanima je bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolu (Grafikon 5c). U tretmanima sa višim ispitivanim koncentracijama ovo smanjenje je bilo ujednačeno za dva intervala izlaganja, međutim u tretmanima sa nižim ispitivanim koncentracijama registrovano je smanjenje stope rasta.





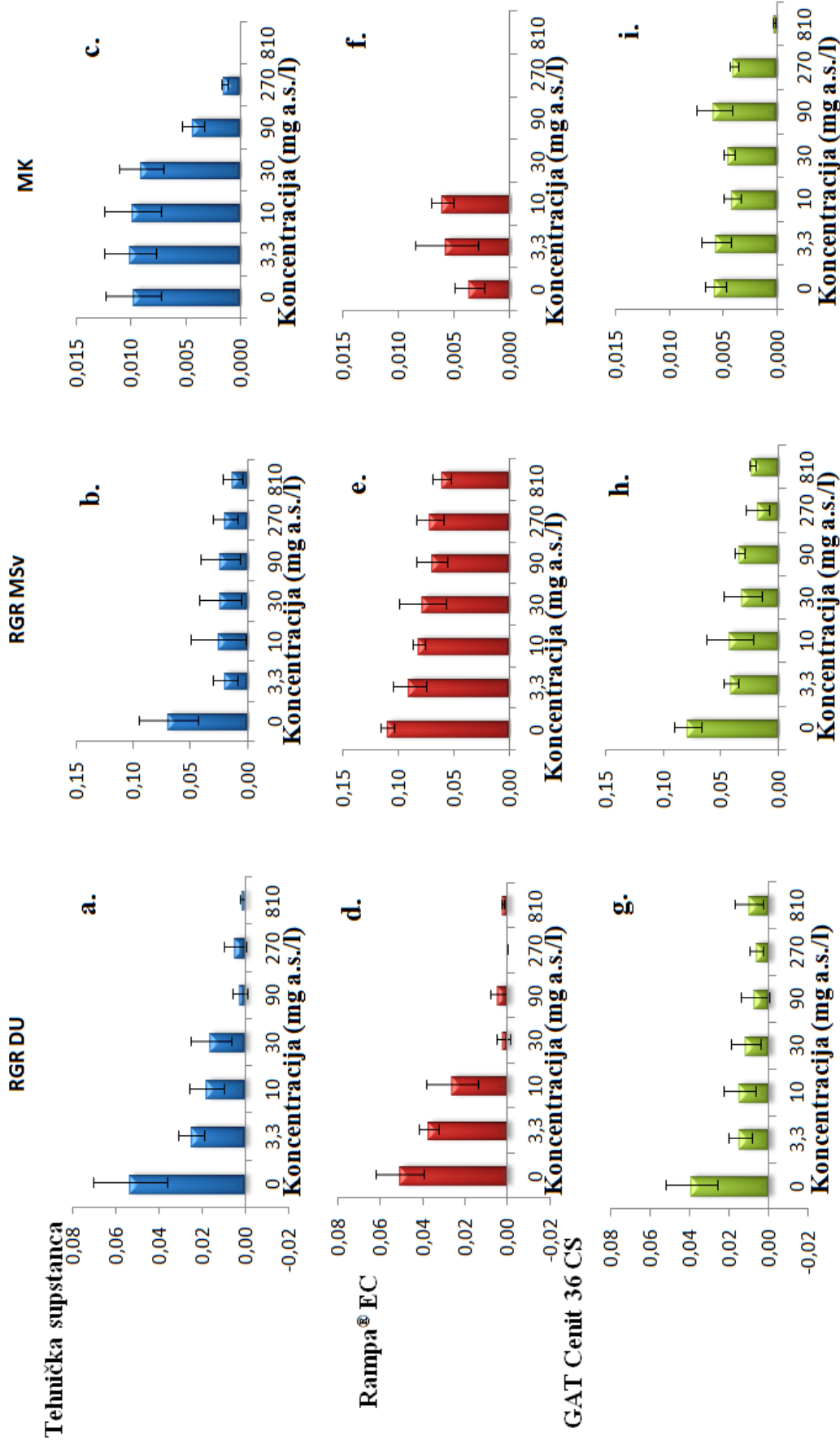
**Grafikon 5** (a-c). Testovi inhibicije rasta vrste *M. aquaticum*. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta nakon izlaganja a) tehničkoj supstanci klomazon i preparatima b) Rampa<sup>®</sup> EC i c) GAT Cenit 36 CS tokom intervala 0-3 i 3-7 dana, kao i kumulativno 0-7 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.

Nakon sedmodnevnog izlaganja jedinki *M. aquaticum* tehničkoj supstanci, stopa rasta izražena preko ukupne dužine (RGR DU) i sveže mase biljaka (RGR MSv) (Grafikon 6) bila je u saglasnosti sa RGR DS. Iako je bilo odstupanja u intezitetu inhibicije, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu registrovane su za sve ispitivane tretmane, kao i kod RGR DS (Prilog 3, Tabela P4 a). Kod jedinki izlaganih preparatu Rampa<sup>®</sup> EC registrovana je slična situacija (Grafikon 6). Statistički značajno smanjenje stope rasta, na osnovu RGR DU i RGR MSv bilo je ujednačeno sa RGR DS. Ipak, intenzitet inhibicije rasta na osnovu MSv bio je manji, u odnosu na DS i DU (Prilog 3, Tabela P4 a). Inhibicija stope rasta na osnovu MSv čak ni u tretmanu sa najvišom

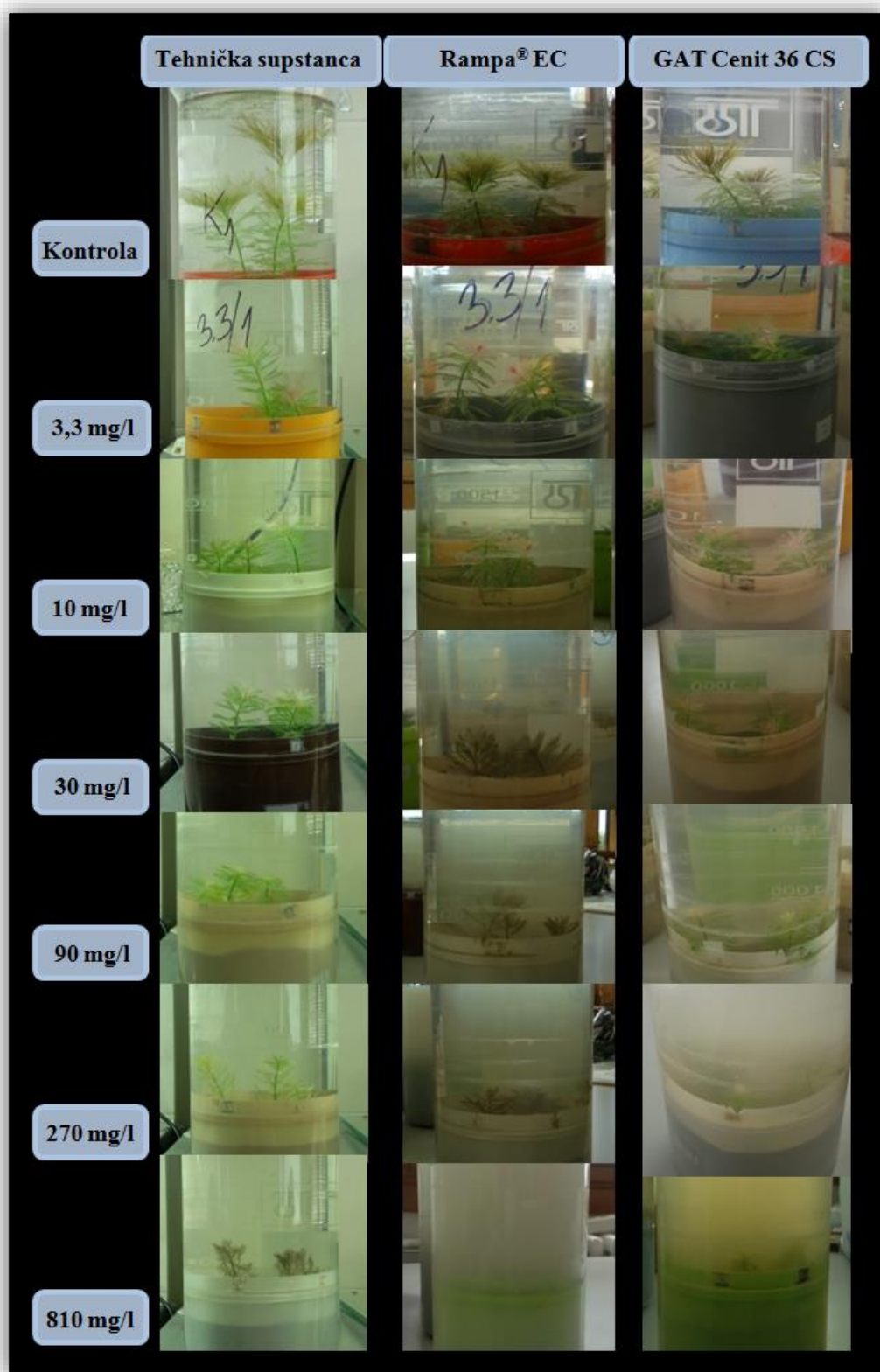
ispitivanom koncentracijom nije prešla 50%. Nakon sedmodnevne izloženosti preparatu GAT Cenit 36 CS na osnovu intenziteta inhibicije utvrđeno je da su parametri DU i MSv bili osetljiviji u odnosu na DS. Naime, statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolu registrovana je u svim ispitivanim tretmanima. Ipak, najviša inhibicija rasta iskazana preko prinosa ukupne dužine biljke (Y DU) iznosila je 85% u tretmanu sa 270 mg/l (Prilog 3, Tabela P4 b).

Na kraju perioda izlaganja merena je masa korena izlaganih biljaka. Statistički značajno manja masa korena, u odnosu na kontrolnu grupu, registrovana je kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci u koncentraciji  $\geq 90$  mg/l (Grafikon 6). U tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom registrovan je izostanak obrazovanja korena. Do izostanka obrazovanja korena došlo je i kod jedinki izlaganih preparatu Rampa<sup>®</sup> EC u tretmanima sa koncentracijom  $\geq 30$  mg/l. U tretmanima sa 3,3 i 10 mg/l registrovana je stimulacija rasta korena, ali razlika u odnosu na kontrolu nije statistički značajna. Jedinke iz svih tretmana sa preparatom GAT Cenit 36 CS obrazovale su koren, a statistički značajno manja masa u odnosu na kontrolu registrovana je jedino u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom (Prilog 3, Tabela P4 c).

Nakon sedmodnevnog izlaganja *M. aquaticum* tehničkoj supstanci i preparatima klomazona biljke svih tretmana vizuelno su se razlikovale od kontrolnih (Slika 10). U tretmanima sa nižim koncentracijama došlo je do pojave promene boje vršnog nodusa, a sa povećanjem koncentracije uočeno je izbeljivanje. Mrka obojenost biljaka registrovana je u tretmanima sa najvišim ispitivanim koncentracijama tehničke supstance i preparata GAT Cenit 36 CS, dok je kod jedinki izlaganih preparatu Rampa<sup>®</sup> EC ova pojava utvrđena u tretmanima sa koncentracijom  $\geq 30$  mg/l.



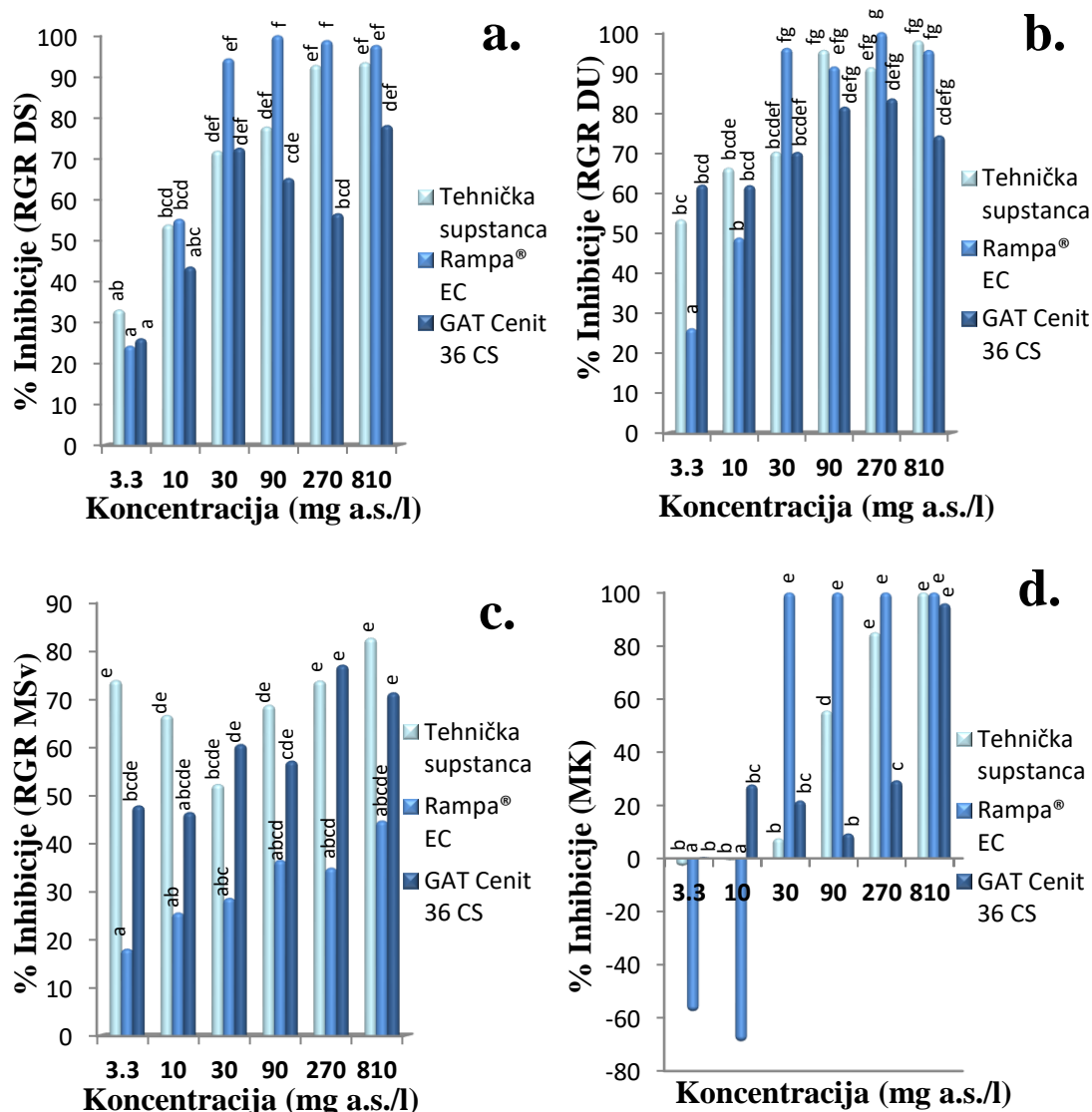
**Grafikon 6 (a-i).** Testovi inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum*. Relativna stopa rasta, na osnovu ukupne dužine (DU – a, d, g) i sveže mase (MSV- b, e, h), i mase korena (MK – c, f, i) nakon izlaganja tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa® EC i GAT Cenic 36 CS tokom intervala 0-7 dana. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.



**Slika 10.** Izgled jedinki *Myriophyllum aquaticum* nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona.

Razlike u rastu *M. aquaticum* pod dejstvom tehničke supstance i dva preparata utvrđene su poređenjem inhibicije rasta, na osnovu RGR DS, RGR DU, RGR MSv i MK (Grafikon 7).

Značajne razlike u inhibiciji rasta *M. aquaticum*, prikazane na osnovu RGR DS registrovane su u tretmanima sa 90 i 270 mg/l (Grafikon 7a). U tretmanu sa 90 mg/l preparat Rampa® EC doveo je do statistički značajno veće inhibicije u odnosu na tehničku supstancu i preparat GAT Cenit 36 CS, dok u tretmanu sa 270 mg/l razlika u intenzitetu inhibicije između preparata Rampa® EC i tehničke supstance nije bilo, a inhibicija do koje je doveo preparat GAT Cenit 36 CS bila je statistički značajno manja. Poređenjem inhibicija rasta na osnovu RGR DU razlike su registrovane samo u tretmanu sa najnižom ispitivanom koncentracijom, gde je preparat Rampa® EC doveo do statistički značajno manje inhibicije u poređenju sa tehničkom supstancom i drugim preparatom, između kojih statistički značajnih razlika nije bilo (Grafikon 7b). Takođe, inhibicija izračunata na osnovu RGR MSv ukazala je na statistički značajno manji efekat preparata Rampa® EC u odnosu na tehničku supstancu i preparat GAT Cenit 36 CS (Grafikon 7c). Najveće razlike u intenzitetu inhibicije rasta *M. aquaticum* registrovane su u masi korena (Grafikon 7d). Intenzitet inhibicije rasta uzrokovan izlaganjem tehničkoj supstanci bio je statistički značajno manji u odnosu na preparat Rampa® EC u svim izuzev tretmana sa dve najviše koncentracije, a statistički značajno veći u odnosu na preparat GAT Cenit 36 CS u tretmanima sa 90 i 270 mg/l. Izuzev tretmana u kojima je registrovana stimulacija rasta korena (3,3 i 10 mg/l), u svim tretmanima preparat Rampa® EC ispoljio je jači intenzitet inhibicije.

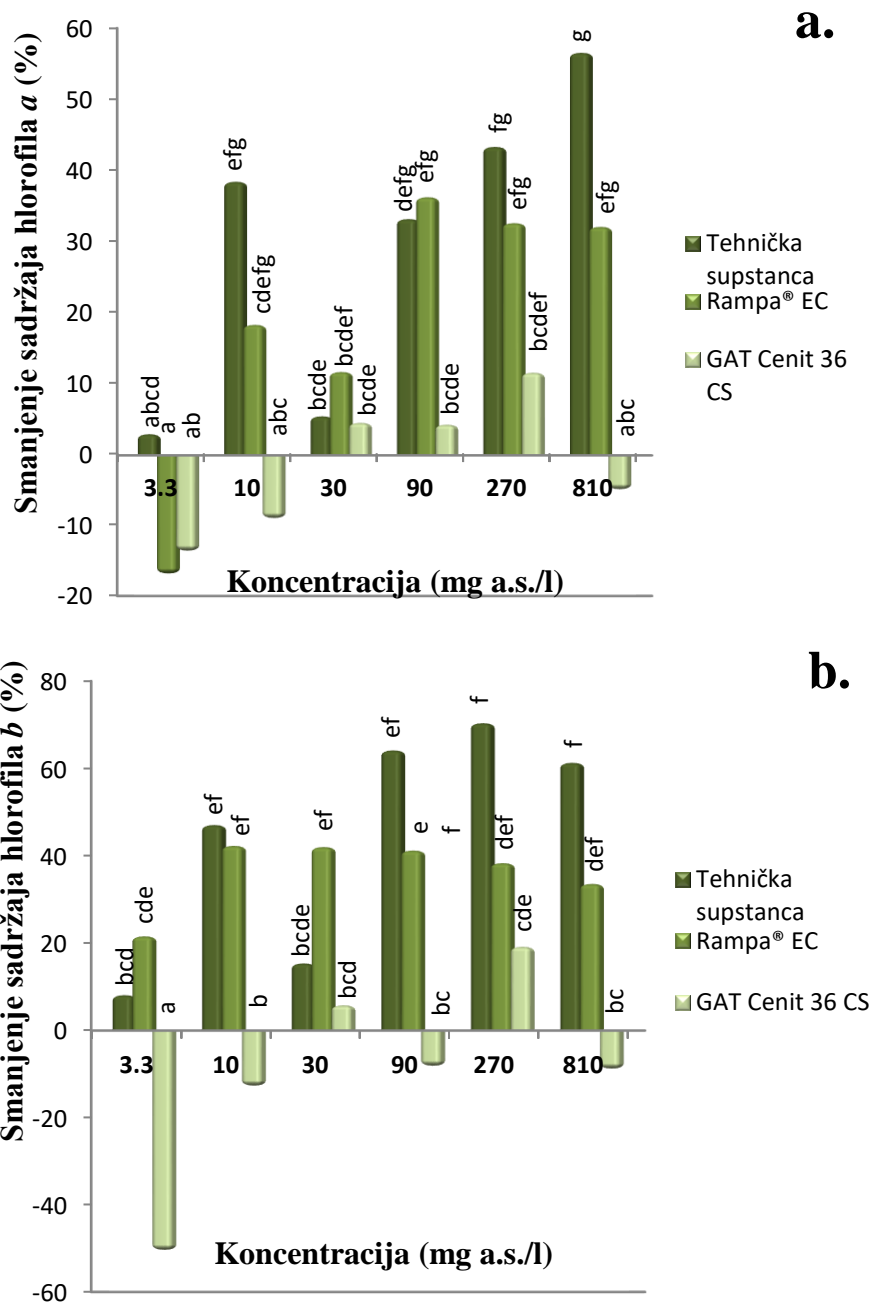


**Grafikon 7 (a-d).** Poređenje intenziteta inhibicije rasta *Myriophyllum aquaticum*, na osnovu a) dužine iznad sedimenta (RGR DS), b) ukupne dužine (RGR DU), c) sveže mase jedinki (RGR MSv) i d) mase korena (MK) nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Statistički značajne razlike u sadržaju chl *a* registrovane su najpre između tehničke supstance i preparata GAT Cenit 36 CS (10 mg/l), a zatim i između dva preparata u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom (Grafikon 8a; Prilog 3, Tabela P5). Kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci i preparatu Rampa® EC razlika u sadržaju fotosintetskih pigmenata nije bilo. Smanjenje sadržaja chl *b* pod uticajem preparata

GAT Cenit 36 CS, u gotovo svim ispitivanim tretmanima, bilo je značajno manje u poređenju sa tehničkom supstancom i preparatom Rampa® EC (Grafikon 8b).



**Grafikon 8 (a, b).** Poređenje smanjenja sadržaja (%) fotosintetskih pigmenata, a) hlorofil *a*; b) hlorofila *b* nakon sedmodnevnog izlaganja vrste *Myriophyllum aquaticum* tehničkoj supstanci i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ )

Najniža IC<sub>50</sub> vrednost kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci utvrđena je na osnovu sveže mase (RGR MSv). Parametar RGR DU pokazao je isti stepen osetljivosti, dok su vrednosti prikaza preko RGR DS i MK bile statistički značajno veće (manje osetljivi parametri) (Tabela 14). Najosetljivi pokazatelj toksičnosti kod jedinki izlaganih preparatu Rampa® EC bio je RGR DS sa IC<sub>50</sub> 8,7 mg/l. Isti stepen osetljivosti ispoljio je i parametar RGR DU, dok su RGR MSv i MK bili manje osetljivi. Ukupna dužina jedinki (RGR DU) je bio parametar sa najnižom IC<sub>50</sub> kod jedinki izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS, a statistički manje osetljiv bio je jedino parametar MK.

**Tabela 14.** Srednje inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) i koncentracije koje dovode do inhibicije rasta 10% (IC<sub>10</sub>) (sa 95% intervalima poverenja), najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat (NOEC) i najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajan efekat (LOEC) kod vrste *Myriophyllum aquaticum* nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS

<i>Myriophyllum aquaticum</i>	mg a.s./l	Stopa rasta (0-7)			MK
		RGR DS	RGR DU	RGR MSv	
<b>Tehnički klomazon</b>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	16,6 ± 5,9 <sup>D</sup> (8,3 – 33,4)	3,3 ± 6,3 <sup>C</sup> (1,4 – 7,7)	1,2 ± 102,2 <sup>C</sup> (0,0 – 1068,0)	80,5 ± 5,0 <sup>E</sup> (57,5 – 112,5)
	IC <sub>10</sub> <sup>a</sup>	-	-	-	27,2 (14,6-51,1)
	NOEC	-	-	-	30 <sup>b</sup> (29,0 <sup>a</sup> )
	LOEC	3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )	90 <sup>b</sup> (83,9 <sup>a</sup> )
<b>Rampa® EC</b>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	8,7 ± 4,7 <sup>C</sup> (6,6 – 11,3)	9,3 ± 4,8 <sup>C</sup> (6,8 – 12,8)	3016,0 ± 15,1 <sup>E</sup> (191,6– 47459,0)	~27,4 <sup>D</sup> (širok opseg)
	IC <sub>10</sub> <sup>a</sup>	2	1,8	-	26,5
	NOEC	3,3 <sup>b</sup> (3,7 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,7 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (3,7 <sup>a</sup> )	10 <sup>b</sup> (11,2 <sup>a</sup> )
	LOEC	10 <sup>b</sup> (11,2 <sup>a</sup> )	10 <sup>b</sup> (11,2 <sup>a</sup> )	10 <sup>b</sup> (11,2 <sup>a</sup> )	30 <sup>b</sup> (33,6 <sup>a</sup> )
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	8,5 ± 7,2 <sup>C</sup> (2,9 – 24,8)	1,0 ± 21,8 <sup>C</sup> (0,03 – 33,9)	7,1 ± 9,8 <sup>C</sup> (1,2 – 42,0)	300,3 ± 5,0 <sup>D</sup> (195,3 – 461,7)
	IC <sub>10</sub> <sup>a</sup>	-	-	-	154,9 (90,4-258,2)
	NOEC	3,3 <sup>b</sup> (2,9 <sup>a</sup> )	-	-	270 <sup>b</sup> (233,2 <sup>a</sup> )
	LOEC	10 <sup>b</sup> (8,6 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (2,9 <sup>a</sup> )	3,3 <sup>b</sup> (2,9 <sup>a</sup> )	810 <sup>b</sup> (699,5 <sup>a</sup> )

IC<sub>50</sub> vrednosti dobijene su iz jednog eksperimenta i prikazane su sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja (95%)

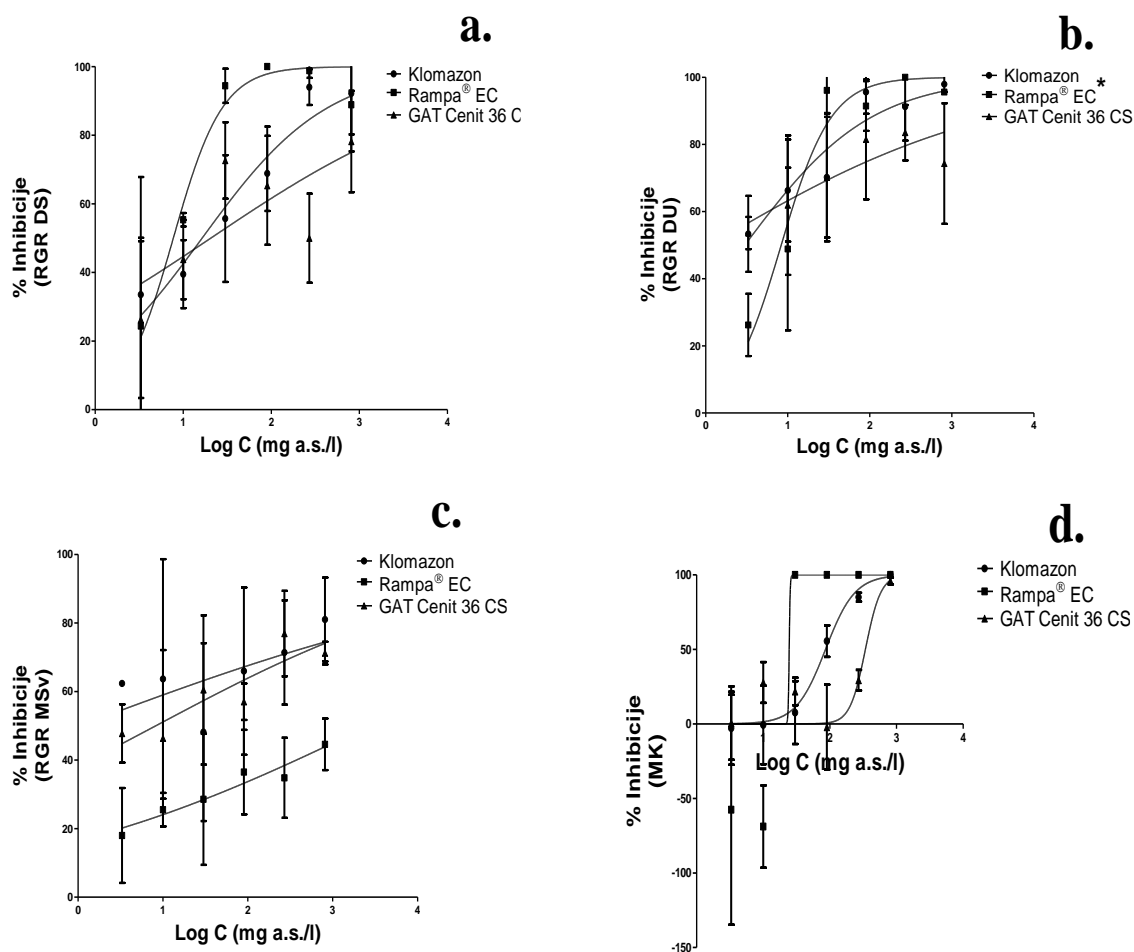
Ista slova u redu označavaju da nema statistički značajnih razlika između IC<sub>50</sub> vrednosti

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije



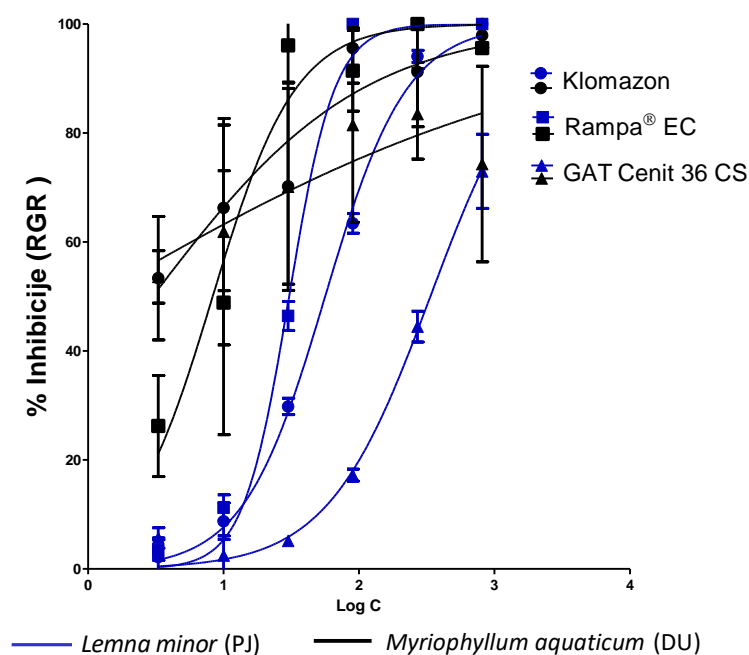
Na osnovu  $IC_{50}$  ukupna dužina jedinki (RGR DU) izdvojila se kao najosetljiviji ili parametar koji se statistički nije razlikovao od najosetljivijeg, pa je stoga izabran za poređenje toksičnosti tehničke supstance i dva preparata. Tehnička supstanca i preparat GAT Cenit 36 CS ispoljili su isti stepen toksičnosti prema *M. aquaticum*, dok je preparat Rampa<sup>®</sup> EC bio manje toksičan (Grafikon 9b).



**Grafikon 9 (a-d).** Regresione krive dozne zavisnosti inhibicije rasta (%) *Myriophyllum aquaticum* na osnovu: a) dužine iznad sedimenta (RGR DS), b) ukupne dužine (RGR DU), c) sveže mase jedinki (RGR MSv) i d) mase korena (MK) nakon sedmodnevne izloženosti tehničkom klomazonu i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu devijaciju. \* - statistički značajna razlika  $IC_{50}$  najosetljivijeg parametra ( $p < 0,01$ ), u odnosu na tehničku supstancu.

### 5.1.3. Poređenje osetljivosti dve vrste akvatičnih makrofita prema tehničkoj supstanci i preparatima klomazona

Osetljivost dve vrste akvatičnih makrofita poređena je na osnovu najosetljivijih parametara utvrđenih u pojedinačnim testovima. Kod vrste *L. minor* najosetljiviji parametar u ispitivanjima sa tehničkom supstancom i preparatima klomazona bila je površina biljaka. Kod vrste *M. aquaticum* najosetljiviji parametar razlikovao se kod ispitivanja sa tehničkom supstancom i preparatima klomazona. Kod ispitivanja sa tehničkom supstancom najveću osetljivost ispoljio je parametar MSv, kod preparata Rampa® EC parametar DS, dok je kod preparata GAT Cenit 36 CS to bio parametar DU. Parametar DU se u ispitivanjima sa tehničkom supstancom i drugim preparatom nije statistički značajno razlikovao od najosetljivijeg parametra (MSv i DS), pa je zato odabran za dalje poređenje osetljivosti sa vrstom *L. minor*. Poređenjem IC<sub>50</sub> vrednosti utvrđeno je da je vrsta *M. aquaticum* bila statistički značajno ( $p < 0,01$ ) osetljivija u odnosu na vrstu *L. minor*, u svim ispitivanjima (Grafikon 10).



**Grafikon 10.** Regresione krive dozne zavisnosti inhibicije rasta (%) vrsta *Lemna minor* na osnovu biljne površine (RGR PJ) i *Myriophyllum aquaticum* na osnovu ukupne dužine (RGR DU) nakon sedmodnevne izloženosti tehničkoj klomazonu i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu devijaciju.

Najveća razlika u odgovoru dve vrste utvrđena je kod izlaganja preparatu GAT Cenit 36 CS, gde je utvrđena  $IC_{50}$  vrednost za *M. aquaticum* bila 300x manja u odnosu na vrstu *L. minor*.

## **5.2. Ispitivanje akutne toksičnosti tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona za vrstu *Daphnia magna***

Nakon 24-časovnog izlaganja jedinki *D. magna* tehničkoj supstanci klomazon statistički značajno ( $p < 0,01$ ) veći broj imobilisanih jedinki u odnosu na kontrolu registrovan je samo u tretmanu sa 100 mg/l (Prilog 4, Tabela P6). Imobilizacija jedinki bila je dozno i vremenski zavisna, pa je na kraju perioda izlaganja (48 h) bila u intervalu od 4% (tretman sa 20 mg/l) do 98% u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom. Srednja efektivna koncentracija na kraju perioda izlaganja bila je 49,9 mg/l (Tabela 15). Kod jedinki izlaganih preparatu Rampa<sup>®</sup> EC statistički značajno ( $p < 0,01$ ) veći procenat imobilisanih jedinki u odnosu na kontrolnu grupu registrovan je u tretmanima sa 13 i 39 mg/l (Prilog 4, Tabela P6). Srednja efektivna koncentracija na kraju eksperimentalnog perioda iznosila je 10,8 mg/l (Tabela 15).

Razlike u intenzitetu imobilizacije *D. magna* između tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC utvrđene su u tretmanima sa istim ili približnim koncentracijama (10 nasuprot 13; 40 nasuprot 39 mg/l), a kao toksičniji izdvojio se preparat. Takođe, statistički značajno veći procenat imobilisanih jedinki registrovan je u tretmanu sa 10 mg/l (13 mg/l, izmereno) preparata Rampa<sup>®</sup> EC u odnosu na 50 mg/l tehničke supstance (Grafikon 11). Ipak, poređenjem  $EC_{50}$  vrednosti tehničke supstance i preparata statistički značajna razlika u toksičnosti nije utvrđena (Grafikon 12). Preparat GAT Cenit 36 CS nakon 24 h ni u jednom ispitivanom tretmanu nije doveo do imobilizacije jedinki *D. magna* (Prilog 4, Tabela P6). Ipak, do kraja eksperimentalnog perioda statistički značajno veći procenat imobilisanih jedinki u odnosu na kontrolu registrovan je u tretmanima sa 50 ( $p < 0,05$ ) i 100 mg/l ( $p < 0,01$ ). Na kraju eksperimentalnog perioda  $EC_{50}$  bila je veća od najviše ispitivane koncentracije, a procenjena je na 183,7 mg/l (Tabela 15).

**Tabela 15.** Srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ) i koncentracije koje dovode do imobilizacije 10% izloženih jedinki ( $EC_{10}$ ) (sa 95% intervalima poverenja), najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajnu imobilizaciju jedinki (NOEC) i najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajnu imobilizaciju jedinki (LOEC) kod vrste *Daphnia magna* nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS

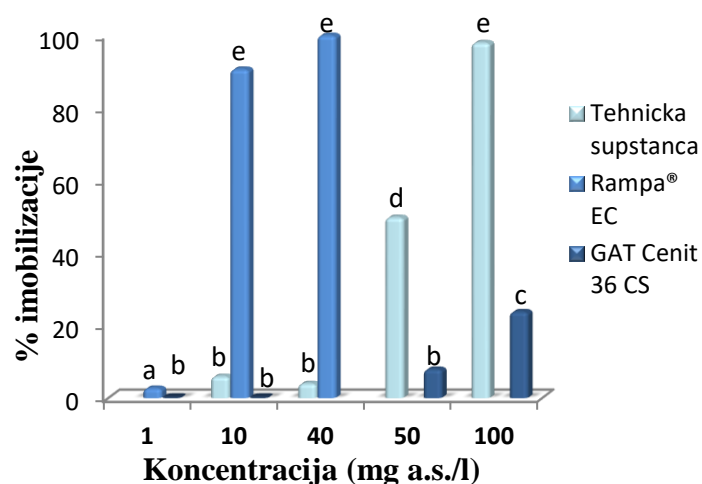
<i>Daphnia magna</i>	mg a.s./l	Dužina izlaganja	
		24 h	48 h
<b>Tehnički klomazon</b>	$EC_{50}^a$	95,7 ± 8,2 (93,1 – 98,4)	49,9 ± 8,3 (47,4 – 52,6)
	$EC_{10}^a$	78,9 (73,3-84,3)	35,6 (31,4-40,3)
	NOEC	80 <sup>b</sup> (78 <sup>a</sup> )	40 <sup>b</sup> (38,4 <sup>a</sup> )
	LOEC	100 <sup>b</sup> (95 <sup>a</sup> )	50 <sup>b</sup> (48,7 <sup>a</sup> )
<b>Rampa® EC</b>	$EC_{50}^a$	27,2 ± 11,7 (23,8 – 31,0)	10,8 (širok opseg)
	$EC_{10}^a$	8,5 (6,4-11,4)	8,9
	NOEC	3 <sup>b</sup> (3,9 <sup>a</sup> )	3 <sup>b</sup> (3,9 <sup>a</sup> )
	LOEC	10 <sup>b</sup> (13,1 <sup>a</sup> )	10 <sup>b</sup> (13,1 <sup>a</sup> )
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	$EC_{50}^b$		183,7 ± 13,7 (118,4 – 285,0)
	$EC_{10}^a$	-	63,8 (44,0-80,7)
	NOEC	-	25 <sup>b</sup> (25,6 <sup>a</sup> )
	LOEC	-	50 <sup>b</sup> (53,0 <sup>a</sup> )

$EC_{50}$ ,  $EC_{10}$ , NOEC i LOEC vrednosti izračunate su na osnovu dva (tehnička supstanca) ili tri (preparati) nezavisna eksperimenta i prikazane sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja (95%)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

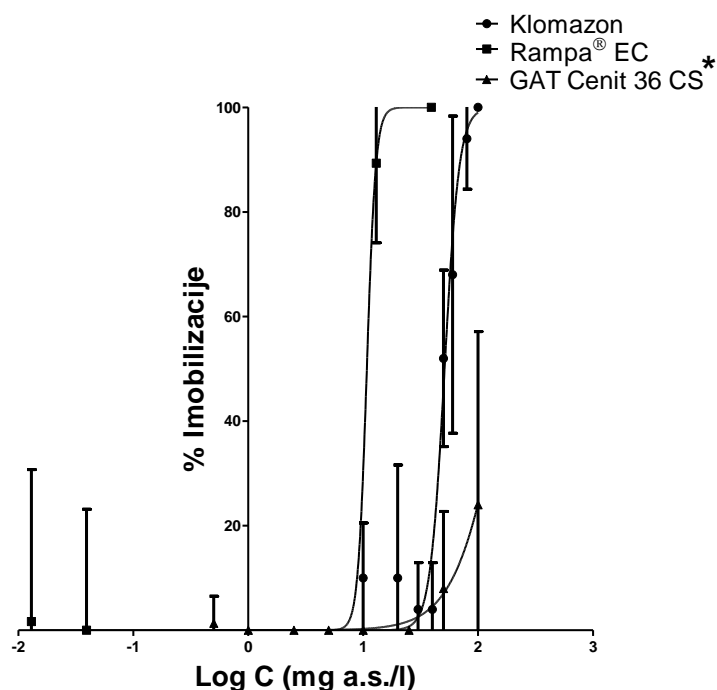
Manji toksični potencijal preparata GAT Cenit 36 CS u odnosu na tehničku supstancu utvrđen je poređenjem efekata između tretmana sa istim ili približnim koncentracijama (Grafikon 11). Statistički značajno manji procenat imobilisanih jedinki utvrđen je u tretmanima sa 50 i 100 mg/l preparata, u odnosu na tretmane sa istim koncentracijama tehničke supstance. U prilog razlika u toksičnosti ukazuje i statistički značajno manji udeo imobilisanih jedinki u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom preparata GAT Cenit 36 CS u odnosu na tretman sa 50 mg/l tehničke supstance.



