



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU

**Razvoj testova inhibicije rasta vrsta roda  
*Myriophyllum* L. 1754 (Saxifragales, Haloragaceae)  
za potrebe ekološke procene rizika od herbicida i  
kontrole kvaliteta sedimenta**

- doktorska disertacija -

Mentor: Prof. dr Ivana Teodorović

Kandidat: Tanja Tunić

Novi Sad, 2015.

*Zahvaljujem se svojoj mentorki dr Ivani Teodorović na podršci i velikoj pomoći tokom mojih doktorskih studija, na savetima i sugestijama, kao i na temeljnosti kojom je u velikoj meri doprinela radu na ovoj disertaciji i mom profesionalnom razvoju.*

*Zahvaljujem se i članicama komisije dr Slobodanki Pajević, dr Dragici Brkić i dr Aleksandri Tubić na pomoći, savetima i korisnim sugestijama za izradu ove teze, kao i na strpljenju, ljubaznosti i iskrenoj podršci koju su mi pružili.*

*Zahvaljujem se svim sadašnjim i bivšim zaposlenima, ili angažovanim ljudima na Departmanu za biologiju i ekologiju koji su svojom dobrotom i inventivnošću nesebično pomogli u rešavanju nepredvidivih problema: dr Milanu Boriševu, Sanji Muzikravić, Šandoru Šipošu, Branki Glišić, Jeleni Hrubik, Milošu Bokorovu, Dušanki Krašić, Marici Jović, Sandi Savić, Milici Rat, dr Tamari Jurca, dr Radmili Kovačević i mnogim drugima.*

*Hvala i Nenadu Tomiću na vrlo korisnim tehničkim rešenjima problema širokog dijapazona.*

*Zahvaljujem se dragoj kolegini Varji Knežević, koja je sa mnom prošla svaki korak u izradi ove disertacije.*

*Zahvalna sam i porodici na moralnoj, duhovnoj, fizičkoj i finansijskoj podršci. Hvala Nenadu, tati Obradu, mami Veroni i bratu Viktoru što su takvi kakvi jesu.*

*Hvala svim drugarima čija mi vedrina, podrška i polet puno znače.*

*Tanja Tunić*

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
<b>2. Pregled literature</b>	5
2.1. Herbicidi	5
2.2. Ekološka procena rizika	13
2.2.1. Ekološka procena rizika od hemikalija	14
2.2.1.1. Ekološka procena rizika od pesticida	16
2.2.2. Procena rizika i karakterizacija sedimenta	19
2.3. Akvatične makrofite u ekološkoj proceni rizika	25
2.3.1. Osobine test organizama	28
<b>3. Ciljevi disertacije</b>	33
<b>4. Materijal i metode</b>	35
4.1. Uzgoj laboratorijskih kultura	35
4.2. Testovi inhibicije rasta	37
<b>5. Rezultati i diskusija</b>	53
5.1. Razvoj kontaktnog testa toksičnosti sedimenta na vrsti <i>M. aquaticum</i> i potencijal primene	53
5.1.1. Kontaktni testovi toksičnosti sedimenta	53
5.1.1.1. Internacionalni test međulaboratorijske kalibracije kontaktnog testa toksičnosti sedimenta	53
5.1.1.2. Primena kontaktnog testa u proceni toksičnosti uzoraka sedimenta iz prirode	54
5.1.1.3. Alternativni parametri u testovima toksičnosti sedimenta	65
5.1.1.4. Uticaj strukturnih svojstava sedimenta na parametre rasta <i>M. aquaticum</i> u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta	75
5.1.2. Potencijal primene kontaktnog testa toksičnosti sedimenta na vrsti <i>M. aquaticum</i> za potrebe preventivne ekološke procene rizika od hemikalija vezanih za sediment	79
5.1.3. Kontaktni testovi toksičnosti sedimenta na <i>M. aquaticum</i> – zaključna razmatranja	84
5.2. Razvoj testova toksičnosti na alternativnim vrstama akvatičnih makrofita za potrebe ekološke procene rizika od herbicida i regulatora rasta	87
5.2.1. Optimizacija test protokola i definisanje kriterijuma osetljivosti	90
5.2.2. Osetljivost testova inhibicije rasta vrste <i>M. aquaticum</i> i <i>M. spicatum</i>	96
5.2.3. Prednosti i mane upotrebe vrsta roda <i>Myriophyllum</i> u ekološkoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta	117
<b>6. Zaključak</b>	121
<b>7. Literatura</b>	124
<b>Prilog</b>	
<b>Biografija</b>	

## Lista slika

Slika 1. Strukturna formula atrazina (Tomlin, 2009)
Slika 2. Strukturna formula izoproturona (Tomlin, 2009)
Slika 3. Strukturna formula trifluralina (Tomlin, 2009)
Slika 4. Hemijska struktura prirodnog (IAA) i sintetičkih auksina koji pripadaju različitim hemijskim grupama (Grossmann, 2010)
Slika 5. Strukturna formula 2,4-dihlorofenoksisirćetne kiseline (2,4 D) (Tomlin, 2009)
Slika 6. Strukturna formula 3,6-dihloro 2-metoksibenzoeve kiseline – dikamba (Tomlin, 2009)
Slika 7. Najvažniji koraci u ekološkoj proceni rizika (ERA)
Slika 8. Sočivasto telo vrste <i>Lemna minor</i>
Slika 9. Cvet, stablo i izdeljeni listovi submerzne vrste <i>Myriophyllum spicatum</i>
Slika 10. Izgled vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i>
Slika 11. Laboratorijska kultura vrste <i>Lemna minor</i> u <i>Steinberg</i> medijumu
Slika 12. Vodena laboratorijska kultura <i>M. aquaticum</i> u <i>Steinberg</i> medijumu
Slika 13. Laboratorijska kultura <i>M. aquaticum</i> gajena na standardnom sisntetičkom sedimentu
Slika 14. Vrsta <i>Myriophyllum spicatum</i> u testu inhibicije rasta (DAT 14)
Slika 15: Vrsta <i>Lemna minor</i> u testovima sa supstancama trifluralin i izoproturon (DAT 7)
Slika 16. Vrsta <i>Lemna minor</i> na početku testa (DAT 0), pre i nakon obrade fotografije u cilju određivanja površine
Slika 17. Vrsta <i>M. aquaticum</i> u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta
Slika 18. Vrsta <i>Myriophyllum aquaticum</i> u sedimentu sa različitim sadržajem konstituenata
Slika 19. Test sistem voda-sediment
Slika 20. Vrste roda <i>Myriophyllum</i> u testovima a) vršni delovi biljaka upotrebljavani u testu, b) test, c) DAT 0 odvajanje dve od 5 inicijalnih biljaka, d) DAT 0 priprema biljaka iz dodatnih posuda za sušenje, e) biljka izvađena iz sedimenta poslednjeg dana testa.
Slika 21 (a-c). Stope rasta <i>Myriophyllum aquaticum</i> u uzorcima sedimenta reke Tamiš (leto, jesen 2009, proleće 2010) u odnosu na kontrolni tretman.
Slika 22. Stope rasta (na osnovu sveže mase) <i>Myriophyllum aquaticum</i> u uzorcima sedimenta reka Jegrička i Krivaja (leto 2011) u odnosu na kontrolni tretman.
Slika 23. Inhibicija rasta <i>M. aquaticum</i> (izražena u % u odnosu na kontrolu) u 9 uzoraka sedimenta reke Tamiš: leto (TL 1-3) i jesen (TJ 1-3) 2009 i proleće 2010 (TP 1-3); Lokaliteti: 1 – Jaša Tomić/Sečanj, 2 – Jabuka, 3 – Pančevo (uzvodno od brane).
Slika 24. Stope rasta <i>M. aquaticum</i> u uzorcima rečnog sedimenta Tamiša (leto i jesen 2009, proleće 2010), Jegričke i Krivaje (leto 2011) u odnosu na kontrolne (dugoročna laboratorijska i prirodna kontrola).
Slika 25. Inhibicija rasta <i>M. aquaticum</i> u uzorcima rečnog sedimenta Tamiš (leto i jesen 2009, proleće 2010), Jegrička i Krivaja (leto 2011) u odnosu na dugoročnu laboratorijsku kontrolu.
Slika 26 (a-c). Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg) dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa <i>M. aquaticum</i> na uzorcima sedimenta sa tri lokaliteta reke Tamiš uzetih u leto i jesen 2009. i proleće 2010. godine.
Slika 27. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa <i>M. aquaticum</i> na uzorcima sedimenta sa lokaliteta reka Jegrička i Krivaja uzetih u leto 2011. godine.

Slika 28. Vrednosti sadržaja hlorofila <i>a</i> (mg) u nodusu <i>M. aquaticum</i> u kontaktnom testu uzoraka sedimenta reke Tamiš uzetih u (a) leto i b) jesen 2009) u odnosu na kontrolu.
Slika 29. Vrednosti koncentracije hlorofila <i>a</i> (mg/g) u nodusu <i>M. aquaticum</i> u kontaktnom testu uzoraka sedimenta reke Tamiš (uzetim u leto i jesen 2009. godine) u odnosu na kontrolu.
Slika 30: Vrednosti stope rasta <i>M. aquaticum</i> u veštačkom sedimentu različitog procentualnog udela treseta ( <i>Sphagnum</i> sp.).
Slika 31. Vrednosti stope rasta <i>M. aquaticum</i> u veštačkom sedimentu različitog procentualnog udela kvarca i kaolina.
Slika 32. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa <i>Myriophyllum aquaticum</i> na sedimentu različitog sadržaja treseta.
Slika 33. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa <i>M. aquaticum</i> na sedimentu različitog sadržaja kvarca i kaolina.
Slika 34. Krive dozne zavisnosti inhibicije rasta (%) <i>Myriophyllum aquaticum</i> od koncentracije atrazina ( $\mu\text{g/g}$ sedimenta) nakon 10-dnevne ekspozicije u (a) preliminarnom i (b) definitivnom testu.
Slika 35. Definitivni kontaktni test toksičnosti atrazina na <i>M. aquaticum</i> .
Slika 36. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta sa atrazinom na vrsti <i>M. aquaticum</i> .
Slika 37 (a, b). Koncentracija hlorofila <i>a</i> (mg/g nodusa) i absorbanca posle desetodnevnog definitivnog testa sa <i>Myriophyllum aquaticum</i> u sedimentu sa atrazinom.
Slika 38 (a-f). Krive zavisnosti inhibicije relativne stope rasta <i>M. aquaticum</i> od koncentracije test supstance. Stope rasta izračunate su na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine biljke (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon sedmodnevnog perioda izloženosti različitim koncentracijama a) 3,5 DCP, b) atrazina, c) izoproturona, d) trifluralina, e) 2,4 D i f) dikambe.
Slika 39. Kriva zavisnosti inhibicije relativne stope rasta <i>M. spicatum</i> od primenjene koncentracije test supstance. Relativne stope rasta su izračunate na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon četrnaestodnevnog perioda izloženosti različitim koncentracijama izoproturona.
Slika 40 (a-c). Krive zavisnosti inhibicije relativne stope rasta <i>M. spicatum</i> od primenjene koncentracije test supstance. Relativne stope rasta su izračunate na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon sedmodnevnog perioda izloženosti različitim koncentracijama a) atrazina, b) izoproturona i c) 2,4 D.
Slika 41 (a-f). Testovi inhibicije rasta <i>M. aquaticum</i> – 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS) tokom intervala 0-3 od 3-7 dana, kao i kumulativno 0-7 dana testa.
Slika 42. Test inhibicije rasta <i>M. spicatum</i> – izoproturon. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta tokom intervala 0-5 od 5-14 dana, kao i kumulativno 0-14 dana testa.
Slika 43 (a-c). Testovi inhibicije rasta <i>M. spicatum</i> – atrazin, izoproturon i 2,4 D. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta tokom intervala 0-3 od 3-7 dana, kao i kumulativno 0-7 dana testa.
Slika 44 (a-c). Vrednosti sveže mase korena <i>M. aquaticum</i> u testovima inhibicije rasta sa a) atrazinom, b) 2,4 D i c) dikambom.
Slika 45 (a-d): Vrednosti sveže mase korena <i>M. spicatum</i> u testu inhibicije rasta sa a) izoproturonom (7+ 14 d test) i tri skraćena testa (3+ 7 d test) sa b) atrazinom, c) izoproturonom i d) 2,4 D.

Slika 46 (A-F). Testovi inhibicije rasta *L. minor* i *M. aquaticum*. Inhibicija rasta u odnosu na kontrolu izračunata na osnovu stope rasta broja jedinki (*L. minor*) i dužine iznad sedimenta (*M. aquaticum*) nakon sedmodnevnog izlaganja 3,5-DCP, atrazinu, izoproturonu, trifluralinu, 2,4 D i dikambi (prerađeno iz Tunić i sar, 2015).

Slika 47 (a-c). Krive dozne zavisnosti zajedničkog parametra – sveža masa test vrsta *Lemna minor*, *Myriophyllum aquaticum*, *Myriophyllum spicatum* u testovima inhibicije rasta sa a) atrazinom b) izoproturonom i c) 2,4 D. Koncentracije su *log* transformisane.

Slika 48 (A-D). Odgovor vrsta *L. minor* i *M. aquaticum* na auksin simulatore. Prikazane su srednje vrednosti stope rasta sa standardnom devijacijom na osnovu broja jedinki (*L. minor*) i dužine iznad sedimenta (*M. aquaticum*) u intervalima 0-3 d, 3-7 d i 0-7 d za ceo period izlaganja 2,4 D (A i C) i dikambi (B i D) (prerađeno iz Tunić i sar, 2015).

Slika 49. Distribucije osetljivosti vrsta (SSD) akvatičnih biljaka na toksično dejstvo odabranih supstanci: 3,5-DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba.

### Lista tabela

Tabela 1. SQT (*Sediment Quality TRIAD*) matrica (iz Chapman, 2007 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2014)

Tabela 2: Sastav hranljivog rastvora *Steinberg* (ISO 16191, 2013)

Tabela 3: Sastav sedimenta prema OECD 218 (2004)

Tabela 4: Sažetak uslova testa inhibicije rasta vrste *Lemna minor* (OECD 221, 2006)

Tabela 5: Uslovi uzgoja laboratorijske kulture i procedure kontaktnog testa toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* (ISO 16191, 2013)

Tabela 6: Varijacije sintetičkog sedimenta sa različitim sadržajem organske materije, kvarca i kaolina

Tabela 7: Sažetak uslova pri izvođenju testova inhibicije rasta *Myriophyllum aquaticum* i *Myriophyllum spicatum* (OECD, draft/2011).

Tabela 8: Konstituenti standardnog sintetičkog sedimenta korišćenog u testovima (OECD, draft/2011).

Tabela 9: Sastav *Smart & Barko* medijuma (OECD, draft/2011)

Tabela 10: Raspored merenja parametara tokom sedmodnevne ekspozicije (OECD, draft/2011)

Tabela 11: Rezultati internacionalnog testa kalibracije metode za procenu toksičnosti sedimenta

Tabela 12: Vrednosti stope rasta sveže mase nodusa i inhibicije u odnosu na kontrolu u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta reka Tamiš (leto, jesen i proleće, lokaliteti L1, L2, L3), Jegrička i Krivaja

Tabela 13. Fizičko-hemijska analiza uzoraka sedimenta reke Tamiš

Tabela 14. Fizičko-hemijske osobine sedimenta reka Jegrička i Krivaja

Tabela 15. Srednje vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korena i vrednosti inhibicije rasta u odnosu na kontrolu u kontaktnim testovima sedimenta reke Tamiš

Tabela 16. Srednje vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korena i vrednosti inhibicije rasta *M. aquaticum* u odnosu na kontrolu u kontaktnim testovima sedimenta reke Krivaja i Jegrička

Tabela 17: Vrednosti sadržaja hlorofila *a* u nodusu, koncentracije hlorofila *a* i inhibicije u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta reke Tamiš (leto i jesen)

Tabela 18: Varijabilnost parametara rasta vrste *M. aquaticum* u kontrolnom – standardnom sintetičkom sedimentu

Tabela 19: Parametri rasta *M. aquaticum* u testovima toksičnosti sedimenta (kontrola i tretmani)

Tabela 20: Odnos mase i dužine korena i izdanka u kontaktnim testovima sa <i>M. aquaticum</i> na uzorcima sedimenta iz prirode
Tabela 21: Varijacije sintetičkog sedimenta sa različitim sadržajem organske materije, kvarca i kaolina
Tabela 22: Vrednosti sveže mase nodusa <i>M. aquaticum</i> na početku i kraju testa, stopa rasta i inhibicija rasta u testu sa varirajućim sadržajem organske materije u sintetičkom sedimentu
Tabela 23: Vrednosti sveže mase nodusa <i>M. aquaticum</i> na početku i kraju testa, stopa rasta i inhibicija rasta u testu sa varirajućim sadržajem kvarca i kaolina
Tabela 24: Vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korenčića i inhibicija rasta <i>M. aquaticum</i> u testu sa varirajućim sadržajem organske materije
Tabela 25: Vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korenčića i inhibicija rasta <i>M. aquaticum</i> u testu sa varirajućim sadržajem kvarca i kaolina
Tabela 26: Odnos mase i dužine korena i izdanka <i>M. aquaticum</i> u sintetičkom sedimentu različite strukture
Tabela 27: Vrednosti odabranih parametara rasta, standardna devijacija, koeficijenti varijacije, srednje inhibitorne koncentracije i minimalne statističke razlike u kontaktnom testu sedimenta sa atrazinom na vrsti <i>M. aquaticum</i>
Tabela 28: Odnos mase i dužine korena i izdanka u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta obogaćenog atrazinom na <i>M. aquaticum</i>
Tabela 29: Testovi sa atrazinom: osetljivost <i>M. aquaticum</i> u različitim test sistemima
Tabela 30: Vrednosti parametara rasta izmerene na početku perioda adaptacije (DAT -3; -7), ekspozicije (DAT 0) i na kraju testa (DAT 7; 14), iskazani preko vrednosti stope rasta (RGR) u periodu adaptacije i ekspozicije sa procenjenim vremenom dupliranja (d.t.) i koeficijenti varijacije (CV%) u testovima sa <i>M. aquaticum</i> i <i>M. spicatum</i>
Tabela 31: Parametri rasta vrsta <i>M. aquaticum</i> i <i>M. spicatum</i> u testovima inhibicije rasta u test sistemu voda-sediment.
Tabela 32: Srednje inhibitorne koncentracije (IC <sub>50</sub> ) u testovima sa vrstama <i>M. aquaticum</i> , <i>M. spicatum</i> i <i>L. minor</i> (prerađeno i dopunjeno iz Tunić i sar, 2015).
Tabela 33: Pregled srednjih inhibitornih koncentracija (IC <sub>50</sub> ) za 2,4 D i dikambu u testovima sa akvatičnim biljkama

## 1. Uvod

U junu 2015. godine, objavljeno je da je u registar Američkog Hemijskog Društva – (CAS Registry, <https://www.cas.org>) uneta stotimilionita supstanca, a da je samo tokom 2014. godine u registar dodato više supstanci nego ukupno tokom perioda od 1965. do 1990. godine. Prema istom izvoru, prosečno se dnevno u registar unosi oko 15000 novih supstanci. Očekivano, samo mali broj od svih poznatih supstanci je zaista u komercijalnoj upotrebi, ali i taj broj raste iz godine u godinu. Prema podacima Američke agencije za životnu sredinu (US EPA) broj supstanci u komercijalnoj upotrebi 2015. godine iznosi oko 84000 ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Zbog tolikog broja različitih supstanci u prometu, ali i činjenice da se u životnoj sredini supstance ne pojavljuju pojedinačno, nego u smešama ili koktelima, a u prostorno-vremenski varijabilnim uslovima životne sredine, procena vrste i razmera uticaja hemijskih supstanci na životnu sredinu, prirodne ekosisteme i ljudsko zdravlje, predstavlja jedan od najkompleksnijih i najtežih izazova i zadataka u oblasti zaštite životne sredine (Rockström i sar, 2009; Brack i sar, 2015).

Sve supstance u životnoj sredini grubo možemo podeliti na dve velike kategorije. Prvu čine supstance za koje je poznato da izazivaju efekte na različitim nivoima biološke organizacije, a koje namerno i ciljano dospevaju u životnu sredinu. U ovu kategoriju ubrajamo sve biocide i pesticide koji se sintetišu i primenjuju u cilju zaštite ljudskog zdravlja i poboljšanja poljoprivredne proizvodnje. Drugu kategoriju čine supstance koje u različite medijume životne sredine i tipove ekosistema stižu nenamerno (slučajno) iz direktnih i rasutih izvora zagađenja, kao što su neprečišćene ili nedovoljno prečišćene industrijske i komunalne otpadne vode, otpadni i izduvni gasovi, deponije čvrstog i hazardnog otpada, saobraćajnice i dr. Ovu grupu čini veliki broj sintetskih organskih industrijskih hemikalija, tzv. kućne hemije, humani i veterinarski lekovi i drugo.

Sa druge strane, sve hemijske supstance koje se pojavljuju u životnoj sredini možemo podeliti i drugačije, a ponovo u dve kategorije – prvu, koju čine tzv. regulisane supstance, odnosno supstance čiju proizvodnju, stavljanje u promet i upotrebu u najvećem broju zemalja na svetu strogo kontroliše zakonska regulativa i drugu grupu tzv. ostalih, odnosno neregulisanih supstanci. Grupa regulisanih supstanci u Evropskoj uniji (EU) i Srbiji (kao državi sa statusom kandidata za članstvo u EU) obuhvata veliki broj supstanci, koje se međusobno razlikuju po hemijskoj strukturi, osobinama i nameni, ali se među njima izdvajaju, po potencijalnom riziku za zdravlje ljudi, prirodne populacije i ekosisteme, broju supstanci i upotrebljenim količinama, dve važne grupe. Prvu grupu čine pesticidi, koji su u EU regulisani Uredbom 1107/2009, a u Srbiji Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, 41/09) i pratećim propisima. Drugu veliku grupu regulisanih supstanci čine industrijske hemikalije, posebno hemikalije koje se proizvode, uvoze i stave u promet u količinama koje prelaze 1 tonu godišnje, a koje u EU podležu Uredbi 1907/2006 ((EC) No 1907/2006) a u Srbiji Zakonu o hemikalijama (Sl. glasnik RS, 36/09, 88/10, 92/11, 93/12) i pratećim propisima. U regulatornom kontekstu, za obe ove velike grupe supstanci je zajedničko to da se na njih primenjuje pristup prevencije rizika, odnosno, pre stavljanja u promet, sve supstance iz ovih grupa prolaze veoma detaljna ispitivanja, posebno fizičko-hemijskih, toksikoloških i ekotoksikoloških svojstava u okviru kompleksne procedure



preventivne ekološke procene rizika (ERA). Malu, ali sa aspekta zaštite životne sredine i ljudskog zdravlja veoma važnu grupu regulisanih supstanci čine prioritete i prioritete hazardne supstance, koje su, na osnovu količina u upotrebi, monitoringom utvrđenih ili modelovanjem predviđenih koncentracija u životnoj sredini i (eko)toksikološkog profila, prepoznate kao supstance koje predstavljaju značajan rizik za prirodne ekosisteme i zdravlje ljudi, te kao takve podležu specifičnoj regulativi, kao što su na primer Okvirna direktiva Evropske unije o vodama (Directive 2000/60/EC) i Zakon o vodama (Sl. glasnik RS, 30/10) sa pratećim propisima (Directive 2013/39/EU, Sl. glasnik RS, 35/11) kojim se utvrđuju standardi kvaliteta i redovan monitoring ovih supstanci u životnoj sredini. Liste prioriteta supstanci nisu konačne, naprotiv, nova naučna saznanja doprinose u velikoj meri revidiranju lista u smislu dopune novim supstancama (von der Ohe i sar, 2011; Slobodnik i sar, 2012), za koje se retrospektivnom ekološkom procenom rizika pokaže da samostalno, u smešama ili multistres uslovima (Altenburger i sar, 2015) ipak predstavljaju značajan rizik po zdravlje ljudi i životnu sredinu. Na taj način određeni broj supstanci iz grupe neregulisanih supstanci prelazi u drugu grupu – grupu regulisanih supstanci.

Ekološka procena rizika (ERA) predstavlja složen proces procene verovatnoće i razmera negativnih uticaja različitih antropogeno uzrokovanih pritisaka, najčešće hemijskih stresora, na prirodne populacije, zajednice i različite tipove ekosistema (SETAC, 1997). Preventivna procena rizika podrazumeva procenu potencijalnog uticaja regulisanih hemikalija, posebno pesticida, na životnu sredinu, pre njihovog stavljanja u promet, u cilju prevencije neprihvatljivog rizika za prirodne populacije ne ciljnih vrsta i ekosisteme. Preventivna ekološka procena rizika predstavlja mehanizam koji bi trebao da spreči ponavljanje grešaka iz ne tako davne prošlosti, kada su neki pesticidi (na primer, organohlorni insekticidi) stavljeni u promet i široku upotrebu na osnovu izuzetne efikasnosti u borbi protiv štetnih bioloških agenasa, a bez sveobuhvatne procene potencijalnog ekološkog rizika kojom su se mogle izbeći dalekosežne i dugotrajne posledice po životnu sredinu i prirodne populacije većeg broja ne ciljnih vrsta (Carlson, 1962; Blus, 1995). Retrospektivna procena rizika podrazumeva procenu stanja životne sredine, ekološkog statusa i ekosistemskog integriteta, sa posebnim akcentom na prisutne zagađujuće i potencijalno toksične supstance u životnoj sredini, čineći tako važan kontrolni mehanizam kojim se ocenjuje delotvornost upravljačkih mera u oblasti zaštite životne sredine (Teodorović i Kaišarević, 2014).

Ekološka procena rizika se bazira na odnosu ekspozicija-efekat, konkretno, na odnosu očekivanih koncentracija supstanci u životnoj sredini i eksperimentalno utvrđenih koncentracija tih supstanci koje (ne)dovode do biološkog efekta. Procena biološkog efekta se godinama u najvećoj meri oslanjala na rezultate standardizovanih (eko)toksikoloških laboratorijskih testova na relativno malom broju odabranih reprezentativnih vrsta iz različitih trofičkih nivoa za vodenu i ne-vodenu životnu sredinu (SANCO, 2002a,b). Najveći izazov u ekološkoj proceni rizika i razlog zbog koga ERA trpi ozbiljne kritike naučne i stručne javosti je dostizanje zadovoljavajućeg nivoa ekološkog i ekosistemskog realiteta testova, odnosno (ne)moćnosti da se rezultati dobijeni standardnim laboratorijskim testovima ekstrapoliraju na prirodne uslove životne sredine i omogućе pouzdanu procenu dugotrajnih efekata na ne ciljne vrste, a posebno na više nivoa biološke organizacije – prirodne populacije i ekosisteme (Newman i sar, 2006).

Regulatorna tela, kao i stručna i naučna javnost ulažu velike napore usmerene ka poboljšanju već postojećih i razvoju novih metoda koje se primenjuju u ekološkoj proceni rizika. Najviše napora se ulaže u razvoj, validaciju i verifikaciju matematičkih modela za procenu emisije, sudbine i ponašanja supstanci i njihovih smeša, modelovanje efekata na višim nivoima biološke organizacije koje zapravo i jesu predmet zaštite, a to su populacije, životne zajednice i

ekosistemi (Schmolke i sar, 2010). Međutim, brzim razvojem i primenom modelovanja u ERA, laboratorijska ispitivanja ne gube na značaju, pa se poslednjih godina intenziviraju i naponi usmereni ka otklanjanju uočenih nedostataka u ERA – daljim razvojem metodologije laboratorijskih *in vitro* i povećanja ekosistemskog realiteta *in vivo* testova, što predstavlja i cilj ove doktorske disertacije.

U ustaljenoj praksi i procedurama ekološke procene rizika, uočen je ozbiljan disbalans između broja i ekosistemske relevantnosti životinjskih i biljnih vrsta među standardnim test organizmima koji su korišćeni za procenu biološkog efekta regulisanih supstanci u vodenoj i nevodenoj životnoj sredini (Arts i sar, 2010). Preventivna i retrospektivna procena ekološkog rizika za vodenu životnu sredinu, bile su dominantno oslonjene na niz animalnih vrsta, dok su od autotrofnih organizama godinama standardnom metodologijom (SANCO, 2002a) bile zastupljene samo alge i akvatične makrofite iz roda *Lemna*. Usko vezano za biologiju i ekologiju odabranih reprezentativnih akvatičnih autotrofnih organizama kao tipičnih predstavnika vrsta koje naseljavaju vodeni stub, ali i opštim zanemarivanjem i ignorisanjem sedimenta kao integralnog strukturnog i funkcionalnog segmenta svih akvatičnih ekosistema, jasno je da ekološka procena rizika prema godinama ustaljenim procedurama nije u dovoljnoj meri obuhvatala sediment (Höss i sar, 2010). Time je sa jedne strane, u preventivnoj proceni rizika, zanemaren rizik po akvatične primarne producente, ali i vodenu sredinu uopšte, od supstanci koje, zbog svojih fizičko-hemijskih svojstava, imaju jasnu i izraženu tendenciju da se zadržavaju upravo u ovom odeljku životne sredine (Feiler i sar, 2013). Sa druge strane, u retrospektivnoj ERA, procena stanja kvaliteta životne sredine, ekološkog statusa i ekosistemskog integriteta je samo rudimentarno uključivala i sediment, pre svega kroz makrozoobentos kao važan, ali ne i jedini biološki element direktno izložen supstancama vezanim za sediment. Takođe, procena ukupne toksičnosti sedimenta kao jedne od metoda složenog procesa karakterizacije sedimenta (TRIAD koncept) podrazumevala je niz *in vitro* i *in vivo* testova na animalnim vrstama (Chapman, 2007, Höss i sar, 2010), ali nikada nije obuhvatala testove na akvatičnim primarnim producentima. Prema Okvirnoj Direktivi o vodama (2000/60/EC) toksikološka osetljivost primarnih producenata (alge i akvatične makrofite) se razmatra pri određivanju standarda kvaliteta za prioritetne supstance (voda, sediment, biota). Grupa novih supstanci kandidovanih za listu prioritetnih polutanata sadrži i određeni broj herbicida (van der Ohe i sar, 2010), ali su ekotoksikološki podaci neophodni za primenu modela distribucije osetljivosti (SSD) čak i za herbicide dostupni skoro isključivo za vrste roda *Lemna* iz grupe akvatičnih makrofita.

S obzirom na to da akvatične makrofite nisu u dovoljnoj meri uključene ni u preventivnu, ni u retrospektivnu ekološku procenu rizika, predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti proširenja obima ekološke procene rizika kroz razvoj ekotoksikoloških testova na vrstama roda *Myriophyllum*.

U procesu registracije herbicida i regulatora rasta u Evropskoj uniji (prema ranijoj „Directive 91/414/EEC“ i trenutno važećoj uredbi „(EC) 1107/2009“), obavezni početni koraci u ERA su testovi na dve vrste algi i vrsti roda *Lemna* (prema standardnoj metodi OECD 221, 2006). Smatra se da su *Lemna* vrste osetljive na velik broj pesticida, ali se poslednjih desetak godina ukazuje i na nedostatke ove vrste kao reprezentativnog predstavnika akvatičnih makrofita u ekološkoj proceni rizika (Maltby i sar, 2010; Arts i sar, 2010). Budući da su *Lemna* vrste monokotiledone, flotantne akvatične biljke, specifične morfologije i kratkog generacijskog vremena, mogu biti neosetljive na pojedine herbicide (npr. auksin simulatore), kao i na

kontaminaciju sedimenta, što može dovesti do toga da se procenom na osnovu rezultata *Lemna* testa potceni stvaran rizik na akvatične makrofite u vodenom ekosistemu (Vervliet-Scheebaum i sar, 2006, Belgers i sar, 2007, Arts i sar, 2008).

Vrste roda *Myriophyllum* se predlažu kao dopunske vrste akvatičnih makrofita u ekološkoj proceni rizika za vodenu životnu sredinu od herbicida i regulatora rasta biljaka (Arts i sar, 2010). Budući da su vrste roda *Myriophyllum* ukorenjene akvatične dikotiledone biljke, brzog rasta, lake za rukovanje i manipulaciju u laboratoriji, relativno osetljive na pesticide sa različitim mehanizmom toksičnog dejstva i herbicide na koje standardna *Lemna* vrsta nije osetljiva, one pokazuju značajan potencijal za upotrebu u ekološkoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta (Knauer i sar, 2006; 2008; Belgers i sar, 2007).

Submerzna vrsta *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verd. je autohtona za područje Evrope, dok je emerzna vrsta *Myriophyllum spicatum* L. autohtona za područje latinske Amerike i alohtona i invazivna za područje Evrope. Obe vrste se mogu primeniti u testovima različite složenosti – u test sistemu sa vodom bez sedimenta i u sistemu voda-sediment, dok emerzna priroda vrste *M. aquaticum* omogućuje i testove i u test sistemu sa sedimentom bez vode.

Doktorska disertacija je imala za cilj razvoj ekotoksikoloških testova na vrstama roda *Myriophyllum* namenjenih preventivnoj i retrospektivnoj ekološkoj proceni rizika, tj. proveru potencijala predstavnika roda *Myriophyllum* za upotrebu u ekološkoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta u vodenoj sredini i sedimentu i proceni ukupne toksičnosti sedimenta.

Podaci i iskustva dobijena ovim istraživanjem imala su značaj za ciklus internacionalnih testova kalibracije metode koji su bili u funkciji standardizacije protokola sa vrstama roda *Myriophyllum*. U okviru procesa standardizacije kontaktnog testa toksičnosti sedimenta (Feiler i sar, 2014) i testa inhibicije rasta na vrstama roda *Myriophyllum* u proceni rizika od herbicida i regulatora rasta (Ratte i Ratte, 2014), rezultati dobijeni ovim istraživanjem doprineli su poboljšanju i dopuni radnih verzija protokola.

Kao rezultat ukupnih napora stručne i naučne zajednice angažovane na poboljšanju ekološke procene rizika za hemikalije, uključujući i sve aktivnosti na razvoju novih test metoda, *M. aquaticum* i *M. spicatum* su navedene kao preporučene dodatne test vrste u višim stepenima procene rizika od herbicida i regulatora rasta ((EU) No 283/2013; (EU) No 284/2013; EFSA, 2013). Takođe, *M. aquaticum* je predložena test vrsta kao predstavnik primarnih producenata u proceni toksičnosti sedimenta (ISO 16191, 2013).

Rad je kvalitativni i kvantitativni doprinos bazi podataka o osetljivosti izabranih test modela za potrebe ekološke procene rizika i modela distribucije osetljivosti vrsta (engl. *species sensitivity distribution model* – SSD model). Takođe, podaci dobijeni ovim istraživanjem doprineli su naporima za podizanje ekološke relevantnosti laboratorijskih testova ekotoksičnosti i potencijalnoj reevaluaciji rizika od sintetičkih auksina na vodenu životnu sredinu.

## 2. Pregled literature

U ovom poglavlju obuhvaćen je predmet istraživanja disertacije sa akcentom na mesto akvatičnih makrofita u ekološkoj proceni rizika i kontroli kvaliteta sedimenta. Dat je kraći opis testiranih supstanci, procesa ekološke procene rizika, kao i opis test organizama i status akvatičnih makrofita u ekološkoj proceni rizika.

### 2.1. Herbicidi

Pesticidi su različita jedinjenja koja se unose u životnu sredinu namerno, u cilju sprečavanja ili ograničavanja efekta štetnih bioloških agenasa kao što su neželjene biljne vrste (tzv. korovi), insekti, uzročnici biljnih bolesti, glodari i dr. u poljoprivredi, šumarstvu (Teodorović i Kaišarević, 2014). Smatra se da se u našoj zemlji na godišnjem nivou upotrebi oko 3.000 tona pesticida (Brkić i sar, 2009). Pesticidi ne ispoljavaju svoje dejstvo samo na mestu primene, nego se, u zavisnosti od načina primene, ali i zbog svojih različitih fizičko-hemijskih osobina, kao i faktora sredine, mogu transportovati u udaljenije ekosisteme i ispoljiti dejstvo na neciljne organizme.

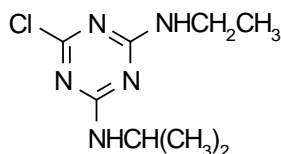
Ulaže se puno energije da bi se napravila ravnoteža između koristi koju pesticidi donose i štetnog dejstva koje imaju na ljude i druge organizme. Pre dospevanja pesticida u upotrebu i promet, oni moraju proći detaljna ispitivanja, pri čemu se, pored efikasnosti, ispituju fizičko-hemijske osobine aktivne supstance i nečistoća, potencijalni toksični efekti za čoveka i ekotoksikološki efekti (Williams, 2003 – cit. Brkić i sar, 2009).

Herbicidi su najčešće korišćena grupa pesticida sa učešćem od oko 40% u ukupnoj potrošnji, dok je procenat upotrebe insekticida i fungicida, 30%, odnosno 20% u ukupnom prometu (Brkić i sar., 2009). Herbicidi nakon primene dospevaju u različite delove životne sredine, a u vodene ekosisteme dospevaju spiranjem sa površine zemljišta i biljaka, aero tretmanima, nepravilnim prskanjem, pranjem aparature i zaštitne odeće, nepravilnim odlaganjem ambalaže itd. Ovim procesima, herbicidi dospevaju do neciljnih organizama, od kojih su posebno osetljivi primarni producenti u vodenim ekosistemima, jer su izloženi dejstvu celom svojom površinom (Cedergreen i sar, 2005). Intenzivna primena herbicida u poljoprivredi je tokom proleća i leta, te su i najveće koncentracije herbicida u vodenim ekosistemima zabeležene upravo u tom periodu. Većina herbicida su polarne, lako rastvorljive supstance. Prema primarnom mehanizmu toksičnog dejstva, herbicidi se dele na inhibitore: a) fotosinteze, b) biosinteze pigmenta, c) biosinteze lipida, d) biosinteze aminokiselina, d) deobe ćelija i e) aktivnosti auksina (Teodorović i Kaišarević, 2014).

U daljem tekstu dat je kratak opis herbicida koji su korišćeni u istraživanjima kao test supstance: atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba.

## Atrazin

Atrazin spada u grupu triazinskih herbicida, njegova molekulska formula je  $C_8H_{14}ClN_5$ , a strukturna formula je prikazana na slici 1. Atrazin ispoljava mehanizam toksičnog dejstva inhibicijom procesa fotosinteze, blokirajući elektron-transportni lanac između fotosistema II i plastohinonskog bazena u tilakoidima hloroplasta, tako što se vezuje za Qb mesto na proteinu  $D_1$  koji se nalazi u reakcionom centru fotosistema II (PSII) (Coleman i sar, 2002; Giddings i sar, 2005). Zbog zaustavljanja transporta elektrona, onemogućena je produkcija ATP i  $NADPH_2$ , što zbog nedostatka energije dovodi do blokade fiksacije  $CO_2$ , nemogućnosti karboksilacije RuBP i sinteze ugljenih hidrata i drugih (sekundarnih) metabolita neophodnih za izbalansiran rast i razvoj biljaka (Brassard i sar, 2003). Dolazi do oksidacije i razgradnje molekula hlorofila što dovodi do hloroze – žutila listova, koje se javlja prvo po rubovima listova, a zatim se progresivno širi zahvatajući celu biljku, konačno izazivajući nekrozu tkiva i odumiranje cele biljke (Matolesy i sar, 1988, Faust i sar, 2001 – cit. Jevrić, 2009). Biljke atrazin apsorbuju kroz koren i preko listova i akumuliraju ga u apikalnom meristemu gde i ispoljava svoje herbicidno dejstvo (Puntarić, 2006).



Slika 1. Strukturna formula atrazina (Tomlin, 2009)

Zbog česte i dugotrajne primene, kao i svojih fizičko-hemijskih osobina atrazin je prisutan u površinskim i podzemnim vodama (Hoffman i sar, 2000; Rhine i sar, 2003 – cit. Radivojević i sar, 2006). Atrazin je veoma postojan i relativno mobilan u životnoj sredini. Vreme poluraspada u akvatičnoj sredini, prema različitim izvorima iznosi 2-600 dana u zavisnosti od vrednosti pH, sadržaja huminske kiseline i drugih faktora (Solomon i sar, 1996; Coady i sar, 2005; Giddings i sar, 2005; Radošević i sar, 2003 – cit. Radivojević i sar, 2006; Puntarić, 2006). Faktor biokoncentracije atrazina je nizak, odnosno njegova biomagnifikacija kroz trofički lanac je zanemarljiva zbog fizičko-hemijskih osobina i niske vrednosti podeonog koeficijenta: n oktanol/voda (2.65) (Solomon, 1996; <http://www.epa.gov>). Ima nizak koeficijent distribucije ( $Kd = 0.19-2.46$ ) i nizak podeoni koeficijent: organski ugljenik / voda ( $Koc = 25-155$ ), te se ne adsorbuje čvrsto na čestice sedimenta. Degradacija atrazina se ostvaruje hemijskim i mikrobiološkim procesima. Većim delom, atrazin se razgrađuje hidrolizom nakon koje sledi razgradnja zemljišnim mikroorganizmima. Hidrolizu atrazina prati stvaranje hidroksiatrazina (HA) kao produkta transformacije. Atrazin se može degradirati u različite metabolite, od kojih je svaki različite perzistentnosti i toksičnosti. Poznati produkti biodegradacije atrazina su: deetilatrazin (DEA), deizopropilatrazin (DIA), diaminohlorotriazin (DAC), hidroksiatrazin (HA), deizopropilhidroksiatrazin (DIHA) (Solomon i sar, 1996). Na osnovu istraživanja došlo se do zaključka da je -S-triazinski prsten atrazina u potpunosti rezistentan na mikroorganizme, te je stoga važnija njegova razgradnja hemijskim putem u odnosu na biodegradaciju. Ipak, dominantan put degradacije atrazina u prirodnoj sredini je kroz biodegradaciju ili mikrobiološku

razgradnju, pri čemu nastaje produkt koji još uvek sadrži triazinski prsten, odnosno degradacioni metabolit koji je i dalje biološki aktivan (Giddings i sar, 2005).

Prethodnih decenija, primena atrazina je bila masovna, te se ostaci atrazina, metabolita i transformacionih proizvoda, posebno atrazin-2-hidroksi i atrazin-desetil i danas detektuju u površinskim i podzemnim vodama širom Evrope koje su često namenjene vodosnabdevanju, često u koncentracijama koje prevazilaze maksimalno dozvoljene u pijaćim vodama prema Direktivi Evropske unije o pijaćim vodama iz 1999. godine (Directive 80/778/EEC, 2008). Iz ovih razloga, atrazin je od 2004. godine, povučen iz primene i zabranjen za upotrebu u zemljama Evropske unije (Okland i sar, 2005; <http://www.ec.europa.eu>). Nakon zabrane upotrebe atrazina na području EU, njegove koncentracije u površinskim vodama su uglavnom ispod 1 µg/l (Graymore i sar, 2001 – cit. Knauert i sar, 2010). Prema najnovijim podacima monitoringa slivnog područja Dunava (ICPDR, 2015) koncentracije atrazina u Dunavu se kreću od 0 do 0,07 µg/l, dok su koncentracije degradacionih proizvoda atrazin-2-hidroksi i atrazin-desetil nešto niže, maksimalne izmerene koncentracije su 0.02 odnosno 0.06 µg/l. Atrazin je tokom devedesetih godina prošlog veka bio jedan od najčešće korišćenih herbicida u Republici Srbiji (Gašić i sar, 2002). Proces usaglašavanja propisa u oblasti zaštite životne sredine Republike Srbije sa Evropskom unijom je doprineo da se atrazin od 2008. godine i u Srbiji ne nalazi u prometu i njegova upotreba je zabranjena zbog perzistentnosti i izražene mobilnosti u podzemnim vodama. Nalazi se na listi zabranjenih supstanci, tj. „Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci za koje postoji odluka o neodobravanju na nivou Evropske unije, a koje nisu u prometu u Republici Srbiji” (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>).

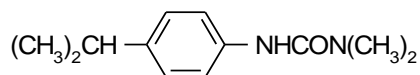
Pravilnikom o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda (Sl. glasnik RS, 59/10, 25/11 i 5/12) atrazin je obeležen znakom opasnosti Xn kao štetan, oznakom rizika R48/22 (što ukazuje na opasnost od teškog oštećenja zdravlja pri produženom izlaganju gutanjem) i oznakom rizika R43, kao supstanca koja može izazvati senzibilizaciju u kontaktu sa kožom. Takođe, atrazin je obeležen i znakom opasnosti N kao opasan po životnu sredinu i oznakom rizika R50/53 što podrazumeva veoma toksičnu supstancu za vodene organizme koja može izazvati dugotrajne štetne efekte u vodenoj životnoj sredini. 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, 105/13), atrazin je, za iste klase opasnosti, obeležen odgovarajućim obaveštenjima o opasnostima (H373, H317; H400 i H410).

## **Izoproturon**

Izoproturon je herbicid iz grupe fenilurea herbicida, molekulske formule C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O i strukturne formule prikazane na slici 2. Izoproturon je jedan od najčešće primenjivanih herbicida u Evropi i često je detektovan u uzorcima površinskih i podzemnih voda. S obzirom na to da se koristi u značajnim količinama, ne iznenađuje podatak da su koncentracije u površinskim vodama visoke, čak do 0.2 µg/l u vodi Dunava (ICPDR, 2015).

Izoproturon biljke apsorbuju dominantno preko korena, ali i nadzemnim delovima. Brzo se transportuje preko ksilema u lišće, gde ispoljava svoje dejstvo (Hock i sar, 1995 – cit. Glabgen i sar, 1999). Toksično dejstvo izoproturon ispoljava blokiranjem fotozavisnog transporta elektrona u procesu fotosinteze u tilakoidima na nivou fotosistema II (PS II) (Porsbring i sar, 2010). Dejstvo izoproturona se ispoljava njegovim vezivanjem na D1 proteinu fotosistema II, blokirajući transport elektrona od Q<sub>A</sub> do Q<sub>B</sub>, što sprečava normalno funkcionisanje elektron-

transportnog lanca (Devine i sar, 1993 – cit. Backhaus i sar, 2004; Janjić, 2009). Ovo dovodi do prekida sinteze ATP i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH<sub>2</sub>) i do oksidativnih oštećenja fotosistemske aparata (Janjić, 1994).



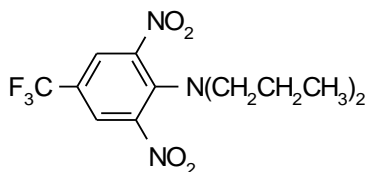
Slika 2. Strukturna formula izoproturona (Tomlin, 2009)

Izoproturon ima nisku vrednost podeonog koeficijenta: n oktanol/voda ( $K_{ow} = 2,5$  na pH 7 i 20 °C), njegov akumulativni potencijal je zanemarljiv i ne smatra se perzistentnim. Ipak, odlikuje ga sporija razgradnja (manja stopa biodegradacije, enzimska i mikrobiološka), vreme poluraspada iznosi  $6 \pm 28$  dana (Galichet i sar, 2002).

Izoproturon je, odobrena aktivna supstanca u upotrebi u sredstvima za zaštitu bilja (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>), nalazi se na listi „Aktivnih supstanci za koje se smatra da su odobrene u skladu sa važećim propisima Evropske unije“. Prema spisku klasifikovanih supstanci u skladu sa Pravilnikom o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda (Sl. glasnik RS, 59/10, 25/11 i 5/12), izoproturon je obeležen znakom opasnosti Xn kao štetan i oznakom rizika R40 koja upućuje na ograničena saznanja o karcinogenom efektu, kao i znakom opasnosti N kao opasan po životnu sredinu i oznakom rizika R50/53 što podrazumeva veoma toksičnu supstancu za vodene organizme koja može izazvati dugotrajne štetne efekte u vodenoj životnoj sredini. 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, 105/13), za klase opasnosti karcinogenost i opasnost po vodenu životnu sredinu, izoproturon je obeležen odgovarajućim obaveštenjima o opasnostima (H351, H400 i H410).

### Trifluralin

Trifluralin molekulske formule C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> i strukturne formule prikazane na slici 3. je herbicid iz grupe dinitroanilina koji inhibira rast korena. Trifluralin prodire, pre svega u seme biljke, u region hipokotila i prekida deobu ćelija. Primarno se absorbuje stabaoctom (kod monokotiledonih biljaka koleoptilom, a kod dikotiledonih biljaka hipokotilom ili epikotilom), a sekundarno korenkom klijanaca. U fazi nicanja trifluralin se absorbuje korenkom, ali je translokacija u stablu limitirana. Trifluralin ulazi u biljke preko korena koji je u razvitku. Njegovo dejstvo se bazira na sprečavanju razdvajanja hromozoma u toku mitoze, jer izaziva depolimerizaciju mikrotubula i sprečava formiranje deobnog vretena, vezivanjem za glavni protein mikrotubula (tubulin) svojim NO<sub>2</sub> radikalom (Fernandes i sar, 2007). To dovodi do nemogućnosti hromozoma da pređu u ekvatorijalnu ravan ćelije u deobi kako bi se razdvojile. Gubitak mikrotubula izazvan prisustvom dinitroanilina dovodi do zadebljanja vrhova korena zato što ćelije u ovom delu nisu u stanju da izvrše deobu i elongaciju i finalno inhibira rast korena biljaka. S obzirom na to da se trifluralin u biljkama izuzetno malo kreće, simptomi na lišću su praktično sekundarni odgovor prozrokovan narušavanjem strukture i funkcije korenovog sistema (Paska i Soper, 1977 – cit. Jovanović-Radovanov i Elezović, 2003).



Slika 3. Strukturna formula trifluralina (Tomlin, 2009)

Glavni putevi razlaganja trifluralina u životnoj sredini su fotodegradacija, evaporacija i biodegradacija. Niska vrednost Henrijeve konstante ukazuje na to da trifluralin ima potencijal da isparava iz vlažnog zemljišta i sa vodenih površina. Trifluralin podleže hidrolizi pri različitim vrednostima pH, ali je veoma sklon fotodegradaciji u vazduhu i u vodi. Promena pH često izaziva hidrolizu. Mehanička inkorporacija trifluralina u zemlju može da smanji stepen fotodegradacije. Umereno je perzistentan do perzistentan herbicid bez povećanog rizika da dospe u podzemne vode (EPA, 1996). Podaci o njegovoj perzistentnosti dosta se razlikuju, zavisno od tipa zemljišta i klimata u kojima je vršeno ispitivanje (Jovanović-Radovanov i Elezović, 2003). Njegova transformacija se brže odvija pod anaerobnim uslovima u odnosu na aerobnu biotransformaciju (Aizama i sar, 1989 – cit. Hegedűs i sar, 2000). Vreme poluraspada trifluralina je različito prema navodima nekih autora i ono iznosi od 29-149 dana (EPA, 1996). Trifluralin se slabo spira i ispira kroz zemljište, teško dospeva do dubljih slojeva ili do podzemnih voda zato što se veoma snažno vezuje za koloide zemljišta i za organsku materiju. Klasifikovan je kao slabo pokretan herbicid (FAO, 1988). Vrednost  $\log K_{ow}$  od 5.27 ukazuje na to da trifluralin ima bioakumulativni potencijal. On je od strane Američke agencije za zaštitu životne sredine (engl. *US EPA United States Environmental Protection Agency*) okarakterisan kao bioakumulativan, perzistentan i toksičan herbicid koji izaziva zabrinutost kada je u pitanju njegov uticaj na životnu sredinu. U vodenim ekosistemima trifluralin podleže procesu fotodegradacije. Kinetika i stepen fotodegradacije trifluralina zavise od prisustva organskih materija i amonijumovih jona. Procenjuje se da je poluživot trifluralina u vodi oko 8.9 sati što u suštini limitira njegovu perzistentnost u gornjim slojevima vode. Isparavanje trifluralina je možda glavni put njegove razgradnje (OSPAR, 2005) – ukoliko se ne inkorporira u zemljište, 41-68% trifluralina isparava u roku od 24 h od primene na zemljištu. Isparavanje je minimalno (<2%) ukoliko se primenjuje inkorporacijom. U atmosferi trifluralin podleže evaporaciji i to onda kada reaguje sa hidroksil radikalima koji su nastali kao proizvod raznih fotohemijskih reakcija. Procenjuje se da je poluživot trifluralina u vazduhu od 5.3 sata do 0.22 dana (OSPAR, 2005). Iako je fototransformacija trifluralina u vazduhu i u vodi intenzivna, ostaci trifluralina mogu biti detektovani u vazduhu i u padavinama (kiši i snegu) i mogu dospeti i na veoma udaljena mesta kao što su Kanadski Arktik, Grendland i Beringovo more (CACP, 2006). Transport putem čestica može biti primarni način prenosa i depozicije u udaljenim oblastima (<http://www.nepis.epa.gov>).

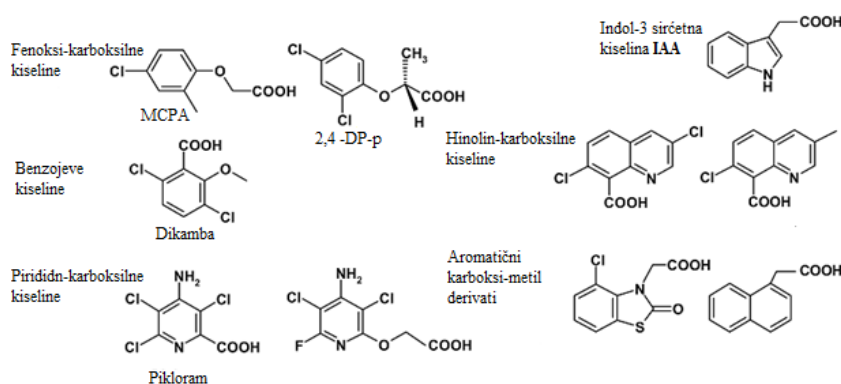
Trifluralin se u primeni u svetu nalazi preko 40 godina, a u Srbiji od 1975. godine (Gašić i Orešković, 2008). Smatra se prioritetnom hazardnom supstancom (EC, 2008). Odlukom Evropske komisije, trifluralin je 2007. godine isključen sa liste odobrenih aktivnih supstanci (<http://www.ec.europa.eu>). Proces usaglašavanja propisa u oblasti zaštite životne sredine Republike Srbije sa Evropskom unijom je doprineo da je trifluralin povučen iz primene u Srbiji i nalazi se na listi zabranjenih aktivnih supstanci u proizvodima za zaštitu bilja koja su u prometu u Republici Srbiji (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>), (Lista aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci za koje postoji odluka o neodobravanju na nivou Evropske unije, a koje su u prometu u



Republici Srbiji). U EU i u Srbiji njegova upotreba i distribucija je zabranjena. Prema spisku klasifikovanih supstanci u skladu sa Pravilnikom o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda (Sl. glasnik RS, 59/10, 25/11 i 5/12), trifluralin je obeležen znakom opasnosti Xn kao štetan i znacima rizika R40 (organičena saznanja o karcinogenom efektu) i R43 (može izazvati senzibilizaciju u kontaktu sa kožom) i oznakom opasnosti N kao opasan po životnu sredinu i oznakom rizika R50/53 što podrazumeva veoma toksičnu supstancu za vodene organizme koja može izazvati dugotrajne štetne efekte u vodenoj životnoj sredini. 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, 105/13), za klase opasnosti karcinogenost, senzibilizacija kože i opasnost po vodenu životnu sredinu, trifluralin je obeležen odgovarajućim obaveštenjima o opasnostima (H351, H317, H400 i H410).

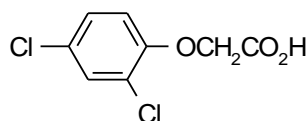
### Sintetički auksini

Sintetički auksini predstavljaju grupu hemijskih jedinjenja koja se koristi u poljoprivredi u svojstvu herbicida ili regulatora rasta. To su jedinjenja koja „imitiraju” dejstvo prirodnog biljnog auksina, indol-3-sirćetne kiseline (Janjić, 1994; Woodward i Bartel, 2005). Auksini (od gr. auxein = rasti) su grupa biljnih hormona koji regulišu ćelijsku deobu i izduživanje, ali i mnoge procese u razviću, uključujući diferencijaciju tkiva, inicijaciju listova, filotaksije, starenje, apikalnu dominaciju i rast korenova (Grossman, 2010). Sintetički hormoni su duže-živeći od prirodnih hormona zahvaljujući većoj stabilnosti u tkivu biljke, samim tim su i jačeg intenziteta delovanja (Grossmann, 2010). Prema svojoj hemijskoj strukturi sintetički auksini obuhvataju širok spektar jedinjenja koja su mogu svrstati u pet grupa: derivati fenoksisirćetne kiseline (2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina, 2,4 D), derivati benzojeve kiseline (dikamba), derivati piridin karboksilne kiseline (pikloram), aromatični karboksimetil derivati, derivati hinolin karboksilne kiseline (Slika 4).

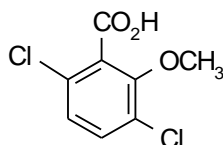


Slika 4. Hemijska struktura prirodnog (IAA) i sintetičkih auksina koji pripadaju različitim hemijskim grupama (Grossmann, 2010).

Strukturne formule sintetičkih auksina 2,4 D (2,4-dihlorofenoksisirćetne kiseline) i dikamba (3,6-dihloro 2-metoksibenzojeve kiseline) su prikazane na slikama 5 i 6.



Slika 5. Strukturna formula 2,4-dihlorofenoksisirćetne kiseline (2,4 D) (Tomlin, 2009)



Slika 6. Strukturna formula 3,6-dihloro 2-metoksibenzoeve kiseline – dikamba (Tomlin, 2009)

Prema podacima Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA) 2,4 D se brzo razlaže u zemljištu (poluživot 6.2 dana) i u aerobnoj vodenoj sredini (poluživot 15 dana), a relativno je perzistentan u anaerobnoj vodenoj sredini (poluživot varira između 41 i 333 dana). Za razlaganje 2,4 D kiseline smatra se da su najzaslužniji mikroorganizmi u zemljištu i fotodegradacija u vodi (EC, 2005). 2,4 D kiselina se dobro rastvara u vodi i pokazuje mali afinitet ka vezivanju za zemljište i sediment i zbog toga se smatra veoma mobilnom (Walters, 1999). Međutim, zbog velikih primenjenih količina i konstantnog spiranja sa obradivog zemljišta, 2,4 D se redovno detektuje u površinskim vodama. Prema najnovijim podacima monitoringa slivnog područja Dunava (ICPDR, 2015) koncentracije 2,4 D u Dunavu se kreću od 0 do 0,02 µg/l. Soli dikambe se brzo razlažu do oblika slobodne kiseline. Pod aerobnim uslovima u tretiranom zemljištu dikamba se brzo razlaže od strane mikroorganizama u procesu O-demetilacije. Izračunat poluživot dikambe u laboratorijskim uslovima u zemljištu varira od 21 do 26 dana na temperaturi 20-25°C (Zarn i Boobis, 2011). Neke studije pokazuju da u sterilnom zemljištu ne dolazi do razlaganja dikambe ni posle 9 nedelja što upućuje na činjenicu da mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u razlaganju dikambe u zemljištu. Koeficijent vezivanja za zemljište kreće se od 0.0 do 0.8 što ukazuje na veliku mobilnost dikambe (Ochsner i sar, 1991-1997 – cit. [www.npic.orst.edu/](http://www.npic.orst.edu/)). Zahvaljujući selektivnom dejstvu sintetičkih auksina prema dikotiledonim biljkama kao i sistemskoj translokaciji (mobilnosti) unutar njih, ovi herbicidi se nalaze među najuspešnijim koji se više od 60 godina koriste u poljoprivredi (Cobb i Reade, 1992 – cit. Grossman, 2000). Kada su sintetički auksini prisutni u malim koncentracijama, stimulišu veći broj procesa u rastu i razviću biljke, dok u povišenim koncentracijama kod osetljivih biljaka dovode do inhibicije i deformacije istih, pa i uvenuća same biljke (Cobb i Reade, 1992 – cit. Hansen i Grossmann, 2000; Grossmann 2010). Kada se analizira vremenski tok događaja, proces deregulacije biljnog rasta usled povećanih koncentracija sintetičkih auksina može se podeliti u tri faze (Rodić, 2013): fazu stimulacije, fazu inhibicije i fazu propadanja.

2,4 D i dikamba se nalaze na listi odobrenih supstanci u Srbiji tj. listi „Aktivne supstance za koje se smatra da su odobrene u skladu sa važećim propisima Evropske unije“ (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>). Prema spisku klasifikovanih supstanci u skladu sa Pravilnikom o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda (Sl. glasnik RS, 59/10, 25/11 i 5/12), 2,4 D je obeležena znakom opasnosti Xn i oznakama rizika R22 što ukazuje na štetno delovanje ako se proguta, R37 (iritativno za respiratorne organe), R41 (rizik od teškog oštećenja oka) i R43 (može izazvati senzibilizaciju u kontaktu sa kožom), dok je

dikamba obeležena kao štetna, sa znakom opasnosti Xn i oznakama rizika R22 (štetno ako se proguta), R41 (rizik od teškog oštećenja oka). Obe supstance obeležene su i sa R52/53 što podrazumeva štetne supstance za vodene organizme koje mogu izazvati dugotrajne štetne efekte u vodenoj životnoj sredini. 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, 105/13), za klase opasnosti akutna toksičnost, specifična toksičnost – jednokratna izloženost, oštećenje oka, senzibilizacija kože i opasnost po vodenu životnu sredinu (hronično), 2,4 D je obeležena odgovarajućim obaveštenjima o opasnostima (H302, H335, H318, H317 i H412). U skladu sa GHS sistemom dikamba je, za klase opasnosti akutna toksičnost, teško oštećenje oka i opasnost po vodenu životnu sredinu (hronično) obeležena sledećim obaveštenjima o opasnosti: H 302, H318 i H412.

## 2.2. Ekološka procena rizika

Procena rizika u najširem smislu podrazumeva kvalitativno i kvantitativno određivanje rizika vezanog za konkretnu situaciju ili pretnju (hazard), a obuhvata dve komponente – determinističku – količinu (veličinu) štete ili gubitka materijalnog dobra i probabalističku – verovatnoću pojave štete ili gubitka. Svaki pojedinac praktično svakodnevno, na individualnom nivou i mikroskali, procenjuje rizik u različitim životnim situacijama, a u formalnom smislu, kvalitativna i kvantitativna procena rizika je nezaobilazan segment pažljivog planiranja projekata i različitih poslovnih aktivnosti, najčešće u sferi transporta, trgovine, finansija, bankarstva i osiguranja.

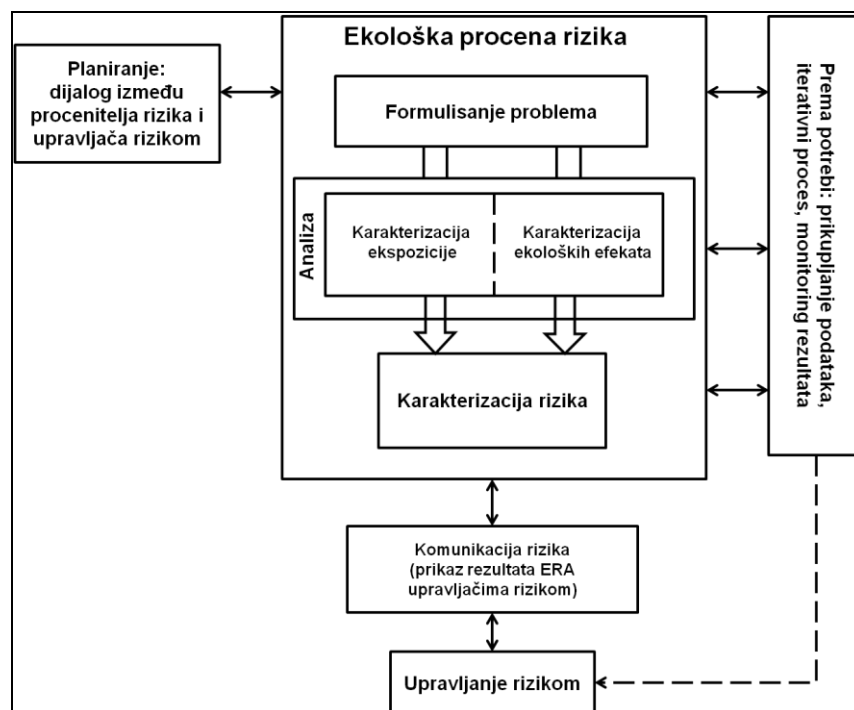
U oblasti zaštite životne sredine, ekološka procena rizika (ERA) je formalizovana sada već pionirskim Okvirom za ekološku procenu rizika Američke Agencije za zaštitu životne sredine (US EPA, 1992) kao “procena verovatnoće da se negativni ekološki efekti pojavljuju ili da se mogu pojaviti kao posledica izlaganja jednom ili većem broju stresora”. Ovakva definicija sama po sebi implicira da ERA može biti preventivna i retrospektivna. Preventivna procena rizika podrazumeva procenu potencijalnog uticaja planiranih pritisaka ili različitih novih stresora na životnu sredinu. U slučaju regulisanih hemikalija to znači procenu uticaja hemikalija pre njihovog stavljanja u promet, u cilju prevencije neprihvatljivog rizika za prirodne populacije i ekosisteme. Retrospektivna procena rizika podrazumeva procenu stanja životne sredine, ekološkog statusa i ekosistemskog integriteta u uslovima antropogenih pritisaka različitih tipova, što je čini kontrolnim mehanizmom kojim se ocenjuje delotvornost upravljačkih mera u oblasti zaštite životne sredine.

Vodič za ekološku procenu rizika (US EPA, 1996) bliže objašnjava ERA kao “proces organizovanja i analize podataka, informacija, pretpostavki i nesigurnosti u cilju procene verovatnoće pojave negativnih ekoloških efekata”. Ekološka procena rizika predstavlja ključni element integrisanog upravljanja zaštitom životne sredine, jer upravljačima rizikom (rizik menadžerima) pruža dragocene naučno-zasnovane informacije koje se pri donošenju odluka integrišu sa socijalnim, pravnim, političkim i ekonomskim aspektima zaštite životne sredine (US EPA, 1996).

Ekološka procena rizika je složen proces kojim se bave specijalisti za oblast procene rizika (procenitelji rizika), a obuhvata tri ključne faze:

1. formulaciju problema, koja obuhvata identifikaciju ciljeva i parametara za procenu kao i razvoj konceptualnog modela i plana analize;
2. analizu, koja obuhvata procenu izloženosti i utvrđivanje veze između stresora i biološkog (ekološkog) efekta;
3. karakterizaciju rizika, koja je ključni segment ERA, a podrazumeva integraciju izloženosti i efekta, uz pažljivo sagledavanje svih činjenica i nesigurnosti.

Konceptualni dijagram najvažnijih koraka u ekološkoj proceni rizika može se (prema US EPA, 1996) šematski prikazati na slici 7.



Slika 7. Najvažniji koraci u ekološkoj proceni rizika (ERA)

Dobra komunikacija između procenitelja rizika i upravljača rizikom je veoma važna za sam proces ERA i uključivanje rezultata ERA u upravljačke mere u oblasti zaštite životne sredine. Najvažnije je pri samom planiranju procesa ERA definisati ciljeve zaštite, da bi se precizno odredili biološki odgovori i specifični parametri za procenu ekološkog efekta, što predstavlja preduslov za preciznu i pouzdanu karakterizaciju rizika.

### 2.2.1. Ekološka procena rizika od hemikalija

U ekološkoj proceni rizika od hemikalija, rizik se karakteriše koeficijentom hazarda (HQ) koji formalno predstavlja odnos procenjenog nivoa ekspozicije (PEC) i potencijalnog ekološkog (biološkog) efekta (PNEC), odnosno:

$$HQ = PEC/PNEC.$$

Ukoliko je vrednost koeficijenta hazarda manja od 1, odnosno, ako su očekivane koncentracije hemikalije niže od koncentracija bez efekta, smatra se da je ekološki rizik od primene predmetne supstance prihvatljiv. Obrnuto, ukoliko je vrednost HQ viša od 1, odnosno, ako su očekivane koncentracije predmetne supstance više od koncentracija bez efekta, smatra se da rizik nije prihvatljiv, što obično implicira planiranje i primenu niza mera za umanj enje ekološkog rizika od predmetne supstance.

Skraćenica PEC (engl. *Predicted Environmental Concentration*, PEC) predstavlja procenjenu očekivanu koncentraciju supstance u životnoj sredini do koje se stiže merenjem (monitoringom, posebno kod retrospektivne ERA) ili kompleksnim modelovanjem (najčešće kod preventivne ERA). Očekivane koncentracije neke supstance u životnoj sredini zavise od njenih fizičko-hemijskih osobina (koje uslovljavaju sudbinu i ponašanje supstance u različitim medijumima životne sredine), količina i načina primene i mnogih drugih faktora. Vrednost PNEC (engl. *Predicted No Effect Concentration*, PNEC) predstavlja koncentraciju bez efekta, odnosno, koncentraciju supstance koja ne dovodi do negativnih efekata u biološkim sistemima, bilo kojeg stepena biološke organizacije. Vrednosti PNEC izvode se iz rezultata najosetljivijeg od serije dostupnih ekotoksikoloških testova uz primenu takozvanog faktora sigurnosti (engl. *safety factor* – SF).

Regulatorna tela, kao i stručna i naučna javnost ulažu velike napore usmerene ka poboljšanju već postojećih i razvoju novih metoda koje se primenjuju u ekološkoj proceni rizika. Najviše napora se ulaže u razvoj, validaciju i verifikaciju matematičkih modela za procenu emisije, sudbine i ponašanja supstanci i njihovih smeša, ali i modelovanje ekoloških efekata na višim nivoima biološke organizacije koje zapravo i jesu predmet zaštite, a to su populacije, životne zajednice i ekosistemi (Schmolke i sar, 2010).

Međutim, procena bioloških (ekoloških) efekata se godinama, u najvećoj meri konzervativno oslanjala na rezultate standardizovanih (eko)toksikoloških laboratorijskih testova na relativno malom broju odabranih reprezentativnih vrsta iz različitih trofičkih nivoa za vodenu i ne-vodenu životnu sredinu i ekstrapolaciju dobijenih rezultata na sve potencijalno ugrožene vrste i više nivoe biološke organizacije – populacije, životne zajednice i ekosisteme (Teodorović i Kaišarević, 2014). Najveći izazov u ekološkoj proceni rizika je dostizanje zadovoljavajućeg nivoa ekološkog i ekosistemskog realiteta. Osnovni razlog zbog koga trenutno relativno konzervativna ERA trpi ozbiljne kritike naučne i stručne javosti je nemogućnost da se rezultati dobijeni standardnim laboratorijskim testovima ekstrapoliraju na prirodne uslove životne sredine i omoguće pouzdanu procenu dugotrajnih efekata na više nivoe biološke organizacije – prirodne populacije i ekosisteme (Newman i sar, 2006).

Brojni faktori uslovljavaju toksičnost supstanci u biološkim sistemima i time usložnjavaju i otežavaju procenu rizika. Samo neki od njih su koncentracija supstanci, dužina perioda ekspozicije, međusobna interakcija supstanci i smeša u inače, veoma dinamičnim ekosistemima (Holvoet i sar, 2007). Drugi faktori koji usložnjavaju procenu rizika podrazumevaju potrebu za određivanjem efekata na nivou zajednica i populacija, odabir adekvatnih bioloških odgovora, vrsta i testova, uključivanje otpornosti i mogućnosti oporavka ekosistema u procenu rizika i drugo (<http://www.eea.europa.eu/> – cit. Suter, 1993).

Budući da je eksperimentima nemoguće u potpunosti imitirati uslove u prirodnim ekosistemima, konstruišu se uprošćeni i nesavršeni modeli na osnovu kojih se aproksimacijom na životnu sredinu, grubo procenjuje ili predviđa uticaj. Teži se tome da testovi koji se primenjuju u proceni rizika imaju visoku ekološku relevantnost i obezbede što realniju procenu efekta na funkcionisanje celokupnog ekosistema. Sa te tačke gledišta, poželjno je predvideti efekat na ekološki značajne grupe organizama i obuhvatiti sve trofičke nivoe (mikroorganizme, primarne producente, biljojede, mesojede), ili vrste koje su graditelji ekosistema, kao što su npr. predstavnici akvatičnih makrofita (Brock i sar, 2006).

Sa ciljem što tačnijeg predviđanja efekta ksenobiotika na organizme u vodenoj sredini i pouzdanije procene rizika, stručnjaci iz oblasti razvijaju nove i usavršavaju već postojeće metode (Maltby, 2010). U ekološkoj proceni rizika moguća je:

1. primena testova na pojedinačnim organizmima,
2. primena model ekosistema (mikro- i mezokosmos sistema) koji podrazumevaju kompleksnije i obimnije testove uz obuhvatanje praćenja efekta test supstanci na više test organizma, najčešće predstavnika glavnih trofičkih nivoa,
3. primena modela „raspodele osetljivosti vrsta“.(eng. „*species sensitivity distribution model*“, SSD model) koji podrazumeva analizu osetljivosti većeg broja vrsta (najmanje 8) za istu supstancu na osnovu koje se može izračunati hazardna koncentracija (HCp) – koncentracija koja utiče na određeni procenat najosetljivijih vrsta i odrediti granična bezbedna koncentracija za datu supstancu koja ne ugrožava određeni procenat najosetljivijih vrsta u ekosistemu (Newman i sar, 2000, Wheeler i sar, 2002).

Međutim, u narednom periodu se očekuje puna integracija matematičkog modelovanja u ekološku procenu rizika, jer se smatra da se efekti na višim nivoima biološke organizacije, zbog ograničenog ekstrapolacionog potencijala laboratorijskih i mezokosmos testova, mogu predvideti sa većim stepenom pouzdanosti primenom toksikokinetičkih/toksikodinamičkih modela (TK/TD modeli), modelima energetskeg budžeta (DEB modeli), populacionim modelovanjem i složenim modelovanjem na nivou životnih zajednica i ekosistema (tzv. *food-web* modeli) (EFSA, 2013).

### 2.2.1.1. Ekološka procena rizika od pesticida

Zbog široke upotrebe i specifične namene u kontroli nepoželjnih organizama, pesticidi su izdvojeni u posebnu kategoriju u odnosu na ostale hemikalije i zahtevaju posebnu regulativu za njihovu kontrolu (<http://www.eea.europa.eu/>). Procedura za registraciju i stavljanje u promet aktivnih supstanci u Evropskoj uniji je uređena Uredbom Evropskog Parlamenta i Saveta o stavljanju u promet proizvoda za zaštitu bilja “Regulation (EC) No 1107/2009”, a na snazi su i propisi koji definišu neophodnu dokumentaciju za registraciju novih aktivnih supstanci i sredstava za zaštitu bilja ((EU) No 283/2013; (EU) No 284/2013). Za registraciju pesticida, Evropska komisija je ustanovila dvojni sistem koji podrazumeva davanje odobrenja za stavljanje u promet aktivnih supstanci na nivou EU, dok države članice daju odobrenja za stavljanje u promet proizvoda za zaštitu bilja koje sadrže te aktivne supstance. Pre stavljanja u promet pesticidi prolaze veoma detaljna ispitivanja, ali samo aktivne supstance, dok detaljna ispitivanja (eko)toksikoloških svojstava gotove formulacije (preparata) nisu obavezna (Teodorović i Kaišarević, 2014).

Procena rizika od pesticida na ne ciljane organizme i njihove prirodne populacije podrazumeva procenu na akvatičnim organizmima (beskičmenjaci, ribe, alge, biljke), terestričnim kičmenjacima (ptice i sisari), pčelama, artropodama, zemljišnim glistama i drugim beskičmenjacima zemljišta, ne ciljnim terestričnim biljkama i procenu aktivnosti mikroorganizama zemljišta (EFSA, 2013).

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 testove na višim stepenima (koji imaju viši nivo realiteta npr. dodatkom sedimenta, ili mikro- i mezokosmos sisteme).

Obavezni testovi za sve aktivne supstance u proceni rizika na akvatične organizme su testovi akutne toksičnosti na dve vrste riba (pastrmka i jedna toploводna vrsta), vrsti kladocere

(*Daphnia* sp.), kao i test hronične toksičnosti na jednoj vrsti zelene alge. U specifičnim slučajevima zahtevaju se i testovi hronične toksičnosti na insektima, kladocerama, ribama i makrofitama. U proceni rizika „višeg stepena“ neophodne su i mikro i mezokosmos studije.

Za karakterizaciju rizika u ekološkoj proceni rizika od pesticida (posebno u vodenoj životnoj sredini) najčešće se izračunava tzv. *TER* vrednost (eng. *toxicity to exposure ratio*), koja podrazumeva odnos potencijalne toksičnosti supstance za određenu grupu organizama i ekspozicije ili izlaganja supstanci, odnosno:

$$TER = \text{toksičnost (LC/EC/IC}_{50})/\text{ekspozicija (PEC)}.$$

Potencijalna toksičnost za ne-ciljne organizme se dobija na osnovu rezultata laboratorijskih testova toksičnosti i izražava kao srednja letalna ( $LC_{50}$ ) ili srednja efektivna/inhibitorna koncentracija ( $EC_{50}$ ;  $IC_{50}$ ) tokom unapred definisanog perioda (Teodorović i Kaišarević, 2014).

Izlaganje (ekspozicija) podrazumeva očekivane koncentracije u životnoj sredini (eng. *predicted environmental concentration*, *PEC*). Očekivane koncentracije u životnoj sredini se u retkim slučajevima dobijaju direktnim merenjima koncentracija supstance (kao i njenih metabolita i degradacionih proizvoda u životnoj sredini), a najčešće i uobičajeno složenim matematičkim modelima – koji zahtevaju poznavanje fizičko-hemijskih osobina supstanci, ali i informacije o nameni, količinama, načinu i učestalosti primene pesticida itd. U cilju usklađivanja načina izračunavanja *PEC* vrednosti ili očekivanih koncentracija pesticida u životnoj sredini, Evropska komisija je osnovala organizaciju „*FOCUS*“ <http://focus.jrc.ec.europa.eu/>. „*FOCUS*“ je skraćenica od “Forum for the co-ordination of pesticide fate models and their use” i označava organizaciju i radne grupe koje koordinišu razvojem i primenom matematičkih modela i simulacija različitih scenarija za izračunavanje očekivanih koncentracija supstanci u životnoj sredini za različite tipove ekosistema i utvrđene zone u Evropi. Modeli podrazumevaju standardne metode koje uključuju sudbinu, ponašanje aktivnih supstanci i metabolita, učestalost primene pesticida i njihov potencijal da dospeju u podzemne i površinske vode različitim procesima (raspršivanje, ispiranje i spiranje). Modeli se neprestano usavršavaju i neretko zamenjuju novim.

Za svaku od grupa organizama (na primer beskičmenjaci, ribe, alge, makrofite) propisan je odgovarajući faktor sigurnosti, prag ili „*trigger*“ vrednost sa kojom se izračunata *TER* vrednost poredi. Na primer, prag za testove akutne toksičnosti je 100, dok je prag za testove hronične toksičnosti i testove na algama i vodenim makrofitama 10. Rizik se karakteriše poređenjem *TER* vrednosti sa definisanim pragom, odnosno, poređenjem ovih vrednosti se odlučuje o prihvatljivosti ili neprihvatljivosti rizika. Ako je *TER* vrednost manja od praga, rizik nije prihvatljiv i obrnuto.

Kada je *TER* vrednost za jednu ili više vrsta ispod praga, pristupa se višim nivoima procene rizika prema kojima se predlažu dodatne složenije mikro ili mezokosmos studije. Pored uslozňavanja strukture ekotoksikoloških testova neophodnih za procenu ekoloških efekata, u višim stepenima ekološke procene rizika primenjuje se i stepenasta struktura tzv. *FOCUS* koraka (koraci 1 do 4, od jednostavnih ka složenijim i detaljnijim) za korekciju *PEC* vrednosti. Ukoliko i veoma specifični scenariji dobijeni *FOCUS* modelima ukažu na postojanje rizika, primenjuju se različite mere ublažavanja rizika (kao što su npr. zaštitni pojasevi vegetacije u blizini mesta primene ili zone bez upotrebe sredstava za zaštitu bilja), o kojima odlučuju države članice EU na osnovu nacionalnih propisa.



U procesu registracije herbicida i regulatora rasta, obavezni početni koraci procene rizika su testovi na vrsti planktonskih zelenih algi (OECD 201, 2011) i vrsti roda *Lemna* (vrste *Lemna minor* i *Lemna gibba*) (OECD 221, 2006), kao predstavnicima primarnih producenata. Kada je  $TER < 10$  za *Lemna* test, potrebno je razmotriti testiranje na drugim vrstama akvatičnih makrofita na „višim nivoima“ procene rizika ((EC) No 1107/2009).

Vodič koji sadrži tehnička uputstva za procenu rizika od sredstava za zaštitu bilja na kom je do nedavno bazirana procena na akvatične ekosisteme “Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC” (SANCO, 2002a) je trenutno pod revizijom, ali ne u formi jedinstvenog dokumenta kao do sada, jer su naučna saznanja i razvoj u oblasti usloveli potrebu za kompleksnijim pristupom ERA. Revidiranim vodičem Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority EFSA*) za stepenasto organizovanu procenu rizika od pesticida za vodene ekosisteme u neposrednoj blizini obradivih površina (EFSA, 2013), obuhvaćene su samo vrste vodenog stuba, dok će zajednice dna biti obuhvaćene posebnim vodičem. Takođe je u planu i vodič za primenu matematičkih modela u proceni efekta pesticida na višim nivoima biološke organizacije. Do sada upotrebljavana *PNEC* vrednost – predviđena koncentracija bez efekta (eng. *predicted no effect concentration*), zamenjuje se RAC vrednošću koja se odnosi na regulatorno prihvatljivu koncentraciju (eng. *regulatory acceptable concentrations*). U odnosu na prethodni SANCO vodič (2002) za akvatične ekosisteme, EFSA vodič (2013) je složeniji i sveobuhvatniji.

Poslednjih godina se model distribucije osetljivosti vrsta (SSD model) koristi u proceni rizika od pesticida, a preporučuje se i za određivanje standarda kvaliteta životne sredine za prioritetne polutante (TGD-EQS, 2011 cit – Teodorović i Kaišarević, 2014). Prema EFSA vodiču (2013) u početnim stepenima procene rizika (nivo 1 – eng. *tier 1*) određivanje regulatorno prihvatljivih koncentracija bazira se na standardnoj *Lemna* vrsti. Na višim nivoima procene rizika (eng. *higher tier*) kada vrste roda *Lemna* i alge koje se upotrebljavaju kao standardni organizmi nisu osetljive na testirani herbicid (odnosno imaju vrednosti  $IC_{50}$  iznad 1 mg/l), ili ako je herbicid auksin simulator, potrebno je uraditi dodatni test na ukorenjenoj akvatičnoj makrofiti, vrsti roda *Myriophyllum* ili *Glyceria*. U višim stepenima procene rizika (nivo 2 – eng. *tier 2*), pored dodatnih testova na ukorenjenim makrofitama preporučuje se i upotreba ne-eksperimentalnih tehnika, kao što su *Geomean* i SSD model (EFSA, 2013). *Geomean* tehnika (eng. *Geometric mean (Geomean) assessment factor (AF) approach*) se preporučuje ako je iz dostupne literature upotrebljivo manje od 8 podataka/vrsta po supstanci, dok je za 8 i više podataka preporučljiv SSD model. Uslov postojanja 8 vrsta za generisanje SSD se teško može dostići za akvatične makrofite (Giddings i sar, 2012), jer je broj podataka koji se tiče toksičnosti velikog broja pesticida na akvatične makrofite koje nisu obuhvaćene standardima ograničen.

### 2.2.2. Procena rizika i karakterizacija sedimenta

Zaštita i upravljanje vodama u zemljama Evropske unije zasniva se na Okvirnoj direktivi o vodama (engl. *Water Framework Directive, WFD*) (Directive 60/EC2000). Na osnovu Okvirne direktive o vodama, odgovornost država članica bila je dostići „dobar status” površinskih, podzemnih voda i zaštićenih zona do 2015. godine. „Dobar status“ podrazumeva dobar ekološki i dobar hemijski status. Direktivom o vodama regulisano je i uspostavljanje hemijskih standarda kvaliteta (engl. *Environmental Quality Standards, EQS*) za vodu, sediment i vodene organizme. Standardi kvaliteta (dati kao dvojne vrednosti – prosečne godišnje i maksimalno izmerene koncentracije) su propisane maksimalno dozvoljene koncentracije prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci u vodi, sedimentu i bioti. Poređenjem izmerenih koncentracija prioriternih supstanci u životnoj sredini se, sa odgovarajućim standardom kvaliteta, ukazuje na postojanje, ili nepostojanje hemijskog stresa i određuje hemijski status vodnih tela, kao dobar – kada su koncentracije svih prioriternih supstanci ispod vrednosti EQS, ili loš – kada koncentracija bilo koje prioriterni supstance prelazi vrednosti EQS (Teodorović i Kaišarević, 2014).

Direktivom 2008/105/EC je bila propisana prva lista prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci sa 33+8 hemikalija i jedinjenja sa standardima kvaliteta (EQS) za te supstance. Između ostalih, na listi su i neki pesticidi: alahlor, atrazin, hlorfevinfos, hlorpirifos, heksahlorbenzen, diuron, endosulfan (alfa-endosulfan), heksahlorcikloheksan ( $\gamma$ -izomer lindan), izoproturon, simazin i trifluralin (Teodorović i Kaišarević, 2014; [www.cecra.dh.pmf.uns.ac.rs](http://www.cecra.dh.pmf.uns.ac.rs)). Lista prioriternih polutanata se stalno revidira, te je predlogom proširenja liste “COM(2011)876” (EC, 2011) inicijalnoj listi dodato još 15 (od kojih 6 prioriternih hazardnih) supstanci, među kojima i herbicidi: aklonifen, bifenoks; insekticidi: cipermetrin, dikofol, heptahlor i fungicid kvinofen. Prema planu Evropske komisije, za nove supstance na listi razviće se standardi kvaliteta do 2018. godine, sa ciljem da se dostigne dobar hemijski status za ove supstance do 2027. godine. Revidirani su i standardi kvaliteta za supstance sa inicijalne liste, uključeni su u planove upravljanja rekama u 2015. godini, sa ciljem dostizanja dobrog hemijskog statusa površinskih voda do 2021. godine. Sastavljena je i lista na kojoj su tri farmaceutska preparata (dva hormonska i analgetik diklofenak), kao lista supstanci na koje treba obratiti pažnju jer rizik od njih u budućnosti može biti velik i koje se mogu uskoro naći na listi prioriternih supstanci (eng. „*watch list*“).

Za određivanje standarda kvaliteta površinskih voda i sedimenta neophodni su pouzdani podaci iz ekotoksikoloških testova o akutnoj i hroničnoj toksičnosti supstanci za po minimum jednu vrstu iz grupe algi i makrofita, dafnija i riba (Teodorović i Kaišarević, 2014). Parametri akutne toksičnosti su srednja letalna ili srednja efektivna vrednost ( $LC_{50}$  ili  $EC_{50}$ ), dok su parametri hronične toksičnosti najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat (NOEC vrednosti (engl. *no observed effect concentration*), (Crane i sar, 2007). Da bi se odredila maksimalna godišnja akutna i hronična toksičnost, uvode se faktori sigurnosti (10, 100 i dr.). Maksimalne dozvoljene koncentracije su označene kao PNEC (eng. *predicted no effect concentration*).

Drugi način određivanja standarda kvaliteta (ili PNEC vrednosti) je upotrebom modela distribucije osetljivosti vrsta (SSD), pri čemu su neophodni podaci o hroničnoj toksičnosti iz osam taksonomskih grupa i minimum deset NOEC vrednosti iz ekotoksikoloških testova.

Zakon o vodama Republike Srbije (Sl. glasnik RS, 30/10) je u velikoj meri usaglašen sa WFD (Teodorović i Kaišarević, 2014), a prioritete supstance su regulisane Uredbom o graničnim vrednostima prioriteta i prioriteta hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje (Sl. glasnik RS, 35/11). Prema Zakonu o vodama (Sl. glasnik RS, 30/10) dobar hemijski status površinske vode i sedimenta, između ostalog, podrazumeva i to da koncentracije prioriteta supstanci ne prekoračuju propisane kriterijume kvaliteta.

Metodologija procene rizika od potencijalno štetnih supstanci po akvatične organizme u sedimentu nije još dovoljno razvijena.

Sediment je specifičan medijum, jer je rezpozitorijum ili skladište i izvor zagađujućih materija (Teodorović i Kaišarević, 2014). Sadrži organske i neorganske materije istaložene ili vezane za sediment koje su vrlo često perzistentne tj. sporo biodegradabilne. U zavisnosti od sadržaja organske materije, sulfida, veličine čestica, strukture sedimenta i drugih fizičko-hemijskih uslova sredine, supstance u sedimentu mogu da budu manje ili više biodostupne, te mogu biti značajan izvor kontaminacije (Knauer i sar, 2008; Teodorović, 2003).

Procena toksičnosti sedimenta je važan aspekt ekološke procene rizika i neophodna je za postizanje ciljeva Direktive o vodama (Höss i sar, 2010). Ignorisanjem specifičnih osobina sedimenta kao skladišta i izvora toksičnih supstanci, može doći do grešaka u proceni ekotoksikološkog statusa voda i sedimenta (Förstner, 2002 cit. – Höss i sar, 2010). Zbog osobine sedimenta da prima i deponuje zagađenje koje potiče iz velikog broja tačkastih i rasutih izvora zagađenja (Teodorović i Kaišarević, 2014), otežano je jasno definisanje prirodnog nivoa zagađenosti sedimenta poreklom od specifičnog hemijskog sastava podloge i identifikacija glavnih polutanata antropogenog porekla.

Smatra se da koncentracije supstanci u sedimentu u većoj meri variraju u prostoru (vertikalno i horizontalno) nego vremenski ili sezonski (Suter, 2007). Takođe, može se reći da tokom životnog ciklusa većine bentosnih beskičmenjaka, koncentracije supstanci na jednom lokalitetu neznatno variraju. Iako je sediment relativno stabilan medijum, sezonske promene mogu uticati na biodostupnost i toksičnost supstanci koje su u sedimentu (Suter, 2007). Heterogenost sedimenta, različit sadržaj organske materije i granulometrijske strukture značajno utiču na biodostupnost supstanci, što dodatno usložnjava procenu rizika toksičnosti sedimenta.

Većina akvatičnih organizama čija je aktivnost vezana za sediment je pretežno u kontaktu sa površinskim slojem sedimenta (5-10 cm), te se pretpostavlja da su koncentracije zabeležene u površinskom sloju reprezentativne za procenu rizika za većinu bentičkih i epibentičkih organizama (organizama koji žive u i na površini sedimenta) (Suter, 2007). Specifičnost osobina sedimenta se ogleda i u tome što se često dešava da ukupne koncentracije polutanata u sedimentu, usled smanjene biodostupnosti supstanci, nisu ujedno i stvarne koncentracije ekspozicije kojima su organizmi čija je aktivnost vezana za sediment izloženi (Teodorović i Kaišarević, 2014).

Testovi na kontaminiranom sedimentu su slabije razvijeni od akvatičnih toksikoloških testova i postoji relativno mali broj standardnih metoda koje se tiču procene toksičnosti sedimenta (Suter, 2007). U retrospektivnoj proceni rizika, kontrola kvaliteta sedimenta podrazumeva kontaktne testove ukupne toksičnosti sedimenta, testove toksičnosti porne ili intersticijske vode i testove eluata (Teodorović i Kaišarević, 2014). Ovo omogućuje analizu različitih puteva ekspozicije (ingestijom ili respiracijom), (Suter, 2007).

Porna ili intersticijska voda je voda koja se nalazi između čvrstih čestica sedimenta, a upotrebljava se nakon što se ekstrahuje iz sedimenta centrifugiranjem ili drugim tehnikama

(Teodorović i Kaišarević, 2014). Testovi porne vode baziraju se na pretpostavci da su supstance koje su vezane za čvrstu fazu nedostupne, dok su supstance rastvorene u pornoj vodi dostupne za najveći broj bentosnih organizama. Intersticijska voda može da se testira korišćenjem standardnih akvatičnih metoda npr. na planktonskim vrstama (Suter, 2007, Teodorović i Kaišarević, 2014). Nedostatak ove metode je što se ekstrakcijom može uticati na biodostupnost kontaminanata.

Eluat je rastvor koji nastaje mešanjem vode i sedimenta, centrifugiranjem dobijene suspenzije i njenim filtriranjem ili dekantovanjem supernatanta nakon taloženja (Teodorović i Kaišarević, 2014). Način nastanka eluata je sličan procesima koji se dešavaju pri odmuljivanju i zato se testiranja eluata koriste pri planiranju remedijacionih zahvata (Suter, 2007; Teodorović i Kaišarević, 2014).

Organizmi koji borave u sedimentu u njemu usvajaju i hranu, što ih čini maksimalno izloženim potencijalno toksičnim supstancama. Fauna dna je grupa organizama koja je najosetljivija na hidrofobne supstance koje su vezane za čestice sedimenta (Kraaij et al, 2002 – cit. Suter, 2007). U testovima tzv „neporemećenog“ sedimenta u kojima se testira ukupna toksičnost sedimenta, koriste se tipične bentičke vrste. Smatra se da su ovi testovi ekološki relevantni jer oslikavaju sve relevantne puteve unosa supstanci (Teodorović i Kaišarević, 2014).

Dodatkom poznatih koncentracija supstance u prirodni ili sintetički sediment (eng. *sediment spiking*) kojem je organizam izložen, može se analizirati uticaj pojedinačnih supstanci ili smeša u sedimentu (ISO 16191, 2013).

Svi standardizovani testovi kontaktne toksičnosti su se dugo godina odnosili na animalne vrste (Höss i sar, 2010), konkretno, dve bentosne beskičmenjačke grupe (Tarazona i sar, 2013). Algalni i *Lemna* test su jedini testovi sa primarnim producentima pogodni za testiranje porne vode. Podaci o ekotoksičnosti svih klasa hemikalija na primarne producente dostupni su pretežno za vodenu fazu (obzirom na postavku i mogućnosti algalnih i *Lemna* testova). Kod definisanja standarda kvaliteta za sediment, primarni producenti se praktično, zbog oskudnosti podataka, ne uzimaju u obzir (Burton i sar, 2012; de Zwart i sar, 2006).

U našoj zemlji do nedavno nije bilo kontinualnog institucionalizovanog monitoringa sedimenta (CECRA, 2008). Podzakonski akt u Republici Srbiji kojim se reguliše kvalitet sedimenta je Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje (Sl. glasnik RS, 50/12). Rokovi za dostizanje graničnih vrednosti zagađujućih materija propisanih Uredbom određuju se u skladu sa dinamikom utvrđenom planovima upravljanja vodama, a najkasniji rok za njihovo dostizanje je decembar 2032. godine.

Uredbom o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje Republike Srbije (Sl. glasnik RS, 50/12), utvrđuju se granične vrednosti supstanci za ocenu statusa i trenda kvaliteta sedimenta: ciljna vrednost, maksimalno dozvoljena koncentracija i remedijaciona vrednost, kao i vrednosti zagađujućih materija koje se koriste pri izmuljivanju i dislokaciji sedimenta iz vodotoka, odnosno ciljna i remedijaciona vrednost, vrednost limita i verifikacioni nivo.

Ciljna vrednost (*c.v.*) predstavlja graničnu vrednost za koncentraciju zagađujuće supstance u sedimentu ispod koje su negativni uticaji na okolinu zanemarljivi i ona predstavlja dugoročni cilj kvaliteta sedimenta. Maksimalno dozvoljena koncentracija (MDK) je granična vrednost za koncentraciju supstance u sedimentu iznad koje su negativni uticaji verovatni. Ukoliko je prekoračena maksimalno dozvoljena koncentracija za bar jednu zagađujuću supstancu u zapremini od 25 m<sup>3</sup> sedimenta na datom lokalitetu, neophodno je inicirati istraživački

monitoring u okviru koga bi se utvrdilo da li postoje negativni ekotoksični efekti na rezidencijalnu biotu ([www.ekourb.vojvodina.gov.rs](http://www.ekourb.vojvodina.gov.rs)).

Remedijaciona vrednost je granična vrednost iznad koje postoji neprihvatljiv rizik za akvatičnu sredinu ili rizik prenošenja zagađenja putem akvatične sredine. Ukoliko je prekoračena remedijaciona vrednost za bar jednu zagađujuću supstancu u zapremini od 25 m<sup>3</sup> na datom lokalitetu, neophodno je razmotriti opcije dislokacije i/ili remedijacije sedimenta.

Postoji veći broj sistema klasifikacije sedimenta i standarda kvaliteta sedimenta.

Holandski sistem klasifikacije sedimenta podrazumeva pet klasa: 0 nezagađen, I i II neznatno zagađen, III zagađen, IV i IV+ izuzetno zagađen (NW4, Ministerie van V&W, 1998).

Prema De Deckere i saradnicima (2012) i MacDonald i saradnicima (2000), određeni su standardi kvaliteta sedimenta SQG: prag efekta TEC (eng. *threshold effect concentration*) i *Consensus 1* vrednost, koji predstavljaju granične koncentracije (supstanci ili grupe jedinjenja) ispod kojih efekat nije verovatan, kao i PEC vrednost (eng. *probable effect concentration*), i *Consensus 2* vrednost, koji predstavljaju granične koncentracije iznad kojih je efekat verovatan.

Prema Međunarodnoj komisiji za zaštitu reke Dunav (eng. *The International Commission for the Protection of the Danube River – ICPDR*) utvrđene su ciljne vrednosti ISQG (eng. *interim sediment quality guideline*) ili vrednosti iznad kojih je moguć uticaj i vrednosti PEL (eng. *probable effect level*) koje su vrednosti iznad kojih je uticaj na akvatične organizme verovatan.

Ciljnoj vrednosti (Sl. glasnik RS, 50/12), odgovaraju vrednosti *Consensus 1* vrednosti TEC, kao i vrednosti ISQG. Ove vrednosti imaju za dugoročni cilj dobar ekološki status i ispod ovih vrednosti štetan efekat nije verovatan. Vrednosti MDK (Sl. glasnik RS, 50/12), odgovaraju vrednosti *Consensus 2*, vrednosti PEC i PEL koje označavaju granične vrednosti iznad kojih je štetan efekat verovatan.

Postoji nedostatak podataka o koncentracijama jedinjenja i elemenata u sedimentu, kao i propisa i legislative ne samo u našoj zemlji, nego i u okviru Evropske unije (CECRA, 2008). Prema MacDonald i saradnicima (2000) standardi kvaliteta sedimenta razvijeni su za 28 hemikalija koje uključuju teške metale, arsen, policiklične aromatične ugljovodonike (PAH), polihlorovane bifenile (PCB) i pesticide.

U nastojanju da se pronađu metode za realniju procenu toksičnosti sedimenta, razvijen je konceptualni model za procenu sedimenta koji podrazumeva tri segmenta: hemijsku analizu, biomonitoring (analizu faune dna) i toksikološke testove. Ovo je tzv. TRIAD koncept (Chapman, 2007). Fizičko-hemijskom analizom sedimenta dolazi se do podataka o prisustvu i koncentraciji određenog broja polutanata (za koje se pretpostavlja da mogu biti prisutni u sedimentu), čije se izmerene koncentracije porede sa propisanim graničnim vrednostima standarda kvaliteta sedimenta (eng. *sediment quality guidelines SQG*) na osnovu čega se ukazuje na izloženost ekosistema hemijskom stresu. Analizom organizama koji žive na dnu vodenih ekosistema dobija se realnija slika o toksičnosti ukupnog sedimenta jer biološki sistemi oslikavaju biodostupnost identifikovanog, ali i uticaj neidentifikovanog zagađenja. Pored analize faune dna kao primarnih receptora, preporučuje se i analiza sekundarnih receptora, tj. zajednice koja je sledeća karika u lancima ishrane. Grupom laboratorijskih testova koji se određuju na osnovu biomonitoringa i rezultata hemijskih analiza se zaokružuje TRIAD pristup. Matrica TRIAD koncepta (iz Chapman, 2007 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2014) prikazana je u tabeli 1.

Nakon inicijalnih laboratorijskih testova, ako je potrebno može da usledi detaljnija ekotoksikološka analiza toksičnosti sedimenta: studije bioakumulacije, analiza odabranih specifičnih biomarkera, testovi toksičnosti sedimenta sa nestandardnim organizmima

relevantnim za sediment ili organizmima prisutnim u sedimentu, efektom usmerene analize (*EDA* pristup) itd. Međutim, treba imati u vidu da kombinacijom hemijskih i bioloških analiza, može doći do usložnjavanja procene toksičnosti sedimenta, jer može postojati neslaganje u rezultatima ova dva tipa analiza.

Koncept TRIAD je opšteprihvaćen, ali je zabeleženo i to da su se u većini studija koje su se oslanjale na principe TRIAD koncepta, morale uneti određene dopune (Suter, 2007). Evaluacija stepena zagađenja na osnovu TRIAD koncepta se uglavnom oslanja na ekspertsku procenu (Bay i sar, 2007 cit. – Teodorović i Kaišarević, 2014).

Tabela 1: SQT (*Sediment Quality TRIAD*) matrica (iz Chapman, 2007 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2014)

Hemijska analiza	Laboratorijski testovi toksičnosti	Analiza rezidencijalne biote (bentos)	Mogući zaključak
+	+	+	Čvrsti dokazi da je degradacija sedimenta uzrokovana zagađenjem – neophodne upravljačke mere
-	-	-	Čvrsti dokazi da nije doslo do degradacije sedimenta uzrokovano zagađenjem – upravljačke mere nisu potrebne
+	-	-	Toksične materije nisu biodostupne – nisu potrebne mere
-	+	-	Prisutne toksične materije koje se ne određuju redovnim monitoringom i/ili – mogu potencijalno dovesti do degradacije
-	-	+	Degradacija nije uzrokovana toksičnim polutantima, razlozi su drugi, nije potrebna remedijacija sedimenta
+	+	-	Prisutne toksične materije su biodostupne, ali <i>in situ</i> efekat izostaje – detaljnijim analizama proveriti uzroke toksičnosti sedimenta
-	+	+	Prisutne neke neidentifikovane toksične materije koje dovode do <i>in situ</i> efekta – proveriti uzrok, npr. <i>EDA</i> ili <i>TIE</i> pristupom
+	-	+	Toksične materije nisu biodostupne, <i>in situ</i> efekat nije uzrokovan toksičnim polutantima – naći druge uzroke

Tokom poslednje dve decenije, ekološka procena rizika sedimenta pobuđuje značajnu pažnju naučne i stručne javnosti.

Kvalitet sedimenta je dugi niz godina procenjivan na osnovu koncentracija poznatih polutanata i numeričkih standarda kvaliteta sedimenta (SQG) (Teodorović i Kaišarević, 2014). Na osnovu ovih kriterijuma procenjivan je i rizik od polutanata vezanih za sediment. Međutim, ključni aspekt upravljanja kvalitetom sedimenta je razumevanje biodostupnosti polutanata (Ahlf i sar, 2002), jer nivo koncentracije supstance koja je vezana za čestice sedimenta, ne mora biti i stvarni nivo koncentracije dostupne organizmima u sedimentu. Nedostatak primene standarda

kvaliteta sedimenta za pojedinačnu supstancu je i taj što se efekat na biološke sisteme uglavnom ispoljava dejstvom smeše supstanci, a ne dejstvom pojedinačnih supstanci. Standardi kvaliteta sedimenta jesu pogodni za procenu određenog hemijskog opterećenja, ali se njima omogućuje monitoring samo ograničenog broja supstanci koje dospevaju u sediment.

U okviru projekta Evropske hemijske agencije (eng. *European chemical agency – ECHA*) koji pruža finansijsku i tehničku podršku državama članicama i potencijalnim kandidatima za članstvo u EU održana je „Radionica o proceni rizika kontaminacije sedimenta“ u maju 2013. u Finskoj (ECHA, 2013). Cilj radionice bio je da kroz razmenu najnovijih naučnih saznanja stručnjaka iz sveta nauke, regulatornih tela i industrije, poboljša instrumente za procenu rizika kontaminacije sedimenta u slatkim i slanim vodama (<http://www.echa.europa.eu/>). Akcenat je bio na industrijskim hemikalijama (EC No 1907/2006), ali i biocidima (EU 528/2012; <http://www.eur-lex.europa.eu>) i sredstvima za zaštitu bilja.

U okviru nemačkog nacionalnog projekta pod nazivom „SekT“ (eng. „*The SeKT joint research project*“) razvijena je serija testova na većem broju vrsta iz glavnih funkcionalnih grupa organizama u sedimentu, pogodna za procenu ekotoksičnosti sedimenata (Höss i sar, 2010). U seriju kontaktnih testova toksičnosti uključeni su testovi na organizmima različitih trofičkih nivoa: na bakterijama, nematodama, valjkastim i člankovitim crvima, biljkama i ribama. Očekivano je da serija testova u kombinaciji sa analizom zajednice bentosa (zatečeno stanje) i hemijskom analizom uzoraka, realnije predstavi kvalitet sedimenta (Feiler i sar, 2004; Höss i sar, 2010). Zbog kompleksne strukture sedimenta koja uključuje čvrstu i tečnu fazu, serija testova pokazuje potencijal, jer se testiranjem organizama iz glavnih funkcionalnih grupa obezbeđuje procena različitih parametara, analiza različitih puteva ekspozicije i supstanci sa različitim mehanizmom toksičnog dejstva, procena kratkoročnih, kao i dugoročnih efekata (Feiler i sar, 2004; Höss i sar, 2010).

### 2.3. Akvatične makrofite u ekološkoj proceni rizika

Akvatične makrofite su fotosintetski organizmi različite filogenije, morfologije, fiziologije i životnih formi, koje pružaju stanište akvatičnim organizmima, igraju važnu ulogu u kruženju hranljivih materija, fizičkim procesima i stabilizaciji sedimenta u vodenim ekosistemima (Knauer i sar, 2006; Cedergreen i Streibig, 2005; Madsen i sar, 2001). Ekološka plastičnost i raznovrsnost morfologije akvatičnih makrofita omogućuje analizu velikog broja parametara u ekotoksikološkim studijama, uključujući morfološke, fiziološke i biohemijske.

Ekološka procena rizika od herbicida i regulatora rasta biljaka u vodenoj životnoj sredini po evropskim propisima ((EC) No 1107/2009), oslanja se na rezultate ekotoksikoloških testova izvedenim na reprezentativnim predstavnicima hidrobionata iz različitih trofičkih kategorija: ribe, beskičmenjaci i primarni producenti. Smatra se da u proceduri primarni producenti nisu u dovoljnoj meri zastupljeni i da samim tim, takva procena rizika ne pruža adekvatan nivo zaštite od rizika primarnim producentima u ekosistemima i da, posledično, ni akvatični ekosistemi u celini nisu u dovoljnoj meri zaštićeni od određenih tipova ksenobiotika (Van der Brink i sar, 2006; Maltby i sar, 2010).

Obavezan segment ekološke procene rizika i obavezan početni korak u registraciji herbicida (Teodorović i sar, 2012) predstavljaju test inhibicije rasta planktonskih zelenih algi (OECD 201, 2011) i *Lemna* test (OECD 221, 2006). Smatra se da su sočivice *L. minor* i *L. gibba* relativno dobri reprezentanti akvatičnih makrofita i danas one imaju široku primenu u proceni rizika velikog broja različitih polutanata u životnoj sredini.

Kombinacija njihovih pogodnih osobina podrazumeva: zadovoljavajuću osetljivost na većinu supstanci koje se mogu naći u životnoj sredini, široko rasprostranjenje i značajnu ulogu unutar hidroekosistema, nisku genetsku varijabilnost, visoki reproduktivni kapacitet, jednostavnost gajenja i održavanja u laboratoriji, kao i manipulaciju u testovima (Bengtsson i Triet, 1994; Taraldsen i sar, 1989 – cit. Bengtsson i Triet, 1994). Ove osobine čine *Lemna* vrste pogodnim za ekotoksikološke testove i do nedavno jednim standardizovanim test modelima – predstavnicima akvatičnih makrofita, na kojima se bazirala ekološka procena rizika od sredstava za zaštitu bilja i drugih regulatora rasta (Maltby i sar, 2010; OECD 221, 2006).

Pored upotrebe u Registraciji i stavljanju u promet pesticida ((EC) No 1107/2009), *Lemna* vrste se koriste i u drugim testovima u regulatorne svrhe: npr. u kontroli i upravljanju industrijskim hemikalijama. Vrste roda *Lemna* često nalaze primenu i u seriji WET testova (eng. *whole effluent toxicity*) – testova za procenu ukupne toksičnosti otpadnih voda (Blinova, 2000; Medonca i sar, 2007; Teodorović i Kaišarević, 2014). U istraživačkim studijama se, pored navedenih standardnih vrsta *L. minor* i *L. gibba*, koriste i drugi predstavnici roda: *L. trisulca*, *L. aequinoctialis* (Wang, 1990, Lewis, 1995, EPA 1996, DIN 2000, 2001, Eberius 2001, ISO, 2001, OECD 2002 – cit. Mkandawire i Dudel, 2007).

Zbog male veličine, relativno jednostavne strukture, aseksualne reprodukcije i kratkog generacijskog vremena, vrste roda *Lemna* su lake za održavanje u laboratoriji i zbog toga veoma pogodne za laboratorijska testiranja (Hillman, 1961, Wang, 1987, Smith i Kwan, Wang, 1990, 1989 – cit. Moody i Miller, 2005). U laboratorijskim uslovima se i decenijama mogu održavati uz vegetativno razmnožavanje (Wang, 1990). Pošto su malih dimenzija, za testove na njima nisu potrebni posebna oprema i velik prostor za gajenje i testiranje, a ipak, budući da su dovoljno velike za vizuelna zapažanja, efekti na njima se mogu uočiti i kvantifikovati bez upotrebe



mikroskopa. Zbog specifične morfologije vrsta, omogućeno je jednostavno merenje rasta na osnovu ukupne biljne površine. Takođe, korišćenjem ovih vrsta, omogućena su i ponovljena vizuelna opažanja nedestruktivnim metodama, posmatranje efekta u intervalima praćenjem parametara tokom testa: brojanje jedinki, merenje sveže mase, određivanje biljne površine itd. Pošto se vrste razmnožavaju vegetativno, stvarajući kolonije, mogu se pratiti populacioni parametri. Sočivice se mogu lako premeštati iz jednog u drugi rastvor tokom testa, što je posebno pogodno za praćenje još jednog, sa ekološkog aspekta, značajnog parametra – oporavka populacije nakon izlaganja (Arts i sar, 2008; Teodorović i sar, 2012). Takođe, vegetativnim rastom se genetska varijabilnost test organizma umanjuje, što ih čini pogodnim objektima u toksikološkim studijama (Hillman, 1961; Smith i Kwan, 1989 – cit. Moody i Miller, 2005).

Ipak, procena rizika samo na osnovu *Lemna* testova ne može se uvek primeniti za zaštitu ostalih makrofitskih vrsta, zbog specifičnosti vrsta roda *Lemna*. Vrste *L. minor* i *L. gibba* su monokotiledone biljke, neosetljive na pojedine herbicide sa specifičnim mehanizmom dejstva, rastu u kolonijama, sa kratkim generacijskim vremenom i razlikuju se u odnosu na ostale vodene biljke u stopi oporavka i načinu ekspozicije toksičnim supstancama (Hanson i sar. 2003).

Jedan od nedostataka primene vrsta iz roda *Lemna* u ekološkoj proceni rizika je i činjenica da je veliki broj pesticida u poljoprivrednoj praksi namenjen suzbijanju dikotiledonih vrsta biljaka, a predstavnici roda *Lemna* su monokotiledone vrste. Iako testovi na *Lemna* sp. pokazuju visoku osetljivost na veliki broj potencijalno toksičnih supstanci, pojedina istraživanja ukazuju i na njihovu manju osetljivost prema različitim grupama polutanata u odnosu na ukorenjene, submerzne vrste npr. u odnosu na vrste iz rodova *Ceratophyllum*, *Najas*, *Elodea* i *Myriophyllum*. Pokazale su manju osetljivost na dejstvo triazinskih, acetanilidnih ili hormonskih herbicida (Cedergreen i sar, 2004, 2005; Turgut i Fomin, 2002; Fairchild i sar, 1998).

Način ekspozicije takođe može predstavljati ograničavajući faktor, jer, budući da su u pitanju flotantne vrste, izloženost ksenobiotiku je samo donjom površinom biljke, za razliku od submerznih vrsta koje su celom površinom izložene test medijumu (Maltby i sar, 2010). Takođe, činjenica da su ove vrste neukorenjene i nemaju kontakt sa sedimentom, ograničava njihovu primenu u testovima toksičnosti, jer praćenje efekta ksenobiotika preko sedimenta nije moguće.

Kraći živoni ciklus vrsta roda *Lemna*, takođe može biti nepovoljna osobina u testovima procene rizika, jer se procenom na brzorastućoj sočivici, mogu zanemariti efekti na submerzne makrofite sporijeg rasta (Cedergreen i sar, 2005 – cit. Arts i sar, 2008).

Budući da je test na *L. minor* standardizovana metoda, postoje brojne studije koje se bave ispitivanjem toksičnosti različitih supstanci na ovoj vrsti, a relativno česte su i studije poređenja osetljivosti na toksične supstance, naročito u odnosu na ukorenjene makrofite (Teodorović i sar, 2012). Manja zastupljenost submerznih, ukorenjenih makrofita u ekotoksikološkim studijama proizašla je iz nepostojanja standardizovanih metoda za njihovu primenu (Belgers i sar, 2007).

Testovi na akvatičnoj vrsti *M. spicatum* su bili aktuelni i pre desetak godina (Bird i sar, 2003). Poslednjih nekoliko godina se intenziviraju istraživanja i na vrsti *M. aquaticum*, odnosno primenljivosti vrsta roda *Myriophyllum* u različitim test sistemima – u vodenoj fazi bez sedimenta na *M. aquaticum* i *M. spicatum* (Turgut i Fomin, 2002; Maletzki i sar, 2011), u sistemu voda-sediment sa *M. spicatum* i *M. aquaticum* (Knauer i sar, 2006), u sedimentu (kontaktni test toksičnosti sedimenta na *M. aquaticum*; Feiler i sar, 2004). Pored pomenutih vrsta, od predstavnika roda *Myriophyllum* u ekotoksikološkim istraživanjima su prisutne i vrste *M. verticillatum* i *M. sibiricum* (Knauer i sar, 2006; Knauer i sar, 2008).

Vrste roda *Myriophyllum* sp. su ukorenjene dikotiledone biljke, jednim delom tela su iznad vode, ali su značajnom površinom tela izložene vodenoj sredini, a prema istraživanjima

predstavljaju relativno osetljive test organizme (Turgut and Fomin, 2002; Turgut, 2007; Maltby i sar, 2010), te se mogu smatrati pogodnim za procenu efekta herbicida (Turgut 2005; Belgers i sar, 2007;). Takođe, dokazano je da na pojedine pesticide pokazuju veću osetljivost od predstavnika roda *Lemna* (Belgers i sar, 2009; Giddings i sar, 2012). Vrste roda *Myriophyllum* su svrstane u potencijalno pogodne test organizme za procenu fitotoksičnosti herbicida i kontaminiranog sedimenta tj. za dopunu postojećih procedura za procenu uticaja na životnu sredinu (Knauer i sar, 2008; Maltby i sar, 2010;). Široka rasprostranjenost, vegetativno razmnožavanje, velika stopa rasta i osetljivost čine *M. aquaticum* i *M. spicatum* pogodnim test modelima (Forney i Davis 1981; Hanson i sar. 2003; Turgut, 2005; Belgers i sar, 2007; Knauer i sar, 2008). Vrste roda *Myriophyllum* se u laboratorijskim uslovima lako uzgajaju i omogućuju nesmetano ponavljanje većeg broja testova (Maltby i sar, 2010). Najčešće korišćeni parametri u studijama sa vrstama *Lemna* sp. su rast i biomasa (OECD 221, 2006), dok upotreba ukorenjenih submerznih makrofita u ekotoksikološkim studijama omogućuje ispitivanje dodatnih ekološki relevantnih parametara kao što su ukupan rast, dužina glavne stabljike, broj i dužina bočnih izdanaka, broj, dužina i masa korenova (Turgut i Fomin, 2002; Knauer i sar, 2008; Arts i sar, 2008).

Do 2014. godine jedini obavezni laboratorijski testovi po evropskim propisima u proceni rizika od sredstava za zaštitu bilja (herbicidi i regulatori rasta) koji su se ticali akvatičnih makrofita su bili testovi na flotantnim vrstama *L. minor* i/ili *L. gibba* (OECD 221, 2006). Do tada su se submerzne i emerzne vrste koristile samo u retkim obaveznim mezokosmos studijama, na višim nivoima ekološke procene rizika (SANCO, 2002a). Sumarno, opravdana sumnja da procena samo na osnovu testova sa vrstama roda *Lemna* ne pruža adekvatnu zaštitu svim akvatičnim makrofitama, ogleđa se u nekoliko razlika između vrsta roda *Lemna* i spororastućih, submerznih, ukorenjenih makrofita:

- potencijalna neosetljivost *Lemna* sp. na rezidue herbicida u sedimentu: sočivice su neukorenjene flotantne biljke, bez direktnog dodira sa sedimentom, te može doći do potcenjivanja rizika od herbicida po ostale akvatične biljke (Vervliet-Scheebaum i sar, 2006);
- način i dužina ekspozicije – vrste roda *Lemna* su izložene vodenom rastvoru samo donjom površinom tela i imaju kratko generacijsko vreme, relativno visoki reproduktivni i potencijal oporavka, čime ne predstavljaju u potpunosti spororastuće, submerzne, ukorenjene makrofite (Arts i sar, 2008; Teodorović i sar, 2012);
- neosetljivost na pesticide sa specifičnim mehanizmom dejstva: sočivice spadaju u monokotiledone biljke, što ih čini relativno neosetljivim na herbicide koji spadaju u grupu regulatora rasta (auksin simulatori), a većina pesticida u poljoprivredi je namenjena za kontrolu nepoželjnih dikotiledonih biljaka (Fairchild i sar, 1997; Turgut and Fomin, 2002; Vervliet-Scheebaum i sar, 2006; Belgers i sar, 2007).

Da bi se izbegli nedostaci procene rizika od herbicida i regulatora rasta, poslednjih godina su se intenzivno razvijale test metode koje će obuhvatiti ukorenjene makrofite.

Članovi savetodavne grupe za akvatične makrofite (AMEG – Advisory Group in Aquatic Macrophyte Ecotoxicology), vodeće međunarodne organizacije koja okuplja stručnjake na polju ekotoksikologije (SETAC – Society of Environmental Toxicology and Chemistry) su ukazali na to da primena i uloga akvatičnih makrofita u proceni rizika od hemikalija nije adekvatno regulisana i zaključili da je neophodno dopuniti postojeću zakonsku regulativu EU. Razvijeni su novi laboratorijski testovi na ukorenjenim dikotilama *M. spicatum* i *M. aquaticum*, pod vođstvom

AMEG grupe (eng. „The SETAC Advisory Group in Aquatic Macrophyte Ecotoxicology“), sprovedeni internacionalni međulaboratorijski testovi kalibracije metoda (IRT) kojim je proverena osetljivost predloženih metoda i vrsta *M. aquaticum* i *M. spicatum* na herbicide sa različitim mehanizmom toksičnog dejstva (Arts i sar, 2010).

Eksperimenti u okviru internacionalnog testa kalibracije metode su sprovedeni u brojnim institucijama širom sveta, uključujući i Laboratoriju za ekotoksikologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Rezultati su predstavljeni u izveštaju (Ratte i Ratte, 2014), i usvojen je standard sa test vrstom *M. spicatum* u voda-sediment sistemu (OECD 239, 2014) koji je namenjen primeni u višim nivoima procene rizika od herbicida i regulatora rasta.

Ranije je nepostojanje standardizovanog protokola za ukorenjene makrofite bilo glavna prepreka u regulatornom kontekstu. Stupanjem na snagu nove Regulative EU ((EC) No 1107/2009) o autorizaciji sredstava za zaštitu bilja, ustanovljeno je sledeće:

- Ako je supstanca herbicid, regulator rasta, ili supstanca koja pokazuje herbicidnu aktivnost, test sa *Lemna* sp. kao osnovnom standardnom makrofitskom vrstom je obavezan.
- Ako je supstanca koja se testira specifičnog mehanizma dejstva i ako postoje jasne indikacije o većoj toksičnosti na dikotiledone biljke (npr. auksin simulatori, herbicidi za širokolisne biljke) ili monokotiledone biljne vrste (npr. herbicidi za trave), odgovarajuća institucija može da zahteva dodatno testiranje od države članice (EFSA, 2013).
- Uredba (EU No 283/2013) navodi koje akvatične makrofite mogu da se koriste u dodatnim istraživanjima – to su dikotiledone vrste: *M. spicatum*, *M. aquaticum* ili monokotiledona vrsta: *Glyceria maxima* (vodena trava). Test *Myriophyllum* sp. ili *Glyceria* može da se primeni za procenu uticaja supstanci u vodenom stubu ili sedimentu (Maltby i sar, 2010, EFSA, 2013).

Značajan pomak u retrospektivnoj ekološkoj proceni rizika je uključivanje akvatičnih makrofita u procenu toksičnosti sedimenta. Razvijen je kontakti test toksičnosti sedimenta na vrsti *M. aquaticum*, a tokom 2012. godine, sproveden je internacionalni test kalibracije metode (ring test) (Feiler i sar, 2014) u kojem je učestvovala i Laboratorija za ekotoksikologiju (LECOTOX, PMF, UNS). Nakon internacionalnog testa, kontakti test toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* je postao standardna metoda (ISO 16191, 2013).

### 2.3.1. Osobine test organizama

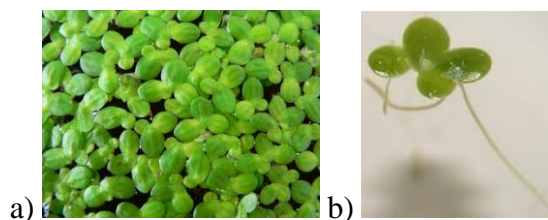
Vrste iz porodice *Lemnaceae* predstavljaju male, plivajuće, neukorenjene, vaskularne biljke, koje naseljavaju tropsku i umerenu zonu. U porodicu *Lemnaceae* uvrštena su četiri roda: *Spirodela*, *Lemna*, *Wolffiella* i *Wolffia*. Porodica broji oko 40 vrsta širom sveta, a neke od vrsta spadaju u grupu najmanjih cvetnica na svetu (Wang, 1990).

*Lemna minor* L., sočivica (fam. *Lemnaceae*) je sitna monokotiledona biljka sa kratkim generacijskim vremenom i atipičnim oblikom rasta. Vrlo je specifične morfologije, telo joj nije diferencirano na stablo i list, nego se ceo listoliki zeleni deo biljke (na engleskom „frond“) može smatrati telom biljke (Blečić, 1976). Izgled biljke je prikazan na slici 8. Često obrazuje agregacije ili kolonije koje se sastoje od nekoliko malih, svetlo zelenih, ovalnih jedinki prečnika 2-4 mm, koje se nekad preklapaju jedna preko druge (Hillman i Culley, 1978). Prema ekološkim

prilagođenostima *L. minor* spada u flotantni tip vodenih biljaka (Stevanović i Janković, 2001). Flotantne hidrofite mogu imati vrlo razvijen korenov sistem, međutim kod nekih predstavnika porodice sočivica, jedan broj vrsta ima ili slabo razvijen koren ili on potpuno odsustvuje. Vrsta *L. minor* ima veoma tanke korenčiće (Blečić, 1976).

Sočivica je široko rasprostranjena od tropskih do umerenih zona (široj Africe, Azije, Evrope i severne Amerike), od slatkovodnih do bočatih, brakičnih voda, te se smatra kosmopolitskom vrstom. Nema je na Arktiku i mestima gde vlada subpolarna klima (Landolt, E. 1986). Naseljava sporotekuće i mirne, stajaće vode tj. slatkovodne bare bogate hranljivim materijama tropske i umerene zone (Mkandawire i Dudel, 2005a; 2005b – cit. Mkandawire i Dudel, 2007). Tolerira širok spektar ekoloških uslova što je ubraja u eurivalentne vrste (Hillman i Culley, 1978). Optimalna temperatura za rast i razvoj je od 20 do 28 °C, ali nalazi se i u vodama sa temperaturnim opsegom od 6 do 33 °C. Iako se može naći u izuzetno kiselim vodama (pH 3,5), kao i alkalnim (pH 10) (Radić-Brkanac i sar, 2010), optimalan rast se registruje pri pH od 5.5 do 7.5 (Mkandawire i Dudel, 2005a; 2005b – cit. Mkandawire i Dudel, 2007).

Vrsta *L. minor* se pretežno razmnožava vegetativno, što omogućava veoma brzu kolonizaciju novih voda (Landolt, 1980 – cit. Mkandawire i Dudel, 2007). Za skoro sve vrste iz familije Lemnaceae je poznato da se razmnožavaju ne samo vegetativno, već i polno, cvetanjem i zametanjem plodova i semena, u specifičnim uslovima. *Lemna* sp. može da dominira sa samo jednom vrstom u ekosistemu, obrazujući guste zajednice u jezerima i barama. Populacija sočivica ekstremno brzo raste (Hillman i Culley, 1978). Zabeleženi su i pomori ribe zbog dominacije sočivica i algi u ekosistemima (Lewis i Bender, 1961 – cit. Wang, 1990). Prema Wangu (1990) vreme potrebno da se kolonije *L. minor* udvostruče je 1.3-2.8 dana, dok je Frick (1985) zabeležio da je vreme dupliranja oko 1.4 dana.



Slika 8. Sočivasto telo vrste *Lemna minor*

(a) <http://www.upload.wikimedia.org>; b) <http://www.itqb.unl.pt>

*Myriophyllum spicatum* L. 1753, meka drezga ili krocanj, je dikotiledona, submerzna, ukorenjena akvatična makrofita. Spada u porodicu Haloragaceae (Janković, 1976). Nativna je za Evropu, Aziju i severnu Afriku. Rasprostranjena je širom Evrope, takođe je i u Srbiji široko rasprostranjena. Čitavom površinom je pod vodom i ima puzeći rizom, mnogobrojne tanke korenčiće i cevaste, uspravljene, razgranate stabljike. Stabljike su člankovite, češljasto perasto deljene na nitaste ili naspramne režnjeve koji su dugi 1-3 cm i široki 1-2 cm sa po 4 lista u pršljenu koji su rasperjani, čime obezbeđuje povećanu asimilacionu površinu za fotosintezu (Janković, 1976; Stevanović i Janković, 2001). Izgled biljke je prikazan na slici 9. Cvetovi se nalaze na vrhu stabljike, sakupljeni u vršne klasiće koji uzdignuti štrče iz vode. Ova vrsta se razmnožava polno i vegetativno (Janković, 1976).

Drezga preferira sporotekuće vode, mrtvaje, kanale i močvare. Prisutna je na staništima do 1450 m nadmorske visine i često obrazuje guste sastojine. Predstavnici ove vrste se nalaze na gornjem, najvišem spratu submerznih makrofita koji se još naziva i pojase podvodnih livada

(Janković 1972; Janković i Janković 1987). Ova vrsta je eurivalentna tj. može da toleriše različite ekološke uslove, ali se smatra indikatorom eutrofnih voda sa niskim sadržajem kiseonika i velikom količinom organske materije. Rast je limitiran količinom svetla, samim tim, meka drezga ne kolonizuje duboke vode. Optimalna dubina za rast u vodi je od oko 1 do 4 m, a maksimalna 12 m (<http://www.plants.usda.gov>). Toleriše pokretanje vode, a talasi mogu da izazovu fragmentaciju delova biljaka, čime se pospešuje distribucija vrste. Može da naraste 5-7 cm po danu i lako se širi stolonima. Nalazi se u slatkim vodama, ali toleriše i bočatu i slanu vodu (Reed, 1977 – cit. Lagenland, 2008). Podnosi pH od 5.4 do 11. Toleriše i vrlo niske temperature i one nemaju dramatičan uticaj na rast. Donji delovi biljke ostaju zeleni cele godine, a tokom proleća brzo bujaju i rasprostiru se. Optimalna temperatura za fotosintezu je 33.6 °C, ali je fotosintetska aktivnost vrlo velika i na nižim temperaturama (Reed 1977 – cit. Lagenland, 2008). Za klijanje semena nije neophodna svetlost. Seme klija na temperaturi iznad 15 °C, ali klijanje se smanjuje ako je seme na dubini od 2 cm ili dublje u sedimentu (Hartleb i sar. 1993; <http://www.plants.usda.gov> ; <http://www.plants.ifas.ufl.edu>; <http://www.ecy.wa.gov>).

Vrsta *M. spicatum* je autothona za evropski kontinent, a alohtona za Sjedinjene Američke Države, centralnu, južnu Ameriku i Australiju gde se smatra i invazivnom (La Rue i sar, 2012) i danas je prisutna u većini voda severne Amerike. U severnu Ameriku je najverovatnije dospela početkom 20. veka, gde se ubrzo proširila i odomaćila. Pretpostavlja se da je introdukovana delatnošću lokalnih akvarista (Blackburn i Weldon 1967). Ima visoku stopu vegetativnog razmnožavanja, te može da raste i iz odlomljene stabljike, što povećava invazivni potencijal vrste. Prekomeran rast *M. spicatum* onemogućava nesmetan razvoj nativnih biljaka koje su neophodan izvor hrane domaćim pticama močvaricama i sisarima, kao i stanište i hrana ribama. Pored toga, gusto rastinje ove biljke pruža stanište insektima prenosiocima bolesti kao što su komarci i paraziti. U SAD se intenzivno radi na kontroli rasta kombinacijom bioloških, fizičkih i hemijskih metoda, jer svojim gustim zajednicama zakrčuje vodene puteve i ugrožava autothtone biljke, sprečavajući im dotok sunčeve svetlosti i kiseonika.



Slika 9. Cvet, stablo i izdijeljeni listovi submerzne vrste *Myriophyllum spicatum* (a) autor: M. Grahovac b) <http://www.aqua-fish.net>; b) <http://www.sv.wikipedia.org>; c) <http://www.q-bank.eu>

Vrsta *Myriophyllum aquaticum* (Velloso) Verdcourt (Haloragaceae, c. 1880) je dikotiledona, emerzna, ukorenjena, akvatična biljka (Turgut i Fomin, 2002). Pripada porodici Haloragaceae (Knauer i sar, 2008; Thiebaut, 2007). Predstavlja nativnu vrstu za područje reke Amazon, u tropskoj i subtropskoj Južnoj Americi (Aiken, 1981 – cit. Hussner i Losch, 2005; ISO 16191, 2013). Krajem 19. veka je prenešena u Severnu Ameriku, a od tada se raširila i po mnogim područjima evropskog i drugih kontinentata (Les i Mehrhoff, 1999 – cit. Hussner i Losch, 2005).

Kao biljka vodenih ekosistema, najvećim delom je submerzna, dok vršni deo biljke viri iznad vodene površine. Dužina izdanaka je od 100 do 600 cm (Aiken, 1981 – cit. Hussner i

Losch, 2005). Emerzni izdanci se izdižu i do 0.2-0.5 m iznad površine vodenog ogledala, dok dužina cele biljke može iznositi čak i do 3 m (Henderson, 1995 – cit. Cilliers, 1999). Stablo je izdvojeno na članke ili noduse sa internodijama, a listovi su gusto perasto deljeni (otuda potiče i engleski naziv „parrotfeather“). Kod ove vrste prisutna je heterofilija – dimorfizam ili polimorfizam listova, odnosno pojava morfološki različitih listova kod iste biljke (Stevanović i Janković, 2001). Primetna je razlika između listova koji su potopljeni i onih koji su iznad vode (Winn, 1999, Tremolieres, 2004 – cit. Wersal i Madsen, 2011). Naime, submerzni listovi su tamniji i slabijeg mehaničkog tkiva i zbog toga deluju gotovo beživotno, naročito kada se izvade iz vode. Njihova dužina je 1.5-3.5 cm i razdeljeni su na 20-30 resa. Emerzni izdanci su čvršći, svetlije zeleni sa listićima u obliku pera, dugački od 2-5 cm sa po 6-18 resa po listu (<http://www.ecy.wa.gov>). Iz nodusa se često formiraju adventivni korenovi (Henderson, 1995 – cit. Cilliers, 1999). Izgled biljke prikazan je na slici 10.

Ova vrsta se u svom autohtonom području razmnožava polno i vegetativno. Van prirodnog areala, zabeleženo je prisustvo gotovo isključivo ženskih i odsustvo muških jedinki, što uslovljava vegetativni tip razmnožavanja (Henderson, 2001 – cit. Hill i Julien, 2003). U nativnom regionu – tropskim i subtropskim predelima ova biljka raste tokom cele godine, dok u drugim krajevima, koje karakteriše umerena klima, rast ima izražen sezonski karakter (Cilliers, 1999). U umerenim klimatskim zonama stopa rasta tokom zimskih meseci znatno je smanjena, a intenzivira se pri temperaturi vode  $\geq 8$  °C. Biljka obrazuje rizome koji služe i za skladištenje rezervnih hranljivih materija i iz kojih se mogu razviti novi izdanci (<http://www.ecy.wa.gov>). Evropsku zimu *M. aquaticum* preživljava u različitim tipovima voda kao rizom, koji može ostati zelen ispod leda tokom zime i iz kojeg se dolaskom proleća i rasta temperature, pojavljuju novi izdanci. Biljka cveta u proleće, a nekad i u jesen. Cvetovi su slabo vidljivi i formiraju se u nodusima emerznog dela biljke.

Vrsta *M. aquaticum* je široko rasprostranjena, ekstremno adaptibilna i eurivalentna, sposobna da toleriše različite ekološke uslove i preživljava u različitim tipovima staništa. Ipak, staništa koja preferira su u toplim klimatskim područjima, sa velikom količinom hranljivih materija. Najintenzivnija produkciona sposobnost joj je u eutrofnim ekosistemima, ali je primećena i adaptacija na niži sadržaj nutrijenata (James i sar, 2006, Geng i sar, 2007 – cit. Hussner, 2009). Rasprostranjena je na nižim nadmorskim visinama, ali je u Brazilu prisutna i na 1900 m, a u Peruu na 3250 m nadmorske visine (Orchard, 1981 – cit. Hussner i sar, 2008). Dominantna je biljka stajaćih i sporotekućih voda (jezera, bare, kanale i potoke). Ukorenjuje se u plićim delovima na dubini 1-10 m, sa potopljenim ili plutajućim stabljikama iznad dubljih delova vode, ali može da opstane i kao flotantna biljka u dubokim jezerima bogatim organskom materijom (Orchard, 1981 – cit. Hussner, 2008). U odnosu na druge vodene biljke, zahteva dobru osvetljenost, jer ima visoku stopu fotosinteze (<http://www.ecy.wa.gov>). Prilagodljiva je na promene nivoa i količine vode, a i sama utiče na variranje nivoa vode, jer je karakteriše izrazita sposobnost evaporacije (H.H. Bosman, 1996 – cit. Cilliers, 1999). Ova vrsta ima malu gustinu populacije pri brzini vodenog toka  $\geq 0.8$  m/s i brzina toka vode predstavlja limitirajući faktor u rasprostranjenju (Hussner i Losch, 2005). Odlikuje se visokim afinitetom ka alkalnim, eutrofnim jezerima visoke tvrdoće (Hoyer i sar, 1996 – cit. Les i Mehrhoff, 1999). Tolerantna je na povećani salinitet od 15‰, toleriše pH od 5.4 do 11, a može da preživi i ispod leda. Rezultati Hussner-ovih istraživanja (2008) pokazuju da je vrsta *M. aquaticum* sposobna da raste i na isušenom zemljištu. Može da se transportuje na velike daljine, a Hussner i saradnici (2008) ukazuju na njenu sposobnost regeneracije iz pojedinačnog lista.

Relativno brza reprodukcija, visoka stopa rasta, adaptibilnost na različite ekološke

uslove, kao i mogućnost regeneracije ukazuju na visok invazivni potencijal ove vrste u nenativnom području. Pošto se smatra dekorativnom, veoma je zastupljena u akvaristici širom sveta, što je rezultiralo nekontrolisanim, invanzivnim širenjem i mimo tropskih regiona (Barreto i sar, 2000). Van svog prirodnog areala, vrsta *M. aquaticum* je prisutna u Severnoj Americi (Wersal i Madsen, 2007), Evropi, Africi, Japanu, Novom Zelandu i Australiji (Cilliers, 1999). Smatra se da je u Evropu introdukovana kao ukrasna biljka krajem 19-og i početkom 20-og veka (Thiebaut, 2007). Prisustvo *M. aquaticum* zabeleženo je u otvorenim vodama Španije, Portugalije (Bernez i sar, 2006), Francuske (Chimits, 1978 – cit. Barreto i sar, 2000), Austrije, Velike Britanije, Nemačke i Holandije (Hussner i Losch, 2005; Hussner i sar, 2008). Ova vrsta se danas smatra invazivnom u Evropi i predstavlja pretnju autohtonim zajednicama akvatičnih makrofita (Cilliers, 1999). Ipak, prisustvo *M. aquaticum*, dosad, nije zabeleženo na teritoriji Republike Srbije (Anačkov i sar, 2013; <http://www.iasv.dbe.pmf.uns.ac.rs>; <http://www.bioras.petnica.rs/>).

Uticaj *M. aquaticum* na autohtonu floru i faunu je višestruk. Prisustvo ove vrste drezge može dovesti do izmena u lancima ishrane: npr. sprečavanjem rasta algi i domaćih vodenih biljaka koje su u stajaćim i sporotekućim vodama osnovni primarni producenti. Pored ovoga, *M. aquaticum* je utočište i stecište larvi komaraca. Guste populacije ove vrste mogu ozbiljno narušiti fizičke i hemijske karakteristike stajaćih i sporotekućih voda, a mogu zakrčiti i vodene tokove i začepiti cevi (Cilliers, 1999). Ova saznanja podsticala su rad nekih istraživača u smeru kontrole *M. aquaticum* (Moreira i sar, 1999, Shaw, 2003 – cit. Hussner, 2009). Tako, Wersal i Madsen (2007) pominju upotrebu herbicida triklopira, dihlobenila i endotala za efikasnu kontrolu ove invazivne vrste. Podsticaj uspešnoj kolonizaciji voda centralne Evrope može biti i promena klime koja inače pogoduje širenju invazivnih vrsta (Hussner i Losch, 2007 – cit. Hussner i sar, 2008). Budući da je ova vrsta adaptirana na stanište bogato nutrijentima (Sytsma i Anderson, 1993 – cit. Hussner i sar, 2008), eutrofikacija evropskih voda pogoduje uspostavljanju stabilne populacije (Hussner i sar, 2008). Uzimajući u obzir adaptibilnost i invazivni potencijal *M. aquaticum* i činjenicu da su već stabilne populacije ustanovljene u brojnim zemljama Evrope, Hussner (2009) prognozira da će ona ostati prisutna u centralnoj Evropi.



Slika 10. Izgled vrste *Myriophyllum aquaticum* (a) Wersal i Madsen, 2011; b) <http://www.src.sfasu.edu>; c) <http://www.empireoftheturtle.com>

### 3. Ciljevi doktorske disertacije

Doktorska disertacija je doprinos daljem razvoju procedura i metodologije u ekološkoj proceni rizika u cilju prevencije, sveobuhvatnije procene i preciznije karakterizacije ekološkog i ekosistemskog rizika od hemikalija kao poboljšanju neophodnih mera zaštite prirodnih populacija, zajednica i ekosistema.

Razvojem testova inhibicije rasta na vrstama roda *Myriophyllum* L. 1754 (Saxifragales, Haloragaceae), cilj disertacije je bio utvrditi potencijal ukorenjenih akvatičnih makrofita *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verd. i *Myriophyllum spicatum* L. u ekološkoj proceni rizika od herbicida i kontrole kvaliteta sedimenta.

Za potrebe retrospektivne ekološke procene rizika, ocenjena je primenljivost, pouzdanost i osetljivost kontaktnog testa toksičnosti sedimenta sa vrstom *M. aquaticum* (Vell.) Verd. Pretpostavljeno je da kontaktni test ukupne toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* može biti adekvatan test za uključivanje u seriju testova u okviru TRIAD pristupa, čime bi se procedura karakterizacije sedimenta proširila i na primarne producente i omogućila realnija procena ukupne toksičnosti sedimenta i rizika za akvatične ekosisteme. Takođe, razmotreno je da li kontaktni test toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* može da se primeni kao prvi test toksičnosti sedimentne čvrste faze na primarnim producentima i u preventivnoj ekološkoj proceni rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment, što bi predstavljalo doprinos integralnijoj i ekosistemski realnijoj proceni rizika od hemikalija u vodenoj životnoj sredini.

Testovima inhibicije rasta vrsta *M. aquaticum* (Vell.) Verd. i *Myriophyllum spicatum* L. u voda-sediment sistemu ispitana je osetljivost i mogućnost primene metode u preventivnoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta. Osetljivost novih test modela poređena je sa osetljivošću standardnih *Lemna* sp. testova. Pretpostavljeno je da je *M. aquaticum* adekvatan predstavnik ukorenjenih makrofita u ekološkoj proceni rizika od pesticida i da da *M. aquaticum* i *M. spicatum* mogu biti alternative vrste u test sistemu voda-sediment.

Značaj test vrsta sa ekotoksikološkog i ekološkog aspekta razmatran je kroz procenu ekotoksikološke osetljivosti i statističke snage test metoda, određivanje osetljivosti različitih parametara i njihove ekološke relevantnosti, primenu predstavnika roda *Myriophyllum* u različitim test sistemima (voda-sediment, sediment), kao i analizu nivoa realiteta različitih test sistema.

U sedimentnom kontaktnom testu inhibicije rasta vrste *M. aquaticum* utvrđeni su:

- a) primenljivost testa u proceni ukupne toksičnosti realnih uzoraka sedimenta iz prirode (reke Tamiš, Jegrička i Krivaja);;
- b) varijabilnost različitih parametara rasta, biološki odgovori sa najmanjom varijabilnošću i najvišom statističkom snagom u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta iz prirode;



- c) uticaj osobina prirodnog i sintetisanog sedimenta različite strukture na parametre rasta analizom niza bioloških odgovora vrste *M. aquaticum* u kontaktnom testu, u cilju preciznijeg razlučivanja između direktnih uticaja toksičnih supstanci i prirodnih svojstava sedimenta;
- d) potencijal primene kontaktnog testa za potrebe ekološke procene rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment.

U testovima u voda-sediment sistemu sa vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum*:

- 1) ispitana je mogućnost zadovoljenja kriterijuma validnosti i prihvatljivosti testova, iskazano kroz zadovoljavajuću stopu rasta i vreme dupliranja u kontroli, na obe vrste u zavisnosti od dužine testa, odnosno dužine perioda adaptacije i ekspozicije;
- 2) utvrđena je varijabilnost i osetljivost većeg broja parametara rasta na izabrane herbicide i sintetičke auksine: atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba, rastvorene u vodi i određeni su najosetljiviji biološki odgovori sa najmanjom varijabilnošću i najvećom ekosistemskom relevantnošću za obe vrste;
- 3) ispitana je mogućnost uniformisanja optimalnog protokola za testiranje obe odabrane vrste roda *Myriophyllum* u sistemu voda-sediment u cilju uporedivosti rezultata i alternativnog korišćenja u ekotoksikološkim testovima pojedinačnih supstanci i smeša;
- 4) osetljivost testova sa vrstama roda *Myriophyllum* poređena je sa osetljivošću standardnih *Lemna* testova, rezultatima testova sa drugim akvatičnim biljkama i SSD modelovanjem;
- 5) određena je i relativna osetljivost testa inhibicije rasta vrste *M. aquaticum* u sistemu voda-sediment u odnosu na jednodimenzionalne sisteme (voda bez sedimenta i sediment bez vode) direktnim poređenjem rezultata testova na izabranim ksenobiotcima, uz razmatranje prednosti i mana svakog od testiranih sistema.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Uzgoj laboratorijskih kultura

Laboratorijska kultura vrste *Lemna minor* (sočivica) Laboratorije za ekotoksikologiju (UNS, PMF LECOTOX) potiče iz prirodne populacije Specijalnog rezervata prirode „Koviljsko-petrovaradinski rit“. Pre početka upotrebe kulture za ekotoksikološke testove, zadovoljen je period adaptacije na rast u odgovarajućem hranljivom rastvoru u standardnim laboratorijskim uslovima, u predviđenom periodu od 2 meseca. Kultura *L. minor* (Slika 11) je gajena u tamnim posudama u hranljivom *Steinberg* medijumu (ISO 16191, 2013), čiji je sastav prikazan u tabeli 2. Uslovi pri gajenju laboratorijske kulture i pri izvođenju testova toksičnosti su bili identični: konstantna temperatura od  $24 \pm 2$  °C i konstantno osvetljenje intenziteta  $85-135 \mu\text{E}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



Slika 11. Laboratorijska kultura vrste *Lemna minor* u *Steinberg* medijumu

Tabela 2: Sastav hranljivog rastvora *Steinberg* (ISO 16191, 2013)

MAKROELEMENTI		g/l
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> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	14.75
MIKROELEMENTI		mg/l
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	Na <sub>2</sub> MoO <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

Početni biljni materijal vrste *M. aquaticum* od kojeg je oformljena laboratorijska kultura (Slika 12), Laboratoriji za ekotoksikologiju je ustupljen je od strane Bavarske agencije za zaštitu

životne sredine u novembru 2009. godine. Do juna 2010. godine, biljke su održavane kao vodena kultura u hranljivom *Steinberg* medijumu (sastav prikazan u tabeli 6), u konstantnom svetlosnom režimu intenziteta  $60-75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , na temperaturi od  $24 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Slika 12. Vodena laboratorijska kultura *M. aquaticum* u *Steinberg* medijumu

Od juna 2010. godine, deo laboratorijske kulture je, u istom svetlosnom i temperaturnom režimu, prebačen na uzgoj u standardnom veštačkom sedimentu (Slika 13) pripremljenom po ISO standardnoj metodi (ISO 16191, 2013) čiji je sastav prikazan u tabeli 8. Sediment ovog sastava se u testovima toksičnosti sedimenta upotrebljava kao kontrolni.



Slika 13. Laboratorijska kultura *M. aquaticum* gajena na standardnom sintetičkom sedimentu

Vrsta *M. aquaticum* je od tad uspešno uzgajana u veštačkom sedimentu u tamnim plastičnim posudama zapremine 500 ml i podloga je redovno zalivana razblaženim *Steinberg* medijumom (Tabela 3) (1:1 v/v, *Steinberg* medijum: destilovana voda) i drži pod konstantnim svetlosnim i temperaturnim režimom (intenzitet svetlosti  $60-70 \mu\text{E/m}^2\text{s}$ , temperatura  $24 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Tabela 3: Sastav sedimenta prema OECD 218 (2004)

Sastojak sedimenta	Procentualni udeo sastojka (%)
Treset ( <i>Sphagnum</i> sp.)	5
Kaolin	20
Kvarcni pesak	74
Kalcijum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ )	1

Vrsta *Myriophyllum spicatum* nije gajena u laboratorijskim uslovima. Biljke su sakupljane dva dana pred svaki test sa tzv. referalnog, nezagađenog lokaliteta Specijalnog rezervata prirode "Koviljsko-petrovaradinski rit". Izgled biljke poslednjeg dana testa prikazan je na slici 14.