**Grafikon 11.** Poređenje razlika u intenzitetu imobilizacije jedinki *Daphnia magna* nakon 48-časovnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

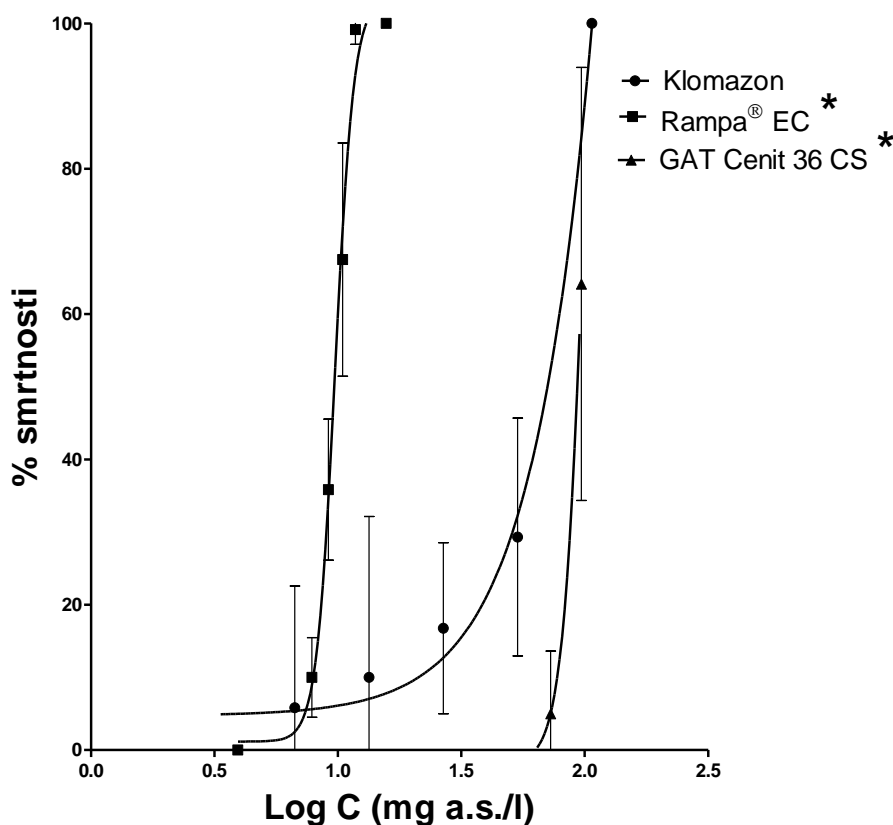
Poređenjem srednjih efektivnih koncentracija tehničke supstance i preparata razlika u toksičnom potencijalu je potvrđena (Grafikon 12).



**Grafikon 12.** Regresione krive dozne zavisnosti imobilizacije jedinki *Daphnia magna* nakon 48-časovnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu devijaciju. \* - statistički značajna ( $p < 0,01$ ) razlika  $LC_{50}$  vrednosti preparata u odnosu na tehničku supstancu.

### 5.3. Ispitivanje akutne toksičnosti tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona za embrione *Danio rerio*

Kod embriona *D. rerio* izlaganih tehničkoj supstanci klomazon statistički značajna ( $p > 0,01$ ) smrtnost, u odnosu na kontrolu, registrovana je počevši od 22 časa nakon oplodnje (Prilog 5, Tabela P7 a) i bila je vremenski i dozno zavisna. Na kraju eksperimentalnog perioda  $LC_{50}$  vrednost (120 hpf, Grafikon 13) iznosila je 61,4 mg/l, dok su NOEC i LOEC za smrtnost bile 3,4 i 6,7 mg/l (Tabela 16). Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) (120 hpf) koja je iznosila 12,1 mg/l i odgovarajući indeks teratogenosti ( $LC_{50}/EC_{50}$ ) od 5,1 izračunati su na osnovu malformacija embriona starosti 120 hpf (edemi, deformacije kičme i vrha repa i nedostatak mehura).



**Grafikon 13.** Regresione krive dozne zavisnosti smrtnosti *Danio rerio* nakon 120-časovne izloženosti tehničkoj supstanci i preparatima klomazona. Kriva je korigovana upotrebom sigmoidne jednačine u programu GraphPad Prism (optimizacija nije uticala na  $LC_{50}$  vrednosti i interpretaciju podataka). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu devijaciju. \* - statistički značajna ( $p < 0,01$ ) razlika  $LC_{50}$  vrednosti preparata u odnosu na tehničku supstancu. Prerađeno iz Stevanovic et al. (2017)

**Tabela 16.** Srednja letalna koncentracija ( $LC_{50}$ ), srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) i koncentracija koja dovodi do pojave efekata kod 10% izloženih jedinki ( $EC_{10}$ ) sa 95% intervalima poverenja, indeks teratogenosti (TI), najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajnu smrtnost (NOEC) i najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajnu smrtnost (LOEC) jedinki *Danio rerio* nakon izlaganja tehničkoj supstanci klorazon i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS. Prerađeno iz Stevanovic et al. (2017)

mg a.s./l	Klorazon	Rampa <sup>®</sup> EC	GAT Cenit 36 CS
$LC_{50}^a$	61,4 ± 6,5 (52,6-71,6)	9,6 ± 6,1 ** (9,5-9,8)	92,5 ± 5,0 ** (89,8-97,4)
$EC_{50}^a$	12,1±6,9 (9,1-16)	10,1±6,1 (9,6-10,6)	24,1 ± 5,5 * (20,9-27,9)
TI	5,1	1	3,8
$EC_{10}^a$	3,7 (2,2-6,5)	7,5 (6,7-8,3)	19,7 (12,2-37,3)
NOEC	3,4 <sup>a</sup> (3,1 <sup>b</sup> )	3,9 <sup>a</sup> (3,1 <sup>b</sup> )	72,8 <sup>a</sup> (75 <sup>b</sup> )
LOEC	6,7 <sup>a</sup> (6,3 <sup>b</sup> )	7,9 <sup>a</sup> (6,3 <sup>b</sup> )	97 <sup>a</sup> (100 <sup>b</sup> )

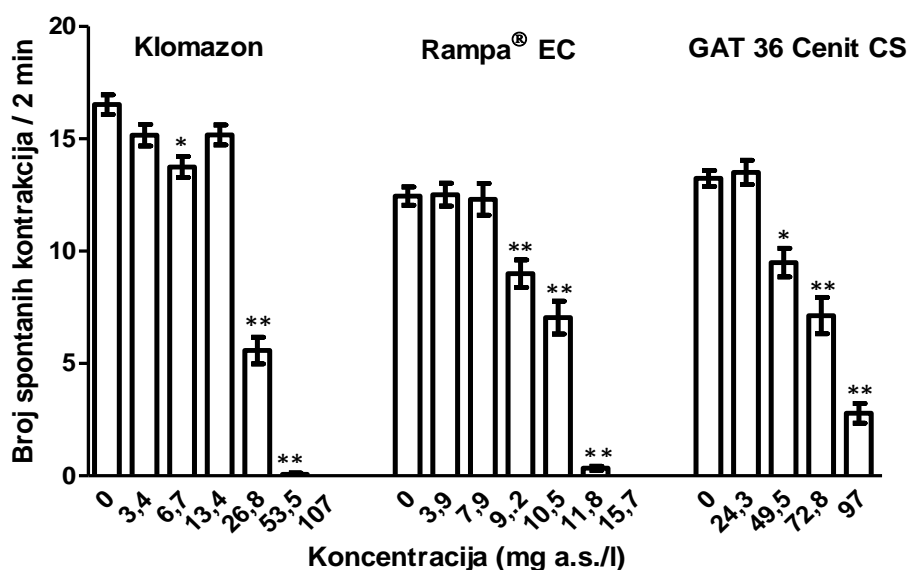
$LC_{50}$ ,  $EC_{50}$ , NOEC i LOEC vrednosti dobijene su iz dva nezavisna eksperimenta i prikazane su sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja (95%)

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ )

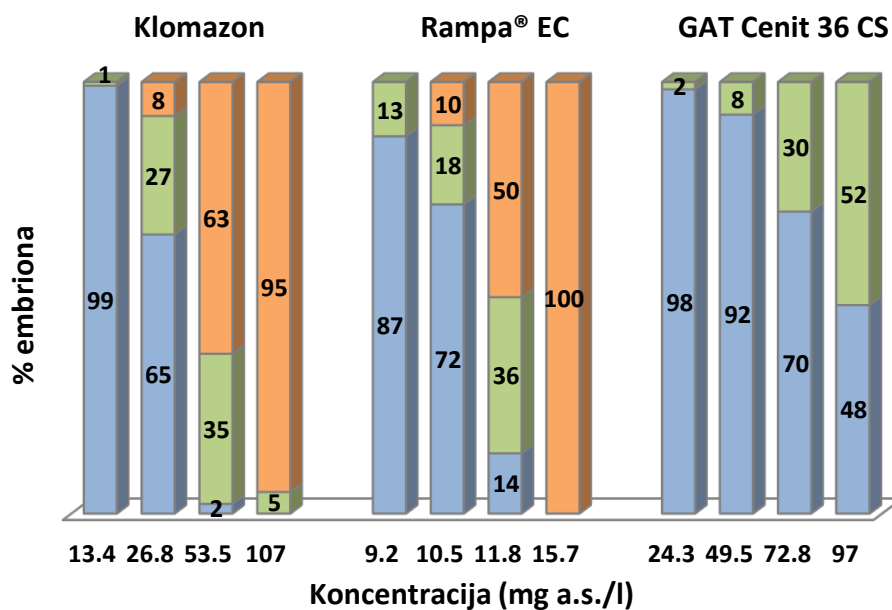
<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

Spontane kontrakcije repa merene su kod embriona starosti 22 h. Nakon izlaganja tehničkoj supstanci kod embriona je registrovano statistički značajno smanjenje frekvencije spontanih pokreta (Grafikon 14), kao i porast broja jedinki kod kojih su pokreti u potpunosti izostali. Takođe, kod nepokretnih embriona registrovana je dozno zavisna pojava kašnjenja u razvoju, sa maksimumom učestalosti u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom (95%) (Grafikon 15). Utvrđene  $EC_{50}$  vrednosti za redukciju spontanih kontrakcija i kašnjenje u razvoju nakon izlaganja tehničkoj supstanci bile su 23,1 i 46,4 mg/l (Tabela 17). Izvaljivanje embriona počelo je 48 hpf i do kraja perioda izlaganja gotovo svi embrioni su bili izvaljeni. Statistički značajne razlike procenata izvaljivanja u tretmanima, u odnosu na kontrolu, registrovane su kod embriona starosti 48, 72 i 96 h, a poređenjem regresionih kriva utvrđeno je statistički značajno kašnjenje u izvaljivanju kod većine primenjenih koncentracija tehničke supstance (Prilog 5, Tabela P7 a).



**Grafikon 14.** Efekti serije koncentracija tehničke supstance i preparata Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS na spontane kontrakcije (srednja vrednosti i standardna greška) embriona *Danio rerio* starih 48 h. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ). Prerađeno iz Stevanovic et al. (2017)



- Nepokretni embrioni sa kašnjenjem u razvoju
- Nepokretni embrioni normalnog razvojnog stadijuma
- Pokretni embrioni

**Grafikon 15.** Udeo (%) pokretnih embriona *Danio rerio* (22 hpf) normalnog razvojnog stadijuma, nepokretnih embriona normalnog razvojnog stadijuma i nepokretnih embriona sa kašnjenjem u razvoju, izloženi seriji koncentracija tehničke supstance i preparata Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS. Prerađeno iz Stevanovic et al. (2017)

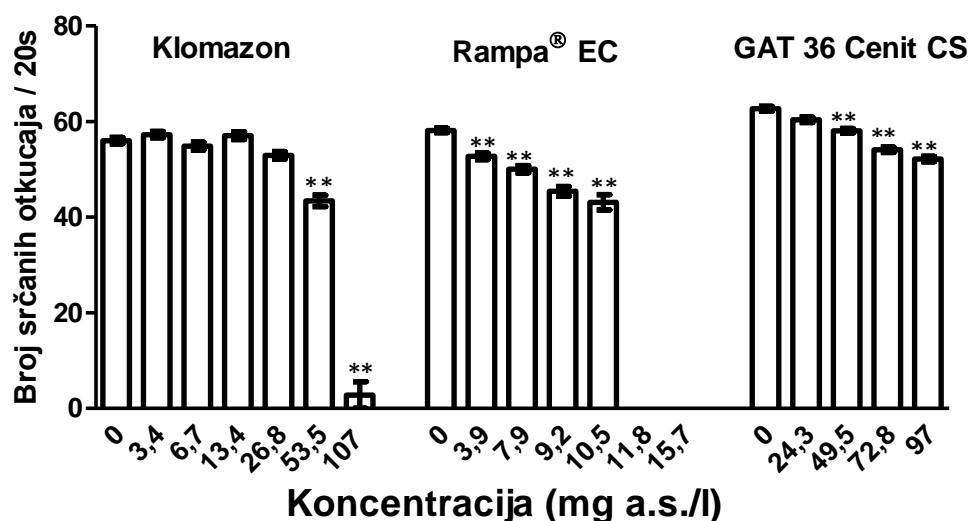


**Tabela 17.** Srednje efektivne koncentracije (EC<sub>50</sub> sa standardnom devijacijom) i 95%-tni intervali poverenja nakon izlaganja *Danio rerio* tehničkoj supstanci i preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS. Prerađeno iz Stevanovic et al. (2017)

EC <sub>50</sub> (mg a.s./l)	Tehnička supstanca klomazon	Preparat Rampa® EC	Preparat GAT Cenit 36 CS
Spontane kontrakcije	23,1±6,2 (20,4-26,1)	10,3±6,1 * (9,9-10,7)	71,9±5,2 * (63,7-81,2)
Nerazvijenost	46,4±6,2 (41,3-52,2)	11,8±6,0 * (11,6-11,9)	>100 *
Srčani ritam	65,3±6,0 (59,8-71,2)	10,7±5,7 * (10,3-11,1)	>100 * (67,5-726,0)
Edemi	27,2±5,6 (25,8-28,7)	9,5±5,1 * (9,0-10,0)	38,4±5,1 * (35,5-41,4)
Deformacije kičme	38,9±5,8 (34,1-44,3)	10,8±5,2 * (9,9-11,8)	90,7±5,0 * (86,0-95,7)
Kraniofacijalne deformacije	12,8±6,0 (10,7-15,4)	8,2±5,1 * (7,8-8,7)	53,0±5,1 * (49,3-56,9)
Nedostatak mehura	15,2±5,9 (12,9-18,1)	10,4±5,1* (9,8-11,0)	24,2 (širok opseg)

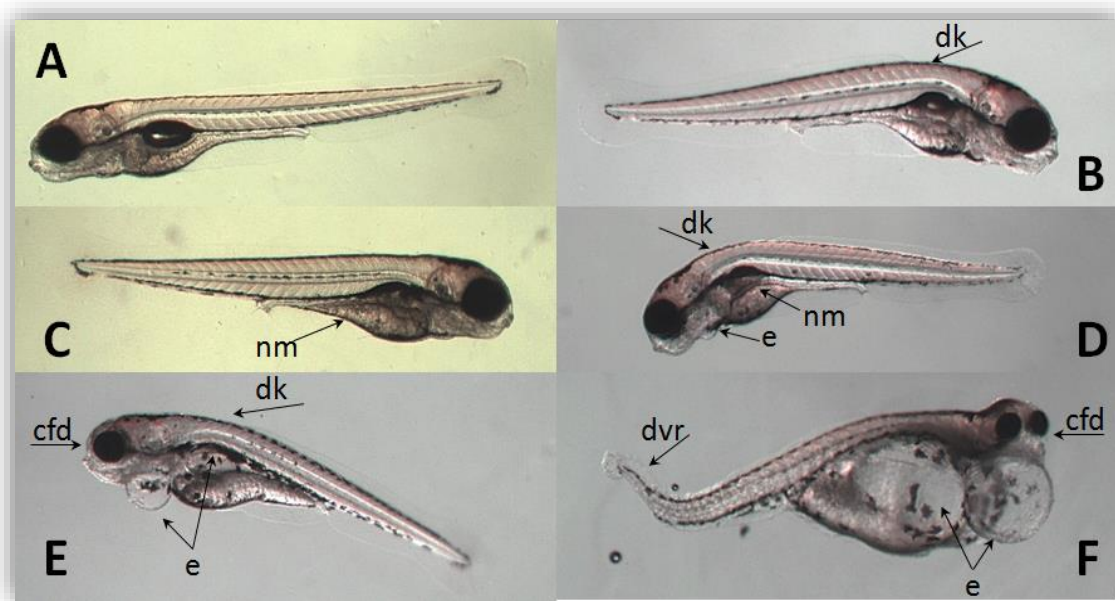
Statistički značajna razlika u odnosu na tehničku supstancu - \* (p<0,01)

Izlaganje tehničkoj supstanci dovelo je i do pojave bradikardije (usporen srčani ritam) kod embriona starosti 48 h. Redukcija srčanog ritma u tretmanu sa 50 mg/l bila je 22,5% (Grafikon 16), a procenjena EC<sub>50</sub> 65,3 mg/l (Tabela 17).



**Grafikon 16.** Srčani ritam embriona *Danio rerio* starosti 48 h (srednja vrednost broja otkucaja tokom 20 s sa odgovarajućom standardnom greškom) izlaganih seriji koncentracija tehničke supstance klomazon i preparata Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01). Prerađeno iz Stevanovic et al. (2017)

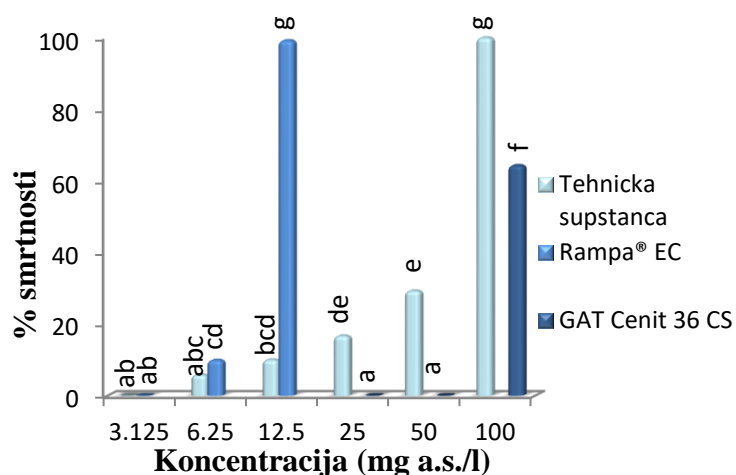
Do kraja eksperimenta kod izlaganih jedinki registrovana je pojava niza različitih teratogenih efekata (Prilog 5, Tabela P7 a; Slika 11). Statistički značajno ( $p < 0,01$ ) veći broj jedinki sa kraniofacijalnim deformacijama (deformisana glava ili vilica) (CFD) i neispunjenim (neobrazovanim) mehurom (NM), u odnosu na kontrolu, registrovan je u svim ispitivanim tretmanima. Izračunate  $EC_{50}$  vrednosti za CFD i NM bile su 12,8 i 15,2 mg/l (Tabela 17). U odnosu na kontrolnu grupu, statistički značajno ( $p < 0,05$ ) veći udeo jedinki sa deformacijama kičme (DK) registrovan je u tretmanu sa najnižom ispitivanom koncentracijom (7,5%). Povećanje broja jedinki sa ovim tipom deformacija bilo je značajno počevši od tretmana sa 26,8 mg/l (Prilog 5, Tabela P7 a;  $p < 0,01$ ). Počevši od istog tretmana (26,8 mg/l) registrovan je i statistički značajno veći udeo jedinki sa edemima (perikardijalni i žumančani) u odnosu na kontrolu, kao i jedinki smanjenog porasta. Deformacije vrha repa (DVR), na nivou statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, registrovane su u tretmanu sa 53,5 mg/l (Prilog 5, Tabela P7 a).



**Slika 11.** Poređenje kontrolnih (A) i embriona *Danio rerio* (120 hpf) izlaganih tehničkoj supstanci klomazon: 3,4 mg/l (B), 6,7 mg/l (C), 13,4 mg/l (D), 26,8 mg/l (E) i 53,5 mg/l (F). Strelice i skraćenice ukazuju na edeme (e), deformacije kičme (dk), deformacije vrha repa (dvr), kraniofacijalne deformacije (cfd) i nedostatak mehura (nm).

Statistički značajno veća smrtnost u odnosu na kontrolu registrovana je kod 22 hpf embriona izlagana preparatu Rampa® EC. Smrtnost je bila dozno i vremenski zavisna, pa je do kraja eksperimentalnog perioda izostala jedino u tretmanu sa najnižom

ispitivanom koncentracijom (Prilog 5, Tabela P7 b). Na osnovu rezultata nelinearne regresije (Grafikon 13) utvrđena  $LC_{50}$  vrednost bila je 9,6 mg/l, dok su NOEC i LOEC za smrtnost iznosile 3,9 i 7,9 mg/l (Tabela 16). Poređenjem smrtnosti tretmana preparata Rampa<sup>®</sup> EC i tehničke supstance, kao i  $LC_{50}$  vrednosti utvrđeno je da je preparat uzrokovao statistički značajno veću smrtnost embriona (Grafikon 17) i da je ispoljio veću toksičnost od čiste aktivne supstance (Grafikon 13). Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) za pojavu malformacija kod embriona starosti 120 h bila je 10,1 mg/l, a TI iznosio je 1 (Tabela 16). Poređenjem nelinearnih regresionih kriva za tehničku supstancu i preparat Rampa<sup>®</sup> EC, na osnovu Log  $EC_{50}$ , registrovane su statistički značajne razlike (Grafikon 13).

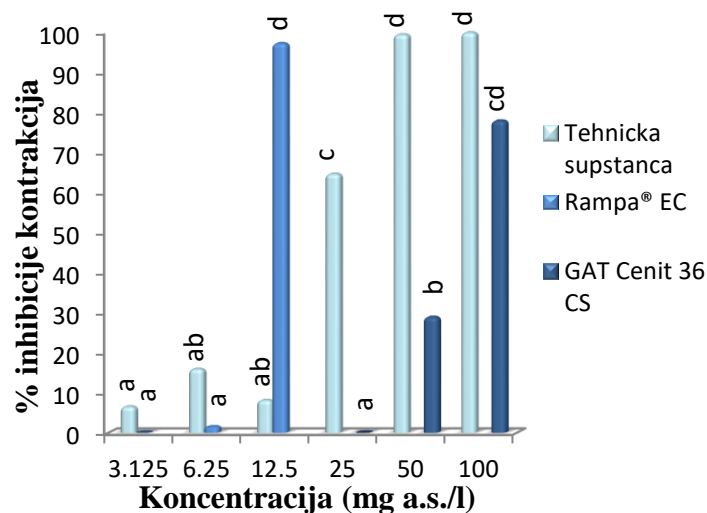


**Grafikon 17.** Smrtnost embriona *Danio rerio* (120 hpf) nakon izloženosti tehničkoj supstanci i preparatima klomazona

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

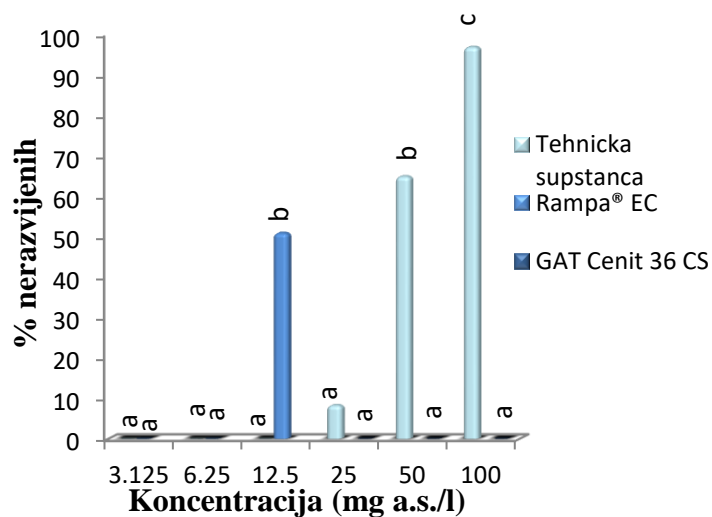
Izlaganje 22 hpf embriona preparatu Rampa<sup>®</sup> EC dovelo je do statistički značajnog smanjenja spontanijih kontrakcija, u odnosu na kontrolu, kao i povećanja broja embriona sa kašnjenjem u razvoju (Grafikon 13; Grafikon 15; Prilog 5, Tabela P7 b). Učestalost kašnjenja u razvoju bila je u intervalu od 10 (10,5 mg/l) do 100% (15,7 mg/l). Poređenjem intenziteta efekta (spontane kontrakcije i kašnjenje u razvoju) tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC utvrđena je statistički značajna razlika između tretmana sa istim (ili približnim, uporedivim) koncentracijama (Grafikon 18; Grafikon 19). Takođe, značajne razlike utvrđene su i između  $EC_{50}$  vrednosti (Tabela 17), a preparat je ispoljio veći stepen toksičnosti.

Procenat izvaljivanja bio je narušen počevši od 72 hpf (Prilog 5, Tabela P7 b). Na kraju eksperimentalnog perioda srednje vreme izvaljivanja ( $HT_{50}$ ) u tretmanima sa koncentracijom preparata  $\geq 7,3$  mg/l bilo je značajno duže u odnosu na kontrolu.



**Grafikon 18.** Inhibicija spontanijh kontrakcija 22 hpf embriona *Danio rerio* nakon izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona

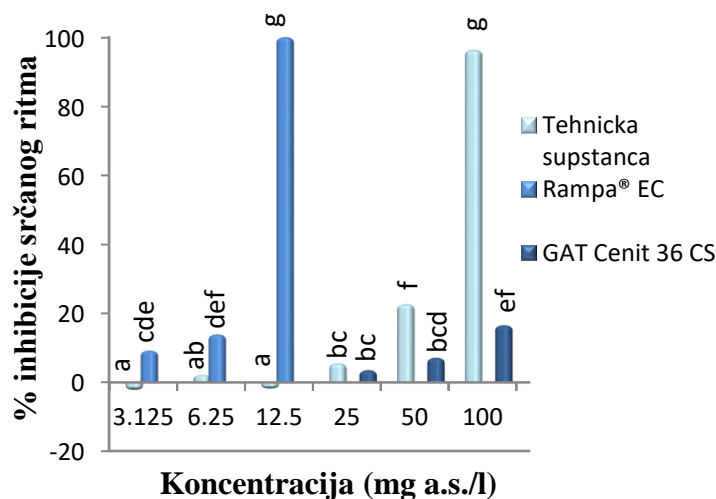
<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna



**Grafikon 19.** Udeo nerazvijenih 22 hpf embriona *Danio rerio* nakon izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

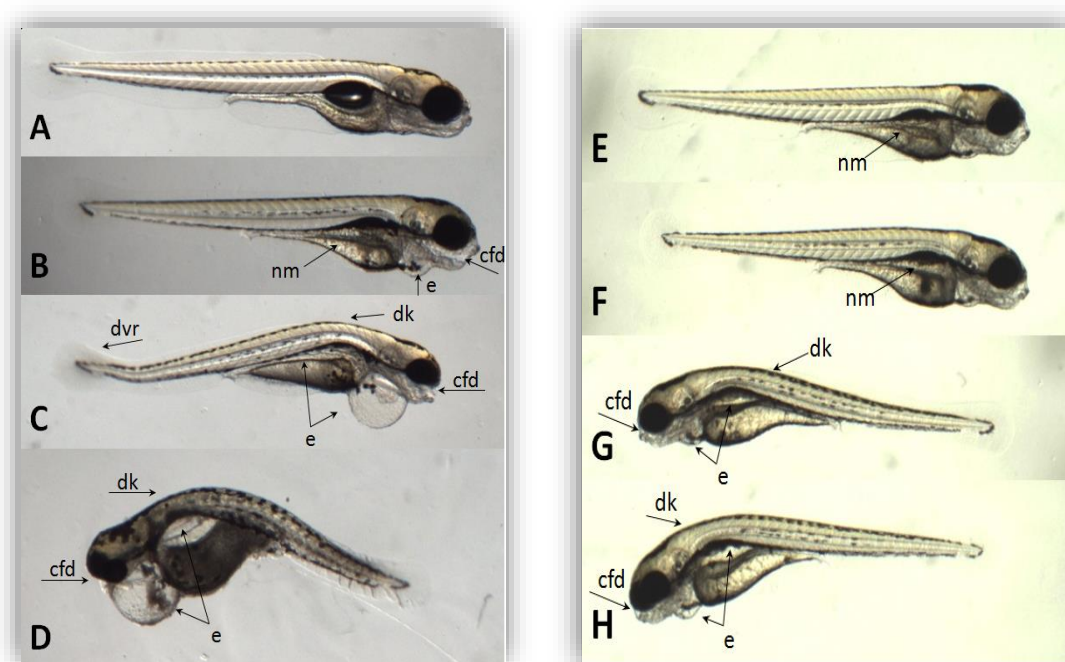
U seriji primenjenih koncentracija prosečan srčani ritam bio je usporen za 9,3-26% (Grafikon 16). Preparat Rampa® EC uzrokovao je statistički značajno veću redukciju srčanog ritma kod izloženih embriona (48 hpf), u poređenju sa tehničkom supstancom (Grafikon 20).



**Grafikon 20.** Uticaj tehničke supstance i preparata klomazona na srčani ritam 48 hpf embriona *Danio rerio*

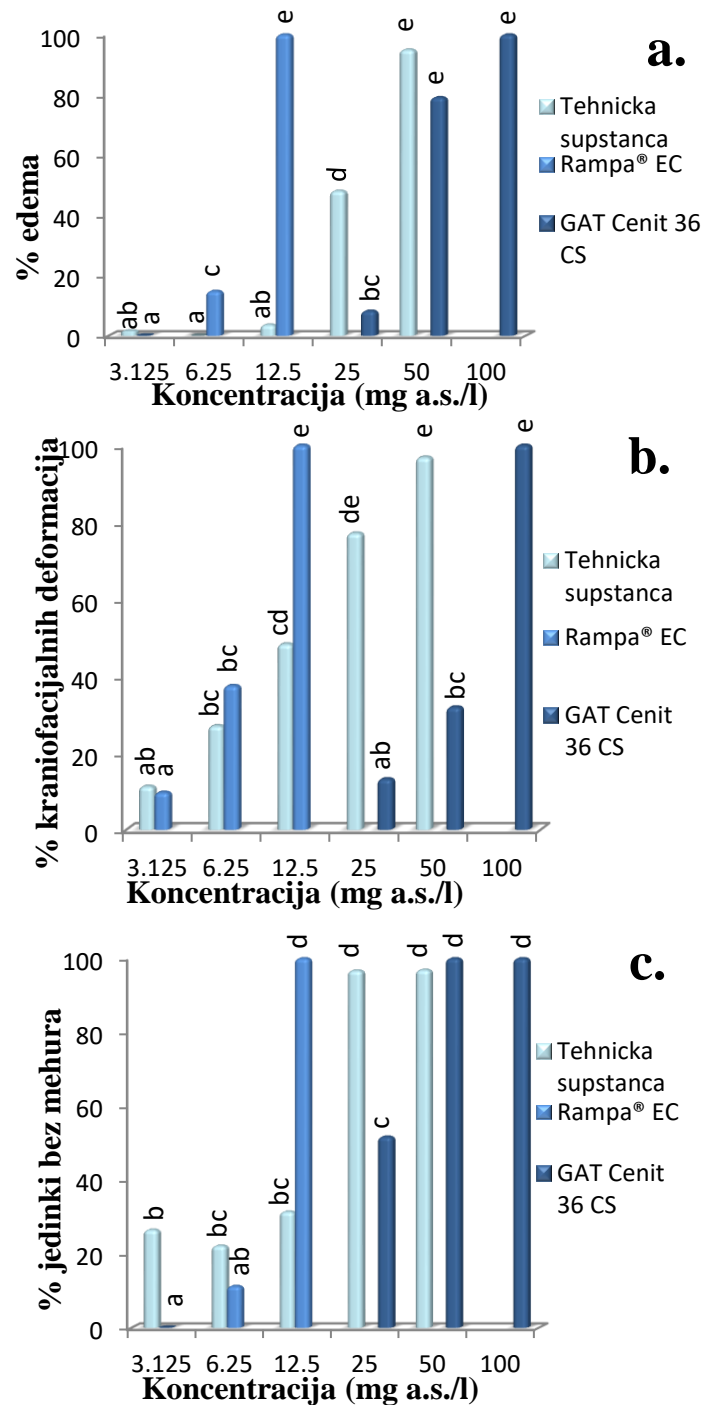
<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Pojava edema (E), CFD i NM registrovani su na kraju perioda izlaganja u tretmanima sa koncentracijom  $\geq 7,9$  mg/l (Prilog 5, Tabela P7 b; Slika 12). Nakon poređenja ovih tretmana sa efektima do kojih je dovelo izlaganje tehničkoj supstanci, intenzitet efekata kod jedinki izlaganih preparatu bio je statistički značajno veći za sve, izuzev za ND u tretmanu sa najnižom ispitivanom koncentracijom (Grafikon 21). Takođe, u odnosu na kontrolnu grupu registrovan je statistički značajan udeo 120 hpf jedinki sa DK i DVR, kao i u broju jedinki smanjene dužine (Prilog 5, Tabela P7 b).



**Slika 12.** Poređenje kontrolnih (A) i embriona *Danio rerio* (120 hpf) izlaganih preparatima Rampa® EC: 7,9 mg/l (B), 9,2 mg/l (C), 10,5 mg/l (D) i GAT Cenit 36 CS: 24,3 mg/l (E), 49,5 mg/l (F), 72,8 mg/l (G) i 97 mg/l (H). Strelice i skraćenice ukazuju na edeme (e), deformacije kičme (dk), deformacije vrha repa (dvr), kraniofacijalne deformacije (cfd) i nedostatak mehura (nm).

Poređenje srednjih efektivnih koncentracija različitih teratogenih efekata sa tehničkom supstancom ukazalo je na statistički značajne razlike, a preparat je ispoljio veći stepen toksičnosti (Tabela 17). Za razliku od tehničke supstance i preparata Rampa® EC, preparat GAT Cenit 36 CS nije uzrokovao smrtnost embriona mlađih od 96 h. Do kraja perioda izlaganja statistički značajna smrtnost, u odnosu na kontrolu, registrovana je jedino u tretmanu sa 100 mg/l (Prilog 5, Tabela P7 c). Na kraju eksperimenta (120 hpf) LC<sub>50</sub> vrednost iznosila je 92,5 mg/l (Grafikon 13; Tabela 16), NOEC 72,8 mg/l i LOEC 97 mg/l. Približne vrednosti LOEC i LC<sub>50</sub> posledica su statistički značajne smrtnosti jedino u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom. U poređenju sa tehničkom supstancom preparat je ispoljio manji stepen toksičnosti (Tabela 16). Kod embriona starosti 120 h EC<sub>50</sub> za pojavu malformacija bila je 24,1 mg/l, a TI iznosio je 3,8.



**Grafikon 21.** Uticaj tehničke supstance i preparata klomazona na pojavu a) edema, b) kraniofacijalnih deformacija i c) nedostatak mehura kod 120 hpf embriona *Danio rerio*.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Izlaganje embriona (22 hpf) preparatu GAT Cenit 36 CS rezultiralo je statistički značajnim smanjenjem spontanijih kontrakcija, u odnosu na kontrolu, nekada čak i potpuni izostanak kontrakcija, međutim embriona sa kašnjenjem u razvoju nije bilo (Grafikon 13; Grafikon 15; Prilog 5, Tabela P7 c). U poređenju sa tehničkom supstancom, preparat je doveo do statistički značajno manjeg efekta na učestalost spontanijih kontrakcija (Grafikon 18;  $p < 0,01$ ). Registrovano je značajno odlaganje izvaljivanja, međutim do kraja perioda izlaganja svi embrioni bili su izvaljeni (Prilog 5, Tabela P7 c).

Srčani ritam bio je narušen kod embriona starosti 48 h (Grafikon 16), sa prosečnim smanjenjem 7,4-16,8%. Ipak, intenzitet smanjenja srčanog ritma kod embriona izlaganih preparatu bio je značajno manji u poređenju sa efektima tehničke supstance (Grafikon 20).

Učestalost pojave edema kod 96 hpf embriona bila je statistički značajno veća u svim ispitivanim tretmanima, u poređenju sa kontrolnom grupom (Prilog 5, Tabela P7 c). Kao i u slučaju poređenja ostalih efekata u odnosu na tehničku supstancu, intenzitet pojave edema bio je statistički značajno manji kod jedinki izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS (Grafikon 21).

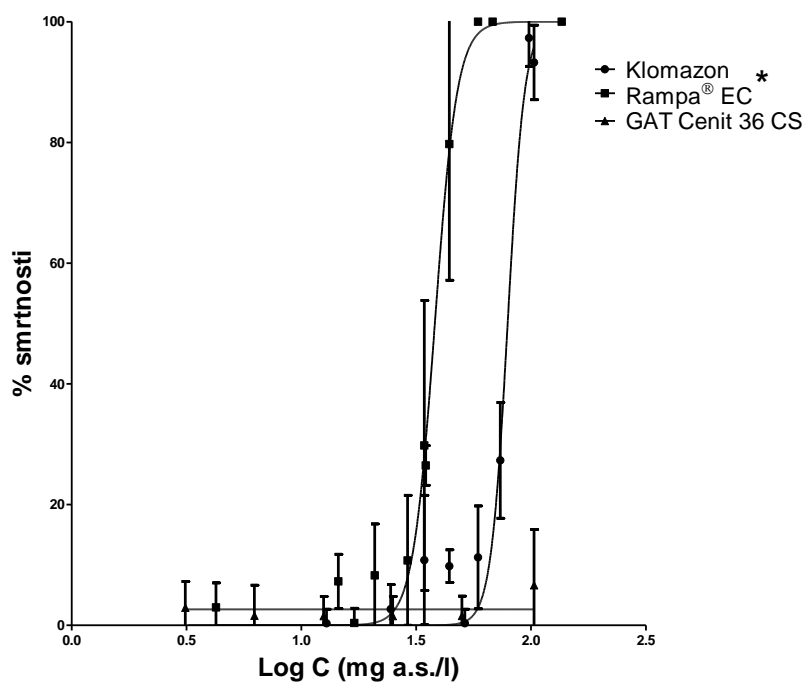
Udeo embriona (120 hpf) sa CFD i NM statistički je bio značajno viši u svim ispitivanim koncentracijama, u odnosu na kontrolu (Prilog 5, Tabela P7 c; Slika 12). Od ostalih teratogenih efekata, još je registrovan značajan udeo jedinki sa DK, dok jedinki sa DVR nije bilo. Značajna ( $p < 0,01$ ) redukcija dužine embriona registrovana je u svim izuzev u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom.

Za svaki od teratogenih efekata urađeno je i poređenje  $EC_{50}$  vrednosti dobijenih za preparat sa jedne, i tehničku supstancu sa druge strane. Rezultati su ukazali na manju toksičnost preparata GAT Cenit 36 CS u odnosu na tehničku supstancu (Tabela 17).



#### 5.4. Ispitivanje teratogenih efekata tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona za embrione *Xenopus laevis* (FETAX)

Statistički značajano veća smrtnost embriona *X. laevis* registrovana je već nakon 24-časovne izloženosti seriji koncentracija tehničke supstance klomazon (Prilog 6, Tabela P8 a). Do kraja eksperimentalnog perioda u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom došlo je do uginjavanja gotovo svih jedinki, a u tretmanim sa nižim koncentracijama registrovano je smanjenje aktivnosti i reakcije na agitaciju (60 i 75 mg/l). Srednja letalna koncentracija ( $LC_{50}$ ) (96 hpf) koja je iznosila 79,1 mg/l izračunata je primenom nelinearne regresije (Grafikon 22), dok su NOEC i LOEC za smrtnost bile 25 i 35 mg/L (Tabela 18). Na kraju eksperimentalnog perioda  $EC_{50}$  izračunata na osnovu svih malformacija embriona (edemi, deformacije, plikovi) bila je 41,0 mg/l, a TI iznosio je 1,9.



**Grafikon 22.** Regresione krive dozne zavisnosti smrtnosti *Xenopus laevis* nakon 96-časovne izloženosti tehničkoj supstanci i preparatima klomazona. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu devijaciju. \* - statistički značajna ( $p < 0,01$ ) razlika  $LC_{50}$  vrednosti preparata u odnosu na tehničku supstancu.