Slika 14. Vrsta *Myriophyllum spicatum* u testu inhibicije rasta (DAT 14)

Provera osetljivosti kultura *L. minor* i *M. aquaticum* rađena je upotrebom referalne supstance 3,5 dihlorfenol, a rezultati su poređeni sa dostupnim literaturnim podacima. Kulture vrsta *L. minor* i *M. aquaticum* na osnovu testa sa referalnom susptancom pokazuju zadovoljavajuću osetljivost.

## 4.2. Testovi inhibicije rasta

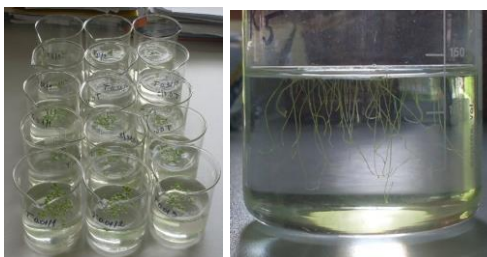
Testovi inhibicije rasta na vrsti *L. minor* izvedeni su prema standardnoj metodi OECD 221 (2006). Testovi su trajali 7 dana, izvedeni su u semi-statičkim uslovima sa promenom rastvora odgovarajuće koncentracije test supstance minimum 2 puta tokom sedmodnevnog testa. To je u najvećem broju slučajeva bilo nakon 48 ili 72 časa (tj. trećeg i petog dana testa: DAT 3; DAT 5, skraćena DAT se odnosi na „day after treatment” tj. dan nakon tretmana). Semi-statičkim uslovima obezbeđene su relativno konstantne nominalne koncentracije test supstance i nutrijenata i sprečeno je prekomerno razvijanje algi. Svaki test je obuhvatao po 6 ponavljanja kontrole i po 3 ponavljanja tretmana. Svako ponavljanje podrazumevalo je dodatnu posudu sa biljnim materijalom za isti tretman. Sažetak uslova testa inhibicije rasta *L. minor* dat je u tabeli 4.

Tabela 4: Sažetak uslova testa inhibicije rasta vrste *Lemna minor* (OECD 221, 2006)

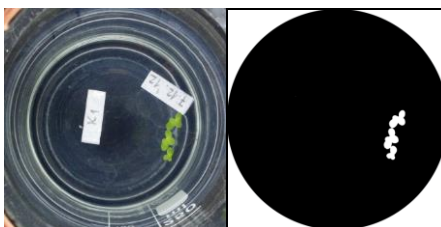
Test model	<i>Lemna minor</i>
Trajanje testa	7 dana
Biljni materijal u testu	3 kolonije po test posudi; npr. 11 jedinki (3+4+4)
Medijum za gajenje i diluent	<i>Steinberg</i> hranljivi rastvor
Osvetljenje	kontinualno; intenzitet 85-135 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$
Temperatura	$24 \pm 2$ °C
Test supstance	3,5 DCP; atrazin; izoproturon; trifluralin; 2,4 D; dikamba
Mereni parametri	broj jedinki, sveža masa, biljna površina
Biološki odgovor	Inhibicija rasta populacije (%)
Postavka testa	kontrola: 6 ponavljanja; test tretmani: 5 koncentracija (za svaki test sem 2,4 D i dikamba: 3 koncentracije) po 3 ponavljanja po tretmanu

Po 3 kolonije sa po 2 do 4 jedinke postavljane su u svaku test posudu (sa ukupnim brojem jedinki od 9 do 12 po posudi). U svaku test posudu na početku testa postavljan je jednak broj

jedinki. Posude su bile zapremine 250 ml i sadržale su 150 ml test rastvora ili *Steinberg* medijuma (Slika 15). Prema standardnoj metodi (OECD 221, 2006), primarni parametar za utvrđivanje inhibicije rasta je broj jedinki, a predlaže se i merenje dodatnog parametra: sveža masa ili biljna površina. Nultog DAT 0, trećeg DAT 3, petog DAT 5 i sedmog DAT 7 dana su određeni broj jedinki, sveža masa i ukupna biljna površina. Jedinke su brojane na licu mesta, a sveža masa je merena na analitičkoj vagi. Površina biljnog materijala je određena uz pomoć fotografija koje su nastale upotrebom digitalnog fotoaparata koji je bio smeštan u improvizovanu komoru na uvek istom rastojanju od test posuda. Digitalnom obradom fotografija (u programu Adobe Photoshop, ver. cs. 3) je određen procentualni odnos biljne površine i ukupne površine (100%) vodenog ogledala u pikselima. Zatim je na osnovu poznate površine test posude u  $\text{cm}^2$  proporcijom izračunata ukupna biljna površina u svim test posudama u  $\text{cm}^2$  (Slika 16).



Slika 15. Vrsta *Lemna minor* u testovima sa supstancama trifluralin i izoproturon (DAT 7)



Slika 16. Vrsta *Lemna minor* na početku testa (DAT 0), pre i nakon obrade fotografije u cilju određivanja površine

U cilju poređenja rezultata sa testom na *M. aquaticum*, testovi inhibicije rasta *L. minor* i *M. aquaticum* su kad je bilo moguće, postavljeni u identičnoj seriji koncentracija test supstance, ali u različitim hranljivim medijumima. Test supstance u testovima sa *L. minor* su bile: 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba.

Serijske koncentracije test supstanci u testovima inhibicije rasta *L. minor* su bile sledeće:  
**3,5 DCP** definitivni test u seriji koncentracija 3,5 dihlorfenola: 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 i 10.0 mg/l od osnovnog rastvora 3,5DCP koncentracije 40 mg/l,

**Atrazin** definitivni test u seriji koncentracija atrazina: 0.08; 0.16; 0.32; 0.64; 1.28 mg/l,

**Izoproturon** definitivni test u seriji koncentracija izoproturona: 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0 mg/l,

**Trifluralin** definitivni test u seriji koncentracija trifluralina: 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0 mg/l,

**2, 4 D** definitivni test u seriji koncentracija 2,4 D kiseline: 0.1; 1; 10 mg/l,

**Dikamba** definitivni test u seriji koncentracija dikambe: 1; 5; 10 mg/l.

Kriterijum za validnost testa je dupliranje broja novonastalih jedinki za manje od 2.5 dana (60 h) što odgovara sedmostrukom uvećanju za period izvođenja testa od sedam dana. Vreme

dupliranja je izračunato na osnovu sledeće formule:  $T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$  gde je  $T_d$  – vreme dupliranja,  $\mu$  - specifična stopa rasta.

Tokom 2012. godine, Laboratorija za ekotoksikologiju (PMF UNS, Srbija) učestvovala je u internacionalnom testu kalibracije metode za procenu toksičnosti sedimenta (*ring test*) sa vrstom *M. aquaticum* (Feiler i sar, 2014). Metoda je razvijena za procenu ukupne toksičnosti prirodnog sedimenta i sedimenta obogaćenim pojedinačnom supstancom ili smešom, a cilj primene *ring* testa je bila procena preciznosti test metode kroz procenu izvodljivosti, ponovljivosti i reproducibilnosti, određivanje kriterijuma validnosti testa (minimalne stope rasta biljaka u kontroli) i opsega osetljivosti na referalnu supstancu 3,5 DCP. Predložen kriterijum validnosti bilo je dostizanje stope rasta  $RGR \geq 0.09$ , a preporučena vrednost inhibicije rasta prilikom izlaganja referalnoj supstanci 3,5 DCP (koncentracije 90 mg/kg suve mase sedimenta) bila je  $35 \pm 15\%$ . Test je obuhvatio analizu 4 uzorka sedimenta: kontrolni sediment (standardni sintetički sediment), kontrolu rastvarača (sintetički sediment + rastvarač (aceton)), sediment obogaćen referalnom supstancom 3,5 DCP i prirodni sediment obogaćen nikal(II)-hloridom (850 mg Ni<sup>2+</sup>/kg suve mase sedimenta), kao primer umereno kontaminiranog sedimenta. Podaci četrnaest laboratorija (od ukupno 21) koje su učestvovala u *ring* testu su uključeni u statističku analizu metode.

U periodu od 2010. do 2013. godine, u Laboratoriji za ekotoksikologiju su izvedeni različiti kontaktni testovi toksičnosti sedimenta. Kontaktne testove toksičnosti prirodnog sedimenta su postavljeni sa 9 uzoraka sedimenta reke Tamiš i sa po jednim uzorkom sedimenta reka Krivaja i Jegrička. Pored testova na realnim uzorcima, postavljeni su eksperimenti sa nekontaminiranim standardnim sintetičkim sedimentom različitog sadržaja konstituenata: organske materije, kaolina i kvarcnog peska. Dodatno, urađen je i test na veštačkom sedimentu sa atrazinom, u seriji koncentracija atrazina .

Kontaktne testove toksičnosti prirodnog sedimenta na *M. aquaticum* postavljeni su po protokolu ISO 16191 (ISO, 2013) (Tabela 5). Testovi su izvedeni pod konstantnim svetlosnim režimom intenziteta  $60 - 75 \mu E m^{-2} s^{-1}$ , na temperaturi od  $24 \pm 0.5$  °C. Postavka testa podrazumevala je smeštanje tri odsečena nodusa sa kratkim internodijama u test posudu, sa 6 ponavljanja kontrole i 3 ponavljanja po tretmanu (Slika 17). Termin ponavljanje se u ovom testu odnosi se na posudu koja sadrži 3 nodusa. Masa nodusa od  $25 \pm 6$  mg na početku testa postignuta je upotrebom izdanaka sa jedinki starih  $21 \pm 3$  dana. Uslov za validnost testa je bila da biljke u kontrolnom tretmanu na kraju testa dostignu minimalnu stopu rasta od 0.09. Period ekspozicije predložen Standardom (ISO 16191, 2013) iznosio je 10 dana, u statičkim uslovima, a uzorci na tretmanima su održavani vlažnim, zalivanjem svaka 2 dana, po potrebi, sa odgovarajućom količinom smeše *Stainberg* rastvora i destilovane vode (u odnosu 1:1). Stopa rasta biljaka u tretmanima je poređena sa stopom rasta u kontroli i tako je dobijena inhibicija rasta izračunata u procentima.

Poređenje rasta test organizma u različitim uzorcima prirodnog sedimenta izvršeno je na osnovu osnovnog parametra predloženog protokolom: stopa rasta izračunata za period od 10 dana na osnovu sveže mase nodusa. Stopa i inhibicija rasta izračunati su na osnovu formula u tekstu navedenih nakon opisa svih test metoda.

Slika 17. Vrsta *M. aquaticum* u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta

Sažetak uslova uzgoja laboratorijske kulture i procedure testa inhibicije rasta *M. aquaticum* u izvedenim kontaktnim testovima toksičnosti prirodnog sedimenta je dat u tabeli 5.

Tabela 5: Uslovi uzgoja laboratorijske kulture i procedure kontaktnog testa toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* (ISO 16191, 2013)

Test organizam	<i>Myriophyllum aquaticum</i>
Trajanje testa	10 dana
Starost kulture u testu	21 ± 3 dana
Početna masa nodusa (članka)	25 ± 6 mg
Osvjetljenje	24 h; intenzitet 60-75 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Temperatura	24 ± 0.5 °C
Medijum za uzgajanje do pol. 2010.g.	Steinberg medijum
Medijum za uzgajanje od pol. 2010.g.	Standardni sintetički sediment
Test sistem (medijum u testu)	sediment (kontrola: standardni sintetički sediment)
Obuvaćeni testovi	- Uzorci neporemećenog prirodnog sedimenta: Tamiš 9 uzoraka (3 lokaliteta u 3 sezone), Krivaja i Jegrička po 1 uzorak (1 sezona) - Serija sedimenta sa različitim koncentracijama atrazina - Testovi na standardnom sintetičkom sedimentu različitog sastava
Biljni materijal korišćen u testu	3 nodusa po test posudi
Postavka testa	Kontrola (min. 3, a najčešće 6 ponavljanja) + tretman (min. 3 ponavljanja)
Biološki odgovor	Inhibicija rasta % na osnovu stope rasta sveže mase nodusa
Limit toksičnosti	20% inhibicija u odnosu na kontrolni tretman
Uslov prihvatljivosti testa	Prosečna stopa rasta u kontrolnom tretmanu $\geq 0.09$
Parametri	Stopa rasta, masa nodusa, ukupna masa izdanka (bočni), masa korena, ukupna dužina izdanka (bočni), ukupna dužina korena, sadržaj hlorofila <i>a</i> u celom nodusu nakon testa (kao absorbanca), koncentracija hlorofila <i>a</i> po gramu biljke na kraju testa.

Uzorci sedimenta su uzeti u leto i jesen 2009. i proleće 2010. godine, duž toka reke Tamiš, za potrebe izrade Studije hemijskog, fizičkog i biološkog statusa reke Tamiš, koja je rađena u okviru susedskog programa Rumunija – Srbija Eko-status reke Tamiš, Prirodno-matematičkog fakulteta (Nosilac izrade studije UNSPMF, finansirano od strane EU u okviru susedskog programa Rumunija – Srbija, koordinator I. Teodorović). Uzorci su uzeti Eijkelkamp korerom, na tri lokaliteta 1. između naselja Jaša Tomić i Sečanj, 2. kod naselja Jabuka i 3. uzvodno od brane kod Pančeva.

Uzorci su, u okviru pomenute Studije detaljno hemijski okarakterisani (Teodorović, 2010). Hemijskom analizom sedimenta reke Tamiš obuhvaćen je sadržaj teških metala Pb, Cd, (EPA 3051A, 2007; EPA 7000B, 1993), Hg (EPA 3051A, 2007; EPA 7471B, 2007) i As (EPA 3051A, 2007; EPA 7010, 2007) u sedimentu, sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja (EPA 3546, 2007; DIN 38409; ASTM D 3921-85, 1985) i sadržaj specifičnih organskih polutanata u sedimentu – policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) (EPA 3546, 2007; EPA 3630C, 2004; EPA 3620B, 2004; EPA 8270C, 2004; EPA 8081A, 2004), organohlornih pesticida, polihlorovanih bifenila ili PCB (EPA 3546, 2007; EPA 3620B, 2004, EPA 8082A, 2007).

Sediment je, po teksturi, bio krupnopeskovita ilovača, sa značajnim udelom krupnog i sitnog peska, od 76.3-84.3%. Sadržaj frakcije < 2 µm iznosi 2.41-5.85% suve mase sedimenta, a fina frakcija sedimenta (prah) čini 7.7-12.2% suve mase sedimenta. Sadržaj organske materije se kreće od 2.1-8.2%. Generalno, sediment je peskovit sa niskim do umerenim udelom finog organskog mulja (Teodorović, 2010).

Uzorci sedimenta Krivaje i Jegričke uzeti su 1. jula 2011. godine i detaljno su okarakterisani na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, u Centru izvrsnosti za hemiju okoline i procenu rizika (CECRA), za potrebe projekata OI172028, OI173037 i projekta SCOPES IZ73Z0 128025 (sufinansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS i Švajcarske nacionalne naučne fondacije).

Kako bi se utvrdio efekat različite strukture sedimenta na rast biljaka, postavljeni su testovi sedimenta različitog procentualnog udela sastojaka (Tabela 6). Svi opšti uslovi eksperimenta i posmatrani parametri su bili identični onim u prethodno opisanim testovima.

Tabela 6: Varijacije sintetičkog sedimenta sa različitim sadržajem organske materije, kvarca i kaolina

TEST VARIRANJA 1	KVARC	KAOLIN	TRESET	CaCO <sub>3</sub>
KONTROLA	74%	20%	5%	1%
sediment I	78%	20%	1%	1%
sediment II	69%	20%	10%	1%
TEST VARIRANJA 2	KVARC	KAOLIN	TRESET	CaCO <sub>3</sub>
KONTROLA	74%	20%	5%	1%
sediment III	47%	47%	5%	1%
sediment IV	30%	64%	5%	1%
sediment V	20%	74%	5%	1%

U testu variranja 1 je ispitan uticaj različitog sadržaja organske materije na rast biljaka u sintetičkom standardnom sedimentu. Testirane su različite varijante veštačkog sedimenta sa 1, 5 i 10 % treseta (*Sphagnum* sp.) (sediment I i II). Sediment sa 5% treseta (koliko je predviđeno



protokolom) je poslužio kao kontrola. Tretmani su postavljeni u 4 ponavljanja (3 nodusa po posudi).

U testu variranja 2 ispitan je uticaj različitog sadržaja kaolina i peska na rast biljaka u sintetičkom standardnom sedimentu. Testirane su različite varijante veštačkog sedimenta sa 47, 64 i 74% kaolina i 47, 30 i 20% peska (sediment III, IV i V). Količina organske materije i kalcijum karbonata je bila konstantna. Kontrolni tretman bio je sintetički sediment predviđen protokolom. Tretmani su postavljeni u 3 ponavljanja (3 nodusa po test posudi).

Poređenje rasta biljaka u sedimentu sa različitim sastavom konstituenata (Slika 18) izvedeno je na osnovu osnovnog parametra predloženog protokolom: stopa rasta računata za period od 10 dana na osnovu sveže mase nodusa. Stopa i inhibicija rasta izračunati su na osnovu formula prikazanih nakon opisa test metoda u ovom poglavlju.



Slika 18. Vrsta *Myriophyllum aquaticum* u sedimentu sa različitim sadržajem konstituenata

Dugoročna kontrola za kontakti test toksičnosti sedimenta uključuje kontrolne tretmane svih izvedenih kontaktnih testova na *M. aquaticum*, što podrazumeva 75 nodusa u 25 posuda.

U cilju provere potencijala metode u primeni za procenu rizika od hemikalija koje su vezane za sediment, urađen je kontaktni test toksičnosti sedimenta sa rastvorom različitih koncentracija atrazina. Korišćen je tehnički atrazin čistoće 98%. Serija koncentracija je pripremljena dodavanjem odgovarajućih koncentracija vodenog rastvora atrazina u standardni sintetički sediment. Standardni veštački sediment je korišćen i kao kontrola. Svaki tretman postavljan je u 3 ponavljanja, a kontrola u 6 ponavljanja.

Svaka test posuda je prema standardu (ISO 16191, 2013) imala 80 g sedimenta sa rastvorom atrazina, i to: 65 g standardnog sintetičkog sedimenta i 15 ml rastvora atrazina određene koncentracije. Pripremljen je početni vodeni rastvor atrazina i serija odgovarajućih koncentracija, nakon čega je napravljena serija tretmana sedimenta sa dodatim rastvorom atrazina odgovarajuće koncentracije. Koncentracije u posudi su preračunate na sediment na osnovu odgovarajuće matematičke proporcije, pri čemu se merne jedinice odnose:  $[mg/l] = [\mu g/ml]$  i  $[\mu g/g] = [mg/kg]$

$$C_{\text{test posude}}[\mu g/g] = (C_{\text{rastvora}}[\mu g/ml] \times V_{\text{rastvora}}[ml]) / (m_{\text{zemljišta}}[g])$$

Preliminarni test toksičnosti je poslužio da se preciznije odabere uži opseg koncentracija za postavljanje definitivnog testa. Pripremljen je početni ili osnovni vodeni rastvor atrazina koncentracije 20 mg/l („stock“ rastvor) iz kojeg je pravljen serija razblaženja za izvođenje

preliminarnog testa u logaritamskoj seriji od 0.1, 1, 10, 100, 1 000 i 10 000  $\mu\text{g/l}$ , a preračunato na sediment, serija razblaženja u preliminarnom testu je bila: 0.000023, 0.00023, 0.0023, 0.0231, 0.231, 2.31  $\mu\text{g/g}$  (mikrograma atrazina po gramu sedimenta). Na osnovu rezultata preliminarnog testa, za definitivni test je odabrana serija koncentracija sa 0.5; 1; 2; 4; 8; 10 i 16  $\text{mg/l}$ , odnosno 0.12, 0.231, 0.46, 0.92, 1.85, 2.31, 3.69  $\mu\text{g/g}$  (mikrograma atrazina po gramu sedimenta). Period ekspozicije predložen Standardom (ISO 16191, 2013) iznosio je 10 dana, u statičkim uslovima. Poređenjem stopa rasta u test tretmanima sa kontrolnim tretmanom izračunata je inhibicija rasta izražena u procentima. Optimalna masa nodusa od  $25 \pm 6$  mg na početku testa postizala se upotrebom kulture stare  $21 \pm 3$  dana. Stopa rasta svakog nodusa kao i koncentracija hlorofila *a* izračunate su na identične načine kao i kod testova toksičnosti prirodnog sedimenta, korišćenjem formula prikazanih nakon opisa test metoda u ovom poglavlju.

Laboratorija za ekotoksikologiju (LECOTOX) učestvovala je u još jednom internacionalnom testu kalibracije metode (u daljem tekstu IRT, od eng. *international ring test*) IRT je organizovan tokom 2011. godine u cilju provere primenjivosti, praktičnosti i osetljivosti predložene metode koja je razvijena za ukorenjene makrofite *M. aquaticum* i *M. spicatum* za upotrebu u višim nivoima ekološke procene rizika OECD/2011. Laboratorija za ekotoksikologiju je u IRT učestvovala sa tri testa na *M. aquaticum* – sa referalnom supstancom 3,5 DCP, izoproturonom i trifluralinom.

Pored navedenih testova urađenih za potrebe IRT, izvedeni su i testovi na *M. spicatum* sa izoproturonom u 21 d testu, na *M. aquaticum* sa atrazinom, 2,4 D i dikambom i tri skraćena 10 d testa na *M. spicatum* sa atrazinom, izoproturonom i 2,4 D.

Testovi su rađeni u voda-sediment sistemu (Slika 19) na osnovu radne verzije protokola OECD/2011 koji je nakon analize rezultata internacionalnog testa kalibracije metode (Ratte i Ratte, 2014) prilagođen i izmenjen u finalnu verziju protokola OECD 239/2014 za testiranje na vrsti *M. spicatum*. Jedinke vrste *M. aquaticum* uzimane su iz kulture Laboratorije za ekotoksikologiju (uslovi gajenja su opisani u poglavlju 3.1.), dok je drugi test organizam, *M. spicatum* sa tzv. referalnog, nezagađenog lokaliteta Specijalnog rezervata prirode “Koviljsko-petrovaradinski rit”.



Slika 19. Test sistem voda-sediment

Testovi su izvedeni po definisanoj radnoj verziji OECD protokola iz 2011. godine, sumiranom u tabeli 7. Parametri rasta koji su mereni u *Myriophyllum* testovima, su bili: dužina biljke iznad sedimenta – DS, ukupna dužina – DU, sveža masa – MSv, suva masa – MSu, sveža masa korena – MK.

Tabela 7: Sažetak uslova pri izvođenju testova inhibicije rasta *Myriophyllum aquaticum* i *Myriophyllum spicatum* (OECD, draft/2011).

Test organizam	<i>Myriophyllum aquaticum</i> , <i>Myriophyllum spicatum</i>
Period adaptacije	3 dana
Period ekspozicije	7 dana
Početna dužina izdanaka	6 ( $\pm$ 1) cm
Osvetljenje	140 $\mu$ E /m <sup>2</sup> s ( $\pm$ 20 $\mu$ E /m <sup>2</sup> s); 16:8h
Temperatura	22 $\pm$ 2 °C
Test supstanca	3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D, dikamba
Sediment	Standardni sintetički sediment OECD/218 (2004)
Hranljivi medijum i diluent	<i>Smart &amp; Barko</i> (1985)
<i>Myriophyllum</i> inokulum	u periodu DAT -3 do DAT 0: 5 izdanka po test posudi u periodu DAT 0 do DAT7: 3 izdanka po test posudi
Ukupan broj test posuda	21 + 5
Postavka testa	kontrola: 6 ponavljanja (po 3 biljke po test posudi) test tretmani: 5 koncentracija, u po 3 ponavljanja po tretmanu (3 biljke po test posudi)
Mereni parametri	dužina izdanka iznad sedimenta – DS, ukupna dužina izdanka – DU, sveža masa – MSv, suva masa – MSu i sveža masa korena – MK
Biološki odgovor	Inhibicija rasta (%) na osnovu stope rasta i prinosa

Tabela 8: Konstituenti standardnog sintetičkog sedimenta korišćenog u testovima (OECD, draft/2011)

Sastojak	Količina po kg suvog sedimenta	Količina u 20 kg suvog sedimenta
Samleven i prosejan treset ( <i>Sphagnum</i> sp.) sušen na sobnoj temperaturi veličine čestica < 1 mm	4.2 g	860 g
Kaolin – glina (sadržaj kaolina > 30%)	200 g	4 kg
Kvarcni pesak (> 50% vel. čestica 50 i 200 $\mu$ m)	750 g	15 kg
NH <sub>4</sub> Cl*	200 mg	4 g
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> *	200 mg	4 g
CaCO <sub>3</sub> (za podešavanje pH 7 $\pm$ 0.5)	7 g	140 g
Voda (min. vlažnost od 30 do 50 %)	400 - 420 ml	8 - 9 l

\*supstance se pre dodavanja u sediment rastvore u destilovanoj vodi

Standardni sintetički sediment čiji je sastav dat u tabeli 8 je pripreman najmanje dva dana pre postavljanja testa, radi obezbeđivanja potpunog vlaženja treseta i stabilizacije pH vrednosti.

Kao kontrolni tretman i medijum za seriju razblaženja korišten je *Smart & Barko* medijum (OECD, draft/2011) (Tabela 9) koji ne sadrži fosfate i azot, u cilju sprečavanja prekomernog razvoja neželjenih algi. Medijum je pripreman najmanje jedan dan pre upotrebe, a pH vrednost medijuma bila je podešena na 7.5 do 8.0. Pored pH vrednosti rastvora, kontrolisani su i drugi fizičko-hemijski parametri kao što su saturacija (koncentracija kiseonika), elektroprovodljivost i temperatura rastvora. Za svaki test, po svakoj supstanci, bilo je potrebno oko 96 l medijuma i 20 kg sedimenta.

Tabela 9: Sastav *Smart & Barko* medijuma (OECD, draft/2011)

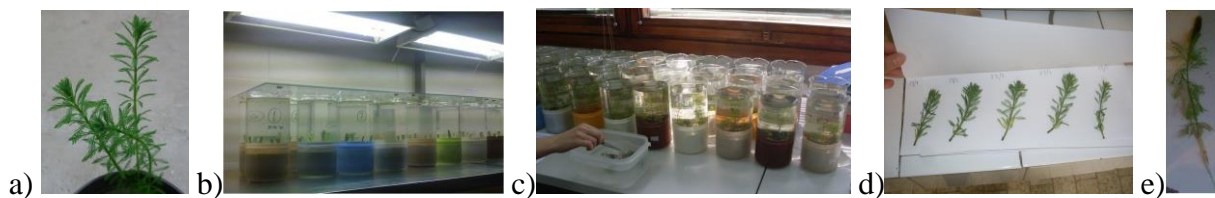
Nutrijent	Količina nutrijenta dodatog u H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	91.7 mg/l
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	69.0 mg/l
NaHCO <sub>3</sub>	58.4 mg/l
KHCO <sub>3</sub>	15.4 mg/l

U 26 plastičnih test posuda sa 800 g standardnog veštačkog sedimenta postavljano je po pet biljaka. Plastične posude sa biljnim materijalom su nakon toga smeštane u velike staklene čaše od 2 l i prelivane sa 1.8 l *Smart & Barko* medijuma. Na posudama je obeleženo pet mesta za pet biljaka, što je omogućilo njihovo kasnije razlikovanje i praćenje individualnog rasta. Biljkama iz laboratorijske kulture, odsecani su zdravi vršni izdanci biljaka bez cvetova, na dužini od  $6 \pm 1$  cm. Protokolom je predviđeno da se biljke postavljaju u standardni sintetički sediment tako da oko 3 cm dužine biljke ostane iznad sedimenta. Svakom pojedinačnom izdanku su izmerene početna dužina i masa, a razlike u masi između pojedinačnih izdanaka nisu smele biti veće od 30%. Nakon sadnje biljaka na obeležena mesta na dubinu od približno 3 cm, izmerena je njihova dužina iznad sedimenta koja je za ovaj test predložena kao osnovni biološki parametar.

Periodu ekspozicije u testovima inhibicije rasta *M. aquaticum* i *M. spicatum* prethodio je period adaptacije u trajanju od 3 dana. Period adaptacije se u ovom testu predlaže u cilju podsticanja rasta korena, adaptacije biljaka na drugačiji hranljivi medijum, a u slučaju emerzne vrste *M. aquaticum* i na novi voda-sediment test sistem. Ovo je bio period od DAT-3 do DAT 0. Nakon adaptacionog perioda od DAT-3 do DAT 0, dve od pet biljaka po test posudi su uklonjene iz svih 26 test posuda, a ostavljene su 3 najsličnije po izgledu, dužini i masi, kako bi se obezbedila uniformnost početnog biljnog materijala. DAT 0 se smatra početkom perioda ekspozicije.

U testu je dalje, za sedmodnevni period izlaganja ostavljeno po tri biljke u sedimentu u 21 test posudi, dok su biljke iz pet tzv. „dodatnih posuda“ (eng. „*additional pots*“) nakon merenja parametara uklonjene iz eksperimenta.

Biljkama iz pet „dodatnih posuda“ su izmerene dužina izdanka iznad sedimenta, ukupna dužina, sveža i suva masa. Dodatnim posudama omogućeno je poređenje vrednosti destruktivnih parametara (ukupna dužina, sveža i suva masa biljke) zabeleženih nultog i sedmog dana testa. Naime, biljke iz „dodatnih posuda“ se smatraju reprezentativnim za početne vrednosti nultog dana, na DAT 0 za parametre rasta koji nisu mogli biti mereni u preostale 21 posude na DAT 0. Parametri ukupna dužina, sveža i suva masa biljaka se smatraju destruktivnim, jer njihovo merenje zahteva uklanjanje biljaka iz sedimenta. Na osnovu srednjih vrednosti merenih parametara biljaka nultog dana iz „dodatnih posuda“, bilo je moguće poređenje sa biljkama kojima je izmeren parametar poslednjeg dana testa, DAT 7 koje su izlagane u periodu ekspozicije. Na osnovu vrednosti izmerenih na DAT 0 i na DAT 7 izračunati su prinos i relativna stopa rasta za destruktivne parametre, dok su prinos i stopa rasta za dužinu iznad sedimenta izračunati poređenjem vrednosti parametra istih biljaka. Pojedine faze testova na vrstama roda *Myriophyllum* prikazane su na slici 20.



Slika 20. Vrste roda *Myriophyllum* u testovima a) vršni delovi biljaka u testu, b) test, c) DAT 0 odvajanje dve od 5 inicijalnih biljaka, d) DAT 0 priprema biljaka iz dodatnih posuda za sušenje, e) biljka izvađena iz sedimenta poslednjeg dana testa

Nultog dana testa pripremani su rastvori tj. serije razblaženja test supstanci za period ekspozicije. Supstance su rastvarane u *Smart & Barko* medijumu (koji je korišten i kao kontrola i kao diluent). Hranljivi rastvor koji je stajao u test posudama u periodu adaptacije, odstranjen je odlivanjem, nakon čega su u odgovarajuće posude sipane odgovarajuće koncentracije rastvora test supstance. Postavka testa je podrazumevala postojanje šest kontrola i po tri ponavljanja od svake koncentracije test supstance. Period ekspozicije je trajao 7 dana i taj deo testova je izveden u statičkim uslovima, dakle, bez promene rastvora.

Po dužini, masi i izgledu najbližnje biljke koje su odabrane da ostanu u testu su od nultog dana testa izlagane seriji razblaženja test supstanci i tokom testa posmatran je efekat na njihov rast. Nultog DAT 0, trećeg DAT 3 i sedmog dana testa DAT 7 merena je dužina biljaka iznad sedimenta, a zabeležena su i subjektivna zapažanja (Tabela 10). Poslednjeg dana testa (DAT 7) je nakon merenja dužine iznad sedimenta biljni materijal izvađen iz posuda i izmerene su ukupna dužina, sveža masa, i sveža masa korenčića biljaka. Nakon toga biljke su smeštane u sušnicu i sušene na 60 °C tokom 2.5 h, nakon čega je izmerena suva masa biljaka. Svi podaci su uneti u tabele, nakon čega je usledila statistička obrada podataka.

Prema protokolu i preporuci IRT, nisu rađeni preliminarni testovi ni za jednu supstancu, već su odmah postavljani tzv. definitivni testovi toksičnosti u seriji od 5 koncentracija. *M. aquaticum* je testiran na šest supstanci, dok je *M. spicatum* testiran na atrazin, izoproturon i 2,4 D. Serije koncentracija test supstanci su bile sledeće:

**3,5 DCP** 1.0, 1.8, 3.2, 5.6 i 10 mg/l za *M. aquaticum*,

**Atrazin** 0.04; 0.08; 0.16; 0.32 i 0.64 mg/l u testu sa *M. aquaticum* i 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0 mg/l u testu sa *M. spicatum*,

**Izoproturon** 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0 mg/l za obe *Myriophyllum* vrste,

**Trifluralin** 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0 mg/l za *M. aquaticum*,

**2, 4 D**, 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0 mg/l za obe *Myriophyllum* vrste,

**Dikamba** 0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1.0, 3.2 mg/l za *M. aquaticum*.

Tokom sprovođenja testa praćeni su i fizičko-hemijski parametri: temperatura vodenog stuba svakodnevno tokom trajanja testa, konduktivitet na početku testa (3210 SET 1 WTW, Austrija), a pH rastvora (340i WTW, Austrija) i zasićenje kiseonikom (3205 WTW, Austria) su mereni nultog i sedmog dana testa.

Tabela 10: Raspored merenja parametara tokom sedmodnevne ekspozicije (OECD, draft/2011)

Period ekspozicije (DAT)	<i>Myriophyllum aquaticum</i> i <i>Myriophyllum spicatum</i>					
	Dužina iznad sedimenta	Ukupna dužina biljke	Sveža masa	Suva masa	Sveža masa korena	pH, O <sub>2</sub> , T i subjektivna zapažanja
0	+					+
3	+					
7	+	+	+	+	+	+

„+” označava da je tog dana izmerena vrednost navedenog parametra

Tokom testa intenzitet svetlosti je bio konstantan ( $140 \pm 20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) u fotoperiodu 16 h osvetljenosti i 8 h mraka. Temperatura u vodenom stubu je održavana na  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nasumičan raspored posuda je bio neophodan kako bi se minimalizovao uticaj razlika u osvetljenosti i temperaturi. Test posude su bile prekrivene providnim staklenim pločama kako bi se umanjilo isparavanje i sprečila eventualna kontaminacija. Radnom verzijom protokola u vreme izvođenja testova strogi kriterijumi validnosti nisu bili definisani, ali su bile propisane vrednosti i opseg variranja temperature i pH, kao i granično variranje vrednosti sveže mase (30%) početnog biljnog materijala, pred period adaptacije. Nultog i sedmog dana testa, merena je pH vrednost rastvora i saturacija kiseonikom, a nultog, trećeg i sedmog dana merene su temperatura (T,  $^\circ\text{C}$ ) i elektroprovodljivost rastvora instrumentom „multi-parameter instrument Ino Lab 3” (WTW - Wissenschaftlich – Technische Werkstätten). Merene vrednosti temperature, saturacije kiseonikom i pH vrednosti rastvora su bile u okviru preporučenih vrednosti i nisu se značajno menjale tokom perioda ekspozicije.

### Formule za izračunavanje stope rasta i inhibicije rasta biljaka u testovima

Merene parametri u testovima su bili:

- broj jedinki, sveža masa i biljna površina u testovima sa *L. minor*
- početna i krajnja masa nodusa, sveža masa i dužina izdanka i korena u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum*
- dužina iznad sedimenta, ukupna dužina, sveža i suva masa i masa korena u testu inhibicije rasta *M. aquaticum* i *M. spicatum* u voda-sediment sistemu

Poređenjem specifične stope rasta (RGR – relative growth rate) i/ili vrednosti prinosa (Y – yield) u test koncentracijama sa kontrolom određena je procentualna vrednost inhibicije.

Relativna stopa rasta je izračunata na osnovu sledeće formule:

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

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

Formula za izračunavanje procentualne vrednosti inhibicije rasta (Ir (%)):

$$\%I_r = \frac{(RGR_c - RGR_t)}{RGR_c} \times 100$$

pri čemu su:

$I_r(\%)$  – procenat inhibicije rasta

$RGR_c$  – srednja vrednost stope rasta u kontrolnom tretmanu

$RGR_t$  – srednja vrednost stope rasta za test koncentraciju

Inhibicija na osnovu relativnih vrednosti prinosa (yield) je izračunata pomoću formule:

$$\%I_y = \frac{(bc - bt)}{bc} \cdot 100$$

gde su:  $I_y\%$  – procenat inhibicije prinosa

$b_c$  – krajnja vrednost minus početna vrednost u kontroli

$b_t$  – krajnja vrednost minus početna vrednost u tretmanu

Inhibicija sveže mase i dužine izdanka i korena u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* i sveže mase korena u testovima sa *M. aquaticum* i *M. spicatum* (voda-sediment) izračunata je na osnovu neobrađenih vrednosti izmerenih poslednjeg dana testa poređenjem sa kontrolom.

U kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta određene su i absorbanca i sadržaj hlorofila *a*. Nodusi su usitnjeni i potapani u 7 ml metanola, koji je korišćen kao rastvarač. Uzorci su ostavljani preko noći na zamračenom mestu. Sutradan su uzorci macerirani i nakon centrifugiranja (15 min. na 800 obrtaja/min) u njima je određena absorbanca na 2 talasne dužine (653 i 666 nm) uz pomoć spektrofotometra. Koncentracija hlorofila *a* je izračunata preko sledećih formula (Lichtenthaler i Wellburn, 1983):

$$C_a = 15.65 A_{666} - 7.34 A_{653} \quad \text{i} \quad C = \frac{C_a \cdot V \cdot R}{m} \cdot 1000$$

pri čemu su:

$C_a$  (mg/dm<sup>3</sup>) – sadržaj hlorofila *a* u ekstraktu

$C$  (mg/g mase lista) – sadržaj hlorofila *a* u nodusu

$V$  (ml) – zapremina rastvarača

$m$  (g) – masa nodusa

$R$  – faktor razblaženja

1000 – konstanta za prevođenje g u mg

### Statistička obrada rezultata

Specifične stope rasta i prinos svih parametara rasta test organizama izračunati su prema formulama prikazanim ranije u tekstu. U svim testovima toksičnosti srednja inhibitorna koncentracija test supstanci, koja dovodi do 50% smanjenja posmatranog parametra u odnosu na kontrolni tretman – IC<sub>50</sub>, je izračunata metodom linearne interpolacije korišćenjem softverskog paketa TesToks, verzija 1.0 (Teodorović i Maurić, 2003). Vrednost NOEC (koncentracija bez efekta, odnosno najviša primenjena koncentracija test supstance koji ne izaziva statistički

značajan efekat u odnosu na kontrolni tretman; engl. *no observed effect concentration*) i LOEC vrednost (najniža primenjena koncentracija test supstance koja izaziva statistički značajan efekat u odnosu na kontrolni tretman; engl. *lowest observed effect concentration*) (Teodorović i Kaišarević, 2014), određene su Dunnett-ovim testom, korišćenjem softverskog paketa TesToks, verzija 1.0 (Teodorović i Maurić, 2003). Dunnett-ov test uključuje analizu varijanse (jednosmerna ANOVA) i, kao post-test, za poređenje srednjih vrednosti  $\pm$  standardna devijacija (sd) svih tretmana sa kontrolom, t-test (kod jednakog broja ponavljanja u svim tretmanima uključujući i kontrolni) ili t-test sa Bonferonijevim adaptacijama u slučaju nejednakog broja ponavljanja. Statistička značajnost je dodeljena uniformno za nivo značajnosti  $p \leq 0.05$ .

Pored ovoga, u cilju procene varijabilnosti svih parametara, izračunat je i koeficijent varijacije ( $CV\% = \text{standardna devijacija} / \text{srednja vrednost}$ ) unutar tretmana, uključujući i kontrolni (uključeno u Dunnett test u paketu TesToks). Da bi se kvantifikovala osetljivost ili statistička snaga testa, a na osnovu MSD – „minimum significant difference“, minimalne statistički značajne razlike, odnosno, najmanje razlike vrednosti posmatranog parametra (biološkog odgovora) između kontrolne grupe i test tretmana koja se može nazvati statistički značajnom, iskazan je i procenat umanjenja vrednosti posmatranog odgovora u test tretmanu u odnosu na kontrolu kao MSD (%) (uključeno u Dunett test u paketu TesToks).

Rezultati su grafički prikazani korišćenjem softverskog paketa Origin, verzija 6.0.

### Model distribucije osetljivosti vrsta

Modelom distribucije osetljivosti vrsta na toksično dejstvo ksenobiotika (engl. *species sensitivity distribution*, SSD), određene su hazardne koncentracije šest testiranih herbicida za određenu frakciju vrsta vodenih biljaka.

Sakupljeni su podaci o testovima toksičnosti sa akvatičnim makrofitama i supstancama 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Korišćene su baze podataka Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA) <http://www.cfpub.epa.gov/ecotox/>, izveštaji Evropske agencije za bezbednost hrane (engl. EFSA – *European Food Safety Authority*) kao i druga dostupna literatura. Uzimane su u obzir samo slatkovodne više biljke, dok su alge i biljke mora izostavljene iz analize.

Napravljen je pregled  $IC_{50}$  vrednosti izračunatih na osnovu prinosa i stope rasta sledećih parametara rasta: broj, dužina, sveža i suva masa biljaka (submerznih i emerznih vrsta) i broj jedinki, površina, sveža i suva masa (kod flotantnih vrsta). Za parametre za koje je pronađeno više vrednosti (iz većeg broja različitih laboratorija/radova), pre uvrštavanja u analizu, izračunata je prosečna vrednost. Podaci ( $IC_{50}$  vrednosti) su sortirani od najnižih ka najvišim i uvršteni u softver za generisanje SSD (<http://www.epa.gov>). Vrednosti za parametrizaciju SSD modela, kao i sami parametri modela su detaljno prikazani u prilogu 7. Vrednostima  $IC_{50}$  su dodeljeni rangovi, vrednosti rangova su transformisane u probit vrednosti, a inhibitorne koncentracije su logaritmovane. Regresionim modelom je procenjena hazardna koncentracija ( $HC_p$ ) za određenu frakciju najosetljivijih vrsta. Hazardnom koncentracijom smatra se koncentracija ksenobiotika (u ovom slučaju herbicida) koja je prihvatljiva za većinu relevantnih vrsta (u ovom slučaju akvatičnih biljaka) u životnoj zajednici, a izaziva efekat samo kod malog broja, odnosno procenta ( $p\%$  npr. 5%) najosetljivijih vrsta. Vrednost  $HC_x$  je izračunata na osnovu formule (Giddings i sar, 2011):



$$HC_x = 10^{((NORMSINV(x) - \text{Intercept}) / \text{Slope})}$$

„*NORMSINV*“ – funkcija izračunava inverznu vrednost standardne normalne kumulativne raspodele

$x$  – osetljiva frakcija vrsta

„*Intercept*“ – odsečak (vrednost  $y$  kad je  $x = 0$ )

„*Slope*“ – nagib krive

## Test supstance

Supstance u testovima su bile: 3,5 dihlorfenol, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Serije razblaženja test supstanci su pravljene od osnovnih rastvora određene koncentracije, uz upotrebu rastvora za razblaživanje (diluenta): *Steinberg* hranljivi medijum u testovima sa *L. minor* i u kontaktnom testu toksičnosti sa *M. aquaticum* i hranljivi medijum *Smart & Barko* u voda-sediment testovima sa *M. aquaticum* i *M. spicatum*.

Supstanca 3,5-dihlorfenol (CAS 591-35-5, hemikalija analitičke čistoće, čistoća 97%, proizvođač Sigma-Aldrich, Nemačka) upotrebljena je kao referalna supstanca.

Atrazin (CAS 1912-24-9, hemikalija tehničke čistoće, komercijalni atrazin čistoće 98%, proizvođač Oxon SpA, Italija, dobijen od firme Galenika Fitofarmacija, Beograd, Srbija). Atrazin (iz grupe triazinskih herbicida) ispoljava mehanizam toksičnog dejstva inhibicijom procesa fotosinteze.

Izoproturon (CAS 34123-59-6, hemikalija tehničke čistoće, čistoća 97%, proizvođač: Gharda chemicals Limited, Mumbai, India, dobijen je za potrebe internacionalnog testa kalibracije metode od Bayer CropScience Aktiengesellschaft, Nemačka). Izoproturon pripada fenilurea grupi herbicida a mehanizam toksičnog dejstva podrazumeva inhibiciju fotosinteze. Izoproturon je odobrena aktivna supstanca u Srbiji.

Trifluralin (CAS 1582-09-8, proizvođač: BASF, Germany), dobijen je za potrebe internacionalnog testa kalibracije metode od BASF, Germany), u obliku koncentrovanog rastvora koji je sadržao 40% (v/v) trifluralina, 25% (v/v) nafte i 25% (v/v) naftalena. Rastvori trifluralina su pravljene od osnovnog rastvora koncentracije 480 g/l od kojeg je pripremljen rastvor niže koncentracije i dalje pravljena serija razblaženja uz upotrebu odgovarajućeg rastvora za razblaživanje. Trifluralin je iz grupe dinitroanilina a mehanizam toksičnog dejstva podrazumeva inhibiciju rasta korena sprečavanjem mitoze. Trifluralin je neregistrabilan u Srbiji i nalazi se na listi zabranjenih aktivnih supstanci.

2,4 D kiselina (CAS No 94-75-7, hemikalija tehničke čistoće, čistoća 96%, proizvođač Changzhou Wintafone Chemical Co., Ltd., dobijeno od Galenika Fitofarmacija, Beograd, Srbija). 2,4 D je derivat fenoksi sirćetne kiseline, a pun naziv je 2,4-dihlorofenoksi sirćetna kiselina. Pripada grupi sintetičkih auksina koji selektivno deluju na dikotiledone biljke. Nalazi se na listi odobrenih supstanci u Srbiji.

Dikamba (CAS 1918-00-9, hemikalija tehničke čistoće, čistoća 98%, proizvođač: Honbor Industrial Co. Ltd China) dobijena od firme Agromarket d.o.o. Kragujevac, Srbija. Dikamba je derivat benzoeeve kiseline koji selektivno deluje na dikotiledone biljke i imitira dejstvo prirodnih biljnih hormona. Nalazi se na listi odobrenih supstanci u Srbiji.

## Analitičke metode za određivanje koncentracija test supstanci

Koncentracije atrazina, izoproturona i trifluralina su određene analitičkim metodama na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, u Centru izvrsnosti za hemiju okoline i procenu rizika (CECRA, PMF UNS), dok su koncentracije 2,4 D i dikambe određene na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu (UNS). Dalje u tekstu dat je kraći opis metoda sa rezultatima određivanja koncentracija test supstanci upotrebljenih u testovima.

Koncentracija referalne supstance nije određivana analitičkim metodama, ali su za izračunavanje rezultata korišćene nominalne vrednosti, oslanjajući se na prethodna iskustva, jer se supstanca, u okrivu Laboratorije, redovno koristi za proveru osetljivosti kulture *L. minor*.

Koncentracija atrazina je određivana u rastvorima u seriji od 1 to 100 µg/l primenom gasne hromatografije sa masenom detekcijom (GC/MS) na instrumentu Agilent Technologies GC 7890A sa MS detektorom 5975C. Pre-koncentracija vodenih uzoraka je određena primenom hromatografije na čvrstoj fazi uz pomoć Superclean ENVI-18 ketrizidža prema standardnoj EPA metodi 508.1 (US EPA, 1995). Efikasnost ekstrakcije za nižu koncentraciju 3 µg/l je bila 116% (RSD = 5.4 %,  $n=5$ ), dok je za višu 90 µg/l bila 102% (RSD = 2.9%,  $n = 3$ ). U uzorcima nominalnih koncentracija 1, 90 i 100 µg/l, merene koncentracije su iznosile: 0.8, 103 i 96 µg/l. Pošto merene vrednosti nisu značajno odstupale od nominalnih, rezultati su obrađeni na bazi nominalnih koncentracija.

Izoproturon je analiziran primenom HPLC/DAD tehnike, nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi primenom C-18 ketrizidža, sa metanolom, u skladu sa EPA metodom 532 (US EPA, 2000). Temperatura kolone je bila 35 °C, protok 1.5 ml/min, a zapremina injektiranja 20 µl. Mobilne faze: 25 mM fosfatni pufer i acetonitril. Početni udeo metanola je bio 40 % i ostao konstantan tokom analize. Trajanje analize je bilo 5 minuta. MDL vrednost za izoproturon u vodi iznosi 1.97 µg/l, a PQL vrednost je 9.86 µg/l (dobijene na osnovu 5 merenja koncentracije od 10 µg/l). Efikasnost ekstrakcije za koncentraciju od 150 µg/l iznosi  $96 \pm 5\%$  (RSD = 5.5%), a za koncentraciju od 10 µg/l iznosi  $100 \pm 2\%$  (RSD = 2.2%). Merene koncentracije u *Steinberg* medijumu početnog dana testa DAT 0 za nominalne koncentracije 10; 100; 1000 µg/l su bile 13.3; 108.5; 1036 µg/l. Rastvori koncentracije 1000 µg/l su razblaženi su 2 puta (250 ml uzorka je pomešano sa 250 ml *Steinberg* rastvora). Efikasnost ekstrakcije u *Steinberg* matriksu za koncentraciju izoproturona od 150 µg/l iznosi  $108 \pm 3\%$  (RSD = 3%). Budući da merene koncentracije nisu značajno odstupale od teorijskih, kao i nakon trodnevnog i sedmodnevnog perioda izlaganja, rezultati testa su izračunavani na osnovu nominalnih koncentracija.

Trifluralin. Alikvote od 1 ml tečne faze su ekstrahovane sa 1 ml heksana (US EPA, 1996) Nakon petnaestominutne tečno-tečne ekstrakcije, analizirano je 0.5 ml ekstrakta, upotrebom gasne hromatografije (GC/µECD; Agilent Technologies 6890 sa 63Ni ECD) primenom DB-XLB kolone (J&W Scientific) i kvantifikovano na osnovu standardne kalibracione metode korišćenjem pentahloronitrobenzena kao internog standarda. Uslovi hromatografije GC/µECD su bili: *split mode* odnos 50:1 – temperature inleta 250 °C, protok gasa u koloni 2 ml/min. Temperaturni program: početna temperatura iznosila je 70 °C (održavana tokom 1 min), nakon čega je rasla do 270 °C 20 °C/min. Rezultati su dobijeni iz tri merenja za četiri koncentracije 0.5, 1, 50 i 100 µg/l. Efikasnost ekstrakcije se kretala u opsegu od 99-118%, sa preciznošću 5-16%.

2,4 D kiselina analizirana je primenom tečne hromatografije prema standardnoj metodi (CIPAC, 1985). Uzorak je rastvoren u standardu i koncentracija 2,4 D je određena uz pomoć HPLC tehnike na koloni sa reverznom fazom, korišćenjem 4-bromfenola kao internog standarda. 2,4 D je odvojen od svih poznatih nečistoća. Koristio se instrument Agilent 1100; Kolona:

Hypersil ODS (2.0 x 250 m x 5  $\mu$ m); Detektor: DAD 280 n. Radni uslovi: Brzina toka mobilne faze 0,9 ml/min; temperatura: sobna; zapremina injekta: 10  $\mu$ l; Mobilna faza: acetonitril:voda (0,3 M NaOH i pH podešen na 2.95 pomoću fosforne kiseline); 2,4 D kalibracioni rastvori – u mobilnoj fazi. Merene vrednosti nisu značajno odstupale od nominalnih, te su rezultati bazirani na nominalnim koncentracijama.

Koncentracija dikambe u rastvorima je merena na osnovu metode Šunjka i sar (2013) upotrebom HPLC tehnike na koloni sa reverznom fazom koristeći UV detektor i eksternu standardizaciju. Temperatura kolone je podešena na 20-40 °C, brzina toka 1,5 ml/min, talasna dužina detektora 280 nm, zapremina injekcije 10  $\mu$ l, a vreme zadržavanja za dikambu je bilo oko 12.2 minuta. Rezultati analize dikambe u *Steinberg* rastvorima na početku testa (DAT 0) za nominalne koncentracije dikambe od 0.01; 0.044 i 0.44 mg/l bili su 0.008; 0.039 i 0.394 mg/l ili 90, 89 i 80% u odnosu na nominalne koncentracije. Posle 7 dana izlaganja, koncentracije su ponovo izmerene i iznosile su redom: 0.007; 0.033 i 0.368 mg/l ili 84, 76 i 75% u odnosu na nominalne koncentracije. U *Smart & Barko* medijumu, nominalne koncentracije su bile 0.01; 0.0439 i 0.439 mg/l. Prvobitno merene koncentracije su bile 0.439, 0.041, 0.009 mg/l što je 100; 93; 90% u odnosu na nominalne koncentracije. Posle 7 dana, koncentracije su bile sledeće: 0.398; 0.036; 0.008, što je 91; 83; 80% u odnosu na nominalne koncentracije. Rezultati pokazuju da je dikamba rastvorena u *Steinberg* rastvoru, kao i u *Smart & Barko* medijumu bila stabilna tokom 7 dana ekspozicije, te su proračuni rađeni na osnovu nominalnih koncentracija.

## 5. Rezultati i diskusija

U ovom poglavlju biće prikazani i prokomentarisani rezultati testova na vrstama roda *Myriophyllum*. U prvom delu biće prezentovani podaci koji se odnose na kontaktne testove toksičnosti sedimenta na *M. aquaticum*, dok će drugi deo obuhvatiti testove inhibicije rasta u voda-sediment sistemu na vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum* sa pojedinačnim supstancama u vodenom rastvoru.

### 5.1. Razvoj kontaktnog testa toksičnosti sedimenta na vrsti *M. aquaticum* i potencijal primene

Poglavlje će obuhvatiti analizu rezultata kontaktnih testova toksičnosti sedimenta, potencijal primene kontaktnog testa za potrebe ekološke procene od hemikalija koje pokazuju afinitet ka vezivanju za sediment i zaključna razmatranja.

U okviru prvog podpoglavlja biće prikazani rezultati internacionalnog testa kalibracije metode za kontaktni test toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum*, rezultati kontaktnog testa toksičnosti realnih uzoraka iz prirode i biće analiziran uticaj strukture i svojstava sedimenta na parametre rasta test organizma. Analiza će obuhvatiti testove na prirodnim uzorcima sedimenta reke Tamiš, Krivaja i Jegrička i testove na sintetičkom sedimentu različite strukture.

Drugi deo poglavlja odnosi se na potencijal primene kontaktnog testa za potrebe ekološke procene od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment. Analiza će obuhvatiti kontaktni test toksičnosti sedimenta obogaćenog različitim koncentracijama atrazina.

#### 5.1.1. Kontaktni testovi toksičnosti sedimenta

##### 5.1.1.1. Internacionalni test međulaboratorijske kalibracije kontaktnog testa toksičnosti sedimenta

Tokom 2012. godine, Laboratorija za ekotoksikologiju (PMF, UNS, Srbija) učestvovala je u internacionalnom testu kalibracije metode za procenu toksičnosti sedimenta (*ring* test) sa vrstom *M. aquaticum* (Feiler, 2012, Feiler i sar, 2014). Metoda je razvijena za procenu ukupne toksičnosti prirodnog sedimenta i supstanci rastvorenih u sedimentu, a cilj *ring* testa je bila analiza preciznosti test metode kroz procenu izvodljivosti, ponovljivosti i reproducibilnosti testa, određivanje kriterijuma validnosti testa (minimalne stope rasta biljaka u kontroli) i opsega osetljivosti na referalnu supstancu 3,5-dihlorfenol. Predložen kriterijum validnosti bila je stopa rasta kontrolnih biljaka  $RGR \geq 0.09$ , a preporučena vrednost inhibicije rasta prilikom izlaganja referalnoj supstanci 3,5 DCP (koncentracije 90 mg/kg suve mase sedimenta) bila je  $35 \pm 15\%$ .

Test je obuhvatio analizu 4 uzorka sedimenta: kontrolni sediment (standardni sintetički sediment), sintetički sediment sa rastvaračem (acetonom), sediment obogaćen referalnom supstancom 3,5 DCP i prirodni sediment obogaćen nikal(II)hloridom (850 mg Ni<sup>2+</sup>/kg suve mase sedimenta), kao primerom umereno kontaminiranog sedimenta. U *ring* test je uključena 21 laboratorija iz 7 evropskih zemalja (Feiler i sar, 2014), ali su u statističku analizu metode uključeni podaci iz samo četrnaest laboratorija. Testovi sedam laboratorija isključeni su iz analize, jer nisu ispunili kriterijum validnosti ili propisane uslove eksperimenta.

U tabeli 11 prikazane su vrednosti stope rasta (RGR) i parametri intra- i interlaboratorijske varijabilnosti *ring* testa ( $CV_r$  i  $CV_R$  (%)), kao i vrednosti RGR i koeficijenta varijacije testova naše laboratorije. Prosečna stopa rasta sveže mase nodusa je u *ring* testu bila 0.135, sa prosečnim koeficijentom varijacije 7% (opseg vrednosti iz pojedinačnih laboratorija bio je 0.89-15.4%). Interlaboratorijska varijabilnost (pokazatelj reproducibilnosti) *ring* testa je bila 20.6%. Slične vrednosti dobijene su i u kontrolnom sedimentu koji su pojedine laboratorije prema protokolu (ISO 16191, 2013) same pripremile (RGR 0.139,  $CV_r$  6.4%,  $CV_R$  17.6%). Rezultati *ring* testa pokazali su niske vrednosti unutar- i interlaboratorijske varijabilnosti za stopu rasta sveže mase nodusa i vrednosti inhibicije rasta u tretmanu sa referalnom supstancom 3,5-DCP u okviru predloženih ( $35 \pm 15\%$ ).

Vrednost stope rasta sveže mase nodusa u eksperimentu Laboratorije za ekotoksikologiju u okviru *ring* testa bila je 0.088 sa  $CV\% = 20.6\%$ , dok ove vrednosti za dugoročnu laboratorijsku kontrolu iznose 0.099 i 15.8%.

Zaključeno je da test metoda pokazuje visoku stabilnost, da preporučeni kriterijum validnosti za stopu rasta od  $\geq 0.09$  može da se prihvati i da na osnovu rezultata, test može biti predložen i upotrebljavan kao standardna metoda u proceni ukupne toksičnosti sedimenta. Da bi se obezbedila visoka statistička snaga testa, predložen je i dodatni kriterijum validnosti – maksimalna vrednost koeficijenta varijacije stope rasta kontrolnih biljaka od 15% (ISO 16191, 2013; Feiler i sar, 2014).

Tabela 11: Rezultati internacionalnog testa kalibracije metode za procenu toksičnosti sedimenta

uzorak	RGR		Inhibicija u odnosu na kontrolu (%)		CV%		CVR
	<i>RING</i>	<i>LECOTOX</i>	<i>RING</i>	<i>LECOTOX</i>	<i>RING</i>	<i>LECOTOX</i>	<i>RING</i>
Kontrola	0.135	<b>0.088*</b> <b>0.099**</b>	/	/	7 (0.89-15.4)	<b>20.6*</b> <b>15.8**</b>	20.6
Kontrola rastvarača (acetona)	0.133	0.073	1.48%	16.8%	9.7	36.5	22.4
Sediment sa 3,5 DCP	0.09	0.022	33.3%	33.7%	10.6 (1.07-33.75)	7.9	25
Prirodni sediment sa NiCl <sub>3</sub>	0.102	0.058	24.4%	75.2%	13.7 (1.21-15.7)	30.14	24.6

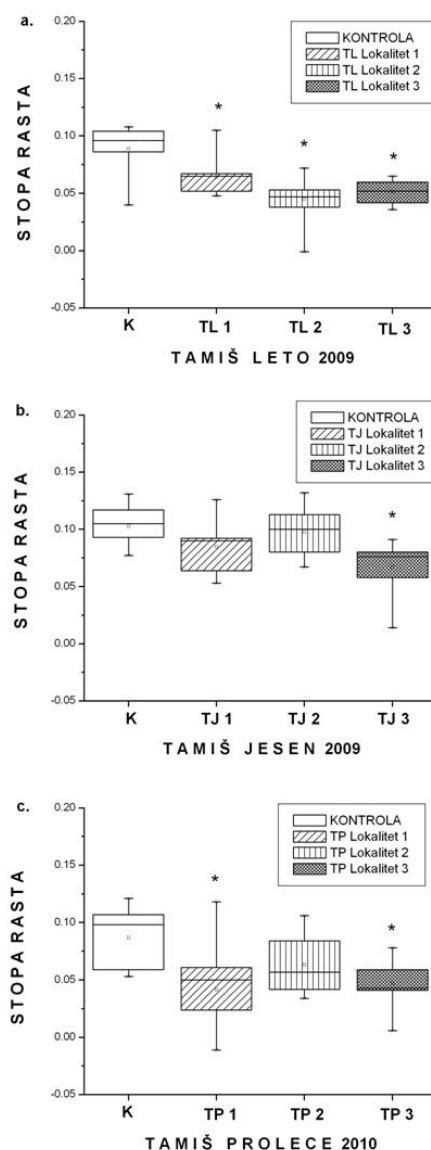
\* *LECOTOX* kontrola u *RING* testu, \*\* dugoročna laboratorijska kontrola *LECOTOX*

### 5.1.1.2. Primena kontaktnog testa u proceni toksičnosti uzoraka sedimenta iz prirode

Kontaktne testove toksičnosti prirodnog sedimenta izvedeni su na uzorcima sedimenta reka Tamiš, Krivaja i Jegrička. Testovi sedimenta reke Tamiš su postavljeni u 3 sukcesivna eksperimenta: TL – leto 2009, TJ – jesen 2009 i TP – proleće 2010. U svakoj seriji su analizirana

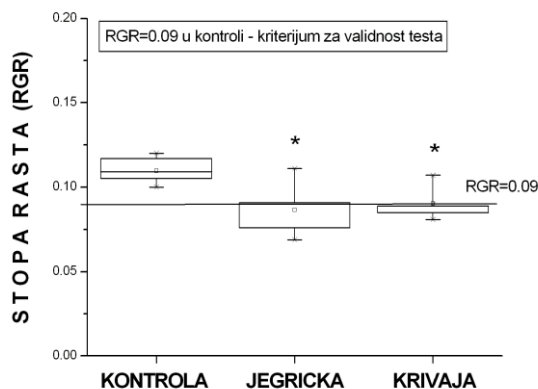
po 3 uzorka uzeta u navedenim sezonama na istim lokalitetima: 1. između naselja Jaša Tomić i Sečanj 2. naselje Jabuka 3. uzvodno od brane kod Pančeva. Kontaktni testovi prirodnog sedimenta iz Krivaje i Jegričke su postavljeni u jednom eksperimentu sa pojedinačnim uzorcima uzetim 2011. godine.

Na slici 21 (a-c) prikazane su stope rasta standardnog parametra sveža masa nodusa *M. aquaticum* u uzorcima sedimenta uzetih u tri sezone sa tri lokaliteta duž toka reke Tamiš u odnosu na kontrolni tretman. Statistički značajne razlike vrednosti posmatranog parametra u odnosu na kontrolu zabeležene su u 6 od 9 uzoraka.



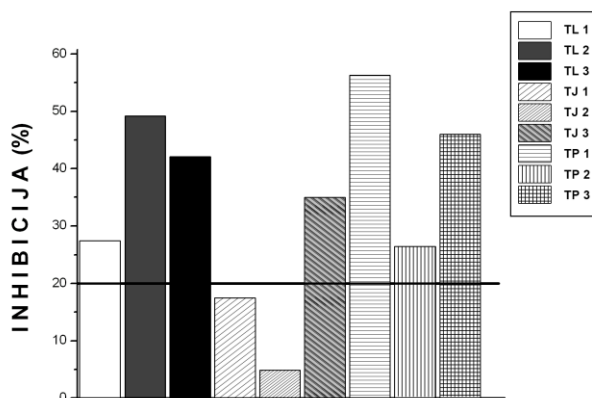
Slika 21 (a-c). Stope rasta *Myriophyllum aquaticum* u uzorcima sedimenta reke Tamiš (leto, jesen 2009, proleće 2010) u odnosu na kontrolni tretman. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* statistički značajne razlike u vrednosti stope rasta u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA,  $t$ -test sa Bonferronijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Na slici 22 su prikazane vrednosti stope rasta *M. aquaticum* izračunate na osnovu sveže mase nodusa nakon završenog desetodnevog testa ukupne toksičnosti uzoraka sedimenta uzetih sa dva lokaliteta reka Jegrička i Krivaja u leto 2011. godine. Statistički značajan pad vrednosti posmatranog parametra u odnosu na kontrolu zabeležen je kod oba uzorka. Međutim, biljke u oba uzorka dostižu, standardom propisanu, minimalnu prosečnu stopu rasta od 0.09.



Slika 22. Stope rasta (na osnovu sveže mase) *Myriophyllum aquaticum* u uzorcima sedimenta reka Jegrička i Krivaja (leto 2011) u odnosu na kontrolni tretman. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* statistički značajne razlike u vrednosti stope rasta u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Na slici 23 je prikazana inhibicija rasta u svim uzorcima sedimenta reke Tamiš. Kao granična vrednost za indikaciju toksičnosti sedimenta, primenjen je kriterijum od 20% inhibicije rasta u odnosu na kontrolu (Höss i sar, 2010). Na histogramu se može primetiti da je inhibicija rasta u 7 od 9 uzoraka bila veća od 20%.



Slika 23. Inhibicija rasta *M. aquaticum* (izražena u % u odnosu na kontrolu) u 9 uzoraka sedimenta reke Tamiš: leto (TL 1-3) i jesen (TJ 1-3) 2009 i proleće 2010 (TP 1-3); Lokaliteti: 1 – Jaša Tomić/Sečanj, 2 – Jabuka, 3 – Pančevo (uzvodno od brane).

Vrednosti stope rasta (RGR) *M. aquaticum* izračunate na osnovu standardnog parametra sa vrednostima inhibicije rasta (%) iz testova sa uzorcima iz prirode su prikazane u tabeli 12 (tri lokaliteta i tri sezone monitoringa sedimenta reke Tamiš i uzorci sedimenta Jegričke i Krivaje).

Tabela 12: Vrednosti stope rasta sveže mase nodusa i inhibicije u odnosu na kontrolu u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta reka Tamiš (leto, jesen i proleće, lokaliteti 1, 2 i 3), Jegrička i Krivaja

Uzorci sedimenta							
VREME UZORKOVANJA	KONTROLA	Tamiš 1		Tamiš 2		Tamiš L3	
	RGR	RGR	I (%)	RGR	I (%)	RGR	I (%)
Leto 2009.	0.089	0.065	27.45*	0.045	49.16*	0.052	42.07*
Jesen 2009.	0.103	0.085	17.48	0.098	4.85	0.067	35*
Proleće 2010.	0.087	0.038	56.44*	0.064	26.85	0.047	45.58*
VREME UZORKOVANJA	KONTROLA	Jegrička		Krivaja			
	RGR	RGR	I (%)	RGR	I (%)		
Leto 2011.	0.11	0.087	20.81*	0.091	17.31*		

\* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Stope rasta u uzorcima sedimenta reke Tamiš su bile u opsegu od 0.098 (TJ2) do 0.038 (TP1), a inhibicije na osnovu stope rasta od 4.85% (TJ2) do 56.44\*% (TP1). Inhibicija stope rasta sveže mase nodusa u uzorku sedimenta iz Jegričke je nešto iznad 20%, dok su biljke u sedimentu iz Krivaje imale inhibisan rast za 17.3% u odnosu na kontrolu.

Prema preporuci za graničnu vrednost toksičnosti sedimenta od 20% u testovima sa akvatičnim biljkama (Höss i sar, 2010), sedam uzoraka sedimenta reke Tamiš i uzorak sedimenta iz Jegričke se mogu smatrati toksičnim.

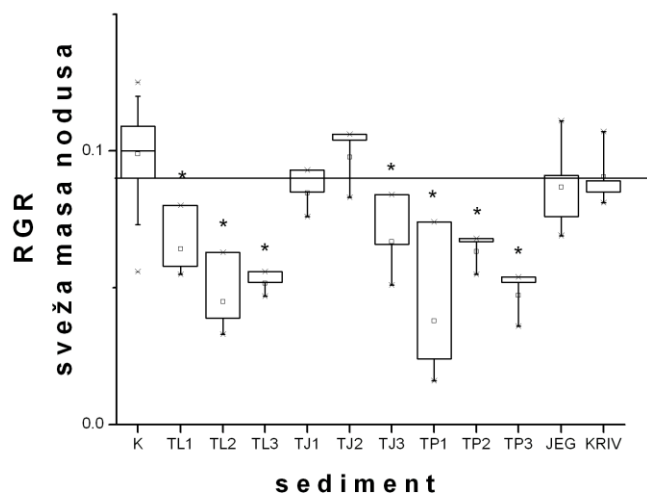
Ako se vrednosti stope rasta u sedimentu reke Tamiš uporede sa stopom rasta dugoročne laboratorijske kontrole (25 ponavljanja) (Slika 24), statistički značajno niže vrednosti su u 7 od 9 uzoraka (poređenjem sa odgovarajućim kontrolama iz testa je bilo 6 od 9 uzoraka), dok se vrednosti inhibicije kreću od 1.24 (TJ2) do 61.6% (TP1) (Slika 24). Vrednosti inhibicije rasta u uzorcima u odnosu na dugoročnu kontrolu pokazuju određene razlike u odnosu na vrednosti prilikom poređenja sa kontrolom u testu, ali je zaključak o toksičnosti sedimenta isti: toksičnim se može smatrati istih 7 od 9 uzoraka, jer pokazuju inhibiciju iznad 20% (32.3-61.6%).

Stope rasta biljaka u sedimentu Jegričke i Krivaje nisu statistički značajno niže u odnosu na vrednosti dugoročne laboratorijske kontrole (Slika 24) a vrednosti inhibicije iznose 12.3% i 8.5% (Slika 25). Toksičnost sedimenta Jegričke je nešto iznad granice toksičnosti ako se poredi sa kontrolom iz testa, dok se poređenjem sa dugoročnom kontrolom ne smatra toksičnim. Sediment Krivaje ne može se okarakterisati kao toksičan, bilo da se poredi sa kontrolom iz testa ili dugoročnom laboratorijskom kontrolom.

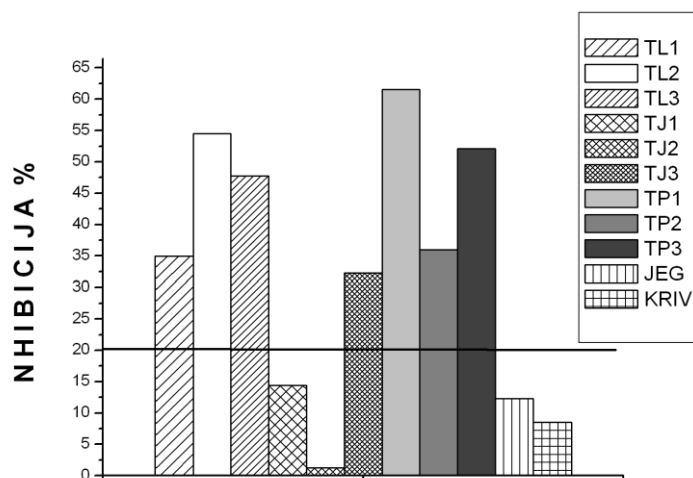
Ipak, govoriti o toksičnosti sedimenta bez analize fizičko-hemijskih osobina sedimenta, a samo sa aspekta rezultata ekotoksikoloških testova, nije preporučljivo. Studije ukazuju na to da u brojnim slučajevima postoji neslaganje između hemijskih analiza i rezultata biomonitoringa – veoma često standardi kvaliteta životne sredine nisu prekoračeni, a analiza faune dna ukazuje na značajno negativno dejstvo kontaminanata (Chapman, 1989). Postoje i slučajevi kada je dokazano prisustvo visokih koncentracija ksenobiotika u sedimentu, a ekotoksikološki testovi ne daju očekivane odgovore koji su u skladu sa nivoom zagađenja. Supstance vezane za čestice sedimenta nisu uvek lako biodostupne organizmima dna, te koncentracija polutanata koja je izmerena u sedimentu ne mora odgovarati stvarnom nivou kontaminacije kojima su organizmi izloženi (Teodorović i Kaišarević, 2014). Kombinacijom hemijskih i bioloških analiza



omogućuje se adekvatnija procena rizika od hemikalija vezanih za sediment i zaštita živog sveta vode i sedimenta.



Slika 24. Stope rasta *M. aquaticum* u uzorcima rečnog sedimenta Tamiša (leto i jesen 2009, proleće 2010), Jegričke i Krivaje (leto 2011) u odnosu na kontrolne (dugoročna laboratorijska i prirodna kontrola). Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrednost u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* statistički značajne razlike u vrednosti stope rasta u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



Slika 25. Inhibicija rasta *M. aquaticum* u uzorcima rečnog sedimenta Tamiš (leto i jesen 2009, proleće 2010), Jegrička i Krivaja (leto 2011) u odnosu na dugoročnu laboratorijsku kontrolu.

U okviru studije o statusu reke Tamiš (Teodorović, 2010), sediment reke Tamiš je fizičko-hemijski okarakterisan na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, u Centru izvrsnosti za hemiju okoline i procenu rizika (CECRA). Sediment se, prema teksturi,

ubraja u krupnopeskovitu ilovaču, sa značajnim udelom krupnog i sitnog peska, od 76.3-84.3% i sa niskim do umerenim udelom finog organskog mulja. Sadržaj frakcije < 2 µm iznosi 2.41-5.85%, a fina frakcija sedimenta (prah) čini 7.7-12.2% suve mase sedimenta. Sadržaj organske materije se kreće od 2.1% (TP1) do 8.2% (TJ2).

Hemijskom analizom sedimenta reke Tamiš (Teodorović, 2010) obuhvaćen je sadržaj teških metala (kadmijum (Cd), olovo (Pb), živa (Hg)) i arsena (As) u sedimentu, sadržaj ukupnih ugljovodonika i mineralnih ulja i sadržaj specifičnih organskih polutanata u sedimentu (PAH, organohlorini pesticidi, PCB). Za interpretaciju rezultata analize kvaliteta sedimenta tada su korišćeni holandski sistemi klasifikacije sedimenta (koji podrazumevaju pet klasa: 0 nezagađen, I i II neznatno zagađen, III zagađen, IV i IV+ izuzetno zagađen) (NW4, Ministerie van V&W, 1998), ciljne vrednosti prema Međunarodnoj komisiji za zaštitu reke Dunav (eng. *The International Commission for the Protection of the Danube River* – ICPDR vrednosti), i to vrednosti ISQG (eng. *interim sediment quality guideline*) iznad koje je uticaj na akvatične organizme moguć i vrednosti PEL (eng. *probable effect level*) iznad koje je uticaj na akvatične organizme verovatan. Korišćen je i sistem klasifikacije propisan za kvalitet zemljišta u Republici Srbiji preko maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK) štetnih materija u zemljištu jer tokom izrade studije granične vrednosti za sediment u Srbiji nisu postojale.

U ovoj disertaciji, koncentracije su poređene i sa novo-uvodenim nacionalnim graničnim vrednostima za sediment, i to ciljnim vrednostima (c.v.) i maksimalno dozvoljenim koncentracijama (MDK) (Sl. glasnik RS, 50/12), sa pragom efekta TEC (eng. *threshold effect concentration*) i vrednošću PEC (eng. *probable effect concentration*) (MacDonald i sar, 2000), sa *Consensus 1* i 2 vrednostima (de Deckere i sar, 2011) (Tabela 13). Vrednost *Consensus 1* i ciljna vrednost imaju za dugoročni cilj dobar ekološki status. Vrednosti c.v., *Consensus 1* i TEC su vrednosti ispod kojih štetan efekat nije verovatan, a vrednosti MDK, *Consensus 2* i PEC su vrednosti iznad kojih je štetan efekat verovatan. U tabeli 13 su vrednosti koje su prekoračile granične vrednosti koje za dugoročan cilj imaju dobar ekološki status (vrednosti c.v., *Consensus 1*, TEC) označene podebljanim slovima, dok su vrednosti koje su prekoračile granične vrednosti iznad kojih je štetan efekat verovatan (vrednosti *Consensus 2*, PEC, MDK) označene podebljanim slovima i podebljanim okvirom ćelija u tabeli.

Sediment reke Tamiš se u pogledu prisustva teških metala, PAH, PCB i organohlorinih pesticida generalno smatra nezagađenim. Izuzetak je letnji uzorak sa lokaliteta 3 koji je zbog povišenih koncentracija Hg svrstan u III klasu (zagađen sediment). Veći broj uzoraka sedimenta zbog povišenog sadržaja As i mineralnih ulja odgovara klasi III (zagađen) i IV (izuzetno zagađen) (Teodorović, 2010). Prirodni radionuklidi su bili u uobičajenim granicama za rečni sediment i zemljište. Arsen je detektovan na svim lokalitetima i u svim sezonama, pri čemu su više koncentracije detektovane u letnjoj i jesenjoj sezoni. Granične vrednosti (ciljna vrednost, MDK, TEC, PEC, *Consensus 1* i 2 vrednosti) za As su prekoračene u većini uzoraka, a jesenji uzorak sedimenta uzvodno od brane kod Pančeva (lokalitet 3) je prema holandskoj metodologiji svrstan u klasu IV. Granične vrednosti kadmijuma su prema određenim metodologijama prekoračene u oko 50% uzoraka, a više vrednosti izmerene su u letnjem i jesenjem periodu.

Tabela 13. Fizičko-hemijska analiza uzoraka sedimenta reke Tamiš (Consensus 1; Consensus 2 (de Deckere i sar, 2011); b) TEC; PEC (MacDonald i sar, 2000); c) c.v.; MDK (Sl. glasnik RS, 50/12))

SEDIMENT		TL1	TL2	TL3	TJ1	TJ2	TJ3	TP1	TP2	TP3	Cons 1 <sup>a</sup> / TEC <sup>b</sup> / CV <sup>c</sup>	Cons 2 <sup>b</sup> / PEC <sup>b</sup> /MDK <sup>c</sup>
Inhibicija ( <i>Myriophyllum aquaticum</i> )	%	27.45	49.16*	42.07*	17.48	4.85	34.95*	56.4*	26.85	45.6*		
TOC	%	3.81	7.69	6.94	8.10	8.54	2.75	2.07	7.56	8.18	-	-
Fina frakcija ≤ 63 μm	%	17.5	26.1	41.7	3.90	3.00	13.9	5.20	5.90	2.40	-	-
Klasifikacija (NW4, Ministerie van V&W, 1998)	klasa	III	III	III	III	II	IV	III	II	II		
Ukupni ugljovodonici	mg/kg	1560	1690	1290	1210	2100	1980	1600	2020	2130	-	-
Mineralna ulja	mg/kg	<b>1430</b>	<b>1480</b>	<b>1070</b>	<b>940</b>	<b>1480</b>	<b>1260</b>	<b>1250</b>	<b>1620</b>	<b>1490</b>	50 <sup>c</sup>	3000 <sup>c</sup>
Cd	mg/kg	0.36	<b>1.03</b>	<b>2.36</b>	0.76	<b>1.82</b>	<b>3.34</b>	<MDL	0.22	0.44	0.93 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>
Pb	mg/kg	<b>37.2</b>	<b>46.2</b>	<b>64.9</b>	7.30	11.2	13.8	<b>31.8</b>	17.3	20.8	25 <sup>a</sup>	118 <sup>a</sup>
Hg	mg/kg	0.035	0.212	<b>2.47</b>	0.052	0.143	0.152	0.065	0.21	0.13	0.23 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>
As	mg/kg	<b>25.8</b>	<b>17.4</b>	<b>35.5</b>	<b>36.6</b>	<b>36.6</b>	<b>44.3</b>	6.73	4.11	4.59	7.9 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
Naftalen	μg/kg	<PQL	<PQL	<PQL	1.07	<PQL	<PQL	9.95	1.42	2.64	200 <sup>a</sup>	6600 <sup>a</sup>
Acenaftilen	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	30 <sup>a</sup>	5200 <sup>a</sup>
Acenaften	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<PQL	<MDL	4.13	40 <sup>a</sup>	3300 <sup>a</sup>
Fluoren	μg/kg	<PQL	<PQL	<PQL	1.53	<PQL	1.47	4.67	1.83	19.7	40 <sup>a</sup>	260 <sup>a</sup>
Fenantren	μg/kg	5.53	2.27	6.64	8.28	2.03	10.7	17.6	27.3	95.7	180 <sup>a</sup>	890 <sup>a</sup>
Antracen	μg/kg	<MDL	<PQL	<PQL	<PQL	<MDL	<PQL	1.51	1.86	4.58	30 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>
Fluoranten	μg/kg	1.52	3.23	2.75	2.25	1.17	5.87	6.82	12.3	86.6	250 <sup>a</sup>	1200 <sup>a</sup>
Piren	μg/kg	<PQL	2.33	2.67	1.26	<PQL	4.72	6.40	10.9	70.9	240 <sup>a</sup>	940 <sup>a</sup>
Benzo(a)antracen	μg/kg	<PQL	2.40	2.02	<PQL	<PQL	1.85	<MDL	<MDL	37.0	120 <sup>a</sup>	600 <sup>a</sup>
Krizen	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<PQL	<PQL	2.24	<MDL	<MDL	19.4	150 <sup>a</sup>	830 <sup>a</sup>
Benzo(b)fluoranten + Benzo(k)fluoranten	μg/kg	<PQL	<PQL	<PQL	<PQL	<PQL	1.27	8.50	10.9	45.7	170+80 <sup>a</sup>	660+320 <sup>a</sup>
Benzo(a)piren	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	4.53	2.79	21.7	140 <sup>a</sup>	600 <sup>a</sup>
Benzo(g,h,i)perilen	μg/kg	<PQL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	3.68	2.99	17.0	110 <sup>a</sup>	450 <sup>a</sup>
Dibenzo(a,h)antracen + Ideno(1,2,3-c,d)piren	μg/kg	<PQL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	7.84	6.93	41.4	20+120 <sup>a</sup>	120+480 <sup>a</sup>
Ukupni PAH	μg/kg	7.05	10.2	14.1	14.4	3.20	28.2	71.5	79.2	466	1610 <sup>b</sup>	22800 <sup>b</sup>
Suma PAH *	μg/kg	1.52	2.23	2.75	2.25	1.17	7.14	31.4	35.9	340	910 <sup>a</sup>	3860 <sup>a</sup>
Suma PCB (28, 52, 101, 118, 118, 138, 153,180)	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<b>83.3</b>	<b>91.1</b>	<MDL	<MDL	<MDL	7.7 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>
α-BHC	μg/kg	<MDL	<MDL	<PQL	<PQL	<PQL	0.670	<MDL	<MDL	<MDL	3 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>
γ-BHC	μg/kg	<MDL	0.75	<PQL	<PQL	1.06	<PQL	<MDL	0.53	<PQL	2.37 <sup>b</sup>	4.99 <sup>b</sup>
β-BHC	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	0.66	0.62	<PQL	<MDL	<MDL	<MDL	9 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>
Heptahlor	μg/kg	<MDL	<b>1.68</b>	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<b>2.03</b>	<MDL	<b>13.2</b>	0.7 <sup>c</sup>	68 <sup>c</sup>
δ-BHC	μg/kg	<MDL	<MDL	<PQL	1.18	1.15	4.22	<MDL	<MDL	<MDL		
Aldrin	μg/kg	1.39	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<PQL	<MDL	<MDL	<PQL	0.06 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>
Heptahlor-epoksid	μg/kg	<b>22.6</b>	<b>55.3</b>	2.03	<PQL	<b>3.18</b>	<b>5.29</b>	<MDL	<MDL	<MDL	2.47 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>
Dieldrin	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	1.9 <sup>b</sup>	61.8 <sup>b</sup>
Endrin	μg/kg	<b>7.27</b>	<MDL	<MDL	<MDL	1.91	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2.22 <sup>b</sup>	207 <sup>b</sup>
Endrin-aldehid	μg/kg	<MDL	<MDL	0.67	0.84	1.43	<PQL	<PQL	1.66	1.24		
Endo-sulfansulfat	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	1 <sup>c</sup>	4000 <sup>c</sup>
4,4'-DDE	μg/kg	<b>1.07</b>	<PQL	<b>1.55</b>	<PQL	<b>1.04</b>	<b>0.8</b>	<MDL	<b>1.02</b>	<PQL	0.31 <sup>a</sup>	6.8 <sup>a</sup>
4,4'-DDD	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<b>0.75</b>	<PQL	<MDL	<MDL	<MDL	0.06 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>
4,4'-DDT	μg/kg	<MDL	<MDL	<MDL	<PQL	<PQL	<PQL	<MDL	<MDL	<MDL	0.09 <sup>c</sup>	9 <sup>c</sup>
Ukupni DDTs	μg/kg	1.07	<PQL	1.55	<PQL	1.79	0.8	<MDL	1.02	<PQL	5.28 <sup>b</sup>	572 <sup>b</sup>

\* Suma PAH: naftalen, fenantren, antracen, fluoranten, krizen, benzo(a)fluoranten, benzo-(k)fluoranten, benzo(a)piren, benzo(g,h,i)perilen; PAHs: PQL – 1,0 μg/kg; MDL 0,4 μg/kg; Pesticidi: PQL – 0,5 μg/kg; MDL – 0,2 μg/kg; PCBs: PQL – 10 μg/kg; MDL – 4 μg/kg; koncentracije izražene prema suvoj masi sedimenta.

Primećena je tendencija akumulacije Cd u sedimentu donjeg toka reke. Granične vrednosti za Pb nisu prekoračene ni u jednom uzorku. Sadržaj Hg u sedimentu nije prelazio granične vrednosti, osim u uzorku pre brane kod Pančeva u letnjem periodu (TL3) u kojem su prekoračene vrednosti prema svim korišćenim standardima kvaliteta, na osnovu čega je sediment svrstan u klasu III.

*Consensus 2* i PEC vrednosti su prekoračene u pet slučajeva Hg (2.45 mg/kg) uzorak TL 3, suma PCB-a (83.3 and 91.1 µg/kg u uzorcima TJ2 i TJ3) i heptahlor-epoksida (22.6 i 55.3 µg/kg u uzorcima TL1 and TL2). Koncentracije As, Pb, Cd, 4,4'-DDE i heptahloro su bile više od *Consensus 1* i *TEC* u nekoliko uzoraka. Ciljne vrednosti za mineralna ulja su prekoračena u svim uzorcima. Koncentracija Cd je bila iznad 1.2 mg/kg granične vrednosti prema ICPDR-u u uzorcima TL3, TJ2 i TJ3 (ICPDR, 2009). Prema izveštaju tima za monitoring kvaliteta površinskih voda u AP Vojvodini 2013. godine ([www.ekourb.vojvodina.gov.rs](http://www.ekourb.vojvodina.gov.rs)), moguće je da je sadržaj As u sedimentu na nivou prirodnog fona, pošto su prema ranijim ispitivanjima na području Banata zabeležene povišene koncentracije As u podzemnoj vodi, kao posledica njegovog prisustva u zemljištu.

Sadržaj mineralnih ulja je u svim uzorcima sa lokaliteta J.Tomić-Sečanj (lokalitet 1) bio iznad dozvoljenog nivoa, te je sediment sa ovog lokaliteta svrstan u klasu III. PAH su detektovani na svim lokalitetima u svim sezonama, ali referentna vrednost za sumu PAH-ova nije prekoračena ni u jednom uzorku, te je sediment na osnovu PAH-ova svrstan u klasu 0 i ocenjen kao nezagađen. Sve granične vrednosti za PCB su prekoračene u dva uzorka: kod Jabuke i Pančeva u letnjem periodu (TL2 i TL3), dok je u drugim uzorcima sadržaj PCB-a bio ispod granice detekcije. Na osnovu sadržaja pesticida, a primenom holandske metodologije, sediment se pretežno svrstava u klase 0 i I, što nije slučaj kod uzoraka iz letnjeg perioda kod J.T-Sečanj i Jabuke (TL1 i TL2) koji su svrstani u klasu III.

Prema kontaktnom testu toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum*, jesenji uzorci sedimenta sa lokaliteta J.Tomić-Sečanj i Jabuka nisu toksični (inhibicije 17.48 i 4.85%). Uzorci koji su, prema *Myriophyllum* testu bili najtoksičniji su tri uzorka sa lokaliteta uzvodno od brane kod Pančeva TL3, TJ3 i TP3 (vrednosti inhibicije: 42.1, 35 i 45.6%) i po jedan uzorak sa druga dva lokaliteta I(TL2) = 49.2% i I(TP1) = 56.4% (Tabela 13).

U odnosu na hemijsku analizu, najveće odstupanje je kod uzorka TP1 koji je prema *Myriophyllum* testu imao najvišu toksičnost (I=56.4%) a prema hemijskoj analizi je jedino sadržaj Pb bio nešto iznad graničnih vrednosti (*Consensus 1*, *TEC*) i pojedini PAH-ovi i PCB su bili iznad ciljnih vrednosti prema klasifikaciji RS (naftalen, fenantren, fluoranten, benzo(a)piren i heptahlor (PCB)).

Odstupanje postoji i kod uzorka TJ2 u kojem su hemijskom analizom detektovane koncentracije iznad propisanih granica za Cd, As, pojedine PCB i mineralna ulja, a inhibicija rasta je bila svega 4.85%. Moguć uzrok je visok sadržaj organske materije (TOC = 8.54%) koji je mogao da utiče na biodostupnost polutanata. S druge strane, sediment TJ3 koji je prema hemijskoj analizi nešto manje opterećen polutantima i sa nižim sadržajem organske materije (TOC 2.75%), doveo do inhibicije 35%.

Visoke inhibicije u letnjim uzorcima (TL2 i TL3) i jesenjem uzorku TJ3 mogu biti pripisane prisustvu teških metala, dok u uzorku TP3 nisu detektovani teški metali i As iznad graničnih vrednosti, ali je *Myriophyllum* test rezultirao visokom inhibicijom rasta (I = 45.6%). Koncentracija pojedinih PAH i PCB je bila iznad ciljnih vrednosti prema klasifikaciji RS (naftalen, fenantren, fluoranten, benzo(a)piren i heptahlor (PCB)).

Moguć uzrok neslaganja rezultata hemijske i ekotoksikološke analize može biti i prisustvo većeg broja neidentifikovanih polutanata, jer je broj analiziranih i kvantifikovanih

polutanata mali, ali i struktura sedimenta (granulacija / veličina čestica, sadržaj organske materije i drugo). Uzorci iz prirode variraju ne samo po tipu i koncentraciji toksičnih supstanci, nego i po geohemijskoj strukturi, što može uticati na parametre rasta test organizama. Höss i saradnici (2010) su primetili varijabilnost u uzorcima niske do umerene kontaminiranosti i pretpostavili da su uzroci varijabilnosti u različitoj strukturi i veličini čestica sedimenta, kao i različitom sadržaju organske materije. Ove karakteristike sedimenta mogu da utiču na varijabilnost parametara, a time i na interpretaciju rezultata testa, pa i procenu kvaliteta sedimenta.

Iako hemijskom analizom sedimenta reke Tamiš nije dokazano prisustvo velikog broja polutanata sa prekoračenim graničnim vrednostima u uzorcima sa lokaliteta 1 i 3 uzetim u prolećnoj sezoni, sadržaj organske materije u uzorku sa lokaliteta 1 i sadržaj gline u uzorku lokaliteta 3 bio je vrlo nizak: 2.07% i 2.4%, što je, takođe, moglo da utiče na rast biljaka. Sa druge strane, u letnjem uzorku sa lokaliteta 1 sa približnim sadržajem organske materije (2.75) i drugim sličnim karakteristikama, zabeležena je inhibicija rasta *M. aquaticum* od svega 17.9%.

Inhibiciju rasta *M. aquaticum* u sedimentu koji hemijskom analizom nije bio svrstan u toksične, mogli su izazvati i neidentifikovani polutanti. Od neidentifikovanih polutanata su najintenzivniji efekat na rast biljaka mogla imati sredstva za zaštitu bilja koja su spiranjem sa poljoprivrednih površina zanošenjem tokom primene (drift) i drugim procesima mogli dospeti u vodu i sediment.

Prema izveštaju tima za monitoring kvaliteta površinskih voda u AP Vojvodini 2013. godine ([www.ekourb.vojvodina.gov.rs](http://www.ekourb.vojvodina.gov.rs)), kvalitet vode Tamiša u pogledu sadržaja prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci odgovara II klasi (dobar status), a kvalitet sedimenta odgovara klasi IV prema sadržaju As i klasi III prema sadržaju Ni, pri čemu se smatra da kontaminirani sediment reke Tamiš može biti posledica prekograničnog zagađenja, na osnovu toga da što Tamiš sa teritorije Srbije ne primaznačajnije količine industrijskih i komunalnih otpadnih voda.

Prema istraživanjima mnogih autora (na primer Brils 2008; Chapman 2007) sediment u kojem koncentracije polutanata prekoračuju SQG vrednosti ne dovodi uvek do ispoljavanja toksičnih efekata u ekotoksikološkim testovima kao ni do strukturnih i funkcionalnih promena u zajednici bentosa na mestu uzorkovanja. Najčešći razlog je smanjena biodostupnost pojedinih polutanata. Nasuprot ovom, česti su i sasvim drugačiji scenariji (videti *Tabelu 1, poglavlje 2.2.2. Procena rizika i karakterizacija sedimenta*) – u velikom broju slučajeva, primećeno je da u uzorcima sedimenta u kom koncentracije analiziranih supstanci ne prekoračuju vrednosti SQG rezultati testova toksičnosti sedimenta ukazuju na prisustvo neanaliziranih ili neidentifikovanih toksičnih supstanci, a negativne promene u zajednici bentosa (u poređenju sa referalnim lokalitetom) ukazuju na ukupne nepovoljne ekološke uslove. Kako bi mere očuvanja dobrog ekološkog statusa određenog vodenog ekosistema bile efikasnije, potrebno je bolje razumevanje odnosa između kontaminacije sedimenta i stvarnog rizika na funkcionisanje ekosistema (Heugens et al, 2001 – cit. Brils 2008, Chapman 2007).

Feiler i saradnici (2004) su poredili kontaktne testove toksičnosti sedimenta na *M. aquaticum* i testove porne vode na *L. minor* na četiri uzoraka sedimenta različitog nivoa zagađenja: dva uzorka praktično nezagađenog sedimenta, jedan uzorak umereno zagađenog sedimenta i jedan uzorak veoma zagađenog sedimenta. Rezultati testova porne vode na *L. minor* bili su u skladu sa hemijskom analizom kojom su obuhvaćeni prioritetni polutanti (teški metali, neka organska perzistentna jedinjenja). Rast *L. minor* u uzorcima niske kontaminacije je inhibiran 2 i 7%, u uzorcima srednje kontaminacije 35%, dok je u uzorku visoke kontaminacije inhibicija bila 62%. U kontaktnim testovima na *M. aquaticum* primećeno je odstupanje od

rezultata hemijske analize (samim tim i odstupanja od rezultata *Lemna* testova). U nezagađenom sedimentu, inhibicija rasta je iznosila -6 i 37%, u sedimentu umerene kontaminacije -5%, dok je u veoma kontaminiranom sedimentu (prema hemijskoj analizi) rast *M. aquaticum* inhibiran svega 17%. Prema vrednostima inhibicije rasta, veoma kontaminiran sediment nije bio toksičan za *M. aquaticum*, a jeste za *L. minor*. Sa druge strane, sediment niske kontaminiranosti na osnovu testa toksičnosti sa *M. aquaticum*, (37% inhibicija) može se kategorisati kao toksičan, a na osnovu *Lemna* testa kao netoksičan. Autori su pretpostavili da je potencijalni uzrok ovakvom neslaganju rezultata dobijenih hemijskim i ekotoksikološkim metodama, ali i različitim ekotoksikološkim metodama međusobno, prisustvo herbicida u koncentracijama iznad praga biološkog dejstva na koje *L. minor* nije osetljiva, budući da je u blizini mesta uzorkovanja sedimenta bila poljoprivredna površina sa koje su u vodeni ekosistem mogli dospeti herbicidi namenjeni kontroli dikotiledonih biljaka. Takođe, mala osetljivost *M. aquaticum* na visoko kontaminirani sediment mogla je ukazivati na to da toksične supstance nisu bile biodostupne ovoj test vrsti. Na osnovu sličnosti i razlika u rezultatima hemijske analize i *Lemna* i *Myriophyllum* testova zaključeno je da je test toksičnosti sedimenta na *M. aquaticum* koristan dodatak seriji testova koje postoje za procenu ekotoksikološkog rizika u vodi i sedimentu.

U studiji Feiler i saradnika (2013) analiziran je 21 uzorak sedimenta iz površinskih voda, serijom kontaktnih testova toksičnosti na različitim organizmima. Rezultati testova su poređeni sa standardima kvaliteta sedimenta (SQG vrednostima). Cilj studije je bio da se utvrdi u kolikoj meri su rezultati serije testova toksičnosti sedimenta na reprezentativnim organizmima različitih trofičkih nivoa u saglasnosti sa propisanim standardima kvaliteta sedimenta i u kolikoj meri ta serija testova može biti značajna dopuna u ekološkoj proceni rizika od toksičnosti sedimenta. Studija je obuhvatila testove na vrsti bakterije, kvasca, nematode, ribe (test na embrionima), makrofite i predložena je kategorizacija efekta na posmatrani parametar i test organizme iz pojedinačnih testova u tri klase. Za akvatične biljke je predložena klasifikacija na osnovu inhibicije rasta u klase: I kategorija <20% ne postoji značajan efekat, II kategorija 20-40% efekat srednje jačine, III kategorija >40% značajan efekat. Nakon kategorizacije efekta iz pojedinačnih testova, predložena je klasifikacija sedimenta na osnovu serije testova, u 5 klasa:

Klasa I – svi testovi su rezultirali kategorijom efekta I – nije toksičan

Klasa II – 1 test u kategoriji II, i nijedan u kategoriji III – blago toksičan

Klasa III – 2 testa u kategoriji II i nijedan u kategoriji III – srednje toksičan

Klasa IV – 3 testa u kategoriji II i 1 test u kategoriji III – toksičan

Klasa V – 3 testa su u kategoriji II i III (pokazuju toksičan efekat) – vrlo toksičan.

Istraživanje je pokazalo da je klasifikacija sedimenta na osnovu serije testova bila u saglasnosti sa klasifikacijom na osnovu SQG kada se radilo o veoma kontaminiranom sedimentu. Međutim, u poređenju ekotoksikološke i klasifikacije na osnovu SQG kod uzoraka nezagađenog sedimenta, uočeno je da je klasifikacijom baziranom na SQG vrednostima, u većem broju slučajeva, rizik od toksičnosti sedimenta bio potcenjen, odnosno da je klasifikacijom na osnovu serije testova ukazano na veći rizik od kontaminiranog sedimenta za akvatične organizme. Rezultatima ove studije ukazano je na potrebu primene serije testova toksičnosti u proceni rizika od kontaminiranog sedimenta

U pojedinim studijama, rezultati ekotoksikoloških analiza uzoraka sedimenta bili su u određenoj meri u skladu sa rezultatima hemijske analize. Höss i saradnici (2010) nisu zabeležili inhibiciju rasta iznad 20% ni u jednom od 10 testiranih uzoraka sedimenta niskog nivoa

kontaminacije (sa smanjenom stopom rasta u 4 od 10 uzoraka), a najviše vrednosti stope rasta su zabeležene u sedimentu sa najvišim procentom fine frakcije. Stešević i saradnici (2007) su analizom 9 uzoraka sedimenta Skadarskog jezera zabeležili niske vrednosti inhibicije (najviše 21%). Hemijskom analizom sedimenta Skadarskog jezera obuhvaćen je samo ograničen broj polutanata (pretežno metala), te je uočena inhibicija rasta biljaka pripisana povišenim koncentracijama hroma. Planojević i saradnici (2011) su analizom veoma zagađenog sedimenta kanala Vojlovica (Industrijska zona jug, Pančevo) u kontaktnom testu toksičnosti sa *M. aquaticum* zabeležili inhibicije u rasponu od 33.3 do 70.35 %. Rezultati kontaktnog testa su bili u saglasnosti sa hemijskom analizom: najviša inhibicija 70.35% je zabeležena u uzorku sa visokim vrednostima Hg, Cd, PAH i PCB. U uzorcima u kojima su izmerene niže vrednosti teških metala i PAH i PCB, inhibicija je bila oko 30%. Sadržaj organske materije u svim uzorcima je bio oko 7%, a inhibicija rasta biljaka dovedena je u vezu sa izuzetno visokim koncentracijama žive i kadmijuma.

Fizičko-hemijsku karakterizaciju sedimenta Jegričke i Krivaje takođe je izvršio Centar izvrsnosti za hemiju okoline i procenu rizika (CECRA) Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine (PMF, UNS).

Tabela 14. Fizičko-hemijske osobine sedimenta reka Jegrička i Krivaja

<b>Prametar/uzorak</b>	<b>Krivaja</b>	<b>Jegrička</b>
<i>Myriophyllum aquaticum</i> test, I %	17.31	20.8
Suva materija (%)	48.84	41.08
Vlaga (%)	51.16	58.92
Organska materija (%)	10.10	9.16
TOC (%)	3.06	3.28
Granulometrijska analiza	2 mm - 7.28% 1 mm - 9.91% 0.8 mm - 7.16% 0.4 mm - 16.42% 0.2 mm - 18.27% 0.125 mm - 14.15% 0.063 mm - 13.73% 0.063-0.02mm - 8.81% 0.020-0.005 mm - 0.52% 0.005-0.002 mm - 0.59% <0.002 mm - 0.09%	2 mm - 4.41% 1 mm - 8.35% 0.8 mm - 6.83% 0.4 mm - 17.71% 0.2 mm - 17.54% 0.125 mm - 14.54% 0.063 mm - 18.38% 0.063-0.02mm - 5.46% 0.020-0.005 mm - 2.79% 0.005-0.002 mm - 1.13% <0.002 mm - 0.63%
PAH	+	+
Pesticidi	+	+
MiroErod	+	+
SRB test		+

Sediment Jegričke i Krivaje je sličan u pogledu sadržaja suve materije (48.8 i 41.1%), vlage (51.2 i 58.9%), organske materije (10.1 i 9.2%), TOC-a (3.06 i 3.28%) i granulometrijskog sastava. Fizičko-hemijske osobine sedimenta iz Krivaje i Jegričke su prikazane u tabeli 14.

Hemijskom analizom uzoraka vode i sedimenta Jegričke i Krivaje (Tubić i sar, 2013) detektovano je prisustvo određenih organskih polutanata, pri čemu su uzorci sedimenta bili

opterećeniji od vodenog stuba, a u sedimentu Jegričke je u odnosu na sediment Krivaje broj različitih polutanata bio veći. U sedimentu Jegričke je detektovano više od 15 PAH-ova, od kojih su neki na listi prioriternih polutanata, a u sedimentu Jegričke i Krivaje detektovani su i pesticidi u tragovima: alahlor (herbicide), hlorneb (fungicide) i insekticide (4,4'-DDE, 4,4'-DDD, hlordan, endosulfan). Prema izveštaju tima za monitoring kvaliteta površinskih voda u AP Vojvodini 2013. godine ([www.ekourb.vojvodina.gov.rs](http://www.ekourb.vojvodina.gov.rs)), smatra se da su pritisci na Krivaju iz koncentrisanih izvora zagađivanja (otpadne vode) i difuznih izvora (spiranje sa okolnog poljoprivrednog zemljišta) veoma izraženi i značajni. Zagađenje potiče od industrije, poljoprivrede i gradskih (komunalnih) otpadnih voda.

Jači efekat na rast biljaka ispoljen je u uzorcima sedimenta iz Jegričke sa inhibicijom rasta od 20.1% naspram sedimenta iz Krivaje sa inhibicijom rasta od 17.3% u odnosu na kontrolu. Statistička snaga ovog testa bila je visoka MSD = 17.2%. Ako se inhibicija rasta biljaka iz ova dva uzorka iskaže u odnosu na dugoročnu laboratorijsku kontrolu, dobijaju se niže vrednosti 12.3% i 8.5%. Sediment Jegričke je na osnovu poređenja sa dugoročnom laboratorijskom kontrolom netoksičan (inhibicija je < 20%).

Ovakav rezultat ukazuje na potrebu da se uzorak iz prirode uvek uporedi sa različitim kontrolama: standardnom sintetičkom kontrolom utvrđenog sastava, dugoročnom laboratorijskom kontrolom i, što je još važnije, kontrolom sa referalnog lokaliteta iz prirode sa sličnim sastavom strukturnih elemenata sedimenta.

Primena kriterijuma od 20% inhibicije rasta za klasifikovanje u toksične sedimente može se preporučiti kada su statistička snaga testa i osetljivost testa visoki, što se ogleda u niskim vrednostima MSD% (preporučljivo ispod 25%).

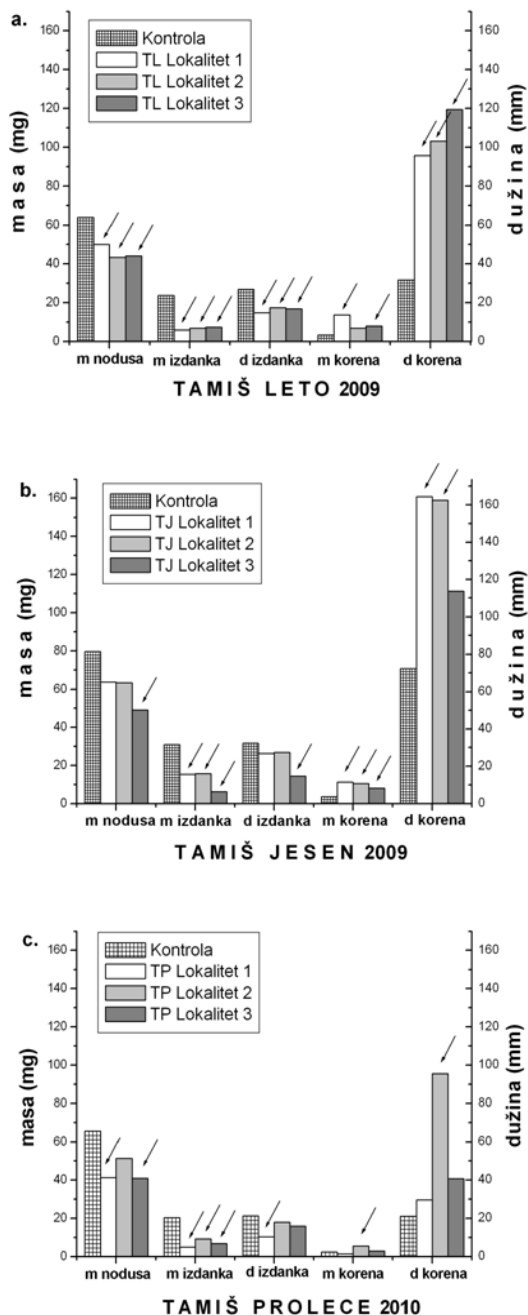
### 5.1.1.3. Alternativni parametri u testovima toksičnosti sedimenta

Parametri koji se u testovima na akvatičnim makrofitama analiziraju, su: dužina i masa izdanka, stabla, korena, odnos korena i izdanka, koncentracija hlorofila itd. Parametri koji se ekotoksikološkim testovima uzimaju u obzir su oni koji su osetljivi i oni koji su ekološki relevantni. Od velikog značaja je i to da varijabilnost parametra izražena koeficijentom varijacije, CV (%), bude niska. Niskom varijabilnošću omogućuje se jasnije razdvajanje promena u rastu biljaka nastalih urođenom varijabilnošću vrste i promena izazvanih hemijskim stresom (Knauer i sar, 2008). Da bi se smanjila varijabilnost nastala manipulacijom biljnim materijalom tokom testa, protokolima se predlaže kvalitativna i kvantitativna uniformnost početnog biljnog materijala u vidu preporučenih vrednosti mase, dužine itd. Takođe, smatra se da je tumačenje rezultata na osnovu stope rasta koja uključuje i dimenziju vremena (trajanje testa) naučno utemeljenije i opravdanije prilikom poređenja vrednosti većeg broja parametara različitih vrsta (Bergtold and Dohmen, 2011).

Pored glavnog parametra – stopa rasta na osnovu sveže mase nodusa, u testovima toksičnosti sedimenta, posmatrani su i drugi parametri: masa i dužina izdanka, i korena, koncentracija hlorofila *a*, i sadržaj hlorofila *a* u nodusu (absorbanca). Na slici 26 (a-c) i u tabeli 15 prikazane su srednje vrednosti različitih parametara u testu toksičnosti uzoraka sedimenta reke Tamiš u odnosu na kontrolu: masa nodusa, masa izdanka, dužina izdanka, masa korena i dužina korena. Konzistentno kod svih uzoraka, uočeno je smanjenje mase i dužine izdanka i povećanje mase i dužine korena u odnosu na kontrolu. U većini uzoraka ove promene su



statistički značajne. U tabeli 15 su prikazane i vrednosti inhibicije rasta parametara u odnosu na kontrolu (u slučaju mase i dužine izdanka reč je o inhibiciji rasta, dok je u slučaju mase i dužine korena reč o stimulaciji rasta).



Slika 26 (a-c). Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg) dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa *M. aquaticum* na uzorcima sedimenta sa tri lokaliteta reke Tamiš uzetih u leto i jesen 2009. i proleće 2010. godine. Zbog preglednosti su prikazane samo srednje vrednosti, a strelicom su označene vrednosti koje su statistički značajno manje od kontrole (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Tabela 15: Srednje vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korena i vrednosti inhibicije rasta u odnosu na kontrolu u kontaktnim testovima sedimenta reke Tamiš

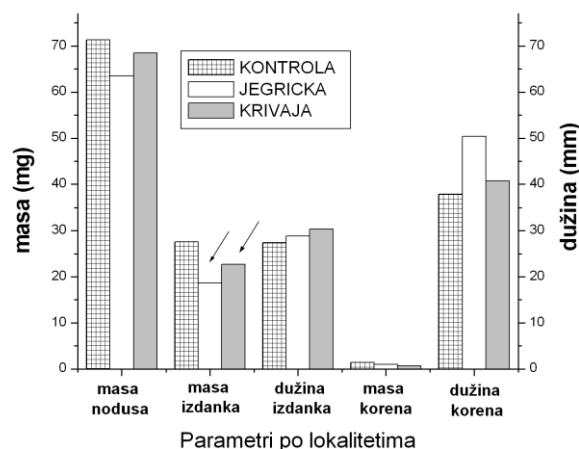
Tamiš leto	m izd (mg)	I %	d izd (mm)	I %	m k (mg)	I %	d k (mm)	I %
<b>K</b>	23.66		26.78		3.2		31.8	
<b>TL1</b>	5.89	75.1 *	14.67	45.2 *	13.7	-324.1 *	89.0	-201.2 *
<b>TL2</b>	6.66	71.9 *	17.33	35.3 *	6.7	-107.1	103.0	-224.3 *
<b>TL3</b>	7.33	69.0 *	16.78	37.3 *	7.9	-143.5 *	119.6	-276.5 *
Tamiš jesen	m izd (mg)	I %	d izd (mm)	I %	m k (mg)	I %	d k (mm)	I %
<b>K</b>	31.01		31.78		3.7		70.9	
<b>TJ1</b>	15.29	50.7 *	26.22	17.5	11.3	25.0	160.9	-127 *
<b>TJ2</b>	15.63	49.6 *	26.89	15.4	10.5	-130.4 *	159.0	-124.3
<b>TJ3</b>	6.36	79.5 *	14.44	54.6 *	8.2	-19.2	111.3	-57.1
Tamiš proleće	m izd (mg)	I %	d izd (mm)	I %	m k (mg)	I %	d k (mm)	I %
<b>K</b>	20.29		21.22		2.4		21.1	
<b>TP1</b>	6.42	68.4 *	13.14	39.3	1.5	25.0	45.3	-114.5
<b>TP2</b>	9.2	54.7 *	17.89	15.7	5.5	-130.4 *	95.5	-352.4 *
<b>TP3</b>	6.78	66.6 *	15.94	24.9	2.9	-19.2	40.8	-93.2

\* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Na slici 27 i u tabeli 16 prikazane su srednje vrednosti različitih parametara u kontaktnom testu toksičnosti uzoraka sedimenta Jegričke i Krivaje u odnosu na kontrolu: masa nodusa, masa i dužina izdanka i masa i dužina korena. Kod oba uzorka sedimenta je uočeno smanjenje mase izdanka i korena i povećanje dužine izdanka i korena test organizma u odnosu na kontrolu, mada u većini slučajeva ove promene nisu statistički značajne. U tabeli 16 su prikazane i vrednosti inhibicije rasta odabranih parametara u odnosu na kontrolu.

Zanimljivo je da je rast korena stimulisan u svim uzorcima sedimenta reke Tamiš, ali nije u uzorcima sedimenta Jegričke i Krivaje. Moguće objašnjenje leži u razlikama u strukturi i granulometrijskom sastavu sedimenta. Sastav sedimenta Jegričke i Krivaje je nešto drugačiji od sastava sedimenta Tamiša, a sličniji standardnom sintetičkom sedimentu u pogledu ukupnog organskog ugljenika (TOC) i sadržaju fine frakcije. Sediment Krivaje ima 3.06% TOC-a, frakcije  $\leq 63 \mu\text{m}$  ima 23.74%, sediment Jegričke ima 3.28 % TOC-a, frakcije  $\leq 63 \mu\text{m}$  ima 28.39%. Standardni sintetički sediment je pravljen prema recepturi standarda (ISO 16191, 2013) sa 5% treseta, 20% kaolina i 74% peska. Prema Feiler i saradnicima (2014) sintetički sediment u kontaktnim testovima sadržao je 66.4% peska (čestice veličine 63-2000  $\mu\text{m}$ ) i 33.6% fine frakcije (kaolin, prah, veličina čestica  $< 63 \mu\text{m}$ ). Sediment reke Tamiš spada u krupnopeskovitu ilovaču, sa značajnim udelom krupnog i sitnog peska, od 76.3-84.3%, ima relativno varijabilni sadržaj organske materije 2.1-8.2% i čestica različitih veličina: frakcije  $< 2 \mu\text{m}$  2.41-5.85%, a fine frakcije (prah) 7.7-12.2%. Sa druge strane, u uzorcima sedimenta iz Jegričke i Krivaje zabeleženo je povećanje dužine izdanaka u odnosu na kontrolu, dok je dužina izdanka u sedimentu reke Tamiš u svim uzorcima bila manja u odnosu na kontrolnu. Nešto više vrednosti

dužine korena u nekontaminiranom prirodnom sedimentu u odnosu na kontrolu su zabeležili i Knauer i saradnici (2008) i to 14.8 u odnosu na 12.8 cm.



Slika 27. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa *M. aquaticum* na uzorcima sedimenta sa lokaliteta reka Jegrička i Krivaja uzetih u leto 2011. godine. Zbog preglednosti prikazane su samo srednje vrednosti. Strelicom je označena vrednost koja je statistički značajno različita od odgovarajuće kontrole (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Tabela 16. Srednje vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korena i vrednosti inhibicije rasta *M. aquaticum* u odnosu na kontrolu u kontaktnim testovima sedimenta reke Krivaja i Jegrička

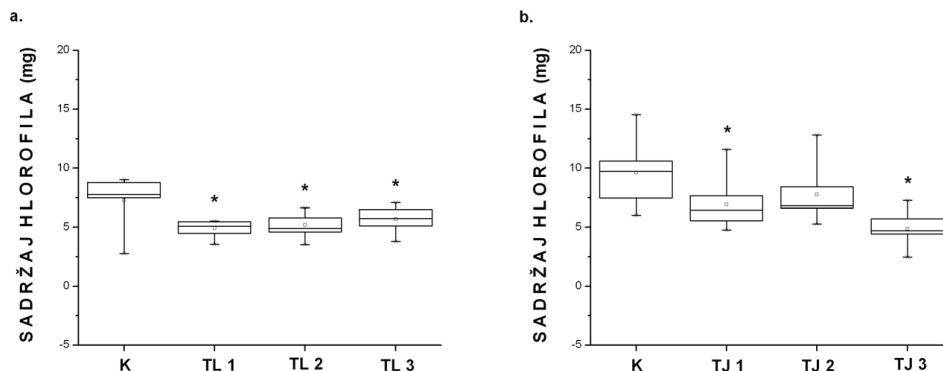
uzorci	m izd (mg)	I %	d izd (mm)	I %	m k (mg)	I %	d k (mm)	I %
<b>K</b>	27.59		27.39		1.4		37.8	
<b>Krivaja</b>	18.64	32.4 *	28.83	-5.3	1.0	28.2	50.4	-33.3
<b>Jegrička</b>	22.69	17.8 *	30.33	-10.8	0.6	55.9	40.7	-7.5

\* statistički značajne razlike u vrednosti u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

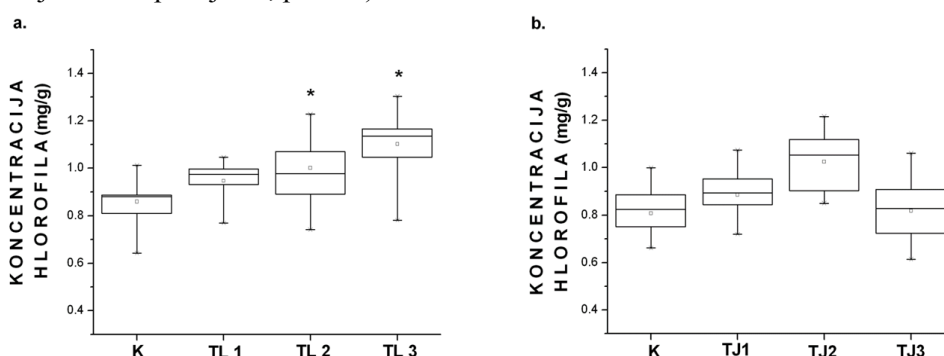
Stimulisan rast biljaka u sedimentu sa niskim nivoom kontaminacije u odnosu na kontrolni zabeležen je i u drugim studijama (Höss i sar, 2010) – više vrednosti RGR primećene su u 6 od 10 uzoraka sedimenta. Stimulisan rast biljaka primećen je i u nekontaminiranom sedimentu iz prirode u odnosu na sintetički sediment (Feiler i sar, 2004; Knauer i sar, 2008). Budući da u kontroli (standardnom sintetičkom sedimentu) citirani autori nisu detektovali povišene koncentracije toksičnih supstanci, slabiji rast biljaka u kontrolnom sedimentu nije se mogao pripisati prisustvu toksičnih materija.

Na slikama 28. i 29. prikazane su vrednosti sadržaja hlorofila *a* u nodusu (mg) i koncentracije hlorofila *a* (mg/g) u uzorcima sedimenta reke Tamiš (uzetih u a) leto i b) jesen) u odnosu na kontrolu. U tabeli 17 prikazane su srednje vrednosti istih parametara, uz vrednosti inhibicije rasta. Kod svih uzoraka, uočeno je smanjenje sadržaja i povećanje koncentracije hlorofila *a* u odnosu na kontrolu. U većini uzoraka je smanjenje sadržaja hlorofila *a* u nodusu

statistički značajno, dok je povećanje koncentracije hlorofila *a* u odnosu na kontrolu značajno u uzorcima uzetim u leto, sa lokaliteta 2 i 3.



Slika 28. Vrednosti sadržaja hlorofila *a* (mg) u nodusu *M. aquaticum* u kontaktnom testu uzoraka sedimenta reke Tamiš uzetih u (a) leto i b) jesen 2009) u odnosu na kontrolu. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



Slika 29. Vrednosti koncentracije hlorofila *a* (mg/g) u nodusu *M. aquaticum* u kontaktnom testu uzoraka sedimenta reke Tamiš (uzetim u leto i jesen 2009. godine) u odnosu na kontrolu. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t* test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Tabela 17: Vrednosti sadržaja hlorofila *a* u nodusu, koncentracije hlorofila *a* i inhibicije u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta reke Tamiš (leto i jesen)

TAMIŠ - SEDIMENT		K	Lokalitet 1		Lokalitet 2		Lokalitet 3	
			vr.	I (%)	vr.	I (%)	vr.	I (%)
LETO 2009	sadr. Chl <i>a</i> u nodusu	7.27	4.93	32.2*	5.19	28.5*	5.69	21.7*
	konc. Chl <i>a</i>	0.82	0.95	-15.2	1.00	-21.8*	1.10	-34.0*
JESEN 2009	sadr. Chl <i>a</i> u nodusu	9.63	6.92	28.2*	7.76	19.5	4.87	49.5*
	konc. Chl <i>a</i>	0.89	0.92	-3.81	1.03	-16	0.82	-7.83

\* statistički značajne razlike u vrednosti u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

U nastavku je dat tabelarni pregled različitih parametara u kontrolnim tretmanima (standardni sintetički sediment) iz sedam eksperimenata sa *M. aquaticum* (Tabela 18). Prikazane

su srednja vrednost (sr.vr.), standardna devijacija (sd), medijana, koeficijent varijacije (CV%) i opseg (minimalne-maksimalne vrednosti) sledećih parametara rasta: masa nodusa (na početku i na kraju testa), prinos biomase (razlika između početne i krajnje mase nodusa), stopa rasta (RGR – izračunata na osnovu sveže mase nodusa), masa izdanka (izražena kao zbir masa bočnih izdanaka), masa korena (izražena kao zbir masa adventivnih korenčića), dužina izdanka (izražena kao zbir dužina bočnih izdanaka), dužina korena (izražena kao zbir dužina adventivnih korenčića), odnos dužine korena i izdanka, odnos mase korena i izdanka, koncentracija hlorofila *a* po gramu nodusa i sadržaj hlorofila *a* (absorbanca) u ekstraktu dobijenom od celog nodusa na kraju testa.

Vrednosti koje se odnose na kontrolne biljke su iz sledećih testova: tri kontaktna testa toksičnosti prirodnog sedimenta reke Tamiš, jedan kontaktni test toksičnosti sedimenta Krivaje i Jegričke, test na sedimentu sa različitim sadržajem organske materije, test na sedimentu sa različitim sadržajem kaolina i peska i test toksičnosti sedimenta obogaćenim različitim koncentracijama atrazina. Ove kontrolne vrednosti se odnose na 25 ponavljanja (videti poglavlje 4. *Materijal i metode*). Stope rasta odnose se na period od 10 dana, a kriterijum validnosti testa podrazumeva stopu rasta sveže mase kontrolnih biljaka od 0.09.

Tabela 18: Varijabilnost parametara rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* u kontrolnom – standardnom sintetičkom sedimentu

Parametri	ponavljanja	sr.vr.	± sd	medijana	opseg (min-max)	CV %
Masa nodusa početna (g)	25	25.5	2.01	24.9	22.7-29.8	7.89
Masa nodusa krajnja (g)	25	69.4	10.9	67.9	41.6-92.3	15.7
Prinos biomase (g)	25	43.9	9.9	43.2	17.9-62.5	22.6
<b>Stopa rasta (sveže mase nodusa)</b>	25	<b>0.099</b>	0.01	0.1	0.056-0.12	<b>15.8</b>
Masa izdanka (g)	25	23.47	8.73	24.3	6.6-43.8	37.2
Masa korena(g)	25	3.9	2.74	3.3	0.53-11.07	70.4
Dužina izdanka (mm)	25	24.4	6.5	24.3	12.7-36.7	26.9
Dužina korena (mm)	25	55.23	40.43	42	4.67-159	73.2
Odnos masa korena/masa izdanka	25	0.18	0.16	0.1	0.02-0.64	85.1
Odnos dužina korena/dužina izdanka	25	2.46	1.95	1.8	0.18-6.66	79.4
Absorbanca (mg)	13	8.9	2.6	8.65	5.01-14.5	28.9
Koncentracija hlorofila <i>a</i> (mg/g)	13	0.91	0.11	0.9	0.66-1.14	11.9

Iz rezultata prikazanih u tabeli 18 se vidi da uslovi gajenja kulture (opisani detaljno u poglavlju Materijal i metode) obezbeđuju zadovoljavajući prinos individualnih nodusa – početna masa nodusa  $25.5 \pm 2.01$  mg (raspon 22.7-29.8 mg) u testovima zadovoljava kriterijum standarda ( $25 \pm 6$  mg) uz minimalne varijacije (7.89%). Takođe, zadovoljen je uslov za prihvatanje testa, koji je standardom postavljen kao minimalna stopa rasta na osnovu sveže mase nodusa u kontrolnom tretmanu od 0.09. Vrednost koeficijenta varijacije za glavni parametar je bliska propisanoj (15%). Mala varijabilnost glavnog parametara je osnov za visoku statističku snagu i osetljivost sedimentnog testa.

Od svih parametara rasta, najmanju varijabilnost, a time i najveću stabilnost imaju početna i krajnja masa nodusa, kao i stopa rasta i prinos na osnovu sveže mase nodusa. Koeficijenti varijacije redom iznose: 7.89, 15.7, 15.8 i 22.6 %. Pored ovih, visoku stabilnost pokazuje i koncentracija hlorofila *a* po gramu zelenog dela biljke (nodusa) izmerena poslednjeg

dana testa sa  $CV = 11.9\%$ . Niska varijabilnost koncentracije hlorofila *a* može ukazivati na mogućnost upotrebe ovog parametra kao surogat parametru biomase.

Međusobno sličnu varijabilnost pokazuju absorbanca (28.9%) i dužina izdanka (26.9%), a visoku varijabilnost pokazuju neobrađene vrednosti mase i dužine korena izmerene poslednjeg dana testa (oko 70%). Odnos korena i izdanka na osnovu mase i dužine ima najviše vrednosti  $CV\%$  – iznad 75%.

Varijabilnost svih pokazatelja rasta biljaka koji podrazumevaju nodus, bilo da je reč o masi, prinosu ili sadržaju hlorofila *a*, direktno zavise od uniformnosti nodusa na početku testa, koja je bila veoma visoka. Ovo ukazuje da protokol uzgoja laboratorijske kulture *M. aquaticum* obezbeđuje visoku ponovljivost, ali sa druge strane, ukazuje i na visoku preciznost eksperimentatora pri manipulaciji biljnim materijalom, jer su nodusi odabrani za testove uniformni. Ipak, pojava bočnih izdanaka (što je takođe svojstvo vrste) na nodusu koji je odsečen sa glavne stabljike, utiče na varijabilnost parametara koji uključuju izdanak – dužinu i masu. Knauer i saradnici (2008) su zabeležili niske vrednosti koeficijenta varijabilnosti u standardnom sintetičkom sedimentu za početnu masu nodusa 9%, za masu nodusa 10. dana testa 16% i za stopu rasta 14%. Isti autori navode vrednosti  $CV\%$  u nekontaminiranom sedimentu iz prirode 12 i 15% za početnu i krajnju masu nodusa i 8% za stopu rasta sveže mase nodusa.

Visoka varijabilnost vrednosti dužine i mase korena u kontrolnim tretmanima može biti pripisana drugom biološkom svojstvu vrste – razvoju adventivnih korenova. Merenje glavnog korena nije moguće, jer se iz nodusa tokom testa razvijaju samo adventivni, bočni korenčići. Merenje dužine korena je time otežano, jer dužina korena predstavlja zbir dužina brojnih bočnih korenčića. Knauer i saradnici (2008) su zabeležili niže vrednosti varijabilnosti dužine korena na osnovu najdužeg korena: u standardnom sintetičkom sedimentu 23%, a u kontroli iz prirode 24%.

Odnosi vrednosti mase i dužine korena i izdanka su imali najvišu varijabilnost: 85.1% i 79.4%. Srednja vrednost za odnos mase korena i izdanka je 0.18 (0.02-0.64), a za odnos dužine korena i izdanka je 2.46 (0.18-6.66).

Očekivalo bi se da je u vodenom sistemu koeficijent varijacije, koji je pokazatelj prirodne varijabilnosti parametara rasta u nekom testu, niži od varijabilnosti u kompleksnom medijumu kao što je sediment – koji sadrži i čvrstu i tečnu fazu, ali je varijabilnost koja je dobijena u *ring* testu zadovoljila čak i kriterijume koji se primenjuju u testovima u vodenom sistemu:  $CV_R < 30\%-40\%$  (EC, 1990, Moore, 2000 – cit. Feiler i sar, 2014).

Uključivanje većeg broja parametara u testovima sa akvatičnim biljkama je preporučljivo, jer se većim brojem parametara može obuhvatiti i više tipova odgovora na supstance sa različitim mehanizmom dejstva, a poželjno je i sa aspekta analize osetljivosti, varijabilnosti i statističke snage testa. Analiza alternativnih parametara rasta u kontroli je prikazana u prethodnom delu ovog poglavlja, a u daljem tekstu prikazaće se variranje istih parametara u test tretmanima.

U tabeli 19 prikazani su intervali vrednosti različitih parametara, koeficijenata varijacije ( $CV\%$ ), inhibicije (INH%) i minimalne statistički značajne razlike izražene kao procenat umanjenja u odnosu na kontrolu  $MSD\%$  u svim kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta. Vrednosti se odnose na pojedinačne tretmane u okviru sedam testova.

Sledeći parametri su obrađeni u okviru svih sedam kontaktnih testova: stopa rasta (izračunata na osnovu prinosa sveže mase nodusa), masa izdanka na kraju testa (mg), masa

korena (mg) (izražena kao zbir masa adventivnih korena), dužina izdanka (mm), dužina korena (mm) (izražena kao zbir dužina adventivnih korena). Vrednosti koncentracije hlorofila *a* po gramu nodusa (mg/g) i sadržaja hlorofila *a* (absorbanca) (mg) u celom nodusu na kraju testa podrazumevaju vrednosti iz tri testa (n = 3).

Stopa rasta, parametar predložen standardom je, iako stabilan u standardnom sintetičkom sedimentu tj. u kontrolnim tretmanima, sa prosečnom vrednošću CV% iz sedam testova 15.8% (Tabela 18), imala višu varijabilnost u test tretmanima (Tabela 19). U prirodnom sedimentu prosečna vrednost CV% unutar tretmana za stopu rasta bila je 23.9% (8.55-82.5%), dok je ta vrednost u tretmanima sa atrazinom bila 66.3% sa posebno visokom varijabilnošću pri najvišim primenjenim koncentracijama atrazina (15.9% u tretmanu 0.12 µg/g i 254.3% u tretmanu 3.69 µg/g).

Tabela 19: Parametri rasta *M. aquaticum* u testovima toksičnosti sedimenta (kontrola i tretmani)

Parametri		br. testova	Kontrolni sediment (min-max)	Varijacije kontrolnog sedimenta (min-max)	Sediment iz prirode (min-max)	Sediment obogaćen atrazinom (min-max)
Stopa rasta (na osnovu sveže mase nodusa) 0-10 d	RGR MSv	7	0.056-0.12	0.038-0.098	0.055-0.127	-0.003-0.09
	CV%		6.9-31.3	7.72-52.1	8.55-82.5	15.9-254.3
	INH %		/	4.8-56.4	-31.5-30.3	10.4-103
	MSD%		/	11.7-36	15.06-41.6	25.6
Masa izdanka (g) 10 d	MI	7	16.8-31.9	10-32.2	5.89-22.7	0-26.8
	CV%		12.2-67	9.27-55.4	10.5-41.1	11.8-176
	INH %		/	-91.6-58.3	17.8-79.5	16.2-100
	MSD%		/	38.2-58.5	18.8-45.4	40.2
Masa korena (g) 10 d	MK	7	1.4-8.1	1.8-14.9	0.6-13.7	0-5.5
	CV%		18.4-53.4	8.4-28.5	5.96-138.4	18.4-173.2
	INH %		/	-84.8-42.2	-324.1-55.9	-32.1-100
	MSD%		/	42.7-46.5	62-184	51.7
Dužina izdanka (mm) 10 d	DI	7	18.8-31.8	14.7-32.2	13.14-30.3	0-19.4
	CV%		8.3-33.3	19.6-28.5	5.96-41.1	11.02-62.2
	INH %		/	-58.2-22.1	-10.8-54.6	22.4-100
	MSD%		/	35.3-43	15.07-45.2	39.04
Dužina korena (mm) 10 d	DK	7	21.1-112.7	20.9-227.3	40.7-160.9	0-39.6
	CV%		10.6-32.7	19.3-66.9	5.96-44.8	23.04-111.4
	INH %		/	-100.8-21.6	-352.4-(-7.5)	-48.3-100
	MSD%		/	48.7-62.1	35.8-188.4	63.2
Koncentracija hlorofila <i>a</i> (mg/g) 10 d	C Chl <i>a</i>	3	0.82-0.94	/	0.82-1.1	0.54-1.02
	CV%		10.3-24	/	7.3-28.1	5.86-55.5
	INH %		/	/	34.03-7.83	-538-42
	MSD%		/	/	17.32-17.8	28.6
Absorbanca (mg) 10 d	Ab.	3	7.27-9.6	/	4.93-7.8	2.02-11.7
	CV%		5.5-32	/	5.98-16.2	3.35-64
	INH %		/	/	19.5-49.5	-25.9-78.2
	MSD%		/	/	19.01-22.3	27.6

NAPOMENA: Pojedinačni kontakti test toksičnosti sedimenta sastojao se od kontrolnog i test tretmana. Kontrolni tretman je postavljan u 3-7, a test tretman u 3 ponavljanja. Izračunata je srednja vrednost, koja je poslužila za poređenje parametra u test tretmanu u odnosu na kontrolni. Sedam testova podrazumevalo je sledeći broj ponavljanja kontrolnih i test tretmana: kontrola 25 ponavljanja, varijacije kontrole 15 ponavljanja, prirodni sediment 33 ponavljanja, atrazin 18 ponavljanja.

U sedimentu iz prirode, relativno nisku varijabilnost imali su i parametri: masa i dužina izdanka i korena. Najmanju varijabilnost unutar tretmana imali su parametri koncentracija hlorofila *a* po gramu nodusa i absorbanca. Parametar koncentracija hlorofila *a* ima veoma malu varijabilnost u kontroli: 11.9 (10.3-24%). Uočeno je da je ovaj parametar veoma stabilan i u testovima prirodnog sedimenta – varijabilnost unutar tretmana se kreće od 7.3-28.1%. U sedimentu obogaćenom atrazinom, vrednosti su više, 5.86-55.5%. Slično je i sa vrednostima CV% za absorbancu ili sadržaj hlorofila *a* u ekstraktima dobijenim od celih nodusa (surogat parametar biomase): u prirodnom sedimentu opseg vrednosti je 5.98-16.2%, dok su u testu sa atrazinom te vrednosti značajno više: 3.35 do 64%. Najveću varijabilnost pokazuju dužina i masa korena čija je varijabilnost posebno visoka u testu sa atrazinom.

Stopa rasta u test tretmanima je relativno stabilan parametar u sedimentu niskog do umerenog stepena kontaminacije (Tabela 13 – hemijska karakterizacija sedimenta, Prilog – Tabele P1 (a-g) pojedinačne vrednosti CV% za parametre i testove).

Statistička snaga, odnosno, osetljivost testova je iskazana za sve pojedinačne biološke odgovore praćene u testu (Tabela 19) na osnovu minimalne statistički značajne razlike, odnosno, najmanje razlike vrednosti posmatranog parametra (biološkog odgovora) između kontrolne grupe i test tretmana koja se može nazvati statistički značajnom MSD% (procenat umanjena vrednosti posmatranog odgovora u test tretmanu u odnosu na kontrolu). Statistička snaga, odnosno, osetljivost testa zavise delom od eksperimentalne postavke, jer se kod eksperimenata sa jednakim brojem ponavljanja svih tretmana (uključujući i kontrolu) mogu direktno izračunati, dok kod eksperimenata sa nejednakim brojem ponavljanja predstavlja aproksimaciju. Sam broj ponavljanja značajno utiče na statističku snagu i osetljivost testa. Međutim najveći uticaj na osetljivost testa ima varijabilnost posmatranog odgovora u tretmanima, posebno kontrolnom. Što je koeficijent varijacije manji, veća je osetljivost testa, i obrnuto (Teodorović, 2004).

Najveća statistička snaga i osetljivost je zabeležena kod sledećih parametara: koncentracija hlorofila *a* po gramu nodusa, ukupni sadržaj hlorofila *a* u ekstraktu celog nodusa na kraju testa (iskazano kao absorbance) sa rasponom vrednosti 17.23-17.8% i 19.01-22.3% za sediment iz prirode i sa vrednostima 28.6 i 27.6% za sediment sa atrazinom. Relativno visoku statističku snagu ima i standardni parametar stopa rasta na osnovu sveže mase nodusa u tretmanima: 15.1-41.6% u prirodnom sedimentu i 25.6% u sedimentu sa rastvorom atrazina.

Velika osetljivost testova korišćenjem gore navedenih parametara direktna je posledica male varijabilnosti (CV%) ovih odgovora unutar pojedinih tretmana (sa izuzetkom testa sedimenta sa atrazinom koji ima relativno visoke CV%, a nisku vrednost MSD%), posebno kontrolnih. Osetljivost, odnosno statistička snaga kontaktnih testova primenom standardom predviđenog biološkog odgovora – stope rasta izračunate na osnovu biomase, varira od 15.1 do 41.6%, odnosno, kao statistički značajno se konstatuje 15.1-41.6-tno smanjenje (ili u ređim slučajevima porast) stope rasta u odnosu na kontrolu.

Ako se kao parametri koriste dužina i masa izdanka, testovi su bili srednje osetljivi, jer se statistički značajno konstatuje razlika ovih parametara u test tretmanima u odnosu na kontrolu u opsegu od oko 20 do oko 60%. Najmanja osetljivost testa je registrovana pri korišćenju mase i dužine korena kao biološkog odgovora, posebno kod kontaktnih testova sa prirodnim sedimentom, gde se čak ni razlika ovih odgovora u test tretmanima u odnosu na kontrolu od preko 50, pa negde čak i preko 100% ne registruje kao statistički značajna. Niska osetljivost testova pri korišćenju navedenih odgovora je posledica visoke varijabilnosti vrednosti ovih odgovora (visoki koeficijenti varijacije) unutar pojedinih tretmana, uključujući i kontrolni.



Parametri koji se odnose na razvoj korena, bilo da je u pitanju masa ili dužina, ni na koji način ne zavise od eksperimentatora, jer se test započinje nodusom, bez korena. Razvoj korena je direktno uslovljen prisustvom toksičnih supstanci, ali i sastavom i strukturom samog sedimenta. Poznato je da manjak hranljivih materija može dovesti do smanjenja mase biljaka (Hussner i sar, 2009), te se, da bi se izbegao nedostatak nutrijenata, biljke tokom kontaktnog testa zalivaju razblaženim hranljivim rastvorom *Steinberg* (ISO 16191, 2013). Hussner i saradnici (2009) su zaključili da relativno mali korenov sistem *M. aquaticum* može da usvoji potrebnu količinu hranljivih materija iz sedimenta, bez obzira na njegovu vlažnost. Može se pretpostaviti, dakle, da je zalivanjem tokom testa obezbeđena optimalna količina nutrijenata u svakom tretmanu, čime se nedostatak hranljivih materija kao faktor može isključiti prilikom procene toksičnosti sedimenta.

Visoka varijabilnost dužine korena u test tretmanima može biti pripisana drugom svojstvu vrste, a to je razvoj adventivnih, bočnih korenčića, što značajno otežava merenje dužine (dužina predstavlja zbir svih prisutnih adventivnih korenčića). Prilikom merenja mase korena manipulacija je lakša, ali je, ipak, varijabilnost ovog parametra u testovima još viša: 87.2% u kontroli i 78.9 % u tretmanima. Međutim, uprkos značajnoj varijabilnosti unutar pojedinih tretmana, razvoj korenovog sistema test jedinki je značajan parametar u kontaktnim testovima, jer može da ukaže na način ekspozicije i put usvajanja toksičnih materija. Na primer, kod kontaktnih testova prirodnog sedimenta reke Tamiš, masa i dužina korena su konzistentno imale više vrednosti u prirodnom sedimentu od vrednosti u kontroli, dok je kod eksperimenta sa atrazinom situacija obrnuta.

Više vrednosti koeficijenta varijacije u prirodnom sedimentu mogu biti uzrokovane faktorima koji se tiču strukture i veličine čestica sedimenta. Prirodni sediment može imati veći procenat fine frakcije od standardnog sintetičkog, te biljke koje se nalaze u prirodnom sedimentu, mogu biti jače pričvršćene za sitnije čestice. Prilikom vađenja biljaka iz sedimenta, deo korenčića može ostati u sedimentu, te preciznost eksperimentatora može igrati ključnu ulogu i direktno uticati na varijabilnost parametara u prirodnom sedimentu (Feiler i sar, 2014).

Najvarijabilniji parametri u kontroli su bili: odnos mase korena i izdanka i dužine korena i izdanka. U prirodnom sedimentu reke Tamiš i Jegričke, ovi parametri imaju više vrednosti od vrednosti u kontrolnom tretmanu, dok su vrednosti u odnosu na kontrolu u sedimentu Krivaje niži (Tabela 20).

Tabela 20: Odnos mase i dužine korena i izdanka u kontaktnim testovima sa *M. aquaticum* na uzorcima sedimenta iz prirode

VREME UZORKOVANJA	Uzorcima sedimenta							
	KONTROLA		Tamiš 1		Tamiš 2		Tamiš 3	
	mk/mi	dk/di	mk/mi	dk/di	mk/mi	dk/di	mk/mi	dk/di
Leto 2009.	0.14	0.17	2.33	6.6	1.01	5.99	1.12	7.11
Jesen 2009.	0.12	2.24	0.74	6.1	0.74	6.16	1.3	7.48
Proleće 2010.	0.17	1.17	0.25	3.59	0.6	5.24	0.54	2.59
VREME UZORKOVANJA	KONTROLA		Jegrička		Krivaja			
	mk/mi	dk/di	mk/mi	dk/di	mk/mi	dk/di		
	Leto 2011.	0.05	1.41	0.07	1.79	0.03	1.38	

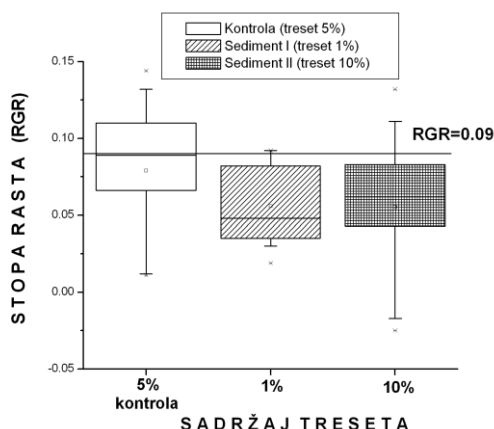
#### 5.1.1.4. Uticaj strukturnih svojstava sedimenta na parametre rasta *M. aquaticum* u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta

U cilju procene mogućeg uticaja prirodnih karakteristika sedimenta na parametre rasta *M. aquaticum* u odsustvu kontaminacije, a sa idejom da ove informacije pomognu kod razlučivanja između mogućih uticaja strukturnih svojstava samog sedimenta i potencijalno prisutnih toksičnih materija u testovima uzoraka iz prirode, korišćen je sintetički sediment različitog sadržaja strukturnih elemenata. U tabeli 21 su prikazane varijacije sintetičkog sedimenta sa različitim procentualnim udelom strukturnih elemenata. Kontrolni standardni sediment sa 5% treseta (*Sphagnum* sp.), 74% kvarca, 20% kaolina i 1% CaCO<sub>3</sub> i varijacije sedimenta: sediment I i II sa 1% i 10% treseta, sediment III, IV i V sa različitim sadržajem kvarca i kaolina (sediment III 47%:47%; sediment IV 30%:64%; sediment V 20%:74%).

Tabela 21: Varijacije sintetičkog sedimenta sa različitim sadržajem organske materije, kvarca i kaolina

TEST VARIRANJA 1	KVARC	KAOLIN	TRESET	CaCO <sub>3</sub>
KONTROLA	74%	20%	5%	1%
sediment I	78%	20%	1%	1%
sediment II	69%	20%	10%	1%
TEST VARIRANJA 2	KVARC	KAOLIN	TRESET	CaCO <sub>3</sub>
KONTROLA	74%	20%	5%	1%
sediment III	47%	47%	5%	1%
sediment IV	30%	64%	5%	1%
sediment V	20%	74%	5%	1%

Slika 30 prikazuje stope rasta sveže mase nodusa *M. aquaticum* u sedimentu različitog sadržaja treseta. Na slici se može primetiti da vrednosti stope rasta nisu međusobno statistički značajno različite i da je najviša stopa rasta zabeležena u sedimentu sa preporučenim sadržajem od 5% treseta.



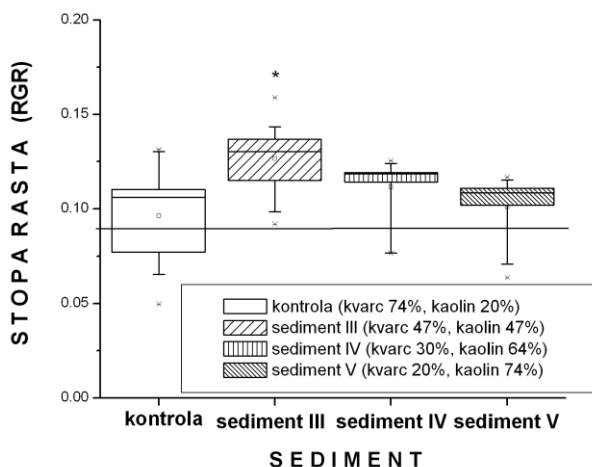
Slika 30. Vrednosti stope rasta *M. aquaticum* u veštačkom sedimentu različitog procentualnog udela treseta (*Sphagnum* sp.). Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

U tabeli 22 se mogu videti vrednosti mase biljnog materijala – nodusa – nultog i desetog dana testa, kao i stope rasta sveže mase nodusa i inhibicije u odnosu na kontrolu u sedimentu različitog sadržaja treseta. Vrednosti inhibicije rasta u sedimentu sa 1 i 10% treseta u odnosu na standardni veštački sediment (kontrolu) su vrlo bliske i iznose oko 30%.

Tabela 22: Vrednosti sveže mase nodusa *M. aquaticum* na početku i kraju testa, stopa rasta i inhibicija rasta u testu sa varirajućim sadržajem organske materije u sintetičkom sedimentu

TEST VARIRANJA I	m nodusa DAT0 (mg)	m nodusa DAT 10 (mg)	RGR stopa rasta	inhibicija rasta %
KONTROLA	24.4	58.67	0.079	
sediment I	24.5	43.93	0.056	29.11
sediment II	24.4	46.18	0.055	30.38

Slika 31 prikazuje stope rasta sveže mase nodusa *M. aquaticum* u sedimentu različitog sadržaja kvarca i kaolina. Može se primetiti da vrednosti stope rasta u svakom alternativnom sedimentu dostižu onu propisanu standardnom metodom (ISO 16191, 2013) i da su čak veće u poređenju sa stopom rasta u kontroli (standardnom sintetičkom sedimentu).