**Tabela 18.** Srednja letalna koncentracija ( $LC_{50}$ ), srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) i koncentracija koja dovodi do pojave efekata kod 10% izloženih jedinki ( $EC_{10}$ ) sa 95% intervalima poverenja, indeks teratogenosti (TI), najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajnu smrtnost (NOEC) i najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajnu smrtnost (LOEC) jedinki *Xenopus laevis* nakon izlaganja tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

mg a.s./l	Klomazon	Rampa <sup>®</sup> EC	GAT Cenit 36 CS
$LC_{50}^a$	79,1 ± 6,1 (76,5-81,8)	38,1 ± 6,1* (36,7-39,7)	-
$EC_{50}^a$	41,0 ± 4,8 (39,4-42,6)	31,0 ± 4,5* (30,2-31,7)	111,1 ± 5,2* (99,0-124,6)
TI	1,9	1,2	-
$EC_{10}^a$	29,8 (27,5-32,5)	27,0 (26,1-28,1)	55,1 (42,7-68,1)
NOEC	25 <sup>a</sup> (25,2 <sup>b</sup> )	<12,5 <sup>a</sup> (14,5 <sup>b</sup> )	<3,1 <sup>a</sup> (3,2 <sup>b</sup> )
LOEC	35 <sup>a</sup> (35,3 <sup>b</sup> )	12,5 <sup>a</sup> (14,5 <sup>b</sup> )	3,1 <sup>a</sup> (3,2 <sup>b</sup> )

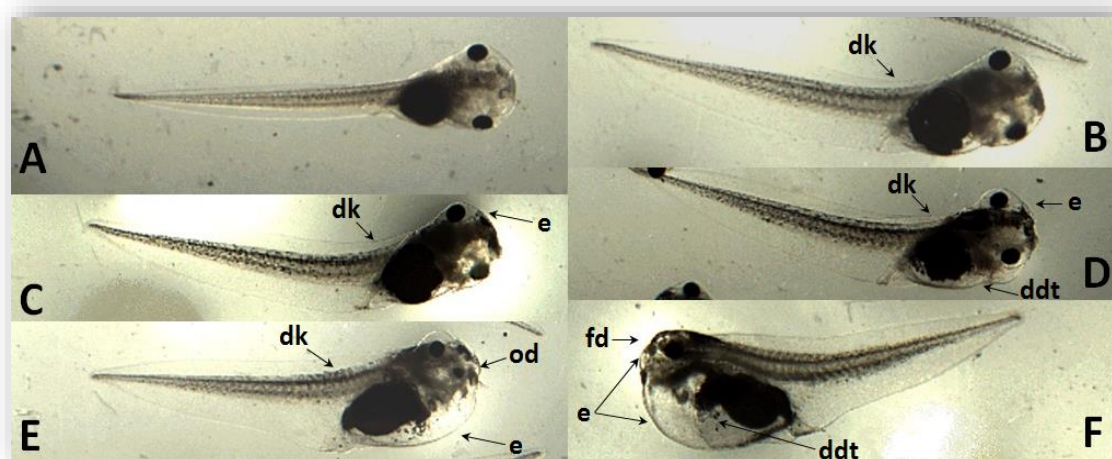
$LC_{50}$  vrednosti dobijene su iz dva nezavisna eksperimenta (150-200 embriona u kontroli i 75 u tretmanima, u svakom) i prikazane su sa standardnom devijacijom i intervalima poverenja  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ , NOEC i LOEC dobijene su iz jednog eksperimenta (150 embriona u kontroli i 75 u tretmanima) i prikazane sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* ( $p < 0.01$ )

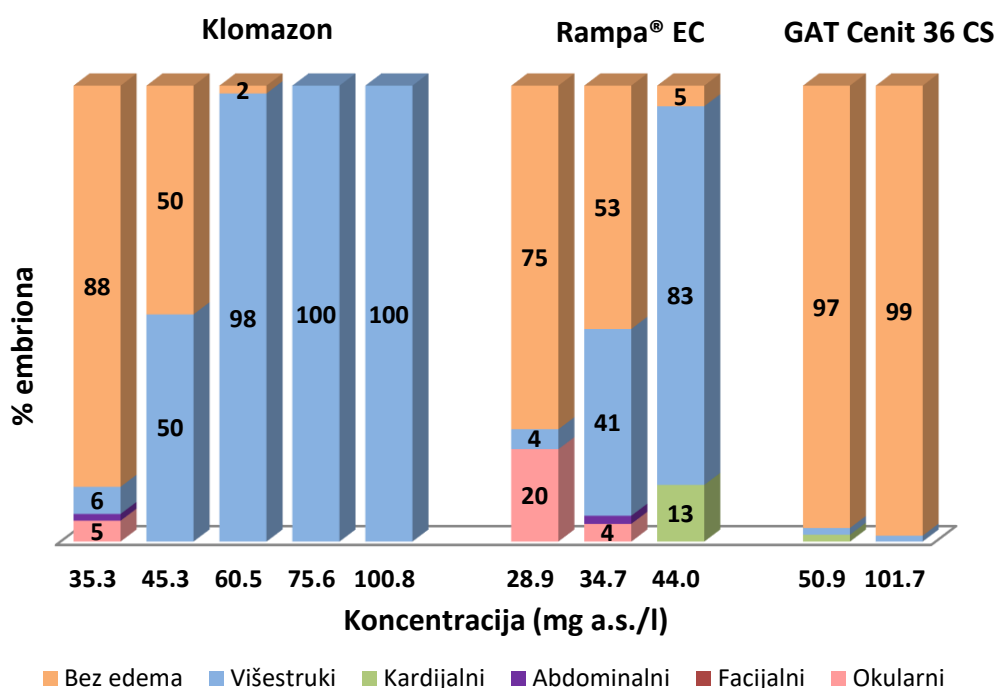
<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

Kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci na kraju perioda izlaganja utvrđene su i pojave edema (E), aksijalnih i drugih deformacija (Slika 13; Prilog 6, Tabela P8 a). Na početku izlaganja najčešće su detektovani pojedinačni E (kardijalni i abdominalni), međutim do kraja perioda izlaganja, sa porastom koncentracije izlaganja, rastao je broj višestrukih E (Grafikon 23). Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) za pojavu E (zbirno) bila je 44,9 mg/l (Tabela 19). Od aksijalnih deformacija najzastupljenije su bile deformacije kičme (DK), sa statistički značajno ( $p < 0,01$ ) većim udelom deformisanih jedinki, u odnosu na kontrolnu grupu, u svim ispitivanim tretmanima (Prilog 6, Tabela P8 a). Izračunata  $EC_{50}$  za pojavu DK iznosila je 51,1 mg/l (Tabela 19).



**Slika 13.** Poređenje kontrolnih (A) i embriona *Xenopus laevis* (96 hpf) izlaganih tehničkoj supstanci klomazon: 25 mg/l (B), 35 mg/l (C), 45 mg/l (D), 60 mg/l (E) i 75 mg/l (F). Strelice i skraćenice ukazuju na edeme (e), deformacije kičme (dk), okularne (od), facijalne (fd) i deformacije digestivnog trakta (ddt).



**Grafikon 23.** Udeo (%) edema kod embriona *Xenopus laevis* (96 hpf) izlaganih seriji koncentracija tehničke supstance i preparata Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS.

Od ostalih deformacija još su registrovane pojave facijalnih (FD) i okularnih deformacija (OD), kao i deformacije digestivnog trakta (DDT) (Prilog 6, Tabela P8 a). U poređenju sa kontrolnom grupom FD su bile statistički značajno više zastupljene u svim izuzev tretmana sa najnižom ispitivanom koncentracijom. Srednja efektivna koncentracija bila je 47,2 mg/l (Tabela 19).

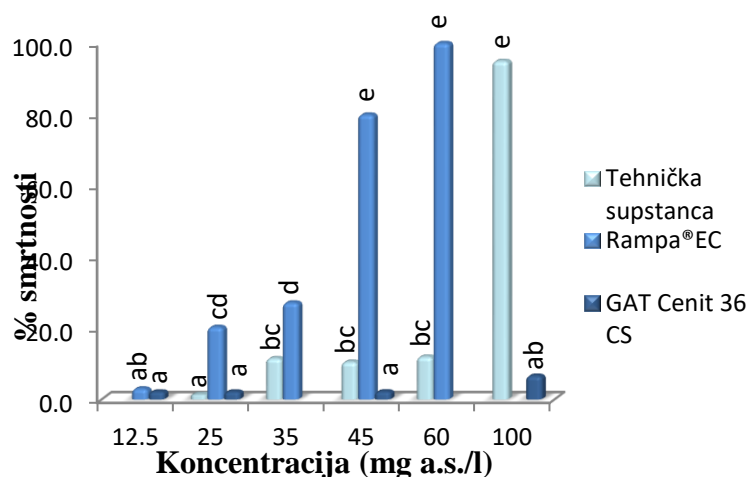
**Tabela 19.** Srednje efektivne koncentracije (EC<sub>50</sub> sa standardnom devijacijom) i 95% intervali poverenja nakon izlaganja *Xenopus laevis* tehničkoj supstanci i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

EC <sub>50</sub> (mg a.s./l)	Tehnička supstanca	Preparat	Preparat
	klomazon	Rampa <sup>®</sup> EC	GAT Cenit 36 CS
Edemi	44,9 ± 4,8 (42,8-47,1)	34,3 ± 4,6 * (33,0-35,7)	-
Deformacije kičme	51,1 ± 4,3 (44,5-58,6)	31,7 ± 4,6 * (29,6-33,9)	107,2 ± 5,0 * (103,3-111,2)
Facijalne deformacije	47,2 ± 4,8 (45,3-49,3)	35,7 ± 4,5 * (34,7-36,7)	-

Statistički značajna razlika u odnosu na tehničku supstancu - \* (p<0.01)

U tretmanima sa dve najniže ispitivane koncentracije registrovana je statistički značajno veća dužina embriona (u proseku za 4,1 i 1,2 % veći) u odnosu na kontrolu. Statistički značajno manja dužina registrovana je jedino u tretmanima sa 75,6 i 100,8 mg/l (4,0 i 10,4 % manji u odnosu na kontrolu) (Prilog 6, Tabela P8 a).

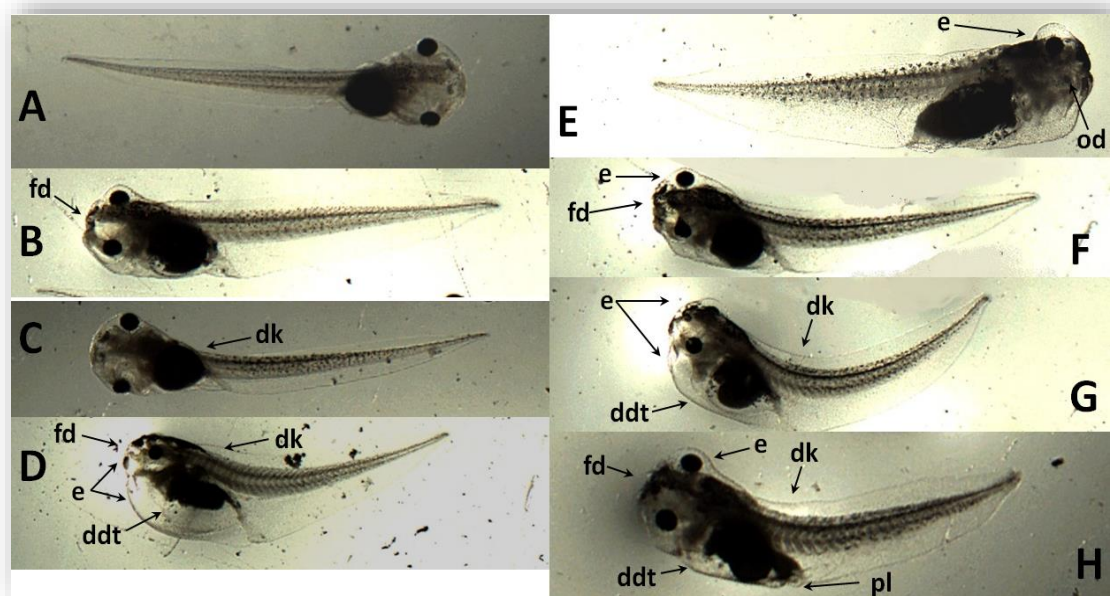
Nakon izlaganja preparatu Rampa<sup>®</sup> EC, statistički značajno veća smrtnost embriona *X. laevis* registrovana je u svim ispitivanim tretmanima (Prilog 6, Tabela P8 b). Na kraju perioda izlaganja LC<sub>50</sub> (96 hpf, Grafikon 22) bila je 38,1 mg/l, LOEC 14,5 mg/l, dok je NOEC za smrtnost niži od ove koncentracije (Tabela 18). Poređenjem smrtnosti koncentraciono ujednačenih tretmana preparata Rampa<sup>®</sup> EC i tehničke supstance (Grafikon 24), kao i LC<sub>50</sub> vrednosti (Tabela 18) utvrđena je statistički značajno veća smrtnost embriona i veća toksičnost preparata u odnosu na tehničku supstancu. Srednja efektivna koncentracija (EC<sub>50</sub>) za sve malformacije (zbirno) bila je 31,0 mg/l, a odgovarajući TI iznosio je 1,2.



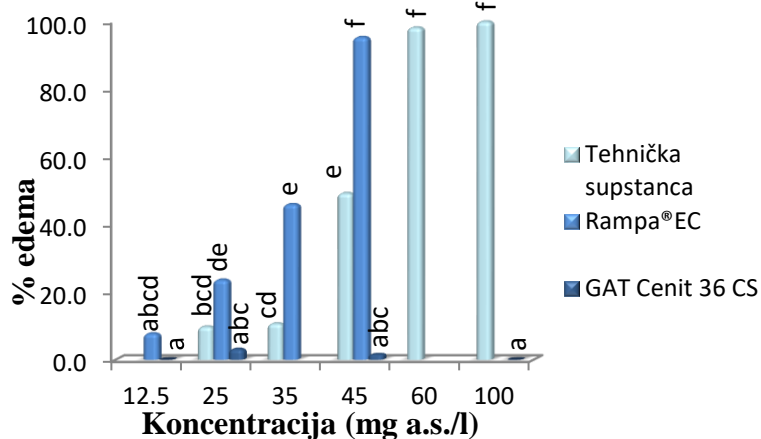
**Grafikon 24.** Smrtnost embriona *Xenopus laevis* (96 hpf) nakon izloženosti tehničkoj supstanci i preparatima klomazona.

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Kao i kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci pojava E registrovana je i kod izlaganja preparatu Rampa® EC (Slika 14). Na kraju perioda izlaganja statistički značajno veći broj embriona sa E registrovan je počevši od tretmana sa 28,9 mg/l (Prilog 6, Tabela P8 b). Najčešće detektovani bili su višestruki i okularni E (Grafikon 23). Veći udeo embriona sa E registrovan je kod izlaganja preparatu Rampa® EC u poređenju sa tehničkom supstancom, a razlike su bile na nivou statističke značajnosti počevši od tretmana sa  $\geq 35$  mg/l (Grafikon 25). Takođe, poređenjem  $EC_{50}$  za pojavu E između preparata i tehničke supstance potvrđeno je da je preparat Rampa® EC bio toksičniji (Tabela 19).



**Slika 14.** Poređenje kontrolnih (A) i embriona *Xenopus laevis* (96 hpf) izlaganih preparatima GAT Cenit 36 CS: 25 mg/l (B), 50 mg/l (C) i 100 mg/l (D), i Rampa® EC: 18 mg/l (E), 25 mg/l (F), 30 mg/l (G) i 38 mg/l (H). Strelice i skraćenice ukazuju na edeme (e), plihove (pl) deformacije kičme (dk), okularne (od), facijalne (fd) i deformacije digestivnog trakta (ddt).

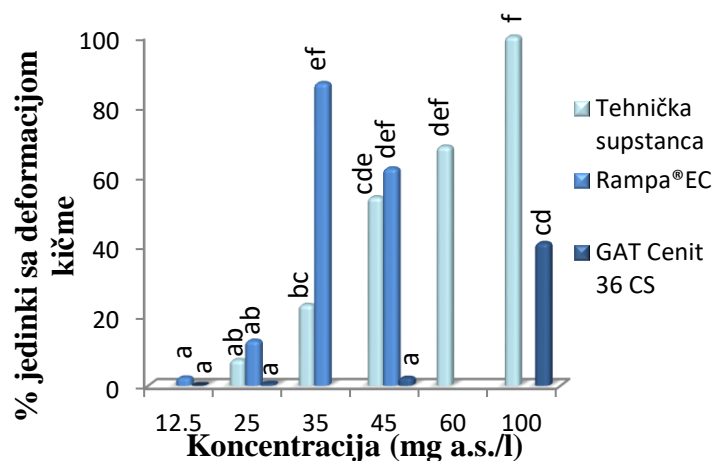


**Grafikon 25.** Uticaj tehničke supstance i preparata klomazona na pojavu edema kod embriona *Xenopus laevis* (96 hpf).

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Udeo embriona sa DK statistički je bio značajno ( $p < 0,01$ ) veći u odnosu na kontrolu počevši od tretmana sa 28,9 mg/l preparata (Prilog 6, Tabela P8 b). Srednja efektivna koncentracija bila je 31,7 mg/l, i u poređenju sa tehničkom supstancom preparat je

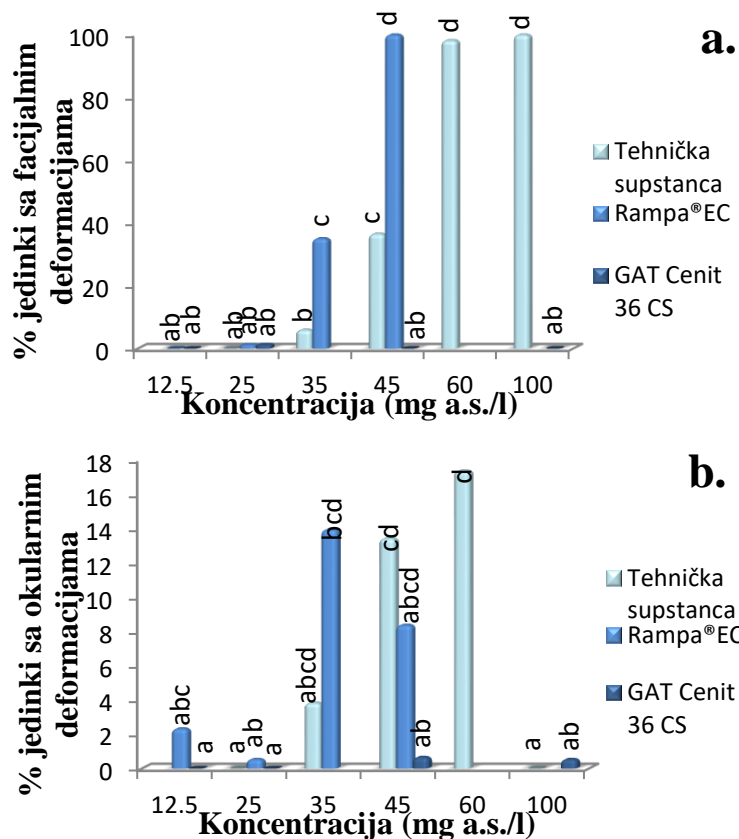
ispoljio statistički značajno veću toksičnost (Tabela 19), dok su poređenja pojedinačnih tretmana ukazala na značajne razlike jedino u tretmanu sa 35 mg/l (34,7 mg/l preparata nasuprot 35,3 mg/l tehničke supstance) (Grafikon 26).



**Grafikon 26.** Uticaj tehničke supstance i preparata klomazona na pojavu deformacija kičme kod embriona *Xenopus laevis* (96 hpf).

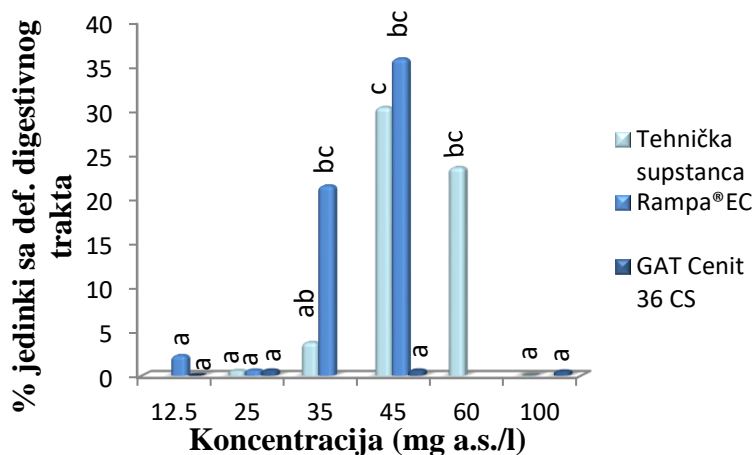
<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Od ostalih promena još su registrovane FD i OD, kao i DDT (Slika 14), a statistički značajno veći procenat u odnosu na kontrolu registrovan je u tretmanima sa 34,7 i 44,0 mg/l (Prilog 6, Tabela P8 b). Vrednost  $EC_{50}$  za pojavu FD od 35,7 mg/l statistički se značajno razlikovala u odnosu na tehničku supstancu, ukazujući na veću toksičnost preparata. Poređenjem pojedinačnih tretmana preparata i tehničke supstance, značajne razlike u intenzitetu pojave FD utvrđene su pri koncentracijama 35 (34,7 i 35,3 mg/l) i 45 mg/l (44,0 i 45,3 mg/l) (Grafikon 27). Statističkih razlika u intenzitetu pojave OD kod jedinki izlaganih preparatu Rampa® EC i tehničkoj supstanci nije bilo (Grafikon 27), a DDT se razlikovao jedino u tretmanu sa 35 mg/l (Grafikon 28).



**Grafikon 27.** Uticaj tehničke supstance i preparata kломazona na pojavu a) facijalnih i b) okularnih deformacija kod embriona *Xenopus laevis* (96 hpf).

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

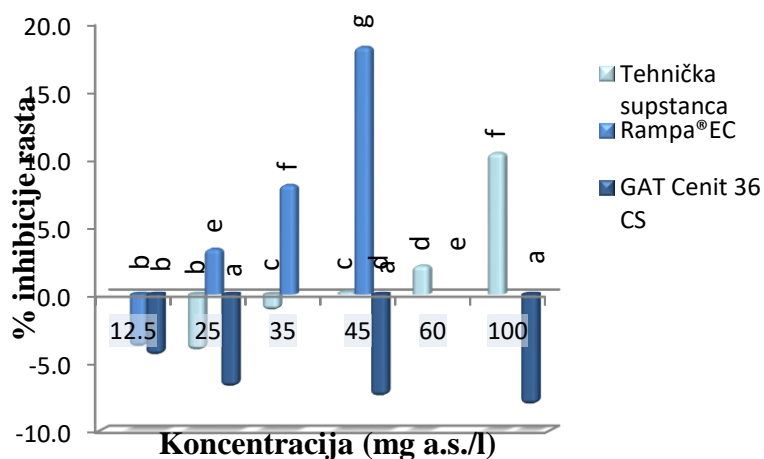


**Grafikon 28.** Uticaj tehničke supstance i preparata kломazona na pojavu deformacija digestivnog trakta kod embriona *Xenopus laevis* (96 hpf).

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna



Značajan uticaj preparata na dužinu embriona utvrđen je u svim ispitivanim tretmanima (Prilog 6, Tabela P8 b). Embrioni u tretmanima sa koncentracijama 14,5 i 20,8 mg/l bili su značajno duži od kontrolnih (2-4 %), dok je u tretmanima sa višim koncentracijama inhibicija rasta (dužine) bila u intervalu od 3 do 18%. U poređenju sa inhibicijom dužine do koje je dovelo izlaganje tehničkoj supstanci, preparat Rampa® EC je opet ispoljio veću toksičnost i statistički značajno veći intenzitet inhibicije dužine embriona *X. laevis* (Grafikon 29).



**Grafikon 29.** Uticaj tehničke supstance i preparata klomazona na porast embriona *Xenopus laevis* (96 hpf).

<sup>1</sup> ista slova označavaju da razlika nije statistički značajna

Preparat GAT Cenit 36 CS ni u jednom tretmanu nije doveo do smrtnosti preko 10%, ipak u nekim tretmanima smrtnost je bila statistički značajno veća od kontrole (Prilog 6, Tabela P8 c). Zbog male smrtnosti LC<sub>50</sub> nije bilo moguće odrediti, a poređenjem smrtnosti embriona izlaganih preparatu i tehničkoj supstanci u pojedinačnim tretmanima registrovana je statistički značajno manja toksičnost preparata (Grafikon 24). Vrednost EC<sub>50</sub> za pojavu malformacija bila je 111,1 mg/l i u poređenju sa EC<sub>50</sub> tehničke supstance preparat je ispoljio statistički značajno manju toksičnost (Tabela 18).

Za razliku od tehničke supstance i preparata Rampa® EC, pojava E kod embriona *X. laevis* izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS gotovo u potpunosti je izostala (Grafikon 25). Od ostalih promena, statistički značajno veći udeo embriona sa DK registrovan je kod embriona izlaganih najvišoj ispitivanoj koncentraciji, u odnosu na kontrolu (Slika 14; Prilog 6, Tabela P8 c). Poređenjem intenziteta pojave DK embriona izlaganih

preparatu GAT Cenit 36 CS, nasuprot embrionima izlaganim tehničkoj supstanci, utvrđen je statistički značajno manji uticaj preparata (Grafikon 26), a veća toksičnost tehničke supstance potvrđena je i poređenjem EC<sub>50</sub> vrednosti (Tabela 19).

Preparat GAT Cenit 36 CS stimulatивно je delovao na dužinu embriona *X. laevis* (Prilog 6, Tabela P8 c), sa statistički značajno ( $p < 0,01$ ) većom dužinom, u odnosu na kontrolu, u svim ispitivanim tretmanima. Za razliku od preparata GAT Cenit 36 CS, stimulacija rasta (dužine) jedinki izlaganih tehničkoj supstanci i drugom preparatu registrovana je samo u tretmanima sa nižim koncentracijama, pa je očigledna razlika u uticaju na porast u pojedinačnim tretmanima potvrđena dvofaktorskom analizom varijanse (Grafikon 29).

### **5.5. Ispitivanje citotoksičnih svojstava tehničke supstance i komercijalnih preparata klomazona**

Citotoksičnost tehničke supstance i preparata klomazona ispitivana je izlaganjem ćelijske linije poreklom od škrge *O. mykiss* – RTgill-W1. Inhibicija vijabilnosti ćelija, parametara citotoksičnosti koji je pokazatelj aktivnosti (vitalnosti) ćelijske populacije, merena je korišćenjem tri fluorescentne indikator boje (eseji): alamar plavo (AB), 5-karboksifluorescein diacetat acetoksimetil ester (CFDA-AM) i neutralno crveno (NR) (Prilog 7, Tabela P9). Smanjenje fluorescencije u esejima ukazivalo je na: smanjenje aktivnosti enzima diaforaza (esej AB), narušavanje integriteta ćelijske membrane (esej CFDA-AM) i narušavanje lizozoma (esej NR).

Rezultati ukazuju da su aktivna supstanca klomazon i preparat Rampa<sup>®</sup> EC ispoljili citotoksično delovanje; sa porastom koncentracije izlaganja proporcionalno je raslo i smanjenje viabilnosti ćelija (Grafikon 30). Kod ćelija izlaganih tehničkoj supstanci statistički značajna ( $p < 0,01$ ) razlika utvrđena je između EC<sub>50</sub> vrednosti tri parametra vijabilnosti ćelija (Tabela 20). Kao najosetljiviji izdvojio se esej AB, dok je najmanja osetljivost registrovana kod CFDA-AM. I kod ćelija izlaganih preparatu Rampa<sup>®</sup> EC statistički značajno ( $p < 0,01$ ) manje osetljiv bio je esej CFDA-AM u odnosu na AB i NR, između kojih razlika nije bilo. Sa druge strane, kod ćelija izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS citotoksično delovanje nije registrovano čak ni u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom (100 mg/l).

**Tabela 20.** Srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$  sa standardnom devijacijom) i 95% intervali poverenja nakon izlaganja ćelija linije RTGill-W1 tehničkoj supstanci i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

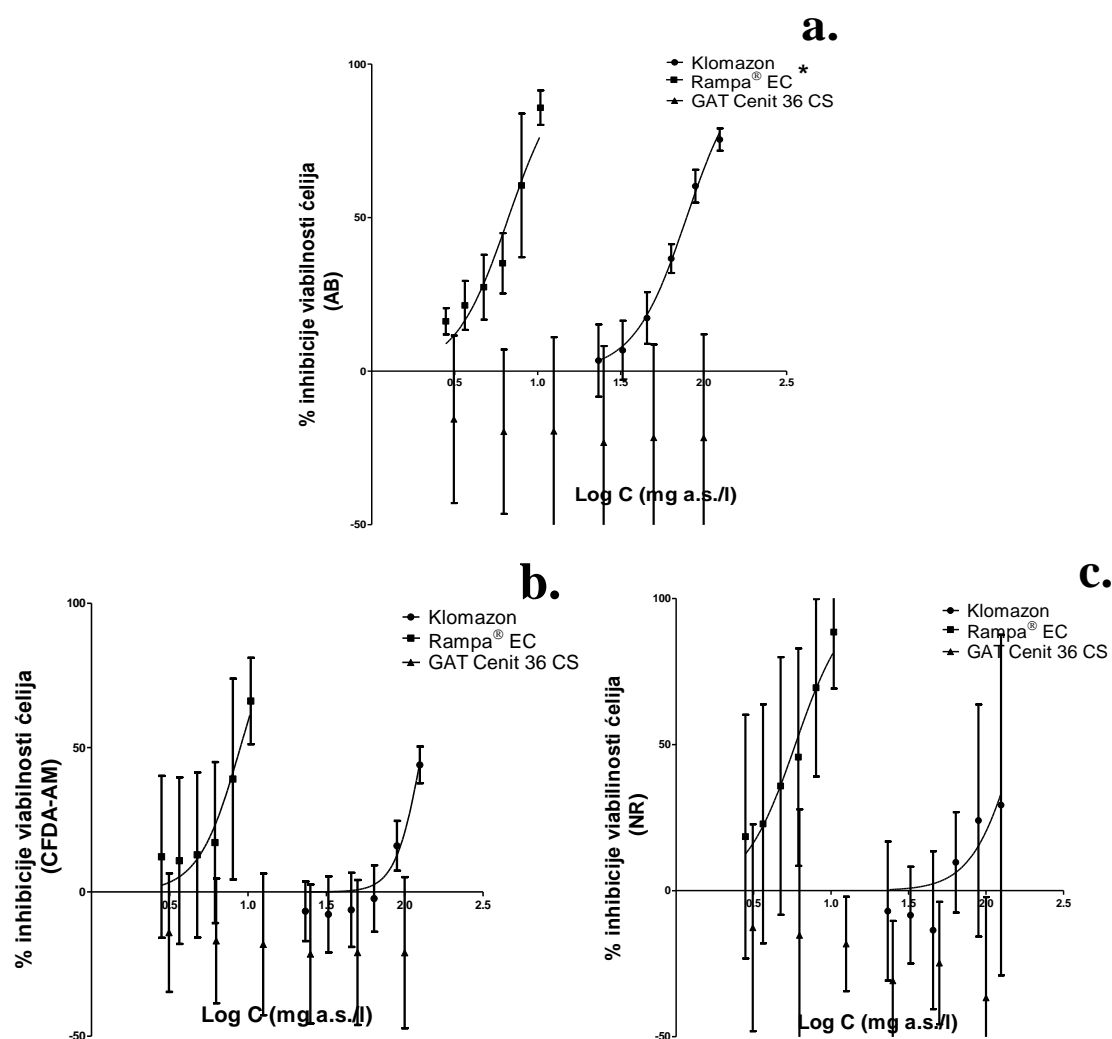
$EC_{50}$ (mg a.s./l) <sup>a</sup>	AB	CFDA-AM	NR
<b>Tehnička supstanca klomazon</b>	80,8 ± 8,7 <sup>C</sup> (77,6-84,0)	133,2 ± 8,7 <sup>E</sup> (125,3-141,3)	97,7 ± 8,8 <sup>D</sup> (90,7-105,3)
<b>Preparat Rampa<sup>®</sup> EC</b>	6,5 ± 8,6 <sup>C</sup> (6,1-6,9)	8,7 ± 9,1 <sup>D</sup> (7,6-10,0)	5,7 ± 9,2 <sup>C</sup> (4,8-6,8)
<b>Preparat GAT Cenit 36 CS</b>	-	-	-

$EC_{50}$  vrednosti dobijene su iz tri nezavisna eksperimenta (kontrola i tretmani u 6 ponavljanja (bunarčića), svaki) i prikazane su sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja (95%)

Ista slova u redu označavaju da nema statistički značajnih razlika između  $EC_{50}$  vrednosti

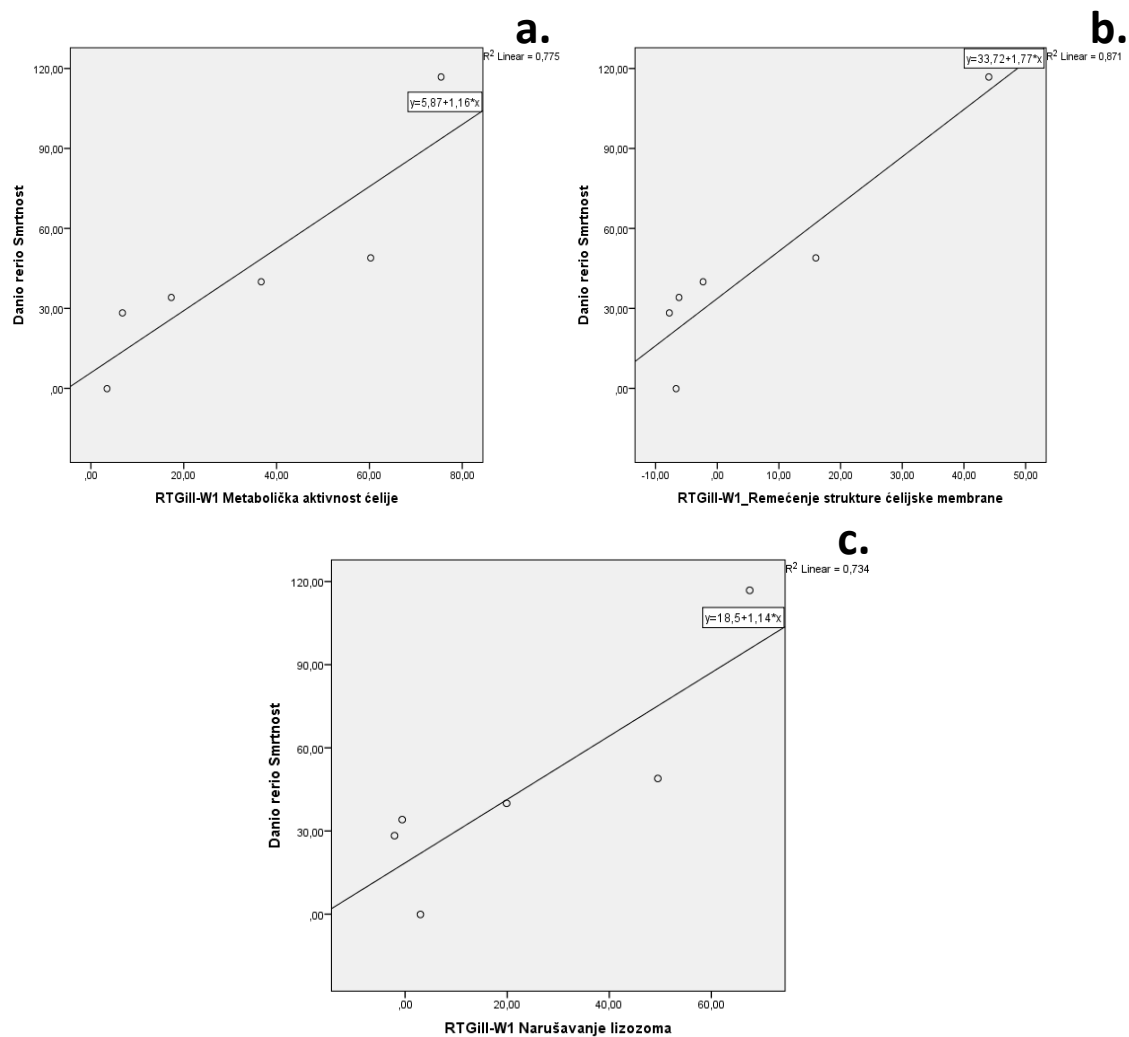
<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

Poređenjem  $EC_{50}$  vrednosti tehničke supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC za najosetljiviji parametar (AB), utvrđeno je da je preparat ispoljio statistički značajno ( $p < 0,01$ ) veći stepen citotoksičnosti (Grafikon 30a) u odnosu na čistu aktivnu supstancu.



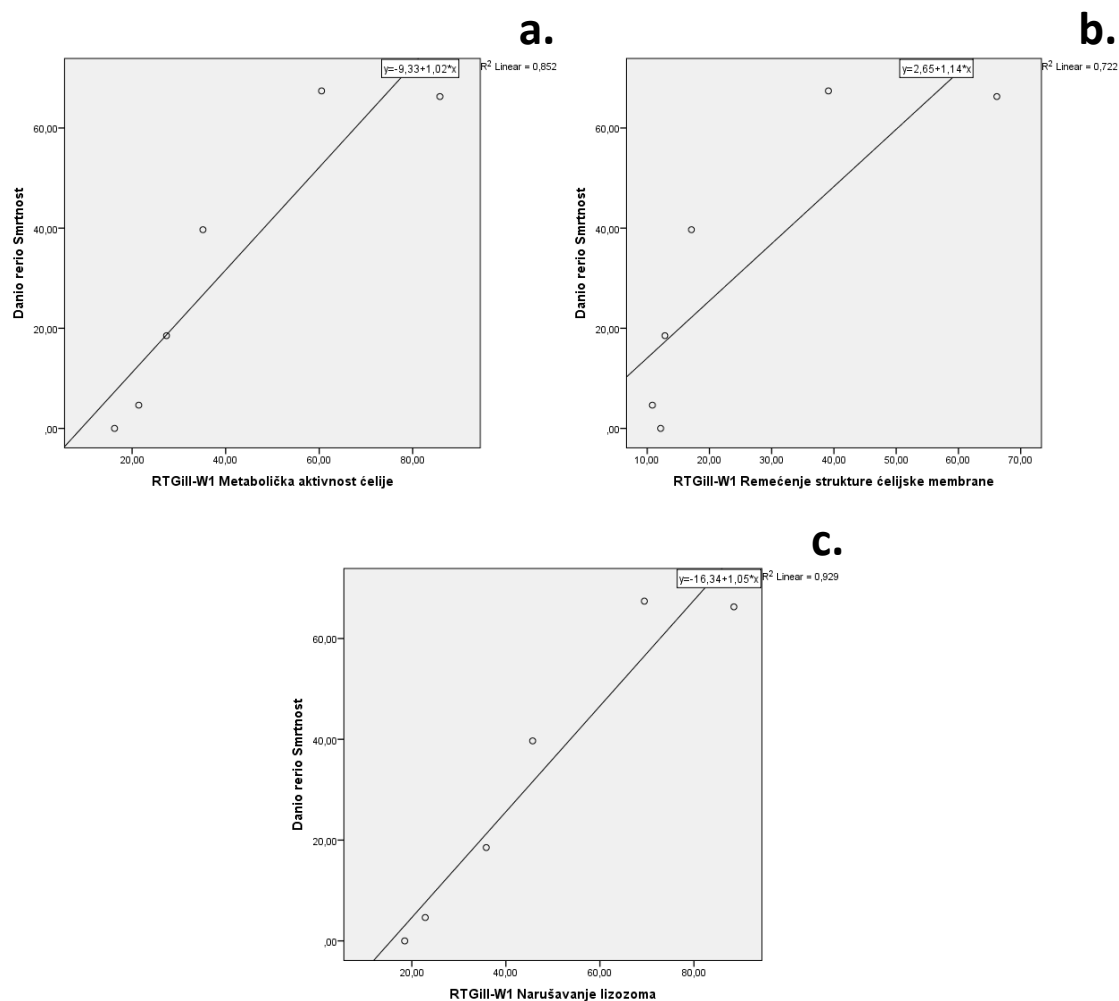
**Grafikon 30 (a-c).** Regresione krive dozne zavisnosti tri eseja citotoksičnosti za ćelije RTGill-W1 nakon 24-časovne izloženosti tehničkoj supstanci i preparatima klomazona utvrđenih na osnovu: a) metaboličke aktivnosti (esej AB), b) integriteta ćelijske membrane (esej CFDA-AM) i c) narušavanja lizozoma (esej NR). Vijabilnost ćelija prikazana je kao % smanjenja očitavane fluorescencije u tretmanu, u odnosu na kontrolu. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost i standardnu grešku.

Poređenjem smrtnosti embriona *D. rerio* i vijabilnosti ćelija RTGill-W1, na osnovu tri praćena parametra, izlaganih tehničkoj supstanci i preparatu Rampa® EC, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija. Kod izlaganja tehničkoj supstanci najjača korelacija utvrđena je između smrtnosti embriona i vijabilnosti ćelija na osnovu parametra CFDA-AM, sa koeficijentom korelacije ( $r$ ) 0,93 (koef. determinacije  $r^2=0,87$ ) (Grafikon 31).



**Grafikon 31.** Korelacija između smrtnosti embriona *Danio rerio* i citotoksičnosti za ćelije RTGill-W1 utvrđene na osnovu: a) metaboličke aktivnosti (esej AB), b) integriteta ćelijske membrane (esej CFDA-AM) i c) narušavanja lizozoma (esej NR), nakon izlaganja tehničkoj supstanci klomazon. Vijabilnosti ćelija prikazana je kao % smanjenja očitavane fluorescencije tretmana, u odnosu na kontrolu.

Za izlaganje preparatu Rampa<sup>®</sup> EC najjača korelacija ( $p < 0,01$ ) utvrđena je između smrtnosti embriona *D. rerio* i vijabilnosti ćelija na osnovu NR parametra, sa  $r = 0,96$  ( $r^2 = 0,93$ ) (Grafikon 32).



**Grafikon 32.** Korelacija između smrtnosti embriona *Danio rerio* i citotoksičnosti za ćelije RTGill-W1 utvrđene na osnovu: a) metaboličke aktivnosti (esej AB), b) integriteta ćelijske membrane (esej CFDA-AM) i c) narušavanja lizozoma (esej NR), nakon izlaganja preparatu Rampa<sup>®</sup> EC. Vijabilnosti ćelija prikazana je kao % smanjenja očitavane fluorescencije tretmana, u odnosu na kontrolu.