Slika 31. Vrednosti stope rasta *M. aquaticum* u veštačkom sedimentu različitog procentualnog udela kvarca i kaolina. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima, \* statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

U tabeli 23 prikazane su vrednosti mase biljnog materijala – nodusa – nultog i desetog dana testa, kao i stope rasta sveže mase nodusa i vrednosti stimulacije rasta u sedimentu sa različitim sadržajem kvarca i kaolina. Primetno je odsustvo inhibicije, odnosno stimulacija rasta u svim tipovima sedimenta (*hormezis* efekat) u odnosu na kontrolni, ali je stimulacija statistički značajna samo za varijaciju sedimenta III (sediment sa istim sadržajem peska i kaolina).

Tabela 23: Vrednosti sveže mase nodusa *M. aquaticum* na početku i kraju testa, stopa rasta i inhibicija rasta u testu sa varirajućim sadržajem kvarca i kaolina

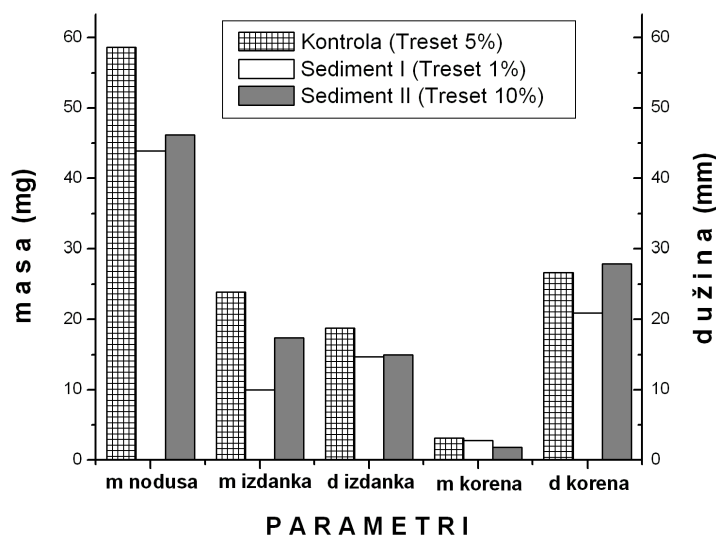
TEST VARIRANJA 2	m nodusa DAT0 (mg)	m nodusa DAT 10 (mg)	RGR stopa rasta	stimulacija rasta %
KONTROLA	25.56	68.67	0.096	
sediment III	26.90	96.08	0.126*	31.49*
sediment IV	25.87	79.39	0.112	16.00
sediment V	24.78	67.97	0.101	4.98

\* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

U sintetičkom sedimentu sa smanjenim (1%) i povišenim (10%) sadržajem organske materije u odnosu na kontrolni, standardni sediment (5%) konstatovana je inhibicija stope rasta glavnog parametra od oko 30%. Ovo ukazuje na značajan uticaj strukture sedimenta, u odsustvu kontaminanata na rast biljaka. Inhibicija na osnovu stope rasta je još veća ako se porede stope 0.056 i 0.055 (iz sedimenta sa 1 i 10% organske materije) sa dugoročnom laboratorijskom kontrolom (RGR = 0.099) i iznosi 43.7% i 44.4%. Međutim, statistička snaga ovog testa nije bila visoka MSD = 41.59%.

Sve varijacije sedimenta različitog sadržaja peska i kaolina, a konstantnog sadržaja organske materije dovele su do stimulacije rasta i nadzemnih i podzemnih delova biljaka u odnosu na kontrolu, a jedini izuzetak je bio sediment V (sa 20% peska i 74% kaolina) gde su zabeležene niže vrednosti mase i dužine korena u odnosu na kontrolu.

Na slikama 32 i 33 i u pratećim tabelama 24 i 25 prikazane su srednje vrednosti svih parametara, osim stope rasta na osnovu sveže mase nodusa u sedimentu sa različitim sadržajem osnovnih konstituenata u odnosu na kontrolu: masa nodusa, masa izdanka, dužina izdanka, masa korena i dužina korena. Prikazane su vrednosti izmerene poslednjeg dana testa DAT 10.



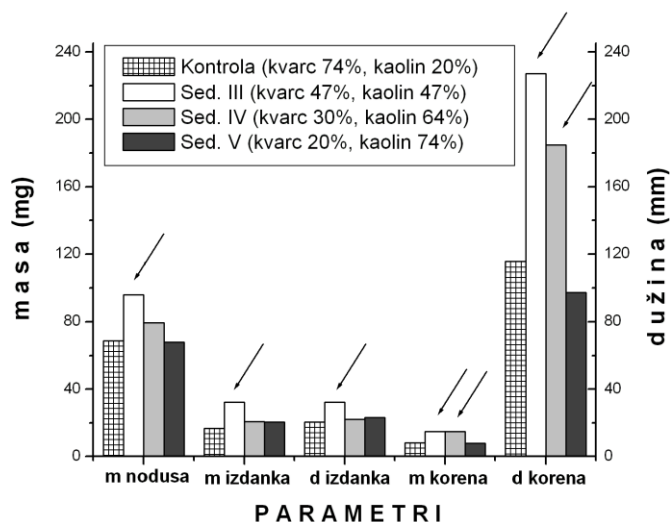
Slika 32. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa *Myriophyllum aquaticum* na sedimentu različitog sadržaja treseta. Zbog preglednosti prikazane su samo srednje vrednosti.

U testu sa variranjem sadržaja organske materije (Slika 32), vidljivo je smanjenje vrednosti svih parametara u odnosu na kontrolu, te su najviše vrednosti u standardnom sintetičkom sedimentu sa 5% treseta, sa izuzetkom vrednosti dužine korenčića koja je nešto viša u sedimentu sa većim sadržajem (10%) treseta. Ove promene nisu statistički značajne.

Tabela 24: Vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korenčića i inhibicija rasta *M. aquaticum* u testu sa varirajućim sadržajem organske materije

TEST VARIRANJA 1	m izdanka (mg)	inhibicija rasta %	d izdanka (mm)	inhibicija rasta %	m korena (mg)	inhibicija rasta %	d korena (mm)	inhibicija rasta %
KONTROLA	23.9		19.7		3.12		26.7	
sediment I	10	58.28	14.7	25.4	2.78	11	20.9	21.6
sediment II	13.1	45.1	15	23.6	1.8	42.3	27.9	-4.7

U kontaktnom testu sedimenta sa različitim sadržajem kvarca i kaolina (Slika 32; Tabela 25) zabeležene su više vrednosti svih parametara u alternativnom sedimentu III i IV u odnosu na kontrolni (sa standardom propisanim procentualnim udelom kvarca (75%) i kaolina (20%)). Vrednosti prosečne mase i dužine korenčića u sedimentu V (u varijaciji obrnutih proporcija u odnosu na standardom propisanu) su nešto niže u odnosu na kontrolne. Statistički značajne razlike su na histogramu (Slika 32) obeležene strelicom, dok su u tabeli označene asteriskom (\*). Masa i dužina korena nisu statistički značajno različite u varijaciji sedimenta sa 1 i sa 10% organske materije, kao i u sedimentu sa najvišom količinom kaolina (74%) i najnižom količinom peska (20%) u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je rast korena značajno je stimulisan u varijaciji sa 47% i 64% kaolina u odnosu na kontrolu.



Slika 33. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnim testovima sa *M. aquaticum* na sedimentu različitog sadržaja kvarca i kaolina. Zbog preglednosti prikazane su samo srednje vrednosti. Strelicom su označene vrednosti koje su statistički značajno različite od odgovarajuće kontrole (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Tabela 25: Vrednosti mase i dužine izdanka, mase i dužine korenčića i inhibicija rasta *M. aquaticum* u testu sa varirajućim sadržajem kvarca i kaolina

TEST VARIRANJA 2	m izdanka (mg)	stimulacija rasta %	d izdanka (mm)	stimulacija rasta %	m korena (mg)	stimulacija rasta %	d korena (mm)	stimulacija rasta %
KONTROLA	16.82		20.33		8.08		115.78	
sediment III	32.23	91.6*	32.17	58.20*	14.94	84.85*	227.33	96.35*
sediment IV	20.59	22.41	22.17	9.02	14.75	82.47*	184.83	59.65*
sediment V	20.36	21.02	23.08	13.53	7.88	-2.58	97.50	-15.79

\* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Odnos podzemnih i nadzemnih delova biljaka u testu prikazan je u tabeli 26. Odnos mase korena i izdanka je viši od kontrolnog u sedimentu sa najmanjim sadržajem organske materije, kao i u sedimentu S3 i S4. Odnos dužine korena i izdanka je u svim alternativnim tipovima sedimenta viši od kontrole, osim u S4 (kvarc 30%, kaolin 64%).

Tabela 26: Odnos mase i dužine korena i izdanka *M. aquaticum* u sintetičkom sedimentu različite strukture

sediment	mk/mi	CV%	dk/di	CV%
K (Sph 5%)	0.15	41.7	1.34	44.3
S1 (Sph 1%)	0.33	60.2	1.47	57.64
S2 (Sph 10%)	0.15	42.3	1.73	36.8
sediment	mk/mi	CV%	dk/di	CV%
K	0.43	33.3	5.65	17.1
S3	0.48	18	6.98	36.5
S4	0.71	32.1	8.79	11.3
S5	0.34	20.9	4.26	67.5

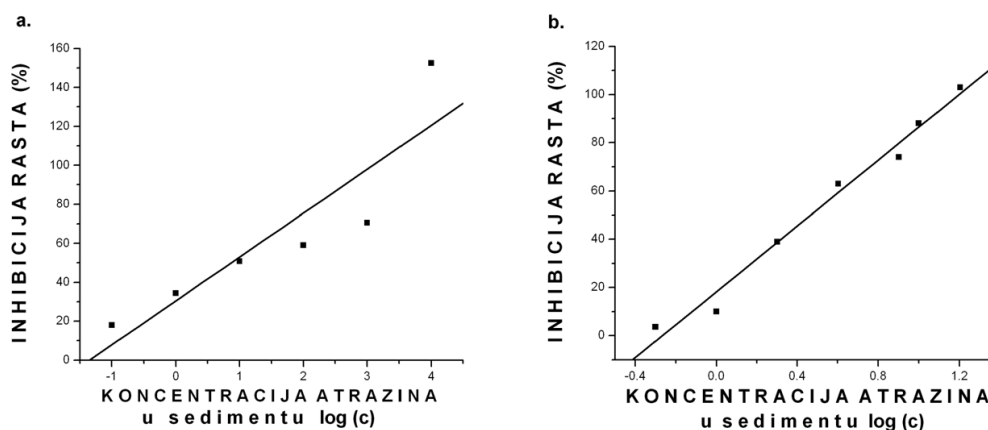
Očigledno je da varijacije u strukturi sedimenta mogu uticati na rast biljaka što može dovesti do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata testova toksičnosti. Uticaj prirodnih karakteristika sedimenta nije zanemarljiv, te je uputna detaljna analiza strukture sedimenta koji se testira pre postavke testa toksičnosti sa standardnom sintetičkom kontrolom. Iz ovih razloga preporučljivo je i korišćenje dodatnih kontrola: dugoročne laboratorijske i nekontaminiranog kontrolnog sedimenta sa referalnog lokaliteta iz prirode.

### 5.1.2. Potencijal primene kontaktnog testa toksičnosti sedimenta na vrsti *M. aquaticum* za potrebe preventivne ekološke procene rizika od hemikalija vezanih za sediment

Standardna test metoda ISO 16191 (ISO, 2013), pored procene toksičnosti realnih uzoraka iz prirode, omogućuje i testiranje pojedinačnih supstanci (potencijalno i smeša) dodatih u standardni sintetički sediment u seriji koncentracija. Okvir kontaktnog testa toksičnosti sedimenta proširen je na primenu testa u preventivnoj ekološkoj proceni rizika od hemikalija, posebno onih koje imaju afinitet vezivanja za sediment.

Potencijal upotrebe metode u preventivnoj proceni rizika od hemikalija ispitan je kontaktnim testom toksičnosti sedimenta obogaćenim atrazinom.

Preliminarni test toksičnosti je postavljen dodatkom vodenog rastvora atrazina u veštački sediment u širokoj logaritamskoj seriji koncentracija 0,1; 1; 10; 100; 1.000; 10.000  $\mu\text{g/l}$ , odnosno, preračunato na sediment: 0.000023, 0.00023, 0.0023, 0.0231, 0.231, 2.31  $\mu\text{g/g}$  (mikrograma atrazina po gramu suve mase sedimenta). Statistički značajna inhibicija rasta test vrste je konstatovana u 3 najviše koncentracije. Na osnovu rezultata preliminarnog testa, određena je serija koncentracija rastvora atrazina za definitivni test: 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 16  $\text{mg/l}$  vodenog rastvora atrazina, odnosno 0.12, 0.231, 0.46, 0.92, 1.85, 2.31, 3.69  $\mu\text{g/g}$  sedimenta. Krive dozne zavisnosti prikazane su na slici 34 (a i b).



Slika 34. Krive dozne zavisnosti inhibicije rasta (%) *Myriophyllum aquaticum* od koncentracije atrazina ( $\mu\text{g/g}$  sedimenta) nakon 10-dnevne ekspozicije u (a) preliminarnom i (b) definitivnom testu. Vrednosti koncentracija su log transformisane.

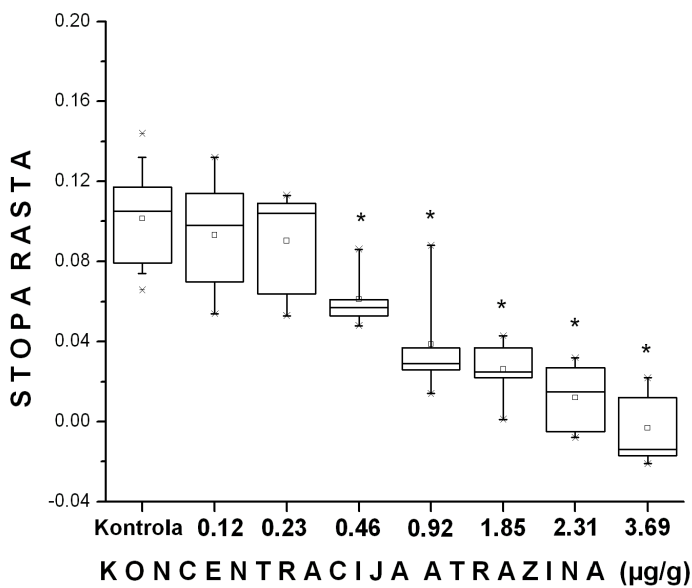
Parametri u definitivnom testu toksičnosti sedimenta sa atrazinom su bili: sveža masa nodusa, dužina i masa novog izdanka, dužina i masa korenčića, koncentracija hlorofila *a* u nodusu i sadržaj hlorofila *a* u nodusu (absorbanca). Jedino je za osnovni parametar predviđen protokolom – sveža masa nodusa – srednja inhibitorna koncentracija izračunata na osnovu stope rasta, dok je za ostale parametre  $\text{IC}_{50}$  izračunata na osnovu izmerenih vrednosti na kraju testa (10 d) (Tabela 27).

Vrednosti  $\text{IC}_{50}$  se kreću u opsegu 0.45-3.6  $\mu\text{g/g}$  i relativno su bliske, osim za sadržaj i koncentraciju hlorofila *a*.  $\text{IC}_{50}$  na osnovu stopu rasta sveže mase nodusa iznosi 0.66  $\mu\text{g/g}$  (Tabela 27). Statistička snaga testa je najviša za parametar RGR sveže mase nodusa, absorbanca i koncentracija hlorofila *a* (< 30%), a najniža za svežu masu i dužinu korena (> 50%).

Tabela 27: Vrednosti odabranih parametara rasta, standardna devijacija, koeficijenti varijacije, srednje inhibitorne koncentracije i minimalne statističke razlike u kontaktnom testu sedimenta sa atrazinom na vrsti *M. aquaticum*

parametar	vrednost	sd	CV%	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	MSD%
RGR (sv. masa nodusa)	0.101	0.016	15.9	0.66	25.6
masa izdanka (mg)	31.93	21.4	67	0.45	40.2
dužina izdanka (mm)	25.04	2.65	10.6	0.84	39.04
masa korena (mg)	4.1	0.76	18.4	0.55	51.7
dužina korena (mm)	26.7	2.65	10.6	0.76	63.2
sadržaj Chl <i>a</i> (mg)	9.26	2.96	32	1.2	27.6
koncentracija Chl <i>a</i> (mg/g)	0.94	0.098	10.3	3.6	28.6

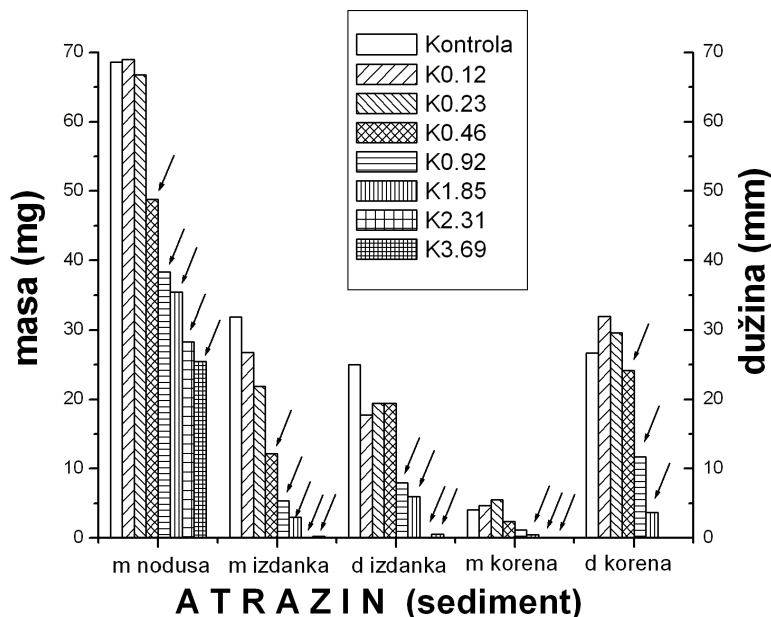
Na slici 35 su prikazane vrednosti stope rasta sveže mase nodusa u svim tretmanima uključujući i kontrolni nakon izloženosti test jedinki atrazinu u periodu od 10 dana. NOEC vrednost, dobijena Dunnett testom (jednosmerna ANOVA, t-test kao post test,  $p \leq 0.05$ ), iznosi  $0.231 \mu\text{g/g}$  dok se statistički značajan pad stope rasta konstatuje kod koncentracije  $0.46 \mu\text{g/g}$  što predstavlja LOEC vrednost.



Slika 35. Definitivni kontaktni test toksičnosti atrazina na *M. aquaticum*. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti stope rasta sveže mase nodusa u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u vrednosti stope rasta u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, t-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

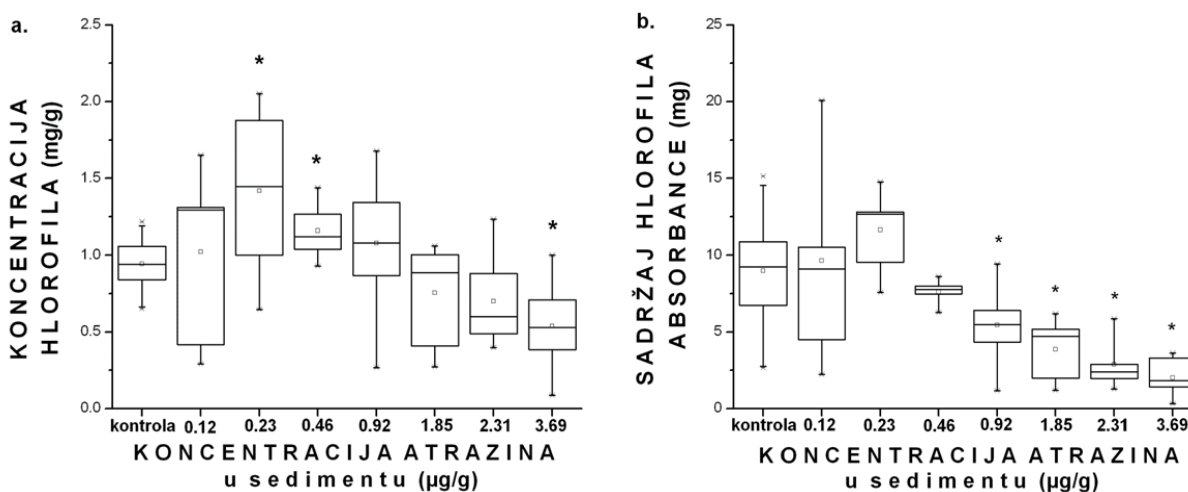
Srednje inhibitorne koncentracije za parametre rasta: masa i dužina izdanka, masa i dužina korena su  $0.45$ ,  $0.84$ ,  $0.55$ ,  $0.76 \mu\text{g/g}$  (Tabela 27), a vrednosti parametara su prikazane na slici 36. Gotovo u svim tretmanima primećuje se smanjenje vrednosti posmatranih parametara, osim u dve najniže primenjene koncentracije za dužinu i masu korena, gde je zabeležena blaga stimulacija rasta koja nije statistički značajna. U dve najviše koncentracije je zabeleženo odsustvo korenovog sistema. Pojedinačne vrednosti svakog parametara, inhibicije i koeficijenti varijacije u svakom tretmanu (sa različitim koncentracijama atrazina u sedimentu) prikazane su u prilogu (Tabela P2).





Slika 36. Masa nodusa, masa izdanka, masa korena (mg), dužina izdanka i dužina korena (mm) u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta sa atrazinom na vrsti *M. aquaticum*. Zbog preglednosti prikazane su samo srednje vrednosti. Strelicom je označena vrednost koja je statistički značajno različita od odgovarajuće kontrole (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Na kraju testa izmerena je i koncentracija hlorofila *a* u nodusima *M. aquaticum* i izražena u mg/g mase nodusa i kao ukupna absorbanca u ekstraktu celog nodusa (mg). Na slici 37 (a i b) su prikazane vrednosti koncentracije hlorofila *a* (mg/g nodusa) i absorbance (mg) u svim tretmanima uključujući i kontrolni, nakon izloženosti test jedinki atrazinu u periodu od 10 dana. Primećuje se *hormezis* efekat – povećanje vrednosti koncentracije hlorofila *a* u odnosu na kontrolu u tretmanima sa nižim koncentracijama atrazina u sedimentu (0.12-0.92  $\mu\text{g/g}$ ), ali vrednosti nisu statistički značajne (Slika 37 a). Pad koncentracije hlorofila *a* u tri najviše primenjene koncentracije (1.85-3.69  $\mu\text{g/g}$ ) nije bio statistički značajan. Međutim, ako se posmatra ukupna koncentracija hlorofila *a* u ekstraktu dobijenom od celog nodusa na kraju testa (Slika 37 b), uočava se klasična dozna zavisnost u delu serije koncentracija od 0.46 do 3.69  $\mu\text{g/g}$ , baš kao i kad se posmatra parametar stopa rasta (Slika 34). Statistički značajan pad vrednosti je primećen pri četiri najviše primenjene koncentracije (0.92-3.69  $\mu\text{g/g}$ ). Pri koncentraciji od 0.23  $\mu\text{g/g}$  (na kojoj je primećen *hormezis* efekat na sadržaj hlorofila *a* po gramu izdanka) dolazi do blagog porasta ukupnog sadržaja hlorofila *a* u nodusu u odnosu na kontrolu, ali porast nije statistički značajan.



Slika 37 (a, b). Koncentracija hlorofila *a* (mg/g nodusa) i absorbanca posle desetodnevnog definitivnog testa sa *Myriophyllum aquaticum* u sedimentu sa atrazinom. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne, minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Vrednost srednje inhibitorne koncentracije  $IC_{50}$  izračunata na osnovu ovih parametara iznosi: 3.6  $\mu\text{g/g}$  (MSD 28.6%) za koncentraciju hlorofila *a* i 1.2  $\mu\text{g/g}$  (MSD% 27.6%) za absorbancu, što ovaj parametar čini osetljivijim od prethodnog.

Izračunat je i odnos korena i izdanka na osnovu mase i dužine (Tabela 28). Zabeležen je porast vrednosti odnosa mase korena i izdanka u svim tretmanima osim u dve najviše primenjene koncentracije, ali taj porast nije bio statistički značajan. Odnos dužine korena i izdanka ne pokazuje jasnu doznu zavisnost, što se može tumačiti rezultatima Turgut (2005) koji nije zabeležio značajne razlike u usvajanju atrazina korenom i izdancima u vodenom rastvoru.

Tabela 28: Odnos mase i dužine korena i izdanka u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta obogaćenog atrazinom na *M. aquaticum*

tretman ( $\mu\text{g/g}$ )	mk/mi	CV%	dk/di	CV%
K	0.15	41.7	1.34	44.3
0.12	0.19	18	2.47	97
0.23	0.24	36.62	2.22	40.9
0.46	0.20	19.3	1.24	17.2
0.92	0.21	55	1.96	90.4
1.85	0.17	24.2	0.58	61
2.31	0.00	100	0.00	100
3.69	0.00	173.2	0.00	100

U tabeli 29 su prikazane srednje inhibitorne koncentracije atrazina u tri različita test sistema sa *M. aquaticum*: test u vodenom rastvoru atrazina bez sedimenta (Teodorović i sar,

2012), test u sedimentu sa različitim koncentracijama atrazina (Teodorović i sar, 2012) i test u voda-sediment sistemu, sa atrazinom rastvorenim u vodi (Tunić i sar, 2015). Test sa atrazinom u voda-sediment sistemu urađen je na osnovu protokola (OECD draft/2011) za ukorenjene makrofite za procenu rizika od sredstava za zaštitu bilja (svi detalji prikazani su niže u tekstu, u podpoglavlju 5.2).

Prikazane su  $IC_{50}$  vrednosti izračunate za svežu masu biljnog materijala u svim testovima, masu i dužinu korena u testu sa sedimentom u koji su dodati rastvori različitih koncentracija atrazina i masu korena u voda-sediment testu. Poređenjem  $IC_{50}$  vrednosti za zajednički parametar u sva tri test sistema, najvišu osetljivost pokazuje test u jednokomponentnom sistemu voda bez sedimenta (sa vodenim rastvorom atrazina) sa vrednošću  $IC_{50} = 0.091$  mg/l. Druga dva testa pokazuju međusobno sličnu osetljivost sa vrednostima  $IC_{50}$  za stopu rasta sveže mase biljke 0.66 i 0.44 mg/l i masu korena 0.55 i 0.29 mg/l. Činjenica da je test toksičnosti sedimenta direktno obogaćenog atrazinom najmanje osetljiv u odnosu na ostale testove ne iznenađuje, budući da je atrazin tipičan polutant vodenog stuba.

Sa druge strane, relativno je slična osetljivost dva različita test sistema (sediment i voda-sediment sistem), dok je statistička snaga kontaktnog testa relativno visoka  $MSD = 25.6\%$ . U kontaktnom testu toksičnosti sedimenta ne postoji vodeni stub iznad sedimenta, a biljka je u direktnom kontaktu sa sedimentom. Smatra se da ovo može biti prednost metode u proceni rizika od hemikalija, jer se efekat na rast biljaka može pripisati isključivo toksičnim supstancama u sedimentu, dok se uticaj vodenog stuba može potpuno zanemariti (Teodorović i sar, 2012). Osobine metode i rezultati kontaktnog testa toksičnosti sedimenta obogaćenog atrazinom mogu ukazati na potencijal primene ove metode u preventivnoj proceni rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet ka vezivanju za sediment.

Tabela 29: Testovi sa atrazinom: Osetljivost *M. aquaticum* u različitim test sistemima

Testovi sa atrazinom				
Test organizam		<i>M. aquaticum</i>		
Test sistem		voda*	sediment*	voda-sediment**
Dužina testa		10 d	10 d	7 d
Početni biljni materijal		nodus	nodus	vršni deo izdanka
		25±6 mg	25±6 mg	6±1 cm
$IC_{50}$ (ppm)	RGR MSv	0.091	0.66	0.44
	MK	/	0.55	0.29
	DK	/	0.76	/

\* rezultati prikazani u radu Teodorović i saradnici (2012)

\*\* rezultati prikazani u radu Tunić i saradnici (2015)

MSv – sveža masa, MK – sveža masa korena, DK – dužina korena

### 5.1.3. Kontaktni testovi toksičnosti sedimenta na *M. aquaticum* – zaključna razmatranja

Dobijeni eksperimentalni podaci u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta ukazuju na to da se vrsta *M. aquaticum* može smatrati adekvatnim test modelom u ovom tipu testa. Period adaptacije biljaka na uslove eksperimenta, pre upotrebe u testu, nije potreban, jer su uslovi

gajenja i testa vrlo slični. Period ekspozicije je ujedno i period trajanja celokupnog testa. Vrstu karakteriše brz rast u sedimentu, te je stopa rasta kontrolnih biljaka u desetodnevnom testu zadovoljavajuća sa postignutim kriterijumom validnosti testa za stopu rasta  $\geq 0.09$ . Kontaktni test toksičnosti sedimenta na vrsti *M. aquaticum* je izuzetno jednostavan za izvođenje. Pored toga, on je pouzdan, sa niskom varijabilnošću glavnog parametra i pojedinih drugih parametara (CV za RGR sveže masa nodusa je bila 15.8% (6.9-31.3%), MSD je bila 24.6 (11.7-41.6%)).

Ekološka relevantnost ovog testa je visoka, budući da su ukorenjene makrofite donjom površinom tela i korenovim sistemom vezane za sediment.

Rezultati internacionalnog testa kalibracije su bili zadovoljavajući. Prihvatljiv rast test organizma, pouzdanost i niska varijabilnost glavnog parametra, kao i visoka statistička snaga metode, doveli su do odluke da se metoda ISO 16191 (ISO, 2013) standardizuje i upotrebljava u proceni rizika toksičnosti sedimenta.

Međutim, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da se prilikom primene metode u karakterizaciji sedimenta iz prirode, uticaj strukturnih karakteristika sedimenta mora uzeti u obzir. Granične vrednosti koje se određuju za *M. aquaticum*, ali i druge test organizme u testovima toksičnosti sedimenta, između ostalog, postoje, da bi se razlučio uticaj toksičnog efekta i prirodne varijabilnosti (Höss i sar, 2010; Feiler i sar, 2014). Ostaje otvoreno pitanje da li je u kontaktnim *Myriophllum* testovima granica od 20% za inhibiciju rasta biljaka u odnosu na kontrolu odgovarajuća kao granica toksičnosti sedimenta i da li prekoračenje te vrednosti treba da bude dovoljan uslov da se sediment klasifikuje kao toksičan. Ova vrednost se može smatrati previsokom kada se ne uzmu u obzir moguće varijacije u strukturi testiranog i kontrolnog sedimenta.

Prirodni sediment se, po strukturi, može značajno razlikovati od standardnog sintetičkog sedimenta koji se upotrebljava kao kontrola i te razlike mogu značajno uticati na rast biljaka u testu. Zbog mogućih razlika između uzoraka prirodnog sedimenta čija se toksičnost procenjuje i kontrolnog – standardnog sintetičkog sedimenta, preporučljivo je prilikom izvođenja testova na prirodnom sedimentu, postavljati i duplu kontrolu, tj. nekontaminirani sediment slične strukture testiranom sedimentu iz prirode, a preporučljivo je i poređenje sa dugoročnom laboratorijskom kontrolom. Negativnom kontrolom odgovarajuće strukture (sintetičkom ili iz prirode) može se obezbediti realnije/prikladnije poređenje i izbeći lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati o toksičnosti sedimenta (ASTM 1990, US EPA 1998 – cit. Höss i sar, 2010).

Neslaganje rezultata hemijskih, ekotoksikoloških i bioloških analiza u pojedinim studijama, ukazuju na složenost procesa karakterizacije sedimenta. Radi što preciznije analize sedimenta, preporučuje se TRIAD pristup koji integriše hemijsku analizu, biomonitoring (analizu faune dna) i (eko)toksikološke testove (Teodorović i Kaišarević, 2014). Izmerene koncentracije određenih polutanata se porede sa propisanim graničnim vrednostima standarda kvaliteta sedimenta (SQG) na osnovu čega se ukazuje na izloženost ekosistema hemijskom stresu. Testovima toksičnosti na test organizmima dobija se slika o toksičnosti ukupnog sedimenta jer biološki sistemi oslikavaju biodostupnost identifikovanog, ali i uticaj neidentifikovanog zagađenja. Serijom laboratorijskih testova, rezultatima biomonitoringa i rezultatima hemijskih analiza sedimenta i zaokružuje se TRIAD pristup karakterizaciji sedimenta.

Veći broj studija ukazuje na neslaganje rezultata hemijskih i bioloških analiza sedimenta (Feiler i sar, 2004; 2013; Brils i sar, 2008; Tubić i sar, 2013, naše istraživanje), što ukazuje na moguće greške koje se mogu načiniti u proceni toksičnosti sedimenta i rizika od zagađenog sedimenta za akvatične ekosisteme. Da bi se izbeglo potcenjivanje rizika, preporučljivo je procenu na osnovu standarda kvaliteta sedimenta dopuniti serijom testova na većem broju

reprezentativnih vrsta različitih trofičkih nivoa, a vrsta *M. aquaticum* u testu toksičnosti sedimenta može biti adekvatan predstavnik primarnih producenata.

Prirodne fizičko-hemijske karakteristike sedimenta koje mogu uticati na rast biljaka i biodostupnost nutrijenata i ksenobiotika su: granulometrijski sastav (sadržaj peska, gline, praha), sadržaj organske materije, vlažnost, prirodni nivo zagađenja itd. Rezultati naših testova pokazuju značajan uticaj sadržaja organske materije, peska i kaolina na rast test organizama i navode na zaključak da se u testovima toksičnosti sedimenta upotrebljavaju i dodatne kontrole sličnije strukture testiranom sedimentu od strukture standardnog sintetičkog sedimenta. Povećanje vrednosti mase i dužina korena su zabeležene u kontroli sa promenjenim sadržajem peska i kaolina (Slika 32), kao i u svim uzorcima sedimenta reke Tamiš (Slika 25 (a-c)). U sedimentu sa dodatim rastvorom atrazina, povišene vrednosti u odnosu na kontrolu su zabeležene samo u najnižim tretmanima (0.12 i 0.23  $\mu\text{g/g}$ ), dok su u višim tretmanima vrednosti postepeno opadale, a u poslednja dva tretmana nije bilo korenčića.

Upotrebom različitih parametara može se obuhvatiti širi dijapazon odgovora biljaka na toksične supstance različitog mehanizma dejstva, obezbediti izbor najadekvatnijeg i najosetljivijeg parametra sa aspekta varijabilnosti i statističke snage. Koncentracija hlorofila *a* u kontaktnim testovima, na primer, ima vrlo nisku varijabilnost i visoku stabilnost, ali i relativnu osetljivost, te se može predložiti kao surogat parametar za procenu biomase.

Rezultati testa toksičnosti sedimenta obogaćenog pojedinačnom supstancom u seriji koncentracija na primeru atrazina, ukazuju na potencijal ovog modela i u preventivnoj proceni rizika od hemikalija, posebno onih koji imaju visok afinitet vezivanja za sediment. Test je pokazao nisku varijabilnost pojedinih parametara, relativno visoku statističku snagu, kao i približnu osetljivost u voda-sediment sistemu, poređenjem  $IC_{50}$  vrednosti. Nepostojanje vodenog stuba iznad sedimenta može biti dodatna pogodnost, jer se time u proceni rizika od hemikalija vezanih za sediment na modelu akvatične makrofite, uticaj vodenog stuba i supstanci rastvorenih u njemu može u potpunosti isključiti.

## 5.2. Razvoj testova toksičnosti na alternativnim vrstama akvatičnih makrofita za potrebe ekološke procene rizika od herbicida i regulatora rasta

U ovom poglavlju predstavljene su rezultati testova na vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum* sa pojedinačnim supstancama rastvorenim u vodi u sistemu voda-sediment koji su izvedeni prema radnoj verziji protokola OECD draft/2011.

Za više nivoje ekološke procene rizika od herbicida i regulatora rasta razvijena je test metoda za ukorenjene makrofite čija provera je ostvarena internacionalnim testom međulaboratorijske kalibracije metode tokom 2011. godine (od eng. *international ring test* – u daljem tekstu IRT ili ring test). Cilj internacionalnog testa je bio provera praktičnosti, primenljivosti i osetljivosti metode (OECD, draft/2011) i predloženih test vrsta *M. aquaticum* i *M. spicatum*. Internacionalni test kalibracije metode je realizovan kroz učešće 15 laboratorija iz različitih zemalja, uključujući i Laboratoriju za ekotoksikologiju (LECOTOX, PMF UNS) iz Srbije.

Za potrebe međunarodnog testa interkalibracije metode u okviru Laboratorije za ekotoksikologiju su izvedena tri testa na vrsti *M. aquaticum*: sa referalnom supstancom 3,5-dihlorfenol i predloženim test supstancama, herbicidima izoproturon i trifluralin. Prema predloženom protokolu, testovi sa *M. aquaticum* su trajali 10 dana (3 dana adaptacije i 7 dana izlaganja supstanci). Rezultatima iz navedenih testova je zadovoljen preliminarni kriterijum validnosti i testovi su u uključeni u finalni izveštaj IRT (Ratte i Ratte, 2014). Od ukupnog broja *M. aquaticum* testova u okviru IRT, samo je 50% smatrano validnim.

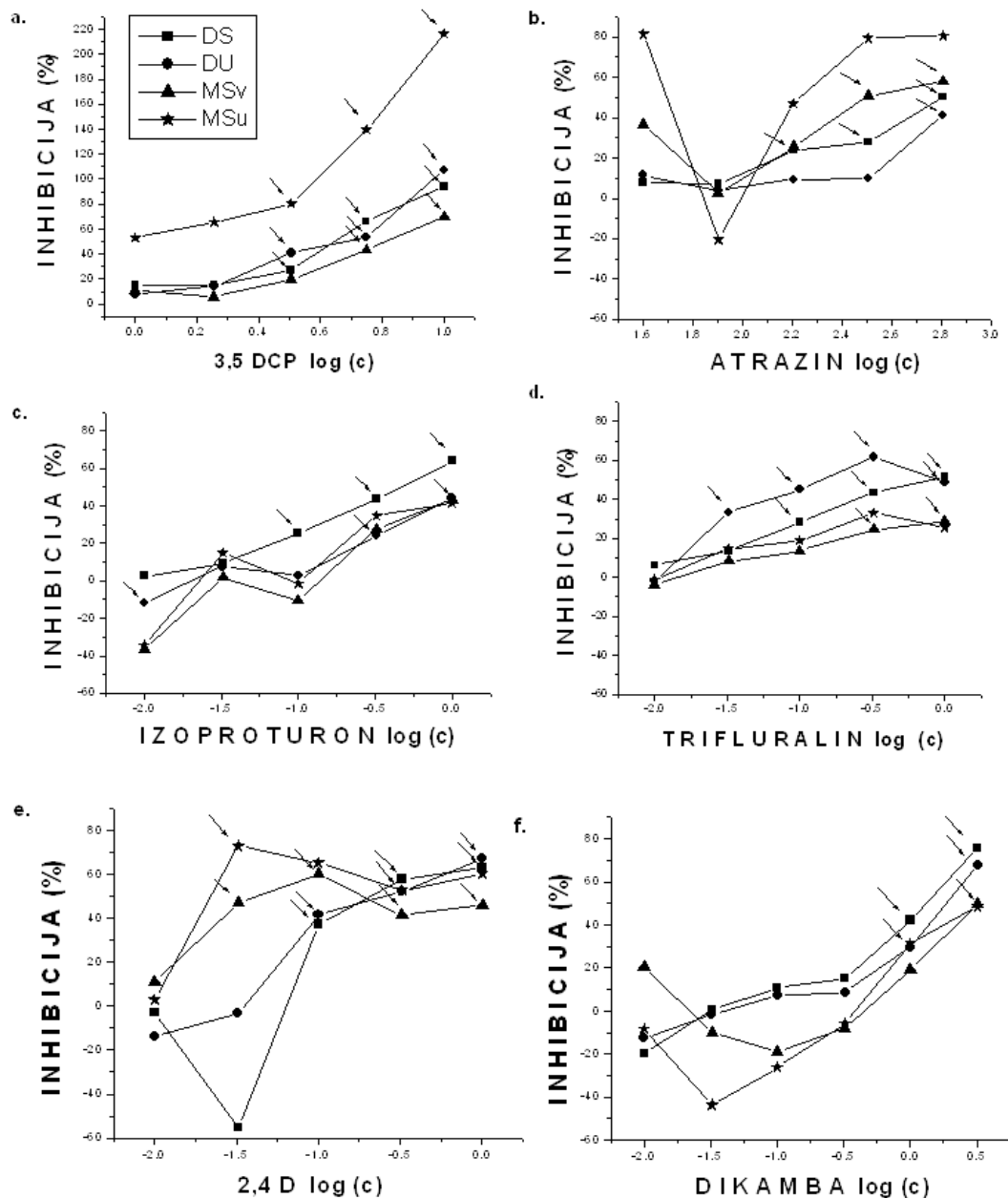
Pored navedenih testova na *M. aquaticum*, izveden je i test na *M. spicatum* sa izoproturonom koji je, prema radnoj verziji protokola OECD draft/2011 za ovu vrstu, trajao 21 dan (7 dana adaptacije i 14 dana izlaganja), ali on nije uključen u IRT, jer je izveden u trenutku kada je evaluacija rezultata IRT već bila u toku.

Obim testova je, isključivo za potrebe ove disertacije, a u cilju optimizacije test protokola i definisanja kriterijuma testa unutar Laboratorije za ekotoksikologiju, proširen, uključivanjem još tri testa na *M. aquaticum* sa atrazinom i dva auksin simulatora (2,4 D i dikamba). Pored navedenih, izvedena su i 3 modifikovana testa na vrsti *M. spicatum*, sa identičnim periodom adaptacije i ekspozicije propisanim za *M. aquaticum* test (3 dana adaptacije i 7 dana ekspozicije) sa supstancama atrazin, izoproturon i 2,4 D.

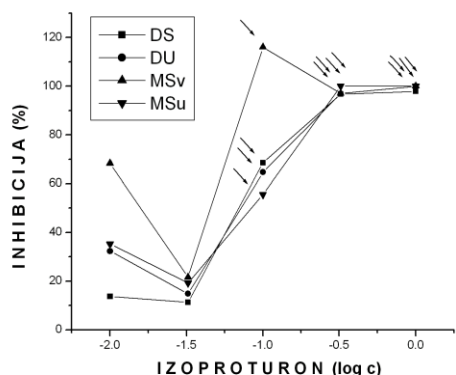
U cilju poređenja, izvedeni su i testovi na vrsti *L. minor* (prema standardnoj test metodi OECD 211, (2006) sa supstancama 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba.

Na slikama 38 (a-f), 39 i 40 (a-c) su prikazane krive dozne zavisnosti u svim *Myriophyllum* testovima. Slika 38 (a-f) prikazuje inhibicije relativne stope rasta *M. aquaticum* izračunate na osnovu dužine iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon sedmodnevnog izlaganja a) 3,5 DCP, b) atrazinu, c) izoproturonu, d) trifluralinu, e) 2,4 D i f) dikambi. Krive dozne zavisnosti inhibicije relativne stope rasta *M. spicatum* prikazane su na slici 39 za četrnaestodnevni period izloženosti izoproturonu i na slici 40 (a-c) za sedmodnevni period izloženosti a) atrazinu, b) izoproturonu i c) 2,4 D. Stopa rasta za parametar dužina iznad sedimenta je izračunata na osnovu formule iz radne verzije protokola (OECD, draft/2011). Stope rasta za poslednja tri parametra izračunata su poređenjem vrednosti sedmog dana testa sa vrednostima izmerenih na biljkama iz dodatnih posuda (eng. „*additional pots*“) kao inicijalnim, izdvojenim nultog dana testa.

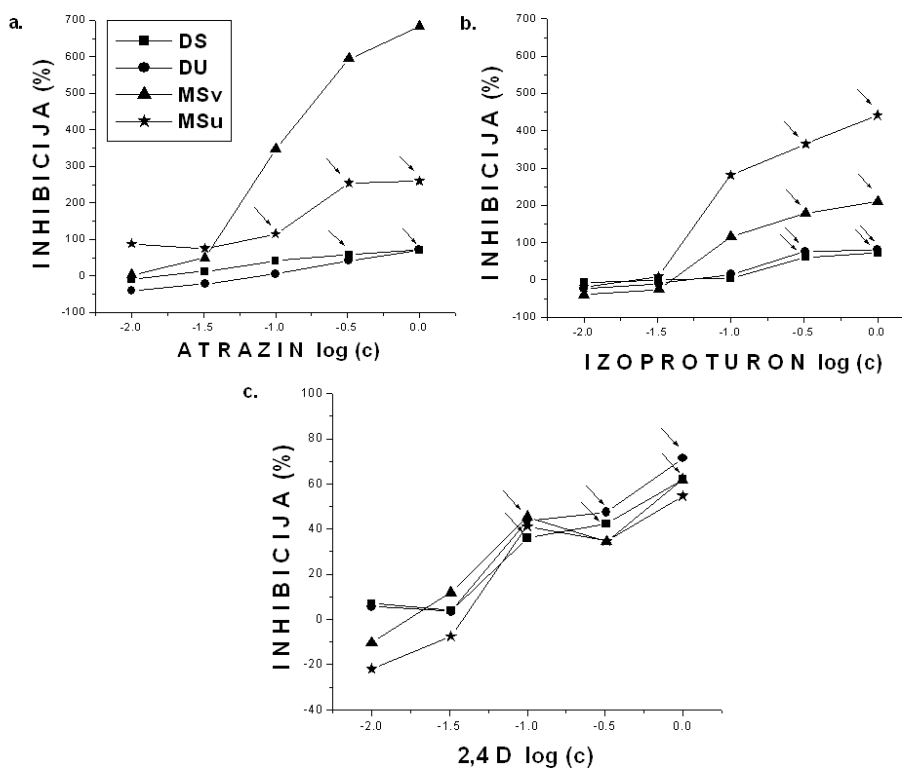
Parametri pokazuju pravilnu doznu zavisnost, a u pojedinim slučajevima je zabeležen i *hormezis* efekat (stimulacija rasta u tretmanima nižih primenjenih koncentracija) koji je statistički značajan samo u *M. aquaticum* testu sa izoproturonom za parametar ukupna dužina biljke.



Slika 38 (a-f). Krive zavisnosti inhibicije relativne stope rasta *M. aquaticum* od koncentracije test supstance. Stope rasta izračunate su na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine biljke (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon sedmodnevnog perioda izloženosti različitim koncentracijama a) 3,5 DCP, b) atrazina, c) izoproturona, d) trifluralina, e) 2,4 D i f) dikambe (koncentracije su log transformisane). Strelicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolni tretman, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



Slika 39. Kriva zavisnosti inhibicije relativne stope rasta *M. spicatum* od primenjene koncentracije test supstance. Relativne stope rasta su izračunate na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon četrnaestodnevnog perioda izloženosti različitim koncentracijama izoproturona (koncentracije su log transformisane). Strelicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolni tretman, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



Slika 40 (a-c). Krive zavisnosti inhibicije relativne stope rasta *M. spicatum* od primenjene koncentracije test supstance. Relativne stope rasta su izračunate na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže (MSv) i suve mase (MSu) nakon sedmodnevnog perioda izloženosti različitim koncentracijama a) atrazina, b) izoproturona i c) 2,4 D (koncentracije su log transformisane). Strelicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolni tretman, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



### 5.2.1. Optimizacija test protokola i definisanje kriterijuma osetljivosti

U ovom delu rada analizirani su parametri rasta biljaka u kontrolnim tretmanima u testovima sa vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum*. Mereni parametri bili su: dužina iznad sedimenta (DS), ukupna dužina (DU), sveža masa (MSv), suva masa (MSu) i sveža masa korena (MK). Analizirani su biološki odgovori koji su izračunati na osnovu parametara: stopa rasta (RGR – relative growth rate), ( $d^{-1}$ ), prinos (Y – yield), uz pregled koeficijenta varijacije (CV %), kako bi se utvrdila varijabilnost parametara rasta. Radi preglednosti, na pojedinim mestima su upotrebljene sledeće skraćenice:

za prinos (Y) i stopu rasta (RGR) na osnovu –  
dužine iznad sedimenta Y DS, RGR DS,  
ukupne dužine Y DU, RGR DU,  
sveže mase Y MSv, RGR MSv,  
suve mase Y MSu; RGR MSu;

za svežu masu korena –  
MK.

Šest *M. aquaticum* i tri *M. spicatum* testa izvedeno je sa periodom adaptacije u trajanju od tri dana, označenim sa “DAT -3 do DAT 0” (“-3” označava “minus tri”, jer podrazumeva dane pre perioda izlaganja) i sedmodnevnim periodom izlaganja test supstancama, označenim sa “DAT 0 do DAT 7”. Takođe, jedan test sa *M. spicatum* izveden je sa periodom adaptacije od 7 dana, označenim sa “DAT -7 do DAT 0” (“-7” označava “minus sedam”, jer podrazumeva dane pre perioda izlaganja).

Pored ovoga, izvedeno je šest *L. minor* testova sa supstancama 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2, 4 D i dikamba, a analizirani parametri bili su prinos (Y) i stopa rasta (RGR) na osnovu parametara broj jedinki (BJ), sveža masa (MSv) i biljna površina (BP).

U tabeli 30. prikazane su prosečne vrednosti parametara rasta kontrolnih biljaka izmerene na početku perioda adaptacije, početku perioda ekspozicije i na kraju testa (dani DAT-3, DAT 0 i DAT 7 – u šest *M. aquaticum* i tri *M. spicatum* testa i DAT -7, DAT 0 i DAT 14 – u jednom *M. spicatum* testu). Pored ovih vrednosti, tabela 30. sadrži i srednje vrednosti stope rasta u kontroli u periodu adaptacije i periodu izlaganja u *Myriophyllum* testovima. Budući da su niska varijabilnost parametara i odgovarajuće vreme dupliranja biomase tokom testa kriterijumi od velikog značaja u testovima sa akvatičnim makrofitama, prikazani su i koeficijenti varijacije CV% i procenjeno vreme dupliranja vrednosti pojedinačnih parametara rasta. Vreme dupliranja je označeno skraćenicom “d.t.” (od eng. “doubling time”, u danima “d”).

Relevantne vrednosti iz svih pojedinačnih testova sa vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum* (vrednosti inhibicije, parametara rasta, prinosa, stope rasta sa procenjenim vremenom dupliranja, srednje inhibitorne koncentracije, NOEC i LOEC vrednost, CV%, MSD%) nalaze se u prilogu (tabele P3-P5).

Prema vrednostima u tabeli 30, biljke u periodu adaptacije su, iako dobijale na dužini, neznatno dobile ili čak izgubile na svežoj masi. Gubitak mase tokom perioda adaptacije zabeležen je u oba tipa testa sa *M. spicatum* – i u periodu adaptacije od 7 i u periodu adaptacije

od 3 dana. Ovo je donekle neočekivano, jer je vrsta *M. spicatum* adaptirana na submerzne uslove i nije jasno zbog čega je zabeležen gubitak mase postavljanjem u voda-sediment test sistem.

Za testove izvedene prema radnoj verziji protokola (OECD draft/2011) nije bio iskazan kriterijum validnosti, ali su predložene vrednosti dužine izdanka i opseg variranja sveže mase biljaka od 30% na početku testa. Nakon analize rezultata internacionalnog testa kalibracije metode, predložena su dva kriterijuma validnosti, odnosno prihvatljivosti rezultata testa: vrednost RGR za svežu masu  $\geq 0.07 \text{ d}^{-1}$  koja odgovara vremenu dupliranja 9.9 d i variranje početnih vrednosti sveže mase i prinosa  $\text{CV}\% \leq 35\%$ .

Tabela 30: Vrednosti parametara rasta izmerene na početku perioda adaptacije (DAT -3; -7), ekspozicije (DAT 0) i na kraju testa (DAT 7; 14), iskazani preko vrednosti stope rasta (RGR) u periodu adaptacije i ekspozicije sa procenjenim vremenom dupliranja (d.t.) i koeficijenti varijacije (CV%) u testovima sa *M. aquaticum* i *M. spicatum*

<i>M. aquaticum</i> parametri 7 d *	Vr. parametra DAT -3	Vr. parametra DAT 0	Vr. parametra DAT 7	RGR u kontroli za period adaptacije	RGR u kontroli za period izlaganja	CV % (RGR)	d.t. (7d rast)
				DAT -3 do DAT 0	DAT 0 do DAT 7		
DS	3.31 mm	5.3 mm	12.22 mm	0.166	0.112	12.9	6.4
DU	6.33 mm	8.04 mm	15.69 mm	0.066	0.093	11.7	8
MSv	0.21 mg	0.27mg	0.52 mg	0.116	0.119	12.5	6.3
MSu	/	/	0.041 mg	/	0.062	35.7	12.1
MK	/	/	0.016 mg	/	/	27.3	/
<i>M. spicatum</i> parametri 14 d**	Vr. parametra DAT -7	Vr. parametra DAT 0	Vr. parametra DAT 14	RGR u kontroli za period adaptacije	RGR u kontroli za period izlaganja	CV % (RGR)	d.t. (14 d rast)
				DAT -7 do DAT 0	DAT 0 do DAT 14		
DS	3.26 mm	8.63 mm	23.62 mm	0.138	0.072	22.3	9.63
DU	6.23 mm	8.4 mm	24.91 mm	0.043	0.077	7.23	9
MSv	0.41 mg	0.254 mg	0.59 mg	-0.066	0.058	24.0	11.95
MSu	/	/	0.052 mg	/	/	16.7	/
MK	/	/	0.008 mg	/	/	59.4	/
<i>M. spicatum</i> parametri 7 d ***	Vr. parametra DAT -3	Vr. parametra DAT 0	Vr. parametra DAT 7	RGR u kontroli za period adaptacije	RGR u kontroli za period izlaganja	CV % (RGR)	d.t. (7d rast)
				DAT -3 do DAT 0	DAT 0 do DAT 7		
DS	2.99 mm	5.18 mm	15.12 mm	0.176	0.148	17.8	4.8
DU	6.26 mm	9.04 mm	18.24 mm	0.12	0.094	27.5	8
MSv	0.51 mg	0.43mg	0.57 mg	-0.064	0.038	140.4	31.5
MSu	/	/	0.049 mg	/	0.039	96.8	23.6
MK	/	/	0.008 mg	/	/	81.2	/

\* Srednja vrednost na osnovu šest testova, \*\* Srednja vrednost na osnovu jednog testa, \*\*\* Srednja vrednost na osnovu tri testa, Skraćenice: RGR – stopa rasta, CV % – koeficijent varijacije, d.t. – vreme dupliranja vrednosti, DAT – „day after treatment“ (dan nakon tretmana), dani testa, DS – dužina iznad sedimenta, DU – ukupna dužina, MSv – sveža masa, MSu – suva masa.

Preliminarni kriterijum validnosti predloženim desetodnevnim testom (sa trodnevnim periodom adaptacije i sedmodnevnim periodom ekspozicije) je zadovoljen, jer su vrednosti stope rasta kontrolnih biljaka *M. aquaticum* za parametre dužina iznad sedimenta, ukupna dužina i sveža masa bile  $\geq 0.07 \text{ d}^{-1}$ . Prema strožijem kriterijumu koji je postavljen finalnom verzijom protokola za vrstu *M. spicatum* (OECD 239, 2014) predviđeno je da se vrednosti dužine izdanka i sveže mase tokom vremena ekspozicije (7 d) dupliraju – što odgovara stopi rasta  $\geq 0.099 \text{ d}^{-1}$ . Prema prosečnim vrednostima dužine iznad sedimenta i sveže mase, ovaj kriterijum validnosti je postignut u *M. aquaticum* testovima. Posmatrajući individualne testove, samo su kontrolne biljke u testu sa atrazinom imale nešto niže vrednosti RGR za oba parametra (RGR DS = 0.086 i RGR MSv = 0.094). Druge vrednosti koje su bile izvan strožijeg kriterijuma validnosti su bile za RGR MSv = 0.07 u testu sa izoproturonom i RGR DS = 0.095 u testu sa 2,4 D.

Poređenja radi, kriterijum validnosti *Lemna* testova propisan standardom (OECD 221/2006) je da vreme dupliranja broja jedinki u kontroli bude ispod 2.5 dana (60 h) što odgovara stopi rasta od minimum  $0.275 \text{ d}^{-1}$ . Rast kontrolnih biljaka u *L. minor* testovima je zadovoljen prosečnom vrednošću 0.33 za RGR BJ iz šest testova. Relevantne vrednosti iz svih pojedinačnih testova *L. minor* (vrednosti inhibicije, parametara rasta, prinosa, stope rasta sa procenjenim vremenom dupliranja, srednje inhibitorne koncentracije, NOEC i LOEC vrednost, CV%, MSD% nalaze se u prilogu (Tabela P6).

U testu sa *M. spicatum*, 14-dnevni period ekspozicije obezbeđuje dovoljno visoku vrednost stope rasta ( $\geq 0.07$ ) za dužinu iznad sedimenta i ukupnu dužinu, ali ne i za svežu masu. Ovaj test ne prolazi strožiji kriterijum validnosti (vreme dupliranja stope rasta  $\geq 0.099 \text{ d}^{-1}$ ) ni prema kojem parametru rasta.

U modifikovanim desetodnevnim testovima sa *M. spicatum* (3 d + 7 d), jedino su parametri dužina iznad sedimenta i ukupna dužina biljaka prema inicijalnom kriterijumu validnosti (RGR za svežu masu  $\geq 0.07 \text{ d}^{-1}$  tj. vreme dupliranja 9.9 d i variranje početnih vrednosti sveže mase  $\leq 35\%$ ) dostigli zadovoljavajuće vrednosti tokom trajanja testa, sa procenjenim vremenom dupliranja: 4.8 i 8 dana, dok je prema finalnom kriterijumu validnosti (RGR za svežu masu i dužinu izdanka  $\geq 0.099 \text{ d}^{-1}$ ), jedino parametrom dužina iznad sedimenta zadovoljen kriterijum, sa stopom rasta 0.148 (dok je stopa rasta za ukupnu dužinu bila skoro dostignuta sa vrednošću 0.094). Stopa rasta sveže mase je bila izuzetno niska sa prosečnom vrednošću 0.04 (min. 0.01, max. 0.07). Čini se da period od 3 dana adaptacije ne dovodi do značajnog rasta vrste *M. spicatum*, naprotiv, stopa rasta ima negativne vrednosti.

Rast kontrolnih biljaka u četrnaestodnevnom periodu ekspozicije *M. spicatum* je i na osnovu dužinskih i masenih parametara bio sporiji od rasta biljaka u sedmodnevnom periodu. Pad vrednosti sveže mase *M. spicatum* zabeležen je u periodu adaptacije i od 3 d i od 7 d, tj. stopa rasta za MSv u periodu adaptacije od 7 dana takođe ima negativne vrednosti.

Negativne vrednosti parametara rasta *M. spicatum* u kontroli navode i Belgers i saradnici, (2007), tokom četvoronedeljnog testa sa *M. spicatum* (pominju se koren i izdanci, ali se ne precizira da li se radi o dužini ili masi parametara).

Test vrste *M. aquaticum* i *M. spicatum* u periodu adaptacije i ekspozicije jednake dužine (3 d + 7 d) imaju uporedive stope rasta za dva parametra: dužina iznad sedimenta i ukupna dužina biljke, dok je razlika za vrednosti sveže mase u 7 d periodu ekspozicije značajna: *M. aquaticum*  $RGR_{7d} = 0.119$  (CV = 12.5%) i *M. spicatum*  $RGR_{7d} = 0.038$  (CV = 140.4%).

Ako posmatramo kolonu sa vrednostima parametara rasta poslednjeg dana *M. spicatum* testova u tabeli 30: DAT 14 (trajanje testa prema protokolu) i DAT 7 (skraćeni testovi), primetićemo, očekivano, više vrednosti dužine kontrolnih biljaka u 14-dnevnom periodu ekspozicije. Međutim, vrednosti sveže i suve mase biljaka su vrlo slične u dva različita perioda ekspozicije: 0.59 mg i 0.052 mg u 14 d testu i 0.57 mg i 0.49 mg u 7 d testu.

Sa druge strane, u periodu ekspozicije koji je trajao duže (14 d), stopa rasta dužine izdanka iznad sedimenta i RGR ukupne dužine biljaka, ima niže vrednosti od onih u kraćem periodu ekspozicije (7 d), dok je vrednost sveže mase za 14-dnevni period viša (0.058) od one za 7-dnevni period (0.038).

Nijedan tip testa sa *M. spicatum* nije zadovoljio kriterijum validnosti, jer period ekspozicije nije bio dovoljan za dupliranje vrednosti sveže mase.

U 14-dnevnom testu je koeficijent varijacije za sve parametre, izuzev za svežu masu korena bio ispod 30%. Takođe, koeficijent varijacije za dužinske parametre u oba tipa testa je relativno mali. S druge strane, vrlo visoke vrednosti CV% su zabeležene za parametre sveža i suva masa u testovima sa 7 d ekspozicijom i iznose 140.4 i 96.8%.

Koeficijent varijacije CV (%) prinosa i stope rasta za svaki parametar u kontroli je izračunat u cilju određivanja varijabilnosti parametara rasta *M. aquaticum* i *M. spicatum*. Pored toga, izračunate su i najmanje statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (MSD%) kao pokazatelji statističke snage testa.

U tabeli 31 prikazane su srednje vrednosti prinosa i stope rasta, sa koeficijentom varijacije (CV%), procenjenim vremenom dupliranja (*d.t.*), maksimalnom statistički značajnom razlikom (MSD%) u *Myriophyllum* testovima. Tabela 31 obuhvata prosečne vrednosti iz šest *M. aquaticum* testova (3 d + 7 d), jednog *M. spicatum* testa (7 d + 14 d), tri modifikovana *M. spicatum* testa (3 d + 7 d), kao i prosečne vrednosti validnih podataka iz internacionalnog testa kalibracije metode na *M. aquaticum* i *M. spicatum* (Ratte i Ratte, 2014). Prosečne vrednosti iz izveštaja IRT prikazane u tabeli uključuju i tri testa Laboratorije za ekotoksikologiju (testovi na *M. aquaticum* sa 3,5 DCP, izoproturonom i trifluralinom).

U tabeli 31 se mogu uočiti relativno niske i bliske prosečne vrednosti CV% za stope rasta *M. aquaticum* parametara: dužina biljke iznad sedimenta 12.9%, ukupna dužina biljke 11.7% sveža masa 12.5%. Najvarijabilniji parametri su suva masa biljke 35.7% i sveža masa korena 27.3%. Najmanje varijabilan parametar je ukupna dužina biljke, dok je glavni parametar predložen protokolom – dužina biljke iznad sedimenta, drugi po varijabilnosti. Razlike u varijabilnosti su relativno male: najniža prosečna vrednost iznosi 11.7 a najviša 35.7.

Koeficijent varijacije za stope rasta u *M. spicatum* testu sa izoproturonom (7 + 14 d) je u rasponu od 11.5 do 59.4%, pri čemu je najniži za ukupnu dužinu, a najviši za masu korena.

Prosečne vrednosti CV% za stope rasta parametara *M. spicatum* u skraćenim (3 + 7 d) testovima su, za dužinu biljke iznad sedimenta 17.8% i ukupnu dužinu biljke 27.5%, dok ostali parametri – sveža masa sa 140.4%, suva masa sa 96.8% i sveža masa korena sa 81.2% imaju visoke vrednosti. Najmanje varijabilan parametar je osnovni parametar predložen protokolom:

dužina biljke iznad sedimenta. Razlike u varijabilnosti su takođe relativno velike: najniža prosečna vrednost iznosi 17.8%, a najviša 140.4%.

Prosečna stopa rasta za parametre DS, MSv i MSu u *M. aquaticum* testovima je u IRT (sa vrednostima 0.10; 0.11; 0.07) bila bliska stopi rasta u šest *M. aquaticum* testova Laboratorije za ekotoksikologiju (0.11; 0.12; 0.06). Procenjeno vreme dupliranja dužine iznad sedimenta i sveže mase bilo je 6.74 i 6.33 (LECOTOX) i 7 i 6.1 (IRT).

Tabela 31: Parametri rasta vrsta *M. aquaticum* i *M. spicatum* u testovima inhibicije rasta u test sistemu voda-sediment

Vrednosti parametara rasta u 7 d testovima sa <i>M. aquaticum</i> (n=6) Lecotox									
Parametar	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
Sr.vr.(0-7 d)	6.9	7.5	0.37	0.016	0.11	0.093	0.12	0.062	0.016
d.t.					6.74	7.99	6.33	12.07	
CV (%)	14.41	15.3	17.8	49.5	12.9	11.7	12.5	35.7	27.3
MSD (%)	22.2	23.4	34.4	68.9	14.8	19.21	35.9	51.7	32.2
Vrednosti parametara rasta u 14 d testu sa <i>M. spicatum</i> (n=1) Lecotox									
Parametar	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
Sr.vr.(0-7 d)	14.9	16.5	0.34	0.02	0.072	0.077	0.058	0.034	0.01
d.t.					9.63	9	11.95	20.4	
CV (%)	22.6	11.5	33.6	41.9	22.3	6.65	21.8	36.7	59.4
MSD (%)	28.5	22.4	54.6	62	25.3	21.3	117.6	75.9	65.9
Vrednosti parametara rasta u 7 d testovima sa <i>M. spicatum</i> (n=3) Lecotox									
Parametar	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
Sr.vr.(0-7 d)	9.9	9.3	0.16	0.01	0.15	0.09	0.04	0.04	0.01
d.t.					4.75	7.95	31.5	23.6	
CV (%)	19	27.3	92.4	89.1	17.92	27.5	140.4	168.8	56.9
MSD (%)	27.2	40	142.5	113	21.5	36.8	254.7	145.6	66.6
Vrednosti parametara rasta u 7 d IRT testovima sa <i>M. aquaticum</i> (n=10) (Ratte i Ratte, 2014)									
Parametar	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
Sr.vr.(0-7 d)	5.3		0.293	0.014	0.099		0.114	0.066	
d.t.					7		6.1	10.5	
CV (%)	20.0		21.0	41.3	15.9		14.1	32.9	
MSD (%)	25.6		26.9	52.9	20.3		18.0	42.1	
Vrednosti parametara rasta u 14 d IRT testovima sa <i>M. spicatum</i> (n=10) (Ratte i Ratte, 2014)									
Parametar	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
Sr.vr.(0-7 d)	27.9		0.894	0.075	0.106		0.103	0.08	
d.t.					6.5		6.7	8.7	
CV (%)	17.1		18.8	18.8	10.5		9.9	11.3	
MSD (%)	21.9		24.1	24.1	13.4		12.7	14.5	

Y – prinos, RGR – stopa rasta, DS – dužina iznad sedimenta, DU – ukupna dužina, MSv – sveža masa, MSu – suva masa, MK – sveža masa korena, d.t. – vreme dupliranja, CV% – koeficijent varijacije, MSD – maksimalna statistički značajna razlika

Raspon vrednosti CV% za Y MSv u šest *M. aquaticum* (LECOTOX) testova bio je od 11.5 do 21.9%, sa prosečnom vednošću 17.8%, što je blisko rezultatima IRT gde je prosečna vrednost 21% (za 13 validnih testova iz 8 laboratorija) i ujedno zadovoljava drugi preliminarni kriterijum validnosti.

Koeficijent varijacije Y MSv *M. spicatum* u testu sa izoproturonom (7 d + 14 d) bio je 33.6, dok je raspon vrednosti CV% za Y MSv u tri *M. spicatum* testa bio 66.2-121.4%.

Najveću varijabilnost iskazanu kroz CV% i MSD% za *M. aquaticum* imao je parametar Y MSu (CV = 49.5%), a slična vrednost je zabeležena i u IRT (CV = 41.3%) (Ratte i Ratte 2014).

Najveća prosečna varijabilnost i MSD% iz tri skraćena *M. spicatum* zabeležena je za parametar Y MSv (CV = 92.4%) što je znatno više od 21.0% koliko je zabeleženo u IRT (Ratte i Ratte 2014). Koeficijent varijacije za ovaj parametar u jednom testu sa *M. spicatum* propisane dužine iznosi 33.6%, dok najvišu vrednost CV% u ovom testu ima YMSu sa 41.9%.

Statistička snaga *M. aquaticum* testova varira u zavisnosti od parametra. Najniže vrednosti MSD% su zabeležene za parametre dužine, dok su vrednosti za ostale parametre iznad 30%. Prema izveštaju IRT, za parametar RGR DSprosečna vrednost MSD 2iznosi 0.11%, ali i MSD za RGR MSv je vrlo niska – 8%. Najviše vrednosti MSD% u *M. spicatum* testovima su zabeležene kod istih parametara kod kojih je varijabilnost bila najveća.

Parametri *M. spicatum* koji se tiču stope rasta mase u IRT (Ratte i Ratte, 2014), dostižu relativno visoke vrednosti: prosečne stope rasta MSv i MSu iznose 0.103 i 0.08 (nasuprot vrednostima za iste parametre u *M. spicatum* testovima Laboratorije za ekotoksikologiju koji su bili  $\geq 0.06$ ). Ovi parametri u IRT, takođe imaju malu varijabilnost, visoku stabilnost i pouzdanost, sa vrednostima CV% 9.9 i 11.3% i vrednostima MSD% 12.7 i 14.5% (nasuprot visokim vrednostima CV% i MSD% u *M. spicatum* testovima Laboratorije za ekotoksikologiju, pogotovo u skraćenim testovima (3 + 7 d)).

Mohr i saradnici (2013) su prilikom izvođenja testova na vrsti *M. spicatum* u voda-sediment sistemu takođe zabeležili najvišu varijabilnost za suhu masu. Iako bi se očekivalo da je dodatkom sedimenta zbog uslozňjavanja sistema došlo i do povećanja varijabilnosti parametara (Mohr i sar, 2013), koeficijent varijacije parametara *M. spicatum* iz IRT i parametara u test sistemu bez sedimenta (samo voda) (Mohr i sar, 2013, OECD, 2014) ne pokazuje značajne razlike. Ipak, parametri rasta sveže i suve mase u skraćenim (3 + 7 d) *M. spicatum* testovima (LECOTOX) pokazuju izuzetno veliku varijabilnost.

Ako uporedimo MSD% vrednosti iz testova na *M. spicatum* i *M. aquaticum* u okviru IRT (Ratte i Ratte, 2014), zaključak je da *M. spicatum* testovi imaju nešto veću statističku snagu od *M. aquaticum* testova.

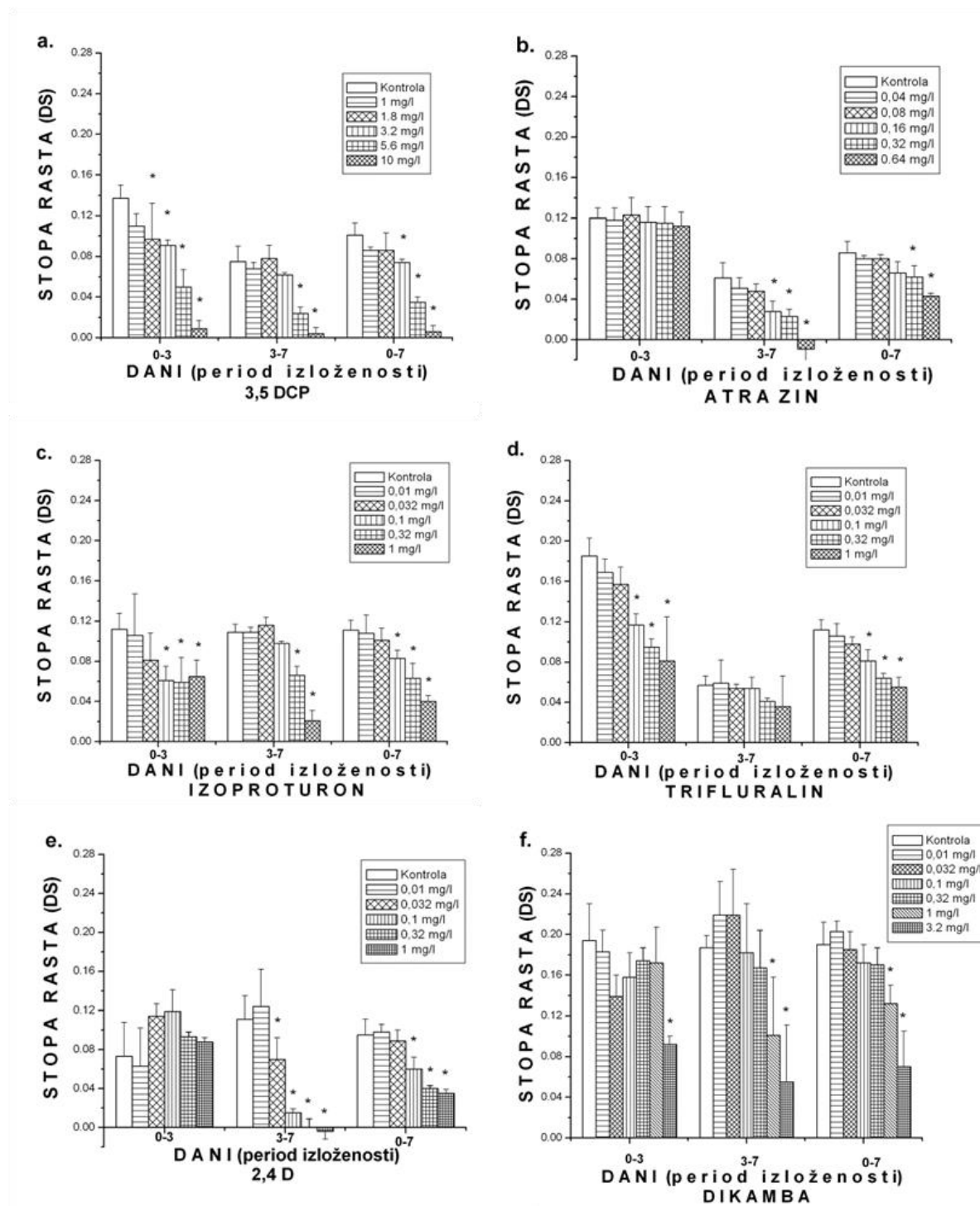
Parametri u *Lemna* testovima su imali relativno niske prosečne vrednosti CV%, pogotovo za vrednosti stope rasta: za RGR BJ 8.9%, RGR MSv 8.4% i RGR BP 11.3%. Očekivano, varijabilnost vrednosti prinosa je viša od varijabilnosti stope rasta. Najvarijabilniji parametar je bio biljna površina. Razlike u prosečnoj varijabilnosti parametara su vrlo male, sa rasponom 8.9-11.3% za stope rasta i rasponom 21.7-28.9% za prinos. MSD% vrednosti u *Lemna* testovima su, takođe, bile relativno niske za sve parametre i prekoračile 30% jedino za parametre Y MSv i Y BP što potvrđuje veliku statističku snagu ovog standardizovanog testa.

### 5.2.2. Osetljivost testova inhibicije rasta vrste *M. aquaticum* i *M. spicatum*

U ovom poglavlju prikazana je osetljivost testova na vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum* sa pojedinačnim susptancama rastvorenim u vodi, u sistemu voda-sediment. Pregled obuhvata šest *M. aquaticum* testova (3 + 7 d) – sa supstancama 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba, jedan *M. spicatum* test (7 + 14 d) – sa izoproturonom, kao i tri skraćena testa na *M. spicatum* (3 + 7 d) – sa atrazinom, izoproturonom i 2,4 D. Analizirana je toksičnost pojedinačnih supstanci u funkciji vremena, kao i za celokupni period izlaganja, srednja inhibitorna koncentracija za različite parametre, kao i minimalna statistički značajna razlika MSD (%), kako bi se kvantifikovala statistička snaga testa. Osetljivost *Myriophyllum* testova upoređena je sa standardnim *Lemna* testovima, kao i sa testovima sa drugim akvatičnim makrofitama.

Glavni parametar predložen standardnom metodom – dužina biljke iznad sedimenta (DS) je u testovima sa *M. aquaticum* meren tri puta tokom perioda ekspozicije, i to danima: DAT 0, DAT 3 i DAT 7, te su izračunate stope rasta za intervale 0-3, 3-7 i kumulativno 0-7 (Slika 41). Sa grafikona se mogu očitati vrednosti LOEC (najniža koncentracija test supstance koja izaziva statistički značajan efekat) i NOEC (najviša koncentracija test supstance koja ne izaziva statistički značajan efekat). LOEC vrednost je u svim testovima označena prvim asteriskom na stupcima u intervalu, dok je NOEC vrednost prva niža koncentracija od LOEC vrednosti, koja nije označena asteriskom. Vrednosti LOEC za period 0-7 dana za ovaj parametar u testovima sa 3,5 DCP, atrazinom, izoproturonom, trifluralinom, 2,4 D i dikambom iznose redom: 3.2, 0.32, 0.1, 0.1, 0.1 i 1 mg/l.

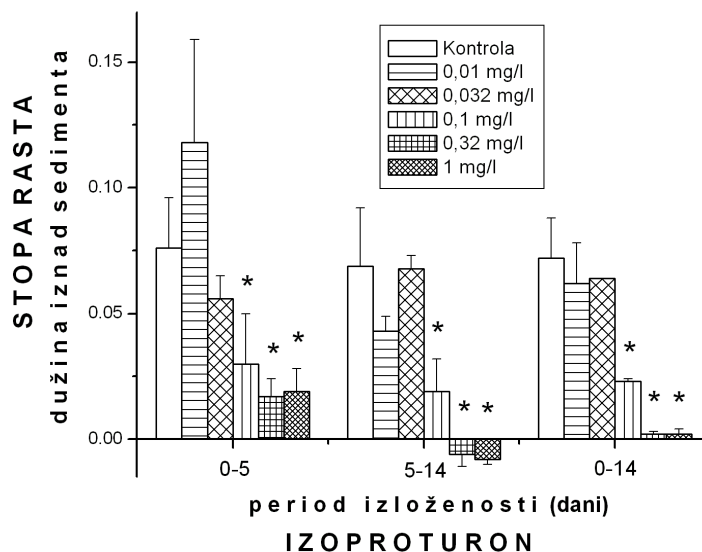
Na osnovu stope rasta izračunate za različite vremenske intervale, može se uočiti da su razlike u visini stope rasta između tretmana i kontrole zabeležene već u prvom intervalu, odnosno, do trećeg dana perioda ekspozicije. Međutim, statistički značajne razlike su u prvom intervalu (0-3) primećene u testovima sa 3,5 DCP, izoproturonom i trifluralinom. U testu sa referalnom supstancom 3,5 DCP, sličan efekat uočen je u sva tri intervala (Slika 41 a) Atrazin je ispoljio jače dejstvo u drugom intervalu (Slika 41 b), što se može primetiti u zanemarljivo malim razlikama između stopa rasta biljaka kontrole i tretmana u prvom i uočljivijim razlikama u drugom intervalu. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su zabeležene u tri najviše primenjene koncentracije. U testu sa izoproturonom zabeležen je sličan efekat u prva dva intervala (Slika 41 c), dok je u testu sa trifluralinom vidljivo jači efekat na rast ispoljen u prvom intervalu (Slika 41 d). U testu sa 2,4 D, jači efekat je ispoljen u drugom intervalu (Slika 41 e). Odgovor biljaka tokom izlaganja dikambi je bio sličan u oba intervala (Slika 41 f), dok je, ako se posmatra ceo period izlaganja (0-7) statistički značajan odgovor bio samo u dve najviše koncentracije (od šest primenjenih). U testovima sa 2,4 D i dikambom je zabeležena blaga stimulacija rasta biljaka u nižim tretmanima, tj. tzv. *hormezis* efekat koji nije bio statistički značajan. Takođe, stimulisan rast biljaka je očekivan odgovor prilikom izlaganja niskim koncentracijama hormonskih herbicida.



Slika 41 (a-f). Testovi inhibicije rasta *M. aquaticum* – 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta (DS) tokom intervala 0-3 od 3-7 dana, kao i kumulativno 0-7 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolni tretman, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



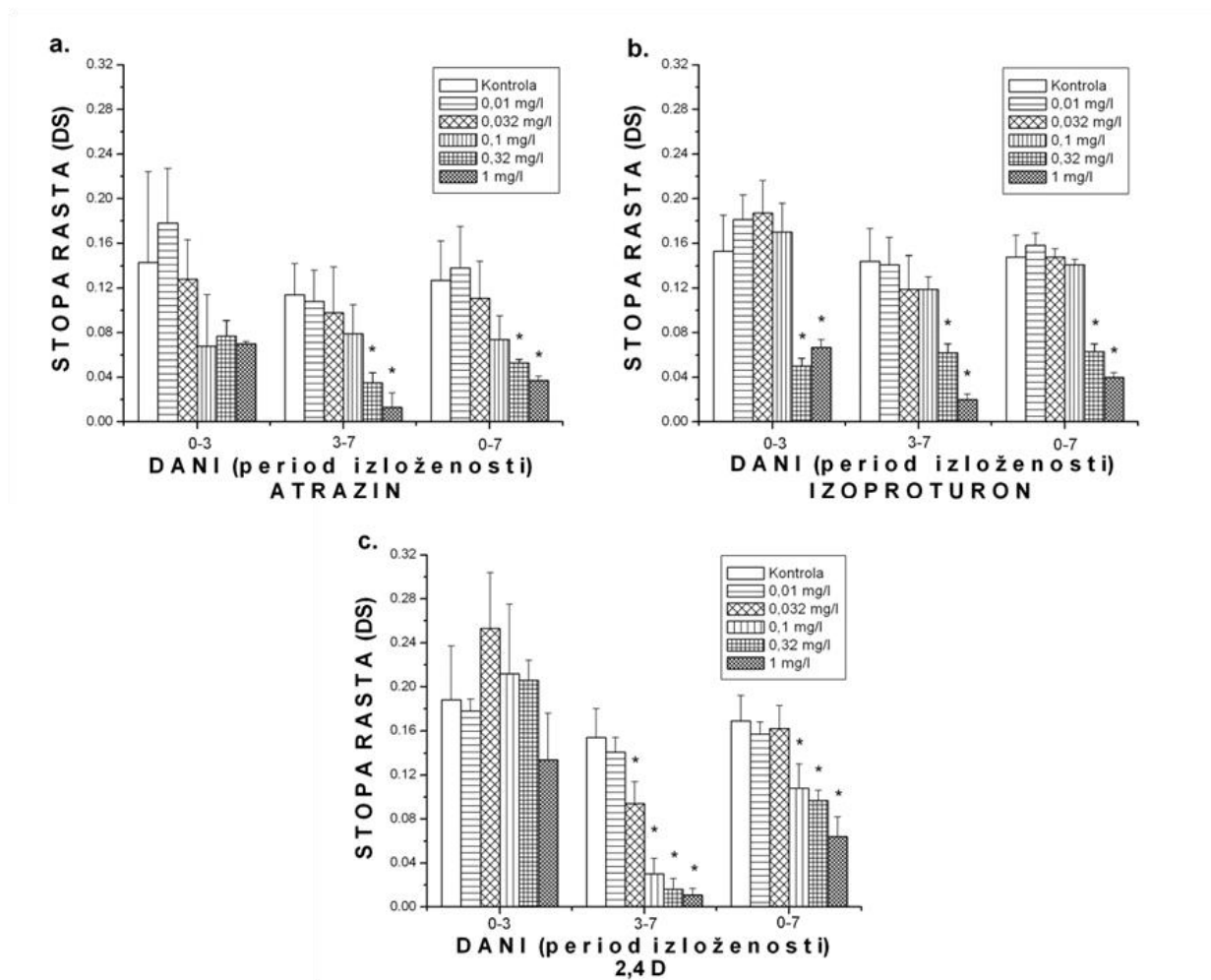
Tokom 14-dnevne ekspozicije u testu *M. spicatum* sa izoproturonom, dužina biljke iznad sedimenta izmerena je (prema protokolu) nultog, petog i četrnaestog dana testa. Stope rasta izračunate za intervale 0-5, 5-14 i kumulativno 0-14 za različite tretmane su prikazane na slici 42. U testu sa izoproturonom, zabeležen je sličan efekat na rast u oba intervala, s tim da je u drugom intervalu bio nešto intenzivniji pri najvišim primenjenim koncentracijama.



Slika 42. Test inhibicije rasta *M. spicatum* – izoproturon. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta tokom intervala 0-5 od 5-14 dana, kao i kumulativno 0-14 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolni tretman, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Na slici 43 (a-c) prikazane su vrednosti stope rasta dužine biljke iznad sedimenta (RGR DS) izmerene tri puta tokom sedmodnevnog perioda ekspozicije *M. spicatum*, i to: DAT 0, DAT 3 i DAT 7 i izračunate su stope rasta za intervale 0-3, 3-7 i kumulativno 0-7.

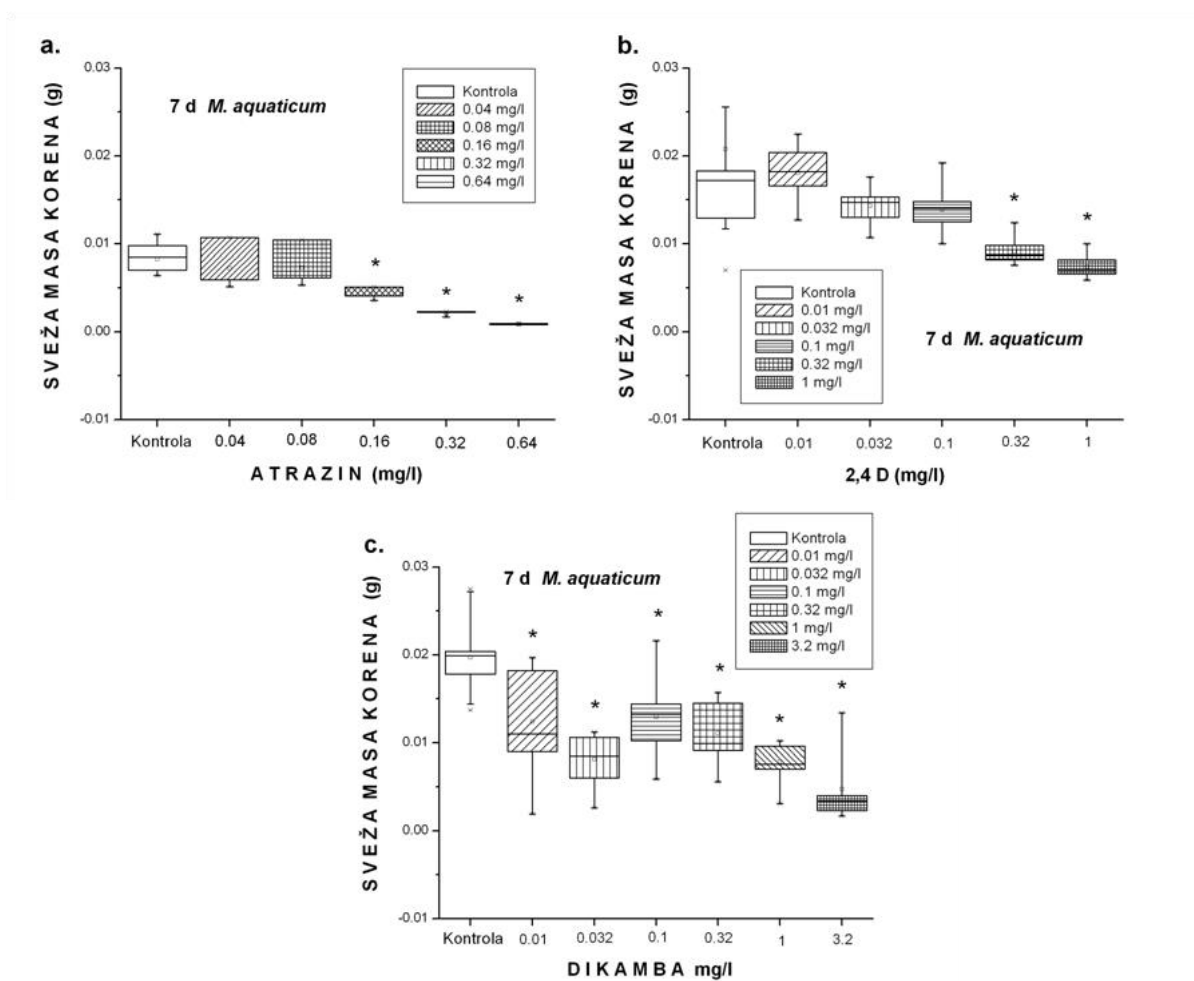
Vrednosti LOEC za period 0-7 dana za ovaj parametar u testovima sa supstancama atrazin, izoproturon i 2,4 D iznose redom: 0.32; 0.32 i 0.1 mg/l. Na osnovu stope rasta izračunate za različite vremenske intervale, može se uočiti da su sve tri supstance imale jače dejstvo na rast *M. spicatum* u drugom intervalu (što je takođe bio slučaj sa *M. aquaticum* i supstance atrazin i 2,4 D). Posmatrajući ceo period izlaganja atrazinu, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su zabeležene u tretmanima sa dve najviše primenjene test koncentracije. Više koncentracije izoproturona (0.32 i 1 mg/l) su imale slično dejstvo u svim intervalima. U tri niža tretmana u prvom intervalu, vrednosti stope rasta su iznad vrednosti u kontroli, što ukazuje na stimulaciju rasta (koja nije statistički značajna). Ovo je uticalo i na to da vrednosti stope rasta posmatrane za ceo period izlaganja budu vrlo bliske kontrolnim i da statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu budu zabeležene samo u tretmanima sa dve najviše primenjene test koncentracije. Supstanca 2,4 D je ispoljila izraženije dejstvo u prvom intervalu. Za ceo period izlaganja, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su zabeležene u tri najviše test koncentracije.



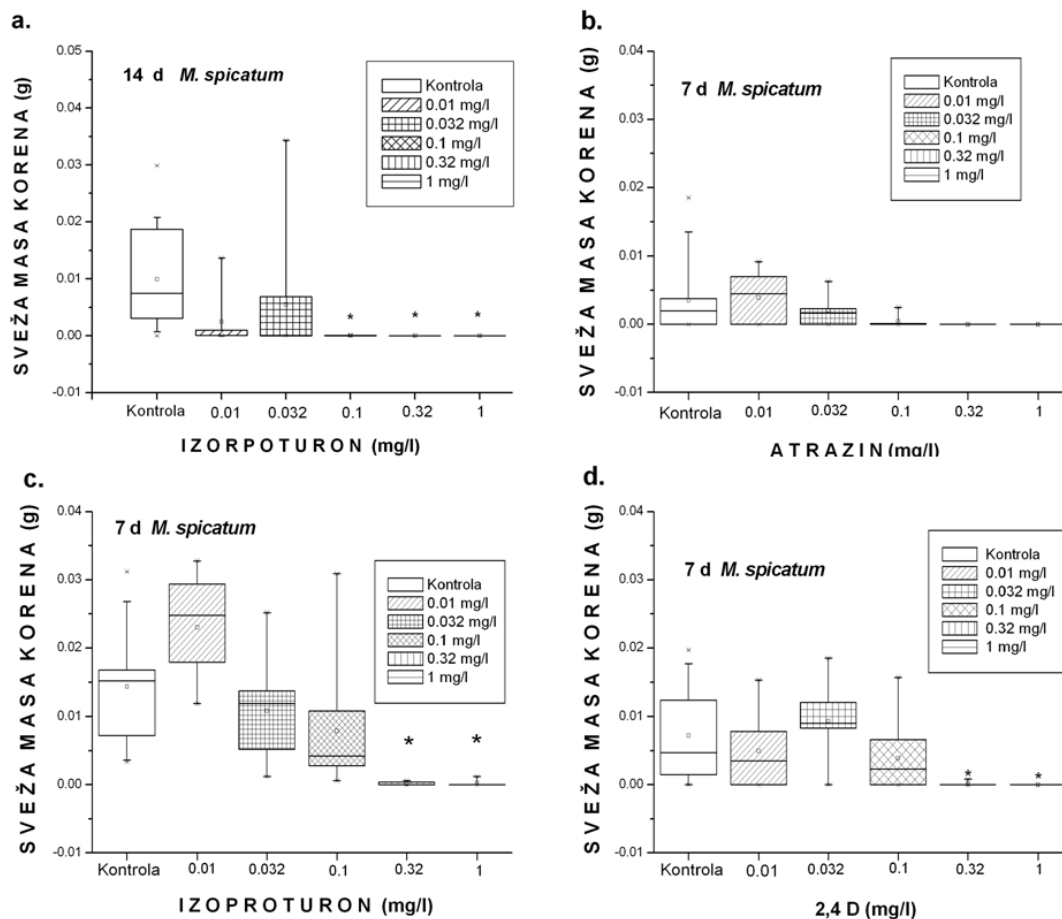
Slika 43 (a-c). Testovi inhibicije rasta *M. spicatum* – atrazin, izoproturon i 2,4 D. Relativna stopa rasta, na osnovu dužine biljke iznad sedimenta tokom intervala 0-3 od 3-7 dana, kao i kumulativno 0-7 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolni tretman, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

Sveža masa korena, merena u tri *M. aquaticum* testa bila je relativno osetljiv parametar, a u testu sa dikambom parametar sa najnižom  $IC_{50}$  vrednošću (0.52 mg/l). Vrednosti sveže mase korena, izmerene sedmog dana testa u *M. aquaticum* prikazane su na slici 44 (a-c). Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni.

Sveža masa korena je i u *M. spicatum* testovima bila relativno osetljiv parametar. Merena je 14. dana u jednom *M. spicatum* testu i 7. dana u tri skraćena *M. spicatum* testa. Vrednosti sveže mase korena u *M. spicatum* testovima prikazane su na slici 45 (a-d). Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. U testu sa izoproturonom, sveža masa korena u prvom tretmanu imala je više vrednosti od mase u kontrolnom tretmanu.



Slika 44 (a-c). Vrednosti sveže mase korena *M. aquaticum* u testovima inhibicije rasta sa a) atrazinom, b) 2,4 D i c) dikambom. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u vrednosti sveže mase korena u odnosu na kontrolu, (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).



Slika 45 (a-d). Vrednosti sveže mase korena *M. spicatum* u testu inhibicije rasta sa a) izoproturonom (7+ 14 d test) i tri skraćena testa (3+ 7 d test) sa b) atrazinom, c) izoproturonom i d) 2,4 D. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti u svim tretmanima uključujući i kontrolni. \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u vrednosti sveže mase korena u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ).

U tabeli 32 prikazane su vrednosti  $IC_{50}$  za sve parametre *Myriophyllum* i *Lemna* testova. Prikazane su i prosečne vrednosti  $IC_{50}$  internacionalnog testa kalibracije metode (IRT). Prosečne vrednosti IRT uključuju i vrednosti dobijene u testovima Laboratorije za ekotoksikologiju sa *M. aquaticum* i supstancama 3,5 DCP, izoproturon i trifluralin.

Poredeći srednje inhibitorne koncentracije izračunate na osnovu prinosa i stope rasta svih parametara, kao i vrednosti sveže mase korena izmerene poslednjeg dana testa u *M. aquaticum* testovima, najosetljiviji parametar je bio suva masa (Y MSu – test sa 3,5 DCP i izoproturonom, RGR MSu – test sa 2,4 D), ukupna dužina biljke (RGR DU – test sa atrazinom i Y DU – test sa trifluralinom) i sveža masa korena (MK – test sa dikambom) (Tabela 32). Sveža masa korena, parametar rasta koji nije predviđen protokolom, merena je u tri testa sa *M. aquaticum* i bila najosetljiviji parametar u jednom testu (test sa dikambom). Iako sa vrlo malom varijabilnošću 12.9% (8.5-18.7), osnovni parametar – dužina biljke iznad sedimenta ni u jednom testu nije bio najosetljiviji.

Tabela 32: Srednje inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) u testovima sa vrstama *M. aquaticum*, *M. spicatum* i *L. minor* (prerađeno i dopunjeno iz Tunić i sar, 2015)

Vrednosti IC <sub>50</sub> (mg/l) (7 d) na osnovu parametara rasta <i>M. aquaticum</i>										
Supstanca	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK	Opseg IC <sub>50</sub> (mg/l)
3,5 DCP*	4.23	3.95	5.072	<b>0.695</b>	4.7	4.98	6.55	0.94	/	0.69-6.55
Atrazin	0.499	>0.64	0.261	0.17	0.317	<b>0.074</b>	0.442	0.606	0.294	0.074->0.64
Izoproturon*	0.384	0.726	0.448	<b>0.259</b>	0.547	>1	>1	0.796	/	0.259->1
Trifluralin*	0.27	<b>0.098</b>	>1	>1	0.94	0.2	>1	>1	/	0.098->1
2,4 D	0.127	0.171	0.029	0.028	0.234	0.237	>1	<b>0.027</b>	0.262	0.027->1
Dikamba	1.29	1.44	2.29	1.99	2.24	2.055	3.14	2.37	<b>0.52</b>	0.52-3.14
Vrednosti IC <sub>50</sub> (mg/l) (14 d) na osnovu parametara rasta vrste <i>M. spicatum</i>										
Supstanca	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK	Opseg IC <sub>50</sub> (mg/l)
Izoproturon	0.068	0.067	0.043	0.073	0.078	0.076	0.04	<b>0.006</b>	0.009	0.01-0.077
Vrednosti IC <sub>50</sub> (mg/l) (7 d) na osnovu parametara rasta <i>M. spicatum</i>										
Supstanca	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK	Opseg IC <sub>50</sub> (mg/l)
Atrazin	0.098	0.262	0.044	0.007	0.195	0.335	0.032	<b>0.006</b>	0.043	0.006-0.335
Izoproturon	0.228	0.2	0.067	<b>0.058</b>	0.273	0.212	0.066	0.06	0.084	0.058-0.273
2,4 D	0.097	<b>0.094</b>	0.393	0.641	0.591	0.392	0.568	0.658	0.118	0.094-0.658
IRT vrednosti IC <sub>50</sub> (mg/l) (7 d) na osnovu parametara rasta <i>M. aquaticum</i> (n=10) (Ratte i Ratte, 2014)										
Supstanca	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK	Opseg IC <sub>50</sub> (mg/l)
3,5 DCP	5.7		4.6	/	6.1		5.2	<b>3.7</b>		3.7 - 6.1
Izoproturon	0.37		0.86	<b>0.12</b>	0.51		1.18	0.13		0.12 - 1.18
Trifluralin	0.82		/	/	<b>0.75</b>		/	/		0.75 - 0.82
IRT vrednosti IC <sub>50</sub> (mg/l) (14 d) na osnovu parametara rasta <i>M. spicatum</i> (n=10) (Ratte i Ratte, 2014)										
Supstanca	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK	Opseg IC <sub>50</sub> (mg/l)
3,5 DCP	5.3		<b>4.7</b>	5	6.3		5.3	4.8		4.7 - 6.3
Izoproturon	0.14		0.083	<b>0.052</b>	0.315		0.164	0.074		0.052 - 0.315
Trifluralin	<b>0.165</b>		0.319	/	0.314		0.84	/		0.163 - 0.840
Vrednosti IC <sub>50</sub> (mg/l) (7 d) na osnovu parametara rasta vrste <i>L. minor</i>										
Supstanca	Y BJ	Y MSv	Y BP	RGR BJ	RGR MSv	RGR BP	Opseg IC <sub>50</sub> (mg/l)			
3,5 DCP*	2.25	<b>1.94</b>	2.21	3.22	2.16	2.91	1.94-3.22			
Atrazin	0.125	<b>0.061</b>	/	0.215	0.114	0.252	0.061-0.252			
Izoproturon*	0.156	<b>0.077</b>	0.14	0.227	0.203	0.211	0.077-0.227			
Trifluralin*	0.285	<b>0.258</b>	0.639	0.756	0.846	0.769	0.258-0.846			
2,4 D	9.82	>10	<b>7.08</b>	>10	>10	>10	7.08->10			
Dikamba	> <b>10</b>	>10	>10	>10	>10	>10	>10			

Y – prinos, RGR – stopa rasta, DS – dužina iznad sedimenta, DU – ukupna dužina, MSv – sveža masa, MSu – suva, masa, MK – sveža masa korena, BJ – broj jedinki, BP – biljna površina. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate metodom linearne interpolacije, a NOEC i LOEC vrednosti su određene poređenjem svakog tretmana sa kontrolom (jednosmerna ANOVA i *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama (zbog nejednakog broja replikata u kontroli i tretmanu). Statistička značajnost dodeljena je uniformno na  $p \leq 0.05$ .

Prosečne vrednosti minimalne statistički značajne razlike MSD (%) iz šest *M. aquaticum* testova su relativno niske, pogotovo za parametre dužinskog rasta (Tabela 31). Najmanju statističku snagu pokazuju parametri suve mase, koji su u većini slučajeva imali najniže IC<sub>50</sub> vrednosti. Poređenjem IC<sub>50</sub> vrednosti, parametri dužine u većini slučajeva nisu najosetljiviji, ali niske vrednosti koeficijenta varijabilnosti (11.7-12.9) i MSD% (14.75-23.36%), upućuju na stabilnost, pouzdanost i visoku statističku snagu ovih parametara.

Najnižu IC<sub>50</sub> vrednost u *M. spicatum* testu za 14 d period izlaganja izoproturonu, imala je RGR MSu. Ovaj parametar je imao varijabilnost 36.7% i visoku vrednost MSD (75.9%).

Najniže vrednosti srednje inhibitorne koncentracije u tri skraćena *M. spicatum* testa (3 + 7 d) imale su RGR MSu (u testu sa atrazinom), Y MSu (u testu sa izoproturonom) i Y DU (u testu sa 2,4 D). Osnovni parametar – dužina biljke iznad sedimenta, iako sa najmanjom varijabilnošću, je samo u testu sa 2,4 D (Y DS) bio među najosetljivijim parametrima sa vrednošću IC<sub>50</sub> = 0.097 mg/l (niža od toga je bila samo vrednost 0.094 mg/l za prinos ukupne dužine). Dodatni parametar sveža masa korena (meren u sva tri skraćena testa sa *M. spicatum*), ni u jednom testu nije bio najosetljiviji, ali ni najmanje osetljiv, dok je vrednost MSD% za masu korena bila relativno visoka (iznad 50%). Visoke vrednosti MSD% (iznad 100%) imali su i parametri sveže i suve mase.

Najniže prosečne IC<sub>50</sub> su u IRT *M. aquaticum* testovima sa 3,5 DCP, izoproturonom i trifluralinom imale redom RGR MSu, Y MSu i RGR DS, dok su najniže prosečne IC<sub>50</sub> za iste supstance u *M. spicatum* testovima bile Y MSv, Y MSu i Y DS.

Prema IC<sub>50</sub> vrednosti za parametar RGR BJ (3.22 mg/l) za referalnu supstancu 3,5 DCP testovi sa *L. minor* su u skladu sa predloženim opsegom osetljivosti (OECD, 2005). Ako posmatramo sve testove inhibicije rasta *L. minor* (3,5 DCP, atrazin, izoproturon, 2,4 D i dikamba), najosetljiviji parametri su bili sveža masa (u tri testa Y MSv: ATR, IPU, TRIF, biljna površina (RGR BP u testu sa 3,5 DCP i Y BP u testu sa 2,4 D) i broj jedinki (Y BJ u testu sa dikambom), uz napomenu da su u svim testovima poređene IC<sub>50</sub> vrednosti, osim u testovima sa auksin simulatorima (u *L. minor* testovima). U testu sa 2,4 D su poređene IC<sub>25</sub> vrednosti, jer je IC<sub>50</sub> bila iznad najviše primenjene koncentracije >10 mg/l, a u testu sa dikambom su poređene vrednosti inhibicije ili stimulacije, s obzirom na to da prilikom izlaganja supstanci nije zabeležen gotovo nikakav negativan efekat na rast.

Na osnovu IC<sub>50</sub> vrednosti izračunate za sve parametre, može se zaključiti da je od dve *Myriophyllum* vrste za isti period ekspozicije, *M. spicatum* imala veću osetljivost od *M. aquaticum* na atrazin i izoproturon, a manju na 2,4 D.

Na osnovu vrednosti IC<sub>50</sub>, za većinu parametara, supstance atrazin i 2,4 D su ispoljile najizraženije toksično dejstvo na *M. aquaticum* (sa najnižim vrednosti IC<sub>50</sub> 0.03 i 0.07 mg/l), dok je, izuzimajući referalnu supstancu, dikamba ispoljila najslabije toksično dejstvo na većinu parametara.

Na osnovu vrednosti IC<sub>50</sub>, za većinu parametara, atrazin je pokazao najizraženije, a 2,4 D najslabije toksično dejstvo na *M. spicatum* za 7 d period ekspozicije.

Najjači efekat na *L. minor* uočen je prilikom izlaganja atrazinu i izoproturonu (sa IC<sub>50</sub> vrednostima 0.061 i 0.077 mg/l), dok vrednosti IC<sub>50</sub> za 2,4 D i dikambu za većinu parametara

(osim za Y BJ i Y BP sa 2,4 D) nije bilo moguće izračunati, jer su prevazilazile najviše primenjene koncentracije ( $IC_{50} > 10$  mg/l).

Poređenje osetljivosti *Lemna* i *Myriophyllum* testova izvršeno je na osnovu osnovnih parametara predloženih protokolima (broj jedinki u *Lemna* testovima i dužina iznad sedimenta u *Myriophyllum* testovima), na osnovu zajedničkog parametra (sveža masa) i na osnovu najosetljivijih parametara.

Prema  $IC_{50}$  vrednostima, izuzimajući osetljivost na hormonske herbicide, osetljivost test vrsta *M. aquaticum*, *M. spicatum* i *L. minor* je relativno slična (Tabela 32). Znatno veće razlike zabeležene su između *M. aquaticum* i *L. minor* u odgovoru na izlaganje auksin simulatorima. Srednje inhibitorne koncentracije su za 2,4 D kod vrste *M. aquaticum* za 6 od 7 parametara bile ispod 1 mg/l, dok je  $IC_{50}$  vrednost kod *L. minor* za dva parametra bila iznad 7 mg/l i za ostalih četiri iznad 10 mg/l. *M. spicatum* je testiran samo na 2,4 D i  $IC_{50}$  vrednosti su za sve parametre bile ispod 1 mg/l. Opseg  $IC_{50}$  vrednosti za *M. aquaticum* u testu sa dikambom je bio od 0.52 do 3.14 mg/l, dok su srednje inhibitorne koncentracije za sve parametre *L. minor* bile iznad 10 mg/l.

Ako se poredi osetljivost osnovnih parametara predloženih protokolima (stopa rasta na osnovu broja jedinki (RGR BJ) i stopa rasta na osnovu dužine iznad sedimenta (RGR DS)): *L. minor* je bila osetljivija na 3,5 DCP, izoproturon i trifluralin, dok je *M. aquaticum* najosetljivija test vrsta na 2,4 D i dikambu, a *M. spicatum* najosetljivija test vrsta na atrazin (Tabela 32).

Kada se poredi osetljivost zajedničkih parametara (prinos i stopa rasta na osnovu sveže mase Y MSv i RGR MSv), svaka od test vrsta je bila najosetljivija na po dve test supstance. Međutim, ako posmatramo samo osetljivost na supstance koje su zajedničke za testove na sve tri vrste, tačnije, osetljivost na atrazin, izoproturon i 2,4 D, vrste roda *Myriophyllum* su bile osetljivije od *L. minor*. Naime, najosetljivija vrsta na atrazin i izoproturon je vrsta *M. spicatum*, dok je na izlaganje supstance 2,4 D najosetljivija vrsta *M. aquaticum* (Tabela 32).

Ako se poredi najosetljiviji parametri *M. aquaticum* i *L. minor* testova, *M. aquaticum* je osetljiviji na četiri od šest analiziranih supstanci, i to: 3,5 DCP, trifluralin, 2,4 D i dikambu. Ako se tome dodaju i rezultati testova na *M. spicatum*, koji prema  $IC_{50}$  vrednosti ima višu osetljivost na atrazin i izoproturon i od *M. aquaticum* i od *L. minor*, ispostavlja se da su predstavnici roda *Myriophyllum* osetljiviji na svih šest analiziranih supstanci (Tabela 32).

Ipak, osetljivost *M. spicatum* testova treba uzeti sa rezervom, jer je varijabilnost parametara, pogotovo onih koji se tiču mase, bila izuzetno visoka.

Na osnovu  $IC_{50}$  vrednosti, nijedan od parametara nije bio konstantno najosetljiviji, a parametri prinosa su, generalno bili nešto osetljiviji od parametara stopa rasta.

Ako se poredi prosečne vrednosti  $IC_{50}$  iz laboratorija učesnica IRT (Ratte i Ratte, 2014), test sa *M. spicatum* je bio nešto osetljiviji od testa sa *M. aquaticum* na izoproturon i trifluralin.

Ako se poredi rezultati testova na sve pomenute test supstance, nijedna od tri test vrste ne može se smatrati najosetljivijom. Ovo je u saglasnosti sa drugim studijama u kojima je testiran veći broj vrsta i supstanci i prema kojima nijedna od testiranih vrsta nije bila najosetljivija na sve supstance, niti je zabeležen jedan najosetljiviji parametar za jednu vrstu (Arts i sar, 2008).

Kao što je i bilo očekivano, jedino je pri izlaganju auksin simulatorima bilo značajnijih odstupanja između *Lemna* i *Myriophyllum* testova, pri čemu su, na osnovu svih parametara, vrste roda *Myriophyllum* bile osjetljivije.

Podaci dobijeni ovim istraživanjem pokazuju da, kada se posmatraju najosetljiviji parametri, vrste roda *Myriophyllum* imaju sličnu međusobnu osjetljivost, ali i sličnu, ako ne i višu osjetljivost kao vrsta *Lemna minor*.

Na slici 46 (A-F) su prikazane sigmoidne krive dozne zavisnosti vrsta *M. aquaticum* i *L. minor* u testovima inhibicije rasta sa 3,5 DCP, atrazinom, izoproturonom, trifluralinom, 2,4 D i dikamba (prerađeno iz Tunić i sar, 2015). Osjetljivost dve vrste je slična na sve test supstance osim na sintetičke auksine.

Na slici 47 (a-c) prikazane su krive dozne zavisnosti zajedničkog parametra – sveže mase (RGR MSv) test vrsta *L. minor*, *M. aquaticum* i *M. spicatum* u testovima sa atrazinom, izoproturonom i 2,4 D. Za svaku supstancu navedena je i srednja inhibitorna koncentracija.

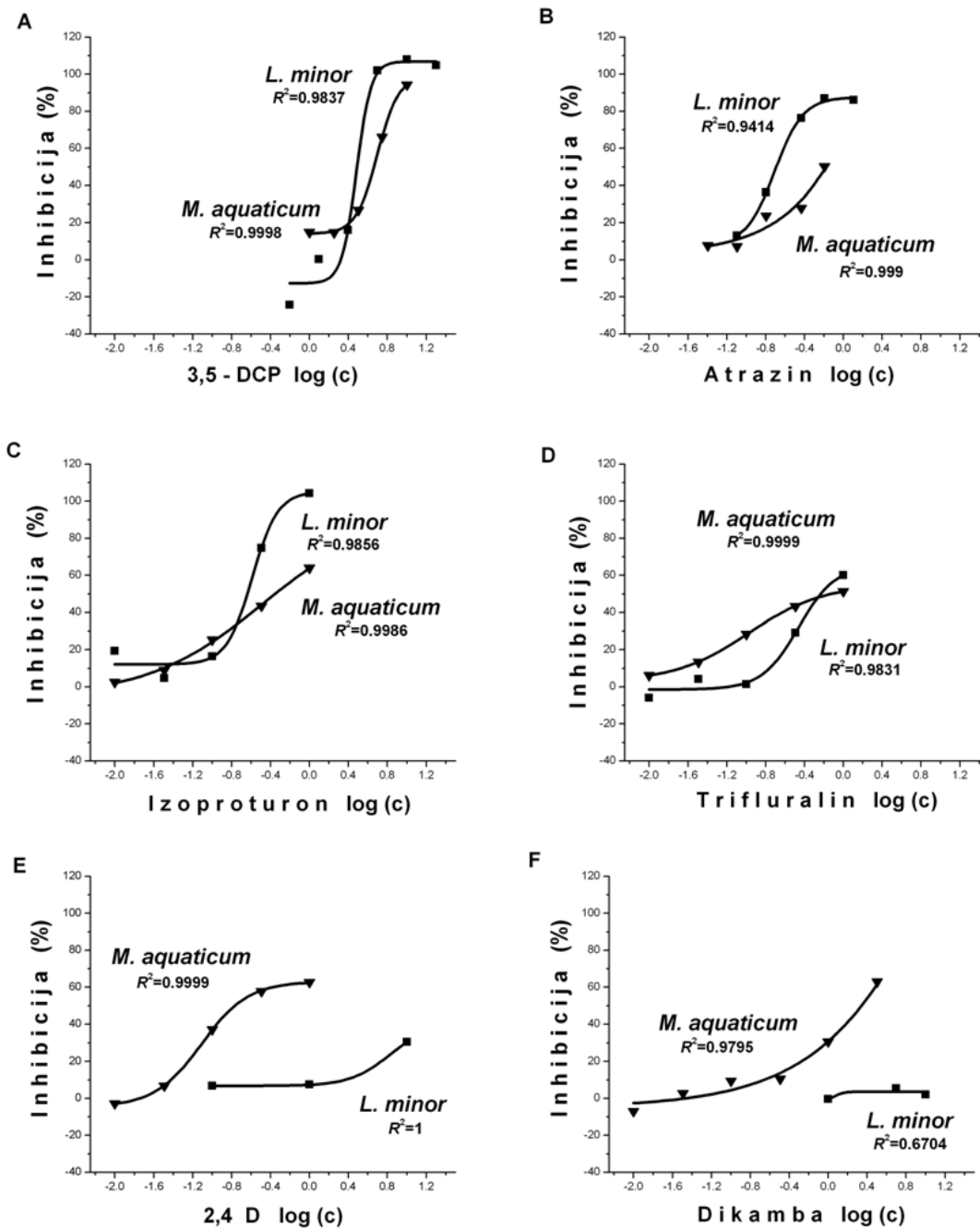
U testovima na vrsti *M. aquaticum* primećuje se pravilna dozna zavisnost pri izlaganju supstancama: 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba (slika 47 (a-c) i 38 (a-f)). Kod vrste *M. spicatum*, pravilna je dozna zavisnost pri izlaganju atrazinu, izoproturonu i 2,4 D (slika 47 (a-c) i slika 40 (a-c)). Kod vrste *L. minor*, pravilna dozna zavisnost se uočava kod svih supstanci, osim kod auksin simulatora gde je dejstvo supstanci, pogotovo supstance dikamba zanemarljivo malo.

Prema literaturnim podacima, postoji veliki broj različitih parametara koji se koriste u testovima sa akvatičnim makrofitama. Brojni autori (Belgers i sar, 2007; Maltby i sar, 2010) smatraju da je zbog različitih morfoloških osobina grupe akvatičnih makrofita, poželjno analizirati što veći broj parametara, kako bi se tačnije utvrdio uticaj supstanci i smeša. Poželjno je uključiti standardne morfološke parametre: dužina, masa, ali i druge ekološki relevantne parametre, kao što je razvoj korena. Merenje, ali i tumačenje rezultata na osnovu parametara mase i dužine je najuputnije kombinovati, jer povećanje dužine biljaka može biti uzrokovano elongacijom ćelija, što ne mora nužno oslikavati i povećanje mase (Ebke i sar, 2013; Ratte i Ratte, 2014).

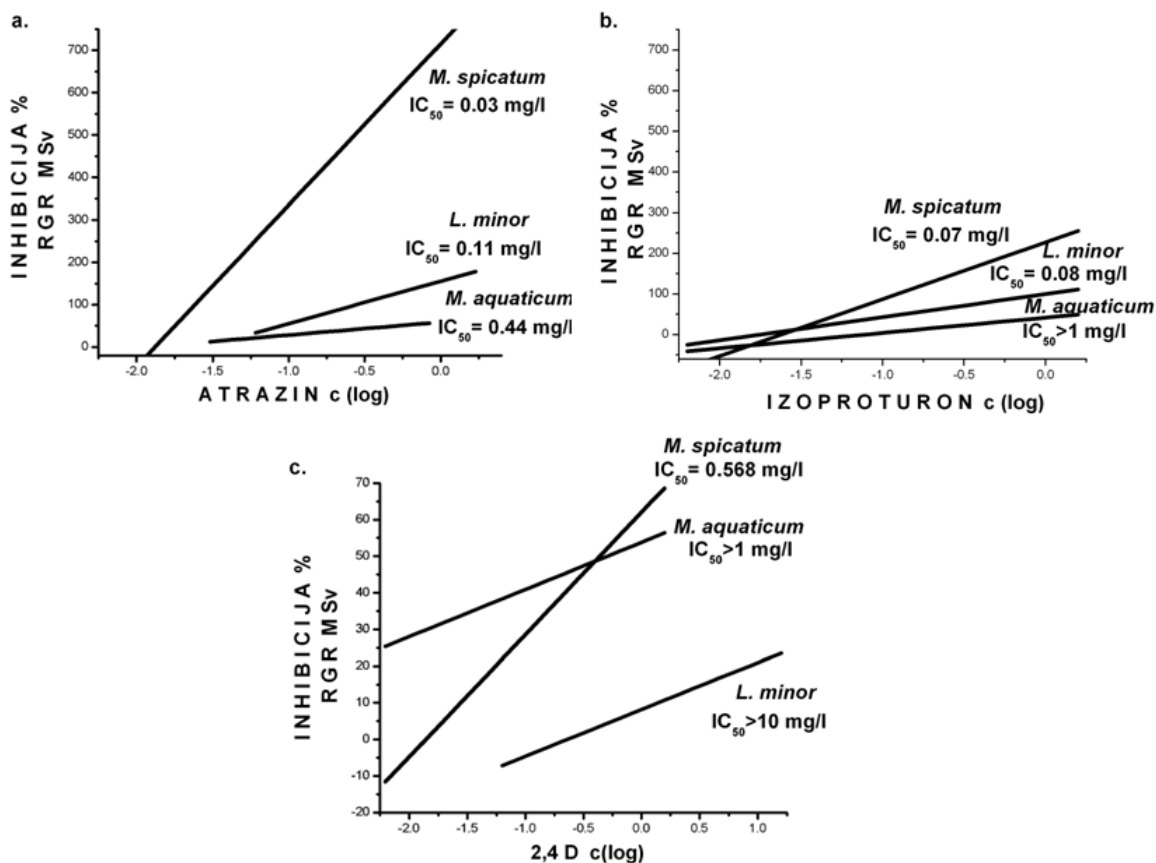
Zbog svega navedenog, izbor test vrste i parametra se pored osjetljivosti, niske varijabilnosti i ekološke relevantnosti bazira i na praktičnijim kriterijumima. Ti kriterijumi su lakoća rukovanja i održavanja kulture u laboratoriji, široka rasprostranjenost, relativno brz rast, primena vrste koja omogućuje analizu šireg spektra parametara, uključujući i vrlo osjetljive, kao što je npr. rast korena. U kompleksnijim analizama, predlaže se upotreba većeg broja vrsta (Knauer i sar, 2008; Arts i sar, 2008).

Uzimajući u obzir nejednak rast različitih biljnih vrsta, važno je test konstruisati na takav način da period izlaganja bude dovoljno dug za detekciju efekta koji testirana supstanca ili uzorak imaju na parametre rasta (Knauer i sar, 2008).





Slika 46 (A-F). Testovi inhibicije rasta *L. minor* i *M. aquaticum*. Inhibicija rasta u odnosu na kontrolu izračunata na osnovu stope rasta broja jedinki (*L. minor*) i dužine iznad sedimenta (*M. aquaticum*) nakon sedmodnevnog izlaganja 3,5-DCP, atrazinu, izoproturonu, trifluralinu, 2,4 D i dikambi. Koncentracije su log transformisane. Dozna zavisnost je prikazana sigmoidnim krivama (prerađeno iz Tunić i sar, 2015).



Slika 47 (a-c). Krive dozne zavisnosti zajedničkog parametra – sveža masa test vrsta *Lemna minor*, *Myriophyllum aquaticum*, *Myriophyllum spicatum* u testovima inhibicije rasta sa a) atrazinom b) izoproturonom i c) 2,4 D. Koncentracije su log transformisane.

U zavisnosti od potreba procene rizika, međunarodno prihvaćeni protokoli mogu se smatrati pogodnim, iako se u testovima nekad upotrebljava vrsta koja nije autohtona za dato područje (SANCOa, 2002). Neke od test vrsta koje se predlažu kao dopunske u proceni rizika se čak smatraju invazivnim u određenim regionima. Tako se vrsta drezge *M. aquaticum* poreklom iz latinske Amerike, upotrebljava kao test organizam u ekotoksikološkim testovima, ali se ujedno smatra i invazivnom vrstom za područje Evrope (Maltby i sar, 2010). Na sličan način, nešto češće upotrebljavana test vrsta *M. spicatum*, autohtona za evropski kontinent, smatra se invazivnom za područje SAD (La Rue i sar, 2012). Prema studiji iz severne Amerike postoje indikacije da hibridizacija predstavnika roda *Myriophyllum* doprinosi invazivnosti i smanjenoj osetljivosti na hemijski stres (La Rue i sar, 2012). Naime, hibridi introdukovane i invazivne vrste za područje severne Amerike *M. spicatum* i native vrste *M. sibiricum* pokazuju smanjenu osetljivost na regulator rasta 2,4 D i povećan invazivni potencijal. Potencijal invazivnosti nekih test organizama iz roda *Myriophyllum* koji se upotrebljavaju u ekotoksikološkim studijama, otvara nova pitanja o eventualnoj smanjenoj osetljivosti ovih vrsta usled osobina invazivnosti.

U daljem tekstu dat je literaturni pregled osetljivosti vrsta *L. minor*, *M. aquaticum* i *M. spicatum* u odnosu na osetljivost testova izvedenih u Laboratoriji za ekotoksikologiju na test supstance 3,5 DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba.

Osetljivost *L. minor* je prema IC<sub>50</sub> vrednostima u testu sa 3,5 DCP bila u propisanim okvirima (OECD 2005). Vrednosti IC<sub>50</sub> u *M. aquaticum* testovima su bile vrlo bliske rezultatima objavljenim u izveštaju međunarodnog testa kalibracije metode (IRT) (Ratte i Ratte, 2014) i bliske vrednostima dobijenim u vodenom sistemu bez sedimenta (Turgut, 2006). Osetljivost *M. spicatum* na 3,5-DCP u voda-sediment sistemu zabeležena u IRT (Ratte i Ratte, 2014) je slična drugim literaturnim podacima (OECD 2014; Mohr i sar, 2013). Generalno, dve *Myriophyllum* vrste pokazuju sličnu osetljivost na referalnu supstancu.

Vrednosti IC<sub>50</sub> za *L. minor* u testu sa atrazinom su u skladu sa drugim istraživanjima sa različitim vremenom ekspozicije u testovima (Kirby i Sheahan, 1994; Fairchild i sar, 1997; Fairchild i sar, 1998). Vrednosti IC<sub>50</sub> za *M. aquaticum* su za sve parametre ispod 1 mg/l, što je u skladu sa studijom Ebke i sar. (2013) u kojoj su biljke izlagane, bez prethodnog perioda adaptacije na submerzne uslove, kao i studijom u testovima različite kompleksnosti u kojoj su objavljene vrednosti za različite parametre (McGregor et al, 2008). Vrednosti IC<sub>50</sub> za *M. spicatum* su bile između 0.006 i 0.335 mg/l (ali sa visokim vrednostima koeficijenta varijacije) dok su u dostupnoj literaturi uglavnom iznad 1 mg/l (Forney i Davis 1981; Bird, 2003). Rezultati analize testova oporavka (Teodorović i sar, 2012) su ukazali na to da je vrsta *L. minor*, iako je brže reagovala na izlaganje atrazinu od *M. aquaticum*, uključivanjem faze oporavka u test, bila manje osetljiva od *M. aquaticum*, budući da je imala brz i efikasan oporavak nakon ekspozicije.

Osetljivost *L. minor* na izoproturon u ovom radu je viša od osetljivosti na osnovu prethodno objavljenih podataka (Kirby i Sheahan-a 1994; Nitschke i sar, 1999). Vrednosti IC<sub>50</sub> u *M. aquaticum* testu sa izoproturonom su bile širokog opsega, od ispod 1 do iznad 1 mg/l, kako u ovom radu, tako i u IRT (Ratte i Ratte, 2014). Vrednosti IC<sub>50</sub> za *M. spicatum* su bile ispod 1 mg/l i to između 0.058-0.273 mg/l, što je u skladu sa rezultatima izveštaja IRT: 0.052-0.315 mg/l (Ratte i Ratte, 2014). Najniže vrednosti su nešto niže od minimalnih vrednosti za *M. aquaticum* u voda-sediment sistemu, a slične vrednostima sa *M. aquaticum* testom u sistemu bez sedimenta (OECD, 2014).

Osetljivost *L. minor* na trifluralin je slična osetljivosti koja je zabeležena u drugim studijama (Fairchild i sar, 1997). Vrednosti IC<sub>50</sub> za *M. aquaticum* su, kao i za izoproturon bile širokog opsega i iznosile od ispod 1 do iznad 1 mg/l. U IRT izveštaju (Ratte i Ratte, 2014) je izuzetno mali broj validnih podataka uključen u finalnu analizu za test sa trifluralinom, ali su sve IC<sub>50</sub> vrednosti bile ispod 1 mg/l. Slične vrednosti za trifluralin su zabeležene i kod *M. spicatum* (Ratte i Ratte, 2014). Podataka o osetljivosti na trifluralin ima veoma malo, ali se na osnovu objavljenih vrednosti IC<sub>50</sub>, može smatrati da su dve *Myriophyllum* vrste slične osetljivosti.

Kao što je i bilo očekivano, *L. minor* je bila relativno neosetljiva na 2,4 D što je zaključeno na osnovu vrednosti IC<sub>50</sub> za većinu parametara koje su bile iznad 10 mg/l. Ipak, na osnovu dva parametra Y BJ i Y BP, vrednost IC<sub>50</sub> je iznosila 9.8 i 7.1 mg/l. Vrednosti IC<sub>50</sub> za 2,4 D i *M. aquaticum* su za sve parametre, osim za RGR MSv, bile ispod 1 mg/l (opseg od 0.027 do >1), što je u skladu sa prethodnim studijama (Turgut i Fomin 2002; Ebke i sar, 2013). Vrednosti

IC<sub>50</sub> za 2,4 D *M. spicatum* su bile od 0.094 do 0.66 mg/l. Slični rezultati su dobijeni i u testovima u sistemu bez sedimenta (Bird, 2003; OECD, 2014) kao i u voda-sediment sistemu (Mohr i sar, 2013) i ukazuju na uporedive vrednosti parametra osetljivosti *M. aquaticum* i *M. spicatum* na 2,4 D. U izveštaju internacionalnog testa kalibracije metode sa *M. spicatum* u jednodimenzionalnom sistemu bez sedimenta (OECD, 2014) i studiji Mohr i saradnika (2013), najosetljiviji parametar u testu izlaganja supstanci 2,4 D je bio koren.

Vrsta *L. minor* je bila neosetljiva na dikambu – maksimalna zabeležena inhibicija je bila zanemarljivo mala (oko 13%). Sve IC<sub>50</sub> vrednosti su bile iznad 10 mg/l, što je u skladu sa istraživanjem Fairchild i saradnika (1997). IC<sub>50</sub> je za *M. aquaticum* bila između 0.52 i 3.14 mg/l. Najosetljiviji parametar je bila sveža masa korena. Michel i saradnici (2004) su zabeležili IC<sub>50</sub> vrednost od 16.6 mg/l za vrstu *Lemna aquinoctialis*. Prema izveštaju organizacije EFSA, zabeleženi su i podaci IC<sub>50</sub> > 3.25 za *Lemna gibba* (EFSA, 2007) i IC<sub>50</sub> > 3.7 za *Myriophyllum verticillatum* (EFSA, 1965). Drugi podaci o efektu dikambe na ukorenjene makrofite u slobodnoj literaturi skoro da i ne postoje.

### Osetljivost test organizama na sintetičke auksine

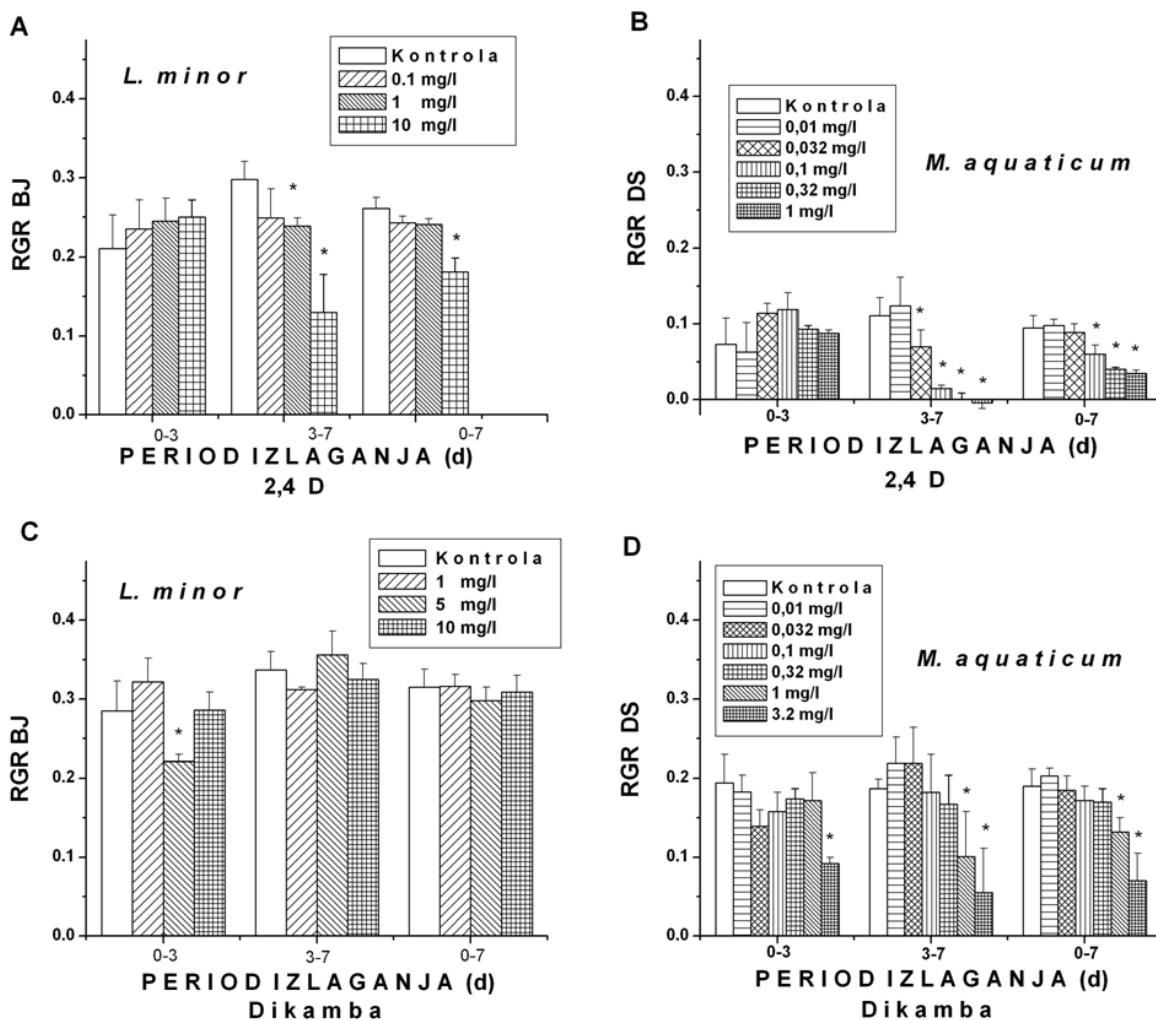
Odgovor vrsta *L. minor* i *M. aquaticum* na izlaganje auksin simulatorima prikazan je na slici 48 (A-D) (prerađeno iz Tunić i sar, 2015). Visoke koncentracije auksin simulatora nisu imale značajno dejstvo na rast *L. minor* (Slika 46 A i C), šta više, stope rasta između kontrole i tretmana nakon sedmodnevnog izlaganja dikambi ne pokazuju nikakve razlike. Rast obe vrste je bio stimulisan prilikom izlaganja 2,4 D u prvom intervalu, a tokom drugog intervala je kod obe vrste primećen značajniji efekat na rast biljaka. Obrazac odgovora dve vrste izlaganju dikambi se razlikovao: smanjenje stope rasta *M. aquaticum* u prvom intervalu, bio je praćen brzim oporavkom u tretmanima nižim koncentracijama u drugom intervalu. Statistički značajan pad vrednosti stope rasta zabeležen je u tretmanima sa dve najviše primenjene koncentracije 1 i 3.2 mg/l u drugom intervalu i tokom celog perioda ekspozicije (Slika 48 D). Od dva testirana sintetička auksina, *L. minor* je bila osetljivija na izlaganje supstanci 2,4 D.

U testovima je, prilikom izlaganju sintetičkim auksinima primećen efekat uvrtnja listova *M. aquaticum* i jedinki *L. minor* što je prethodno zabeleženo i u studiji Grossmann-a i saradnika na različitim biljkama (2001).

Na osnovu pregleda literaturnih podataka, zabeležen je mali broj podataka o osetljivosti akvatičnih makrofita na sintetičke auksine, pogotovo na dikambu.

U tabeli 33 dat je pregled vrednosti IC<sub>50</sub> za sintetičke auksine 2,4 D i dikamba u testovima sa akvatičnim biljkama. Prikazane su vrednosti najosetljivijih parametara iz pojedinačnih testova Laboratorije za ekotoksikologiju i literaturni podaci.

Uočava se da je najniža IC<sub>50</sub> vrednost za supstancu 2,4 D za predstavnike roda *Lemna* 0.58 mg/l što je oko pet puta viša vrednost od najniže zabeležene za vrste roda *Myriophyllum* (0.013 mg/l). Druge monokotiledone vrste: *Potamogeton lucens*, *P. crispus* i *Elodea nuttallii* (Belgers i sar, 2007) su prema IC<sub>50</sub> vrednostima osetljivije na izlaganje 2,4 D od većine *Lemna* vrsta.



Slika 48 (A-D). Odgovor vrsta *L. minor* i *M. aquaticum* na auksin simulators. Prikazane su srednje vrednosti stope rasta sa standardnom devijacijom na osnovu broja jedinki (*L. minor*) i dužine iznad sedimenta (*M. aquaticum*) u intervalima 0-3 d, 3-7 d i 0-7 d za ceo period izlaganja 2,4 D (A i C) i dikambi (B i D). \* statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, *t*-test sa Bonferonijevim adaptacijama,  $p \leq 0.05$ ), (pređeno iz Tunić i sar, 2015).

Najniža  $IC_{50}$  vrednost za dikambu za najosetljiviji parametar je zabeležena u testu sa *M. aquaticum*, što je preko 6 puta niže od najniže vrednosti u *Lemna* testu ( $IC_{50} > 3.25$ ).

Sintetički auksini se ne smatraju veoma toksičnim supstancama za neciljne akvatične vrste i ekosisteme i smatra se da je rizik od njihove primene prihvatljiv. Međutim, ovakav stav proističe iz činjenica da se ekološka procena rizika oslanja na rezultate dobijene ekotoksikološkim testovima sa vrstama roda *Lemna* koje, kao monokotiledone makrofite specifičnih bioloških i ekoloških karakteristika, nisu posebno osetljive na herbicide iz ove grupe.

Supstance 2,4 D i dikamba su svrstane u štetne supstance za vodene organizme koje mogu izazvati dugotrajne štetne efekte u vodenoj životnoj sredini (Sl. glasnik RS, 59/10, 25/11 i 5/12; Sl. glasnik RS, 105/13).

Tabela 33: Pregled srednjih inhibitornih koncentracija (IC<sub>50</sub>) za 2,4 D i dikambu u testovima sa akvatičnim biljkama

2,4 D				
Naziv vrste	Parametar	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<i>Myriophyllum sibiricum</i>	dužina korena	14 d	0.013	Roshon et al, 1996
<b><i>Myriophyllum aquaticum</i></b>	<b>Y MSu</b>	<b>7 d</b>	<b>0.027</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Ranunculus aquatilis</i>	dužina korena	28 d	0.092	Belgers i sar, 2007
<b><i>Myriophyllum spicatum</i></b>	<b>Y DS</b>	<b>7 d</b>	<b>0.094</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Ranunculus circinatus</i>	dužina korena	28 d	0.1	Belgers i sar, 2007
<i>Ranunculus peltatus</i>	dužina izdanka	28 d	0.14	Belgers i sar, 2007
<i>Potamogeton lucens</i>	dužina korena	28 d	0.18	Belgers i sar, 2007
<i>Potamogeton crispus</i>	dužina korena	28 d	0.29	Belgers i sar, 2007
<i>Elodea nuttallii</i>	dužina korena	28 d	0.57	Belgers i sar, 2007
<i>Lemna gibba</i>	populacija	14 d	0.58	EC, 2001
<i>Lemna aequinoctialis</i>	RGR populacije	7 d	2.21	Michel i sar, 2004
<b><i>Lemna minor</i></b>	<b>Y BP</b>	<b>7 d</b>	<b>7.08</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Lemna trisulca</i>	MSu, biomasa, RGR	28 d	>3	Belgers i sar, 2007
DIKAMBA				
Naziv vrste	Parametar	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<b><i>Myriophyllum aquaticum</i></b>	<b>MK</b>	<b>7 d</b>	<b>0.52</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Lemna gibba</i>	populacija, abundanca	14 d	>3.25	EFSA, 2007
<i>Myriophyllum verticillatum</i>	biomasa	14 d	>3.7	EFSA, 1965
<i>Lemna aequinoctialis</i>	RGR populacije	7 d	16.58	Michel i sar, 2004
<b><i>Lemna minor</i></b>	<b>svi parametri</b>	<b>7 d</b>	<b>&gt;10</b>	<b>LECOTOX</b>

Turgut (2007) procenjuje da predviđene koncentracije 2,4 D i dikambe u vodenoj životnoj sredini (PEC vrednosti – eng. *predicted environmental concentration*) iznose 0.33 i 0.12 mg/l.

Crane i saradnici (2007) su predložili nove vrednosti standarda kvaliteta za 2,4 D kiselinu. Maksimalnu prosečnu godišnju koncentraciju za akutnu toksičnost (PNEC<sub>ST</sub> – *short term predicted no effect concentration*) su odredili na osnovu podataka iz deset taksonomskih grupa (na vrstama algi, vodozemaca, glista, mahovina, rakova, riba, insekata, makrofita, mekušaca i rotifera). Maksimalnu prosečnu godišnju koncentraciju za hroničnu toksičnost (PNEC<sub>LT</sub> – *long term predicted no effect concentration*) su odredili na osnovu podataka o vrstama manjeg broja grupa organizama (vrstama algi, račića, riba, makrofita i rotifera).

Nove PNEC<sub>ST</sub> PNEC<sub>LT</sub> vrednosti koje su Crane i saradnici (2007) predložili su 1.3 i 0.3 µg/l za akutnu i hroničnu toksičnost u odnosu na ranije vrednosti 200 i 40 µg/l.

Vrednost PNEC<sub>ST</sub> je izračunata na osnovu najniže EC<sub>50</sub> vrednosti (14 d) za najosetljiviju vrstu – u ovom slučaju *M. sibiricum* – koja iznosi 13 µg/l i faktor sigurnosti 10 (prema pravilima za izračunavanje standarda kvaliteta za vodu faktor sigurnosti je 10, jer su pouzdane EC<sub>50</sub> vrednosti dostupne za alge, beskičmenjake i ribe).

Vrednost PNEC<sub>LT</sub> je izračunata na osnovu najniže NOEC vrednosti (14 d) za najosetljiviju vrstu – u ovom slučaju *M. sibiricum* – koja iznosi 3.3 µg/l i faktor sigurnosti 10.

Prethodno su za 2,4 D standardi kvaliteta bili određeni na osnovu podataka o toksičnosti na dafnijama i faktor sigurnosti kojim je uzeto u obzir da su fotosintetski organizmi osetljiviji na herbicid 2,4 D od dafnija.

U pomenutom izveštaju (Crane i sar, 2007) navodi se da određivanje standarda kvaliteta za sediment nije neophodno jer supstanca 2,4 D ostaje u vodenom stubu zbog umereno brzog

razlaganja i malog potencijala adsorpcije na sediment (vrednost particionog koeficijenta je  $\log K_{oc}$  su 0.7-2.3 i vrednost podeonog koeficijenta oktanol/voda je  $\log K_{ow} < 3$ ). Takođe, navedeno je da podaci o testovima toksičnosti sa 2,4 D na organizmima dna ne postoje.

Iskustva pokazuju da izbor parametra može da utiče na osetljivost vrste, pogotovo u slučaju supstanci sa specifičnim mehanizmom dejstva. Stoga izbor vrste, kao i izbor parametra, mogu igrati značajnu ulogu i u proceni rizika kojom se nastoji zaštititi najveći broj vrsta i funkcionisanje ekosistema kao celine. U tom smislu, uputno je daljim ispitivanjima utvrditi da li je stvarni rizik od grupe sintetičkih auksina potcenjen.

### Model distribucije osetljivosti vrsta

Model distribucije osetljivosti vrsta (SSD) se često koristi u naučnim istraživanjima (Newman i sar, 2000, Wheeler i sar, 2002, von der Ohe i Liess, 2004 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2014), a poslednjih godina se koristi i u proceni rizika od pesticida (Lepper, 2002).

Za konstrukciju SSD preporučuju se parametri stope rasta i to na bazi najosetljivijeg parametra (Maltby i sar, 2010; EFSA, 2013) uključujući i nestandardne parametre koji se tiču i razvoja korena.

Generalno se ne preporučuje da broj podataka za model SSD bude manji od 5 (<http://www.epa.gov> – cit. van Leeuwen 1990). Prema preporuci EFSA (2013) za generisanje SSD za akvatične makrofite, najmanji broj podataka odnosno vrsta koje treba obuhvatiti je 8.

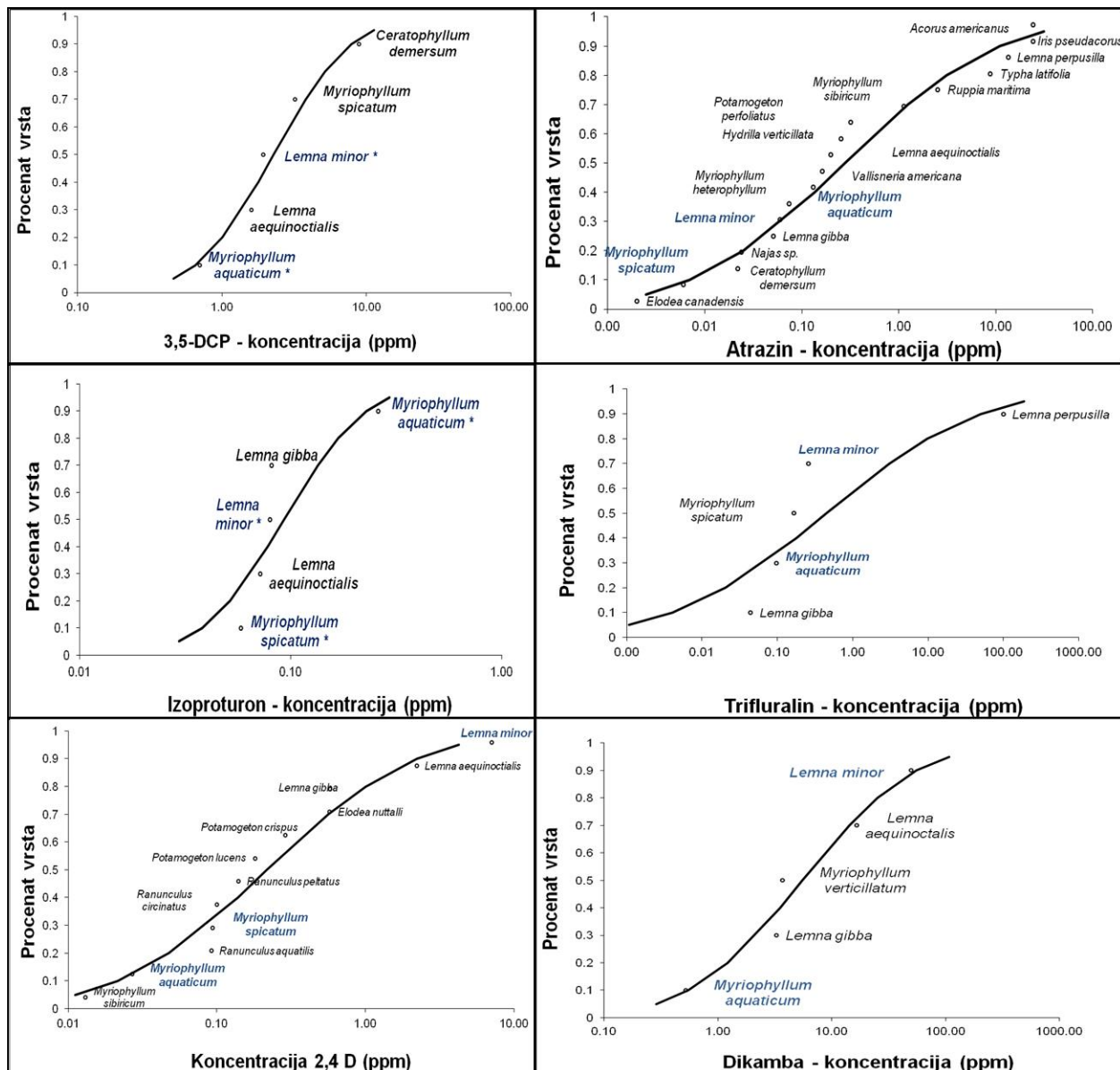
Na slici 49 prikazane su distribucije osetljivosti vrsta akvatičnih biljaka na toksično dejstvo 3,5 DCP i odabranih herbicida atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Plavom bojom su označeni rezultati dobijeni u Laboratoriji za ekotoksikologiju (PMF UNS), dok su ostale vrednosti sakupljene iz dostupne literature.

Pregledom literaturnih podataka, uočeno je da su ekotoksikološki podaci neophodni za primenu modela SSD dostupni za mali broj vrsta iz grupe akvatični makrofita i da je praktično samo za dve supstance (atrazin i 2,4 D), od šest ispitivanih, bio dostupan preporučeni minimalan broj podataka (8 vrsta) za pouzdanu analizu distribucije osetljivosti vrsta. Softver za generisanje SSD (<http://www.epa.gov>), omogućuje konstruisanje SSD za minimalno 5 tačaka, što je i bio slučaj za ostale supstance: 3,5 DCP, izoproturon, trifluralin i dikambu.

Za distribuciju osetljivosti vrsta prikazanih na slici 48, upotrebljene su vrednosti i prinosa i stope rasta parametara, jer bi upotrebom samo vrednosti stope rasta, broj podataka bio smanjen. Vrednosti  $IC_{50}$  upotrebljene za konstrukciju sigmoidnih krivih prikazane su tabelarno u prilogu (Tabela P7).