## 5.6. Procena rizika za akvatične organizme od primene klomazona

### 5.6.1. Prvi nivo stepenaste procene rizika (Tier I)

Obavezni testovi za procenu rizika za akvatične organizme od herbicida obuhvataju ispitivanja akutne toksičnosti za ribe i beskičmenjake i uticaj na rast algi i makrofita. Procena rizika se konstantno unapređuje, zahvaljujući zalaganju stručne i naučne zajednice, pa su kod specifičnih uslova ili svojstava ispitivane supstance pored obaveznih predloženi i dodatni testovi (EFSA, 2013). Tako, za supstance koje imaju tendenciju javljanja u površinskim vodama i koje hidrolizuju manje od 90% u prva 24h, stoji preporuka za uvođenje ispitivanja toksičnosti za embrione ili mlađ riba. Za potrebe

registracije pesticida Uredbom 283/2013 nisu obuhvaćena ispitivanja toksičnosti za vodozemce (EC, 2013a), ipak za potrebe procene rizika preporučuje se njihovo uključivanje. Ova preporuka odnosi se na razvojne stadijume vezane za vodenu sredinu. Ukoliko herbicidna supstanca ima specifičan mehanizam delovanja, ili postoje naznake veće toksičnosti za dikotiledone biljke, pored obaveznog ispitivanja sa vrstom *L. minor* preporučuje se ispitivanje uticaja na rast neke dikotiledone vrste (npr. vrste roda *Myriophyllum*).

Procena rizika za klomazon rađena je u okviru procesa registracije i stavljanja u promet pesticida (EFSA, 2007). U vreme registracije klomazona dodatni testovi nisu bili predloženi, pa tako nisu ni implementirani u pomenuti dokument. Jedan od doprinosa istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije je ispitivanje na nekim od vrsta predloženih za dodatna ispitivanja. Radi sveobuhvatnije procene rizika postojećim literaturnim podacima toksičnosti klomazona dodati su rezultati toksičnosti aktivne supstance i preparata Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS (Tabela 21).

U ispitivanjima sa akvatičnim makrofitama (*L. minor* i *M. aquaticum*) uticaj na rast praćen je merenjem više parametara, pa je na osnovu svakog od njih izračunata  $IC_{50}/EC_{50}$  vrednost. Parametar koji je ispoljio najveću osetljivost, odnosno za koji je izračunata  $IC_{50}/EC_{50}$  vrednost bila najniža, korišćen je za procenu rizika. U ispitivanjima sa vrstama *D. magna*, *D. rerio* i *X. laevis* za procenu rizika korišćene su dobijene  $EC_{50}/LC_{50}$  vrednosti.

**Tabela 21.** Toksičnost tehničke supstance i preparata klomazona za organizme akvatične sredine

Vrsta	Ispitivana supstanca	Izlaganje	Parametar toksičnosti	Toksičnost (mg/l)
<i>Danio rerio</i>	aktivna supstanca	120 h (statički)	LC <sub>50</sub>	61,4
			EC <sub>10</sub>	3,7
	Rampa® EC		LC <sub>50</sub>	9,6
			EC <sub>10</sub>	7,5
	GAT Cenit 36 CS		LC <sub>50</sub>	92,5
			EC <sub>10</sub>	19,7
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	aktivna supstanca	96 h (statički)	LC <sub>50</sub>	15,5*
	aktivna supstanca	21 dan (protočni)	NOEC	2,3*
<i>Xenopus laevis</i>	aktivna supstanca	96 h (statički)	LC <sub>50</sub>	79,1
			EC <sub>10</sub>	29,8
	Rampa® EC		LC <sub>50</sub>	38,1
			EC <sub>10</sub>	27,0
	GAT Cenit 36 CS		LC <sub>50</sub>	>100
			EC <sub>10</sub>	55,1
<i>Daphnia magna</i>	aktivna supstanca	48 h (statički)	EC <sub>50</sub>	49,9
	Rampa® EC		EC <sub>50</sub>	10,8
	GAT Cenit 36 CS		EC <sub>50</sub>	>100
	aktivna supstanca		EC <sub>50</sub>	12,7*
	aktivna supstanca	96 h (protočni)	NOEC	2,2*
	aktivna supstanca	120 h (statički)	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	>0,185*
<i>Navicula pelliculosa</i>	aktivna supstanca		E <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	0,136*
<i>Selenastrum capricornutum</i>	aktivna supstanca	72 h (statički)	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	4,1*
			E <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	2,0*
<i>Lemna minor</i>	aktivna supstanca	7 d (polustatički)	I <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	54,0
			I <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	18,9
	Rampa® EC		I <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	33,3
			I <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	14,5
	GAT Cenit 36 CS		I <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	321,0
			I <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	76,6
<i>Lemna gibba</i>	aktivna supstanca	7 d (statički)	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	34,0*
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	aktivna supstanca	7 d (statički)	I <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	1,2
			I <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	0,4
	Rampa® EC		I <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	8,7
			I <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	8,1
	GAT Cenit 36 CS		I <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	1,0
			I <sub>b</sub> C <sub>50</sub>	0,7

r – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu relativne stope rastab – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu prinosa

\* preuzeto iz EFSA (2007)



---

Za prvi nivo procene rizika generisana PEC vrednost iznosila je 67,64 µg/l (Prilog 8).

Rezultati procene rizika metodom određivanja TER vrednosti, sa graničnim vrednostima propisanim Aneksom VI Direktive 91/414/EEC (OJEC, 1991), prikazani su u Tabeli 22. Na prvom nivou procene rizika utvrđeno je da rizik koji tehnička supstanca predstavlja za organizme akvatične sredine nije prihvatljiv za jednu vrstu alge (*N. pelliculosa*) i jednu vrstu makrofite (*M. aquaticum*). Za sve ostale ispitivane organizme vrednosti TER bile su veće od graničnih vrednosti, stoga se procena rizika za te organizme završava na prvom nivou. Utvrđene TER vrednosti prvog nivoa procene rizika za organizme izložene preparatima Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS bile su veće od graničnih vrednosti za sve ispitivane organizme, što znači da je rizik koji upotreba ovih preparata u preporučenim količinama primene za organizme akvatične sredine prihvatljiv. Procena rizika za preparate završava se na ovom nivou.

**Tabela 22.** Prvi nivo procene rizika tehničke supstance i preparata klomazona za akvatične organizme

Vrsta	Tip ispitivanja	Toksičnost (mg/l)	PEC	TER	Granična vrednost
<b>Aktivna supstanca</b>					
<i>Danio rerio</i>	akutno	61,4	0,06764	907,7	100
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	akutno	15,5*	0,06764	229,2	100
	hronično	2,3*		34	10
<i>Xenopus laevis</i>	akutno	79,1	0,06764	1169,4	100
<i>Daphnia magna</i>	akutno	12,7*	0,06764	187,8	100
	hronično	2,2*		32,5	10
<i>Navicula pelliculosa</i>	akutno	>0,185* (r)	0,06764	<b>2,7</b>	10
		0,136* (b)		<b>2,0</b>	
<i>Selenastrum capricornutum</i>	akutno	4,1* (r)	0,06764	60,6	10
		2,0* (b)		29,6	
<i>Lemna minor</i>	kratkotrajno	54,0 (r)	0,06764	798,3	10
		18,9 (b)		279,4	
<i>Lemna gibba</i>	kratkotrajno	34,0*	0,06764	502,7	10
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	kratkotrajno	1,2 (r)	0,06764	17,7	10
		0,4 (b)		<b>5,9</b>	
<b>Rampa® EC</b>					
<i>Danio rerio</i>	akutno	9,6	0,06764	141,9	100
<i>Xenopus laevis</i>	akutno	38,1	0,06764	563,3	100
<i>Daphnia magna</i>	akutno	10,8	0,06764	159,7	100
<i>Lemna minor</i>	kratkotrajno	33,3 (r)	0,06764	492,3	10
		14,5 (b)		214,4	
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	kratkotrajno	8,7 (r)	0,06764	128,6	10
		8,1 (b)		119,8	
<b>GAT Cenit 36 CS</b>					
<i>Danio rerio</i>	akutno	92,5	0,06764	1367,5	100
<i>Xenopus laevis</i>	akutno	>100	0,06764	1478,4	100
<i>Daphnia magna</i>	akutno	>100	0,06764	1478,4	100
<i>Lemna minor</i>	kratkotrajno	321,0 (r)	0,06764	4745,7	10
		76,6 (b)		1132,5	
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	kratkotrajno	1,0 (r)	0,06764	14,8	10
		0,7 (b)		10,3	

Vrednosti TER koje su podebljane ne prelaze graničnu vrednost i ukazuju na neprihvatljiv rizik za te vrste  
r – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu relativne stope rasta

b – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu prinosa

\* preuzeto iz EFSA (2007)

Za vrste kod kojih je rizik na prvom nivou procene bio neprihvatljiv rađena je procena na drugom nivou. Generisana vrednost PEC drugog nivoa procene rizika iznosila je 27,52 µg/l (Prilog 9).

Vrednost TER izračunata na osnovu PEC drugog nivoa procene rizika i srednje efektivne koncentracije za *M. aquaticum* bila je veća od granične vrednosti (Tabela 23), stoga dolazimo da zaključka da je rizik od primene klomazona za ovu vrstu prihvatljiv.

**Tabela 23.** Drugi nivo procene rizika od tehničke supstance klomazon za akvatične organizme

Vrsta	Ispitivana supstanca	Toksičnost (mg/l)	PEC	TER	Granična vrednost
<i>Navicula pelliculosa</i>	a.s.	>0,185* (r) 0,136* (b)	0,02752	<b>6,7</b> <b>4,9</b>	10
<i>Myriophyllum aquaticum</i>		1,2 (r) 0,4 (b)	0,02752	43,6 14,5	10

r – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu relativne stope rasta

b – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu prinosa

\* preuzeto iz EFSA (2007)

Ipak, kod vrste *N. pelliculosa* TER izračunata na osnovu PEC drugog nivoa procene opet je bio niži od granične vrednosti, pa se rizik mora procenjivati na sledećem nivou.

Izračunata vrednost PEC-a trećeg nivoa procene rizika za scenario R3 bila je 6,73, a za R4 5,72 µg/L (Prilog 10).

Na osnovu TER vrednosti trećeg nivoa procene rizika utvrđeno je da primena klomazona ne predstavlja rizik za vrstu *N. pelliculosa* (Tabela 24).

**Tabela 24.** Treći nivo procene rizika od tehničke supstance klomazon za akvatične organizme

Vrsta	Ispitivana supstanca	Toksičnost (mg/l)	Scenario	PEC	TER	Granična vrednost
<i>Navicula pelliculosa</i>	a.s.	>0,185* (r) 0,136* (b)	R3 R4	0,00673 0,00572	27,5 20,2 32,3 23,8	10

r – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu relativne stope rasta

b – IC<sub>50</sub> vrednost dobijena na osnovu prinosa

\* preuzeto iz EFSA (2007)

Kako je ova vrsta ispoljila najveću osetljivost prema klomazonu, na osnovu dostupnih podataka možemo reći da je rizik koji upotreba klomazona u preporučenim koncentracijama nosi za akvatične organizme prihvatljiv.

Procena rizika urađena na osnovu RAC vrednosti dala je slične rezultate (Tabela 25). Kod procene rizika za aktivnu supstancu RAC vrednost za vrstu *N. pelliculosa* bila je niža od predviđene koncentracije u životnoj sredini ( $PEC_1$  i  $PEC_2$ ) za prva dva nivoa. Ipak, na trećem nivou procene utvrđeno je da je rizik prihvatljiv i za tu vrstu, za oba scenarija. Rizik koji primena preparata nosi već na prvom nivou bio je prihvatljiv za sve ispitivane organizme.

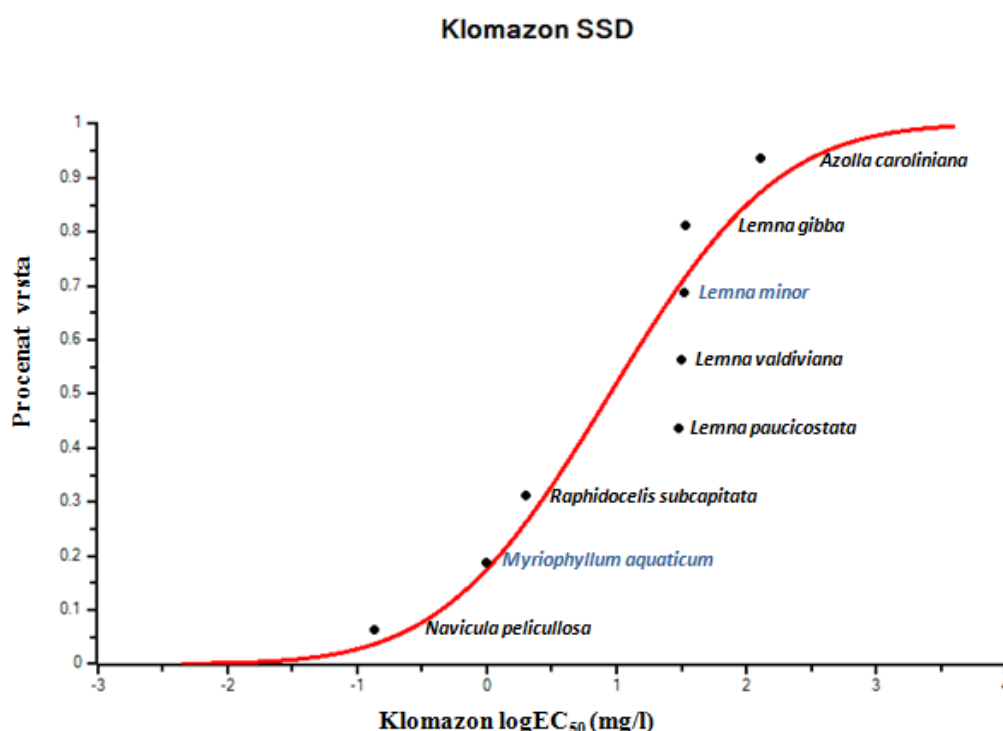
**Tabela 25.** Procena rizika od klomazona i preparata Rampa® EC i GAT Cenit 36 CS za akvatične organizme na osnovu RAC vrednosti

Vrsta	Tip ispitivanja	Toksičnost (mg/l)	RAC	PEC <sub>1</sub>	PEC <sub>2</sub>	PEC <sub>3</sub>	
						R3	R4
<b>Aktivna supstanca</b>							
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	akutno LC <sub>50</sub>	15,5	0,15	0,06764	-	-	-
<i>Danio rerio</i>	hronično EC <sub>10</sub>	3,7	0,37	0,06764	-	-	-
<i>Xenopus laevis</i>	hronično EC <sub>10</sub>	29,8	2,98	0,06764	-	-	-
<i>Daphnia magna</i>	akutno EC <sub>50</sub>	12,7	0,127	0,06764	-	-	-
	hronično NOEC	2,2	0,22	0,06764	-	-	-
<i>Navicula pelliculosa</i>	akutno E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	0,185	0,0185	<b>0,06764</b>	<b>0,02752</b>	0,00673	0,00572
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	akutno E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	1,2	0,12	0,06764	-	-	-
<b>Rampa® EC</b>							
<i>Danio rerio</i>	hronično EC <sub>10</sub>	7,5	0,75	0,06764	-	-	-
<i>Xenopus laevis</i>	hronično EC <sub>10</sub>	27,0	2,70	0,06764	-	-	-
<i>Daphnia magna</i>	akutno EC <sub>50</sub>	10,8	0,11	0,06764	-	-	-
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	akutno E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	8,7	0,87	0,06764	-	-	-
<b>GAT Cenit 36 CS</b>							
<i>Danio rerio</i>	hronično EC <sub>10</sub>	19,7	1,97	0,06764	-	-	-
<i>Xenopus laevis</i>	hronično EC <sub>10</sub>	55,1	5,51	0,06764	-	-	-
<i>Daphnia magna</i>	akutno EC <sub>50</sub>	>100	>1,0	0,06764	-	-	-
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	akutno E <sub>r</sub> C <sub>50</sub>	1,0	0,10	0,06764	-	-	-

### 5.6.2. Drugi nivo stepenaste procene rizika – SSD (Tier II)

Rezultati toksičnosti klomazona za vrste *L. minor* i *M. aquaticum* (stopa rasta najosetljivijeg parametra) i prikupljeni literaturni podaci ispunili su preporučeni minimalan broj podataka neophodnih za pouzdanu analizu distribucije osetljivosti vrsta. Za distribuciju osetljivosti vrsta, prikazanu na Grafikonu 33, upotrebljene su vrednosti toksičnosti utvrđene na osnovu stope rasta i prinosa, jer bi upotrebom samo vrednosti stope rasta broj podataka bio smanjen, a analiza onemogućena. Plavom bojom obeležene su vrednosti dobijene u okviru istraživanja za potrebe ove disertacije, dok su ostale vrednosti prikupljene iz dostupne literature. Vrednosti  $IC_{50}$  upotrebljene za konstrukciju sigmoidne krive prikazane su u Prilogu 11.

Vrsta *M. aquaticum* bila je druga najosetljivija vrsta; osetljivija je bila samo vrsta alge *Navicula pelicullosa*. Hazardna koncentracija klomazona za 5% najosetljivijih vrsta primarnih producenata je 0,16 mg/l (sa 50% pouzdanosti –  $HC_5$ ), odnosno 0,005 mg/l (95% pouzdanosti – LL  $HC_5$ ).



**Grafikon 33.** Distribucija osetljivosti vrsta (SSD) akvatičnih primarnih producenata na toksično dejstvo klomazona.

**Tabela 26.** Procena rizika od klomazona za akvatične primarne producente na osnovu SSD modelovanja

SSD	Toksičnost (mg/l)	AF	RAC	PEC1	PEC2	PEC3	
						R3	R4
HC <sub>5</sub>	0,16	3	0,052	<b>0,06764</b>	0,02752	-	-

Procena rizika urađena na osnovu RAC vrednosti dobijene SSD modelovanjem dala je slične rezultate kao prvi nivo stepenaste procene rizika. U slučaju RAC vrednosti izračunate na osnovu HC<sub>5</sub> rizik je prihvatljiv već za drugu vrednost predviđenih koncentracija u životnoj sredini.

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Nestandardni testovi rađeni sa klomazonom i njihov doprinos u proceni efekata

#### 6.1.1. *Myriophyllum aquaticum* kao dodatna vrsta u proceni toksičnosti herbicida i regulatora rasta

Ispitivanje uticaja herbicida i regulatora rasta na akvatične makrofite integralni je deo procesa registracije pesticida i njihovog stavljanja u promet, kao i jedan od osnovnih koraka preventivne procene rizika. U okviru ovog procesa obavezni su testovi na vrsti planktonskih zelenih algi (OECD 201, 2011) i vrsti roda *Lemna* (OECD 221, 2006), predstavnicima primarnih producenata. Kao standardni test organizam, vrste roda *Lemna* svrstavaju se u najčešće korišćene akvatične makrofite u ispitivanjima toksičnosti pesticida. Ipak, veći broj autora ukazao je na razlike u osetljivosti u odnosu na druge vrste (Fairchild et al., 1998; Davies et al., 2003; Cedergreen et al., 2004; Belgers et al., 2007). Razlike u osetljivosti prema različitim pesticidima zavise kako od svojstava samih supstanci, tako i od razlika vezanih za biologiju i ekologiju testiranih vrsta. Veliki broj herbicida namenjen je za suzbijanje dikotiledonih biljaka, pa vrste roda *Lemna*, kao monokotiledone biljke, mogu ispoljiti manju osetljivost. Takođe, manja osetljivost može biti i posledica razlika u izloženosti – submerzne biljake su izložene čitavom površinom, dok su flotantne vrste izložene samo donjom površinom biljke. Imajući sve rečeno u vidu, procena rizika koja se zasniva samo na vrstama roda *Lemna* ne pruža odgovarajući nivo zaštite od rizika za sve primarne producente u akvatičnim ekosistemima (Maltby et al., 2010).

Ispitivanja na vrstama roda *Myriophyllum* aktuelna su duži niz godina, a prema smernicama vodiča za stepenasto organizovanu procenu rizika od pesticida za vodene ekosisteme u neposrednoj blizini obradivih površina (EFSA, 2013) predložene su kao dopuna postojećih procedura procene rizika od herbicida i regulatora rasta, na višim nivoima. Prednost ovog testa, u odnosu na testove sa vrstama roda *Lemna* je proširivanje ispitivanja sa jedno (voda) na dvokomponentni sistem (voda i sediment). Ovakav test ima visoku ekološku relevantnost, jer je sediment integralni deo svakog



akvatičnog ekosistema i najbolje oslikava uslove u akvatičnoj sredini. Značajnost ispitivanja u dvokomponentnom sistemu ogleda se u nizu fizičko-hemijskih procesa vezanih za adsorpciju, biodostupnost i preraspodelu supstance između dve faze. Sediment može značajno uticati na smanjenje sadržaja zagađujućih supstanci u vodenom stubu, pa testiranje sa neukorenjenim makrofitama može dati lažno negativne rezultate, odnosno dovesti do pogrešnog zaključka da ispitivana supstanca ne predstavlja rizik za akvatične ekosisteme (Maltby et al., 2010).

Rezultati ispitivanja toksičnosti kloramfenikola, dobijeni u okviru ove disertacije, ukazali su na veću osetljivost vrste *M. aquaticum* u odnosu na *L. minor*. Srednja inhibitorna koncentracija (IC<sub>50</sub>) rasta vrste *M. aquaticum*, kod ispitivanja sa tehničkom supstancom, bila je 50 puta niža u odnosu na vrstu *L. minor*. Ovaj nalaz potvrđuje činjenicu da se procena rizika, koja se do skora oslanjala samo na vrste roda *Lemna*, ne može uvek primeniti za zaštitu ostalih makrofita zbog činjenice da su vrste roda *Lemna* neukorenjene monokotiledone biljke sa kratkim generacijskim vremenom i brzom stopom oporavka. Veću osetljivost vrsta roda *Myriophyllum* prema pojedinim herbicidima, u poređenju sa vrstama iz roda *Lemna*, dokazao je veći broj istraživača (Turgut i Fomin, 2002; Cedergreen et al., 2004; Tunić et al., 2015). Turgut i Fomin (2002) su ispitivanjem osetljivosti *M. aquaticum* prema 17 pesticida (od toga 14 herbicida) utvrdili da je kod većine ispitivanih supstanci osetljivost slična vrstama roda *Lemna*. Ipak, za auksin simulatorske (2,4-D; dikamba; dihlorprop), piridat i neka jedinjenja iz grupe sulfonilurea vrsta *M. aquaticum* ispoljila je značajno veći nivo osetljivosti. Do sličnog zaključka došli su i Tunić et al. (2015) dokazavši veću osetljivost vrsta roda *Myriophyllum* (*M. aquaticum* i *M. spicatum*) prema 2,4-D, u odnosu na vrstu *L. minor*. Sa druge strane, vrsta *M. spicatum* bila je manje osetljiva od *L. minor* prema supstanci metsulfuron-metil (sulfonilurea) (Cedergreen et al., 2004). Zanimljivo je da su dve studije (Turgut i Fomin, 2002; Cedergreen et al., 2004) pokazale da čak i jedinjenja iz iste hemijske grupe mogu različito da deluju na akvatične makrofite istog roda, pa se ne može govoriti o univerzalno najosetljivijoj vrsti akvatičnih makrofita. Slično, Tunić et al. (2015) su na osnovu komparativne studije toksičnosti šest herbicida, takođe došli do zaključka da ni jedna od tri ispitivane test vrste ne može da se izdvoji kao najosetljivija.

Najveća razlika u osetljivosti dve vrste prema klomazonu registrovana je kod izlaganja preparatu GAT Cenit 36 CS (300x manja  $IC_{50}$  vrednost kod vrste *M. aquaticum*). Ovaj preparat, koji nije ispoljio toksično delovanje na vrstu *L. minor*, kod ispitivanja sa ukorenjenom makrofitom doveo je do značajnih efekata u svim ispitivanim tretmanima, a  $IC_{50}$  vrednost bila je na nivou koncentracija detektovanih u životnoj sredini (Hug et al., 2014). Veća toksičnost registrovana kod ispitivanja sa *M. aquaticum* može se delimično objasniti interspecijskom varijabilnošću.

Proučavanjem uticaja klomazona na akvatične makrofite, osim ispitivanja za potrebe registracije i stavljanja u promet, bavio se veći broj istraživača (Michel et al., 2004; EFSA, 2007; Silva et al., 2012). U poređenju sa rezultatima drugih autora (Michel et al., 2004; EFSA, 2007), vrsta *L. minor* ispoljila je manju osetljivost prema tehničkom klomazonu, u odnosu na druge vrste roda *Lemna* (*L. punctostata* i *L. gibba*  $EC_{50}=30,2$  i  $34,0$  mg/l), međutim kako odstupanja nisu velika ovo može biti posledica razlika u osetljivosti međulaboratorijskih populacija, kao i uslova gajenja i izlaganja. Druga ispitivana vrsta – *Azolla caroliniana* bila je manje osetljiva u odnosu na vrste roda *Lemna* (Silva et al., 2012; Della Vechia et al., 2016). Važno je istaći da su studije sa klomazonom rađene na flotantnim makrofitama, dok su ispitivanja na ukorenjenim makrofitama izostala. Rezultati ispitivanja u okviru ove disertacije prvi su nalaz tog tipa i ukazuju da, u slučaju klomazona, flotante vrste nisu dovoljno prediktivne i protektivne za sve akvatične makrofite, odnosno da je ispitivanjima samo na vrstama roda *Lemna*, potcenjen rizik od njegove primene za ostale akvatične makrofite.

Ispitivanje uticaja preparata formulisanog u obliku suspenzije kapsula (EFSA, 2007) u saglasnosti je sa fitotoksičnošću preparata GAT Cenit 36 CS za *L. minor*, međutim u ispitivanjima Della Vechia et al. (2016) isti oblik preparata (Gamit<sup>®</sup> CS) ispoljio je značajno veću toksičnost ( $EC_{50}=10,2$  mg/l). U ovoj studiji su biljke pre postavke eksperimenta (predekspozicija) bile izlagane preparatu u trajanju od 24 h, a nakon toga podvrgnute dezinfekciji u rastvoru natrijumhipohlorita (2%). Povećana osetljivost biljaka prema klomazonu ne može biti posledica predekspozicije, ali je moguće da povećana osetljivost biljaka proističe iz pretrpljenog stresa ili eventualnog oštećenja tkiva nakon dezinfekcije. Ispitivanja sa preparatima formulisanim u vidu koncentrata za

emulzije do sada nisu rađena, a prema našim rezultatima ovaj tip formulacije ispoljio je najveći stepen toksičnosti prema *L. minor*.

### **6.1.2. Ispitivanje embriotoksičnosti klomazona**

#### *6.1.2.1. Testovi sa vrstom Danio rerio*

U skladu sa postulatom 3R test embriotoksičnosti sa vrstom *D. rerio* predložen je kao alternativni metod za ispitivanje neželjenih efekata toksikanata akvatične sredine (Nagel, 2002; Braunbeck et al., 2005; Scholz et al., 2008). Prema navodima Belanger et al. (2013) predloženi test iste je osetljivosti kao standardni test akutne toksičnosti na ribama, ali je dobrobit životinja značajno unapređena. Naime, toksikanti su često prisutni u subletalnim koncentracijama i mogu uzrokovati niz morfoloških, histoloških i biohemijskih poremećaja koje standardnim testom akutne toksičnosti nije moguće pratiti. Spoljašnje oplodjenje, brz razvoj, jednostavna manipulacija i prozirnost tokom embrionalnog/larvenog stadijuma zbog koje je moguće praćenje morfoloških anomalija ukazuju na prednost testova sa embrionima *D. rerio*, u odnosu na testove akutne toksičnosti sa adultnim stadijumima (Cook et al., 2005; De Esch et al., 2012; Fraysse et al., 2006; Pérez et al., 2013). Pojavu različitih subletalnih malformacija (žumančani i kardijalni edemi, deformacije kičme, neuralni poremećaji, kraniofacijalne i deformacije mehura...) kao posledicu izlaganja pesticidima, dokumentovao je veliki broj istraživača (Cook et al., 2005; Lin et al., 2013; Wiegand et al., 2001).

Uticaj klomazona na ribe ispitivan je za juvenilni i adultni stadijum više vrsta (dos Santos Miron et al., 2004, 2005; Crestani et al., 2006, 2007; Cattaneo et al., 2012; Pereira et al., 2013). Iako postoje brojna proučavanja toksičnog delovanja različitih pesticida na različite stadijume *D. rerio* (Görge and Nagel, 1990; Lin et al., 2013; Watson et al., 2014; Weichert et al., 2017; Wang et al., 2018), nijedna studija nije obuhvatila ispitivanje uticaja klomazona na embrionalni stadijum ove, ili bilo koje druge vrste. Prema dostupnoj literaturi srednja letalna koncentracija (LC<sub>50</sub>) klomazona za ribe varira od 15,5 mg/L (*O. mykiss*) do 34 mg/l (*L. macrochirus*) za slatkovodne i 40,6 mg/l (*C. variegatus*) za morske vrste (EFSA, 2007; U.S. EPA, 2007a). Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da je embrionalni stadijum manje osetljiv od juvenilnog i adultnog, ali da su rezultati u istom koncentracionom opsegu

( $LC_{50}=61,4$  mg/l). Razlike u osetljivosti mogu se objasniti različitom osetljivošću razvojnih stadijuma ispitivanih vrsta. Rani razvojni stadijumi su obično najosetljiviji u toku života riba, međutim prema navodima nekih autora horion ima zaštitno svojstvo i može značajno umanjiti usvajanje toksičnih supstanci (Fent i Meier, 1994; Strmac i Braunbeck, 1999; Braunbeck et al., 2015; Pamanji et al., 2015).

Pored smrtnosti praćene su razvojne promene i niz deformacija do kojih je izlaganje klomazonu dovelo, a koje do sada nisu dokumentovane. Iz odnosa smrtnosti i teratogenih efekata utvrđeno je da tehnička supstanca klomazon ima teratogeni potencijal ( $TI=5,1$ ).

Kod embriona *D. rerio* starosti 22 h registrovano je dozno zavisno smanjenje učestalosti spontanijih kontrakcija repa, koje su pokazatelj normalnog razvoja motornih neurona i nisu pod kontrolom centralnog nervnog sistema (Kimmel et al., 1995). Ovakav uticaj herbicida na embrione *D. rerio* dokumentovao je veći broj autora (Wiegand et al., 2001; Lin et al., 2013; Weichert et al., 2017). Poznato je da mnogi insekticidi deluju na nervni sistem, ali neurotoksično delovanje klomazona na embrione *D. rerio* do sada nije registrovano. Međutim, pokazano je da je aktivnost acetilholinesteraze (AChE), posebno kod riba, vrlo značajna za mnoge fiziološke funkcije kao što su lokomotorna aktivnost, pronalaženje hrane, izbegavanje predatora, orijentacija u prostoru, socijalne interakcije (Bradbury et al., 2008), pa remećenje aktivnosti ovog enzima negativno utiče na pobrojane fiziološke funkcije. Pored ove poznate aktivnosti enzima, utvrđeno je da enzim ima i druge tzv. neklasične uloge kao što su: delovanje na hematopoezu, trombopoezu, dopaminsku aktivaciju neurona, sinaptogenezu, formiranje nervnih i amiloidnih vlakana i dr. (Soreq i Seidman, 2001), a neke od uloga nisu do kraja rasvetljene (Kim i Lee, 2018). Behra et al. (2002) su od neklasičnih funkcija AChE kod *D. rerio*, registrovali uticaj na nervno-mišićni razvoj embriona. U nekoliko ispitivanja je utvrđeno da, pored klasičnih inhibitora AChE, organofosfata i karbamata, i piretroidi, neki teški metali, ali i herbicidi, remete funkciju AChE kod riba (Kumar et al., 2009; Salbego et al., 2010; Richetti et al., 2011; Menéndez-Helman et al., 2012; Larsen et al., 2016; Clasen et al., 2018). Shuman-Goodier i Propper (2016) su konstatovali da je u osnovi smanjene brzine plivanja kod riba inhibicija aktivnosti AChE. Zahvaljujući rezultatima ispitivanja pomenutih, ali i drugih autora koji su utvrdili smanjenje AChE u

moždanom tkivu riba izlaganih klomazonu (dos Santos Miron, 2005; Crestani et al., 2007; Moraes et al., 2007; dos Santos Miron et al., 2008; Pereira et al., 2013; Murussi et al., 2015), odnosno povećanje aktivnosti AChE u mišićnim tkivima (Moraes et al., 2007, Murussi et al., 2015) možemo pretpostaviti da je u osnovi uticaja klomazona na spontane kontrakcije ometanje neurotransmisije u holinergičkim sinapsama i uticaj na razvoj motornih (eferentnih) neurona.

Osim delovanja na nervni sistem, kod embriona je utvrđeno i kašnjenje u razvoju. Kao i kod uticaja na spontane kontrakcije, mehanizam kojim je klomazon doveo do zaostatka u razvoju nije poznat. Jedna od pretpostavki može da proistekne iz poznatog mehanizma delovanja klomazona – inhibicije sinteze izopentenil pirofosfata (IPP). Uloga ovog jedinjenja u animalnim ćelijama je od izuzetnog značaja. Naime, IPP je prekursor za veliki broj biološki aktivnih jedinjenja neophodnih za razvoj i normalno funkcionisanje organizma, kao što su: holesterol, terpenoidi, steroidi, koenzim Q, itd. (Voet i Voet, 2011). Međutim, inhibicija IPP u biljnim ćelijama odvija se u okviru metileritrol 4-fosfat (MEP) metaboličkog puta, koji je specifičan za biljnu ćeliju (Ferhatoglu i Barrett, 2005). Sa druge strane mevalonski put koji je prisutan i u biljnim i u animalnim ćelijama nije narušen, te stoga pretpostavka remećenja sinteze izoprenoida kao mehanizma delovanja kod embriona *D. rerio* nije prihvatljiva. Ipak, u okviru MEP puta klomazon inhibira reakciju između piruvata i gliceraldehid 3-fosfata (G3P) delujući na enzim deoksiluloza 5-fosfat sintazu (DXP). Oba jedinjenja – piruvat i G3P uključeni su u više metaboličkih puteva svih organizama, od kojih su najvažniji Krebsov (ciklus trikarbonskih kiselina) i pentoza fosfatni metabolički ciklus. Takođe, piruvat je od suštinske važnosti u sintezi alanina, kao i u metabolizmu  $\beta$  oksidacije masnih kiselina i glikolizi. U aerobnim uslovima ćelijskim procesima piruvat biva preveden u acetilkoenzim A ili oksalsirćetnu kiselinu (oksalacetat), međutim pod anaerobnim uslovima piruvat fermentacijom prelazi u mlečnu kiselinu (Voet i Voet, 2011). Becker et al. (2009) su ispitivanjem uticaja smeše koja je sadržala klomazon na metabolizam soma (*Rhamdia quelen*) utvrdili da je, između ostalog, došlo do nakupljanja mlečne kiseline u mišićnom tkivu. Ovaj podatak ukazuje da je moguće mesto delovanja klomazona u animalnim ćelijama narušavanje metabolizma piruvata. Ukoliko je ova pretpostavka tačna, ključni ćelijski metabolički procesi bili bi prekinuti što bi, u embrionalnoj

razvojnoj fazi, dovelo do usporavanja ili potpunog prekida daljeg razvoja, a što je ispitivanjima u okviru ove disertacije i registrovano.

Nagel (2001) navodi da je srčani ritam jedan od najvažnijih subletalnih parametara koji se prati kod ispitivanja embriotoksičnosti *D. rerio*. Brz srčani ritam koji prati metaboličku aktivnost od krucijalne je važnosti u toku razvoja organizma. Delovanje hemikalija na usporavanje srčanog ritma može da rezultira brojnim komplikacijama (Singleman i Holtzman, 2012; Watson et al., 2014). Usporavanje srčanog ritma pod uticajem herbicida (atrazin) registrovali su Wiegand et al. (2001). Kod jedinki izlaganih organofosfatnim insekticidima usporavanje srčanog ritma dovodi se u vezu sa produženom stimulacijom receptora za acetyl holin na postsinaptičkoj membrani, koja nastaje zbog inhibicije aktivnosti AChE (Watson et al., 2015; Pamanji et al., 2015). Remećenje aktivnosti AChE u mišićnom tkivu pod uticajem klomazona utvrdilo je više istraživača (dos Santos Miron et al., 2005; Crestani et al., 2007; Moraes et al., 2007), a moguće je da su posmatrani efekti na kardiovaskularni sistem u našem istraživanju posledica istog mehanizma, koji dovodi do ispoljavanja muskarinskih efekata (usporen srčani rad), kao posledica produžene stimulacije muskarinskih receptora (Di Gulio i Hinton, 2008). Poremećaji rada srca koji vode usporavanju srčanog ritma posredno utiču i na cirkulaciju, pa se dodatna merenja uticaja toksikanata na kardiovaskularni sistem orijentišu na utvrđivanje morfoloških promena srca i pojavu edema (Billiard et al., 1999; Yamuchi et al., 2005; Watson et al., 2014), a što je u okviru ispitivanja uticaja klomazona i registrovano.

Izvaljivanje larvi *D. rerio* odvija se sporadično, počevši od 48 hpf i traje do 72 hpf, ponekad i duže (Kimmel et al., 1995). Sporije (odloženo, kasnije) izvaljivanje larvi u odnosu na kontrolnu grupe registrovano je kod jedinki izlaganih tehničkom klomazonu. Odloženo izvaljivanje, kao pokazatelj negativnog uticaja pesticidnih jedinjenja na larve *D. rerio* praćeno je i u drugim studijama (Todd i Van Leeuwen, 2002; Lin et al., 2013). Prema navodima nekih autora, odloženo izvaljivanje larvi može biti posledica uticaja toksikanta na proteolitičke enzime koji deluju na horion prilikom procesa izvaljivanja. Ukoliko dođe do narušavanja osmoze, larve se mogu naći u stanju hipoksije što posredno utiče na aktivnost, smanjenje pokreta repa, a za posledicu takođe može imati odloženo izvaljivanje (Strmac et al., 2002; Haendel et al., 2004; Pandey i Guo, 2014).

Stepen razvijenosti embriona nije uslovljen vremenom izvaljivanja, a ranije izvaljene jedinke nisu po pravilu razvijenije od onih koje su još obavijene horionom (Kimmel et al., 1995). Larve *D. rerio* su, i pored odloženog izvaljivanja na kraju perioda izlaganja klomazonu, gotovo sve bile izvaljene. Pamanji et al. (2015) takođe su registrovali odlaganje izvaljivanja koje je bilo kratkotrajnog karaktera i zaključili da, iako na kraju eksperimentalnog perioda nije bilo značajnih razlika u odnosu na kontrolnu grupu, odlaganjem izvaljivanja larve duže ostaju obavijene horionom i ostaju lako dostupan plen.

Porast (dužina) embriona izdvaja se kao lako merljiv parametar koji može da ukaže na brojne molekularne i ćelijske odgovore. Takođe, smanjenje porasta riba u određenim razvojnim stadijumima može biti indikator smanjenja dobrog fizičkog stanja individua (Newman i Unger, 2003; Cook et al., 2005). Slično rezultatima uticaja insekticida (lindan, malation, monokrotofos) na porast embriona *D. rerio* (Görge i Nagel, 1990; Fraysse et al., 2006; Pamanji et al., 2015), kod jedinki izlaganih klomazonu utvrđeno je značajno smanjenje porasta. Na osnovu ranije iznetih pretpostavki o potencijalnom mehanizmu delovanja klomazona na *D. rerio* smanjenje porasta može biti posledica narušavanja metaboličkih procesa, sinteze aminokiselina i metabolizma ugljenih hidrata. Kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci je, pored uticaja na dužinu, registrovana i pojava deformacija kičme i vrha repa. Solomon (1977 – cit. Cook et al., 2005) pojavu deformisanja (savijanja) repova kod embriona medake (*Oryzas* sp.) nakon izlaganja malationu povezuje sa neuromuskularnim spazmom. Uticaj klomazona na smanjenje aktivnosti AChE već je pomenut, pa su moguće posledice ovakvog delovanja deformacije kičme i repa registrovane u našim ispitivanjima.

Nedostatak ili neispunjenost mehura kod riba je pogodan parametar za praćenje uticaja toksičnih supstanci, jer je značajan pokazatelj narušenog razvoja embriona *D. rerio* (Li et al., 2011; Hagenaaars et al., 2014; Santos et al., 2014). Poremećaj obrazovanja ili naduvenosti mehura bio je veoma osetljiv pokazatelj toksičnosti klomazona. Mehur je kod riba od esencijalne važnosti, jer regulisanje ispunjenosti (zapremine) mehura omogućava ribama neometano kretanje prilikom promene dubine vode (Robertson et al., 2007). Promenu zapremine formiranog mehura kontroliše autonomni nervni sistem, refleksnim kontrakcijama membrane pomoću acetilholina i opuštanja (relaksacije)

pomoću  $\beta$ -adrenergičkog agoniste (Fänge, 1983). Uticaj klomazona na aktivnost AChE je već pomenut, a moguće je da je upravo smanjenje aktivnosti dovelo do kontrakcije membrane mehura i onemogućavanja usvajanja gasova. Kranijalne deformacije su još jedan od poremećanja registrovanih kod embriona *D. rerio* izlaganih klomazonu. Pojava ovakvih deformacija, kod organizama koji su u ranim fazama razvoja, može biti posledica usporavanja krvotoka i slabijeg dospevanja hranljivih materija u glavenu regiju (Billiard et al., 1999).

Rezultati ispitivanja klomazona na embrione *D. rerio* u okviru ove disertacije ukazuju da, pored smrtnosti, niz razvojnih i morfoloških poremećaja značajno može ugroziti opstanak populacije koja je izložena delovanju klomazona. U tretmanu sa najnižom ispitivanom koncentracijom, a koja je u nivou koncentracija registrovanih u životnoj sredini (Hug et al., 2014), udeo deformisanih jedinki bio je oko 30%. Kombinacija neispunjenog mehura, kraniofacijalnih i deformacija kičme i repa u realnim uslovima ekosistema posredno može da dovede do uginuća embriona zbog izgladnjivanja ili neuspešnog izbegavanja predatora (Goolish i Okutake, 1999; Li et al., 2011).

#### 6.1.2.2. Testovi sa vrstom *Xenopus laevis*

Opadanje brojnosti prirodnih populacija vodozemaca širom sveta sve češće se vezuje za upotrebu pesticida, a prema nekim podacima oko 40% vrsta je u opasnosti od istrebljenja (Mikó et al., 2017). Iako im je razvoj direktno vezan za akvatičnu sredinu, ispitivanja razvojnih promena i osetljivosti vodozemaca prema pesticidima i dalje su ograničena. Poslednjih godina ozbiljno je rađeno na ovoj problematici, što je rezultiralo i preporukom za uključivanje vodozemaca u procenu rizika od pesticida (EFSA, 2013). Weltje et al. (2013) navode da su ispitivanja sa ribama najčešće dovoljno prediktivna za vodozemce, međutim ističu da je kod supstanci koje utiču na metamorfozu registrovano veliko odstupanje u osetljivosti između dve grupe organizama. Ispitivanjem toksičnog potencijala herbicida za vodozemce bavio se veći broj autora (Osano et al., 2002; Howe et al., 2004; Kang et al., 2009), međutim pregledom dostupne literature nisu nađeni podaci o ispitivanju toksičnosti klomazona. Rezultatima ispitivanja u okviru ove disertacije utvrđena je toksičnost za embrionalni stadijum, a usled nedostatka literaturnih podataka povlačenje paralele u osetljivosti različitih razvojnih stadijuma ili vrsta žaba nije bilo moguće. Poređenje osetljivosti razvojnih stadijuma prema herbicidu



glifosatu ispitivalo je više autora, a rezultati su varirali u odnosu na testirane vrste. Mann i Bidwell (1999) i Mikó et al. (2017) su utvrdili da su jedinke vodozemaca nižeg ontogenetskog razvoja osetljivije na prisustvo glifosata od starijih jedinki. Nasuprot ovoj tvrdnji, Howe et al. (2004) su ustanovili veću osetljivost starijih jedinki vrsta *Rana clamitans*, *R. pipiens*, *R. sylvatica* i *Bufo americanus*. Manju osetljivost jedinki nižeg razvojnog stupnja grupa autora pripisuje načinu ishrane (još uvek se hrane iz žumanceta), kao i nepotpunom razvoju metaboličkog i imunog sistema. Takođe, razlike u pomenutim studijama mogu biti i posledica interspecijske varijabilnosti.

Pored smrtnosti praćene su razvojne promene i niz deformacija do kojih je izlaganje klomazonu dovelo, a koje do sada nisu bile dokumentovane. Iz odnosa smrtnosti i teratogenih efekata utvrđeno je da tehnička supstanca klomazon ima teratogeni potencijal (TI=1,9) (Dumont et al., 1983 – cit. Osano et al., 2002). Ispitivanja u okviru ove disertacije prvi su nalaz toksičnosti i teratogenosti klomazona za vodozemce.

U tretmanima sa nižim koncentracijama registrovan je statistički značajno veći porast (dužina) 96 hpf embriona, dok je u tretmanima sa višim koncentracijama registrovana inhibicija porasta. Smanjenje porasta vodozemaca kao posledica izlaganja herbicidima već je dokumentovana. Hayes et al. (2006) navode da jedinke kod kojih su registrovane deformacije i smanjen porast teže uspevaju da nađu hranu, u isto vreme postaju lak plen za predatore. Utvrđeno je i da porast i vreme metamorfoze imaju značajan uticaj na sazrevanje (Smith, 1987). Slične deformacije kičme Huang et al. (2014) su registrovali kod embriona *Pelophylax nigromaculata* izlaganih subletalnim koncentracijama olova. Zanimljivo je da su kod jedinki sa ovim deformacijama nakon metamorfoze utvrđene deformacije skeleta u vidu skraćanja udova i iskrivljenja femura, što je jedinkama otežavalo kretanje. Praćenje razvoja jedinki *X. laevis* nakon izlaganja klomazonu prekinuto je 96 hpf, ali na osnovu registrovanih promena moguće je da bi metamorfoza bila odložena, a nakon metamorfoze jedinke bile značajno deformisane, što bi imalo dugotrajan uticaj na prirodnu populaciju.

Od ostalih deformacija do kojih je izlaganje klomazonu dovelo treba istaći pojavu edema, deformacije kičme, digestivnog trakta i glavenog regiona. Sličan tip deformacija registrovan je i kod embriona *B. orientalis* izlaganih različitim koncentracijama herbicida molinata (Kang et al., 2009). Za razliku od ovog herbicida koji inhibira proces

mitotičke deobe, mesto delovanja klomazona nije jasno. Moguće je da je do deformacija i iskrivljenja kičmenog stuba došlo usled inhibicije AChE, a da je ometanje metabolizma piruvata rezultiralo smanjenjem rasta jedinki. Takođe, Lenkowski et al. (2010) su u studiji uticaja većeg broja herbicidnih supstanci na embrione *X. laevis* utvrdili značajnu pojavu edema kod jedinki izlaganih atrazinu i 2,4-D.

Deformacije digestivnog trakta embriona *X. laevis* registrovane su u tretmanima sa višim koncentracijama tehničke supstance klomazon. Pojava deformacija digestivnog trakta vodozemaca pod uticajem herbicida već je dokumentovana (Osano et al., 2002; Lenkowski et al., 2010). Neki autori deformacije digestivnog trakta, nakon izloženosti herbicidima (atrazin, 2,4-D i glifosat), objašnjavaju kao posledicu potencijalnog narušavanja signalnog puta, a kako klomazon kod riba vodi inhibiciji AChE, moguće je da je pojava digestivnih deformacija posledica ovog delovanja (Lenkowski et al., 2010).

De Oliveira et al. (2016) su ukazali da klomazon primenjen u subletalnim koncentracijama dovodi do promena parenhima jetre – lipidoze i nakupljanja granulocita i melanomakrofaga. Važno je napomenuti da je, kao i kod ispitivanja sa embrionima *D. rerio*, dugatrajne efekte teško predvideti, posebno jer embrioni *X. laevis* prolaze kroz proces metamorfoze.

### **6.1.3. In vitro ispitivanja sa ćelijskom linijom RTgill-W1**

Za potrebe ispitivanja citotoksičnosti u poslednjih dvadeset godina izolovane su i korišćene 43 ćelijske linije poreklom iz različitih tkiva *O. mykiss* (Bols et al., 2017). Ove ćelijske linije korišćene su u cilju: 1) ispitivanja nespecifične toksičnosti hemikalija i uzoraka iz životne sredine, 2) specifičnih ćelijskih odgovora radi utvrđivanja mehanizma delovanja toksikanata, i 3) zamene ili dopune *in vivo* testiranja sa životinjama (Segner, 1998; Dayeh et al., 2003). Ispitivanje nespecifične citotoksičnosti utvrđuje se merenjem osnovnih strukturnih i/ili funkcionalnih ćelijskih promena zajedničkih za sve ćelije, do kojih dovodi veliki broj hemikalija (narušavanje metaboličkih procesa, integriteta ćelijske membrane ili transporta molekula) (Ekwall, 1983). Za razliku od nespecifične citotoksičnosti ispitivanje mehanizma toksičnog delovanja hemikalija bazira se na praćenju specifičnih reakcija, karakterističnih za

organ ili tip ćelija, a do kojih dovode određene supstance ili grupe jedinjenja (specifične biotransformacije, vezivanje za ćelijske receptore itd) (Dayeh et al., 2003).

Ispitivanjem citotoksičnog potencijala klomazona za ćelijsku liniju RTgill-W1 merena je nespecifična citotoksičnost, i to: smanjenje metaboličke aktivnosti, integritet ćelijske membrane i narušavanje integriteta lizozoma. Citotoksičnost je registrovana kod ćelija izlaganih tehničkoj supstanci i preparatu Rampa<sup>®</sup> EC, dok preparat GAT Cenit 36 CS nije ispoljio citotoksično delovanje. Izostanak citotoksičnosti preparata GAT Cenit 36 CS može biti posledica kombinacije postepenog otpuštanja aktivne supstance i kratkog izlaganja (24 h). Najbolji pokazatelj citotoksičnosti kod izlaganja tehničkoj supstanci i preparatu Rampa<sup>®</sup> EC bilo je smanjenje viabilnosti ćelija RTgill – W1 iskazano preko narušavanja metaboličke aktivnosti. Za potrebe ove disertacije za merenje narušavanja metaboličke aktivnosti korišćen je esej alamar plavo. Merenje narušavanja metaboličke aktivnosti bazira se na smanjenju aktivnosti enzima diaforaza (NADPH ili NADH dehidrogenaza) koje boju alamar plavo redukcijom prevode u fluorescentni oblik (O'Brien et al., 2000). Ispitivanje uticaja klomazona na embrione *D. rerio*, kao i literaturni podaci o uticaju klomazona na ribe i mehanizmu delovanja na biljke ukazali su na moguće delovanje klomazona na piruvat. Uticaj klomazona na aktivnost enzima iz grupe oksido-reduktaza ide u prilog pretpostavljenom mehanizma delovanja klomazona kod riba. Enzim piruvat dehidrogenaza katališe reakciju između piruvata i koenzima A iz koje nastaje acetyl CoA, jedinjenje neophodno za ćelijsko disanje (Voet i Voet, 2011). Inhibicijom aktivnosti ovog enzima metabolizam piruvata ozbiljno je narušen, a ćelijski procesi od krucijalne važnosti za normalno funkcionisanje ćelija, organa, i organizma kao celine prekinuti. Eseji citotoksičnosti korišćeni u okviru ove disertacije daju informacije o nespecifičnim ćelijskim odgovorima, pa se o mehanizmu delovanja klomazona kod riba ne može govoriti sa sigurnošću. Ipak, potvrda delovanja na enzimski sistem uključen u metabolizam piruvata značajan je trag za usmeravanje daljih ispitivanja mehanizma delovanja.

Tanneberger et al. (2013) su RTgill-W1 testom ispitivali toksičnost 35 organskih ksenobiotika (industrijskih hemikalija, pesticida...). Modifikacijom ovog testa povećali su osetljivost metode koja se pokazala kao manje, jednako ili čak i više osetljiva, u zavisnosti od ispitivanih hemikalija, nego klasičan test akutne toksičnosti na ribama.

Utvdili su jaku pozitivnu korelaciju ispitivanjem nespecifične citotoksičnosti i klasičnih testova akutne toksičnosti, ukazujući na veliki potencijal ćelijskih linija kao alternative eksperimentalnim životinjama; razmatraju se mogućnosti da se ovaj test primeni u konceptu 3R na ribama. Michelova et al. (2015) su, u testovima sa osam različitih farmaceutskih aktivnih supstanci, poredili dobijene vrednosti iz RTgill-W1 i FET testa. Njihovi rezultati pokazuju da su  $EC_{50}$  vrednosti dobijene iz RTgill-W1 testa generalno više nego one dobijene u FET testu, ali dobijene vrednosti prate isti trend. Sličan trend su dobili i poređenjem rezultata iz FET testa sa literaturnim podacima vezanim za akutne toksičnosti ovih supstanci za ribe. Zaključili su da, pored prihvatljivosti ovih testova u regulativi industrijskih hemikalija, oni predstavljaju pogodnu alternativu u skriningu testova akutne toksičnosti i za farmaceutska sredstva, ali i ukazuju da postoji potencijal i za njihovo uključivanje u ERA.

Imajući u vidu da se u oba pomenuta ispitivanja radi ili o industrijskim hemikalijama sa uglavnom nespecifičnim narkotičkim delovanjem, ili o farmaceutskim aktivnim supstancama, diskutabilna je njihova uloga kao zamena za *in vivo* testove kada su pesticidi u pitanju, imajući u vidu njihovu nedovoljnu konzervativnost. Međutim, specifični *in vitro* testovi, sami ili u kombinaciji sa drugim testovima, daju dragocene podatke o procesima koji mogu da ukažu na mehanizam delovanja ksenobiotika i svakako imaju veliki značaj u proceni njihovih toksičnih efekata.

RTgill-W1 ćelijska linija se može koristiti za predviđanje akutne toksičnosti hemikalija sa specifičnim mehanizmom delovanja. Na primer, za inhibitore AChE (malation, disulfoton, paration-etil) korelacija je iznenađujuće dobra, a odnos  $EC_{50}/LC_{50}$  je oko 1. Postoje dve pretpostavke kojima se ovaj fenomen može objasniti. Prva je da ćelije škrge zadržavaju aktivnost AChE i da su samim tim osetljive na delovanje inhibitora ovog enzima, kao što je pokazano u ćelijama tkiva škrge (Yadav et al, 2009). Druga pretpostavka je da su pomenuti organofosfatni insekticidi slabi inhibitori AChE, a da deluju kao nespecifične toksične supstance u akutnoj ekspoziciji, a  $LC_{50}$  kao i  $EC_{50}$  vrednosti su veoma dobro predviđene korišćenjem QSARs (Tanneberg et al., 2013).

Kada su naša ispitivanja u pitanju, citotoksičnost tehničke supstance ( $EC_{50}=78,9$  mg/l) bila je manja u odnosu na toksičnost registrovanu kod ispitivanja sa vrstom *D. rerio*, dok je preparat Rampa<sup>®</sup> EC ispoljio veću toksičnost prema ćelijskoj liniji, ali su i u ovom slučaju vrednosti toksičnosti za *D. rerio* i citotoksičnosti za ćelijsku liniju bile uporedive ( $EC_{50}=5,9$ ;  $LC_{50}=9,6$  mg/l). Za veću toksičnost preparata Rampa<sup>®</sup> EC najverovatnije je odgovoran organski rastvarač na bazi aromatičnih ugljovodonika (nafta). Između parametara toksičnosti za vrstu *D. rerio* i citotoksičnosti ćelijske linije RTgill-W1 utvrđena je pozitivna korelacija, za tehničku supstancu i preparat Rampa<sup>®</sup> EC. Nasuprot tome, kod ispitivanja sa preparatom GAT Cenit 36 CS korelacija nije dokazana. Literaturni podaci pokazuju da  $LC_{50}$  za kalifornijsku pastrmku iznosi 15,5 mg/l što je više od pet puta manje od  $EC_{50}$  vrednosti dobijene u RTgill-W1 testu. Rezultati dobijeni u ispitivanjima u okviru ove disertacije, kada se sagledaju sa literaturnim rezultatima rađenim sa klomazonom i preparatima *in vivo*, upravo potvrđuju sumnju da se *in vitro* testovi mogu koristiti kao zamena za ispitivanja *in vivo*, bar kad su pesticidi u pitanju.

## 6.2. Komparativna toksičnost aktivne supstance i preparata na bazi klomazona

Pre stavljanja u promet aktivne supstance pesticida formulišu se u oblik pogodan za primenu, pri čemu nakon dodatka pomoćnih supstanci gotov proizvod može ispoljiti različitu toksičnost u odnosu na aktivnu supstancu. Povećanje ili smanjenje toksičnog potencija formulisanih preparata, u odnosu na aktivnu supstancu, opisalo je više autora (Folmar et al., 1979; Beggel et al., 2010; Puglis i Boone, 2011). U studiji ispitivanja toksičnosti na tri humane ćelijske linije, utvrđeno je da je osam od devet ispitivanih preparata bilo višestruko toksičnije od čistih aktivnih supstanci (glifosat, izoproturon, fluroksipir, pirimikarb, imidakloprid, acetamiprid, tebukonazol, epoksikonazol i prohloraz) (Mesnage et al., 2014). Razlike u toksičnosti između aktivne supstance i formulisanih preparata glifosata, kao i među samim preparatima, veći broj istraživača pripisuje prisustvu površinski aktivnih materija polioksietilenamina– POEA (Mann i Bidwell, 1999; Perkins et al., 2000; Howe et al., 2004). Preparati formulisani u obliku koncentrata za emulzije, kao što je preparat Rampa<sup>®</sup> EC, pored aktivne supstance sadrže i organske rastvarače i emulgatore. Veća toksičnost ovog tipa formulacije može biti

posledica povećanog (olakšanog) usvajanja aktivne supstance zato što rastvarač zajedno sa pomoćnim supstancama (emulgatorima) povećava mobilnost pesticida u vodenoj fazi tako što omogućava formiranje emulzije. Takođe, rastvarač u ovom preparatu je jedinjenje iz grupe policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH), a toksičnost ove grupe za organizme vodene sredine je utvrđena (Swigert et al., 2014; Dupuis i Ucan-Marin, 2015; Geier et al., 2017). U cilju smanjenja negativnog uticaja pesticida na životnu sredinu u primenu se uvode između ostalih i preparati sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance (Hirech et al., 2003). Kod preparata formulisanih na bazi kontrolisanog otpuštanja, kao što je preparat GAT Cenit 36 CS, aktivna supstanca se nalazi u mikrokapsulama i na taj način je odvojena od spoljašnje sredine, a oslobađa se difuzijom. Otpuštanje aktivne supstance je proces koji je moguće kontrolisati podešavanjem veličine kapsule, debljine i poroznosti zida kapsule. Prema tome, toksičnost preparata formulisanih na ovaj način zavisi od brzine oslobađanja aktivne supstance. Takođe, odsustvo organskih rastvarača, samo po sebi, smanjuje toksičnost ovog tipa formulacija.

Dve vrste makrofita različito su reagovala na različite oblike formulacija. Najveći stepen toksičnosti prema vrsti *L. minor* ispoljio je preparat Rampa<sup>®</sup> EC, dok preparat GAT Cenit 36 CS, nije delovao toksično ( $EC_{50}=336,3$  mg/l). Kod vrste *M. aquaticum* toksično delovanje su ispoljila oba preparata, i za razliku od ispitivanja sa vrstom *L. minor*, preparat GAT Cenit 36 CS ispoljio je veći stepen fitotoksičnosti.

Negativno delovanje herbicida, u obliku aktivne supstance i/ili formulisanih preparata, na populaciju vrste *D. magna* dokumentovano je brojnim studijama (Villarrol et al., 2003; Diao et al., 2010; Cuhra et al., 2013; Hansen i Roslev, 2016; Vidal et al., 2016). Preparat Rampa<sup>®</sup> EC akutno je ispoljio najveću toksičnost za populaciju *D. magna*, nešto manju toksičnost ispoljila je aktivna supstanca, dok preparat GAT Cenit 36 CS nije delovao toksično ( $EC_{50}=173,4$  mg/l). U izveštaju Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA, 2007) ima podataka samo za hronično izlaganje ( $NOEC=2,2$  mg/l) aktivnoj supstanci klomazon, a preparat Command (formulacija suspenzija kapsula;  $EC_{50}=155,7$  mg/l) akutno je ispoljio gotovo isti uticaj kao GAT Cenit 36 CS. Prema podacima Američke agencije za životnu sredinu (US EPA, 2009) akutna toksičnost klomazona za vrstu *D. magna* je 5,4 mg/l. Ova vrednost desetostruko je niža u odnosu

na naše rezultate, a gotovo je jednaka NOEC za imobilizaciju kod hroničnog izlaganja (NOEC=4,4; EFSA, 2007), što može biti indikator velike osetljivosti ispitivane populacije. Drugih podataka o toksičnosti klomazona za vrste roda *Daphnia* u dostupnoj literaturi nema. Burdett et al. (2001) su ispitivali uticaj herbicida (molinat, klomazon i tiobenkarb) na vrstu *Chironomus tepperi* i došli do zaključka da klomazon primenjen u preporučenim količinama primene neće izazvati direktne neželjene efekte na neciljne akvatične beskičmenjake. Ipak, u odnosu na druga dva ispitivana herbicida klomazon je doveo do najveće redukcije biomase makrofita i primarnih producenata, pa postoji bojazan od indirektnog delovanja na druge konstituente zajednice.

Slično rezultatima ispitivanja sa *D. magna* preparat Rampa<sup>®</sup> EC ispoljio je veću, a GAT Cenit 36 CS manju toksičnost u odnosu na tehničku supstancu za embrione *D. rerio* i *X. laevis*. Manja toksičnost preparata GAT Cenit 36 CS, u odnosu na tehničku supstancu i drugi preparat, može se pripisati specifičnosti formulacije i odsustvu organskog rastvarača. Naime, formulacije sa postepenim otpuštanjem aktivne supstance mogu značajno umanjiti negativan efekat na neciljne organizme smanjenjem koncentracije izlaganja, pri tom ne smanjujući efikasnost za ciljane vrste. Važno je istaći i da su LOEC vrednosti za tehničku supstancu i preparat Rampa<sup>®</sup> EC bile na nivou koncentracija detektovanih u životnoj sredini (Hug et al., 2014). Iako embrioni *X. laevis* nemaju zaštitnu opnu (horion) bili su manje osetljivi prema klomazonu, u odnosu na embrione *D. rerio*. Pored toga što dve vrste pripadaju različitim klasama, brzina razvića može biti jedan od faktora odgovornih za registrovane razlike u osetljivosti. Klomazon se, nakon usvajanja u biljnoj ćeliji, posredstvom citohrom P450 enzimskog sistema hidrolitički prevodi u 5OH-klomazon (2[(2-hlorfenil)metil]-5-hidroksi-4,4-dimetil-3-izoksazolidinon), a tek nakon prevođenja u 5-keto-klomazon (2[(2-hlorfenil)metil]-4,4-dimetil-3,5-izoksazolidindion) postaje biološki aktivan (El Naggar et al., 1992). Colombo et al. (1996) su ispitivali aktivnost citohrom P450A1 (CYP1A1) sistema izlaganjem *X. laevis* radioaktivno obeleženom benzo[a]pirenu i došli do zaključka da je metabolizam embriona stadijuma 35 (50 hpf) manje efikasan u odnosu na embrione razvojnog stadijuma 48 (180 hpf), kod kojih je jetra u potpunosti razvijena. Kod embriona *X. laevis* (stadijum 45, 96 hpf) korišćenih za potrebe ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije enzimski sistem neophodan za aktivaciju klomazona nije dostigao punu ekspresiju. Ovo je u saglasnosti sa manjom toksičnošću klomazona za embrione *X.*

*laevis*, nasuprot *D. rerio* kod kojih je enzimski sistem CYP1A1 u potpunosti funkcionalan (Otte et al., 2010; Scornaienchi et al., 2010). Takođe, ovo ukazuje na potencijalno veću osetljivost starijih jedinki (kasnijih razvojnih stadijuma) vodozemaca prema klomazonu, u odnosu na embrionalni stadijum.

Sve praćene deformacije, subletalni i teratogeni poremećaji bili su jačeg intenziteta kod izlaganja preparatu Rampa® EC u odnosu na GAT Cenit 36 CS. Najbolji pokazatelj ovih razlika je uticaj na razvoj 22 hpf embriona *D. rerio* – kod izlaganja preparatu Rampa® EC u tretmanu sa 12,5 mg/l (nominalno) svi embrioni su kasnili u razvoju, dok kod jedinki izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS najvišoj koncentraciji (100 mg/l) kašnjenje u razvoju nije registrovano. Kašnjenje u razvoju registrovano je i kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci, što jasno ukazuje da je izostanak ovog efekta kod preparata GAT Cenit 36 CS posledica oblika formulacije i odsustva organskog rastvarača.

Razlike između preparata su registrovane i za teratogeni indeks. Kod ispitivanja sa embrionima *D. rerio* preparat Rampa® EC ispoljio je slabu teratogenost (TI=1), a veću embriotoksičnost, dok je drugi preparat (TI=3,8), slično tehničkoj supstanci (TI=5,1) ispoljio veći teratogeni potencijal. Preparat Rampa® EC i kod ispitivanja sa embrionima *X. laevis* je ispoljio slabo teratogeno delovanje (TI=1,2), dok TI za preparat GAT Cenit 36 CS nije mogao da bude utvrđen, pa se ne može reći da je embriotoksičan ili teratogen. Na osnovu pregleda literature utvrđeno je da su ispitivanja formulisanih preparata na bazi klomazona rađena samo za ribe, za tip formulacije suspenzija kapsula (dos Santos Miron, 2005; EFSA, 2007). Dva preparata (Gamit 36 CS i Command 360 CS) ispoljila su različit akutni efekat sa LC<sub>50</sub> od 7,3 (*R. quelen*) i 187,9 mg/l (*O. mykiss*) za slatkovodne vrste. Isti oblik formulacije ispitivan je u okviru ove disertacije, a na osnovu rezultata možemo zaključiti da su embrioni *D. rerio* osetljiviji od kalifornijske pastrmke (*O. mykiss*), a manje osetljivi od soma (*R. quelen*).

Poremećaji rada srca i pojave edema bile su u saglasnosti sa prethodnim zapažanjama, a toksičnost se povećavala u nizu: preparat GAT Cenit 36 CS < tehnička supstanca klomazon < preparat Rampa® EC. Interesantno je da preparat GAT Cenit 36 CS kod embriona *X. laevis* nije doveo do pojave edema, ali to je najverovatnije posledica načina izlaganja. Embrioni *D. rerio* izlagani su u statičnom sistemu, dok je kod jedinki *X.*



*laevis* medijum menjan svakodneвно. Kombinacija specifičnosti formulacije (postepeno otpuštanje aktivne supstance) i odsustva organskog rastvarača rezultirala je nižom toksičnošću preparata GAT Cenit 36 CS.

Smanjen porast embriona bio je praćen povećanjem udela jedinki sa deformacijama kičme. Kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci klomazon i preparatu Rampa® EC utvrđene su i deformacije repa (sa dozno zavisnim intenzitetom pojave), dok isti efekat nije registrovan kod jedinki izlaganih preparatu GAT Cenit 36 CS. Howe et al (2004) su utvrdili pojavu deformacija kičme kod jedinki *R. pipens* izlaganih formulacijama glifosata – Roundup Original® i Roundup Transorb®, dok iste promene nisu registrovane kod jedinki izlaganih tehničkoj supstanci ili formulacijama novije generacije. Smanjenje dužine repa je izdvojeno kao značajan efekat negativnog delovanja dve formulacije. Autori ističu da smanjenje dužine repa, kao i deformacije utvrđene u našim ispitivanjima, značajno utiču na lokomotornu aktivnost jedinki i smanjuju sposobnost izbegavanja predatora.

Intenzitet pojave deformacija kod jedinki *X. laevis* i *D. rerio* bio je različit, a vodozemci su ispoljili manju osetljivost prema klomazonu. U proseku, isti nivo deformacija glavenog regiona dve vrste registrovan je u tretmanima sa razlikom u koncentraciji 3-5 puta (tehnička supstanca: 45 nasuprot 12,5 mg/l; preparat Rampa® EC: 35 nasuprot 6,25 mg/l). *D. rerio* je i u ovom slučaju bila vrsta koja je ispoljila veću osetljivost.

Sagledavanjem dobijenih rezultata jasno je da je preparat Rampa® EC bio značajno toksičniji od preparata GAT Cenit 36 CS za sve ispitivane organizme, izuzev *M. aquaticum*. Efikasnost oba preparata za organizme koji se suzbijaju je slična, ali je uticaj na ne ciljne konstituente životne sredine značajno različit. Pravilnim odabirom formulacije preparata na bazi klomazona negativan uticaj na organizme akvatičnih ekosistema može biti smanjen.

### 6.3. Ekološka procena rizika

Procena rizika od upotrebe pesticida integralni je deo procesa registracije pesticida. Prema vodiču za procenu rizika od sredstava za zaštitu bilja na kom je bazirana procena na akvatične sisteme u vreme kada je klorazon registrovan obavezni testovi za sve aktivne supstance bili su testovi akutne toksičnosti na dve vrste riba (pastrmka i jedna toplovodna vrsta), kladoceri (*Daphnia* sp.) i test hronične toksičnosti na jednoj vrsti zelene alge (EC, 2002). Testovi hronične toksičnosti za kladoceru rade se ukoliko postoji mogućnost kontinuiranog izlaganja, odnosno ukoliko se supstanca primenjuje više puta tokom sezone, a  $DT_{50}$  u vodi je  $\geq 2$  d. Hronična toksičnost za ribe takođe se ispituje ukoliko se predviđa kontinuirana ekspozicija. Kako se procena rizika konstantno unapređuje, zahvaljujući zalaganju stručne i naučne zajednice, a u cilju usaglašavanja sa regulativom, EFSA je uradila reviziju ovog dokumenta i objavila vodič za stepenasto organizovanu procenu rizika od pesticida za vodene ekosisteme u blizini obradivih površina (EFSA, 2013). Kao što naziv dokumenta sugeriše, u procesu registracije i stavljanja u promet pesticida u Evropskoj uniji, procena rizika ima stepenastu strukturu koja podrazumeva jednostavnije testove u nižim nivoima (laboratorijski testovi) i složenije u višim nivoima procene (povećanje ekološkog realiteta). Prema ovom vodiču obavezni testovi za procenu rizika za akvatične organizme od herbicida su testovi akutne toksičnosti za *O. mykiss* i kladoceru (*Daphnia* sp.) i testovi hronične toksičnosti za dve vrste algi, jednu makrofitu (*Lemna* sp, *Myriophyllum* sp. ili *Glyceria* sp.). Vrste roda *Lemna* su uobičajni test organizmi, međutim gde ove vrste ne ispolje osetljivost ( $EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$ ) preporučuje se dodatno ispitivanje sa ukorenjenim makrofitama (*Myriophyllum*). Ispitivanja sa ranim životnim stadijumima riba (embrioni ili mlađ riba) predlažu se ukoliko postoji mogućnost dospevanja do površinskih voda, a supstanca ne podleže brzom hidrolizi ( $DT_{90} > 1$  d). Za potrebe registracije pesticida Uredbom 283/2013 nisu obuhvaćena ispitivanja toksičnosti za vodozemce (EC, 2013a), ipak za potrebe procene rizika, na višim nivoima procene, preporučuje se njihovo uključivanje. Ova preporuka odnosi se na razvojne stadijume vezane za vodenu sredinu.

Jedan od doprinosa istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije je ispitivanje na nekim od vrsta predloženih za dodatna ispitivanja. Procena rizika u okviru

ove doktorske disertacije predstavlja dopunu postojećim podacima radi unapređenja zaštite organizama akvatične sredine. Takođe, količina primene klomazona u zemljama Evropske unije i našoj zemlji značajno se razlikuje, a modelovanje za predviđene koncentracije urađeno je na osnovu preporuka o primeni relevantnoj za naše područje. Procena rizika za aktivnu supstancu bila je kompletna, odnosno prikupljeni su svi podaci o toksičnosti koji su propisani procedurom. Međutim, procena rizika za preparate urađena je na osnovu podataka dobijenih u okviru ispitivanja za disertaciju, pa baterija testova nije kompletna.

Na osnovu izračunatih RAC vrednosti, modelovanjem za prva dva nivoa PEC vrednosti, rizik nije bio prihvatljiv. Međutim, PEC vrednost trećeg nivoa procene ukazala je da je rizik koji upotreba klomazona u preporučenim količinama primene nosi, prihvatljiv. Ukorenjena akvatična makrofita bila je protektivna za gotovo sve konstituente akvatičnog ekosistema; jedina vrsta osetljivija na prisustvo klomazona bila je alga *Navicula pelliculosa*. Grupe autora Giddings et al. (2013) je poređenjem osetljivosti većeg broja akvatičnih makrofita i algi prema pesticidima različitog mehanizma delovanja došla do zaključka da jedna vrsta ne može biti reprezentativan predstavnik svih akvatičnih primarnih producenata. Burdett et al. (2001) su utvrdili da tri herbicidne supstance (molinat, klomazon i tiobenkarb) nisu ispoljile neželjene efekte na vrstu *Chironomus tepperi*. Ipak, jedino je klomazon doveo do značajne redukcije biomase primarnih producenata, što je, kako su zaključili, indikator indirektnog delovanja i narušavanja ekosistema.

Pouzdanost predviđanja PEC vrednosti pomoću FOCUS softvera, kao i nivo zaštite prirodnih ekosistema u realnim uslovima, već neko vreme su u žiži interesovanja eksperata iz oblasti procene rizika. Naime, veći broj autora registrovao je povećane koncentracije pesticida u životnoj sredini u odnosu na modelovane PEC vrednosti. Najviše detektovane koncentracije klomazona u životnoj sredini utvrđene su u otpadnim vodama industrijske zone u Nemačkoj (Hug et al., 2014) i višetruko prevazilaze PEC vrednosti za najgori mogući scenario (1 mg/l nasuprot  $PEC_1=0,067$  mg/l). Ako ovu, detektovanu koncentraciju klomazona uporedimo sa hazardnom koncentracijom za 5% vrsta akvatičnih primarnih producenata ( $HC_5=0,016$  mg/l) izračunate u okviru SSD modelovanja dolazimo do zaključka da prag štetnosti u realnim uslovima može biti

pređen. Iako ovako visoka koncentracija klomazona do sada nije detektovana u oblastima sa intenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom ove rezultate ne treba zanemariti. Sa druge strane, najviše detektovane koncentracije klomazona u površinskim vodama oblasti sa intenzivnom poljoprivrednom praksom bile su u opsegu do 10 µg/l (Marchesan et al., 2007). Ukoliko se posmatra donja granica HC<sub>5</sub> vrednosti (LL HC<sub>5</sub>), ova koncentracija je na samom pragu štetnosti.

Procena rizika urađena za aktivnu supstancu bila je dovoljno prediktivna i za rizik koji nosi primena preparata, međutim, ove rezultate treba uzeti sa rezervom jer baterija testova u ispitivanjima sa preparatima nije bila kompletna. Predviđene koncentracije u životnoj sredini bile su više ili u saglasnosti sa većinom detektovanih koncentracija u oblastima sa intenzivnom poljoprivrednom praksom, međutim jedan nalaz u Evropi iz uzorka otpadnih voda sadržao je značajno veću koncentraciju klomazona (1 mg/l). Većina subletalnih efekata registrovanih kod izlaganja tehničkoj supstanci i preparatu Rampa<sup>®</sup> EC bila je u ovom koncentracionom rangu, a to u kombinaciji sa incidencom ovakve pojave u vodama može imati posledice po akvatične ekosisteme. Istovremeno, preparat GAT Cenit 36 CS ne bi doveo do ispoljavanja negativnog efekta.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ispitivanja uticaja tehničke supstance i formulisanih preparata klomazona na akvatične organizme mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Vrsta *Myriophyllum aquaticum* se pokazala kao značajno osetljivija na delovanje klomazona od vrste *Lemna minor*, što potvrđuje činjenicu da flotantne monokotiledone vrste roda *Lemna* nisu reprezentativne za sve akvatične makrofite. Najosetljiviji praćeni parametar kod vrste *L. minor* bila je površina jedinki, dok se kod vrste *M. aquaticum* osetljivost parametara rasta razlikovala kod izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona. Ipak, parametar ukupne dužne biljke u svim ispitivanjima bio je, čak i u slučajevima kada se nije pokazao kao najosetljiviji, parametar koji se statistički nije razlikovao od najosetljivijeg parametra. Od svih ispitivanih organizama u okviru ovih istraživanja najveću osetljivost prema tehničkoj supstanci i preparatima klomazona ispoljila je vrsta *M. aquaticum*. Ovi rezultati po prvi put ukazuju da, u slučaju klomazona, flotante vrste nisu dovoljno prediktivne i protektivne za sve akvatične makrofite, odnosno da je ispitivanjima samo na vrstama roda *Lemna*, potcenjen rizik od njegove primene za ostale akvatične makrofite, što ide u prilog uvođenja ukorenjene akvatične makrofite u procenu rizika od herbicida.
- Tehnička supstanca i preparat Rampa<sup>®</sup> EC bili su toksični za vrstu *Daphnia magna*, dok je preparat GAT Cenit 36 CS ispoljio značajno manju toksičnost.
- Kod ispitivanja sa embrionima *Danio rerio* i *Xenopus laevis* preparat Rampa<sup>®</sup> EC ispoljio je veću, a GAT Cenit 36 CS manju toksičnost, u poređenju sa tehničkom supstancom.
- Prvi put je utvrđeno da klomazon ima embriotoksičan i teratogeni potencijal za embrione *D. rerio* i *X. laevis*, kao i da se dve različite formulacije klomazona razlikuju u ispoljavanju embriotoksičnih i teratogenih efekata. Formulacija u obliku koncentrata za emulzije ispoljila je veću toksičnost od aktivne supstance, što je najverovatnije posledica povećanog usvajanja aktivne supstance zbog prisustva rastvarača i emulgatora koji povećavaju mobilnost aktivne supstance u vodi, kao i prisustva organskog rastvarača koji je toksičan sam po sebi. Iz

odnosa smrtnosti i pojave neželjenih efekata izračunat je indeks teratogenosti, koji je bio različit za dve vrste. Kod embriona *D. rerio* tehnička supstanca ispoljila je veći teratogeni (TI=5,1) a manji toksični potencijal, dok je za embrione *X. laevis* ispoljila manji teratogeni, a veći toksični potencijal (TI=1,9). Preparat Rampa® EC kod obe vrste je ispoljio jače toksično nego teratogeno delovanje (*D. rerio* 1,0 i *X. laevis* 1,2). Preparat GAT Cenit 36 CS ispoljio je teratogeni potencijal kod vrste *D. rerio* (TI=3,8), dok kod *X. laevis* nije bilo moguće izračunati indeks teratogenosti zbog niske stope smrtnosti, čak i u tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom. Pojava edema, smanjenje rasta i niz razvojnih deformacija pokazali su se kao dobri indikatori toksičnosti tehničke supstance i preparata klomazona na rane razvojne stadijume vrsta *D. rerio* i *X. laevis*. Test sa embrionima *D. rerio* pokazao je da, pored smrtnosti, opstanak populacije koja je izložena delovanju klomazona može značajno ugroziti niz poremećaja, kako razvojnih tako i morfoloških, koji se ne mogu otkriti primenom standardnih metoda, što ide u prilog uvođenja ove vrste testova u procenu rizika od pesticida.

- Rezultati dobijeni u eksperimentima na *D. rerio* pokazuju da mehanizam delovanja klomazona najverovatnije obuhvata remećenje metabolizma piruvata, što dovodi do produženja ili prekida embrionalnog razvoja. Ovo je prvi nalaz koji ukazuje na moguć mehanizam delovanja klomazona ali, da bi se sa velikom sigurnošću govorilo o tome, potrebna su dalja opsežna ispitivanja.
- Tehnička supstanca i preparat Rampa® EC ispoljili su citotoksično delovanje prema ćelijskoj liniji RTgill-W1, dok citotoksičnost preparata GAT Cenit 36 CS nije utvrđena. Preparat Rampa® EC ispoljio je statistički značajno veću citotoksičnost od aktivne supstance, dok nedostatak citotoksičnog potencijala preparata GAT Cenit 36 CS može biti posledica kombinacije kratkog perioda izlaganja (24 h), specifične tehnologije kontrolisanog otpuštanja aktivne supstance i odsustva organskog rastvarača. Najosetljiviji pokazatelj inhibicije vijabiliteta ćelija bio je esej alamar plavo, a najmanju osetljivost ispoljio je esej CFDA-AM. Iz ovoga se izvodi zaključak da je, na ćelijskom nivou, klomazon najpre delovao na narušavanje metaboličke aktivnosti, odnosno ispoljio je negativno delovanje na aktivnost enzima iz grupe diaforaza.

- Dobijeni rezultati u RTgill-W1 testu pokazuju da su *in vitro* ispitivanja sa ovom ćelijskom linijom bila pogodan dopunski metod za utvrđivanje toksičnog potencijala klomazona za ribe. Međutim, kada se dobijeni eksperimentalni podaci uporede sa postojećim literaturnim, potvrđuje se sumnja da se *in vitro* testovi mogu koristiti kao zamena za ispitivanja *in vivo*, bar kad su pesticidi u pitanju.
- Procena rizika izvedena na osnovu toksičnosti utvrđene u okviru istraživanja tokom realizacije ove disertacije i literaturnih podataka, kao i ekspozicije izračunate za aktivnu supstancu klomazon korišćenjem programa FOCUS, ukazala da je rizik koji primena klomazona nosi, u preporučenim količinama i načinu primene u našoj zemlji, prihvatljiv za organizme akvatične sredine. Ipak, treba naglasiti da u modelovanje za ekspoziciju preparatima nije bilo moguće uključiti svojstva pomoćnih supstanci, i sledstveno tome oblik formulacije, pa je ekspozicija preparata formulisanog na bazi koncentrata za emulziju potencijalno potcenjena.
- Hazardne koncentracije za 5% akvatičnih primarnih producenata (HC<sub>5</sub> i LL HC<sub>5</sub>) utvrđene SSD modelovanjem u opsegu su koncentracija klomazona detektovanih u životnoj sredini, što ukazuje da prag štetnosti klomazona u realnim uslovima može biti pređen, a broj ugroženih vrsta veći od definisane prihvatljive frakcije (5%).
- Različite formulacije iste aktivne supstance mogu da imaju različitu toksičnost i različite efekte na neciljne vrste, što ukazuje na činjenicu da procena rizika koja se zasniva samo na aktivnoj supstanci nije dovoljno pouzdana ni preventivna kada su u pitanju efekti i toksičnost različitih formulacija.
- Razlike u toksičnosti između preparata ukazuju da izbor preparata koji se koriste za istu namenu, a različito su formulisani, ima veliki značaj u zaštiti neciljnih organizama i životne sredine.

---

## 8. LITERATURA

- Abramović, B. F., Despotović, V. N., Šojić, D. V., Orčić, D. Z., Csanádi, J. J., Četojević-Simin, D. D. (2013): Photocatalytic degradation of the herbicide clomazone in natural water using TiO<sub>2</sub>: Kinetics, mechanism, and toxicity of degradation products. *Chemosphere* 93 (1): 166-171.
- AERU (2017): Agricultural substances database background and support information. Agriculture and Environment Research Unit, University of Hertfordshire. [https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/docs/Background\\_and\\_Support.pdf](https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/docs/Background_and_Support.pdf)  
Pristupljeno: Januar 2018
- Alekseev, V., Lampert, W. (2001): Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature* 414: 899-901.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J., García-Río, L. (2008): The mobility and degradation of pesticides in soil and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123: 247-260.
- ASTM (1991): Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus* (FETAX). American society for testing and materials, STP E1439-91. Philadelphia, PA.
- Avila, V. L., Frye, P. G. (1978): Feeding behaviour of the African clawed frog (*Xenopus laevis* Daudin): (Amphibia, Anura, Pipidae): Effect on pray type. *Journal of Herpetology* 12 (3): 391-396.
- Becker, A. G., Moraes, B. S., Menezes, C. C., Loro, V. L., Santos, D. R., Reichert, J. M., Baldisserotto, B. (2009): Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1734-1739.
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R. E., Geist, J. P. (2010): Sublethal toxicity of commercial insecticide formulation and their active ingredients to larval fatted



- minnow (*Pimephales promelas*). *Science of the Total Environment* 408: 3169-3175.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J. L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U. (2002): Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebra fish embryo. *Nature Neuroscience* 5: 111–118.
- Belanger, S. E., Rawlings, J. M., Carr, G. J. (2013): Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (8): 1768-1783.
- Belgers, J. D. M., Van Lieverloo, R. J., Van der Pas, L. J. T., Van den Brink, P. J: (2007): Effects of herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* 86: 260-268.
- Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K. E. (2014): Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Marine Environmental Research* 96: 81-91.
- Billiard, S. M., Querbach, K., Hodson, P. V. (1999): Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (9): 2070-2077.
- Boaru, D. A., Dragoş, N., Schirmer, K. (2006): Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology* 218: 134-148.
- Bols, N. C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S. J., Goegan, P., Lee, L. E. J. (1994): Development of a cell line form primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* 17 (6): 601-611.
- Bols, N., Dayeh, V., Lee, L., Schirmer, K. (2005): Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. In: Moon, T. W., Mommsen, T. P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier Science, Amsterdam: 43-84.

- Bols, N. C., Pham, P. H., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J. (2017): Invitromatics, invitrome, and invitroomics: introduction of three new terms for in vitro biology and illustration of their use with the cell lines from rainbow trout. In *viro cellular and developmental biology – Animal* 53: 383-405.
- Bonfanti, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzetto, I., Andrioletti, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., Fascio, U., Vailanti, G., Vismara, C. (2004): Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology* 70: 189-200.
- Borenfreund, E., Puerner, J. A. (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24: 119-124.
- Botelho, R. G., Cury, J. P., Tornisielo, V. L., dos Santos, J. B. (2012): Herbicides and the aquatic environment. In: *Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds*. INTECH Open Access Publisher.
- Bradbury, S. P., Carlson, R. W., Henry, T. R., Padilla, S., Cowden, J. (2008): Toxic responses of the fish nervous system. In: Di Giulio, R. T., Hinton, D. E. (Eds.): *The Toxicology of Fishes*. CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 417–455.
- Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *ALTEX* 22: 87-102.
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, R. (2015): The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 16247-16261.
- Bringolf, R. B., Cope, W. G., Barnhart, M. C., Mosher, S., Lazaro, P. R., Shea, D. (2007): Acute and chronic toxicity of pesticide formulations (atrazine, chlorpyrifos and permethrin) to Glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (10): 2101-2107.

- Brkić, D., Gašić, S., Nešković, N. (2009): Akutna toksičnost herbicida GAL-57. *Pesticidi i fitomedicina* 24 (39): 221-226.
- Brum, A., Dotta, G., Roubledakis, K., Gonçalves, E. L. T., Garcia, L. P., Garcia, P., Scussel, V. M., Martins, M. L. (2014): Hematological and histopathological changes in silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 49: 169-175.
- Burdett, A. S., Stevens, M. M., Macmillan, D. L. (2001): Laboratory and field studies on the effect of molinate, clomazone, and thiobencarb on nontarget aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (10): 2229-2236.
- Burešová, H., Crum, S. J. H., Belegers, J. D. M., Adriaanse, P. I., Arts, G. H. P. (2013): Effects of linuron on a rooted aquatic macrophyte in sediment-dosed test systems. *Environmental Pollution* 175: 117-124.
- Caminada, D., Escher, C., Fent, K. (2006): Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic toxicology* 79: 114-123.
- Carter, A. D. (1999): Herbicide movement in soil: principles, pathways and processes. *Weed Research* 40: 113-122.
- Castaño, A., Gómez-Lechón, M. J. (2005): Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. *Toxicology in Vitro* 19: 695-705.
- Castaño, A., Cantarino, M. J., Castillo, P., Tarazona, J. V. (1996): Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and in vivo LC50 rainbow trout bioassay. *Chemosphere* 32 (11): 2141-2157.
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E. J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J. R., Sintes, J. R., Ruffli, H., Smith, R., Wood, C., Segner, H. (2003): The use of fish cells in

- ecotoxicology: The report and recommendations of ECVAM workshop 47. *ATLA* 31: 317-351.
- Cattaneo, R., Moraes B. S., Loro, V. L., Pretto, A., Menezes, C., Sartori, G. M. S., Clasen, B., de Avila, L. A., Marchesan, E., Zanella, R. (2012): Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62 (1): 97-106.
- Cedergreen, N., Streibig, J. C., Spliid, N. H. (2004): Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57: 153-161.
- Cerejeira, M. J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M. J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A. M. (2003): Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water research* 37: 1055-1063.
- Chakravarthy, S., Sadagopan, S., Nair, A., Sukumaran, S. K. (2014): Zebrafish as an *In Vivo* high-throughput model for genotoxicity. *Zebrafish* 11 (2): 154-166.
- Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., Zanella, R. (2018): Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Science of the Total Environment* 626: 737-743.
- Colombo, A., Bonfanti, P., Ciccotelli, M., Doldi, M., Del'Orto, N., Camatini, M. (1996): Induction of cytochrome P4501A isoform in *Xenopus laevis* is a valid tool for monitoring the exposure to benzo[a]pyrene. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 5: 207-211.
- Cook, L. W., Paradise, C. J., Lom, B. (2005): The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (7): 1745-1750.
- Cox, C., Sorgan, M. (2006): Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives* 114: 1803-1806.

- Crayon, J. J. (2005): Family Pipidae. In: Lannoo, M. J. (Ed.), Amphibian declines: The conservation status of United States species. University of California Press, 522-526.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Lazzari, R., Duarte, M. F., Morsch, V. M., Pippi, A. L., Vieira, V. P. (2006): Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 48-55.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F. F., Zanella, R., Loro, V. L. (2007): Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67 (11): 2305-2311.
- Crosby, D. G., Tucker, R. K. (1966): Toxicity of aquatic herbicides to *Daphnia magna*. *Science* 154 (3746): 289-291.
- Cuhra, M., Traavik, T., Bøhn, T. (2013): Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22: 251-262.
- Dalton, R. L., Nussbaumer, C., Pick, F. R., Boutin, C. (2013): Comparing the sensitivity of geographically distinct *Lemna minor* populations to atrazine. *Ecotoxicology* 22: 718-730.
- Damalas, C. A., Eleftherohorinos, I. G. (2011): Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8: 1402-1419.
- DAR (2006): Draft assessment report (DAR) – Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Denmark for the existing active substance Clomazone. European Commission.

- Davies, J., Honegger, J. L., Tencalla, F. G., Meregalli, G., Brain, P., Newman, J. R., Pitchford, H. F. (2003): Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study. *Pest Management Science* 59: 231-237.
- Dayeh, V. R., Schirmer, K., Bols, N. C. (2002): Applying whole-water samples directly to fish cell cultures in order to evaluate the toxicity of industrial effluent. *Water Research* 36: 3727-3738.
- Dayeh, V. R., Bols, N. C., Schirmer, K., Lee, L. E. J. (2003): The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants. *Current Protocols in Toxicology*: 1.5.1-1.5.17.
- Dayeh, V. R., Schirmer, K., Lee, L. E. J., Bols, N. C. (2005): Rainbow trout gill cell line microplate cytotoxicity test. In: Blaise, S., Féraud, J.-F. (Eds), *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Volume I*. Springer, Netherlands, 473-503.
- Dayeh, V. R., Schirmer, K., Bols, N. C. (2009): Ammonia-containing industrial effluents, lethal to rainbow trout, induce vacuolization and neutral red uptake in the rainbow trout gill cell line, RTgill-W1. *ATLA* 37: 77-87.
- de Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., de Groot, D. (2012): Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. *Neurotoxicology and Teratology* 34: 545-553.
- de Kruijf, H. A. M., de Zwart, D., Viswanathan, P. N., Ray, P. K. (1988): *Manual on aquatic ecotoxicology*, Allied Publisher Private Ltd., New Delhi, India, 298.
- De Liguoro, M., Dalla Bona, M., Gallina, G., Capolongo, F., Binato, G., Di Leva, V. (2014): A monitoring of chemical contaminants in water used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental Science and Pollution Research* 21(5): 3546-3557.
- de Oliveira, C. R., Fraceto, L. F., Rizzi, G. M., Salla, R. F., Abdalla, F. C., Costa, J. M., Silva-Zacarin, E. C. M. (2016): Hepatic effect of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 149: 304-313.

- Della Vecchia, J. F., Cruz, C., Silva, A. F., Cerveira JR., W. R., Garlich, N. (2016): Macrophyte bioassay applications for monitoring pesticides in the aquatic environment. *Planta Daninha* 34 (3): 597-603.
- Demetrio, P. M., Bulus Rossini, G. D., Bonetto, C. A., Ronco, A.E. (2012): Effects of pesticide formulation and active ingredients on the coelenterate *Hydra attenuata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88: 15-19.
- Di Giulio, R. T., Hinton, D. E. (Eds.) (2008): *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Diao, J., Xu, P., Wang, P., Lu, D., Lu, Y. L., Zhou, Z. (2010): Enantioselective degradation in sediment and aquatic toxicity to *Daphnia magna* of the herbicide lactofen enantiomers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 2439-2445.
- Domingues, I., Oliveira, R., Musso, C., Cardoso, M., Soares, A. M. V. M., Loureiro, S. (2011): Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. *Environmental Toxicology* 28 (3): 155-163.
- dos Santos Miron, D., Vargas Flores da Silva, L., Ineu Golombieski, J., de Oliveira Machado, S. L., Marchezan, E., Baldisserotto, B. (2004): Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Ciência Rural* 34 (5): 1465-1469.
- dos Santos Miron, D., Crestani, M., Shettinger, M. R., Morsch, V. M., Baldisserotto, B., Tierno, M. A., Moraes, G., Vieira, V. L. P. (2005): Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61: 398-403.
- dos Santos Miron, D., Pretto, A., Crestani, M., Gluszczak, L., Schetinger, M. R., Loro, V. L., Morsch, V. M. (2008): Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74 (1): 1-5.
- Dougherty, J. A., Swarzenski, P. W., Dinicola, R. S., Reinhard, M. (2010): Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and

- groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Environmental Quality* 39: 1173-1118.
- Driever, S. M., van Nes, E. H., Roijackers, R. M. M. (2005): Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. *Aquatic Botany* 81: 245-251.
- Duellman, W. E., Schlager, N., Trumpey, J. E. (2003): Grzimek's animal life encyclopedia: Volume 6: Amphibians. Farmington Hills, Gale Group, 99-104.
- Dupuis, A., Ucan-Marin, F. (2015): A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota. DFO Canadian Science Advisory Secretariat (CSAS), Research Document 2015/007.
- Ebert, D. (2005): Ecology, epidemiology and evolution of parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology: 5-18.
- EC (2002): Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, SANCO/3268/2001 rev. 4 (final), Brussels.
- EC (2009): Regulation No 1007/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. [http://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/086\\_NOVA%20Regulativa%20PPP%201107%202009.pdf](http://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/086_NOVA%20Regulativa%20PPP%201107%202009.pdf)
- EC (2010): Commission Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
- EC (2013a): Commission regulation No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=%20CELEX:32013R0283&from=EN>



- EC (2013b): Commission regulation No 284/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:093:0085:0152:EN:PDF>
- EC (2018): EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>  
Pristupljeno: Januar 2018
- EFSA (2004): Opinion on the scientific panel on plant health, plant protection products and their residues on a request from EFSA on the appropriateness of using the current FOCUS surface water scenarios for estimating exposure for risk assessment in aquatic ecotoxicology in context to Council Directive 91/414/EEC. The EFSA Journal 145: 1-31.
- EFSA (2007): Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance clomazone. EFSA Scientific Report 109: 1-73.
- EFSA (2013): Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA Journal 11 (7): 3290.
- EFSA (2015): Outcome of the pesticides peer review meeting on general recurring issues in ecotoxicology. EFSA Technical Report: 1-62.
- EFSA (2015a): Data collection on combined toxicity of multiple chemicals for animal health and ecological risk assessment. EFSA External Scientific Report: 1-112.
- EFSA (2018): Scientific opinion on the state of the science on pesticide risk assessment for amphibians and reptiles. EFSA Journal 16 (2): 5125.
- Eggert, C., Fauquet, A. (2006): A preliminary biotelemetric study of a feral invasive *Xenopus laevis* population in France. Alytes 23 (3-4): 144-149.
- Ekwall, B. (1983): Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. Annals of the New York Academy of Science 407: 64-77.

- El Naggar, S. F., Creekmore, R. W., Schocken, M. J., Rosen, R. T., Robinson, R. A. (1992): Metabolism of clomazone herbicide in soybean. *The Journal of Agricultural Science* 40: 880-883.
- Evans, B. J., Greenbaum, E., Kusamba, C., Carter, T. F., Tobias, M. L., Mendel, S. A., Kelley, D. B. (2011): Description of a new octoploid frog species (Anura: Pipidae: *Xenopus*) from the Democratic Republic of Congo, with a discussion of the biogeography of African clawed frogs in the Albertine Rift. *Journal of Zoology* 283: 276-290.
- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., Carlson, A. R. (1998): Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzine, alachlor, and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (9): 1830-1834.
- Fänge, R. (1983): Gas exchange in fish swim bladder. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 97, Springer, Berlin, 111-158.
- Fent, K. (2001): Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro* 15: 477-488.
- Fent, K., Meier, W. (1994): Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 224-231.
- Ferhatoglu, Y., Barrett, M. (2006): Studies of clomazone mode of action. *Pesticides Biochemistry and Physiology* 85 (1): 7-14.
- FOCUS (2015): Generic guidance for FOCUS surface water scenarios. Report of the FOCUS Surface Water Scenarios Group, EC Document Reference SANCO/4802/2001-rev. 2.
- Fogg, P., Boxall, A., Walker, A., Jukes, A. A. (2003): Pesticide degradation in a “biobed” composting substrate. *Pest Management Science* 59: 527-537.
- Folmar, L. C., Sanders, H. O., Julin, A. M. (1979): Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8: 269-278.

- Foudoulakis, M. (2006): Ecotoxicological risk assessment for plant protection products in Europe. In: Ecotoxicology, Ecological Risk Assessment and Multiple Stressors. Springer, Netherlands, 137-154.
- Fouquet, A., Measey, G. J. (2006): Plotting the course of an African clawed frog invasion in Western France. *Animal Biology* 56 (1): 95-102.
- Freese, H. M., Martin-Creuzburg, D. (2013): Food quality of mixed bacteria-algae diets for *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 715: 63-76.
- Freyse, B., Mons, R., Garric, J. (2006): Development of a zebrafish 4-day embryolarval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 253-267.
- Gašić, S., Elezović, I. (1993): Perspektive razvoja formulacija pesticide i njihova primena. *Pesticidi* 8: 97-102.
- Gašić, S., Orešković, Z. (2006): Novi tipovi formulacija u zaštiti bilja: emulzije ulja u vodi (EW). *Pesticidi i Fitomedicina* 21: 263-271.
- Gašić, S., Budimir, M., Brkić, D., Nešković, N. (2002): Residues of atrazine in agricultural areas of Serbia. *Journal of Serbian Chemical Society* 67 (12): 887-882.
- Gavrilescu, M. (2005): Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5: 497-526.
- Geier, M. C., Chlebowski, A. C., Truong, L., Massey Simonich, S. L., Anderson, K. A., Tanguay, R. L. (2017): Comparative developmental toxicity of a comprehensive suite of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Toxicology*, DOI 10.1007/s00204-017-2068-9.
- Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E., Cheng, K. C. (2002): Life spans and senescent phenotypes in two strains of zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental Gerontology* 37: 1055-1068.

- Giddings, J. M., Arts, G., Hommen, U. (2013): The relative sensitivity of macrophyte and algal species to herbicides and fungicides: an analysis using species sensitivity distributions. *Integrated Environmental Assessment and Management* 9 (2): 308-318.
- Goolish, E. M., Okutake, K. (1999): Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface. *Journal of Fish Biology* 55: 1054-1063.
- Görge, G., Nagel, R. (1990): Toxicity of lindane, atrazine and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20: 246-255.
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., Wu, L. (2012): U.S. EPA Pesticides industry sales and usage: 2006 - 2007 Market Estimates. Washington, DC: U.D. Environmental Protection Agency.
- Guillarmod, A. J. (1979): Water weeds in Southern Africa. *Aquatic Botany* 6: 377-391.
- Gülden, M., Mörchel, S., Seibert, H. (2005): Comparison of mammalian and fish cell line cytotoxicity: impact of endpoint and exposure duration. *Aquatic Toxicology* 71: 229-236.
- Gurdon, J. B., Hopwood, N. (2000): The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology* 44: 43-50.
- Haendel, M. A., Tilton, F., Bailey, G. S., Tanguay, R. L. (2004): Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. *Toxicological Sciences* 81: 390-400.
- Hagenaars, A., Stinckens, E., Vergauwen, L., Bervoets, L., Knapen, D. (2014): PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 157: 225-235.

- Hansen, L. R., Roslev, P. (2016): Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology* 179: 36-43.
- Hanski, I., Ranta, E. (1983): Coexistence in a patchy environment: three species of *Daphnia* in rock pools. *Journal of Animal Ecology* 52 (1): 263-279.
- Hanson, M. L., Sanderson, H., Solomon, K. R. (2003): Variation, replication, and power analysis of *Myriophyllum* spp. microcosm toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (6): 1318-1329.
- Harland, R. M., Grainger, R. M. (2011): *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in Genetics* 27 (12): 507-515.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V. P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M. (2006): Pesticides mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives* 114 (Suppl 1): 40-50.
- Hirech, K., Payan, S., Carnelle, G., Brujes, L., Legrand, J. (2003): Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerisation. *Powder Technology* 130: 324-330.
- Hoff, K. V., Wassersug, R. J. (1986): The kinematics of swimming in larva of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Biology* 122: 1-12.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., Veldhoen, N. (2004): Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (8): 1928-1938.
- HRAC: <http://www.weedscience.org/Documents/ShowDocuments.aspx?DocumentID=1193>
- Huang, M., Duan, R., Ji, X. (2014): Chronic effects of environmentally-relevant concentrations of lead in *Pelophylax nigromaculata* tadpoles: threshold dose and adverse effect. *Ecotoxicology and Environmental safety* 104: 310-316.

- Hug, C., Ulrich, N., Schulze, T., Brack, W., Krauss, M. (2014): Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and non target screening. *Environmental Pollution* 184: 25-32.
- Hussner, A. (2009): Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. *Weed Research* 49 (5): 506-515.
- Hussner, A., Meyer, C., Busch, J. (2009): The influence of water level and nutrient availability on growth and root system development of *Myriophyllum aquaticum*. *Weed Science* 49 (1): 73-80.
- Hussner, A., Champion, P. D., Francis, R. A. (2012): *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt (parrot feather). A Handbook of Global Freshwater Invasive Species (Ed. Francis, R. A.), Earthscan, 103-111.
- Hussner, A., Stiers, I., Verhofstad, M. J. J. M., Bakker, E. S., Grutters, B. M. C., Haury, J., van Valkenburg, J. L. C. H., Brundu, G., Newman, J., Clayton, J. S., Anderson, L. W. J., Hofstra, D. (2017): Management and control methods of invasive alien freshwater aquatic plants: A review. *Aquatic Botany* 136: 112-137.
- Ignace, D. D., Dodson, S. I., Kashian, D. R. (2011): Identification of the critical timing of sex determination in *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) for use in toxicological studies. *Hydrobiologia* 668: 117-123.
- ISO (1996): ISO 7346 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachyodanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 1: Static method; Part 2: Semi-static method.
- ISO (2005): ISO 20079 – Water Quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test.
- ISO (2013): ISO 16191 – Water Quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.

- Jarvinen, A. W., Tanner, D. K. (1982): Toxicity of selected controlled release and corresponding unformulated technical grade pesticide to the fished minnow *Pimephales promelas*. Environmental Pollution A 27: 179-195.
- Jokumsen, A., Weber, R. E. (1980): Haemoglobin-oxygen binding properties in the blood of *Xenopus laevis*, with special reference to the influences of aestivation and of temperature and salinity acclimation. Journal of Experimental Biology 86: 19-37.
- Jonsson, C. M., Maia, A. H. N., Ferreira, C. J. A., Ribeiro, E. O. 1995): Risk assessment of herbicide clomazone to aquatic life. In: Congress of International Association of Theoretical and Applied Limnology, 26.
- Kang, H. S., Park, C. J., Gye, M. C. (2009): Effects of molinate on survival and development of *Bombina orientalis* (Boulenger) embryos. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 82: 305-309.
- Keppeler, E. C. (2009): Toxicity of sodium chloride and methyl parathion on the macrophyte *Lemna minor* (Linnaeus, 1753) with respect to frond number and chlorophyll. Biotemas 22 (3): 27-33.
- Kim, Y. H., Lee, S. H. (2018): Invertebrate acetylcholinesterases: Insights into their evolution and nonclassical functions. Journal of Asia-Pacific Entomology 21: 186-195.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics 203: 253-310.
- Kleiven, O. T., Larsson, P., Hobaek, A. (1992): Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65 (2): 197-206.
- Klüttgen, B., Dülmer, U., Engles, M., Ratte, H. T. (1994): AdaM, and artificial freshwater for the culture of zooplankton. Water Research 28 (3): 743-746.

- Knauer, K., Vervliet-Scheebaum, M., Dark, R. J., Maund, S. J. (2006): Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. *Pest Management Science* 62: 715-722.
- Knauer, K., Mohr, S., Feiler, U. (2008): Comparing growth development of *Myriophyllum* sp. in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 322-331.
- Knäbel., A., Stehle, S., Schäfer, R. B., Schulz, R. (2012): Regulatory FOCUS surface water models fail to predict insecticide concentrations in the field. *Environmental Science and Technology* 46: 8397-8404.
- Knäbel., A., Meyer, K., Rapp, J., Schulz, R. (2014): Fungicide field concentrations exceed FOCUS surface water predictions: Urgent need in model improvement. *Environmental Science and Technology* 48: 455-463.
- Knäbel., A., Scheringer, M., Stehle, S., Schulz, R. (2016): Aquatic exposure predictions of insecticide field concentrations using a multimedia mass-balance model. *Environmental Science and Technology* 50: 3721-3728.
- Knowles, A (2005): New developments in crop protection product formulation. *Agrow Reports UK; T and F Informa, UK*, 153-156.
- Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., Garrido, T., Fraile, J., López de Alda, M., Barcelo, D. (2014): Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in ground water of Catalonia (NE-Spain). *Science of the total environment* 470-471: 1087-1098.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M. (2009): State of the Art Report on mixture toxicity: Final report. Brussels, Belgium: European Commission, Directorate General for the Environment, 7-12.
- Kortenkamp, A. (2014): Low dose mixture effects on endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curent Opinion in Pharmacology* 19: 105-111.



- Kramer, N. I., Hermens, J. L. M., Schirmer, K. (2009): The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between *in vitro* and acute fish toxicity data. *Toxicology in Vitro* 23: 1372-1379.
- Kumar, A., Rai, D. A., Sharma, B., Pandey, R. S. (2009):  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced *in vivo* alterations in the activity of acetylcholinesterase in a fresh-water fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 96-99.
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009): Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149: 196-209.
- Landolt, E. (1975): Morphological differentiation and geographical distribution of the *Lemna gibba*–*Lemna minor* group. *Aquatic Botany* 1: 345-363.
- Larsen, K. E., Lifschitz, A. L., Lanusse, C. E., Virkel, G. L. (2016): The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 45: 41-44.
- Lawrence, C. (2007): The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269: 1-20.
- Lazartigues, A., Thomas, M., Cren-Olivé, C., Brun-Bellut, J., Le Roux, Y., Banas, D., Feidt, C. (2013): Pesticide pressure and fish farming in barrage pondin Northeastern France. Part II: Residues of 13 pesticides in water, sediments, edible fish and their relationships. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 117-125.
- Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K., Bols, N. C. (2009): Application and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Animal* 45: 127-134.
- Lema, S. C., Schultz, I. R., Scholz, N. L., Incardona, J. P., Swanson, P. (2007): Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to

- 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquatic toxicology* 82 (4): 296-307.
- Lemon, G. D., Posluszny, U. (2000): Comparative shoot development and evolution of Lemnaceae. *International Journal of Plant Sciences* 161 (5): 733-748.
- Lenkowski, J. R., Sanchez-Bravo, G., McLaughlin, K. A. (2010): Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences* 22 (9): 1305-1308.
- Les, D. H., Crawford, D. J., Landolt, E., Gabel, J. D., Kimball, R. T. (2002): Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Systematic botany* 27 (2): 221-240.
- Li, W. F., Wei, J. F., Jin, H. T., Huang, M. F., Zhang, J. X., Li, C. H., Chen, C. J., Liu, C., Wang, A. P. (2011): Study of the toxicity of 1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin to zebrafish. *Biomedical and Environmental Sciences* 24 (4): 383-390.
- Lin, T., Chen, Y. Q., Chen, W. (2013): Impact of toxicological properties of sulfonamides on the growth of zebrafish embryos in the water. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 1068-1076.
- Lobos, G., Jaksic, F. M. (2005): The ongoing invasion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) in Chile: causes of concern. *Biodiversity and Conservation* 14: 429-439.
- López-Olmeda, J. F., Sánchez-Vázquez, F. J. (2011): Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of thermal biology* 36: 91-104.
- MacBean, C. (Ed.) (2012): *The Pesticide manual – A World Compendium* (16<sup>th</sup> edition). British Crop Production Council (BCPC), Omega Park, Alton, Hampshire GU34 2QD, UK.
- Maddin, H. C., Eckhart, L., Jaeger, K., Russell, A. P., Ghannadan, M. (2009): The anatomy and development of the claws of *Xenopus laevis* (Lissamphibia: Anura)

- reveal alternate pathways of structural evolution in the integument of tetrapods. *Journal of Anatomy* 214: 607-619.
- Maltby, L., Arnold, D., Arts, G., Davis, J., Heimbach, F., Pickl, C., Poulsen, V. (2010): Aquatic macrophyte risk assessment for pesticides. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Florida, USA.
- Mann, R. M., Bidwell, J. R. (1999): The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 193-199.
- Marchesan, E., Zanella, R., Avila, L. A., Camargo, E. R., Machado, S. L. O., Macedo, V. R. M. (2007): Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia agricola* 64 (2): 131-137.
- Mayden, R. L., Tang, K. L., Conway, K. W., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., Schneider, L., Sudkamp, M., Wood, R. M., Agnew, M., Bufalino, A., Sulaiman, Z., Miya, M., Saitoh, K., He, S. (2007): Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: A framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *Journal of experimental zoology part B: Molecular and Developmental Evolution* 308B: 642-654.
- McCallum, M. L. (2007): Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology* 41 (3): 483-491.
- McCoy, K. A., Bortnick, L. J., Campbell, C. M., Hamlin, H. J., Guillette Jr., L. J., St Mary; C. M. (2008): Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives* 116 (11): 1526-1532.
- Measey, G. J. (1998): Diet of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, UK. *Journal of Zoology* 246: 287-298.
- Measey, G. J., Tinsley, R. C. (1998): Feral *Xenopus laevis* in South Wales. *Herpetological Journal* 8: 23-27.

- Measey, G. J., Rödder, D., Green, S. L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., Rebelo, R., Thirion, J.-M. (2012): Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions* 14 (11): 2255-2270.
- Menezes, C. C., Loro, V. L., Fonseca, M. B., Cattaneo, R., Pretto, A., dos Santos Miron, D., Santi, A. (2011): Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100: 145-150.
- Menezes, C., Leitempurger, J., Toni, C., Santi, A., Lopes, T., Barbosa, N. B. V., Neto, J. R., Loro, V. L. (2013): Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress on carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 706-714.
- Menezes, C., Leitempurger, J., Murussi, C., Toni, C., Araújo, M. C. S., Farias, I. L., Perazzo, G. X., Barbosa, N. V., Loro, V. L. (2014): Herbicide clomazone effects on  $\delta$ -amniolevulinic acid activity and metabolic parameters in *Cyprinus carpio*. *The Bulletin of Environmental Contaminations and Toxicology* 92: 393-398.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., Dos Santos Afonso, M., Salibián, A. (2012): Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88: 6–9.
- Mesnager, R., Defarge, N., de Vendômois, J. S., Séralini, G. (2014): Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Research International*, Article ID 179691, 8 pages.
- Michel, A., Johnson, R. J., Duke, S. O., Scheffler, B. E. (2004): Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: An improved ecotoxicological method. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (4): 1074-1079.
- Michelova, M., Pipal, M., Jonas, A., Becanova, J., Blaha, L., (2015): Pharmaceuticals and fish: effects in alternative in vitro cellular and embryonal models. SETAC Europe 25<sup>th</sup> Annual Meeting, Barcelona, Spain.

- Mikó, Z., Ujszegi, J., Hettyey, A. (2017): Age-dependent changes in sensitivity to a pesticide in tadpoles of the common toad (*Bufo bufo*). *Aquatic Toxicology* 187: 48-54.
- Moody, M. L., Les, D. H. (2010): Systematics of the aquatic angiosperm genus *Myriophyllum* (Haloragaceae). *Systematic Botany* 35 (1): 121-139.
- Moraes, B. S., Loro, V. L., Gluszczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., de Oliveira Machado, S. (2007): Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68: 1597-1601.
- Murussi, C. R., Costa, M., Menezes, C., Leitempurger, J., Guerra, L., Lópes, T., Severo, E., Zanella, R., Loro, V. L. (2015): Integrated assessment of biomarker response in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to clomazone. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 646-654.
- Nagel, R. (2001): *DarT*: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19: 38-48.
- Nelson, J. S. (2006): *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc.
- Nešković, N., Vojinović, V. (1987): Pesticidi u zemljištu – dospevanje, perzistentnost i efekti na živi svet. *Pesticidi* 2: 171-178.
- Newman, M. C., Unger, M. A. (2003): *Fundamentals of ecotoxicology*, 2<sup>nd</sup> ed. Lewis publishers, USA, 291-301.
- Niell, S., Pareja, L., Geis Asteggiante, L., Cesio, M. V., Heinzen, H. (2010): Comparison of extraction solvents and conditions for herbicide residues in milled rice with liquid chromatography-diode array detection analysis (LC-DAD). *Food Additives and Contaminants* 27 (2): 206-211.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267: 5421-5426.

- OECD (2004) Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute immobilisation test. OECD Guideline for the testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720201e.pdf?expires=1519814705&id=id&accname=guest&checksum=0B7AF18AFD67AFB3DD7505453A558CB8>
- OECD (2006) Test No. 221: *Lemna* sp. Growth inhibition test. OECD Guideline for the testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9722101e.pdf?expires=1448969258&id=id&accname=guest&checksum=B8673089203AA4F85C406AA05D64E019>
- OECD (2011): Ring-test protocol: Standardized method for investigating test substance impact on rooted aquatic macrophytes. Organization for Economic Cooperation and Development.
- OECD (2011) Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, Growth inhibition test. OECD Guideline for the testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720101e.pdf?expires=1519816044&id=id&accname=guest&checksum=1D1B46F71FF53B1028200E145C3398E5>
- OECD (2013) Test No. 210: Fish early life stage toxicity test. OECD Guideline for the testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713191e.pdf?expires=1421846895&id=id&accname=guest&checksum=E4A0448A9D96A39084055F97C44737B0>
- OECD (2014) Test No. 239: Water-sediment *Myriophyllum spicatum* toxicity test. OECD Guideline for the testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714501e.pdf?expires=1450439592&id=id&accname=guest&checksum=82045196A70C0FB769C619021C9113F7>

- Oka, T., Tooi, O., Mitsui, N., Miyahara, M., Ohnishi, Y., Takase, M., Kashiwagi, A., Shinkai, T., Santo, N., Iguchi, T. (2008): Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 87: 215-226.
- Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., Castrejón-Godínez, M. L. (2013): Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process. *Biodegradation-Life Science*. Intech-publishing, Rijeka, Croatia, 251-287.
- Osano, O., Admiraal, W., Otieno, D. (2001): Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloracetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (2): 375-379.
- Osano, O., Admiraal, W., Otieno, D. (2002): Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloracetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (2): 375-379.
- Otte, J. C., Schmidt, A. D., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010): Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 100: 38-50.
- Pamanji, R., Bethu, M. S., Yashwanth, B., Leelevanthi, S., Venkateswara Rao, J. (2015): Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorus pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (10): 7744-7753.
- Pandey, M. R., Guo, H. (2014): Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos. *Toxicology in Vitro* 28: 340-353.
- Papadakis, E. N., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Makris, K. C., Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015): A pesticide monitoring survey in rivers and lakes in northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 116: 1-9.

- Park, J., Brown, M. T., Depuydt, S., Kim, J. K., Won, D. S., Han, T. (2017): Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three *Lemna* species exposed to four herbicides. *Environmental Pollution* 220: 818-827.
- Parlak, K. U., Yilmaz, D. D. (2013): Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91: 79-85.
- Pereira, A. S., Daam, M. A., Cerejeira, M. J. (2017): Evaluation of FOCUS surface water pesticide concentration predicitions and risk assessment of field-measured pesticide mixtures – a crop-based approach under Mediterranean conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 17394-17406.
- Pereira, L., Fernandes, M. N., Martinez, C. B. (2013): Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and pharmacology* 36 (1): 1-8.
- Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A. M. V. M., Loureiro, S. (2013): Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research* 20 (7): 4671-4680.
- Perkins, P. J., Boermans, H. J., Stephenson, G. R. (2000): Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (4): 940-945.
- Puglis, H. J., Boone, M. D. (2011): Effects of technical-grade active ingredients vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60 (1): 145-155.
- Quayle, W. C., Oliver, D. P., Zrna, S. (2006): Field dissipation and environmental hazard assessment of clomazone, molinate, and thiobencarb Australian rice culture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54 (19): 7213-7220.



- Raftery, T. D., Isales, G. M., Yozzo, K. L., Volz, D. C. (2014): High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. *Environmental Science and Technology* 48: 804-810.
- Ratte, M., Ratte, H. (2014): *Myriophyllum* toxicity test: Results of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in water-sediment system. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing.
- Reilly, T. J., Smalling, K. L., Orlando, J. L., Kuivila, K. M. (2012): Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere* 89: 228-234.
- Rice, P. J., Rice, P. J., Arthur, L. E., Barefoot, A. C. (2007): Advances in pesticide fate and exposure assessments. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 5367-5376.
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., Bonan, C. D. (2011): Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebra fish brain is altered by heavy metal exposure. *Neuro Toxicology* 32 (1): 116–122.
- Robertson, G. N., McGee, C. A. S., Dumbarton, T. C., Croll, R. P., Smith, F. M. (2007): Development of the swimbladder and its innervation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Morphology* 268: 967-985.
- Rosenkrantz, R. T., Baun, A., Kusk, K. O. (2013): Growth inhibition and recovery of *Lemna gibba* after pulse exposure to sulfonylurea herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89: 89-94.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C. R., Cavalheiro de Menezes, C., Lazzari, R., Radunz, J., Baldisseriotto, B., Loro, V. L. (2010): Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 740–745.

- Santos, D., Matos, M., Coimbra, A. (2014): Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. *Neurotoxicology and Teratology* 46: 18-25.
- Sauco, S., Eguren, G., Heinzen, H., Defeo, O. (2010): Effects of herbicides and freshwater discharge on water chemistry, toxicity and benthos in a Uruguayan sandy beach. *Marine Environmental Research* 70: 300-307.
- Schirmer, K., Chan, A. G. J., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., Bols, N. C. (1997): Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro* 11: 107-119.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – application beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 394-404.
- Scholz, S., Knöbel, M., Ortmann, J., Busser, F., Kramer, N., Hermens, J., Tanneberger, K., Schirmer, K. (2009): The fish embryo test as an alternative to acute fish toxicity testing: Optimisation for difficult compounds and role of metabolic activation. *Toxicology Letters* 189: S205.
- Scholz, S., Sela, E., Blaha, L., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., García-Franco, M., Guinea, J., Klüver, N., Schirmer, K., Tanneberger, K., Tobor-Kapłon, M., Witters, H., Belanger, S., Benfenati, E., Creton, S., Cronin, M. T. D., Eggen, R. I. L., Embry, M., Ekman, D., Gourmelon, A., Halder, M., Hardy, B., Hartung, T., Hubesch, B., Jungmann, D., Lampi, M. A., Lee, L., Léonard, M., Küster, E., Lillicrap, A., Luckenbach, T., Murk, A. J., Navas, J. M., Peijnenburg, W., Repetto, G., Salinas, E., Schüürmann, G., Spielmann, H., Tollefsen, K. E., Walter-Rohde, S., Whale, G., Wheeler, J. R., Winter, M. J. (2013): A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 67: 506-530.

- Schoonbee, H. J., Prinsloo, J. F., Nxiweni, J. G. (1992): Observations on the feeding habits of larvae, juvenile and adult stages of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, in impoundments in Transkei. *Water SA-Pretoria* 18 (4): 227-236.
- Scornaienchi, M. L., Thornton, C., Willett, K. L., Wilson, J. Y. (2010): Functional differences in the cytochrome P450 1 family enzymes from zebrafish (*Danio rerio*) using heterologously expressed proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 502: 17-22.
- Seaman, D. (1990): Trends in the formulation of pesticides - an overview. *Pesticide Science* 29: 437-449.
- Segner, H. (1998): Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In: Braunbeck, T., Hinton, D. E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Springer Basel AG.
- Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J. (2016): Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 538 (7625): 336-343.
- Shuman-Goodier, M. E., Propper, C. R. (2016): A meta-analysis synthesizing the effects of pesticides on the swim speed and activity of aquatic vertebrates. *Science of the Total Environment* 15:758-766.
- Silva, A. F., Cruz, C. N., Neto, A., Pitelli, R. A. (2012): Ecotoxicidade de herbicidas para a macrófita aquática (*Azolla caroliniana*). *Planta Daninha* 30 (3): 541-546.
- Singleman, C., Holtzman, N. G. (2012): Analysis of postembryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics* 241: 1993-2004.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2009): Zakon o sredstvima za zaštitu bilja. Sl. Glasnik RS, br. 41/09.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2012): Pravilnik o sadržini i načinu postupanja sa dokumentacijom za procenu aktivne supstance, odnosno osnovne supstance i metodama za ispitivanje aktivne supstance, odnosno osnovne supstance. Sl. Glasnik RS, br. 69/12.

- Službeni glasnik Republike Srbije (2012): Pravilnik o sadržini i načinu postupanja sa dokumentacijom za procenu sredstava za zaštitu bilja i metodama za ispitivanje sredstava za zaštitu bilja. Sl. Glasnik RS, br. 69/12.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2017): Pravilnik o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za klasifikaciju i obeležavanje UN. Sl. Glasnik RS, br. 52/17.
- Smirnov, N. N. (2014a): General. In: Smirnov, N. N., *Physiology of Cladocera*. Academic Press, USA, 1-7.
- Smirnov, N. N. (2014b): Reproduction. In: Smirnov, N. N., *Physiology of Cladocera*. Academic Press, USA, 129-149.
- Smirnov, N. N. (2014c): Ecophysiology. In: Smirnov, N. N., *Physiology of Cladocera*. Academic Press, USA, 187-197.
- Smirnov, N. N. (2014d): Growth and molting. In: Smirnov, N. N., *Physiology of Cladocera*. Academic Press, USA, 119-127.
- Smith, D. C. (1987): Adult recruitment in Chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68 (2): 344-350.
- Soreq, H., Seidman, S. (2001): Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 294-302.
- Solomon, K., Dalhoff, K., Volz, D., Van der Kraak, G. (2013): Effects of herbicides on fish. *Fish physiology* 33: 369-409.
- Spasić, R. (urednik) (2016): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji 2016. Osamnaesto, izmenjeno i dopunjeno izdanje. Društvo za zaštitu bilja Srbije. Beograd, 360-362.
- Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahemd, Z. F., Smith, C. (2007): Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 71: 304-309.

- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008): The behaviour and ecology of zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83: 13-34.
- Stehr, C. M., Linbo, T. L., Incardona, J. P., Scholz, N. L. (2006): The developmental neurotoxicity of fipronil: Notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicological Sciences* 92 (1): 270-278.
- Stevanović, B. M., Janković, M. M. (2001): *Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka*, NNk International, Beograd, 267-281.
- Stevanovic, M., Gasic, S., Pipal, M., Blahova, L., Brkic, D., Neskovic, N., Hilscherova, K. (2017): Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 188: 54-63.
- Strmac, M., Braunbeck, T. (1999): Effects of triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 25-39.
- Strmac, M., Oberemm, A., Braunbeck, T. (2002): Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology* 61: 24-38.
- Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Rondeau, M., Sverko, E., Marvin, C. (2011): Occurrence and distribution of sulfonyleurea and related herbicides in Central Canadian surface waters 2006-2008. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87: 420-425.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., Waller, R. W. (2004): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306 (5702): 1783-1786.
- Suter II, G. W. (2006): *Ecological risk assessment*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Swigert, J. P., Lee, C., Wong, D. C. L., Podhasky, P. (2014): Aquatic hazard and biodegradability of light and middle atmospheric distillate petroleum streams. *Chemosphere* 108: 1-9.

- Tan, F., Wang, M., Wang, W., Lu, Y. (2008): Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals *in vitro*. *Toxicology in Vitro* 22: 164-170.
- Taneberger, K., Knöbel, M. (2014): Ring study: RTgill-W1 cell line assay (SOP: CS-02). Based on Project CellSens CEFIC-LRI Eco-8.
- Tanneberger, K., Knöbel, M., Busser, F. J. M., Sinnige, T. L., Hermens, J. L. M., Schrimmer, K. (2013): Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environmental Science and Technology* 47: 1110-1119.
- Teodorović, I., Kaišarević, S. (2015): *Ekotoksikologija*. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, 200-260.
- Teodorović, I., Knežević, V., Tunić, T., Čučak, M., Nikolić Lečić, J., Leovac, A., Ivančev Tumbas, I. (2012): *Myriophyllum aquaticum* versus *Lemna minor*: Sensitivity and recovery potential after exposure to atrazine. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (2), 417-426.
- Tobias, M. L., Barnard, C., O'Hagan, R., Horng, S. H., Rand, M., Kelley, D. B. (2004): Vocal communication between male *Xenopus laevis*. *Animal Behaviour* 67 (2): 353-365.
- Tobias, M. L., Corke, A., Korsh, J., Yin, D., Kelley, D. B. (2010): Vocal competition in male *Xenopus laevis* frogs. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 1791-1803.
- Todd, N. E., Van Leeuwen, M. (2002): Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 267-272.
- Tsuji, K. (1987): Controlled release formulation. In: *Pesticide Science and Biotechnology* (eds. Greenhalgh, R. and Roberts, T.R.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 223-234.
- Tunić, T., Knežević, V., Kerkez, Đ., Tubić, A., Šunjka, D., Lazić, S., Brkić, D., Teodorović, I. (2015): Some arguments in favor of a *Myriophyllum aquaticum* growth inhibition test in a water-sediment system as an additional test in risk

- assessment of herbicides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34 (9): 2104-2115.
- Turgut, C., Fomin, A. (2002): Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC<sub>50</sub>. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69: 601-608.
- U. S. EPA (1992): Framework for ecological risk assessment. Risk Assessment Forum, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA/630/R-92/001. <https://semsub.epa.gov/work/10/500006111.pdf>
- U.S. EPA (2007a): Clomazone summary document: Registration review. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. [https://archive.epa.gov/oppsrrd1/registration\\_review/web/pdf/clomazone\\_summary.pdf](https://archive.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/web/pdf/clomazone_summary.pdf) Pristupljeno: Januar 2017
- U.S. EPA (2007b): Registration review docket. Clomazone: PPDC Registration Review working group meeting. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. <https://archive.epa.gov/pesticides/ppdc/ppdc/regisreview/implemen/march07/clomazone.pdf> Pristupljeno: Januar 2017
- U.S. EPA (2009): Ecological risk assessment and effects determination: clomazone. Registration review. <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2009-0081-0124> Pristupljeno: Januar 2017
- van der Heide, T., Roijackers, R. M. M., van Nes, E. H., Peeters, E. T. H. M. (2006): A simple equation for describing the temperature dependent growth of free-floating macrophytes. *Aquatic Botany* 84: 171-175.
- van der Werf, H. M. G. (1996): Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60: 81-96.
- Van Leeuwen, C. J., Hermens, J. L. M. (Eds.) (2001): Risk assessment of Chemicals – An Introduction. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Van Scoy, A., Tjeerdema, R. S. (2014): Environmental fate and toxicology of clomazone. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 229: 35-49.
- Vargas, J. M. (1975): Pesticide degradation. In International shade tree conference in Detroit, Michigan, *Journal of Arboriculture*, 232-233.
- Vidal, T., Pereira, J. L., Abrantes, N., Soares, A. M. V. M., Gonçalves, F. (2016): Reproductive and developmental toxicity of the herbicide Betanal® Expert and corresponding active ingredients to *Daphnia spp.* *Environmental Science and Pollution Research* 23(13): 13276-13287.
- Villarroel, M. J., Sancho, E., Ferrando, M. D., Andreu, E. (2003): Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53: 857-864.
- Voet, D., Voet, J. G. (2011): *Biochemistry* (4<sup>th</sup> ed.). John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Walker, C. H. (2008): *Organic pollutants: An Ecotoxicological Perspective*. CRC Press, 257-264.
- Wallingford, J. B., Liu, K. J., Zheng, Y. (2010): *Xenopus*. *Current Biology* 6 (20): R263-R264.
- Walsh, P. T., Downie, J. R., Monaghan, P. (2008): Predation-induced plasticity in metamorphic duration in *Xenopus laevis*. *Functional Ecology* 22: 699-705.
- Wang, W. (1990): Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 52: 7-22.
- Wang, Y., Wu, S., Chen, J., Zhang, C., Xu, Z., Li, G., Cai, L., Shen, W., Wang, Q. (2018): Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. *Chemosphere*, 192: 14-23.



- Watson, F. L., Schmidt, H., Turman, Z. K., Hole, N., Garcia, H., Gregg, J., Tilghman, J., Fradinger, E. A. (2014): Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (6): 1337-1345.
- Wauchope, R. D., Yeh, S., Linders, J. B. H. J., Kloskowski, R., Tanaka, K., Rubin, B., Katayama, A., Kördel, W., Gerstl, Z., Lane, M., Unsworth, J. M. (2002): Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science* 58: 419-445.
- Weichert, F.G., Floeter, C., Meza Artman, A.S., Kammann, U. (2017): Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances – Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. *Chemosphere*, 186: 43-50.
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T. H. (2012): Developmental effects of coumarine and the anticouagulant coumarine derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reproductive Toxicology* 33: 133-141.
- Wellburn, A. R. (1994): The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Weltje, L., Simpson, P., Gross, M., Crane, M., Wheeler, J. R. (2013): Comparative acute and chronic sensitivity of fish and amphibians: a critical review of data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (5): 984-994.
- Wersal, R. M., Madsen, J. D. (2011): Comparative effects of water level variations on growth characteristics of *Myriophyllum aquaticum*. *Weed Research* 53 (4): 386-393.
- Wersal, R. M., Cheshier, J. C., Madsen, J. D., Gerard, P. D. (2011): Phenology, starch allocation, and environmental effects on *Myriophyllum aquaticum*. *Aquatic Botany* 95: 194-199.

- Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C., Pflugmacher, S. (2001): Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 199-205.
- Yamuchi, M., Kim, E-Y., Iwata, H., Tanabe, S. (2005): Molecular characterisation of the aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) from red seabream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141: 177-187.
- Yadav, A., Gopesh, A., Pandey, R. S., Rai, D. K., Sharma, B. (2009): Acetylcholinesterase: A potential biochemical indicator for biomonitoring of fertilizer industry effluent toxicity in freshwater teleost, *Channa striatus*. *Ecotoxicology* 18: 325–33.
- You, W., Yu, D., Liu, C., Xie, D., Xiong, W. (2013): Clonal integration facilitates invasiveness of the alien aquatic plant *Myriophyllum aquaticum* L. under heterogeneous water availability. *Hydrobiologia* 718: 27-39.
- Zanella, R., Primel, E. G., Gonçalves, F. F., Martins, A. F. (2000): Development and validation of a high-performance liquid chromatographic for the determination of clomazone residues in surface water. *Journal of Chromatography A* 904: 257-262.
- Zanella, R., Primel, E. G., Machado, S. L. O., Gonçalves, F. F., Marchezan, E. (2002): Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatographia* 55 (9): 573-577.

## Prilog 1

Tabela P1. Parametri validnosti izvedenih ispitivanja na vrstama (a) *Lemna minor*, (b) *Myriophyllum aquaticum*, (c) *Daphnia magna*, (d) *Danio rerio* i (e) *Xenopus laevis*. Prikazani su: relativna stopa rasta broja jedinki (RGR BJ), standardna devijacija (SD), koeficijent varijacije (CV), vreme dupliranja (Td), vrednosti parametara dužina iznad sedimenta (DS) i sveže mase (MSv) *M. aquaticum* na početku adaptacije (DAT -3), nultog (DAT 0) i sedmog dana (DAT 7) izlaganja

(a)		RGR BJ	SD	CV % (RGR)	Td
Tehnička supstanca		0,46	0,01	2,2	1,52
Rampa® EC		0,42	0,01	2,3	1,63
GAT Cenit 36 CS		0,42	0,01	2,3	1,63

(b)		Parametar	DAT -3	DAT 0	DAT 7	RGR (0-7)	CV % (RGR)	Td
Tehnička supstanca	DS (cm)	3,1	5,4	9,0	0,07	15,3	9,6	
	MSv (g)	0,23	0,37	0,65	0,08	21,1	9,2	
Rampa® EC	DS (cm)	2,9	5,3	8,0	0,06	32,6	11,9	
	MSv (g)	0,27	0,34	0,73	0,10	16,7	7,0	
GAT Cenit 36 CS	DS (cm)	3,1	4,5	6,9	0,06	22,0	11,7	
	MSv (g)	0,25	0,33	0,58	0,06	30,7	10,8	

(c)		Broj jedinki u kontroli	Imobilisane jedinke	% imobilisanih	O <sub>2</sub> (%)
Tehnička supstanca		50	0	0	>93,8
Rampa® EC		75	5	7,7	>97,7
GAT Cenit 36 CS		75	0	0	>95,7

(d)		Broj jedinki u kontroli	Broj uginulih	% preživelih	O <sub>2</sub> (%)
Tehnička supstanca		120	1	99,2	>97,0
Rampa® EC		120	0	100	>97,0
GAT Cenit 36 CS		120	2	98,3	>98,0

(e)		Broj jedinki u kontroli	Broj uginulih	Broj deformisanih	% preživelih i bez deformacija	pH
Tehnička supstanca		346	2	4	98,3	8,4
Rampa® EC		346	2	4	98,3	8,7
GAT Cenit 36 CS		346	2	4	98,3	8,6

## Prilog 2

**Tabela P2 (a, b).** Parametri rasta vrste *Lemna minor*. Prikazane su vrednosti a) stope rasta (RGR) i b) prinosa (Y) na osnovu broja (BJ), sveže mase (MSv) i površine jedinki (PJ) nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

(a)	mg a.s./L		Stopa rasta (0-7)					
			RGR BJ		RGR MSv		RGR PJ	
			sr.vr. ± sd	I <sub>r</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>r</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>r</sub> (%)
<b>Klomazon</b>	0	0	0,46±0,01		0,46±0,01		0,41±0,01	
	3,3 <sup>b</sup>	3,0 <sup>a</sup>	0,46±0,00	-0,7	0,44±0,01 <sup>*</sup>	4,4	0,40±0,01	4,4
	10 <sup>b</sup>	8,2 <sup>a</sup>	0,45±0,02	1,0	0,42±0,01 <sup>**</sup>	9,8	0,37±0,01 <sup>**</sup>	21,8
	30 <sup>b</sup>	31,5 <sup>a</sup>	0,39±0,01 <sup>**</sup>	13,9	0,33±0,01 <sup>**</sup>	28,7	0,29±0,01 <sup>**</sup>	60,5
	90 <sup>b</sup>	80,1 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>**</sup>	35,2	0,20±0,01 <sup>**</sup>	55,6	0,15±0,01 <sup>**</sup>	90,4
	270 <sup>b</sup>	253,6 <sup>a</sup>	0,04±0,02 <sup>**</sup>	92,0	0,01±0,01 <sup>**</sup>	97,2	0,02±0,00 <sup>**</sup>	99,1
	810 <sup>b</sup>	814,6 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0
<b>Rampa<sup>®</sup> EC</b>	0	0	0,42±0,01		0,44±0,01		0,38±0,01	
	3,3 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>	0,42±0,01	1,4	0,42±0,01 <sup>**</sup>	6,3	0,37±0,01	3,5
	10 <sup>b</sup>	10,9 <sup>a</sup>	0,41±0,02	4,0	0,39±0,01 <sup>**</sup>	12,4	0,34±0,01 <sup>**</sup>	11,2
	30 <sup>b</sup>	32,8 <sup>a</sup>	0,34±0,01 <sup>**</sup>	21,0	0,28±0,02 <sup>**</sup>	36,7	0,20±0,01 <sup>**</sup>	46,4
	90 <sup>b</sup>	98,3 <sup>a</sup>	0,05±0,01 <sup>**</sup>	87,1	0,02±0,01 <sup>**</sup>	95,9	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0
	270 <sup>b</sup>	294,9 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0
	810 <sup>b</sup>	884,8 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0	0,00±0,00 <sup>**</sup>	100,0
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	0	0	0,42±0,01		0,44±0,01		0,38±0,01	
	3,3 <sup>b</sup>	3,1 <sup>a</sup>	0,41±0,01	2,5	0,43±0,01	3,9	0,36±0,01	5,7
	10 <sup>b</sup>	9,5 <sup>a</sup>	0,41±0,01	2,6	0,43±0,01	2,1	0,37±0,01	2,5
	30 <sup>b</sup>	28,6 <sup>a</sup>	0,40±0,01	5,3	0,42±0,01	4,7	0,36±0,00	5,2
	90 <sup>b</sup>	85,9 <sup>a</sup>	0,37±0,01 <sup>**</sup>	13,8	0,36±0,00 <sup>**</sup>	19,9	0,31±0,00 <sup>**</sup>	17,2
	270 <sup>b</sup>	257,7 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>**</sup>	26,9	0,26±0,00 <sup>**</sup>	41,4	0,21±0,01 <sup>**</sup>	44,5
	810 <sup>b</sup>	773,1 <sup>a</sup>	0,19±0,04 <sup>**</sup>	55,5	0,15±0,03 <sup>**</sup>	67,3	0,10±0,03 <sup>**</sup>	72,8

Stopa rasta (RGR) parametara izraženi su kao srednja vrednost iz jednog eksperimenta (kontrola 6, tretmani 3 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

(b)	mg a.s./L		Prinos (0-7)					
			Y BJ		Y MSv		Y PJ	
			sr.vr. ± sd	I <sub>y</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>y</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>y</sub> (%)
<b>Klomazon</b>	0	0	33,7±2,9		0,07±0,01		2,51±0,24	
	3,3 <sup>b</sup>	3,0 <sup>a</sup>	34,4±1,0	-2,0	0,07±0,00	8,4	2,40±0,19	4,4
	10 <sup>b</sup>	8,2 <sup>a</sup>	32,6±3,9	3,3	0,05±0,01**	27,8	1,96±0,26**	21,8
	30 <sup>b</sup>	31,5 <sup>a</sup>	21,0±1,0**	37,7	0,03±0,00**	62,6	0,99±0,04**	60,4
	90 <sup>b</sup>	80,1 <sup>a</sup>	10,0±0,6**	70,5	0,01±0,00**	88,3	0,24±0,02**	90,4
	270 <sup>b</sup>	253,6 <sup>a</sup>	0,4±0,3**	98,7	0,00±0,00**	99,6	0,02±0,00**	99,1
	810 <sup>b</sup>	814,6 <sup>a</sup>	0,0±0,0**	100,0	0,00±0,00**	100,0	0,00±0,00**	100,0
<b>Rampa® EC</b>	0	0	26,5±2,6		0,06±0,01		1,94±0,20	
	3,3 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>	25,3±2,2	4,5	0,05±0,00**	21,4	1,67±0,15	13,5
	10 <sup>b</sup>	10,9 <sup>a</sup>	23,4±2,8	11,7	0,04±0,01**	35,2	1,37±0,15**	29,1
	30 <sup>b</sup>	32,8 <sup>a</sup>	13,5±1,1**	48,9	0,02±0,00**	74,5	0,47±0,05**	76,0
	90 <sup>b</sup>	98,3 <sup>a</sup>	0,7±0,1**	97,5	0,00±0,00**	99,5	0,00±0,00**	100,0
	270 <sup>b</sup>	294,9 <sup>a</sup>	0,0±0,0**	100,0	0,00±0,00**	100,0	0,00±0,00**	100,0
	810 <sup>b</sup>	884,8 <sup>a</sup>	0,0±0,0**	100,0	0,00±0,00**	100,0	0,00±0,00**	100,0
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	0	0	26,5±2,6		0,06±0,01		1,94±0,20	
	3,3 <sup>b</sup>	3,1 <sup>a</sup>	24,5±1,1	7,6	0,05±0,00	12,5	1,67±0,06	13,9
	10 <sup>b</sup>	9,5 <sup>a</sup>	24,4±2,7	7,7	0,05±0,01	13,0	1,71±0,27	11,4
	30 <sup>b</sup>	28,6 <sup>a</sup>	22,4±2,1	15,5	0,05±0,00**	24,5	1,53±0,10**	20,9
	90 <sup>b</sup>	85,9 <sup>a</sup>	17,1±1,9**	35,4	0,03±0,00**	51,9	1,09±0,12**	43,8
	270 <sup>b</sup>	257,7 <sup>a</sup>	11,1±0,8**	58,1	0,01±0,00**	77,4	0,49±0,05**	74,5
	810 <sup>b</sup>	773,1 <sup>a</sup>	4,0±1,5**	84,7	0,00±0,00**	93,1	0,14±0,05**	92,8

Prinos (Y) parametara izraženi su kao srednja vrednost iz jednog eksperimenta (kontrola 6, tretmani 3 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

**Tabela P3.** Sadržaj fotosintetskih pigmenata (mg/g) vrste *L. minor* nakon sedmodnevne izloženosti tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

	mg a.s./L		Hlorofil <i>a</i>		Hlorofil <i>b</i>		
			sr.vr. ± sd	I (%)	sr.vr. ± sd	I (%)	
<b>Klomazon</b>	0	0	0,314±0,015		0,611±0,015		
	3,3 <sup>b</sup>	3,0 <sup>a</sup>	0,320±0,011	-1,9	0,621±0,031	-1,7	
	10 <sup>b</sup>	8,2 <sup>a</sup>	0,316±0,003	-0,8	0,559±0,015**	8,6	
	30 <sup>b</sup>	31,5 <sup>a</sup>	0,285±0,007**	9,2	0,481±0,017**	21,2	
	90 <sup>b</sup>	80,1 <sup>a</sup>	0,263±0,007**	16,3	0,417±0,010**	31,7	
	270 <sup>b</sup>	253,6 <sup>a</sup>	0,147±0,003**	53,0	0,167±0,021**	72,6	
	810 <sup>b</sup>	814,6 <sup>a</sup>	0,000±0,000**	100,0	0,000±0,000**	100,0	
		EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>		216,1±4,5 (190,9-244,7)		118,4±4,6 (100,0-140,3)	
		NOEC		10 <sup>b</sup> (8,2 <sup>a</sup> )		3,3 <sup>b</sup> (3,0 <sup>a</sup> )	
		LOEC		30 <sup>b</sup> (31,5 <sup>a</sup> )		10 <sup>b</sup> (8,2 <sup>a</sup> )	
<b>Rampa<sup>®</sup> EC</b>	0	0	0,342±0,019		0,599±0,047		
	3,3 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>	0,353±0,030	-3,3	0,658±0,072	-10,0	
	10 <sup>b</sup>	10,9 <sup>a</sup>	0,315±0,010	7,8	0,510±0,005*	14,8	
	30 <sup>b</sup>	32,8 <sup>a</sup>	0,264±0,003**	22,9	0,398±0,005**	33,4	
	90 <sup>b</sup>	98,3 <sup>a</sup>	0,090±0,017**	73,7	0,053±0,039**	91,2	
	270 <sup>b</sup>	294,9 <sup>a</sup>	0,000±0,000**	100,0	0,000±0,000**	100,0	
	810 <sup>b</sup>	884,8 <sup>a</sup>	0,000±0,000**	100,0	0,000±0,000**	100,0	
		EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>		58,3±4,5 (52,3-65,0)		41,5±4,6 (35,0-49,3)	
		NOEC		10 <sup>b</sup> (10,9 <sup>a</sup> )		3,3 <sup>b</sup> (3,6 <sup>a</sup> )	
		LOEC		30 <sup>b</sup> (32,8 <sup>a</sup> )		10 <sup>b</sup> (10,9 <sup>a</sup> )	
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	0	0	0,342±0,019		0,599±0,047		
	3,3 <sup>b</sup>	3,1 <sup>a</sup>	0,355±0,018	-3,9	0,661±0,019	-10,4	
	10 <sup>b</sup>	9,5 <sup>a</sup>	0,351±0,003	-2,7	0,650±0,051	-8,5	
	30 <sup>b</sup>	28,6 <sup>a</sup>	0,340±0,011	0,7	0,558±0,022	6,8	
	90 <sup>b</sup>	85,9 <sup>a</sup>	0,320±0,008	6,5	0,514±0,009*	14,2	
	270 <sup>b</sup>	257,7 <sup>a</sup>	0,337±0,018	1,4	0,501±0,018**	16,4	
	810 <sup>b</sup>	773,1 <sup>a</sup>	0,344±0,007	-0,5	0,495±0,014**	17,4	
		EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>		∞		8350±16,5 (468,0-148994)	
		NOEC		-		30 <sup>b</sup> (28,6 <sup>a</sup> )	
		LOEC		-		90 <sup>b</sup> (85,9 <sup>a</sup> )	

Sadržaj pigmenata izražen je kao srednja vrednost iz jednog eksperimenta (kontrola 6, tretmani 3 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

### Prilog 3

**Tabela P4 (a, b, c).** Parametri rasta vrste *Myriophyllum aquaticum*. Prikazane su vrednosti a) stope rasta (RGR) i b) prinosa (Y) na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU) i sveže mase jedinki (MSv), i c) mase korena nakon sedmodnevnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

mg a.s./L		Stopa rasta (0-7)					
		RGR DS		RGR DU		RGR MSv	
		sr.vr. ± sd	I <sub>r</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>r</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>r</sub> (%)
<b>Klomazon</b>							
0	0	0,072±0,011		0,053±0,02		0,076±0,02	
3,3 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>	0,048±0,012 <sup>*</sup>	22,1	0,025±0,01 <sup>*</sup>	53,4	0,020±0,01 <sup>**</sup>	73,7
10 <sup>b</sup>	10,5 <sup>a</sup>	0,033±0,003 <sup>**</sup>	39,9	0,020±0,01 <sup>**</sup>	66,3	0,025±0,02 <sup>**</sup>	66,5
30 <sup>b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	0,020±0,012 <sup>**</sup>	62,6	0,016±0,01 <sup>**</sup>	70,2	0,036±0,02 <sup>*</sup>	52,2
90 <sup>b</sup>	83,9 <sup>a</sup>	0,016±0,005 <sup>**</sup>	76,3	0,002±0,00 <sup>**</sup>	95,6	0,024±0,02 <sup>**</sup>	68,6
270 <sup>b</sup>	246,4 <sup>a</sup>	0,005±0,003 <sup>**</sup>	93,0	0,005±0,01 <sup>**</sup>	91,2	0,020±0,01 <sup>**</sup>	73,7
810 <sup>b</sup>	740,0 <sup>a</sup>	0,005±0,006 <sup>**</sup>	93,6	0,001±0,00 <sup>**</sup>	97,9	0,013±0,01 <sup>**</sup>	82,5
<b>Rampa<sup>®</sup> EC</b>							
0	0	0,058±0,016		0,051±0,011		0,110±0,01	
3,3 <sup>b</sup>	3,7 <sup>a</sup>	0,044±0,015	24,4	0,037±0,005	26,2	0,090±0,01	18,0
10 <sup>b</sup>	11,2 <sup>a</sup>	0,026±0,001 <sup>**</sup>	55,4	0,026±0,012 <sup>**</sup>	48,9	0,082±0,01 <sup>**</sup>	25,5
30 <sup>b</sup>	33,6 <sup>a</sup>	0,003±0,003 <sup>**</sup>	94,3	0,002±0,003 <sup>**</sup>	96,1	0,078±0,02 <sup>*</sup>	28,6
90 <sup>b</sup>	100,9 <sup>a</sup>	0,000±0,000 <sup>**</sup>	100	0,004±0,004 <sup>**</sup>	91,5	0,070±0,01 <sup>**</sup>	36,5
270 <sup>b</sup>	302,7 <sup>a</sup>	0,001±0,001 <sup>**</sup>	98,8	0,000±0,000 <sup>**</sup>	100,0	0,072±0,01 <sup>**</sup>	34,9
810 <sup>b</sup>	908,2 <sup>a</sup>	0,006±0,008 <sup>**</sup>	97,6	0,002±0,000 <sup>**</sup>	95,6	0,061±0,01 <sup>**</sup>	44,6
<b>GAT Cenit 36 CS</b>							
0	0	0,060±0,013		0,039±0,013		0,079±0,011	
3,3 <sup>b</sup>	2,9 <sup>a</sup>	0,044±0,014	24,2	0,015±0,006 <sup>**</sup>	62,0	0,041±0,007 <sup>**</sup>	47,8
10 <sup>b</sup>	8,6 <sup>a</sup>	0,033±0,007 <sup>*</sup>	43,8	0,015±0,008 <sup>**</sup>	61,9	0,042±0,020 <sup>*</sup>	46,4
30 <sup>b</sup>	25,9 <sup>a</sup>	0,016±0,007 <sup>**</sup>	72,7	0,012±0,007 <sup>**</sup>	70,2	0,031±0,017 <sup>**</sup>	60,5
90 <sup>b</sup>	77,7 <sup>a</sup>	0,021±0,01 <sup>**</sup>	65,3	0,007±0,007 <sup>**</sup>	81,5	0,034±0,004 <sup>**</sup>	57,0
270 <sup>b</sup>	233,2 <sup>a</sup>	0,030±0,008 <sup>**</sup>	50,0	0,007±0,004 <sup>**</sup>	83,5	0,018±0,010 <sup>**</sup>	76,9
810 <sup>b</sup>	699,5 <sup>a</sup>	0,001±0,003 <sup>**</sup>	78,2	0,010±0,007 <sup>**</sup>	74,3	0,023±0,003 <sup>**</sup>	71,2

Stopa rasta (RGR) parametara izraženi su kao srednja vrednost iz jednog eksperimenta (kontrola 6, tretmani 3 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

<b>(b)</b>  <b>mg a.s./L</b>		<b>Prinos (0-7)</b>					
		<b>Y DS</b>		<b>Y DU</b>		<b>Y MSv</b>	
		sr.vr. ± sd	I <sub>y</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>y</sub> (%)	sr.vr. ± sd	I <sub>y</sub> (%)
<b>Klomazon</b>							
0	0	3,756±0,750		3,974±1,51		0,248±0,10	
3,3 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>	2,422±0,875**	35,5	1,690±0,41**	57,5	0,059±0,03*	76,2
10 <sup>b</sup>	10,5 <sup>a</sup>	1,778±0,139**	52,7	1,193±0,56**	70,0	0,085±0,08*	65,7
30 <sup>b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	1,133±0,458**	69,8	1,023±0,64**	74,3	0,116±0,06	53,3
90 <sup>b</sup>	83,9 <sup>a</sup>	0,689±0,102**	81,7	0,143±0,21**	96,4	0,08±0,05*	67,8
270 <sup>b</sup>	246,4 <sup>a</sup>	0,211±0,126**	94,4	0,288±0,33**	92,8	0,060±0,03*	75,9
810 <sup>b</sup>	740,0 <sup>a</sup>	0,167±0,208**	95,6	0,066±0,07**	98,4	0,039±0,03**	84,3
<b>Rampa® EC</b>							
0	0	2,655±0,765		3,283±0,88		0,397±0,03	
3,3 <sup>b</sup>	3,7 <sup>a</sup>	2,000±0,713	24,7	2,300±0,33	29,9	0,304±0,07	23,4
10 <sup>b</sup>	11,2 <sup>a</sup>	1,078±0,019**	59,4	1,545±0,80**	53,0	0,266±0,02**	33,1
30 <sup>b</sup>	33,6 <sup>a</sup>	0,111±0,096**	95,8	0,111±0,19**	96,6	0,254±0,09**	36,0
90 <sup>b</sup>	100,9 <sup>a</sup>	0,0±0,0**	100,0	0,306±0,28**	90,7	0,234±0,05**	41,1
270 <sup>b</sup>	302,7 <sup>a</sup>	0,022±0,038**	99,2	0,0±0,0**	100,0	0,228±0,05**	42,6
810 <sup>b</sup>	908,2 <sup>a</sup>	0,044±0,077**	98,3	0,122±0,02**	96,3	0,188±0,03**	52,8
<b>GAT Cenit 36 CS</b>							
0	0	2,317±0,438		2,461±0,932		0,252±0,044	
3,3 <sup>b</sup>	2,9 <sup>a</sup>	1,433±0,376**	38,1	0,839±0,347**	65,9	0,113±0,021**	55,1
10 <sup>b</sup>	8,6 <sup>a</sup>	1,078±0,184**	53,5	0,911±0,557*	63,0	0,123±0,066**	51,4
30 <sup>b</sup>	25,9 <sup>a</sup>	0,511±0,217**	77,9	0,661±0,435**	73,1	0,086±0,050**	65,8
90 <sup>b</sup>	77,7 <sup>a</sup>	0,622±0,287**	73,1	0,428±0,425**	82,6	0,105±0,018**	58,4
270 <sup>b</sup>	233,2 <sup>a</sup>	0,900±0,203**	61,2	0,361±0,184**	85,3	0,050±0,028**	80,3
810 <sup>b</sup>	699,5 <sup>a</sup>	0,422±0,283**	81,8	0,567±0,401**	77,0	0,061±0,006**	75,7

Stopa rasta (RGR) parametara izraženi su kao srednja vrednost iz jednog eksperimenta (kontrola 6, tretmani 3 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije



(c)	Masa korena (g)						
	mg a.s./L <sup>b</sup>	Klomazon		Rampa <sup>®</sup> EC		GAT Cenit 36 CS	
		sr.vr. ± sd	I (%)	sr.vr. ± sd	I (%)	sr.vr. ± sd	I (%)
0	0,010±0,003		0,004±0,001		0,006±0,001		
3,3	0,010±0,002	-2,8	0,006±0,003	-57,5	0,006±0,001	0,6	
10	0,010±0,003	-0,7	0,006±0,001	-68,8	0,004±0,001	27,8	
30	0,009±0,002	7,6	0,000±0,000**	100,0	0,005±0,001	21,8	
90	0,004±0,001*	55,6	0,000±0,000**	100,0	0,006±0,002	-2,1	
270	0,002±0,000**	85,1	0,000±0,000**	100,0	0,004±0,000	29,4	
810	0,000±0,000**	100,0	0,000±0,000**	100,0	0,000±0,000**	95,9	

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

**Tabela P5.** Sadržaj fotosintetskih pigmenata (mg/g) vrste *M. aquaticum* nakon sedmodnevne izloženosti tehničkoj supstanci kloromazon i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS

(a)	mg a.s./L		Hlorofil <i>a</i>		Hlorofil <i>b</i>	
			sr.vr. ± sd	I (%)	sr.vr. ± sd	I (%)
<b>Kloromazon</b>	0	0	0,5324±0,173		0,165±0,044	
	3,3 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>	0,516±0,170	3,0	0,151±0,056	8,1
	10 <sup>b</sup>	10,5 <sup>a</sup>	0,327±0,004	38,4	0,087±0,022	47,4
	30 <sup>b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	0,503±0,123	5,5	0,14±0,045	14,8
	90 <sup>b</sup>	83,9 <sup>a</sup>	0,355±0,160	33,2	0,103±0,057	37,5
	270 <sup>b</sup>	246,4 <sup>a</sup>	0,301±0,047	43,3	0,078±0,032	52,7
	810 <sup>b</sup>	740,0 <sup>a</sup>	0,170±0,054*	68,0	0,044±0,020*	73,5
		EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	296,7±7,6 (86,3-1021,0)		165,0±8,4 (38,6-705,0)	
		NOEC	270 <sup>b</sup> (246,4 <sup>a</sup> )		270 <sup>b</sup> (246,4 <sup>a</sup> )	
		LOEC	810 <sup>b</sup> (740 <sup>a</sup> )		810 <sup>b</sup> (740 <sup>a</sup> )	
<b>Rampa<sup>®</sup> EC</b>	0	0	0,188±0,038		0,316±0,060	
	3,3 <sup>b</sup>	3,7 <sup>a</sup>	0,220±0,049	-16,8	0,248±0,030	21,6
	10 <sup>b</sup>	11,2 <sup>a</sup>	0,154±0,006	18,3	0,183±0,065*	42,3
	30 <sup>b</sup>	33,6 <sup>a</sup>	0,166±0,026	11,7	0,184±0,078*	42,0
	90 <sup>b</sup>	100,9 <sup>a</sup>	0,120±0,012*	36,3	0,186±0,047*	41,2
	270 <sup>b</sup>	302,7 <sup>a</sup>	0,127±0,003*	32,6	0,195±0,015*	38,3
	810 <sup>b</sup>	908,2 <sup>a</sup>	0,128±0,019*	32,1	0,210±0,022*	33,6
		EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>				
		NOEC	30 <sup>b</sup> (33,6 <sup>a</sup> )		3,3 <sup>b</sup> (3,7 <sup>a</sup> )	
		LOEC	90 <sup>b</sup> (100,9 <sup>a</sup> )		10 <sup>b</sup> (11,2 <sup>a</sup> )	
<b>GAT Cenit 36 CS</b>	0	0	0,231±0,018		0,312±0,047	
	3,3 <sup>b</sup>	2,9 <sup>a</sup>	0,263±0,009	-13,6	0,469±0,019**	-50,3
	10 <sup>b</sup>	8,6 <sup>a</sup>	0,252±0,019	-8,9	0,351±0,051	-12,6
	30 <sup>b</sup>	25,9 <sup>a</sup>	0,221±0,030	4,6	0,294±0,022	5,8
	90 <sup>b</sup>	77,7 <sup>a</sup>	0,221±0,025	4,3	0,337±0,009	-8,0
	270 <sup>b</sup>	233,2 <sup>a</sup>	0,204±0,021	11,6	0,252±0,018	19,2
	810 <sup>b</sup>	699,5 <sup>a</sup>	0,242±0,018	-4,8	0,339±0,014	-8,7
		EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>				
		NOEC	-		-	
		LOEC	-		-	

Sadržaj pigmenata izražen je kao srednja vrednost iz jednog eksperimenta (kontrola 6, tretmani 3 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerene koncentracije

<sup>b</sup> Nominalne koncentracije

## Prilog 4

**Tabela P6.** Imobilizacija (%) jedinki *Daphnia magna* nakon 24- i 48-časovnog izlaganja tehničkoj supstanci i preparatima klomazona

mg a.s./L		Dužina izlaganja	
		24 h	48 h
		Imobilizacija (%) ± sd	Imobilizacija (%) ± sd
<b>Klomazon</b>			
0	0	0,0±0,0	0,0±0,0
10 <sup>b</sup>	10,2 <sup>a</sup>	0,0±0,0	6,0±9,7
20 <sup>b</sup>	18,0 <sup>a</sup>	2,0±6,3	4,0±12,6
30 <sup>b</sup>	28,2 <sup>a</sup>	0,0±0,0	4,0±8,9
40 <sup>b</sup>	38,4 <sup>a</sup>	0,0±0,0	4,0±8,9
50 <sup>b</sup>	48,7 <sup>a</sup>	2,0±6,3	50,0±21,6**
60 <sup>b</sup>	59,8 <sup>a</sup>	8,0±10,9	60,0±31,6**
80 <sup>b</sup>	78,0 <sup>a</sup>	6,0±13,5	86,0±18,9**
100 <sup>b</sup>	95,0 <sup>a</sup>	42,0±25,7**	98,0±6,3**
<b>Rampa<sup>®</sup> EC</b>			
0	0	1,5±5,5	7,7±15,4
0,010 <sup>b</sup>	0,013 <sup>a</sup>	1,3±5,2	8,0±26,0
0,030 <sup>b</sup>	0,039 <sup>a</sup>	1,3±5,2	6,7±20,9
0,10 <sup>b</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,0±0,0	4,0±8,3
0,30 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>	1,3±5,2	1,3±5,2
1,0 <sup>b</sup>	1,3 <sup>a</sup>	1,3±5,2	2,7±7,0
3,0 <sup>b</sup>	3,9 <sup>a</sup>	0,0±0,0	4,0±8,3
10 <sup>b</sup>	13 <sup>a</sup>	22,7±21,2**	90,7±12,8**
30 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>	66,7±26,9**	100,0±0,0**
<b>GAT Cenit 36 CS</b>			
0	0	0,0±0,0	0,0±0,0
0,5 <sup>b</sup>	0,5 <sup>a</sup>	1,3±5,2	8,0±26,0
1 <sup>b</sup>	1,1 <sup>a</sup>	0,0±0,0	0,0±0,0
2,5 <sup>b</sup>	2,6 <sup>a</sup>	0,0±0,0	0,0±0,0
5 <sup>b</sup>	5,3 <sup>a</sup>	0,0±0,0	0,0±0,0
10 <sup>b</sup>	10,6 <sup>a</sup>	0,0±0,0	0,0±0,0
25 <sup>b</sup>	26,5 <sup>a</sup>	0,0±0,0	0,0±0,0
50 <sup>b</sup>	53,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0	8,0±14,7*
100 <sup>b</sup>	105,9 <sup>a</sup>	0,0±0,0	24,0±33,1**

Imobilizacija (%) je izražena kao srednja vrednost iz dva (tehnička supstanca) ili tri (Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS) nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0,05), \*\* (p<0,01)

<sup>a</sup> Izmerena koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>b</sup> Nominalna koncentracija tehničke supstance klomazon

## Prilog 5

**Tabela P7.** Udeo toksičnog efekta (u %) praćen u različitim razvojnim stadijumima embriona *Danio rerio* tokom izloženosti a) tehničkoj supstanci klomazon i preparatima b) Rampa<sup>®</sup> EC i c) GAT Cenit 36 CS. Prerađeno iz Stevanovic et al., 2017

a) Vreme	Parametar	Kontrola	Koncentracija (mg a.s./L)					
			3,1 <sup>b</sup>	6,3 <sup>b</sup>	12,5 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
			3,4 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	13,4 <sup>a</sup>	26,8 <sup>a</sup>	53,5 <sup>a</sup>	107 <sup>a</sup>
22 hpf	smrtnost	0±0	0±0	2,5±4,3	1,7±1,4	15±6,6**	25,8±5,2**	83,3±8**
	nerazvijeni	0±0	0±0	0±0	0±0	8±6,9**	62,7±5,3**	95,8±7,2**
48 hpf	smrtnost	0±0	0±0	2,5±4,3	1,7±1,4	15,8±3,8**	28,3±5,2**	88,3±5,8**
	izvaljeni	18,3±8	4,2±7,2**	5,8±5,2*	16,2±8,3	0±0**	2,5±4,3**	0±0
72 hpf	smrtnost	0±0	0±0	6,7±11,5**	8,3±12,3**	15,8±3,8**	28,3±5,2**	99,2±1,4**
	izvaljeni	88,3±5,8	85±6,6	81,3±11,1*	96,1±3,4*	88,1±0,5	39,3±21,1**	0±0
96 hpf	smrtnost	0±0	0±0	6,7±11,5**	10,8±16,6**	15,8±5,2**	28,3±5,2**	100±0**
	izvaljeni	100±0	99,2±1,4	100±0	98,8±2,1	95,1±1,5*	77,9±10**	-
	edemi	0,8±1,4	0,8±1,4	4,4±1,1	3,6±6,2	28,6±10,9**	89,2±13,5**	-
120 hpf	smrtnost	0,8±0,6	0,8±1,4	6,7±11,5*	10,8±16,6**	17,5±5**	30±2,5**	100±0**
	izvaljeni	100±0	99,2±1,4	100±0	100±0	96±1,5	96,1±4	-
	HT <sub>50</sub> <sup>c</sup>	57	62,3**	64,7*	55,2	64,4**	77,4**	-
	edemi	1,7±3	3,3±3,8	1,9±1,7	5,6±7,6	48,4±3,2**	95,2±2,3**	-
	deformacije kičme	0,8±1,5	7,5±9*	1,9±1,7	2,9±0,6	24,2±10,7**	71,4±18,6**	-
	kraniofacijalne deformacije	1,7±1,5	12,7±6,8**	27,7±15,4**	48,9±11,2**	76,9±9**	96,4±3,7**	-
	nedostatak mehura	2,5±2,5	27,9±21,9**	23,5±7,3**	34,4±14**	97±0,2**	96,4±3,7**	-
deformacije vrha repa	0±0	0±0	0,8±1,4	0±0	2±3,5	14,4±6,8**	-	
	dužina (µm) <sup>d</sup>	3836 ±194	3862 ±168	3861 ±87	3803 ±185	3646 ±365**	3387 ±297**	-

Učestalost efekata (u %) smrtnosti i malformacija dobijene su iz dva nezavisna eksperimenta (60 embriona u svakom) i prikazani sa standardnom devijacijom.

<sup>a</sup> Izmerena koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>b</sup> Nominalna koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>c</sup> Srednje vreme izvaljivanja (HT<sub>50</sub>) izraženo je u časovima nakon oplodnje (hpf)

<sup>d</sup> Dužina embriona (µm) prikazana je kao srednja vrednost dužine i standardne devijacije iz dva nezavisna eksperimenta

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) i – nije utvrđeno zbog smrtnosti

b)	Vreme	Parametar	Kontrola	Koncentracija (mg a.s./L)					
				3.1 <sup>b</sup>	6.3 <sup>b</sup>	7.3 <sup>b</sup>	8.3 <sup>b</sup>	9.4 <sup>b</sup>	12.5 <sup>b</sup>
				3.9 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	10.5 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	15.7 <sup>a</sup>
22 hpf	smrtnost	0±0	0±0	1.7±2.9	0±0	0.8±1.4	4.2±3.8	67.5±2.5**	
	nerazvijeni	0±0	0±0	0±0	0±0	10±4.3**	50.9±20.3**	100±0**	
48 hpf	smrtnost	0±0	0±0	1.7±2.9	0±0	0.8±1.4	5±2.5*	68.3±3.8**	
	izvaljeni	1.7±1.5	1.7±1.4	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	
72 hpf	smrtnost	0±0	0±0	8.3±3.8**	32.5±4.3**	63.3±16.6**	77.5±4.3**	100±0**	
	izvaljeni	55±6.6	65.8±20.1	57.8±15.5	32.4±19*	32.8±11.8	0±0**	-	
96 hpf	smrtnost	0±0	0±0	10±2.5**	33.3±3.8**	63.3±16.6**	93.3±3.8**	100±0**	
	izvaljeni	100±0	99.2±1.4	95.4±3.1*	84.8±7**	62.2±13.1**	0±0**	-	
	edemi	0±0	1.6±0.6	6.4±1.5**	30.4±3.5**	53.4±1**	100±0**	-	
120 hpf	smrtnost	0±0	0±0	10±2.5**	35.8±5.8**	67.5±15.2**	99.2±1.4**	100±0**	
	izvaljeni	100±0	100±0	95.4±3.1*	92.6±9.8**	71.9±17.3**	0±0**	-	
	HT <sub>50</sub> <sup>c</sup>	71.2	68.3	70	79**	89.5**	-	-	
	edemi	1.7±1.4	0.8±1.4	16.6±7**	50.1±9.5**	64.6±27.3**	100±0*	-	
	deformacije kičme	0.8±1.4	0±0	0±0	10.3±4**	17.4±6.5**	100±0*	-	
	kraniofacijalne deformacije	14.2±6.3	22.5±6.6	47±14**	81.6±6.3**	90±10**	100±0	-	
	nedostatak mehura	1.7±1.4	0.8±1.4	12.9±3.9**	35.9±9.2**	45.2±13.4**	100±0*	-	
	deformacije vrha repa	0±0	0±0	0±0	5.2±2*	6.7±11.5	0±0	-	
	dužina (µm) <sup>d</sup>	3819 ±19	3800 ±105	3793 ±151	3709 ±250**	3697 ±327**	-	-	

Učestalost efekata (u %) smrtnosti i malformacija dobijene su iz dva nezavisna eksperimenta (60 embriona u svakom) i prikazani sa standardnom devijacijom.

<sup>a</sup> Izmerena koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>b</sup> Nominalna koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>c</sup> Srednje vreme izvaljivanja (HT<sub>50</sub>) izraženo je u časovima nakon oplodnje (hpf)

<sup>d</sup> Dužina embriona (µm) prikazana je kao srednja vrednost dužine i standardne devijacije iz dva nezavisna eksperimenta

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) i – nije utvrđeno zbog smrtnosti

c)			Koncentracija (mg a.s./L)			
Vreme	Parametar	Kontrola	25 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
			24.3 <sup>a</sup>	49.5 <sup>a</sup>	72.8 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
22 hpf	smrtnost	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
	nerazvijeni	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
48 hpf	smrtnost	1.7±0.6	0±0	0±0	0±0	0±0
	izvaljeni	11.9±7.9	2.5±2.5**	0±0**	0±0**	0±0**
72 hpf	smrtnost	1.7±0.6	0±0	0±0	0±0	0±0
	izvaljeni	82.2±11	63.3±16.1**	45±6.6**	20.8±10.4**	2.5±2.5**
96 hpf	smrtnost	1.7±0.6	0±0	0±0	5±4.3	30±15.6**
	izvaljeni	100±0	100±0	100±0	79.9±4.9**	44.2±22.8**
	edemi	0±0	2.5±4.3	0±0	41.1±5**	100±0**
120 hpf	smrtnost	1.7±0.6	0±0	0±0	7.5±5	65±22.9**
	izvaljeni	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
	HT <sub>50</sub> <sup>c</sup>	60.4	69.3**	72.3**	82.6**	92.9**
	edemi	0±0	8.3±8.8**	79.2±8**	96.3±1.8**	100±0**
	deformacije kičme	0±0	0.8±1.4	0±0	15.3±1**	61.9±16.9**
	kraniofacijalne deformacije	6.8±3	19.2±8.8**	36.7±9.5**	97.3±0.1**	100±0**
	nedostatak mehura	1.7±2.9	52.5±17.3**	100±0**	100±0**	100±0**
	deformatcije vrha repa	0±0	2.5±2.5	0±0	0.9±1.5	0±0
	dužina (µm) <sup>d</sup>	3813 ±188.9	3743 ±211	3725 ±133**	3534 ±148**	3346 ±127**

Učestalost efekata (u %) smrtnosti i malformacija dobijene su iz dva nezavisna eksperimenta (60 embriona u svakom) i prikazani sa standardnom devijacijom.

<sup>a</sup> Izmerena koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>b</sup> Nominalna koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>c</sup> Srednje vreme izvaljivanja (HT<sub>50</sub>) izraženo je u časovima nakon oplodnje (hpf)

<sup>d</sup> Dužina embriona (µm) prikazana je kao srednja vrednost dužine i standardne devijacije iz dva nezavisna eksperimenta

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) i – nije utvrđeno zbog smrtnosti

## Prilog 6

**Tabela P8.** Udeo toksičnog efekta (u %) praćen u različitim razvojnim stadijumima embriona *Xenopus laevis* tokom izloženosti a) tehničkoj supstanci klomazon i preparatima b) Rampa<sup>®</sup> EC i c) GAT Cenit 36 CS.

a) Vreme	Parametar	Kontrola	Koncentracija (mg a.s./L)					
			25 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
			25,2 <sup>a</sup>	35,3 <sup>a</sup>	45,3 <sup>a</sup>	60,5 <sup>a</sup>	75,6 <sup>a</sup>	100,8 <sup>a</sup>
24 hpf	smrtnost	0,0±0,0	2,0±2,0*	10,7±8,3**	6,8±4,5**	9,6±10,5**	14,1±2,9**	10,5±5,2**
48 hpf	smrtnost	0,3±0,5	2,0±2,0	12,0±10,6**	11,0±2,7**	12,3±8,4**	22,5±3,1**	46,9±0,1**
72 hpf	smrtnost	0,6±0,5	2,0±2,0	12,0±10,6**	11,0±2,7**	12,3±8,4**	28,2±9,5**	95,1±4,3**
	<u>edemi</u> višestruki	0,0±0,0	1,4±2,4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,9±3,2	0,0±0,0
	kardijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	3,5±6,1	1,5±2,6	7,9±2,9**	8,9±11,2**	50,0±0,0*
	abdominalni	0,0±0,0	0,0±0,0	2,8±4,8	1,7±2,9	1,6±2,7	0,0±0,0	0,0±0,0
	facijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	okularni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
96 hpf	smrtnost	0,6±0,5	2,0±2,0	12,0±10,6**	11,0±2,7**	12,3±8,4**	28,2±9,5**	95,1±4,3**
	<u>edemi</u> višestruki	0,2±0,4	1,4±2,4	6,0±2,3*	50,0±26,2**	98,3±3,0**	100,0±0,0**	100,0±0,0**
	kardijalni	0,7±1,8	9,8±2,8**	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	abdominalni	0,0±0,0	0,0±0,0	1,5±2,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	facijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	okularni	0,0±0,0	0,0±0,0	4,6±0,6*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	deformacije kičme	0,8±1,9	8,1±8,0**	23,7±7,4**	54,3±9,3**	68,7±19,8**	54,0±9,7**	100,0±0,0**
	deformacije repa	0,8±1,9	0,0±0,0	1,4±2,4	0,0±0,0	4,4±4,2	3,7±6,4	0,0±0,0
	deformacije peraja	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	facijalne deformacije	1,5±2,4	1,4±2,4	7,4±1,9*	37,6±19,6**	98,3±3,0**	87,6±11,1**	100,0±0,0**
	okularne deformacije	0,8±1,9	0,0±0,0	4,6±0,6	14,1±5,7**	18,0±11,1**	1,8±3,0	0,0±0,0
	plihovi	0,0±0,0	1,5±2,5	3,1±2,8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	deformacije digestivnog trakta	0,8±1,9	1,4±2,4	4,6±0,6	31,0±14,1**	24,3±15,0**	12,0±2,0**	0,0±0,0
	dužina (µm) <sup>d</sup>	8947±332	9314±487**	9053±613*	8929±433	8758±561	8593±410**	8017±235**

b)			Koncentracija (mg a.s./L)					
Vreme	Parametar	Kontrola	12,5 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	38 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>
			14,5 <sup>a</sup>	20,8 <sup>a</sup>	28,9 <sup>a</sup>	34,7 <sup>a</sup>	44,0 <sup>a</sup>	57,9 <sup>a</sup>
24 hpf	smrtnost	0,0±0,0	5,7±2,3**	2,9±3,2**	4,0±4,0**	6,8±2,5**	2,7±2,3*	19,4±13,4**
48 hpf	smrtnost	0,3±0,5	5,7±2,3**	4,3±4,2**	9,3±6,5**	13,7±10,0**	63,0±31,8**	100,0±0,0**
72 hpf	smrtnost	0,6±0,5	7,1±2,7**	5,7±4,8**	9,3±6,5**	23,3±7,2**	75,3±24,0**	100,0±0,0**
	<u>edemi</u> višestruki	0,0±0,0	4,5±7,9*	3,2±5,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
	kardijalni	0,0±0,0	13,5±8,6**	6,3±7,3**	13,1±8,0**	15,5±8,0**	16,7±23,6**	-
	abdominalni	0,0±0,0	1,6±2,7	1,8±3,0	4,6±4,4*	1,6±2,7	0,0±0,0	-
	facijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
	okularni	0,0±0,0	1,6±2,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
96 hpf	smrtnost	0,6±0,5	7,1±2,7**	5,7±4,8**	10,7±8,9**	27,4±3,2**	79,5±22,3**	100,0±0,0**
	<u>edemi</u> višestruki	0,2±0,4	0,7±4,8	3,2±2,8	4,4±4,1	41,9±9,4**	83,0±11,3**	-
	kardijalni	0,7±1,8	3,0±5,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±17,7	-
	abdominalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,8±3,0	0,0±0,0	-
	facijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
	okularni	0,0±0,0	1,5±2,5	1,8±3,0	20,4±6,6**	3,9±3,4	0,0±0,0	-
	deformacije kičme	0,8±1,9	3,1±2,7	3,4±2,9	13,6±16,6**	86,8±3,0**	62,5±53,0**	-
	deformacije repa	0,8±1,9	3,1±2,7	0,0±0,0	1,5±2,5	2,1±3,6	9,1±12,9*	-
	deformacije peraja	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-
	facijalne deformacije	1,5±2,6	1,5±2,6	3,2±2,8	2,8±2,4	36,2±14,5**	100,0±0,0**	-
	okularne deformacije	0,8±1,9	3,1±2,7	3,2±2,8	1,3±2,3	14,6±17,0**	9,1±12,9**	-
	plihovi	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±17,7	-
	deformacije digestivnog trakta	0,8±1,9	3,1±2,7	1,6±2,8	1,5±2,5	22,2±8,4**	36,4±51,4**	-
	dužina (µm) <sup>d</sup>	8947±332	9292±484**	9136±431*	8648±628**	8228±426**	7318±857**	-



c)			Koncentracija (mg a.s./L)					
Vreme	Parametar	Kontrola	3,1 <sup>b</sup>	6,3 <sup>b</sup>	12,5 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
			3,2 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>	25,4 <sup>a</sup>	50,9 <sup>a</sup>	101,7 <sup>a</sup>
24 hpf	smrtnost	0,0±0,0	4,1±0,1**	2,0±3,5*	2,0±2,0*	1,4±1,2	0,7±1,2	2,9±3,9**
48 hpf	smrtnost	0,3±0,5	4,1±0,1**	2,7±4,7*	2,7±2,3*	2,7±3,1*	2,0±2,0	7,3±6,8**
72 hpf	smrtnost	0,6±0,5	4,1±0,1**	2,7±4,7*	2,7±2,3	2,7±3,1	2,7±2,4	7,3±6,8**
	<u>edemi</u> višestruki	0,0±0,0	1,4±2,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	3,0±2,6
	kardijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	4,4±0,3*	0,0±0,0	2,9±5,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	abdominalni	0,0±0,0	1,5±2,6	0,0±0,0	4,1±4,0	1,4±2,5	1,4±2,5	0,0±0,0
	facijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	okularni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
96 hpf	smrtnost	0,6±0,5	4,1±0,1**	2,7±4,7*	2,7±2,3	2,7±3,1	2,7±2,4	7,3±6,8**
	<u>edemi</u> višestruki	0,2±0,4	2,9±2,5	3,0±2,6	0,0±0,0	2,9±5,0	1,5±2,5	1,3±2,3
	kardijalni	0,7±1,8	0,0±0,0	0,0±0,0	1,5±2,5	0,0±0,0	1,5±2,5	0,0±0,0
	abdominalni	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	facijalni	0,0±0,0	0,0±0,0	1,4±2,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	okularni	0,0±0,0	0,0±0,0	2,8±4,8	0,0±0,0	1,5±2,5	0,0±0,0	0,0±0,0
	deformacije kičme	0,8±1,9	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,4±2,4	3,0±5,3	41,3±3,3**
	deformacije repa	0,8±1,9	3,0±5,3	3,0±2,6	1,3±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	deformacije peraja	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	facijalne deformacije	1,5±2,4	2,9±2,5	4,4±0,3	0,0±0,0	2,8±2,5	1,5±2,5	1,3±2,3
	okularne deformacije	0,8±1,9	0,0±0,0	1,6±2,8	0,0±0,0	0,0±0,0	1,5±2,5	1,3±2,3
	plihovi	0,0±0,0	1,5±2,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	deformacije digestivnog trakta	0,8±1,9	4,4±0,1	4,4±4,2	0,0±0,0	1,5±2,5	1,5±2,5	1,3±2,3
	dužina (µm) <sup>d</sup>	8947±332	9237±395**	9253±453**	9347±479**	9555±495**	9617±401**	9672±391**

Učestalost efekata (u %) smrtnosti i malformacija dobijene su iz jednog eksperimenta (150 embriona u kontroli i 75 u tretmanima) i prikazani sa standardnom devijacijom.

<sup>a</sup> Izmerena koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>b</sup> Nominalna koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>c</sup> Dužina embriona (µm) prikazana je kao srednja vrednost dužine i standardne devijacije iz dva nezavisna eksperimenta

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu - \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) i – nije utvrđeno zbog smrtnosti

## Prilog 7

**Tabela P9.** Inhibicija viabiliteta ćelija RTgill-W1 nakon izlaganja tehničkoj supstanci klomazon i preparatima Rampa<sup>®</sup> EC i GAT Cenit 36 CS. Viabilitet ćelija meren je na osnovu indikator boja Alamar Blue (metabolička aktivnost), CFDA-AM (integritet ćelijske membrane) i Neutral Red (narušavanje lizozoma), a rezultati su prikazani kao % smanjenja očitavane fluorescencije tretmana, u odnosu na kontrolu

mg a.s./L		Metabolička aktivnost	Integritet ćelijske membrane	Narušavanje lizozoma
<b>Klomazon</b>				
23,2 <sup>b</sup>	23,8 <sup>a</sup>	3,5±11,8	-6,7±10,3	3,0±14,1
32,5 <sup>b</sup>	33,3 <sup>a</sup>	6,8±9,6	-7,7±13,2	-2,1±15,3
45,6 <sup>b</sup>	46,6 <sup>a</sup>	17,3±8,4	-6,2±12,8	-0,6±19,0
63,8 <sup>b</sup>	65,3 <sup>a</sup>	36,7±4,7	-2,3±11,5	19,9±7,9
89,3 <sup>b</sup>	91,4 <sup>a</sup>	60,3±5,4	16,0±8,6	49,5±9,0
125 <sup>b</sup>	127,9 <sup>a</sup>	75,4±3,6	44,0±6,4	67,5±7,9
<b>Rampa<sup>®</sup> EC</b>				
2,2 <sup>b</sup>	2,7 <sup>a</sup>	16,2±4,2	12,2±28,1	18,5±41,7
2,8 <sup>b</sup>	3,5 <sup>a</sup>	21,4±8,0	10,8±28,9	22,9±40,9
3,6 <sup>b</sup>	4,6 <sup>a</sup>	27,4±10,6	12,8±28,6	35,8±44,1
4,7 <sup>b</sup>	6,0 <sup>a</sup>	27,4±10,6	17,1±27,9	45,7±37,2
6,2 <sup>b</sup>	7,8 <sup>a</sup>	60,5±23,4	39,1±34,8	69,4±30,4
8 <sup>b</sup>	10,1 <sup>a</sup>	85,8±5,6	66,2±15,0	88,5±19,3
<b>GAT Cenit 36 CS</b>				
3,1 <sup>b</sup>	3,1 <sup>a</sup>	-10,8±16,6	-9,6±13,3	-12,8±29,3
6,3 <sup>b</sup>	6,3 <sup>a</sup>	-13,7±16,6	-12,3±14,0	-15,4±41,6
12,5 <sup>b</sup>	12,6 <sup>a</sup>	-13,7±19,6	-13,3±16,4	-19,1±12,0
25 <sup>b</sup>	25,1 <sup>a</sup>	-17,5±20,1	-16,5±15,8	-32,8±25,7
50 <sup>b</sup>	50,2 <sup>a</sup>	-15,8±19,2	-16,0±16,7	-26,6±25,7
100 <sup>b</sup>	100,4 <sup>a</sup>	16,5±22,0	-16,0±17,9	-39,6±43,4

Inhibicija viabiliteta izražena je kao srednja vrednost iz tri eksperimenta (kontrola i tretmani 6 ponavljanja) sa standardnom devijacijom

<sup>a</sup> Izmerena koncentracija tehničke supstance klomazon

<sup>b</sup> Nominalna koncentracija tehničke supstance klomazon

## Prilog 8

### FOCUS Surface water Tool for Exposure Predictions Step 1

developed by Michael Klein

Program version: Version 3.2  
 Date of this simulation: 17.11.2016, 9:33:31  
 OVERVIEW ON THE SUBSTANCE SPECIFIC INPUT DATA USED IN THE CALCULATION  
*Comments: Soybean, spring, 1 app/season, soil incorporation*  
 Active substance: Klomazon  
 Application rate (g/ha) of a.i.: 270,00  
 Application/crop type: no drift (incorp or seed  
 trtmt)  
 Number of applications per season: 1,00  
 Water solubility (mg/L): 1100,00  
 KOC compound(L/kg): 286,00  
 DT50 water/sediment (d): 52,00

#### SCENARIO DATA USED IN THE CALCULATION

Distance to the water body (m): 1,00  
 Spraydrift (% of application): 0,0000  
 Runoff + drainage(% of application): 10,00  
 Ratio of field to water body: 10,00  
 Water depth (cm): 30,00  
 Sediment depth (cm): 5,00  
 Effective sediment depth for sorption (cm): 1,00  
 Sediment OC (%): 5,00  
 Sed. bulk density (kg/L): 0,80

#### RESULTS OF THE CALCULATION

Equivalent app. rate for drift (g/ha): 270,00  
 Equivalent app. rate for runoff/drainage(g/ha): 270,00  
 Equivalent app. rate for runoff/drainage(g/ha) of parent: 0,00E+00  
 Loading to water body via drift (mg/m<sup>2</sup>): 0,0000  
 Loading to water body via runoff/drainage(mg/m<sup>2</sup>): 27,0000  
 fraction of substance entering water body in water phase: 0,7239  
 fraction of substance entering water body in sediment phase: 0,2761

Table: Calculated Concentrations in the water body

Time (d)	PEC <sub>sw</sub> (µg/L)		PEC <sub>sed</sub> (µg/kg dry sediment)	
	Actual	TWA	Actual	TWA
0	65,1544		186,3417	
1	64,2917	64,7231	183,8743	185,1080
2	63,4404	64,2941	181,4396	183,8811
4	61,7715	63,4482	176,6664	181,4617
7	59,3500	62,2072	169,7410	177,9127
14	54,0627	59,4362	154,6192	169,9876
21	49,2464	56,8298	140,8446	162,5334
28	44,8591	54,3770	128,2971	155,5183
42	37,2224	49,8921	106,4561	142,6913
50	33,4574	47,5584	95,6881	136,0169
100	17,1807	35,9900	49,1367	102,9314

## Prilog 9

### FOCUS Surface water Tool for Exposure Predictions Step 2

developed by Michael Klein

Program version: Version 3.2  
Date of this simulation: 17.11.2016, 9:32:59

#### OVERVIEW ON THE SUBSTANCE SPECIFIC INPUT DATA USED IN THE CALCULATION

*Comments: Soybean, spring, 1 app/season, soil incorporation*

Active substance:	Klomazon
Application rate (g/ha) of a.i.:	270,00
Crop Interception:	no interception (0 %)
Application/crop type:	no drift (incorp or seed trtmt)
Number of applications per season:	1
Region and season of application:	South Europe, Mar. - May
Water solubility (mg/L):	1100,00
KOC assessed compound(L/kg):	286,00
KOC parent compound(L/kg):	0,00E+00
DT50 water(d):	52,00
DT50 sediment (d):	1000,00
DT50 soil (d):	167,00

#### SCENARIO DATA USED IN THE CALCULATION

Distance to the water body (m):	1,00
Spraydrift (% of application):	0,0000
Runoff + drainage(% of application):	4,00
Ratio of field to water body:	10,00
Water depth (cm):	30,00
Sediment depth (cm):	5,00
Effective sediment depth for sorption (cm):	1,00
Sediment OC (%):	5,00
Sed. bulk density (kg/L):	0,80

#### RESULTS OF THE CALCULATION

Number of application per season considered for this run:	1
Equivalent application rate for drift (g/ha):	270,00
Equivalent application rate for runoff/drainage(g/ha):	270,00
Loading to water body per drift event(mg/m2):	0,0000
Loading to water body via runoff/drainage (mg/m2):	10,6222
fraction of substance entering water body in water phase:	0,7239
fraction of substance entering water body in sediment:	0,2761
Total Loading to water body via drift (mg/m2):	0,0000 ( 0,0000%)
Total Loading to water body via water phase(mg/m2):	7,6898 ( 72,3938%)
Total Loading to water body via sediment phase (mg/m2):	2,9324 ( 27,6062%)
Maximum PECSW (µg/L):	25,6327
Maximum PECSW occurring on day:	4
Maximum PECsed (µg/kg dry sediment):	73,3094
Maximum PECsed occurring on day:	4

Table: Calculated Concentrations in the water body

Time after max. peak(d)	PEC <sub>sw</sub> (µg/L)		PEC <sub>sed</sub> (µg/kg dry sediment)	
	Actual	TWA	Actual	TWA
0	25,6327	---	73,3094	---
1	25,2933	25,4630	73,2586	73,2840
2	25,0460	25,3163	72,5424	73,0923
4	24,5586	25,0590	71,1308	72,4635
7	23,8453	24,6910	69,0647	71,4477
14	22,2604	23,8675	64,4743	69,0957
21	20,7809	23,0824	60,1890	66,8330
28	19,3996	22,3324	56,1886	64,6664
42	16,9065	20,9299	48,9676	60,6095
50	15,6285	20,1826	45,2660	58,4468
100	9,5624	16,2654	27,6961	47,1059

## Prilog 10

### Summary report: Soybeans\_R3\_Stream

TOXSWA GUI version : FOCUS\_TOXSWA 4.4.3 [3.1.0]  
SPIN version : SPIN (Substances Plug IN) 2.2  
Report generated on : 23-11-2017 13:17:41

```
-----
* TOXSWA REPORT: Header
* Results from the TOXSWA model (c) Alterra
* FOCUS TOXSWA version : 4
* TOXSWA model version : 3.3.4
* TOXSWA created on : 02-Apr-2015
*
* Working directory : D:\SwashProjects\project_C1123\TOXSWA
* Run ID : 94
* Input file generated on : 23-11-2017
-----
```

```
*
* Scenario : R3_Stream
* Meteo Station : Bologna
* Substance : C1123
* Flow Type : Variable
* Water Body Type : R3_STREAM
* Application Scheme : FOCUS_EXAMPLE
* Simulation Period : 01-Mar-1980 to 28-Feb-1981
-----
```

```
*
* End of TOXSWA REPORT: Header
* -----
```

```
* -----
* TOXSWA REPORT: Substance properties and substance loadings
```

```
* Summary for the following substances
```

```
*
* Substance 1: C1123
* Molar mass (g.mol-1) : 239.7
* Saturated vapour pressure (Pa) : 0.192E-01 measured at (C) : 20.0
* Water solubility (mg.L-1) : 0.110E+04 measured at (C) : 20.0
* Half-life in water (d) : 52.53 measured at (C) : 20.0
* Half-life in sediment (d) : 1000.00 measured at (C) : 20.0
* Kom susp.solids (coef. for sorption on organic matter) (L.kg-1) : 162.41
* Freundlich exponent (-) : 0.88
* Kom sediment (coef. for sorption on organic matter) (L.kg-1) : 162.41
* Freundlich exponent (-) : 0.88
* Kmp (coef. for sorption on macrophytes-dry weight) (L.kg-1) : 0.00
*
*
* Summary for the substance loadings
```

```
* Application pattern and deposition by drift on water surface
```

```
* Appl.No Date/Hour Mass (g ai.ha-1) Areic mean deposition (mg.m-2)
* 1 26-Apr-1980-09h00 270.0000 0.4020
```

```
* Lateral entries: runoff and erosion Simulated by: PRZM
```

```
* Maximum hourly fluxes from lateral entries
```

```
* Year Type Water/Substance Flux Date
1980 Water 1.149 mm.m-2.hr-1 27-Nov-1980-00h00
1980 Runoff C1123 0.001928 mg.m-2.hr-1 05-May-1980-01h00
1980 Runoff C1123 9239616.6 ug.L-1 05-May-1980-04h00
1980 Erosion C1123 0.000040 mg.m-2.hr-1 05-May-1980-01h00
```

1981		Water		0.04284	mm.m-2.hr-1	11-Feb-1981-00h00
1981	Runoff		C1123	< 1e-6	mg.m-2.hr-1	11-Feb-1981-01h00
1981	Runoff		C1123	318.3	ug.L-1	11-Feb-1981-04h00
1981	Erosion		C1123	< 1e-6	mg.m-2.hr-1	11-Feb-1981-01h00

\* End of TOXSWA REPORT: Substance properties and  
substance loadings \*-----

\* -----  
\* TOXSWA REPORT: Exposure in Waterbody

\* Table: Annual maximum exposure concentrations in water layer of substance: C1123  
\* In segment from 95.00 to 100.00 m in water body

* Year	Concentration	Date	Daynr
	ug.L-1		
1980	6.730	05-May-1980-02h00	66
1981	0.000012	01-Jan-1981-21h00	307

\* Tables: Maximum exposure concentrations in water layer  
\* In segment from 95.00 to 100.00 m in water body  
\* Actual concentrations PECsw as well as PECsed refer to momentary concentrations  
\* occurring 1, 2 etc days after the global maximum concentration.  
\* The Time Weighted Average Exposure Concentrations (TWAEC) have been calculated  
\* for a moving time frame and have been allocated to the last day of the period  
considered

\* Table: PEC in water layer of substance: C1123

	Concentration	Date	Daynr
	ug.L-1		
Global max	6.730	05-May-1980-02h00	66
(incl. suspend.solid	6.733	05-May-1980-02h00	66)
PECsw 1 day	0.03494	06-May-1980-02h00	67
PECsw 2 days	0.007638	07-May-1980-02h00	68
PECsw 4 days	0.002208	09-May-1980-02h00	70
PECsw 7 days	0.000921	12-May-1980-02h00	73
PECsw 14 days	0.002246	19-May-1980-02h00	80
PECsw 21 days	0.001668	26-May-1980-02h00	87
PECsw 28 days	0.000649	02-Jun-1980-02h00	94
PECsw 42 days	0.2727	16-Jun-1980-02h00	108
PECsw 50 days	0.000263	24-Jun-1980-02h00	116
PECsw 100 days	0.000072	13-Aug-1980-02h00	166

\* Legend: - in table means PECsw is later than end of simulated period: 28-Feb-1981

\* Table: Maximum Time Weighted Averaged Exposure Concentrations substance: C1123

	Concentration µg.L-1	Date	Daynr
TWAECSw_1_day	2.748	06-May-1980-00h00	67
TWAECSw_2_days	1.383	07-May-1980-00h00	68
TWAECSw_4_days	0.6935	09-May-1980-00h00	70
TWAECSw_7_days	0.3969	12-May-1980-00h00	73
TWAECSw_14_days	0.3063	19-May-1980-00h00	80
TWAECSw_21_days	0.2403	26-May-1980-00h00	87
TWAECSw_28_days	0.1986	24-May-1980-09h00	85
TWAECSw_42_days	0.1389	07-Jun-1980-09h00	99
TWAECSw_50_days	0.1168	15-Jun-1980-09h00	107
TWAECSw_100_days	0.06307	04-Aug-1980-09h00	157

\* Tables: Maximum exposure content in sediment

\* In the top 5.00 cmsediment located under  
 \* the water body segment from 95.00 to 100.00m,  
 \* the content is expressed as µg substance per kg dry sediment.

\* Table: PEC in sediment of substance: C1123

	Content µg.kg-1	Date	Daynr
Global max	1.603	05-May-1980-13h00	66
PECsed_1_day	0.9545	06-May-1980-13h00	67
PECsed_2_days	0.7270	07-May-1980-13h00	68
PECsed_4_days	0.5541	09-May-1980-13h00	70
PECsed_7_days	0.4459	12-May-1980-13h00	73
PECsed_14_days	0.5999	19-May-1980-13h00	80
PECsed_21_days	0.5803	26-May-1980-13h00	87
PECsed_28_days	0.4856	02-Jun-1980-13h00	94
PECsed_42_days	0.4623	16-Jun-1980-13h00	108
PECsed_50_days	0.3686	24-Jun-1980-13h00	116
PECsed_100_days	0.2538	13-Aug-1980-13h00	166

\* Legend: - in table means PECsed is later than end of simulated period: 28-Feb-1981

\* Table: Maximum Time Weighted Averaged Exposure Content substance: C1123

	Content µg.kg-1	Date	Daynr
TWAECSed_1_day	1.364	06-May-1980-06h00	67
TWAECSed_2_days	1.138	07-May-1980-04h00	68
TWAECSed_4_days	0.9004	09-May-1980-03h00	70
TWAECSed_7_days	0.7327	12-May-1980-03h00	73
TWAECSed_14_days	0.6782	19-May-1980-04h00	80
TWAECSed_21_days	0.6573	26-May-1980-03h00	87
TWAECSed_28_days	0.6347	02-Jun-1980-03h00	94
TWAECSed_42_days	0.5643	16-Jun-1980-02h00	108
TWAECSed_50_days	0.5400	24-Jun-1980-02h00	116
TWAECSed_100_days	0.4256	13-Aug-1980-02h00	166



# Summary report: Soybeans\_R4\_Stream

TOXSWA GUI version : FOCUS\_TOXSWA 4.4.3 [3.1.0]  
SPIN version : SPIN (Substances Plug IN) 2.2  
Report generated on : 23-11-2017 13:18:35

-----  
\* TOXSWA REPORT: Header  
\* Results from the TOXSWA model (c) Alterra  
\* FOCUS TOXSWA version : 4  
\* TOXSWA model version : 3.3.4  
\* TOXSWA created on : 02-Apr-2015  
\*  
\* Working directory : D:\SwashProjects\project\_C1123\TOXSWA  
\* Run ID : 95  
\* Input file generated on : 23-11-2017  
-----

\*  
\* Scenario : R4\_Stream  
\* Meteo Station : Roujan  
\* Substance : C1123  
\* Flow Type : Variable  
\* Water Body Type : R4 STREAM  
\* Application Scheme : FOCUS EXAMPLE  
\* Simulation Period : 01-Oct-1979 to 30-Sep-1980  
-----

\* End of TOXSWA REPORT: Header  
\* -----

\* -----  
\* TOXSWA REPORT: Substance properties and substance loadings

\* Summary for the following substances

\* Substance 1: C1123  
\* Molar mass (g.mol-1) : 239.7  
\* Saturated vapour pressure (Pa) : 0.192E-01 measured at (C) : 20.0  
\* Water solubility (mg.L-1) : 0.110E+04 measured at (C) : 20.0  
\* Half-life in water (d) : 52.53 measured at (C) : 20.0  
\* Half-life in sediment (d) : 1000.00 measured at (C) : 20.0  
\* Kom susp.solids (coef. for sorption on organic matter) (L.kg-1) : 162.41  
\* Freundlich exponent (-) : 0.88  
\* Kom sediment (coef. for sorption on organic matter) (L.kg-1) : 162.41  
\* Freundlich exponent (-) : 0.88  
\* Kmp (coef. for sorption on macrophytes-dry weight) (L.kg-1) : 0.00

\* Summary for the substance loadings

\* Application pattern and deposition by drift on water surface

Appl.No	Date/Hour	Mass (g ai.ha-1)	Areic mean deposition (mg.m-2)
1	02-Mar-1980-09h00	270.0000	0.4020

\* Lateral entries: runoff and erosion Simulated by: PRZM

\* Maximum hourly fluxes from lateral entries

Year	Type	Water/Substance	Flux		Date
1979		Water	1.629	mm.m-2.hr-1	04-Oct-1979-00h00
1979	Runoff	C1123	0.000003	mg.m-2.hr-1	04-Oct-1979-01h00
1979	Runoff	C1123	536.0	ug.L-1	05-Oct-1979-00h00
1979	Erosion	C1123	< 1e-6	mg.m-2.hr-1	04-Oct-1979-01h00
1980		Water	0.6354	mm.m-2.hr-1	15-Apr-1980-00h00
1980	Runoff	C1123	0.008071	mg.m-2.hr-1	19-Mar-1980-01h00
1980	Runoff	C1123	12805465.0	ug.L-1	19-Mar-1980-14h00
1980	Erosion	C1123	0.000007	mg.m-2.hr-1	19-Mar-1980-01h00

\* End of TOXSWA REPORT: Substance properties and  
 substance loadings \*-----  
 -----

\* -----

\* TOXSWA REPORT: Exposure in Waterbody

\* Table: Annual maximum exposure concentrations in water layer of substance: C1123

\* In segment from 95.00 to 100.00 m in water body

* Year	Concentration	Date	Daynr
	µg.L-1		
1979	0.000414	05-Oct-1979-00h00	5
1980	5.719	19-Mar-1980-14h00	171

\* Tables: Maximum exposure concentrations in water layer

\* In segment from 95.00 to 100.00 m in water body

\* Actual concentrations PECsw as well as PECsed refer to momentary concentrations

\* occurring 1, 2 etc days after the global maximum concentration.

\* The Time Weighted Average Exposure Concentrations (TWAEC) have been calculated

\* for a moving time frame and have been allocated to the last day of the period  
 considered

\* Table: PEC in water layer of substance: C1123

	Concentration	Date	Daynr
	µg.L-1		
Global max	5.719	19-Mar-1980-14h00	171
(incl. suspend.solid)	5.721	19-Mar-1980-14h00	171
PECsw 1 day	0.009408	20-Mar-1980-14h00	172
PECsw 2 days	0.003372	21-Mar-1980-14h00	173
PECsw 4 days	0.003223	23-Mar-1980-14h00	175
PECsw 7 days	0.000792	26-Mar-1980-14h00	178
PECsw 14 days	0.000215	02-Apr-1980-14h00	185
PECsw 21 days	0.000115	09-Apr-1980-14h00	192
PECsw 28 days	0.02926	16-Apr-1980-14h00	199
PECsw 42 days	0.000080	30-Apr-1980-14h00	213
PECsw 50 days	0.000077	08-May-1980-14h00	221
PECsw 100 days	0.000023	27-Jun-1980-14h00	271

\* Legend: - in table means PECsw is later than end of simulated period: 30-Sep-1980

\* Table: Maximum Time Weighted Averaged Exposure Concentrations substance: C1123

	Concentration	Date	Daynr
	µg.L-1		
TWAECSw 1 day	4.056	20-Mar-1980-00h00	172
TWAECSw 2 days	2.034	21-Mar-1980-00h00	173
TWAECSw 4 days	1.286	23-Mar-1980-00h00	175
TWAECSw 7 days	0.7356	26-Mar-1980-00h00	178
TWAECSw 14 days	0.3680	02-Apr-1980-00h00	185
TWAECSw 21 days	0.2526	23-Mar-1980-09h00	175
TWAECSw 28 days	0.2108	16-Apr-1980-00h00	198
TWAECSw 42 days	0.1449	30-Apr-1980-00h00	213
TWAECSw 50 days	0.1249	21-Apr-1980-09h00	204
TWAECSw 100 days	0.06323	10-Jun-1980-09h00	254

\* Tables: Maximum exposure content in sediment

\* In the top 5.00 cmsediment located under  
 \* the water body segment from 95.00 to 100.00m,  
 \* the content is expressed as µg substance per kg dry sediment.

\* Table: PEC in sediment of substance: C1123

	Content	Date	Daynr
	µg.kg-1		
Global max	2.114	19-Mar-1980-18h00	171
PECsed_1_day	1.190	20-Mar-1980-18h00	172
PECsed_2_days	0.8965	21-Mar-1980-18h00	173
PECsed_4_days	0.9618	23-Mar-1980-18h00	175
PECsed_7_days	0.6887	26-Mar-1980-18h00	178
PECsed_14_days	0.4939	02-Apr-1980-18h00	185
PECsed_21_days	0.4116	09-Apr-1980-18h00	192
PECsed_28_days	0.6978	16-Apr-1980-18h00	199
PECsed_42_days	0.3831	30-Apr-1980-18h00	213
PECsed_50_days	0.3444	08-May-1980-18h00	221
PECsed_100_days	0.2395	27-Jun-1980-18h00	271

\* Legend: - in table means PECsed is later than end of simulated period: 30-Sep-1980

\* Table: Maximum Time Weighted Averaged Exposure Content substance: C1123

	Content	Date	Daynr
	µg.kg-1		
TWAECSed 1 day	1.772	20-Mar-1980-10h00	172
TWAECSed 2 days	1.472	21-Mar-1980-07h00	173
TWAECSed 4 days	1.283	23-Mar-1980-07h00	175
TWAECSed 7 days	1.097	26-Mar-1980-05h00	178
TWAECSed 14 days	0.8436	02-Apr-1980-03h00	185
TWAECSed 21 days	0.7145	09-Apr-1980-03h00	192
TWAECSed 28 days	0.6433	16-Apr-1980-05h00	199
TWAECSed 42 days	0.5870	30-Apr-1980-03h00	213
TWAECSed 50 days	0.5516	08-May-1980-02h00	221
TWAECSed 100 days	0.4200	27-Jun-1980-02h00	271

## Prilog 11

**Tabela P10.** Vrednosti IC<sub>50</sub> upotrebljene za konstrukciju sigmoidne krive

<b>Vrsta</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/l)</b>	<b>Izvor</b>
<i>Navicula pelicullosa</i>	0,136	EFSA, 2007
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	1,0	Rezultati iz disertacije
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	2,0	DAR, 2006
<i>Lemna paucicostata</i>	30,2	Michel et al., 2004
<i>Lemna valdiviana</i>	31,7	Jonsson et al., 1995
<i>Lemna minor</i>	33,3	Rezultati iz disertacije
<i>Lemna gibba</i>	34,0	EFSA, 2007
<i>Azolla caroliniana</i>	129,6	Silva et al., 2012

## BIOGRAFIJA

Marija (Dragoslav) Stevanović je rođena 1985. godine u Beogradu, Republika Srbija. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/2005. godine. Kao redovan student na odseku za Zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda diplomirala je 2010. godine, sa prosečnom ocenom 9,21 (devet dvadeset jedan). Diplomski rad pod nazivom „Prisustvo i rasprostranjenost virusa mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*) u usevu paradajza“ odbranila je na katedri za Fitopatologiju, sa ocenom 10.

Doktorske studije, modul Fitomedicina, na Katedri za pesticide Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2010/2011. godine. Ispitne obaveze na doktorskim studijama uspešno je završila, sa prosečnom ocenom 10.

Nakon upisa na doktorske studije angažovana je kao stipendista Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine na projektu „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane“, kojim rukovodi prof. dr Aleksa Obradović.

Od decembra 2013. do decembra 2014. godine, kao stipendista Evropske Komisije u okviru programa Erasmus Mundus (JoinEU-See), doktorske razmene, boravila je u laboratoriji RECETOX (Research Center for Toxic Compounds in the Environment), na Masarik Univerzitetu, Brno, Češka Republika. Od 01.04.2015. godine zasnovala je radni odnos na određeno vreme u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd – Zemun, a 05.04.2016. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik.

U saradnji sa drugim autorima objavila je ili saopštila 18 naučnih radova. Odlično vlada engleskim, a služi se ruskim i španskim jezikom. Član je Društva za zaštitu bilja, kao i međunarodnog naučnog udruženja Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Стевановић

Број индекса 10/20

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај активне супстанце и формулисаних препарата кломазона на акватичне организме**

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

Потпис аутора

У Београду, 30.03.2018.

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Стевановић

Број индекса 10/20

Студијски програм Пољопривредне науке, модул: Фитомедицина

Наслов рада Утицај активне супстанце и формулисаних препарата  
кломазона на акватичне организме

Ментор проф. др Драгица Бркић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 30.03.2018.



---

## Изјава о коришћењу

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

Утицај активне супстанце и формулисаних препарата кломазона на акватичне организме

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

Потпис аутора

У Београду, 30.03.2018.

  
\_\_\_\_\_



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

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

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

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

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

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