Uključivanje neodređenih vrednosti u SSD model, kao što su npr.  $IC_{50}$  vrednosti iznad najviše primenjene koncentracije u testu, nije praksa prilikom konstrukcije SSD (Giddings i sar, 2012; EFSA 2013), ali je u ovom radu u tome načinjen izuzetak za supstancu dikamba, te je podatak  $IC_{50} > 10$  mg/l uključen u model. Prema EFSA (2013), ovakvi podaci mogu biti uključeni u SSD, ali to mora biti opravdano. Naime, ovakvi podaci se smeju koristiti u situacijama kada su neodređene vrednosti ( $IC_{50} < ili > x$ ) za neku vrstu izvan opsega već zabeleženih vrednosti za tu vrstu ili kada su izvan opsega u odnosu na  $IC_{50}$  vrednosti ostalih vrsta.

Vrste roda *Myriophyllum* su bile među prve dve najosetljivije vrste za svih 6 testiranih supstanci. Rangovi  $IC_{50}$  vrednosti upotrebljenih u SSD su: za 3,5 DCP (0.7-8.9 mg/l), za atrazin (0.002-24.3 mg/l), za izoproturon (0.058-0.26 mg/l), za trifluralin (0.044-100 mg/l), za 2,4 D (0.013-7.08 mg/l), za dikambu (0.52->10 mg/l).



Slika 49. Distribucije osetljivosti vrsta (SSD) akvatičnih biljaka na toksično dejstvo odabranih supstanci: 3,5-DCP, atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Prema softveru za generisanje SSD (<http://www.epa.gov>) vrednostima  $IC_{50}$  su dodeljeni rangovi, vrednosti rangova su transformisane u probit vrednosti.

Najniže vrednosti  $IC_{50}$  pronađene u literaturi za testove na vrstama algi (96 h) za iste supstance redom iznose: 0.89; 0.021; 0.05; 0.12; 0.042; 0.036 mg/l (Kirby i Sheahan, 1994; Comber i sar, 1995; Fairchild i sar, 1997; Ma i sar, 2001; CIS, 2005). Svi testovi se odnose na



vrstu *Pseudokirchneriella subcapitata*, osim testa sa izoproturonom koji se odnosi na vrstu *Chlorella fusca* var. *vacuolata*.

Giddings i saradnici (2012) su poredili dostupne podatke o osetljivosti vodenih makrofita (6 do 15 vrsta po supstanci), na osnovu najosetljivijeg parametra. *Lemna* vrste su bile osetljivije od *Myriophyllum* vrsta na 9 od 13 pesticida od kojih su većina bili herbicidi i nekoliko fungicida. Isti autori su u SSD analizu herbicida i fungicida uključili i alge i zaključili da je za većinu supstanci – najosetljivija vrsta algi bila osetljivija od najosetljivije akvatične biljke. Isti obrazac je primećen i ako se posmatraju IC<sub>50</sub> vrednosti upotrebljene za SSD u ovom radu, za testove sa izoproturonom, trifluralinom i dikambom, ali nije primećen u SSD za 3,5 DCP, atrazin i 2,4 D. Najosetljiviji parametri u testovima sa *Lemna gibba* i algama u studiji Giddings i saradnika, za 12 od 14 pesticida su imali srednje inhibitorne koncentracije bliske koncentracijama koje odgovaraju petom procentu iz SSD modela.

Rezultati pokazuju da su hazardne koncentracije za 5% najosetljivijih vrsta (HC<sub>5</sub>) na osnovu distribucije osetljivosti vrsta su vrlo niske i iznose: za 3,5 DCP 3.61 µg/l; za atrazin 0.0000014 µg/l; za izoproturon 0.9 µg/l; za trifluralin 0.00000001 µg/l; za 2,4 D 0.0013 µg/l; za dikambu 0.035 µg/l (ppb).

Giddings i saradnici (2012) su za fotosintetske inhibitore dobili sledeće HC<sub>5</sub> vrednosti: 1.8; 2.5; 2.9; 4.1; 10 µg/l, što je iznad vrednosti koje su dobijene za atrazin i izoproturon u ovom radu. Za herbicid koji je inhibitor ćelijske deobe, HC<sub>5</sub> je bila 4.8 µg/l, za auksin simulatore vrednost HC<sub>5</sub> je bila 7.7 µg/l (Giddings i sar, 2012), što je znatno iznad HC<sub>5</sub> izračunatih prema dostupnim podacima za trifluralin, 2,4 D i dikambu. Giddings i saradnici (2012) nisu objavili na koje se konkretno pesticide odnose rezultati, opisali su ih samo opštim mehanizmom toksičnog dejstva, jer nisu koristili otvorene literaturne izvore, nego poverljiva istraživanja koja sprovode proizvođači pesticida za potrebe registracije. Zbog toga nije moguće direktno poređenje naših rezultata sa rezultatima pomenutih autora, poređenje ipak treba uzeti sa rezervom.

Giddings i saradnici (2012) su zaključili da je uslov od minimalno 8 relevantnih podataka za konstruisanje SSD primenjiv samo za vrlo ograničen broj pesticida. Čak i kad su traženi minimalni broj vrsta smanjili na 6, i kad su upotrebili i podatke koji se tiču i prinosa i stope rasta, uspeali su da konstruišu SSD samo za 13 supstanci (većinom herbicide i nekoliko fungicida). Jedan od razloga za nedostatak podataka je taj što se pouzdanim podacima smatraju samo oni koji potiču iz GLP laboratorija (Laboratorija sa dobrom laboratorijskom praksom eng. *GLP – Good Laboratory Practices*), a većina tih laboratorija izvodi testove samo na ograničenom broju vrsta koje se koriste u standardnim testovima za potrebe registracije pesticida.

Isti autori (2012) su zaključili da su *Lemna* vrste osetljivije od *Myriophyllum* vrsta na 9 od 13 pesticida (od kojih su većina bili herbicidi, a ostali fungicidi). Za pesticide za koje *Lemna* vrste nisu bile najosetljivije (4 supstance), *M. spicatum* je bio osetljiviji od ostalih vrsta roda *Myriophyllum*. Na osnovu zaključaka tog rada, EFSA (2013) je predložila *M. spicatum* kao dodatnu dikotiledonu vrstu u višim nivoima procene rizika od pesticida. Ova preporuka je bila malo preuranjena, budući da je količina podataka korišćena za konstrukciju SSD u pomenutom radu bila relativno ograničena, a to je jedina studija na koju se EFSA (2013) oslonila prilikom preporuke o izboru alternativne vrste makrofita za više nivoe ERA za herbicide i regulatore rasta.

Primena SSD modela predstavlja napredak u proceni rizika, jer je prednost modela u tome su što se za karakterizaciju rizika ne uzima jedna vrednost (kao što je npr. IC<sub>50</sub> vrednost najosetljivijeg parametra najosetljivije testirane vrste), nego model pruža uvid u opseg

osetljivosti različitih vrsta na isti ksenobiotik, čime se za različite koncentracije ksenobiotika u životnoj sredini definiše procenat vrsta koje mogu biti pogođene negativnim dejstvom datog ksenobiotika (EFSA, 2013). Na osnovu hazardnih koncentracija za određeni procenat najosetljivijih vrsta dobijenih SSD modelom mogu se odrediti PNEC ili RAC vrednosti, odnosno, granične bezbedne koncentracije supstanci (EFSA, 2013; ECETOC, 2014), što doprinosi realnijoj ekološkoj proceni rizika. Nedostaci SSD modela su, prema Teodorović i Kaišarević (2014) sledeći:

- laboratorijski izvedene vrednosti L(E)C<sub>50</sub> i NOEC ne mogu precizno predvideti efekte ksenobiotika na nivou prirodnih populacija;
- većina ovih vrednosti dobijena je za standardne laboratorijske test vrste, što ne mora uvek da bude relevantno kod predviđanja efekta na prirodne životne zajednice;
- postoji mali broj pouzdanih podataka za vrste koje ne spadaju u standardne test organizme;
- SSD model podrazumeva da će, u slučaju da koncentracije ksenobiotika u životnoj sredini dostignu HC<sub>p</sub> vrednost, određeni procenat (p%) vrsta ipak biti ugrožen.

Činjenica da se SSD modelovanje bazira na standardnim laboratorijskim testovima, koji ne uzimaju u obzir oporavak individua / populacija umanjuje prediktivnu moć modela i ugrožava ekosistemsku relevantnost, jer ne omogućava procenu odloženog ili subletalnog dejstva ksenobiotika, posebno na višim nivoima biološke organizacije (EFSA, 2013).

Ipak, regulatorno prihvatljive koncentracije (RAC) koje se mogu izvesti iz SSD se oslanjaju na isti koncept kao i vrednosti RAC koje se dobijaju u nižim nivoima procene rizika – neprihvatljivog rizika ne sme biti. Ovo znači da i vrednosti RAC koje se dobijaju na osnovu HC<sub>5</sub> vrednosti iz SSD i odgovarajućeg faktora (eng. *assessment factor AF*), takođe moraju osigurati zaštitu svih, a ne samo 95% vrsta (EFSA, 2013). Hazardne koncentracije za 1 i 5% vrsta (HC<sub>1</sub> i HC<sub>5</sub>) iz SSD modela koncentracija poređene sa NOEC vrednostima najosetljivijih odgovora iz 32 mezokosmos studija, potvrdile su da su za većinu pesticida HC<sub>1</sub> vrednosti bile niže od NOEC vrednosti. tj. da granične vrednosti izvedene iz SSD modela mogu da zaštite relevantne vrste, ako se uporede sa graničnim vrednostima izvedenim iz rezultata složenijih testova (npr. mezokosmos studijama) sa većim brojem vrsta (ECETOC, 2014).

Izbor vrsta i parametara u SSD za akvatične makrofite zahteva posebnu pažnju. Predloženi su različiti tipovi podataka iz testova toksičnosti na akvatičnim makrofitama za upotrebu u SSD modelu (Maltby i sar, 2010; Giddings i sar, 2012; ECETOC, 2014). Generalno, aspekti na koje treba obratiti pažnju i problemi na koje se nailazi prilikom izbora vrsta i parametara su brojniji kod akvatičnih biljaka, u odnosu na probleme prilikom izbora vrsta i odgovora algalnih testova, jer je broj podataka o algalnim testovima trenutno mnogo veći, jer su i standardi za njih razvijeni u ranijem periodu, a raspon različitih odgovora je manji.

Smatra se da se za određeni broj herbicida (npr. fotosintetske inhibitore) može upotrebiti zajednički SSD za alge i makrofite (Van den Brink i sar 2006; Giddings i sar, 2012), što pak, nije

preporučljivo za herbicide koji su toksičniji za više biljke, kao što su inhibitori sinteze aminokiselina i auksin simulatori. Organizacija EFSA (2013), takođe, navodi da su saznanja o mehanizmu toksičnog dejstva određenog broja drugih herbicida previše ograničeni da bi se mogle nagađati preporuke o zajedničkoj ili odvojenoj upotrebi algi i viših biljaka u SSD modelu.

Maltby i saradnici (2010) navode da je za konstrukciju SSD poželjno koristiti niz morfološki i taksonomski različitih makrofita, osim ako je mehanizam toksičnog dejstva supstance takav da utiče na određenu grupu makrofita (npr. monokotiledone, dikotiledone, flotantne, ukorenjene vrste). Preporučuje se upotreba parametara koji su uporedivi i koji potiču iz sličnih testova približno istog trajanja, sistema, načina ekpozicije, a preferiraju se testovi koji su izvedeni prema standardizovanim protokolima.

U testovima sa akvatičnim makrofitama, posmatra se veliki broj i širok raspon različitih parametara. Konzervativni pristup SSD modelovanju bi podrazumevao upotrebu najosetljivijeg parametra (koji ima najnižu  $IC_{50}$  vrednost) za određenu vrstu. To bi ujedno bio i pristup za procenu prema "najlošijem scenariju" (Giddings i sar, 2012). Ipak, da bi se izbegla prevelika varijabilnost u modelu SSD, za makrofite se preporučuje korišćenje stope rasta (i to na osnovu dužine ili mase). Pojedini istraživači navode razloge zbog kojih je uputnije koristiti parametre stope rasta, nego prinosa za alge i makrofite (Bergtold i Dohmen 2011 – cit. EFSA, 2013), te se njihova upotreba preporučuje kad god je to moguće. Sa statističke tačke gledišta, najbolje bi bilo da se SSD bazira na zajedničkom parametru, jer svaki parametar može imati drugačiju distribuciju, ali to je u praksi vrlo teško izvodljivo.

Podaci koji se tiču toksičnosti supstanci na druge vodene biljke osim na *Lemna* vrste su vrlo dragoceni u generisanju SSD. Zbog toga Uredba 1107/2009 Evropskog parlamenta i Saveta o stavljanju u promet proizvoda za zaštitu bilja ((EC) No 1107/2009) dozvoljava u višim stepenima procene rizika od pesticida literaturne podatke koji nisu dobijeni praćenjem regulatornih ciljeva u proceni rizika, ali i ti podaci moraju zadovoljiti određene kriterijume pouzdanosti (EFSA, 2013).

Iako danas osim standardnog *Lemna* testa postoji standardna metoda samo za još jednu vrstu akvatičnih makrofita – *M. spicatum* (OECD 239, 2014), podaci o osetljivosti drugih makrofita, uključujući i *M. aquaticum* mogu biti značajni za pravilnu upotrebu SSD modela, kao i određivanja regulatorno prihvatljivih koncentracija herbicida i regulatora rasta.

Prema Okvirnoj direktivi EU o vodama (2000/60/EC) sa kojom je u određenoj meri harmonizovan i Zakon o vodama Republike Srbije (Sl. glasnik RS, 30/10), akvatične makrofite predstavljaju jedan od bioloških elemenata kvaliteta pri oceni ekološkog statusa vodenih ekosistema i pri proceni rizika od nepostizanja dobrog ekološkog statusa. Toksikološka osetljivost makrofita se razmatra, ravnopravno sa rezultatima testova na algama, beskičmenjacima i ribama, pri određivanju standarda kvaliteta (EQS eng. *environmental quality standards*) za prioritetne polutante koji se postavljaju za vodu, sediment i biotu. Radnom verzijom vodiča za postavljanje EQS (CIS, 2012) preporučeno je korišćenje modela distribucije osetljivosti vrsta (SSD) koji se koristi za određivanje granične bezbedne koncentracije supstance.

Za određivanje standarda kvaliteta za površinske vode na osnovu SSD, preporučuju se NOEC vrednosti iz testova hronične toksičnosti i L(E) $C_{50}$  vrednosti iz testova akutne toksičnosti za vrste iz različitih taksonomskih grupa (Lepper, 2002). Distribucije osetljivosti vrsta na bazi NOEC vrednosti služe za izračunavanje srednjih godišnjih koncentracija za dugoročne efekte (AA-EQS), dok SSD na bazi L(E) $C_{50}$  vrednosti služe za izračunavanje maksimalnih dozvoljenih koncentracija (MAC-EQS). Pouzdanom se smatra procena na osnovu SSD modela koja obuhvata

više od 15 (poželjno), a minimalno deset NOEC vrednosti za različite vrste, iz minimalno osam taksonomskih grupa. Odstupanja su dozvoljena, samo uz argumentovana obrazloženja. Grupe organizama koje se obuhvataju SSD analizom su ribe (pastrmka, sunčanica i druge), rakovi (kladocere, kopepode, ostrakode, izopode, amfipode), insekti (vodeni cvetovi, vilini konjici, mušice, komarci, insekti reda Plecoptera i Trioptera), gliste, mekušci, alge, više biljke i druge.

Pored EQS za vodu, započet je razvoj metode za upotrebu SSD modela za određivanje standarda kvaliteta sedimenta (Lepper, 2002), ali metod najčešće mora biti modifikovan zbog male količine ekotoksikoloških podataka za organizme čija je životna aktivnost vezana za sediment. Za standard kvaliteta sedimenta baziran na SSD modelu se mogu upotrebiti podaci o akvatičnim vrstama i koeficijentu distribucije (ili podeonog koeficijenta zemljište/voda – Kd (l/kg)).

Poslednjih godina se upotrebljavaju i fSSD (field-based species distribution) i CSD (community sensitivity distribution) koji dodatno podižu nivo ekološkog realiteta modela distribucije osetljivosti različitih vrsta (ECETOC, 2014) i ispituje se i mogućnost upotrebe SSD modela u klasifikaciji vodenih ekosistema (Lepper, 2002).

### **5.2.3. Prednosti i mane upotrebe vrsta roda *Myriophyllum* u ekološkoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta**

Jedan od zadataka teze je evaluacija praktičnosti, pouzdanosti i statističke snage testa na vrstama roda *Myriophyllum* u voda-sediment sistemu i primenljivost u proceni rizika na herbicide i regulatore rasta.

Prilikom izbora test organizma za ekotoksikološke testove, određene osobine organizama se smatraju povoljnim: relativna osetljivost, reprezentativnost u lancima ishrane široko rasprostranjenje (relevantnost podataka), veliki reproduktivni potencijal, jednostavnost uzgoja u laboratorijskim uslovima, niska varijabilnost vrste i parametara rasta (Arts i sar, 2008).

Vrste *M. aquaticum* i *M. spicatum* su ukorenjene vodene biljke iz grupe drezga i karakteriše ih brz rast što ih čini pogodnom za održavanje u laboratorijskim uslovima.

Test metoda ima visoku ekološku relevantnost, jer podrazumeva kompleksan dvokomponentni sistem (sa dva medijuma - voda i sediment) i takav sistem najrealnije oslikava uslove u akvatičnoj sredini. Takođe, ovakva metoda otvara i više mogućnosti testiranja, jer se biljke mogu izlagati kako supstancama rastvorenim u vodenom stubu, tako supstancama dodatim direktno u sediment i time se omogućuje praćenje efekta polutanata iz vodene faze, kao i sedimenta. Smatra se da dodatak sedimenta u test sistem povećava realitet testa (zbog uzimanja u obzir procesa koji su u vezi sa sedimentom (adsorpcija na i desorpcija sa čestica sedimenta, biodostupnost itd). Knauer i saradnici (2008) navode da je najadekvatniji model onaj koji može da se modifikuje u zavisnosti od samih osobina hemikalija koje se testiraju i relevantnih puteva izlaganja preko vode ili sedimenta, što je upravo i slučaj sa testom u sistemu voda-sediment

Postavkom testa u sistemu voda-sediment, omogućeno je praćenje i nedestruktivnog parametra – dužina biljke iznad sedimenta u intervalima, a ne samo određivanje morfoloških parametara na početku i kraju testa, kao što je slučaj u nekim drugim test sistemima.

Prema prosečnim vrednostima za RGR DS i RGR MSv vrste *M. aquaticum* zadovoljen je kriterijum validnosti metode u voda-sediment sistemu ( $RGR \geq 0.099$ ). Rast biljaka nije bio zadovoljavajući u nekoliko individualnih testova za pojedine parametre, ali se ti slučajevi smatraju izuzecima. Intralaboratorijska varijabilnost parametara rasta u kontroli je prihvatljiva u većini slučajeva, statistička snaga testa je visoka i test je obezbedio ponovljive podatke.

Prosečne vrednosti parametara rasta *M. spicatum* su za DS bile iznad 0.099, dok su i prosečne, kao i sve individualne vrednosti za MSv bile daleko ispod 0.099.

Međutim, zaključak u izveštaju o internacionalnom testu kalibracije metode (Ratte i Ratte, 2014) je bio da, iako je test sa *M. aquaticum* izvodljiv u praksi, postavka testa (3 dana adaptacije praćeno 7-dnevnom fazom ekspozicije) nije adekvatna, jer ne obezbeđuje potrebno i dovoljno vreme za rast i dupliranje dužine i mase biljaka. Sa druge strane, predloženi protokol za testove sa vrstom *M. spicatum* podrazumeva duže ukupno trajanje testa ukupno 14 dana, koji je u okviru IRT bio odgovarajuć i dovoljan za dupliranje vrednosti parametara rasta, sa malim vrednostima koeficijenta varijacije i MSD%.

Međutim, količina podataka upotrebljena za evaluaciju *M. aquaticum* testova je bila znatno manja od količine podataka dostupnih za *M. spicatum* testove. Samo 50% od ukupnih rezultata testova na *M. aquaticum* je zadovoljilo preliminarni kriterijum validnosti, za razliku od 86% rezultata za *M. spicatum*. Primenom strožijeg kriterijuma, još je manje podataka smatrano validnim 42% (u odnosu na 71% podataka za *M. spicatum*). Veći broj istraživača koji je učestvovalo u IRT je imao poteškoća dostizanjem zadovoljavajuće stope rasta *M. aquaticum* nego sa *M. spicatum*.

Na osnovu iskustva u radu sa dve vrste roda *Myriophyllum* – pojedine karakteristike vrste *M. aquaticum* imaju prednost u odnosu na osobine vrste *M. spicatum*.

Vrednostima parametara rasta i pokazatelja stabilnosti testa u *M. aquaticum* testovima zadovoljen je kriterijum validnosti testa – zadovoljavajuć rast i vreme dupliranja (prinos i stopa rasta u sedmodnevnom periodu), niska varijabilnost parametara i visoka statistička snaga testa MSD% na osnovu pojedinih parametara svedoče o stabilnosti testa. Pored navedenog, vrsta *M. aquaticum* je izuzetno laka za uzgajanje i rukovanje tokom izvođenja testova.

Poređenjem IC<sub>50</sub> vrednosti dve *Myriophyllum* vrste, *M. spicatum* je imala niže vrednosti srednjih inhibitornih koncentracija za pojedine supstance, ali se one, zbog previsoke varijabilnosti parametara rasta i visokih vrednosti pokazatelja statističke snage testa (MSD%), moraju uzeti sa rezervom.

Pojedini autori dovode u pitanje reprezentativnost i osetljivost vrste *M. aquaticum*, jer je reč o emerznoj vrsti koja je, iako većim delom potopljena u vodi, gornji delom izdanka iznad vode, što podrazumeva i pojavu različitog tipa listova u različitim medijumima. Budući da se ova vrsta uspešno uzgaja na sedimentu iznad kojeg nema vodene faze, delovi biljaka koji se upotrebljavaju u testovima sa vodenom fazom moraju proći period adaptacije na submerzne uslove. Postoji zabrinutost da period adaptacije od tri dana, predviđen test metodom nije dovoljan za prilagođavanje listova i stabljike na submerzne uslove. Primećeno je da dužina perioda adaptacije *M. aquaticum* znatno utiče na osetljivost vrste. Ebke i saradnici (2013) su utvrdili da se povećanjem dužine perioda adaptacije, vrednosti IC<sub>50</sub> smanjuju, odnosno, da se osetljivost bazirana na ovom parametru povećava. Nedostatak upotrebe *M. aquaticum* u testovima namenjenim ERA može biti i tumačenje rezultata testova na osnovu dužinskih

parametara. Naime, odgovor emerzne biljke na submerzne uslove može rezultirati prekomernim izduživanjem izdanaka i stabljike u novim uslovima sredine, što može dovesti do pogrešnog tumačenja brzine rasta biljke. Izduživanje pojedinih delova biljke, ne mora podrazumevati stvarni rast i stvarno povećanje mase. Iz ovih razloga, u testovima sa akvatičnim makrofitama, preporučljivo je kombinovati upotrebu dužinskih, masenih i drugih parametara. Uniformisanje uslova testa i smanjivanje uticaja svih ostalih uzroka varijabilnosti dodatno povećavaju pouzdanost i osetljivost test metode.

Nedostatak vrste *M. spicatum* može biti taj što nije dostupna tokom čitave godine i sklona je kontaminaciji algama i drugim organizmima, za razliku od vrste *M. aquaticum* koja je dostupna tokom cele godine i ne postoje komplikacije u vezi sa kontaminacijom prilikom gajenja. Pored toga, čvršći izdanci *M. aquaticum* su lakši za merenje i rukovanje u laboratoriji u odnosu na klizave stabljike i lomljive listove *M. spicatum*.

Realniji zaključci o osetljivosti *M. spicatum* mogli bi se doneti eliminacijom faktora varijabilnosti i generisanjem većeg broja podataka – izvođenjem većeg broja testova. Pogodnost *M. spicatum* kao test vrste je ta što zbog submerzne prirode vrste, ne postoji bojazan da period adaptacije u voda-sediment sistemu nije dovoljno dug, jer su listovi već prilagođeni na uslove vodene sredine. Takođe, vrsta je autohtona za područje Evrope, te njena upotreba ima visoku ekološku relevantnost.

Međutim, negativne vrednosti stope rasta sveže mase ove vrste u periodu adaptacije u testovima izvedenim u Laboratoriji za ekotoksikologiju dovode do sumnje u pouzdanost testova sa ovom vrstom i zahtevaju posebnu pažnju.

Moguć razlog za više vrednosti varijabilnosti u testovima sa *M. spicatum* u odnosu na testove sa *M. aquaticum* je taj što je *M. aquaticum* laboratorijska kultura LECOTOX-a od 2010. godine, zbog čega je i varijabilnost biljnog materijala na početku testa manja, a starost biljaka poznata, dok jevrsta *M. spicatum* sakupljana sa referalnog lokaliteta svaki put pred test, što je dovelo do neuniformnosti biljnog materijala na samom početku testa. Postoje i velike razlike u varijabilnosti između *M. spicatum* testova koji su trajali 21 i 14 dana. Razlike su možda uslovljene time što je prvi test izveden na *M. spicatum* bio 21-dnevni test sa izoproturonom i tokom testa, veliki broj biljaka je na samom početku bio lošijeg kvaliteta, te je već na samom početku ili tokom testa bio izbačen iz testa. Posledično, biljke koje su ostale u testu su, iako malobrojnije, bile sličnije. Skraćeni testovi na vrsti *M. spicatum* su izvedeni sa već određenim iskustvom u radu sa vrstom. Broj vitalnih biljaka u testu je bio veći i, iako je variranje inicijalnih vrednosti dužine i mase biljaka bilo manje, starost biljaka i biljnih delova je najverovatnije bila različita.

U poređenju sa sedmodnevnim *Lemna* testovima testovi na *M. aquaticum* i *M. spicatum* su zahtevniji. Traju duže (10 ili 21 dan), zahtevaju više materijala (oko 90 l rastvora i 20 kg sedimenta) i biljaka (130 izdanaka) po testu, tehnički ih je teže izvesti jer zauzimaju više prostora i radnih sati.

Jedan od uzroka za slabiju prihvatljivost *M. aquaticum* testova i nedostizanje kriterijuma validnosti može ležati i u malom broju podataka i laboratorija koje su inicijalno učestvovala u testovima (15), u odnosu na npr. testove kalibracije metode kontaktnog testa toksičnosti sedimenta (21) u kom je *M. aquaticum* pokazao odgovarajuć rast, varijabilnost i osetljivost.

Iskustvo sa ovim test modelom je možda bilo slabije, te su i uslovi izvođenja testova bili varijabilniji.

Testovi na *M. aquaticum* opisani u ovom radu ukazuju na to da je dužina testa dovoljna za dupliranje vrednosti sveže mase i dužine izdanka (posmatrajući prosečne vrednosti iz 6 testova i skoro sve individualne testove). Tokom izvođenja testova, uslovi tokom testa su pratili uslove propisane protokolom, te smatramo da su dobro postavljeni za vrstu *M. aquaticum*. Moguće je da bi se neznatnim modifikacijama metode postigao još veći rast biljaka. Izmene bi mogle uključiti nešto višu temperaturu testa (višu od  $20 \pm 2$ , budući da se radi o vrsti iz područja reke Amazon).

U višim nivoima procene rizika, nakon potvrđene neosetljivosti *L. minor* u prvoj fazi procene rizika od pesticida, predlaže se upotreba *Myriophyllum* vrste kao predstavnika ukorenjenih akvatičnih makrofita. Protokol OECD 239, 2014, navodi *M. spicatum* kao standardni test organizam. Međutim, osetljivost *M. aquaticum* na herbicide sa različitim mehanizmom toksičnog dejstva, ne bi trebala da se podceni (Tunić i sar, 2015). Uredbe 283/2013 i 284/2013 ((EU) No 283/2013; (EU) No 284/2013) predlažu ravnopravnu upotrebu obe *Myriophyllum* vrste – *M. aquaticum* i *M. spicatum*, kao i vrstu *Glyceria maxima*. Kako je količina podataka o osetljivosti ukorenjenih vodenih makrofita i dalje ograničena, vrsta *M. aquaticum* ne treba biti zanemarena u testovima toksičnosti.

Arts i saradnici (2008) su testiranjem submerznih makrofita došli do zaključka da nijedna od makrofita nije bila konzistentno najosetljivija i da izbor test organizma mora biti zasnovan na različitim osobinama vrsta, načinu ekspozicije, ali i praktičnim kriterijumima, kao što su uspeh gajenja, lakoća rukovanja u laboratoriji, rasprostranjenje vrste i drugi. Takođe, isti autori smatraju da se mnogi problemi mogu rešiti usvajanjem pristupa testiranja većeg broja vrsta.

Odluka da se iz prve verzije protokola sa dve vrste roda *Myriophyllum* isključi test na *M. aquaticum* i standardizuje protokol koji podrazumeva testiranje samo na vrsti *M. spicatum* je preuranjena, s obzirom na to da još uvek ne postoji velik broj podataka o osetljivosti ove dve vrste na herbicide i regulatore rasta, a nisu ozbiljno uzete u obzir ni pogodnosti i lakoća rukovanja *M. aquaticum* kao laboratorijskog test organizma.

Rezultati poređenja *Myriophyllum* i *Lemna* testova sa 3,5-dihlorfenolom, atrazinom, izoproturonom i trifluralinom ukazuju na to da se vrste ne razlikuju značajno po toksikološkoj osetljivosti na odabrane ksenobiotike, odnosno, na to da toksikološka osetljivost *M. aquaticum* i *M. spicatum* nije najznačajniji argumet za proširenje obima ekološke procene rizika uvođenjem testa na dodatnoj vrsti akvatičnih makrofita. Razlike u biologiji i ekologiji ovih vrsta i veća ekosistemska relevantnost testa u sistemu sediment-voda primenljivog u slučaju *M. aquaticum* i *M. spicatum* predstavljaju značajnije razloge za primenu ukorenjenih vrsta roda *Myriophyllum* u ekološkoj proceni rizika.

Poređenjem *Myriophyllum* i *Lemna* testova sa sintetičkim auksinima utvrđeno je da su vrste *M. aquaticum* i *M. spicatum* značajno osetljivije na štetno dejstvo ovih herbicida u odnosu na *L. minor*. Značajno veća osetljivost *Myriophyllum* vrsta na 2,4 D i dikambu ukazuje na to da je stvarni rizik od sintetičkih auksina možda godinama bio podcenjen, što bi trebalo potvrditi dodatnim ispitivanjima sa drugim auksinima različite hemijske strukture.

## 6. Zaključak

Razvojem testova inhibicije rasta na vrstama roda *Myriophyllum* L. 1754 (Saxifragales, Haloragaceae), cilj disertacije je bio utvrditi potencijal ukorenjenih akvatičnih makrofita *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verd. i *Myriophyllum spicatum* L. u ekološkoj proceni rizika od herbicida i kontrole kvaliteta sedimenta.

Deo rezultata dobijenih u okviru rada na ovoj doktorskoj disertaciji ostvaren je učešćem u dva međunarodna testa interkalibracije novih metoda za procenu rizika na vrstama roda *Myriophyllum* – kontaktnog testa toksičnosti sa vrstom *M. aquaticum* i testa inhibicije rasta vrsta *M. aquaticum* i *M. spicatum* u test sistemu voda-sedimet. Dobijeni rezultati i komentari su uključeni u završne izveštaje internacionalnih testova interkalibracije metoda, a kao rezultat ovih aktivnosti usvojene su dve nove standardne metode na ukorenjenim akvatičnim makrofitama:

- ISO 16191:2013. Test za utvrđivanje toksičnih efekata sedimenta na rast vrste *Myriophyllum aquaticum*, namenjen retrospektivnoj proceni rizika i karakterizaciji sedimenta.
- OECD Vodič br. 239: 2014. Test toksičnosti na vrsti *Myriophyllum spicatum* u sistemu voda-sediment, namenjen preventivnoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta.

Pored rezultata ostvarenih za potrebe standardizacije novih metoda na međunarodnom nivou, u okviru rada na razvoju kontaktnog testa toksičnosti sedimenta sa vrstom *Myriophyllum aquaticum* ispitana je a) primenljivost i osetljivost kontaktnog testa na uzorcima sedimenta iz prirode b) varijabilnost i osetljivost različitih bioloških odgovora, c) uticaj strukture sedimenta na parametre rasta *M. aquaticum* i d) potencijal primene kontaktnog testa toksičnosti sedimenta u proceni rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment.

U okviru rada na razvoju testova inhibicije rasta vrsta roda *Myriophyllum* u sistemu voda-sediment ispitani su 1) varijabilnost i osetljivost većeg broja parametara rasta na izabrane herbicide 2) postizanje adekvatnog kontrolnog rasta, kriterijumi validnosti i mogućnost uniformisanja optimalnog protokola za testiranje vrsta roda *Myriophyllum* u sistemu voda-sediment, u cilju alternativnog korišćenja u ekotoksikološkim testovima pojedinačnih supstanci i smeša, 3) osetljivost test metode u odnosu na standardne *Lemna* testove i potencijal test metode u reevaluaciji rizika od sintetičkih auksina.

Na osnovu rezultata istraživanja potencijala i ograničenja kontaktnog testa toksičnosti sedimenta sa vrstom *Myriophyllum aquaticum*, može se zaključiti:

- Kontaktni test toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* je izuzetno jednostavan i lak za izvođenje.



- Vrsta *M. aquaticum* u jedno-komponentnom sistemu (sediment) je zadovoljila kriterijum validnosti koji se tiče vrednosti ( $RGR \geq 0.09$ ) i niske varijabilnosti (15%) glavnog parametra – stope rasta sveže mase tokom testa u kontroli, a imala je nisku varijabilnost i drugih posmatranih bioloških odgovora (početne i krajnje mase nodusa, koncentracije hlorofila *a* i prinosa biomase), što je čini pogodnim test organizmom u ovom tipu testa.
- Prekoračenje standardnom metodom (ISO 16191:2013) predložene granične inhibicije rasta od 20%, nije nedvosmislen pokazatelj toksičnosti sedimenta, jer struktura sedimenta, posebno granulometrijski sastav sedimenta i sadržaj ukupnih organskih materija, značajno utiče na varijabilnost bioloških odgovora i može da dovede do tzv. lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata.
- U slučajevima kada postoje značajna odstupanja u strukturi između kontrolnog i testiranog prirodnog sedimenta, uputno je koristiti dodatni kontrolni sintetički ili prirodni sediment strukture slične testiranom sedimentu.
- Kontaktni test toksičnosti sedimenta sa *M. aquaticum* se pokazao adekvatnim modelom za procenu toksičnosti sedimenta i kao pogodan za uključivanje u seriju ekotoksikoloških testova okviru „TRIAD“ pristupa za realniju i sveobuhvatniju karakterizaciju sedimenta.
- U kontaktnom testu toksičnosti hemikalija u sedimentnoj fazi, utvrđena je relativno mala varijabilnost i visoka osetljivost pojedinih bioloških odgovora, zbog čega se ovaj test može smatrati potencijalno dobrom metodom za proširenje ekološke procene rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment.

Na osnovu rezultata istraživanja usmerenih ka ispitivanju potencijala primene testova na vrstama roda *Myriophyllum* u dvokomponentnom test sistemu voda-sediment, namenjenih ekološkoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta, može se zaključiti:

- Testovi inhibicije rasta vrsta roda *Myriophyllum* u voda-sediment sistemu su složeni, ali izvodljivi u praksi.
- Testovi inhibicije rasta vrste *M. aquaticum* u voda-sediment sistemu su pokazali visoki stepen stabilnosti, statističku snagu i malu varijabilnost svih ispitivanih parametara rasta, osim suve mase.
- Najosetljiviji parametri u *M. aquaticum* testovima u voda-sediment sistemu su bili suva masa, ukupna dužina biljke i sveža masa korena.
- Najosetljiviji parametri u testovima na vrsti *M. spicatum* su bili suva masa i ukupna dužina biljke, ali su najveću stabilnost, statističku snagu i najmanju varijabilnost imali parametri dužinskog rasta.
- Rezultati prikazani u radu nisu sasvim u skladu sa konačnim zaključcima *ring* testa koji su doveli do usvajanja standardne metode testa toksičnosti na vrsti *M. spicatum* u

- sistemu voda-sediment, jer su testovi na ovoj vrsti pokazali niži stepen stabilnosti od testova sa vrstom *M. aquaticum*, koja nije prihvaćena standardnom metodom.
- Poređenjem testova inhibicije rasta sa vrstama *M. aquaticum* i *M. spicatum*, nije utvrđena suštinska razlika u osetljivosti ove dve vrste na odabrane herbicide.
  - Osetljivost predstavnika roda *Myriophyllum* za većinu odabranih supstanci uporediva je sa osetljivošću standardnog *Lemna* testa, ali je znatno viša na regulatore rasta 2,4 D i dikamba, što ukazuje na primenljivost ovih ukorenjenih dikotiledonih vrsta u proceni rizika od pesticida specifičnog mehanizma toksičnog dejstva i reevaluaciju rizika od sintetičkih auksina.
  - Neadekvatan kontrolni rast *M. aquaticum* u 10-dnevnom testu tokom *ring* testa je poslužio kao glavni argument za isključivanje ove vrste, a prihvatanje 14-dnevnog testa sa *M. spicatum* kao jedinog test modela u standardnoj metodi OECD 239: 2014. Rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji nedvosmisleno pokazuju, suprotno zaključcima iznetim u izveštaju međunarodnog *ring* testa, da kontrolne biljke u *M. aquaticum* testu dužine 10 dana (3 dana adaptacionog perioda i 7 dana ekspozicije test supstanci) zadovoljavaju opšti kriterijum prihvatljivosti, a to je dupliranje biomase tokom perioda ekspozicije, što je obezbeđeno visokom stopom rasta ( $RGR \geq 0.099$ ) gotovo svih parametara.
  - Uprkos preporukama najnovijeg Vodiča za ekološku procenu rizika u akvatičnoj sredini (EFSA, 2013) da se kao dodatna vrsta makrofita u višim nivoima ERA koristi *M. spicatum* (prema metodi OECD 239, 2014) vrstu *M. aquaticum* ne treba zanemariti kao test organizam u ekološkoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta, šta više, ona se može smatrati alternativnom vrstom vrsti *M. spicatum* u istom test sistemu. Dodatno, vrsta *M. aquaticum* zbog svoje emerzne prirode pruža veće mogućnosti, jer je pogodna za različite test sisteme (voda, sediment i voda-sediment), a samim tim poseduje veći potencijal primene u ekosistemski relevantnijoj preventivnoj, ali i retrospektivnoj ekološkoj proceni rizika.

## 7. Literatura

- Ahlf, W, Hollert, H, Neumann-Hense, H, Ricking, M. 2002. A Guidance for the Assessment and Evaluation of Sediment Quality A German Approach Based on Ecotoxicological and Chemical Measurements. *JSS - J Soils & Sediments* 2 (1) 37-42.
- Altenburger R, Ait-Aissac S, Antczak P, Backhaus T, Barceló D, Seiler TB, Brion F, Busch W, Chipman K, López de Alda M, de Aragão Umbuzeiro G, Escher BI, Falciani F, Faust M, Focks A, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Jäger F, Jahnke A, Kortenkamp A, Krauss M, Lemkine GF, Munthe J, Neumann S, Schymanski E, Scrimshaw M, Segner H, Slobodnik J, Smedes F, Subramaniam K, Teodorovic I, Tindall AJ, Tollefsen KE, Walz KH, Williams TD, Van den Brink PJ, van Gils J, Vrana B, Zhangy X, Brack W. 2015. Future water quality monitoring – Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Science of the Total Environment* 512-513, 540-551.
- Anačkov, T.G, Rat, M.M, Radak, D.B, Igić, S.R, Vukov, M.D, Rućando, M.M, Krstivojević, M.M, Radulović, B.S, Cvijanović, Lj.D, Milić, M.D, Panjković, I.B, Szabados, L.K, Perić, D.R, Kiš, M.A, Stojšić, R.V, Boža, P.P. 2013. Alien invasive neophytes of the Southeastern part of the Pannonian Plain. *Cent. Eur. J. Biol.* 8(10). 2013. 1032-1047.
- Arts, G, Davies, J, Dobbs, M, Ebke, P, Hanson M, Hommen, U, Knauer, K, Loutseti, K, Maltby, L, Mohr, S, Poovey, A, Poulsen, V. 2010. AMEG: the new SETAC advisory group on aquatic macrophyte ecotoxicology. *Environ Sci Pollut Res* 17:820-823.
- Arts, GHP, Belgers, JDM, Hoekzema, CH, Thissen, JTMN. 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental Pollution* 153: 199-206.
- ASTM D 3921-85. 1985. Standard Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water.
- Backhaus, T, Faust, M, Scholze, M, Gramatica, P, Vighi, M, Horst, Grimme, L. 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 2, pp. 258-264.
- Barreto, R, Charudattan, R, Pomella, A, Hanada, R. 2000. Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi. *Crop Protection* 19: 697- 703.
- Belgers, J.D.M., Aalderink, G.H., Van den Brink, P.J. 2009. Effects of four fungicides on nine non-target submersed macrophytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009) 579–584.
- Belgers, J.D.M., Lieverloo, R.J.V., Van der Pas, L.J.T., Van den Brink, P.J. 2007. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes *Aquatic Botany* 86 :260-268.
- Bengtsson, B.E, Triet, T. 1994. Tapioca starch wastewater characterized by Microtox and duckweed tests. *Ambio* 23(8):471-477.
- Bergtold, M, i Dohmen, G. 2011. Biomass or growth rate endpoint for algae and aquatic plants: relevance for the aquatic risk assessment of herbicides. *Integr Environ Assess Manag.* 2011 Apr;7(2):237-47. doi: 10.1002/ieam.136.
- Bernež, I, Aguiar, F, Violle, C, Ferreira, T. 2006. Invasive river plants from Portuguese floodplains: What can species attributes tell us? *Hydrobiologia* 570: 3-9.

- Bird, K.T. 2003. Comparisons of herbicide toxicity using *in vitro* cultures of *Myriophyllum spicatum*. *J Aquat Plant Manage* 31:43-45.
- Blackburn, D.R., Weldon, W.L. 1967. The Sensitivity of Duckweeds (Lemnaceae) and Azolla to Diquat and Paraquat. *Weeds*, Vol. 13, No. 2 (Apr., 1965), pp. 147-149.
- Blečić, V, 1976: Fam. Lemnaceae, U: Flora SR Srbije VII tom (Ur. Josifović, M.), str. 482-484, Srpska akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, 1973.
- Blinova, I. 2000. The Perspective of Microbiotests Application to Surface Water Monitoring and Effluent Control in Estonia. *Inc. Environ Toxicol* 15: 385-389.
- Blus, L. 1995. Organochlorine Pesticides. U: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A. Jr., Cairns J. Jr. (Ur.) *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, 275-300.
- Boivin, A, Amellal, S, Schiavon, M, van Genuchten, M T, 2006. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental Pollution*, 138(1), 92-99.
- Brack, W, Altenburger, R, Schüürmann G, Krauss, M, López Herráez, D, van Gils, J, Slobodnik, J, Munthe, J, Gawlik, BM, van Wezel, A, Schriks, M, Hollender, J, Tollefsen, KE, Mekenyan O, Dimitrov S, Bunke D, Cousins I, Posthuma L, van den Brink PJ, López de Alda, M, Barceló, D, Faust, M, Kortenkamp, A, Scrimshaw, M, Ignatova, S, Engelen, G, Massmann, G, Lemkine, G, Teodorovic, I, Walz, KH, Dulio, V, Jonker, MTO, Jäger, F, Chipman, K, Falciani, F, Liska, I, Rooke, D, Zhang, X, Hollert, H, Vrana, B, Hilscherov, a K, Kramer, K, Neumann, S, Hammerbacher, R, Backhaus, T, Mack, J, Segner, H, Escher, B, de Aragão Umbuzeiro, G. 2015. SOLUTIONS for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Science of the Total Environment*, 503-504, 22-31.
- Brassard, C, Gill L, Stavol, a A, Lin, J, Turner, L. 2003. Atrazine Analysis of Risks Endangered and Threatened Salmon and Steelhead Trout.
- Brils, J, 2008. Sediment monitoring and the European Water Framework Directive. *Ann Ist Super Sanità* 2008 | Vol. 44, No. 3: 218-223.
- Brkić, D, Gašić, S, Nešković, N. 2009. Akutna toksičnost herbicida GAL-57. *Pesticidi i fitomedicina*, 221-226.
- Brock, T.C.M., Arts, G., Maltby, L., Van den Brink, P.J. 2006. Aquatic Risks of Pesticides, Ecological Protection Goals, and Common Aims in European Union Legislation *Integrated Environmental Assessment and Management – Volume 2, Number 4—p. e20–e46 e20, SETAC.*
- Burton, GA, De Zwart, D, Diamond, J, Dyer S, Kapo, KE, Liess, M, Posthuma, L. 2012. Making Ecosystem Reality Checks the status quo. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(3): 459-468.
- CACP (Canadian Arctic Contaminants Programme), 2006. Northern Contaminants Program.
- Carlson, R. 1962. *Silent Spring*, Houghton Mifflin, Boston, SAD.
- Cedergreen, N, Streibig, JC, Spliid, NH. 2004. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57: 153-161.
- Cedergreen, N, Andersen, L, Olesen, CF, Spliid, NH, Streibig JC. 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on *Kow* or mode of action? *Aquatic Toxicology* 71: 261-271.

- Cedergreen, N., Streibig, J. C. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag Sci* 61:1152-1160.
- Centar izvrsnosti za hemiju okoline i procenu rizika, (CECRA). 2008. Monitoring sedimenta. Dejan Krčmar. CECRA, PMF UNS. Letnja škola za zaštitu životne sredine, Water Workshop, Novi Sad, 1-5. septembar, 2008.
- Chapman, P.M. 2007. Determining when contamination is pollution – weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* 33, 492-501.
- Chapman, PM. 2007: Do not disregard the benthos in sediment quality assessments! *Mar Pollut Bull* 54:633–635.
- Chapman, P.M. 1989. Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 589-599.
- Cilliers, C.J. 1999. *Lysathia* n.sp. (Coleoptera: Chrysomelidae), a host-specific beetle for the control of the aquatic weed *Myriophyllum aquaticum* (Haloragaceae) in South Africa. *Hydrobiologia* 415: 271-276.
- Coady, KK, Murphy, MB, Villeneuve, DL, Hecker, M, Jones, PD, Carr, JA, Solomon, KR, Smith, EE, Van Der Kraak, G, Kendall, RJ, Giesy, JP. 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 160-173.
- Cobb, A H, Reade, J P, 1992. Auxin-type herbicides. *Herbicides and Plant Physiology*, Second Edition, 133-156.
- Coleman, J.O.D., Frova, C, Schröder, P, Tissut, M. 2002. Exploiting Plant Metabolism for the Phytoremediation of Persistent Herbicides. *Environ Sci & Pollut Res* 9(1) 18-28.
- Collaborative international pesticides analytical council. 1985. Henriët, J., Martijn, A., Povlsen, H.H. (Eds.) CIPAC handbook, Volume 1C, Analysis of technical and formulated pesticides, 2062-2063.
- Comber, M.H.I., D.V. Smyth, and R.S. Thompson, 1995; Assessment of the Toxicity to Algae of Colored Substances; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55(6): 922-928.
- Common Implementation Strategy (CIS) Guidance for Deriving EQS (EC, 2011). European Commission, WFD-CIS Guidance Document No. 27, Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2011, p. 204.
- Common Implementation Strategy (CIS). 2005. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data Sheet Priority Substance No. 333 Trifluralin CAS-No. 1582-09-8. Brussels, 15 January 2005
- Crane, M, Maycock D, Watts C D, Atkinson C, Johnson I. 2007. Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) Science Report – HOEP670085/SR15. Environment Agency, Bristol, UK.
- de Deckere, E, De Cooman, W, Leloup, V, Meire, P, Schmitt, C, von der Ohe, PC. 2011. Development of sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *J Soils Sediments* 3:144-162.
- de Zwart, D, Posthuma, L, Gevrey, M, von der Ohe, PC i de Deckere, E. 2009. Diagnosis of ecosystem impairment in a multiple stress context—how to formulate effective river basin management plans. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5(1): 38-49.

- de Zwart, D. i L. Posthuma. 2006. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 2665-2672.
- Deutsches Institut für Normung (DIN) 38409. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge.
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, L 327/1-72. (tzv. Water Framework Directive).
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- Ebke, KP, Felten C, Dören L. 2013. Impact of heterophylly on the sensitivity of *Myriophyllum aquaticum* biotests. *Environ Sci Euro* 25(1):1-9.
- Ertli, T, Marton, A, Foldenyi, R. 2004. Effect of pH and the role of organic matter in the adsorption of isoproturon on soils. *Chemosphere* 57 (2004) 771–779
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). 2014. Estimating toxicity thresholds for aquatic ecological communities from sensitivity distributions. ECETOC Workshop Report No. 28. ISSN-2078-7200-28 (print), ISSN-2078-7219-28 (online).
- European Chemical Agency (ECHA). 2013. Principles for Environmental Risk Assessment of the Sediment Compartment. Proceedings of the Topical Scientific Workshop. Helsinki, 7-8 May 2013.
- European Commission, 2008. Directive 80/778/EEC. Synthesis report on the quality of drinking water in the member states of the European Union in the period 1999-2001.
- European Commission, 2008. Priority Substances and Certain Other Pollutants according to Annex II of Directive 2008/105/EC.
- European Commission. 2001. Review report for the active substance 2,4-D. Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 2 October 2001. In view of the inclusion of 2,4-D in Annex I of Directive 91/414/EEC. European Commission. Health & consumer protection directorate-general. E1 - Plant health 2,4-D 7599/VI/97-final.
- European Commission. 2008. Directive 2008/105/EC of the European parliament and of the council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.
- European Commission. 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 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. *Off J EU L* 309/1, 24.11.2009, pp. 1-50.
- European Commission. 2009. Regulation No 1107/2009 EU pesticides database on active substances and products.
- European Commission. 2009. Regulation No 1107/2009. Regulation of the European Parliament and of the council concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- European Commission. 2011. Proposal COM(2011)876 for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.

- European Commission. 2013a. Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with the Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. OJ L 93, 3.4.2013.
- European Commission. 2013b. Commission Regulation (EU) No 284/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with the Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. OJ L 93, 3.4.2013, p. 85-152.
- European Food Safety Authority (EFSA), 1965. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance dicamba. European Food Safety Authority, EFSA, Parma, Italy EFSA Journal 2011;9(1):1965.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2007. Draft Assessment Report (DAR) Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Denmark for the existing active substance Dicamba of the third stage (part B) of the review programme referred to an Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. Volume 1. 2007.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2013 EFSA (2013) European Food Safety Authority Panel on Plant Protection Products and their Residues 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA Journal 2013;11(7):3290. doi:10.2903/j.efsa.2013.3290.
- European Food Safety Authority Panel on Plant Protection Products and their Residues (EFSA PPR Panel). 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA Journal 2013;11(7):3290, 268 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3290.
- Fairchild, JF, Ruessler, DS, Haverland, PS, Carlson, AR. 1997. Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 353-357.
- Fairchild, JF, Ruessler, DS, Haverland, PS, Carlson, AR. 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and , metoachlor. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 17, No. 9: 1830-1834.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1988. FAO Specifications for Plant Protection Products – Trifluralin, Rome, 1988.
- Faust, M, Altenburger, R, Backhaus, T, Blanck, H, Boedeker, W, Gramatica, P, Hamer, V, Scholze, M, Vighi, M, Grimme, LH. 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. 2001. Aquatic Toxicology. 56 : 13-32.
- Feiler, U, Kirchesch, I, Heininger, P. 2004. A New Plant- based Bioassay for Aquatic sediments. Soils and Sediments 4 (4): 261- 266.
- Feiler, U, Ratte, M, Arts, G, Bazin, C, Brauer, F, Casado, C, Dören, L, Eklund, B, Gilberg, D, Grote, M, Gonsior, G, Hafner, C, Kopf, W, Lemnitzer, B, Liedtke, A, Matthias, U, Okos, E, Pandard, P, Scheerbaum, D, Schmitt-Jansen, M, Stewart, K, Teodorovic, I, Wenzel, A, Pluta, HJ. 2014. Inter-laboratory trial of a standardized sediment contact test with the aquatic plant *Myriophyllum aquaticum* (ISO 16191). *Environ Toxicol Chem* 33(3):662-670.
- Feiler, U. 2012. Sediment contact test with *Myriophyllum aquaticum* (ISO/DIS 16191): results of an international ring test. 6<sup>th</sup> World Congress / 22<sup>nd</sup> SETAC Europe Annual Meeting, 20-24 May 2012, Berlin, Germany.

- Feiler, U, Hoss, S, Ahlf, W, Gilberg, D, Hammers, W, Hollert, H, Meller, M, Neumann-Hensel, H, Ottermanns, R, Siler TB, Spira, D, Heiningery P. 2013. Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in German waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 32. SETAC Press. DOI: 10.1002/etc.2024
- Fernandes, TCC, Mazzeo, DEC, Marin-Morales, MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88 : 252-259.
- Forney, DR, Davis, DE. 1981. Effects of low concentrations of herbicides on submersed aquatic plants. *Weed Science* 29:677-685.
- Frick, H. 1985. Micronutrient tolerance and accumulation in the duckweed, *Lemna*. *J. Plant. Nutrit.* 8, 1131-1145.
- Galichet, F, Mailhot, G, Bonnemoy, F, Bohatier, J, Bolte, M. 2002. Iron(III) photo-induced degradation of isoproturon: correlation between degradation and toxicity. *Pest Manag Sci* 58: 707-712.
- Gašić, S, Orešković, Z, 2008. Uoporedivo ispitivanje karakteristika različitih formulacija pesticida sa istom aktivnom materijom *Pestic. fitomed.* 23:201-206.
- Gašić, S, Budimir, M, Brkić, D, Nešković, N. Residues of atrazine in agricultural areas of Serbia. 2002. *J.Serb.Chem.Soc.* 67: 887-892.
- Giddings, J.M., 2011 The Relative Sensitivity of Macrophyte and Algal Species to Herbicides and Fungicides: An Analysis Using Species Sensitivity Distributions. CSI Report No. 11702. for the Species Sensitivity Distribution Working Group (SSD WG), functioning under the umbrella of the Aquatic Macrophyte Ecotoxicology Group (AMEG) Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). September 30, 2011.
- Giddings, J.M., Arts, G, Hommen, U. 2012. The Relative Sensitivity of Macrophyte and Algal Species to Herbicides and Fungicides: An Analysis Using Species Sensitivity Distributions. *Integr Environ Asses Manag* 9, 308-318.
- Giddings, JM, Anderson, TA, Hall LW, Hosmer AJ, Kendall RJ, Richards RP, Solomon KR, Williams, WM. 2005. Atrazine in North American Surface Waters: A Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment . Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Glabgen, W, Komoba, D, Bohnenkamper, A, Haas, M, Hertkorn, H, May, R, Szymczak, W, Sandermann, H. 1999. Metabolism of the Herbicide Isoproturon in Wheat and Soybean Cell Suspension Cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63, 97-113.
- Grossmann, K, 2000. The mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science*, 5(12), 506-508.
- Grossmann, K, 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science*, 66(2), 113-120.
- Grossmann, K, Kwiatkowski, J, Tresch, S, 2001. Auxin herbicides induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *Journal of experimental botany*, 52:1811–1816.
- Hansen, H, Grossmann, K, 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* 124:1437-1448.
- Hanson, M, Sanderson, H, Keith, R, Solomon. 2003. Variation, replication, and power analysis of *Myriophyllum* spp. microcosm toxicity data. 2003. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22, No. 6, pp. 1318-1329.



- Hartleb, C.F., Madsen, J.D. and Boylen, C.W., 1993. Environmental factors affecting seed germination in *Myriophyllum spicatum* L. *Aquat. Bot.*, 45:15-25.
- Hegedűs, G, Béla, I, Székács, A. 2000. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Analytica Chimica Acta*. 421 : 121-133.
- Hill, MP, Julien, MH. 2003. The transfer of appropriate technology; key to the successful biological control of five aquatic weeds in Africa. In: Cullen JM, Briese DT, Kriticos DJ, Lonsdale WM, Morin L, Scott JK. 2004. Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds. Canberra, Australia, 27 April–2 May 2003.
- Hillman, WS, Culley, DD. 1978. The use of duckweed. *Amer. Sci.* 66, 442-451.
- Hinman, M.L. 1989. Utility of Rooted Aquatic Vascular Plants for Aquatic Sediment Hazard Evaluation: I. Evaluation of *Hydrilla verticillata* Royle as a Sediment Toxicity Bioassay Organism to Selected Aquatic Pollutants; II. Evaluation an; Ph.D.Thesis, Memphis State Univ., Memphis, TN:86 p.
- Hoffman, R.S., Capel, P.D and Larson, S.J. 2000. Comparison of pesticide in eight US urban streams. *Environ.Tox.Chem.*, 19: 2249-2258.
- Holvoet, K, Seuntjens, P, Mannaerts, R, Scheppe, De, V, Vanrolleghem, P.A. 2007. The dynamic water-sediment system: results from an intensive pesticide monitoring campaign". *Water Science & Technology* Vol 55 No 3 pp 177-182, IWA Publishing
- Höss, S, Ahlf, W, Fahnenstich, C, Gilberg, D, Hollert, H, Melbye, K, Meller, M, Hammers-Wirtz, M, Heininger, P, Neumann-Hensel, H, Ottermanns, R, Ratte, H-T, Seiler, B, Spira, D, Weber, J., Feiler, U. 2010. Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination e Determination of toxicity thresholds. *Environ Pollut* 158:2999-3010.
- Hussner, A, Losch, R. 2005. Alien aquatic plants in a thermally abnormal river and their assembly to neophyte-dominated macrophyte stands (River Erft, Northrhine-Westphalia). *Limnologica* 35: 18–30.
- Hussner, A. 2009. Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. *Weed Research* 49:506-515.
- Hussner, A, Meyer, C, Busch, J. 2008. The influence of water level and nutrient availability on growth and root system development of *Myriophyllum aquaticum*. *Weed Research* 49, 73-80.
- International Commission for Protection of the Danube River. 2009. Joint Danube Survey 2, Final Scientific Report. Vienna, Austria.
- International Commission for the Protection of the Danube River (ICPDR). 2015. Liška I., Wagner F., Sengl F., Deutch K., Slobodnik J (Urednici). Joint Danube Survey 3. A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. Final Scientific Report. ICPDR – Vienna.
- International Organization for Standardization (ISO), 2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 1: Method using freshly prepared bacteria. International Organisation for standardisation, Geneva, Switzerland. ISO 11348-1:2007.
- International Organization for Standardization (ISO). 1995. Water quality – *Pseudomonas putida* growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test) International Organisation for standardisation, Geneva, Switzerland. ISO 10712:2007(E).

- International Organization for Standardization (ISO). 2013. Water quality: Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*. ISO 16191:2013. Geneva, Switzerland.
- Janjić V. 1994. Hormonski herbicidi. Nauka 86-7621-090-X. Beograd, Srbija.
- Janjić V. 2009. Mehanizam delovanja pesticida. Akademija nauka i umjetnosti Republike Srpske. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd – Zemun.
- Janković, M, M. 1972. Ekološka studija problema zarašćivanja veštačkih jezera na primeru budućeg jezera na Novom Beogradu. Čovek i biosfera. Problemi čovekove sredine. Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Tom VII nov, ser. 1-4, 1972, Beograd.
- Janković, M, M. Janković, I, M. 1972. Prilog poznavanju i rešavanju problema eutrofizacije. I zarašćivanja Savskog jezera (Ada Ciganlija) kod Beograda. Čovek i biosfera. Problemi čovekove sredine. Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, Tom XVI (1981, 1982) 1987, Beograd.
- Janković, M. M., 1976: Fam. Halorrhagidaceae (Haloragaceae). U: Flora SR Srbije V tom (Ur. Josifović, M.), str. 50-53 Srpska akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, 1976.
- Jevrić, L. 2009. Ispitivanje korelacije između hemijske strukture, fizičko-hemijskih i retencionih parametara u hromatografiji na obrnutim fazama novosintetisanih derivata s-triazina. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad.
- Jovanović-Radanov, K, Elezović, I, 2003. Fitotoksično delovanje trifluralina na hibride kukuruza (*Zea mays* L.) I njegova perzistentnost, Scientific Paper 632-633.
- Kirby, MF, Sheahan, DA. 1994. Effects of atrazine, isoproturon, and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 53:120-126.
- Knauer, K, Mohr, S, Feiler, U. 2008. Comparing growth development of *Myriophyllum* spp. in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. *Environ Sci Pollut Res* 15:322-331. DOI 10.1007/s11356-008-0008-1.
- Knauer, K., Vervliet-Scheebaum, M., Dark, J.R., and Maund, J. S. 2006. Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. *Pest Manag Sci* 62:715-722 (2006).
- Knauert, S, Singer, H, Hollender, J, Knauer, K. 2010. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms. *Environmental Pollution* 158:167-174.
- Landolt, E. 1986. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) The family of Lemnaceae - a monographic study, Volume 1., Veroff. Geobot. Inst. ETH, Zurich: 638 pp.
- Langeland K.A. 2008. Identification and Biology of Nonnative Plants in Florida's Natural Areas - Second Edition, by K.A. Langeland, et al. University of Florida-IFAS Pub SP 257.
- LaRue, A. E., Zuellig, P. M., Netherland, D. M., Heilman, A. M. and Thum, A.R., 2012. Hybrid watermilfoil lineages are more invasive and less sensitive to a commonly used herbicide than their exotic parent (Eurasian watermilfoil). *Evolutionary Applications* ISSN 1752-4571. doi:10.1111/eva.12027.
- Lazić, L. Pavić, D., Stojanović, V., Tomić, P., Romelić, J., Pivac, T., Košić, K., Besermenji, S., Kicošev, S., Đarmati, Z., Puzović, S., Đureković-Tešić, O, Stojanović, T, Marić, B., Vig,

- L., Panjković, B., Habijan-Mikeš, V., Sabadoš, K., Delić, J., Kovačević, B., Stojšić, V., Korać, J. 2008. Zaštićena prirodna dobra i ekoturizam Vojvodine, Departman za geografiju, turizam i hotelijerstvo, Novi Sad, (Novi Sad: Stojkov) - COBISS.SR/ID 230543623. Str. 141-153.
- Lepper, P. 2002. Towards the derivation of quality standards for priority substances in the context of the Water Framework Directive, final report of the study contract No. B4-3040/2000/30637/MAR/E1: Identification of quality standards for priority substances in the field of water policy. Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology.
- Les, DH, Mehrhoff, LJ. 1999. Introduction of nonindigenous aquatic vascular plants in southern New England: a historical perspective. *Biological Invasions* 1: 281-300.
- Lichtenthaler, HK, Wellburn, AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Transactions* 11: 591-592.
- Liska, I. 2011. Water threats at the river basin scale. In: P. Quevauviller, U. Borchers, K.C. Thompson and T. Simonart (Eds.), *The Water Framework Directive*, RSC Publishing, p. 62.
- Ma, J., W. Liang, L. Xu, S. Wang, Y. Wei, and J. Lu, 2001. Acute Toxicity of 33 Herbicides to the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa*; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66(4): 536-541.
- MacDonald, DD, Ingersoll, CG, Berger, TA. 2000. Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 39:20–31
- Madsen, J.D., Chambers, P.A., James, W.F., Koch, E.W. i Westlake D.F. 2001. The interaction between water movement, sediment dynamics and submersed macrophytes. *Hydrobiologia* 444: 71–84.
- Maletzki, D, Kussatz C, Ratte, M, Ratte, HT. 2011. *Myriophyllum spicatum* toxicity test: Design and first results of an inter laboratory ring test using a sediment-free test system. SETAC Europe 21th Annual Meeting, Milan, Italy.
- 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, United States of America.
- McGregor, EB, Solomon, KR, Hanson, ML. 2008. Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* to atrazine. *Chemosphere* 73:249-260.
- Medonca, E, Picado, A, Silva, L, Anselmo, AM. 2007. Ecotoxicological evaluation of cork-boiling wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 384-390.
- Michel, A, R.D. Johnson, S.O. Duke, B.E. Scheffler. 2004. Dose-Response Relationships Between Herbicides with Different Modes of Action and Growth of *Lemna paucicostata*: An Improved Ecotoxicological Method; *Environ. Toxicol. Chem.* 23(4): 1074-1079.
- Mkandawire, M, Dudel, EG. 2007. Are *Lemna* spp. Effective Phytoremediation Agent? Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability. Global Science Books.
- Mohr S, Schott J, Maletzki D, Hünken A. 2013. Effects of toxicants with different modes of action on *Myriophyllum spicatum* in test systems with varying complexity. *Ecotoxicol Environ Safe* 97:32-39.
- Moody, M, Miller, J. 2005. *Lemna minor* growth inhibition test. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, Vol. 1, 271-298.
- Newman, MC, Crane, M, Holloway, G. 2006. Does Pesticide Risk Assessment in the European Union Assess Long-Term Effects? *Rev Environ Contam Toxicol* 187:1–65.

- Newman, MC, Ownby, DR, Mezin, LCA, Powell, DC, Christensen, TRL, Lerberg SB. 2000. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: Assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000; 19: 508-515.
- Nitschke, L, Wilk, A, Schossler, W, Metzner, G, Lind, G. 1999 Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. *Chemosphere* 39(13):2313-2323.
- National Pesticide Information Center (NPIC) – Oregon State University, Dicamba Technical Fact Sheet ([www.npic.orst.edu/](http://www.npic.orst.edu/)).
- NW4, Ministerie van V&W. 1998. Vierde Nota Waterhuishouding, Regeringsbeslissing, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, December 1998.
- Okland, TE, Wilhelmsen, E, Solevag, O. 2005. A study of the priority substances of the Water Framework Directive. Norwegian Pollution Control Authority.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2004. Guidelines for the testing of chemicals. Sediment-water Chironomid toxicity test using spiked sediment OECD 218. Paris, France.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2005. Guidance document on the validation and international acceptance of new OECD or updated test methods for hazard assessment. OECD series on testing and assessment Number 34. Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology ENV/JM/MONO(2005)14.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2006. Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 221: *Lemna* sp. growth inhibition test. Paris, France.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2011. Ring-test protocol. Standardized method for investigating test substance impact on rooted aquatic macrophytes. OECD Guideline. Paris, France.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 239: Water-Sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test. ISBN: 9789264224155. Paris, France.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris, France.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 238: Sediment-Free *Myriophyllum Spicatum* Toxicity Test
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2011. Guidelines for the testing of chemicals Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- OSPAR Commission. 2005. Protecting and conserving the North-East Atlantic and its resources, OSPAR Commission – Trifluralin.
- Planojević, I., Teodorović, I., Bartova, K., Jurca, T., Tubić, A., Machat, J., Kopf, W., Blaha, L. Kovacević, R. 2011. Wastewater canal Vojlovica, industrial complex Pancevo, Serbia – preliminary ecotoxicological assessment of contaminated sediments. *Journal of Serbian Chemical Society*, 76 (3) 459-478.

- Porsbring, T, Backhaus, T, Johansson, P, Kuylenstierna, M, Blank, H. 2010. Mixture toxicity from Photosystem II inhibitorsonmicroalgal community succession is predictable by concentration addition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 29, No. 12, pp. 2806-2813.
- Puntarić, D, 2006. Atrazin u okolišu – zdravstveni rizik. Vol 2, Broj 8, 7. Listopad 2006. ISSN 1845-3082.
- Radić-Brkanac, S, Stipaničev, D, Širac, S, Glavaš, K, Pevalek-Kozlina, B. 2010. Biomonitoring Of Surface Waters Using Duckweed (*Lemna minor* L.). BALWOIS 2010 - Ohrid, Republic of Macedonia - 25, 29 May 2010.
- Radivojević, Lj, Šantrić, Lj, Stanković-Kalezić, R. 2006. Delovanje atrazina na mikroorganizme u zemljištu. *Pestic. Fitomed.* 21: 215-221.
- Ratte, M., Ratte, H. 2014. *Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris, France.
- Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC
- Regulation (EC) No 1907/2006 – Regulation concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH).
- Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. (BPR, Regulation (EU) 528/2012).
- Rockström, J., W. Steffen, K. Noone, Å. Persson, F. S. Chapin, III, E. Lambin, T. M. Lenton, M. Scheffer, C. Folke, H. Schellnhuber, B. Nykvist, C. A. De Wit, T. Hughes, S. van der Leeuw, H. Rodhe, S. Sörlin, P. K. Snyder, R. Costanza, U. Svedin, M. Falkenmark, L. Karlberg, R. W. Corell, V. J. Fabry, J. Hansen, B. Walker, D. Liverman, K. Richardson, P. Crutzen, and J. Foley. 2009. Planetary boundaries:exploring the safe operating space for humanity. *Ecology and Society* 14(2): 32.
- Rodić, M. 2013. Sintetički aoksini: novi dokazi o ekološkom riziku za akvatične makrofite. Završni rad. Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Univerzitet u Novom Sadu.
- SANCO (Sante´ des Consommateurs) 2002a. Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/3268/2001 rev. 4 (final). Brussels (BE).
- SANCO (Sante´ des Consommateurs) 2002b. Guidance Document on Risk Assessment for Birds and Mammals Under Council Directive 91/414/EEC, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions, E1 - Plant health, SANCO/4145/2000.
- Sass, JB, Colangelo, A. 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *International Journal of occupational and environmental health* Vol. 12, No. 3: 260-267.
- Schmolke, A, Thorbek, P, Chapman, P, Grimm, V. 2010. Ecological models and pesticide risk assessment current modeling practice. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 1006-1012.

- Slobodnik, J, Mrafkova, L, Carere, M, Ferrara, F., Pennelli, B, Schüürmann, G, von der Ohe, P.C. 2012. Identification of river basin specific pollutants and derivation of environmental quality standards: A case study in the Slovak Republic. *Trends in Analytical Chemistry* 41, 133-145.
- Službeni glasnik Republike Srbije. 2009. Zakon o sredstvima za zaštitu bilja. Sl. glasnik RS 41/2009.
- Službeni glasnik Republike Srbije. 2010. Zakon o vodama. Sl. glasnik RS 30/10.
- Službeni glasnik Republike Srbije. 2012. Zakon o hemikalijama. Sl. glasnik RS 36/09, 88/10, 92/11, 93/12.
- Službeni glasnik Republike Srbije. 2011. Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje. Sl. glasnik RS, br. 35/11.
- Službeni glasnik Republike Srbije. 2011. Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje. Sl. glasnik RS, br. 35/11
- Službeni Glasnik Republike Srbije. 2012. Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim, podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje. Sl. glasnik RS, br. 50/2012.
- Službeni glasnik RS, broj 105/2013. Pravilnik o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda u skladu sa Globalno harmonizovanim sistemom za kvalifikaciju i obeležavanje UN (Sl. glasnik RS", br. 105/2013).
- Službeni glasnik RS, broj 59/10 Pravilnik o klasifikaciji, pakovanju, obeležavanju i oglašavanju hemikalije i određenog proizvoda.
- Službeni list SRJ. Br. 42/98 i 44/99. Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće.
- Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). 1997. Technical issue paper: Ecological risk assessment. Pensacola, FL, USA: SETAC. 4 p.
- Solomon, KR, Baker, DB, Richards, RP, Dixon, KR, Klaine, SJ, La Point, TW, Kendall, RJ, Weisskopf, CP, Giddings, JM, Giesy, JP. 1996. Ecological Risk Assessment Of Atrazine In North American Surface Waters. *Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)* Vol. 15 (1): 31- 76.
- Stešević, D, Feiler U, Sundić D, Mijović S, Erdinger L, Seiler TB, Heininger P, Hollert H. 2007. Application of a New Sediment Contact Test with *Myriophyllum aquaticum* and of the Aquatic *Lemna* Test to Assess the Sediment Quality of Lake Skadar. *Soils Sediments* 7 (5): 342-349.
- Stevanović, B, Janković, M, 2001: Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka, NNK International str. 263-281.
- Šunjka, D, Lazić, S, Grahovac, N, Jakšić, S. 2013. Solid-phase extraction of dicamba herbicide from water. Proceedings of the 15<sup>th</sup> DKMT Euroregion Conference on Environment and Health with satelite event LACREMED Conference Sustainable agricultural production: restoration of agricultural soil quality by remediation, 16-17 May 2013, University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia.
- Suter, W.G. 2007. Ecological Risk Assessment, Second Edition. ISBN 1-56670-634-3.
- Tarazona, J.V., Versonnen, B, Janssen, C, De Laender, F, Vangheluwe, M., Knight D. (Eds). 2013. Principles for Environmental Risk Assessment of the Sediment Compartment. Proceedings of the Topical Scientific Workshop, Helsinki, 7-8 May 2013, European Chemicals Agency, ECHA-14-R-13-EN.

- 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 *Environ Toxicol Chem* 31(2):417-426.
- Teodorović, I, Maurić, N. 2003. TestToks, verzija 1.0. Zadužbina Andrejević i Nacionalni komitet IAD-a Srbije i Crne Gore.
- Teodorović, I., Kaišarević, S. 2014. Ekotoksikologija. Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju Novi Sad, 2014. Štamparija Stojkov, Novi Sad ISBN broj: ISBN 978-86-7031-145-9
- Teodorović, I. 2003. Toksikološki testovi u monitoringu kvaliteta otpadnih i površnih voda. Doktorska disertacija. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Teodorović, I. 2004. Testovi toksičnosti u kontroli otpadnih voda. Biblioteka Dissertatio, Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Teodorović, I. (ur.) 2010. Studija hemijskog, fizičkog i biološkog statusa reke Tamiš (06SER02/03/007-8). U okviru susedskog programa Rumunija – Srbija EKO-STATUS REKE TAMIŠ, Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet.
- Thiebaut, G. 2007. Invasion success of non-indigenous aquatic and semi-aquatic plants in their native and introduced ranges. A comparison between their invasiveness in North America and in France *Biological Invasions* 9:1-12.
- Tomlin, C.D.S. (Ed.): *The Pesticide Manual - A World Compendium (15th Edition)*. British Crop Production Council (BCPC), Omega Park, Alton, Hampshire GU34 2QD, UK, 2009.
- Trebst, A. 1987. The 3-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II, *Z. Naturforsch.* 42, 742-750.
- Tunić, T, Knežević, V, Kerkez, Đ, Tubić, A, Šunjka, D, Lazić, S, Brkić, D, Teodorović, I. 2015. Some arguments in favour 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*. DOI: 10.1002/etc.3034.
- Turgut, C, Fomin, A. 2002. Sensitivity of the Rooted Macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdocout to seventeen Pesticides Determined on the Basis of EC<sub>50</sub>. *Environ. Contam. Toxicology* 69: 601- 608.
- Turgut, C. 2005. Uptake and Modeling of Pesticides by Roots and Shoots of Parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *ESPR – Environ Sci & Pollut Res* 12 (6) 342-346.
- Turgut, C. 2006. The growth stability and sensitivity of parrotfeather to a reference toxicant (3,5-dichlorophenol) throughout a 1-year period. *Fresen Environ Bull* 15(5):462-464.
- Turgut, C. 2007. The impact of pesticides toward parrotfeather when applied at the predicted environmental concentration. *Chemosphere* 66 469-473.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1992. Framework for Ecological Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EPA/630/R-92/001.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. Method 7000B. Flame atomic absorption spectrophotometry.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Determination of chlorinated pesticides, herbicides, and organohalides by liquid-solid extraction and electron capture gas chromatography, revision 2.0. Method 508.1. Office of Research and Development, Cincinnati, OH.

- U.S. Environmental Protection Agency. 1996. Proposed Guidelines for Ecological Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EPA/630/R-95/002B.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2000. Method 532. Determination of phenylurea compounds in drinking water by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection. Revision 1.0. National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2004. Method 3620B. Florisil cleanup.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2004. Method 3630c. Silica gel cleanup.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2004. Method 8081A. Organochlorine pesticides by gas chromatography.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2004. Method 8270C. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).
- U.S. Environmental Protection Agency. 2007. Method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Revision 1.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2007. Method 3546. Microwave extraction.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2007. Method 7010. Graphite furnace atomic absorption spectrophotometry.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2007. Method 7471B. Mercury in solid or semisolid waste (manual cold-vapor technique). Revision 2.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2007. Method 8082A. Polychlorinated biphenyls (PCBs) by gas chromatography.
- Van den Brink, P.J., Blake, N., Brock, T.C.M., Maltby, L. 2006. Predictive Values of Species Sensitivity Distributions for Effects of Herbicides in Freshwater Ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment* 2006; 12: 645-674.
- Vervliet-Scheebaum, M., Knauer, K., Maund, J. S., Grade, R., Wagner, E. 2006. Evaluating the necessity of additional aquatic plant testing by comparing the sensitivities of different species. *Hydrobiologia* 570: 231-236.
- Vitorović, S., Škrlić, M., Mitić, N., Levata, S. 2004. *Leksikon otrovnih hemikalija*. YU ISBN 86-315-0142-5.
- von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik J., de Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R.U., Ginebreda A., de Cooman, W., Schüürmann, G., Brack, W. 2011. A new risk assessment approach for the prioritisation of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment* 409, 2064-2077.
- Walters, J. 1999. Environmental fate of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Department of pesticide regulations, Sacramento, CA, 1-18.
- Wang, W. 1990. Literature Review on Duckweed Toxicity Testing. *Environmental research* Vol. 52, p. 7-22.
- Weller, P. i Liska, I. 2011. A river basin management plan for the Danube River, *Water Reseach and Management*, Vol.1, No. 1, p.6.
- Wersal, R. M., Madsen, J. D. 2007. Comparison of Imazapyr and Imazamox for Control of Parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.). *J. Aquat. Plant Manage.* 45: 132-136.



- Wersal, R, M, Madsen, J, D. 2011. Influences of water column nutrient loading on growth characteristics of the invasive aquatic macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. *Hydrobiologia* 665:93–105.
- Wheeler, J.R., Grista, E.P.M., Leunga, K.M.Y., Morratta D., Cranea M. 2002. Species sensitivity distributions: data and model choice. *Marine Pollution Bulletin* 45 (2002) 192-202.
- Woodward, A.W, Bartel, B, 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707-735.
- Zarn, J, Boobis, A, 2011. First draft prepared by Jürg Zarn and Alan Boobis. Pesticide residues in food – 2010, 203.

## Prilog

## Prilog 1

Tabela P1 (a-g): Varijabilnost parametara a) stopa rasta sveže mase nodusa, b) sveža masa izdanka, c) dužina izdanka, d) sveža masa korena, e) dužina korena, f) koncentracija hlorofila *a* g) sadržaj hlorofila *a* u nodusu (absorbanca) u kontaktnim testovima toksičnosti sedimenta sa *Myriophyllum aquaticum*. Prikazane su srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV % – koeficijent varijacije unutar pojedinih kontrolnih i test tretmana i MSD % – minimalna statistički značajna razlika izražena kao procenat umanjenja u odnosu na kontrolu.

Tabela P1 (a): Stopa rasta sveže mase nodusa

STOPA RASTA (sveža masa nodusa)						
UZORAK	N	SR. VR.	sd	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	0.089	0.014	16.21		
TL1 *	9	0.065	0.014	21.07	27.4 *	
TL2*	9	0.045	0.016	35.36	49.1 *	
TL3*	9	0.052	0.004	8.55	42 *	20.87
TJK	9	0.103	0.013	12.9		
TJ1	9	0.085	0.009	10.3	17.6	
TJ2	9	0.098	0.013	13.4	4.8	
TJ3 *	9	0.067	0.017	25	34.9 *	21.49
TPK	9	0.087	0.027	31.3		
TP1 *	7	0.038	0.031	82.5	56.4 *	
TP2	9	0.064	0.007	11.1	26.9	
TP3 *	9	0.047	0.010	21.2	45.6 *	35.95
AK	9	0.101	0.016	15.9		
A 0.12	9	0.093	0.027	28.8	7.5	
A 0.23	9	0.090	0.028	31.2	10.4	
A 0.46 *	9	0.061	0.011	18.6	39.1	
A 0.92 *	8	0.037	0.015	40.6	63.5	
A 1.85 *	9	0.026	0.006	22.5	74.0	
A 2.31 *	9	0.012	0.008	68.2	88.2	
A 3.69 *	9	-0.003	0.008	254.3	103.0	25.58
S5% (K)	12	0.079	0.016	20.6		
S1%	12	0.056	0.013	22.9	29.5	
S10%	12	0.055	0.029	52.1	30.3	41.59
K	18	0.096	0.014	15.02		
S I *	12	0.126	0.010	7.72	-31.5 *	
S II	12	0.112	0.013	11.7	-16.0	
S III	12	0.101	0.011	10.45	-5.0	15.06
Kontrola	18	0.11	0.008	6.9		
Krivaja *	12	0.087	0.018	21.3	20.8 *	
Jegrička *	12	0.091	0.012	12.9	17.3 *	11.72

Tabela P1 (b): Sveža masa izdanka

MASA IZDANKA (mg)						
UZORAK	N	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	23.66	5.92	25		21.42
TL1*	9	5.89	1.23	20.9	75.1 *	
TL2*	9	6.66	1.39	20.8	71.9 *	
TL3*	9	7.33	1.93	26.3	69.0 *	
TJK	9	31.01	7.42	23.9		20.76
TJ1*	9	15.29	3.28	21.5	50.7 *	
TJ2*	9	15.63	6.2	39.7	49.6 *	
TJ3*	9	6.36	2.04	32.1	79.5 *	
TPK	9	20.29	12.5	61.7		45.35
TP1*	7	6.42	2	31.1	68.4 *	
TP2 *	9	9.2	2.26	24.5	54.7 *	
TP3*	9	6.78	2.09	30.8	66.6 *	
AK	9	31.93	21.4	67		40.19
A 0.12	9	26.76	13.43	50.6	16.2	
A 0.23	9	21.87	10.2	46.7	31.5	
A 0.46 *	9	12.17	3.6	29.3	61.9 *	
A 0.92 *	9	5.38	3.3	61.5	83.2 *	
A 1.85 *	6	2.97	0.351	11.84	90.7 *	
A 2.31 *	9	0	0	100	100 *	
A 3.69 *	9	0.23	0.404	176	99.3 *	
S5% (K)	12	23.85	13.87	58.2		58.49
S1%	12	10	4.35	43.7	58.3	
S10%	12	13.08	7.25	55.4	45.1	
K	18	16.82	5.42	32.2		38.24
S I *	12	32.23	2.99	9.27	-91.6 *	
S II	12	20.59	6.44	31.3	-22.4	
S III	12	20.36	3.31	16.3	-21.0	
Kontrola	18	27.59	3.37	12.22		18.84
Krivaja *	12	18.64	7.66	41.1	32.4 *	
Jegrička *	12	22.69	2.38	10.5	17.8 *	

Tabela P1 (c): Dužina izdanka

DUŽINA IZDANKA (mm)						
UZORAK	N	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	26.78	2.22	8.3		19.59
TL1 *	9	14.67	1.45	9.88	45.2 *	
TL2 *	9	17.33	1.45	8.37	35.3 *	
TL3 *	9	16.78	1.58	9.38	37.3 *	
TJK	9	31.78	6.81	21.43		19.5
TJ1	9	26.22	3.1	11.8	17.5	
TJ2	9	26.89	5.89	21.9	15.4	
TJ3 *	9	14.44	3.2	22.2	54.6 *	
TPK	9	21.22	6.9	32.7		45.18
TP1	7	13.14	0.77	5.96	39.3	
TP2	9	17.89	4.17	23.3	15.7	
TP3	9	15.94	5.12	32.1	24.9	
AK	9	25.04	2.65	10.6		39.04
A 0.12	9	17.78	7.62	42.9	29	
A 0.23	9	19.44	12.7	62.3	22.4	
A 0.46	9	19.44	2.14	11.02	22.4	
A 0.92 *	9	8	4.98	62.2	68.1 *	
A 1.85 *	9	6	1.45	24.2	76.0 *	
A 2.31 *	9	0	0	100	100 *	
A 3.69 *	9	0.56	0.962	173.2	97.8 *	
S5% (K)	12	18.83	3.75	19.9		42.9
S1%	12	14.67	3.02	20.6	22.1	
S10%	12	15.03	4.3	28.5	20.2	
K	18	20.33	6.8	33.3		35.31
S I *	12	32.17	7.07	22	-58.2 *	
S II	12	22.17	5.6	25.1	-9	
S III	12	23.08	4.5	19.6	-13.5	
Kontrola	18	27.39	3.37	12.22		15.07
Krivaja	12	28.83	7.66	41.1	-5.3	
Jegrička	12	30.33	2.38	10.5	-10.8	

Tabela P1 (d): Sveža masa korena

SVEŽA MASA KORENA (mg)						
UZORAK	N	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	3.2	0.93	28.7		183.57
TL1*	9	13.7	5.68	41.4	-324.1 *	
TL2	9	6.7	3.17	47.2	-107.1	
TL3	9	7.9	0.901	11.42	-143.5 *	
TJK	9	3.7	6.81	21.4		116.43
TJ1*	9	11.3	3.1	11.8	-205.1 *	
TJ2*	9	10.5	5.89	21.9	-182.9 *	
TJ3*	9	8.2	3.2	22.2	-121.6 *	
TPK	9	2.4	6.93	32.7		113.52
TP1	7	1.5	0.77	5.96	25.0	
TP2*	9	5.5	4.17	23.3	-130.4 *	
TP3	9	2.9	5.2	32.1	-19.2	
AK	9	4.1	0.76	18.4		51.66
A 0.12	9	4.7	1.8	38.1	-14.6	
A 0.23	9	5.5	3.5	63.3	-32.1	
A 0.46	9	2.4	0.7	29.5	42.4	
A 0.92	9	1.2	1.18	98.2	70.9 *	
A 1.85*	9	0.5	0.16	31.5	87.4 *	
A 2.31	9	0.0	0	100	100 *	
A 3.69	9	0.1	0.192	173.2	97.3 *	
S5% (K)	12	3.1	3.75	19.9		46.46
S1%	12	2.8	3.02	20.6	11.0	
S10%	12	1.8	4.29	28.5	42.2	
K	18	8.1	1.96	24.3		42.66
S I	12	14.9	2.31	15.5	-84.8 *	
S II	12	14.8	1.24	8.4	-82.5 *	
S III	12	7.9	1.98	25.2	2.6	
Kontrola	18	1.4	0.76	53.4		62.02
Krivaja	12	1.0	0.623	61.3	28.2	
Jegrička	12	0.6	0.87	138.4	55.9	

Tabela P1 (e): Dužina korena

DUŽINA KORENA (mm)						
UZORAK	N	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	31.8	8.87	27.94		131.15
TL1 *	9	89.0	9.96	10.41	-201.2 *	
TL2 *	9	103.0	46.09	44.8	-224.3 *	
TL3 *	9	119.6	37.13	31.05	-276.5 *	
TJK	9	70.9	6.81	21.4		101.56
TJ1 *	9	160.9	3.1	11.8	-127 *	
TJ2	9	159.0	5.83	21.9	-124.3	
TJ3	9	111.3	3.2	22.2	-57.1	
TPK	8	21.1	6.93	32.7		188.43
TP1	6	45.3	0.77	5.96	-114.5	
TP2 *	9	95.5	4.17	23.3	-352.4 *	
TP3	9	40.8	5.2	32.11	-93.2	
AK	9	26.7	2.65	10.6		63.17
A 0.12	8	32.0	7.62	42.9	-20.0	
A 0.23	9	39.6	12.69	65.3	-48.3	
A 0.46	9	24.2	2.14	11.02	9.2	
A 0.92	9	11.7	4.98	62.2	56.3 *	
A 1.85*	9	3.7	1.45	24.22	86.3 *	
A 2.31 *	9	0.0	0	100	100 *	
A 3.69 *	9	0.0	0.962	173.21	100 *	
S5% (K)	12	26.7	3.75	19.9		62.06
S1%	12	20.9	3.02	20.6	21.6	
S10%	12	27.9	4.29	28.5	-4.7	
K	18	112.7	34.8	30.9		48.73
S I	12	227.3	97.65	42.96	-100.8 *	
S II	12	191.6	37.02	19.3	-70.1 *	
S III	12	97.5	65.2	66.9	13.4	
Kontrola	18	37.8	9.99	26.41		35.8
Krivaja	12	50.4	13.15	26.1	-33.3	
Jegrička	12	40.7	16.8	41.3	-7.5	

Tabela P1 (f): Koncentracija hlorofila *a*

KONCENTRACIJA HLOROFILA <i>a</i> (mg/g)						
UZORAK	N	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	0.82	0.142	17.3		17.32
TL1	9	0.95	0.07	7.29	-15.15	
TL2 *	9	1.00	0.121	12.1	-21.72 *	
TL3 *	9	1.10	0.112	10.2	-34.03 *	
TJK	9	0.89	1.96	20.4		17.83
TJ1 *	9	0.92	1.18	17.1	28.2 *	
TJ2	9	1.03	20.3	26.15	19.5	
TJ3 *	9	0.82	1.37	28.1	49.5 *	
AK	20	0.94	0.098	10.3		28.57
A 0.12	9	1.02	0.57	55.5	-10.9	
A 0.23 *	9	1.42	0.56	39.4	-53.8 *	
A 0.46 *	9	1.16	0.068	5.86	-25.6 *	
A 0.92	9	1.08	0.126	11.7	-17.2	
A 1.85	9	0.75	0.17	22.4	18.1	
A 2.31	9	0.70	0.11	15.5	23.9	
A 3.69 *	6	0.54	0.15	27.6	41.9 *	

Tabela P1 (g): Sadržaj hlorofila *a* u nodusu (absorbanca)

SADRŽAJ HLOROFILA <i>a</i> (ABSORBANCA) (mg)						
UZORAK	N	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
TLK	9	7.27	2.02	27.7		19.01
TL1 *	9	4.93	0.38	7.65	32.2 *	
TL2 *	9	5.19	0.31	5.98	28.54 *	
TL3 *	9	5.69	0.63	11.1	21.73 *	
TJK	7	9.64	0.05	5.5		22.26
TJ1 *	8	6.92	0.113	12.22	-3.81	
TJ2	8	7.76	0.073	7.09	-15.98	
TJ3 *	9	4.87	0.133	16.2	7.83	
AK	20	9.26	2.96	32		27.62
A0.12	9	9.66	6.25	64.7	-4.3	
A0.23	9	11.65	2.62	21.9	-25.9	
A0.46	9	7.61	0.26	3.35	17.8	
A0.92	9	5.44	1.31	24.03	41.2 *	
A1.85 *	9	3.88	0.343	24.3	58.1	
A2.31 *	9	2.8	0.74	25.7	68.9	
A3.69 *	6	2.02	0.62	30.6	78.2	

## Prilog 2

Tabela P2: Parametri u kontaktnom testu toksičnosti sedimenta sa atrazinom (prikazane su srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV % – koeficijent varijacije unutar pojedinih kontrolnih i test tretmana i MSD % – minimalna statistički značajna razlika izražena kao procenat umanjnja u odnosu na kontrolu.

STOPA RASTA (sveža masa nodusa)					
U	SR. VR.	sd	CV%	INH %	MSD%
AK	0.101	0.016	15.9		25.58
A 0.12	0.093	0.027	28.8	7.5	
A 0.23	0.090	0.028	31.2	10.4	
A 0.46 *	0.061	0.011	18.6	39.1	
A 0.92 *	0.037	0.015	40.6	63.5	
A 1.85 *	0.026	0.006	22.5	74.0	
A 2.31 *	0.012	0.008	68.2	88.2	
A 3.69 *	-0.003	0.008	254.3	103.0	
MASA IZDANKA					
UZORAK	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
AK	31.93	21.4	67		40.19
A 0.12	26.76	13.43	50.6	16.2	
A 0.23	21.87	10.2	46.7	31.5	
A 0.46 *	12.17	3.6	29.3	61.9 *	
A 0.92 *	5.38	3.3	61.5	83.2 *	
A 1.85 *	2.97	0.351	11.84	90.7 *	
A 2.31 *	0	0	100	100 *	
A 3.69 *	0.23	0.404	176	99.3 *	
DUŽINA IZDANKA					
UZORAK	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
AK	25.04	2.65	10.6		39.04
A 0.12	17.78	7.62	42.9	29	
A 0.23	19.44	12.7	62.3	22.4	
A 0.46	19.44	2.14	11.02	22.4	
A 0.92 *	8	4.98	62.2	68.1 *	
A 1.85 *	6	1.45	24.2	76.0 *	
A 2.31 *	0	0	100	100 *	
A 3.69 *	0.56	0.962	173.2	97.8 *	
MASA KORENA					
UZORAK	SR. VR.	SD	CV%	INH %	MSD%
AK	4.1	0.76	18.4		51.66
A 0.12	4.7	1.8	38.1	-14.6	
A 0.23	5.5	3.5	63.3	-32.1	
A 0.46	2.4	0.7	29.5	42.4	
A 0.92	1.2	1.18	98.2	70.9 *	
A 1.85*	0.5	0.16	31.5	87.4 *	
A 2.31	0.0	0	100	100 *	
A 3.69	0.1	0.192	173.2	97.3 *	
DUŽINA KORENA					
AK	26.7	2.65	10.6		63.17



A 0.12	32.0	7.62	42.9	-20.0	
A 0.23	39.6	12.69	65.3	-48.3	
A 0.46	24.2	2.14	11.02	9.2	
A 0.92	11.7	4.98	62.2	56.3 *	
A 1.85*	3.7	1.45	24.22	86.3 *	
A 2.31 *	0.0	0	100	100 *	
A 3.69 *	0.0	0.962	173.21	100 *	
KONCENTRACIJA HLOOROFILA <i>a</i>					
AK	0.94	0.098	10.3		
A 0.12	1.02	0.57	55.5	-10.9	
A 0.23 *	1.42	0.56	39.4	-53.8 *	
A 0.46 *	1.16	0.068	5.86	-25.6 *	
A 0.92	1.08	0.126	11.7	-17.2	
A 1.85	0.75	0.17	22.4	18.1	
A 2.31	0.70	0.11	15.5	23.9	
A 3.69 *	0.54	0.15	27.6	41.9 *	28.57
SADRŽAJ HLOOROFILA <i>a</i> (ABSORBANCA)					
AK	9.26	2.96	32		
A0.12	9.66	6.25	64.7	-4.3	
A0.23	11.65	2.62	21.9	-25.9	
A0.46	7.61	0.26	3.35	17.8	
A0.92	5.44	1.31	24.03	41.2 *	
A1.85 *	3.88	0.343	24.3	58.1	
A2.31 *	2.8	0.74	25.7	68.9	
A3.69 *	2.02	0.62	30.6	78.2	27.62

## Prilog 3

Tabela P3 (a-b) Parametri rasta (prosečne i vrednosti u individualnim testovima) vrste *M. aquaticum* u voda-sediment sistemu. Prikazane su vrednosti a) prinosa (Y) i b) stope rasta (RGR) na osnovu dužine iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže mase (MSv), suve mase (MSu) i sveže mase korena (MK); vreme dupliranja (d.t.), koeficijent varijacije (CV%), minimalna statistički značajna razlika (MSD%), vrednosti inhibicije u pojedinačnim testovima i tretmanima, srednje inhibitorne koncentracije – IC<sub>50</sub>, NOEC vrednosti – najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat i LOEC vrednosti – najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajan efekat. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate metodom linearne interpolacije, \* su označeni statistički značajni tretmani. NOEC i LOEC vrednosti su određene poređenjem svakog tretmana sa kontrolom, korišćenjem Dunnett-ovog testa – jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama (zbog nejednakog broja replikata u kontroli i tretmanu). Statistička značajnost dodeljena je uniformno na  $p \leq 0.05$ .

Tabela P3 (a). Vrednosti prinosa (Y) u *M. aquaticum* testovima

PROSEČNE VREDNOSTI PRINOS (Y) – PARAMETRI RASTA u <i>M. aquaticum</i> testovima (n=6)				
<i>M. aquaticum</i>	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu
sr. vr. (min, max)	6.9 (4.0, 12.8)	7.5 (5.68, 12.96)	0.37 (0.19, 0.48)	0.016 (0.01, 0.02)
d.t. sr. vr. (min, max)				
CV%	14.41 (8.8, 20)	15.3 (8.23, 22.14)	17.8 (11.5, 21.9)	49.5 (25.9, 110.4)
MSD	22.2 (12.7, 38.6)	23.4 (17.41, 32.49)	34.4 (19.83, 59.5)	68.9 (36.3, 101.6)

KONTROLNE BILJKE <i>M. aquaticum</i>				
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
3,5 DCP	Dužina iznad sedimenta (DS)	Ukupna dužina (DU)	Sveža masa (MSv)	Suva masa (MSu)
1	30.12	9.68	17.78	72.68
1.8	17.23	16.52	6.96	76.83
3.2	34.74 *	46.63 *	29.43	88.67
5.6	76.36 *	57.38 *	55.77 *	114.64
10	95.96 *	104.89 *	79.55 *	139.44 *
IC <sub>50</sub>	4.230	3.950	5.072	0.695
NOEC	1.8	1.8	3.2	5.6
LOEC	3.2	3.2	5.6	10
PRINOS (Y)	5.77	5.68	0.484	0.024
CV%	15.57	20.4	21.31	110.44
MSD (%)	17.75	25.71	25.77	101.61
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
ATR	DS	DU	MSv	MSu
0.04	20.50	14.70	41.23	75.66
0.08	13.34	5.41	2.38	-24.63
0.16	28.75 *	12.67	29.81	44.69
0.32	38.1 *	18.33	61.88 *	85.25
0.64	59.28 *	47.64 *	63.57 *	78.47
IC <sub>50</sub>	0.499	>0.64	0.261	0.170
NOEC	0.08	0.32	0.16	0.64
LOEC	0.16	0.64	0.32	>0.64
PRINOS (Y)	4.04	6.58	0.235	0.008
CV%	16.6	17.68	21.88	41.78
MSD (%)	19.28	26.05	44.86	90.73

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
<b>IPU</b>	<b>DS</b>	<b>DU</b>	<b>MSv</b>	<b>MSu</b>
0.01	-1.78	-19.70	-45.80	-16.82
0.032	11.93	11.14	3.23	31.62
0.1	-12.62	4.24	-18.85	10.59
0.32	47.53 *	34.94 *	40.99	59.71
1	70.61 *	54.71 *	47.77	51.50
IC <sub>50</sub>	0.384	0.726	0.448	0.259
NOEC	0.1	0.1	1	1
LOEC	0.32	0.32	>1	>1
PRINOS (Y)	5.63	7.33	0.185	0.011
CV%	9.67	8.23	19.27	33
MSD (%)	38.63	17.62	59.51	63.05
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
<b>TRIF</b>	<b>DS</b>	<b>DU</b>	<b>MSv</b>	<b>MSu</b>
0.01	3.22	-3.20	-4.89	-0.34
0.032	23.00 *	39.33 *	14.82	20.80
0.1	36.85 *	51.25 *	20.86	22.24
0.32	53.67 *	64.75 *	32.89 *	35.47
1	59.44 *	54.71 *	40.63 *	30.76
IC <sub>50</sub>	0.270	0.098	>1	>1
NOEC	0.01	0.01	0.1	1
LOEC	0.032	0.032	0.32	>1
PRINOS (Y)	6.74	6.43	0.431	0.016
CV%	8.75	11.7	11.5	25.91
MSD (%)	12.70	17.41	19.83	36.29
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
<b>2,4 D</b>	<b>DS</b>	<b>DU</b>	<b>MSv</b>	<b>MSu</b>
0.01	-8.00	-18.40	15.90	2.08
0.032	3.61	-5.65	54.73 *	72.1 *
0.1	46.53 *	46.99 *	67.47 *	64.54
0.32	64.12 *	56.83 *	49.29 *	49.04
1	71.33 *	72.13 *	53.29 *	56.98
IC <sub>50</sub>	0.127	0.171	0.029	0.028
NOEC	0.032		0.01	0.01
LOEC	0.1		0.032	0.032
PRINOS (Y)	6.32	6.1	0.429	0.015
CV%	19.96	22.14	17.38	45.35
MSD (%)	22.48	32.49	23.81	58.09
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
<b>DIKAMBA</b>	<b>DS</b>	<b>DU</b>	<b>MSv</b>	<b>MSu</b>
0.01	-19.93	-20.11	14.08	-4.99
0.032	0.44	-3.82	-13.20	-48.46
0.1	10.88	10.08	-28.96	-27.81
0.32	15.14	12.85	-8.82	-1.57
1	42.3 *	38.89 *	29.55	35.98
3.2	75.72 *	77.48 *	59.18 *	50.54
IC <sub>50</sub>	1.29	1.44	2.29	1.99
NOEC	0.32	0.32	1	3.2
LOEC	1	1	3.2	>3.2
PRINOS (Y)	12.77	12.96	0.431	0.021
CV%	15.88	11.53	15.41	40.45

MSD (%)	22.09	20.97	32.81	63.75
---------	-------	-------	-------	-------

Tabela P3 (b). Vrednosti stope rasta (RGR) u *M. aquaticum* testovima

PROSEČNE VREDNOSTI STOPA RASTA (RGR) – PARAMETRI RASTA u <i>M. aquaticum</i> testovima (n=6)					
<i>M. aquaticum</i>	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
sr. vr. (min, max)	<b>0.11</b> (0.07, 0.2)	0.093 (0.07, 0.14)	<b>0.12</b> (0.07, 0.16)	0.062 (0.04, 0.09)	0.016
d.t. sr. vr. (min, max)	6.74 (3.7, 9.5)	7.99 (5.13, 10.5)	6.33 (4.33, 9.9)	12.07 (7.37, 16.9)	
CV%	12.9 (9.3, 18.7)	11.68 (4.8, 18.2)	12.5 (7.1, 16.7)	35.7 (19.3, 42.4)	27.3 (21.9, 49.5)
MSD	14.8 (11.9, 18.4)	19.21 (13.9, 27.1)	35.93 (13.6, 57.9)	51.71 (17.8, 91.4)	32.2 (18.8, 44.5)

KONTROLNE BILJKE <i>M. aquaticum</i>				
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)			
3,5 DCP	Dužina iznad sedimenta (DS)	Ukupna dužina (DU)	Sveža masa (MSv)	Suva masa (MSu)
1	14.91	7.34	10.86	53.20
1.8	14.80	14.45	5.69	62.30
3.2	26.77 *	40.77 *	19.95	80.41 *
5.6	65.12 *	53.10 *	43.59 *	139.55 *
10	94.33 *	106.99 *	69.81 *	216.55 *
IC <sub>50</sub>	4.669	4.978	6.55	0.94
NOEC	1.8	1.8	3.2	1.8
LOEC	3.2	3.2	5.6	3.2
Stopa rasta (RGR)	<b>0.101</b>	0.07	<b>0.152</b>	0.07
CV%	11.4	16.5	13.5	42.9
d.t.	6.86	9.90	4.56	9.90
MSD (%)	14.42	21.84	57.91	17.76

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)				
ATR	DS	DU	MSv	MSu	MK
0.04	7.81	11.55	36.43	81.53	12.75
0.08	7.24	3.7	2.65	-20.34	11.94
0.16	23.76	9.33	25.57	47.01	48.75 *
0.32	27.94 *	9.8	50.87 *	79.46	74.98 *
0.64	50.31 *	41.23	57.90 *	80.64	89.43 *
IC <sub>50</sub>	0.317	0.074	0.442	0.606	0.294
NOEC	0.16	0.64	0.32	0.08	0.08
LOEC	0.32	>0.64	0.64	0.16	0.16
Stopa rasta (RGR)	<b>0.086</b>	0.088	<b>0.094</b>	0.043	0.0083
CV%	12.5	13.2	16.7	41.5	21.9
d.t.	8.06	7.88	7.37	16.12	/
MSD (%)	15.30	20.50	38.93	91.39	33.32

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)			
IPU	DS	DU	MSv	MSu
0.01	2.56	-11.75	-36.49	-15.97
0.032	9.02	7.36	-1.21	24.84
0.1	25.44 *	2.91	-10.61	12.45
0.32	43.45 *	24.47 *	27.50	43.54
1	63.98 *	44.19 *	43.37	49.27
IC <sub>50</sub>	0.547	>1	>1	0.796
NOEC	0.032	0.1	1	1
LOEC	0.1	0.32	>1	>1
Stopa rasta (RGR)	<b>0.111</b>	0.123	<b>0.07</b>	0.059

CV%	9.3	4.8	12.8	31.1
d.t.	6.24	5.64	9.90	11.75
MSD (%)	15.73	13.87	52.72	58.54

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)			
TRIF	DS	DU	MSv	MSu
0.01	6.22	-1.89	-3.89	-1.21
0.032	13.35	33.42 *	8.43	14.64
0.1	28.37 *	44.93 *	13.64	18.91
0.32	43.31 *	61.70 *	24.54 *	33.06
1	51.38 *	48.56 *	28.99 *	25.69
IC <sub>50</sub>	0.939	0.200	>1	>1
NOEC	0.032	0.01	0.1	1
LOEC	0.1	0.032	0.32	>1
Stopa rasta (RGR)	<b>0.113</b>	0.078	<b>0.16</b>	0.094
CV%	8.5	9.3	7.1	19.3
d.t.	6.13	8.89	4.33	7.37
MSD (%)	12.77	16.08	13.61	28.21

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)				
2,4 D	DS	DU	MSv	MSu	MK
0.01	-2.83	-14.1	10.84	2.80	13.06
0.032	6.82	-3.52	46.89 *	72.74 *	31.03
0.1	37.17 *	41.39 *	59.88 *	65.07	33.28
0.32	57.85 *	51.92 *	41.30 *	52.58	56.02 *
1	62.67 *	66.94 *	45.87 *	60.23	64.21 *
IC <sub>50</sub>	0.234	0.237	>1	0.0274	0.262
NOEC	0.032	0.032	0.01	0.01	0.1
LOEC	0.1	0.1	0.032	0.032	0.32
Stopa rasta (RGR)	<b>0.095</b>	0.066	<b>0.108</b>	0.041	0.021
CV%	17.3	18.2	12.7	42.4	49.5
d.t.	7.30	10.50	6.42	16.91	/
MSD (%)	18.41	27.08	21.05	55.22	44.48

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)				
DIKAMBA	DS	DU	MSv	MSu	MK
0.01	-7.00	-12.56	20.71	-8.30	37.31 *
0.032	2.80	-1.87	-10.09	-43.59	58.75 *
0.1	9.47	7.3	-18.69	-26.22	34.44 *
0.32	10.55	8.63	-7.83	-5.75	43.84 *
1	30.71 *	29.55 *	19.35	31.27	60.33 *
3.2	62.95 *	67.97 *	49.55 *	48.70	75.97 *
IC <sub>50</sub>	2.24	2.055	3.141	2.365	0.521
NOEC	0.32	0.32	1	3.2	<0.01
LOEC	1	1	3.2	> 3.2	0.01
Stopa rasta (RGR)	<b>0.190</b>	0.135	<b>0.129</b>	0.067	0.020
CV%	18.7	8.1	12.2	37.2	10.5
d.t.	3.65	5.13	5.37	10.35	/
MSD (%)	11.89	15.91	31.36	59.15	18.78

## Prilog 4

Tabela P4 (a, b) Parametri rasta vrste *M. spicatum* u voda-sediment sistemu, test 7d + 14 d. Prikazane su vrednosti a) prinosa (Y) i b) stope rasta (RGR) na osnovu dužine iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže mase (MSv), suve mase (MSu) i sveže mase korena (MK); vreme dupliranja (d.t.), koeficijent varijacije (CV%), minimalna statistički značajna razlika (MSD%), vrednosti inhibicije u tretmanima, srednje inhibitorne koncentracije – IC<sub>50</sub>, NOEC vrednosti – najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat i LOEC vrednosti – najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajan efekat. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate metodom linearne interpolacije, \* su označeni statistički značajni tretmani. NOEC i LOEC vrednosti su određene poređenjem svakog tretmana sa kontrolom, korišćenjem Dunnett-ovog testa – jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama (zbog nejednakog broja replikata u kontroli i tretmanu). Statistička značajnost dodeljena je uniformno na  $p \leq 0.05$ .

Tabela P4 (a) Vrednosti prinosa (Y) u *M. spicatum* testu

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)				
	IZOPROTURON	DS	DU	MSv	MSu
0.01		21.43	37.64 *	54.44	87.91 *
0.032		18.23	21.79	26.34	47.39
0.1		77.38 *	70.54 *	101.91 *	139.16 *
0.32		97.99 *	103.71 *	155.55 *	148.81 *
1		101.17 *	108.55 *	172.12 *	148.81 *
IC <sub>50</sub>		0.068	0.066	0.043	0.060
NOEC		0.032	0.032	0.032	<0.01
LOEC		0.1	0.1	0.1	0.01
YIELD		14.93	16.48	0.338	0.02
CV%		22.64	11.54	33.62	41.93
d.t.					
MSD %		28.45	22.43	54.64	61.96

Tabela P4 (b) Vrednosti stope rasta (RGR) u *M. spicatum* testu

KONTROLNE BILJKE <i>M. spicatum</i>							
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)						
	IZOPROTURON	DS	DU	MSv	MSu	IPU	MK
0.01		13.72	32.36 *	68.27	114.42	0.01	73.90
0.032		11.25	14.80	21.58	48.90	0.032	42.61
0.1		68.47 *	64.68 *	115.99	179.74	0.1	99.39 *
0.32		96.69 *	109.85 *	305.82 *	188.65	0.32	100 *
1		97.87 *	119.93 *	501.65 *	188.65	1	100 *
IC <sub>50</sub>		0.078	0.076	0.038	0.006	IC <sub>50</sub>	0.009
NOEC		0.032	0.032	0.1	1	NOEC	0.032
LOEC		0.1	0.1	0.32	>1	LOEC	0.1
RGR		0.072	0.077	0.058	0.034	value	0.0096
CV%		22.31	6.65	21.77	36.68	CV%	59.39
d.t.		9.63	9.00	11.95	20.39	d.t.	/
MSD %		25.31	21.29	117.62	75.89	MSD (%)	65.90

## Prilog 5

Tabela P5 (a-b) Parametri rasta (prosečne i vrednosti u individualnim testovima) vrste *M. spicatum* u voda-sediment sistemu, testovi 3d + 7d. Prikazane su vrednosti a) prinosa (Y) i b) stope rasta (RGR) na osnovu dužine iznad sedimenta (DS), ukupne dužine (DU), sveže mase (MSv), suve mase (MSu) i sveže mase korena (MK); vreme dupliranja (d.t.), koeficijent varijacije (CV%), minimalna statistički značajna razlika (MSD%), vrednosti inhibicije u pojedinačnim testovima i tretmanima, srednje inhibitorne koncentracije – IC<sub>50</sub>, NOEC vrednosti – najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat i LOEC vrednosti – najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajan efekat. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate metodom linearne interpolacije, \* su označeni statistički značajni tretmani. NOEC i LOEC vrednosti su određene poređenjem svakog tretmana sa kontrolom, korišćenjem Dunnett-ovog testa – jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama (zbog nejednakog broja replikata u kontroli i tretmanu). Statistička značajnost dodeljena je uniformno na  $p \leq 0.05$ .

Tabela P5 (a). Vrednosti prinosa (Y) u *M. spicatum* testovima

PROSEČNE VREDNOSTI PRINOS (Y) – PARAMETRI RASTA <i>M. spicatum</i> testovima (n=3)				
<i>M. spicatum</i>	Y DS	Y DU	Y MSv	Y MSu
sr. vr. (min, max)	9.9 (6.8, 11.6)	9.3 (5.8, 11.4)	0.16 (0.06, 0.03)	0.01 (0.01, 0.02)
d.t. sr. vr. (min, max)				
CV%	19 (13.8, 26.0)	27.3 (18.4, 33.1)	92.4 (66.2, 121.4)	89.1 (46.3, 162.6)
MSD	27.18 (16, 39.2)	40.04 (31.2, 55.7)	142.5 (68.5, 234.3)	113 (67.8, 198.8)

KONTROLNE BILJKE <i>M. spicatum</i>				
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
ATR	Dužina iznad sedimenta (DS)	Ukupna dužina (DU)	Sveža masa (SvM)	Suva masa (SuM)
0.01	-17.01	37.28	6.17	80.39
0.032	14.61	-9.22	37.73	61.28
0.1	48.28 *	14.70	167.62	87.97
0.32	68.81 *	54.29	244.35	176.65 *
1	78.30 *	76.34	288.94	180.89 *
IC <sub>50</sub>	0.098	0.262	0.044	0.007
NOEC	0.032	1	1	0.1
LOEC	0.1	>1	>1	0.32
PRINOS (Y)	6.88	5.78	0.061	0.015
CV%	17.19	30.42	121.36	58.35
d.t.				
MSD %	39.17	55.67	234.33	72.37

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
IPU	DS	DU	MSv	MSu
0.01	-20.94	-36.89	-46.91	-26.59
0.032	-0.43	-12.89	-24.98	15.90
0.1	12.12	14.05	98.41	192.10
0.32	71.15 *	79.61 *	134.50	215.65
1	80.64 *	85.19 *	155.51 *	262.75 *
IC <sub>50</sub>	0.228	0.200	0.067	0.058
NOEC	0.1	0.1	0.32	0.32
LOEC	0.32	0.32	1	1
PRINOS (Y)	11.6	10.56	0.147	0.008
CV%	13.78	18.42	89.63	162.56
d.t.				
MSD %	15.99	31.23	124.64	198.80

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)			
	2,4 D	DS	DU	MSv
0.01	13.26	12.28	0.87	-14.98
0.032	6.48	9.18	15.57	-11.54
0.1	51.84 *	53.75 *	44.46	33.41
0.32	59.42 *	57.73 *	41.07	38.42
1	76.37 *	79.58 *	63.69	56.09
IC <sub>50</sub>	0.097	0.094	0.393	0.641
NOEC	0.032	0.032	1	1
LOEC	0.1	0.1	>1	>1
PRINOS (Y)	11.14	11.44	0.265	0.014
CV%	26.03	33.13	66.23	46.28
d.t.				
MSD %	26.38	33.23	68.48	67.76

Tabela P5 (b): Vrednosti stope rasta u *M. spicatum* testovima

PROSEČNE VREDNOSTI STOPA RASTA (RGR) – PARAMETRI RASTA <i>M. spicatum</i> testovima (n=3)					
<i>M. spicatum</i>	RGR DS	RGR DU	RGR MSv	RGR MSu	MK
sr. vr. (min, max)	<b>0.15</b> (0.13, 0.17)	0.09 (0.06, 0.12)	<b>0.04</b> (0.01, 0.07)	0.04 (0.02, 0.05)	0.01 (0.004, 0.01)
d.t. sr. vr. (min, max)	4.75 (4.1, 5.5)	7.95 (5.64, 11)	31.5 (9.8, 63.01)	23.6 (13.3, 43.3)	
CV%	17.92 (12.8, 27.3)	27.5 (14.6, 44.7)	140.4 (63.1, 271.8)	168.8 (48.1, 269.5)	56.9 (35.9, 81.5)
MSD	21.49 (12.7, 34.7)	36.83 (25.1, 58.8)	254.7 (68.9, 562.6)	145.60 (70.8, 282.3)	66.6 (48.4, 95.5)

KONTROLNE BILJKE <i>M. spicatum</i>					
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)				
	ATR	Dužina iznad sedimenta (DS)	Ukupna dužina (DU)	Sveža masa (SvM)	Suva masa (SuM)
0.01	-8.92	-40.91	3.45	88.46	-11.01
0.032	12.62	-21.97	50.27	75.59	41.51
0.1	41.33	5.99	346.89	114.91 *	88.37
0.32	57.96 *	41.45	594.56	254.24 *	100.00
1	70.56 *	70.68	682.63	259.68 *	100.00
IC <sub>50</sub>	0.195	0.335	0.032	0.006	0.043
NOEC	0.1	1	1	0.032	1
LOEC	0.32	>1	>1	0.1	>1
RGR	<b>0.127</b>	0.063	<b>0.011</b>	0.052	0.0035
CV%	27.31	44.68	271.77	269.51	81.50
d.t.	5.46	11.00	63.01	13.33	/
MSD %	34.68	58.80	562.57	83.67	95.49

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)				
	IPU	DS	DU	MSv	MSu
0.01	-6.76	-23.88	-39.52	-19.33	-60.29
0.032	-0.05	-9.05	-25.27	9.75	24.38
0.1	5.00	14.67	115.62	281.05	44.81
0.32	60.77 *	76.16 *	178.02 *	364.06 *	99.92 *
1	72.66 *	81.40 *	209.71 *	440.85 *	98.30 *
IC <sub>50</sub>	0.273	0.212	0.066	0.060	0.084
NOEC	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
LOEC	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
RGR	<b>0.148</b>	0.096	<b>0.032</b>	0.016	0.014
CV%	12.84	14.62	86.42	188.73	35.92
d.t.	4.68	7.22	21.66	43.32	/
MSD %	12.65	26.62	132.76	282.29	48.39



Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)				
	<b>DS</b>	<b>DU</b>	<b>MSv</b>	<b>MSu</b>	<b>MK</b>
<b>2,4 D</b>					
0.01	6.99	5.70	-10.41	-21.98	30.91
0.032	3.89	3.50	11.87	-7.51	-30.29
0.1	35.95 *	43.52 *	45.41	41.26	45.78
0.32	42.20 *	47.52 *	34.40	34.78	98.61 *
1	62.00 *	71.38 *	61.97	54.72	100 *
IC <sub>50</sub>	0.591	0.392	0.568	0.658	0.118
NOEC	0.1		1	1	0.1
LOEC	0.032		>1	>1	0.32
RGR	<b>0.169</b>	0.123	<b>0.071</b>	0.049	0.0072
CV%	13.61	23.1	63.14	48.09	53.28
d.t.	4.10	5.64	9.76	14.15	/
MSD %	17.13	25.08	68.90	70.83	56.03

## Prilog 6

Tabela P6 (a, b) Parametri rasta (prosečne i vrednosti u individualnim testovima) vrste *Lemna minor* Prikazane su vrednosti a) prinosa (Y) i b) stope rasta (RGR) na osnovu broja jedinki (BJ), sveže mase (MSv), biljne površine (BP); vreme dupliranja (d.t.), koeficijent varijacije (CV%), minimalna statistički značajna razlika (MSD%), vrednosti inhibicije u pojedinačnim testovima i tretmanima, srednje inhibitorne koncentracije – IC<sub>50</sub>, NOEC vrednosti – najviše koncentracije test supstanci koje ne izazivaju statistički značajan efekat i LOEC vrednosti – najniže koncentracije test supstanci koje izazivaju statistički značajan efekat. IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate metodom linearne interpolacije, \* su označeni statistički značajni tretmani. NOEC i LOEC vrednosti su određene poređenjem svakog tretmana sa kontrolom, korišćenjem Dunnett-ovog testa – jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama (zbog nejednakog broja replikata u kontroli i tretmanu). Statistička značajnost dodeljena je uniformno na  $p \leq 0.05$ .

Tabela P6 (a): Vrednosti prinosa u *Lemna minor* testovima

<i>L. minor</i> – prinos	Y BJ	Y MSv	Y BP
sr. vr. (min, max)	92.9 (57.5, 107.6)	0.15 (0.12, 0.2)	4.0 (3.03, 5.19)
d.t. sr. vr. (min, max)			
CV% sr. vr. (min, max)	21.7 (11.6, 29.5)	28.9 (4.8, 39.5)	27.9 (18.2, 37.1)
MSD sr. vr. (min, max)	23.7 (13.1, 33.3)	33.4 (5.7, 57.6)	39.9 (30.2, 63.5)

KONTROLNE BILJKE <i>L. minor</i>			
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)		
3,5 DCP	Y BJ	Y MSv	Y BP
0.625	-13	-16.34	-33.98
1.25	-1.86	-25.2	-36.75
2.5	60.06 *	89.84 *	59.07 *
5	98.76 *	103.89 *	111.41 *
10	99.69 *	101.70 *	114.39 *
EC50	2.25	1.94	2.208
NOEC	1.25	1.25	1.25
LOEC	2.5	2.5	2.5
PRINOS (Y)	107.67	0.196	3.876
CV%	29.5	39.54	37.11
d.t.			
MSD %	33.3	44.14	42.68

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)		
ATR	Y BJ	Y MSv	Y BP
0.08	29.92 *	65.57 *	
0.16	65.44 *	92.61 *	
0.32	92.48 *	103.11 *	
0.64	96.48 *	104.31 *	
1.28	96.32 *	104.27 *	/
EC50	0.125	0.061	/
NOEC	<0.08	<0.08	
LOEC	0.08	0.08	
PRINOS (Y)	104.17	0.216	/
CV%	24.67	36.74	/
d.t.			
MSD %	18.37	21.46	/

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)		
----------------------	-------------------------	--	--

IPU	Y BJ	Y MSv	Y BP
0.01	39.93 *	53.02 *	44.51 *
0.032	13.09	11.2	6.9
0.1	35.91 *	59.22 *	40.38 *
0.32	91.28 *	96.04 *	93.32 *
1	101.01 *	100.97 *	105.7 *
EC50	0.156	0.077	0.14
NOEC	<0.01	<0.01	<0.01
LOEC	0.01	0.01	0.01
PRINOS (Y)	99.33	0.119	3.967
CV%	23.38	33.76	31.55
d.t.			
MSD %	23.71	33.31	32.58

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)		
TRIF	Y BJ	Y MSv	Y BP
0.01	-15.44	-33.4 *	-35.48 *
0.032	8.72	12.43	8.72
0.1	5.37	-11.14	-7.97
0.32	55.03 *	61.35	7.5
1	82.38 *	82.15 *	85.6 *
EC50	0.285	0.258	0.639
NOEC	0.1	0.32	0.32
LOEC	0.1	1	1
PRINOS (Y)	99.33	0.119	3.967
CV%	23.38	33.76	31.55
d.t.			
MSD %	32.24	57.62	63.45

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)		
2,4 D	Y BJ	Y MSv	Y BP
0.01	14.2	-6.08	14.43
1	15.36	11.52 *	6.49
10	50.72 *	45.33 *	47.61 *
EC50	9.82	>10	7.08
NOEC	1	0.01	1
LOEC	10	1	10
PRINOS (Y)	57.5	0.116	3.025
CV%	11.58	4.77	20.31
d.t.			
MSD %	13.12	5.66	30.33

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % PRINOS (Y)		
DIKAMBA	Y BJ	Y MSv	Y BP
1	-0.37	-13.85	-1.45
5	13.01	-32.6	-17.79
10	5.2	-48.13 *	-30.86
EC50	>10	>10	>10
NOEC	10	10	10
LOEC	>10	>10	>10
PRINOS (Y)	89.67	0.122	5.187
CV%	17.7	24.59	18.91
d.t.			

MSD %	21.47	38.36	30.22
-------	-------	-------	-------

Tabela P6 (b): Vrednosti prinosa u *Lemna minor* testovima

<i>L. minor</i> – stopa rasta	RGR BJ	RGR MSv	RGR BP
sr. vr. (min, max)	0.33 (0.26, 0.4)	0.4 (0.34, 0.43)	0.31 (0.28, 0.33)
d.t. sr. vr. (min, max)	2.16 (1.92, 2.7)	1.79 (1.6, 2.07)	2.28 (2.08, 2.4)
CV% sr. vr. (min, max)	8.9 (5.5, 11.9)	8.4 (4.3, 14.9)	11.3 (8, 19.2)
MSD sr. vr. (min, max)	10.7 (7.06, 13.2)	13.2 (7.7, 20.1)	18.3 (10.8, 25.4)

KONTROLNE BILJKE <i>L. minor</i>			
Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)		
3,5 DCP	Broj jedinki	Sveža masa	Biljna
0.625	-4.93	-10.59	-18.39
1.25	-1.65	-4.63	-20.74
2.5	30.68 *	67.45*	34.34 *
5	94.71 *	142.65 *	100*
10	98.61 *	112.86 *	100*
EC50	3.22	2.16	2.91
NOEC	0.625	1.25	1.25
LOEC	1.25	2.5	2.5
Stopa rasta (RGR)	0.361	0.433	0.284
CV%	11.91	14.87	19.24
d.t.	1.92	1.6	2.44
MSD %	12.93	20.12	19.28

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)		
ATR	Broj jedinki	Sveža masa	Biljna
0.08	13.12 *	32.30 *	
0.16	36.26 *	74.29 *	
0.32	76.33 *	126.58 *	
0.64	86.92 *	153.08 *	
1.28	86.15 *	143.25 *	/
EC50	0.215	0.114	0.252
NOEC	<0.08	<0.08	0.08
LOEC	0.08	0.08	0.16
Stopa rasta (RGR)	0.359	0.415	/
CV%	9	8.3	/
d.t.	1.93	1.67	/
MSD %	11.51	19.15	/

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)		
IPU	Broj jedinki	Sveža masa	Biljna
0.01	19.28 *	9.93 *	15.14
0.032	4.68	-6.82	-3.7
0.1	16.42 *	25.32 *	21.69
0.32	74.74 *	78.15 *	77.80 *
1	104.17 *	109.93 *	143.78 *
EC50	0.227	0.203	0.211
NOEC	<0.01	<0.01	0.1
LOEC	0.01	0.01	0.32
Stopa rasta (RGR)	0.327	0.401	0.306
CV%	9.8	6.4	10.2
d.t.	2.12	1.73	2.27

MSD %	10.71	8.16	21
-------	-------	------	----

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)		
TRIF	Broj jedinki	Sveža masa	Biljna
0.01	-5.99	-4.66	-6.37
0.032	4.14	7.35	6.08
0.1	1.4	3.79	4.94
0.32	29.12 *	29.05 *	10.54
1	60.06 *	55.16 *	68.83 *
EC50	0.756	0.846	0.769
NOEC	0.1	0.1	0.32
LOEC	0.32	0.32	1
Stopa rasta (RGR)	0.327	0.401	0.306
CV%	9.8	6.4	10.2
d.t.	2.12	1.73	2.27
MSD %	13.17	11.68	25.4

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)		
2,4 D	Broj jedinki	Sveža masa	Biljna
0.01	6.8	-3.44	8.14
1	7.39	5.81	2.41
10	30.48 *	22.16 *	43.29 *
EC50	>10	>10	>10
NOEC	1	1	1
LOEC	10	10	10
Stopa rasta (RGR)	0.261	0.357	0.297
CV%	5.5	4.3	8
d.t.	2.66	1.94	2.33
MSD %	7.06	7.74	15.21

Koncentracija (mg/l)	INHIBICIJA % STOPA RASTA (RGR)		
DIKAMBA	Broj jedinki	Sveža masa	Biljna
1	-0.46	-5.29	1.3
5	5.33	-18.08	-7.36
10	1.99	-18.91	-8.99
EC50	>10	>10	>10
NOEC	10	10	10
LOEC	>10	>10	>10
Stopa rasta (RGR)	0.315	0.336	0.334
CV%	7.2	10	9
d.t.	2.2	2.07	2.08
MSD %	8.97	12.31	10.79

## Prilog 7

Tabela P7 a: Lista vrsta i vrednosti IC<sub>50</sub> upotrebljenih u modelu distribucije vrsta (SSD)

3,5 DCP				
NAZIV VRSTE	PARAMETAR	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Y MSu	7 d	0.7	LECOTOX
<i>Lemna aequinoctialis</i>	Y MSu	4 d	1.6	Bengtsson i sar, 1999
<i>Lemna minor</i>	Y MSv	7 d	1.94	LECOTOX
<i>Myriophyllum spicatum</i>	dužina korena	14 d	3.2	Mohr i sar, 2013
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Y i RGR dužine izdanka i MSv	9 d	8.9	Granse i sar, 2008
ATRAZIN				
NAZIV VRSTE	PARAMETAR	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<i>Elodea canadensis</i>	sveža masa korena	14 d	0.002	McGregor i sar, 2008
<i>Myriophyllum spicatum</i>	RGR MSu		0.006	LECOTOX
<i>Ceratophyllum demersum</i>	populacija, biomasa	14 d	0.022	Fairchild i sar, 1998
<i>Najas</i> sp.	populacija, biomasa	14 d	0.024	Fairchild i sar, 1994
<i>Lemna gibba</i>	populacija, biomasa	14 d	0.051	Hoberg, 1993
<i>Lemna minor</i>	Y MSv	7 d	0.06	LECOTOX
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	RGR DU	7 d	0.074	LECOTOX
<i>Myriophyllum heterophyllum</i>	populacija biomasa	14 d	0.132	Fairchild i sar, 1998
<i>Vallisneria americana</i>	dužina svih listova	47 d	0.163	Forney, 1980
<i>Lemna aequinoctialis</i>	stopa rasta	8 d	0.2	Grossmann i sar, 1992
<i>Hydrilla verticillata</i>	rast, dužina	14 d	0.253	Hinman, 1989
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	inhibicija rasta	21 d	0.32	Forney i Davis, 1981
<i>Myriophyllum sibiricum</i>	dužina korena	14 d	1.13	Roshon i sar, 1997
<i>Ruppia maritima</i>	rast, dužina	35 d	2.5	Johnson i Bird, 1995
<i>Typha latifolia</i>	rast, biomasa	7 d	8.76	Marecik i sar, 2012
<i>Lemna perpusilla</i>	stopa rasta populacije	7d	13.49	Phewnil i sar, 2012
<i>Iris pseudacorus</i>	rast, biomasa	35 d	24.23	Wang i sar, 2014
<i>Acorus americanus</i>	rast, biomasa	7 d	24.3	Marecik i sar, 2012
IZOPROTURON				
NAZIV VRSTE	PARAMETAR	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Y MSu	7 d	0.058	LECOTOX
<i>Lemna aequinoctialis</i>	stopa rasta populacije	7 d	0.072	Michel, 2004
<i>Lemna minor</i>	Y MSv	7 d	0.08	LECOTOX
<i>Lemna gibba</i>	hronična toksičnost	/	0.081	EC SANCO, 2002
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Y MSu	7 d	0.26	LECOTOX

TRIFLURALIN				
NAZIV VRSTE	PARAMETAR	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<i>Lemna gibba</i>	populacija, abundanca	14 d	0.044	US EPA, 2013
<b><i>Myriophyllum aquaticum</i></b>	<b>Y DU</b>	<b>7 d</b>	<b>0.098</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Y dužina izdanka	14 d	0.165	Ratte i Ratte, 2014
<b><i>Lemna minor</i></b>	<b>Y MSv</b>	<b>7 d</b>	<b>0.26</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Lemna perpusilla</i>	Smrtnost LC <sub>50</sub>	7 d	100	Nishiuchi i Yoshida, 1974 cit. - Balogh i Walker, 1992
2,4 D				
NAZIV VRSTE	PARAMETAR	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<i>Myriophyllum sibiricum</i>	dužina korena	14 d	0.0131	Roshon et al, 1996
<b><i>Myriophyllum aquaticum</i></b>	<b>Y MSu</b>	<b>7 d</b>	<b>0.027</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Ranunculus aquatilis</i>	dužina korena	28 d	0.092	Belgers i sar, 2007
<b><i>Myriophyllum spicatum</i></b>	<b>Y DS</b>	<b>7 d</b>	<b>0.094</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Ranunculus circinatus</i>	dužina korena	28 d	0.1	Belgers i sar, 2007
<i>Ranunculus peltatus</i>	dužina izdanka	28 d	0.14	Belgers i sar, 2007
<i>Potamogeton lucens</i>	dužina korena	28 d	0.181	Belgers i sar, 2007
<i>Potamogeton crispus</i>	dužina korena	28 d	0.29	Belgers i sar, 2007
<i>Elodea nuttalli</i>	dužina korena	28 d	0.574	Belgers i sar, 2007
<i>Lemna gibba</i>	populacija	14 d	0.58	EC, 2001
<i>Lemna aequinoctialis</i>	RGR populacije	7 d	2.21	Michel i sar, 2004
<b><i>Lemna minor</i></b>	<b>Y BP</b>	<b>7 d</b>	<b>7.08</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Lemna trisulca</i>	MSu, biomasa, RGR	28 d	>3	Belgers i sar, 2007
DIKAMBA				
NAZIV VRSTE	PARAMETAR	Trajanje	Vrednost IC <sub>50</sub>	Referenca
<b><i>Myriophyllum aquaticum</i></b>	<b>MK</b>	<b>7 d</b>	<b>0.52</b>	<b>LECOTOX</b>
<i>Lemna gibba</i>	populacija, abundanca	14 d	>3.25	EFSA, 2007
<i>Myriophyllum verticillatum</i>	biomasa	14 d	>3.7	EFSA, 1965
<i>Lemna aequinoctialis</i>	RGR populacije	7 d	16.58	Michel i sar, 2004
<b><i>Lemna minor</i></b>	<b>svi parametri</b>	<b>7 d</b>	<b>&gt;10</b>	<b>LECOTOX</b>

Tabela P7 b: Parametri SSD

3,5 DCP	
<b>Slope</b>	2.372
<b>Intercept</b>	4.150
<b>R<sup>2</sup></b>	0.973
<b>GrandMean</b>	0.358
<b>SumSQ</b>	1.305
<b>CSSQ</b>	0.663
<b>MSE</b>	0.034
<b>Tcrit</b>	2.353
<b>N</b>	5
<b>df</b>	3
<b>HC5 (ppb)</b>	3.61
<b>HC50 (ppb)</b>	17.8

TRIFLURALIN	
<b>Slope</b>	0.627
<b>Intercept</b>	5.217
<b>R<sup>2</sup></b>	0.740
<b>GrandMean</b>	-0.347
<b>SumSQ</b>	7.812
<b>CSSQ</b>	7.212
<b>MSE</b>	0.332
<b>Tcrit</b>	2.353
<b>N</b>	5
<b>df</b>	3
<b>HC5 (ppb)</b>	0.00000001
<b>HC50 (ppb)</b>	0.000005

ATRAZIN	
<b>Slope</b>	0.801
<b>Intercept</b>	5.445
<b>R<sup>2</sup></b>	0.961
<b>GrandMean</b>	-0.556
<b>SumSQ</b>	30.681
<b>CSSQ</b>	25.117
<b>MSE</b>	0.041
<b>Tcrit</b>	1.746
<b>N</b>	18
<b>df</b>	16
<b>HC5 (ppb)</b>	0.0000014
<b>HC50 (ppb)</b>	0.00016

2,4 D	
<b>Slope</b>	1.274
<b>Intercept</b>	5.842
<b>R<sup>2</sup></b>	0.965
<b>GrandMean</b>	-0.661
<b>SumSQ</b>	11.658
<b>CSSQ</b>	6.416
<b>MSE</b>	0.038
<b>Tcrit</b>	1.812
<b>N</b>	12
<b>df</b>	10
<b>HC5 (ppb)</b>	0.0013
<b>HC50 (ppb)</b>	0.026

IZOPROTURON	
<b>Slope</b>	3.294
<b>Intercept</b>	8.395
<b>R<sup>2</sup></b>	0.740
<b>GrandMean</b>	-1.031
<b>SumSQ</b>	5.572
<b>CSSQ</b>	0.262
<b>MSE</b>	0.332
<b>Tcrit</b>	2.353
<b>N</b>	5
<b>df</b>	3
<b>HC5 (ppb)</b>	0.9
<b>HC50 (ppb)</b>	2.83

DIKAMBA	
<b>Slope</b>	1.278
<b>Intercept</b>	4.051
<b>R<sup>2</sup></b>	0.970
<b>GrandMean</b>	0.743
<b>SumSQ</b>	5.039
<b>CSSQ</b>	2.280
<b>MSE</b>	0.038
<b>Tcrit</b>	2.353
<b>N</b>	5
<b>df</b>	3
<b>HC5 (ppb)</b>	0.0015
<b>HC50 (ppb)</b>	0.028



## BIOGRAFIJA



Tanja Tunić rođena je 9.3.1982. godine u Senti. Prirodno-matematički fakultet, Odsek za biologiju i ekologiju, smer Diplomirani ekolog za zaštitu životne sredine je upisala školske 2001 godine.

Osnovne studije je završila 2007. godine prosekom 8.81. Diplomski rad: „Bioprodukcija genotipova vrba (*Salix* sp.) u uslovima povišenih koncentracija olova” (Mentor: prof. dr Slobodanka Pajević). Master studije upisuje 2008. godine i završava 2009. sa prosekom 10.00. Master rad: „Upravljanje specijalnim rezervatom prirode „Koviljsko-petrovaradinski rit”, problem invazivnih drvenastih vrsta“ (Mentor: prof. dr Ante Vujić). 2009. godine upisuje doktorske studije i sve ispite predviđene planom i programom je položila sa prosečnom ocenom 9.5. Tokom doktorskih studija od 2010. do 2011. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od 2011. je zaposlena na Prirodno-matematičkom fakultetu (UNS), Departmanu za biologiju i ekologiju.

Od 2010 do 2013. godine kao istraživač pripravnik i kasnije istraživač saradnik angažovana u izvođenju praktične nastave predmeta Ekotoksikologija, Morfologija i sistematika beskičmenjaka i Zoologija beskičmenjaka za studente PMF-a, Novi Sad. Od 2014. godine zaposlena kao asistent na Prirodno-matematičkom fakultetu, Departman za biologiju i ekologiju, Katedra za ekologiju i zaštitu životne sredine, angažovana u nastavi, predmet Ekotoksikologija.

Učešće na nacionalnim projektima: 2009-2010 angažovana na projektu Ministarstva nauke republike Srbije. "Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću – efekti na reproduktivnu i funkciju štitne žlezde, određivanje njihovog prisustva u okolini bioanalizama", (Ev. broj: 143058), a od 2011. godine na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj republike Srbije "Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću: reproduktivni, metabolički, razvojni odgovori i mehanizam dejstva kod odabranih model organizama i ćelijskih linija" (Ev. broj: 173037).

Učesnik na internacionalnim projektima: Studija hemijskog, fizičkog i biološkog statusa reke Tamiš (06SER02/03/007-8), u okviru susedskog programa Rumunija-Srbija „Eko-status reke Tamiš“, projekat opštine Kanjiža „Povećanje ekološkog potencijala pograničnih mrtvaja reke Tise“ – članica ekološkog tima za predstudiju, 2008.

Autor je i koautor dva rada objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja (sa *SCI* liste), deset prezentacija na međunarodnim kongresima i jedan rad u nacionalnom časopisu.

Od novembra 2013. član Stručnog saveta za sredstva za zaštitu bilja, Republika Srbija, Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Uprava za zaštitu bilja.

Od 2010. godine član međunarodnih organizacija Društvo za toksikologiju i hemiju životne sredine. SETAC – Society for Environmental Toxicology and Chemistry [www.setac.org](http://www.setac.org). SETAC CEE - Society for Environmental Toxicology and Chemistry, Central Eastern European Branch [www.setac-cee.cz](http://www.setac-cee.cz).

Član domaćih nevladinih organizacija: Društvo za proučavanje i zaštitu ptica Srbije 2010-2015 [www.pticesrbije.rs](http://www.pticesrbije.rs), Udruženje ljubitelja prirode „Riparia“ 2010-2015 [www.riparia.org.rs](http://www.riparia.org.rs), Akademsko društvo za proučavanje i zaštitu prirode, Novi Sad 2007-2009, NIDSBE „Josif Pančić“ 2002-2008 [www.josifpancic.com](http://www.josifpancic.com).

Odlično vlada srpskim, mađarskim i engleskim jezikom.

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Tanja Tunić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Ivana Teodorović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	„Razvoj testova inhibicije rasta vrsta roda <i>Myriophyllum</i> L. 1754 (Saxifragales, Haloragaceae) za potrebe ekološke procene rizika od herbicida i kontrole kvaliteta sedimenta“
Jezik publikacije: JP	srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja (7), stranica (138), slika (49), tabela (33), referenci (223), priloga (7).
Naučna oblast: NO	Ekološke nauke
Naučna disciplina: ND	Zaštita životne sredine
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ekološka procena rizika, sediment, herbicidi, <i>Myriophyllum aquaticum</i> , <i>Myriophyllum spicatum</i>

UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad
Važna napomena: VN	nema
<p>Izvod: IZ</p> <p>Razvojem testova inhibicije rasta na vrstama roda <i>Myriophyllum</i> ispitan je potencijal vrsta <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verd. i <i>Myriophyllum spicatum</i> L. u ekološkoj proceni rizika od herbicida i kontrole kvaliteta sedimenta. Ispitana je primenljivost kontaktnog testa toksičnosti sedimenta sa vrstom <i>M. aquaticum</i> u retrospektivnoj proceni rizika sedimenta na uzorcima iz prirode – na sedimentu reka Tamiš, Krivaja i Jegrička. Testom toksičnosti sedimenta obogaćenog atrazinom, analiziran je i potencijal kontaktnog testa u preventivnoj proceni rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment. Testovima inhibicije rasta <i>M. aquaticum</i> i <i>M. spicatum</i> u voda-sediment sistemu ispitan je osetljivost i mogućnost primene metode u preventivnoj proceni rizika od herbicida i regulatora rasta.</p> <p>Deo rezultata dobijenih u radu uključen je u završne izveštaje internacionalnih testova interkalibracije metoda, a kao rezultat ovih aktivnosti usvojene su nove standardne metode na ukorenjenim akvatičnim makrofitama ISO 16191/2013 i OECD 239/2014.</p> <p>Na osnovu istraživanja, zaključeno je da je kontaktni test toksičnosti sedimenta jednostavan i lak za izvođenje, kao i da je vrsta <i>M. aquaticum</i> u jedno-komponentnom sistemu (sediment) adekvatan test model. Rastom kontrolnih biljaka, niskom varijabilnošću i visokom osetljivošću bioloških odgovora zadovoljen je kriterijum validnosti testa. Preporučeno je korišćenje dodatne kontrole u slučajevima kada postoje značajna odstupanja u strukturi između standardnog sintetičkog kontrolnog i testiranog prirodnog sedimenta. Kontaktnim testom toksičnosti sedimenta obogaćenog atrazinom pokazano je da se ovaj test može smatrati potencijalno dobrom metodom za proširenje ekološke procene rizika od hemikalija koje pokazuju afinitet vezivanja za sediment.</p> <p>Ispitivanjem potencijala testa inhibicije rasta vrsta roda <i>Myriophyllum</i> u voda-sediment sistemu utvrđeno je da su testovi izvodljivi u praksi, da pokazuju visoki stepen stabilnosti, statističku snagu i malu varijabilnost većine ispitivanih parametara rasta. Poređenjem testova sa vrstama <i>M. aquaticum</i> i <i>M. spicatum</i>, nije utvrđena značajna razlika u osetljivosti na odabrane herbicide. Osetljivost testova na vrstama roda <i>Myriophyllum</i> i standardnih <i>Lemna</i> testova je bila slična, osim u slučaju auksin simulatora gde su vrste roda <i>Myriophyllum</i> sp. bile osetljivije, što ukazuje na njihovu primenljivost u proceni rizika od pesticida specifičnog mehanizma toksičnog dejstva.</p> <p>Iako obe vrste roda <i>Myriophyllum</i> imaju prednosti i nedostatke kao test organizmi, vrste se mogu smatrati reprezentativnim akvatičnim ukorenjenim makrofitama i predstavljati adekvatne dopunske test vrste u višim nivoima ekološke procene rizika od herbicida i regulatora rasta. Takođe, vrsta <i>M. aquaticum</i> je pogodna za testiranje u različitim test sistemima, a samim tim ima i veći potencijal primene u preventivnoj, ali i retrospektivnoj ekološkoj proceni rizika.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	28.03.2013.

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: dr Slobodanka Pajević, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu  član: dr Aleksandra Tubić, docent, Prirodno- matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu  član: dr Dragica Brkić, vanredni profesor, Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun  član (mentor): dr Ivana Teodorović, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Tanja Tunić
Mentor: MN	Dr Ivana Teodorović, Associate Professor
Title: TI	Development of growth inhibition tests on species of the genus <i>Myriophyllum</i> L. 1754 (Saxifragales, Haloragaceae) for use in environmental risk assessment of herbicides and sediment quality control
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description: PD	chapters (7), pages (138), references (223), figures (49), tables (33), supplemental data (7)
Scientific field SF	Ecology
Scientific discipline SD	Environmental sciences
Subject, Key words SKW	Environmental risk assessment, sediment, herbicides, <i>Myriophyllum aquaticum</i> , <i>Myriophyllum spicatum</i>
UC	

Holding data: HD	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	No
<p>Abstract: AB</p> <p>Growth inhibition tests on <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Vell.) Verd. and <i>Myriophyllum spicatum</i> L. were conducted in order to assess their use in refined risk assessment of chemicals, as well as in sediment risk assessment. The applicability, stability and sensitivity of the <i>M. aquaticum</i> sediment contact test on natural sediments (from rivers Tamiš, Krivaja and Jegrička) was assessed for use in retrospective ecological risk assessment (ERA). The potential use of the spiked sediment contact test in risk assessment of sediment bound chemicals was also investigated. The sensitivity and applicability of the growth inhibition tests on <i>M. aquaticum</i> and <i>Myriophyllum spicatum</i> in a water-sediment system was assessed for potential use in prospective ERA of plant protection products.</p> <p>A part of the results of this study was included in the final report of the two international ring tests, which resulted with new standardised methods with rooted macrophytes: ISO 16191/2013 i OECD 239/2014. Tests on <i>Myriophyllum</i> species were compared to standard <i>Lemna</i> tests. Test substances in <i>M. aquaticum</i> and <i>Lemna minor</i> L. tests were 3,5 dichlorophenol, atrazine, isoproturon, trifluralin, 2,4 D and dicamba, while substances used in <i>M. spicatum</i> tests were atrazine, isoproturon and 2,4 D.</p> <p>The sediment contact test proved to be simple and robust, while <i>M. aquaticum</i> can be considered as an adequate test model in a one-compartment (sediment) test. The validity criteria regarding control plant growth and variability was met. The use of an additional control is suggested when testing of sediments with considerably different properties of the standard synthetic control is taking place. The spiked sediment contact tests with atrazine showed that the method could be applied in prospective risk assessment of sediment bound chemicals.</p> <p>The water-sediment growth inhibition test with <i>Myriophyllum</i> species proved to be applicable in practice, with high stability, statistical power and low variability of the majority of the growth parameters. <i>M. aquaticum</i> and <i>M. spicatum</i> didn't show major differences in sensitivity to tested substance. The sensitivity of <i>Myriophyllum</i> and <i>Lemna</i> tests was also similar, except to auxin simulators, where <i>Myriophyllum</i> species were considerably more sensitive, which makes them adequate candidates for use in risk assessment of chemicals with specific mode of action.</p> <p>Even though both <i>Myriophyllum</i> species show advantages and disadvantages as test organisms, they can be regarded as representative rooted aquatic macrophyte species and additional test species in refined risk assessment of herbicides and growth regulators. Also, <i>M. aquaticum</i> can be tested in various test systems, which makes this species applicable in prospective as well as retrospective ecological risk assessment.</p>	
Accepted on Scientific Board on: AS	28.03.2013.

Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: dr Slobodanka Pajević, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad  member: Aleksandra Tubić, Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad  member: dr Dragica Brkić, Associate Professor, Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade-Zemun  member (mentor): dr Ivana Teodorović, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad