



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Ђурађ Милошевић

**Ларве фамилије Chironomidae (Diptera, Insecta) слива Јужне Мораве и
њихова примена у процени еколошког статуса текућих водених
екосистема**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013. године

Докторску дисертацију посвећујем мом брату Вуку, који ме је увео у свет науке и открио ми изазове истраживачког рада

Ђурађ Милошевић

ЗАХВАЛНИЦА

Чим смо формулисали тему, знао сам да је преда мном дуг и тежак пут истраживања. Срећом, на том путу су ми многе особе пружиле драгоцену помоћ и подршку. Свима се овом приликом најискреније захваљујем.

Мом ментору др Владици Симићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, дугујем захвалност за помоћ при избору теме и за искрену и непрекидну сарадњу током истраживања и израде дисертације.

Др Момиру Пауновићу, вишем научном сараднику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду, захваљујем се на помоћи и корисним сугестијама у свакој фази израде доктората.

Др Дубравки Черба, доценту Завода за екологију вода, Департман за биологију Универзитета „Јосип Јурај Штросмајер“ у Осијеку, Хрватска, дугујем захвалност за корисне консултације и пријатељске савете током писања докторске дисертације.

Милицы Стојковић Пиперац, асистенту Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу и мом најбољем пријатељу и дугогодишњој сарадници, дугујем посебну захвалност за помоћ у експерименталној фази истраживања, као и током израде дисертације.

Др Владимиру Жикићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, захваљујем се на помоћи у обради материјала и корисним сугестијама.

Експериментални део ове дисертације урађен је у лабораторијама Департмана за биологију и екологију ПМФ-а у Нишу. На конкретној помоћи, разумевању и интересовању дугујем велику захвалност свим колегама Департмана за биологију и екологију, посебно професору др Владимиру Ранђеловићу.

Захвалност дугујем колеги и пријатељу Данијелу Митићу на његовој спремности да ми пружи сваку врсту помоћи кад год сам то тражио.

Колеги Саши Бранковићу дугујем захвалност за логистичку подршку током истраживања и многобројне стручне савете.

Захваљујем Милени Дражић, професору књижевности и новинару, за лекторисање овог рада.

Изузетну захвалност заслужује мој, сада већ велики пријатељ, др Henk Moller Pillot из Тилбурга, Холандија, светски познати стручњак за фамилију Chironomidae. Др Henk K. M. Moller Pillot је због мене организовао индивидуални курс детерминације који је водио заједно са Henком Vallenduиком. Том приликом ми је уступио и сву релевантну литературу, потребну за ово истраживање и касније помагао приликом обраде и детерминације материјала.

И, на крају, захвалност дугујем својој породици, која ми је све време пружала велику подршку и показала разумевање за мој рад.

Ђурађ Милошевић

Име и презиме: Бурађ Милошевић
Датум и место рођења: 04.08.1983. године, Ниш
Садашње запослење: Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Департамент за биологију и екологију, звање асистент
II Докторска дисертација
Наслов: Ларве фамилије Chironomidae (Diptera, Insecta) слива Јужне Мораве и њихова примена у процени еколошког статуса текућих водених екосистема
Број страница: 132
Број слика: 23 слике, 16 табела
Број библиографских података: 164
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Научна област (УДК): Општа екологија, Биоценологија, Хидробиологија, Биогеографија (574). Природа. Изучавање и чување природе. Заштита природе и живог света (502/504)
Ментор: Проф. др Владица Симић, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 20.03.2013. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Владица Симић, ванредни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине; 2. Др Момир Пауновић, научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” у Београду, научна област: Биологија; 3. Др Дубравка Черба, доцент Завода за екологију вода, Департамент за биологију Универзитета „Josip Juraj Strossmayer” у Осијеку, Хрватска, научна област: Општа биологија и екологија.
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:
<hr/> <p>Др Владица Симић, ванредни професор, ментор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине</p> <hr/> <p>Др Момир Пауновић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” у Београду Ужа научна област: Биологија (Хидроекологија)</p> <hr/> <p>Др Дубравка Черба, доцент Завода за екологију вода Департамент за биологију, Универзитет „Josip Juraj Strossmayer” у Осијеку, Хрватска Ужа научна област: Општа биологија и екологија</p>
Датум одбране докторске дисертације:

Ларве фамилије Chironomidae (Diptera, Insecta) слива Јужне Мораве и њихова примена у процени еколошког статуса текућих водених екосистема

Резиме:

Хириномиде (Chironomidae, Diptera), као широко распрострањена и разноврсна група акватичних бескичмењака, поседују велики потенцијал у процени стања еколошког статуса акватичних екосистема. Због контрадикторних резултата о корисности ове групе у методама биопроцене, већина рутинских мониторинг програма не укључује ларве фамилије Chironomidae. Овакво стање упућује на неопходност познавања просторне и временске дистрибуције заједнице хириномида.

Циљеви овог истраживања били су: анализа структуре и динамике заједнице хириномида и дефинисање модела њихове повезаности са абиотичким параметрима, тестирање потенцијалних структурних особина заједнице и потенцијалних индикаторских таксона у процени еколошког статуса акватичних екосистема и, коначно, одређивање најнижег таксономског нивоа, довољног за примену ове групе у методама биопроцене.

Како би се представила мултидимензионална структура заједнице хириномида и одредила веза са параметрима средине, коришћена је мултиваријантна метода вештачких неуромрежа (самоорганизујуће мапе, енгл. Self organizing map - SOM). Способност моделовања нелинеарних веза, мања осетљивост на утицај екстремних вредности и успешно процесуирање и визуализација великог броја параметара и реплика, чини ову методу одговарајућом за анализу структуре заједнице хириномида кроз просторне и временске градијенте. За представљање заједнице фамилије хириномида коришћен је индекс просечне таксономске различитост (Δ^+), чија је главна предност потпуна независност од метода и учесталости узорковања, што омогућава примену ове методе у поређењу студија без података о темпу и начину узорковању и типу станишта.

Истраживање је спроведено у периоду од маја 2010. до марта 2011. године, када су узорковане ларве хириномида на 28 локалитета распоређених дуж читавог слива Јужне Мораве. Током истраживања, од укупно 35.185 анализираних јединки, констатовано је присуство 111 таксона у оквиру 65 родова, дистрибуираних у 5 потфамилија (Orthoclaadiinae (51), Chironominae (38), Tanypodinae (17), Diamesinae (3) и Prodiamesinae (2)).

SOM анализа је, на основу структуре заједнице хириномида, формирала три групе локалитета на SOM мрежи. Анализа индикаторских врста (IndVal) је представила индикаторске таксоне за две групе локалитета. Двадесет таксона је показало значајну варијабилност у абундантности у односу на временске јединице (месеце). Врсте из потфамилије Chironominae и Tanypodinae, регистроване током овог истраживања, показале су временску варијабилност са максималним средњим рангом у јулу и августу (осим *Polypedilum convictum*), представљајући летње форме, док су Orthoclaadiinae и Diamesinae представљале зимске форме у оквиру групе хириномида. Од 15 мерених срединских параметара, one way ANOVA је показала да се 10 значајно разликује између група локалитета дефинисаних SOM методом. Надморска висина је имала најзначајнији утицај на структуру заједнице, и такође је утицала и на остале срединске параметре. На основу резултата, зима и период високих вода су се показали као главни извори природне варијабилности. У овој студији врсте *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg. и *Rheocricotopus chalybeatus* су се показале као индикатори органског загађења. Таксономски индекси диверзитета су на подручју слива Јужне Мораве детектовали значајну промену структуре заједнице у временском периоду од три деценије. Анализом главних компоненти, (PCA) је приказано постојање линеарне везе Δ^+ и традиционалних индекса диверзитета са градијентом квалитета воде. SOM метода, заједно са анализом класификационе снаге (CS) и RELATE тестом, открила је да ниво рода најтачније апроксимира структуру заједнице на највећој могућој таксономској резолуцији. BIOENV анализа је показала да таксономска скала

од врсте до рода не утиче на везу између структуре заједнице и срединских параметара. IndVal анализа је представила индикаторе квалитета воде на таксономском нивоу рода који обезбеђују скоро исту количину информација као и врсте индикатори.

Резултати нашег истраживања су приказали квалитативни и квантитативни састав заједнице хирономида на подручју слива Јужне Мораве и дефинисали модел промене структуре заједнице на просторном и временском градијенту, што доприноси општем познавању фауне и екологије акватичних инсеката и пружају додатне информације о биодиверзитету Србије, Балкана и Европе. Откривање главних извора природне варијабилности структуре заједнице, приказивање постојања линеарне везе индекса диверзитета са степеном нарушености акватичних екосистема и одређивање „довољне“ таксономске резолуције значајно доприноси примени фамилије Chironomidae у процени еколошког статуса текућих водених екосистема.

Larvae of Chironomidae family (Diptera, Insecta) in Southern Morava river basin and their application in assessing the ecological status of lotic systems

Summary:

The widely distributed family of the Chironomidae presents the most diverse group of macroinvertebrate fauna and they are the prime candidate for the ecological status assessment of the lotic ecosystems. Due to the contradictory results in previous studies regarding comprehensiveness of the group in bioassessment, it has been a commonplace to exclude chironomids from the monitoring programs. This further stresses the need for more studies concerning spatio-temporal pattern of the Chironomidae community.

The aim of the study was to analyze spatial and temporal variation in the chironomid community, to investigate the importance of variations in environmental factors and their influence on the community pattern, and to test the strength of potential community metrics and indicator taxa in assessing the ecological status of lotic systems. Finally, we wanted to determine the sufficient taxonomical level of the chironomid community, which could provide reliable information for the bioassessment.

To present multidimensional structure of chironomid community and to pattern it with environmental factors we used Kohonen unsupervised artificial neural networks (Self organizing map – SOM). The ability to treat nonlinear relationships, less sensitivity to outliers, successful processing, and visualization of large data sets, make this method suitable for the community structure analysis. To describe the chironomid community, the average taxonomic distinctness ($\Delta+$) was used. Its main advantage is that it is largely independent of sampling effort with the implication that it can be directly compared across studies with unknown or different sampling efforts.

The field campaign was conducted from May 2010. to March 2011, when larvae were sampled at 28 sites distributed along the whole Southern Morava river basin. During the study, a total of 35.185 specimens were recorded, distributing over 5 subfamilies, 65 genera, and 111 taxa (Orthocladiinae (51), Chironominae (38), Tanypodinae (17), Diamesinae (3) and Prodiamesinae (2)).

The SOM analysis of the chironomid community data produced three groups of sites. The indicator species analysis (IndVal) presented indicator taxa for two groups of sites. Twenty taxa according to Kruskal-Wallis test showed the most pronounced differences among the temporal units (months). The species of Chironominae and Tanypodinae recorded during this research, which showed temporal variability, had the highest values of Mean Rank in July and August (except *Polypedilum convictum*), representing summer forms, while Orthocladiinae and Diamesinae represent the spring forms. Out of 15 measured environmental parameters, one way ANOVA pointed out that 10 significantly differ between the groups. Elevation had the most important influence on the chironomid community, also affecting other environmental parameters. According to our finding, the winter season and the periods of high water level are the main sources of natural variability. In this study, *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg and *Rheocricotopus chalybeatus* could be considered indicators of organic pollution. The indices of taxonomic diversity detected substantial changes of chironomide community structure over three decades. Principal component analysis (PCA) revealed the linear relationship between diversity indices ($\Delta+$ and traditional diversity indices) and water quality gradient. The SOM method, together with Classification strength (CS) analysis and the RELATE test, revealed that the genus-level most accurately approximated the species-level community pattern. BIO-ENV analyses presented the same set of important environmental parameters at species- and genus-level. IndVal analysis showed that indicator genera provide information very close to that gained from species indicators.

The results of this study present the qualitative and quantitative structure of chironomid community as well as its changes along spatial and temporal gradients in lotic systems of Southern Morava river basin. Furthermore, this study contributes to the general knowledge of fauna and ecology

of aquatic insects, providing additional information about biodiversity of Serbia, Balkan Peninsula and whole Europe. Revealing the main source of natural variability, defining the linear relationship between diversity indices and the extent of anthropogenic influence and presenting the sufficient taxonomic resolution of chironomid community lead to the implementation of this group in assessing the ecological status of lotic ecosystems.

Садржај:

1. Увод.....	1
1.1 Животни циклус фамилије Chironomidae	3
1.2 Просторна и временска дистрибуција ларви фамилије Chironomidae у лотичким системима.....	7
1.3 Утицај срединских параметара на структуру фамилије Chironomidae.....	9
1.4 Диверзитет фамилије Chironomidae.....	10
1.5 Примена фамилије Chironomidae у методама биопроцене	13
1.6 Таксономска резолуција.....	15
1.7 Истраживања ларви фамилије Chironomidae у Србији	18
2. Циљеви рада.....	20
3. Материјал и методе	22
3.1 Подручје истраживања.....	23
3.1.1 Власина	23
3.1.2 Ветерница	24
3.1.3 Топлица.....	24
3.1.4 Пуста река.....	25
3.1.5 Сокобањска Моравица	25
3.1.6 Нишава.....	25
3.1.7 Темска	26
3.1.8 Јерма	26
3.2 Период прикупљања материјала, карактеристике и класификација локалитета	27
3.3 Методе мерења и одређивања срединских параметара (хидролошке, физичке и хемијске карактеристике).....	31
3.4 Методе узорковања и идентификације.....	32
3.5 Анализа података	33
3.5.1 Самоорганизујуће мапе	33
3.5.2 Индекси диверзитета	36
3.5.3 Мултиваријантни и униваријантни тестови	40
4. Резултати.....	44
4.1 Таксономски састав фауне хирономида на сливу Јужне Мораве	45
4.2 Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae	52

4.3 Утицај срединских фактора на композицију заједнице хирономида	57
4.4 Потенцијалне метричке особине заједнице хирономида у процени еколошког статуса лотичких система	62
4.5 Таксономска резолуција.....	71
4.5.1 Утицај таксономске резолуције на структуру групе хирономида.....	71
4.5.2 Утицај таксономске резолуције на повезаност срединских параметара и фамилије Chironomidae	76
4.5.3 Утицај таксономске резолуције на индикаторске таксоне	79
5. Дискусија.....	83
5.1 Диверзитет фамилије хирономида и потенцијалне метричке особине у процени еколошког статуса	84
5.2 Просторна и временска варијабилност заједнице хирономида	90
5.3 Заједница хирономида и средински параметри.....	94
5.4 Методе биопроцене: могућности и примена	97
5.5 Степен усаглашености података на таксономској скали	101
6. Закључак.....	105
7. Референце.....	110
8. Прилог	124

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1. Животни циклус фамилије Chironomidae.....	3
Слика 2. Глобална дистрибуција диверзитета фамилије Chironomidae по зоогеографским регионима (број врста/број родова). Скраћенице означавају имена зоогеографских региона (РА-Палеарктик, НА- Неарктик, NT- Неотропски, АТ- Афротропски, OL-Оријентални, AU-Аустралијски PAC- Пацифички, ANT- Антарктички).....	13
Слика 3. Локалитети истраживања на сливу Јужне Мораве. Квадрати (□) обележавају локалитете узорковане 1981, а кругови (●) локалитете из 2010/11.....	29
Слика 4. Структура самоорганизујућих мапа. Тачке представљају променљиве неуроне улазног слоја. Линије представљају векторе, који се сликају у излазни слој неурона.....	33
Слика 5. Пример (а) таксономског, (б) филогенетског стабла и дефинисаних тежина таксономског пута (ω_{ij}) с врсте i до врсте j , за узорак од 7 врста. Дужина пута је једнака суми дужина таксономских корака (v) до првог заједничког чвора одређеног пара врста у узорку. Средња вредност дужине таксономских путева свих парова врста у узорку представља индекс таксономске различитости ($\delta+$).....	38
Слика 6. Пример два стабла (а; б) са истим вредностима просечне таксономске различитости ($\delta+$), али са различитим вредностима индекса $\lambda+$ (варијанса таксономске различитости), који рефлектује већу неуједначеност структуре стабла б у односу на стабло а , где је структура максимално уједначена. Дужина таксономских корака (v) је стандардизована тако да је максимална вредност $\omega=100$	39
Слика 7. Визуализација просторне и временске дистрибуције заједнице Chironomidae у сливу Јужне Мораве помоћу SOM мреже. За кластеровање неурона на мрежи је коришћена k -mean метода. Велика слова (А, В и С) означавају различите групе. Кодови на сваком неурон означавају различите локалитете, узорковане у различитим месецима. Број у коду означава одређени локалитет, док три слова означавају месец узорковања (сезону).....	53
Слика 8. Визуализација дистрибуције 15 срединских параметара на претходно тренираној SOM мрежи (где је: DO(mg/l)–концентрација кисеоника; DO(%)–сатурација; NO ₃ -N, концентрација нитрата; PO ₄ -P–концентрација ортофосфата, NH ₄ -N–концентрација амонијака). Скала за сваку мапу представља мерене вредности параметара. Црна засенченост је за сваки параметер високо корелисан са максималном вредношћу забележеном током студије. Светлије нијансе индикују опадање вредности представљених параметара.....	60
Слика 9. Визуализација дистрибуције 28 индикаторских таксона (са IndVal већим од 25%) на SOM мапи. Скала за сваку мапу представља абундантност индикаторских таксона (у загради, максимални број индивидуа по m ²). Црна засенченост је за сваки таксон високо корелисан са максималном абунданцом забележеном током студије. Светлије нијансе индикују опадање густине представљених таксона.....	61
Слика 10. Однос $\delta+$ и $\lambda+$ дистрибуције са контурама 95% интервала поверења. Вредности су израчунате из опсега вредности броја врста (S), са 100.000 симулација.....	63
Слика 11. Графички приказ таксономске различитости (А) и варијансе таксономске различитости (Б) добијених података о фауни хириномида на сливу Јужне Мораве, Србија у 2010. години и броја врста. Референтни и нарушени локалитети су означени празним (○) и пуним круговима (●), респективно. Графикон приказује теоријску средњу вредност и 95% интервал поверења. Поузданост анализе расте дуж вертикалне осе са порастом броја врста.....	65
Слика 12. Графички приказ таксономске различитости (А) и варијансе таксономске различитости (Б) добијених података о фауни хириномида на сливу Јужне Мораве, Србија за 10 селектованих локалитета у 2010. години (пуни троуглови (▲) и за 14 локалитета из студије из 1981. (празни троуглови ())(према Јанковић, 1985) и броја врста. Графикон приказује теоријску средњу вредност и 95% интервал поверења. Поузданост анализе расте дуж вертикалне осе са порастом броја врста.....	66
Слика 13. Резултати анализе главних компоненти (PCA) показују везу између локалитета (арапски бројеви), срединских параметара и $\delta+$ индекса као меру структуре заједнице Chironomidae (вектори). Средински параметри су: концентрација нитрата – NO ₃ -N, ортофосфата – PO ₄ -P; амонијака – NH ₄ -N, кисеоника – DO, сатурације - DO%, тврдоћа – Н, кондуктивитет - ЕС и рН, биолошка потришња кисеоника – BOD ₅ , температуре воде – t и турбидитет - Тг. Кластери, који су резултат Ward-овог алгоритма, представљени су пољима обојеним различитом нијансом сиве боје.....	69
Слика 14. Анализа главних компоненти (PCA) срединских параметара и индекса диверзитета (Shannon-Wiener-ов индекс диверзитета (H'), Pielou-ов индекс уједначености (J'), Simpson-ов индекс (1-D) и укупна бројност хириномида у узорку (N)). Средински параметри су: концентрација нитрата – NO ₃ -N, ортофосфата – PO ₄ -P; амонијака – NH ₄ -N, кисеоника – DO, сатурације - DO%, тврдоћа – Н, кондуктивитет - ЕС и рН, биолошка потрошња кисеоника – BOD ₅ , температуре воде – t и турбидитет - Тг.	70
Слика 15. Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae на сливу Јужне Мораве. SOM анализа на основу бројности таксона идентификованих до нивоа врсте. Слова А, Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „ k -mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).....	73
Слика 16. Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae на сливу Јужне Мораве. SOM анализа на основу бројности представника појединих родова. Слова А, Б и Ц означавају различите групе	

неурона, формиране класификационом методом „k-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).....	74
Слика 17. Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae на сливу Јужне Мораве. SOM анализа на основу бројности представника потфамилија. Слова А, Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „k-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).....	75
Слика 18. SOM визуализација срединских параметара, значајних за заједницу хириномида (таксономски ниво врсте) према BIO-ENV анализи (NH4-N-амонијак). Скала на свакој мапи представља мерене вредности параметара. Засенченост црне броје за сваки параметар је високо корелисана са максималним вредностима у студији. Опадање степена засенчености индикује и опадање вредности параметара.....	77
Слика 19. SOM визуализација срединских параметара, значајних за заједницу хириномида (таксономски ниво рода) према BIO-ENV анализи (NH4-N-амонијак). Скала на свакој мапи представља мерене вредности параметара. Засенченост црне броје за сваки параметар је високо корелисан са максималним вредностима у студији. Опадање степена засенчености индикује и опадање вредности параметара.....	78
Слика 20. SOM мрежа са дистрибуираним локалитетима на основу срединских параметара. Слова А; Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „k-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).....	80
Слика (прилог) 1. <i>Polypedilum scalaenum</i> а) бочни изглед ларве, б) бочни изглед главене чауре, ц) антена, д) вентрални изглед главене чауре, е) ментум, ф) мандибула.....	126
Слика (прилог) 2. <i>Parakiefferiella smolandica</i> а) антена, б) мандибула, с) ментум д) вентрални изглед главене чауре.....	127
Слика (прилог) 3. <i>Cricotopus bicinctus</i> а) антена б) мандибула с) ментум.....	128

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1. Потфамилије и трибуси фамилије Chironomidae	11
Табела 2. Типологизација водотокова у Србији	24
Табела 3. Локалитети узорковања на сливу Јужне Мораве са редом реке и географским координатама. Локалитети са звездицом се поклапају са локалитетима из студије Jankovic (1985).....	28
Табела 4. Таксономски састав заједнице фамилије Chironomidae констатован током истраживања на подручју слива Јужне Мораве, у период од маја 2010. до марта 2011. године.....	46
Табела 5. Таксони хириномида присутни (X)/одсутни (-) у две одвојене студије спроведене на сливу Јужне Мораве током 1981. и 2010. године.....	48
Табела 6. Репрезентативни и значајни таксони хириномида за групе (Гр) формиране COM анализом. Подвучено - таксони који су репрезентативни таксони групе и имају IndVal вредности (InV) веће од 25%. Остали наведени таксони су значајни за групу.....	54
Табела 7. <i>A priori</i> класификација локалитета на сливу Јужне Мораве.....	55
Табела 8. Kruskal-Wallis-ов тест представља таксоне хириномида чија се релативна бројност значајно ($p < 0,05$) разликује између месеци, са вредностима: ета квадрата (η^2), χ^2 , степена слободе (df) и месецима са највећим средњим рангом (Md*).	57
Табела 9. Средња вредности ± 1 стандардна девијација параметара по групама.....	59
Табела 10 Корелација delta+ са осталим индексима диверзитета.....	62
Табела 11. Средња вредност ± 1 стандардна девијација delta+ и срединских параметара по групама.....	67
Табела 12. Корелација индекса диверзитета са срединским параметрима	68
Табела 13. Корелација између индекса диверзитета на различитим таксономским нивоима.....	71
Табела 14. BIO-ENV анализа : прве три најбоље комбинације варијабли на нивоу врсте и рода са вредностима Spearman-овог коефицијента корелације (Rho) и г.....	76
Табела 15. Средња вредност ± 1 стандардна девијација срединских параметара по групама формираних COM анализом.....	79
Табела 16. Индикаторски таксони, на различитим таксономским нивоима (врста и род) за COM групе (Гр), формиране на основу срединских параметара. Таксони са IndVal вредностима (InV) већим од 25% представљају репрезентативне таксона група и у табели подвучени. Остатак таксона у табели је значајно за групу (видети материјал и методе).....	81

1. Увод

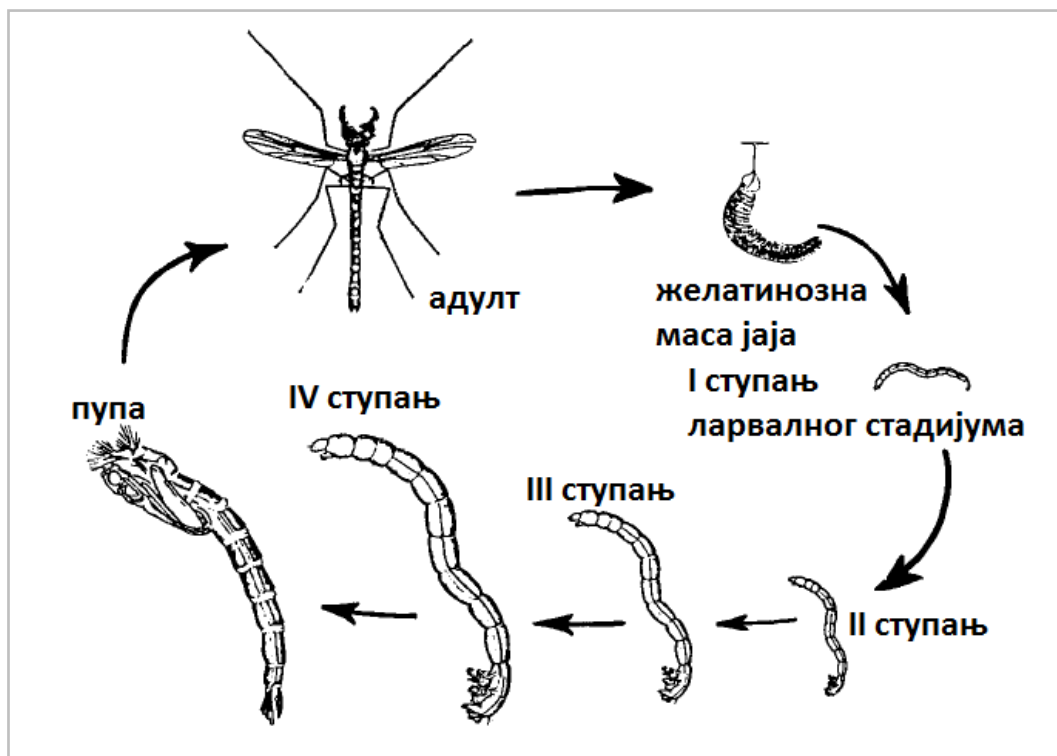
Стални пораст индустријализације и аграрног развоја, поготово у земљама у развоју, значајно утиче на површинске водотокове и представља главну претњу биодиверзитету и интегритету природних екосистемима. Многе активности човека на стаништима богатим врстама (на пример, водоплавне реке) се често завршавају фрагментацијом и стварањем нових станишта, сиромашних врстама (канални, резервоари). Последица ових процеса је деградација средине. За спречавање даље деградације и ревитализацију станишта која су већ значајно измењена потребно је успоставити ефикасно управљање водама. Основни елемент управљања, који претходи дефинисању одговарајућих мера заштите, је мониторинг. Општи циљ Оквирне директиве о водама (WFD, енгл. Water Framework Directive) је унапређење статуса површинских вода, што је императив за све земље Европе. Наиме, према WFD индустријски развијене земље, као и оне у развоју, у обавези су да до 2015. године успоставе добар еколошки статус свих водних тела. Термин „еколошки статус“ описује структуру и функционисање акватичног екосистема, узимајући у обзир хидролошке, морфолошке, физичке и хемијске карактеристике станишта, као и карактеристике биолошке заједнице. Ступањем на снагу WFD, биолошки елементи у мониторингу вода добијају значајније место. Акватичне заједнице представљају први елемент који бива поремећен услед квалитативних модификација морфолошких, физичких и хемијских карактеристика површинских вода, чиме је илустрован значај биолошког мониторинга. Од свих група слатководних организама које се користе у различитим методама процене квалитета воде, бентосне макроинвертебрате се најчешће препоручују. Европска регулатива која обухвата заштиту вода такође захтева да се у проценама еколошког статуса река, поред осталих акватичних група организама, укључи и заједница макроинвертебрата.

Фамилија Chironomidae представља широко распрострањену и разноврсну групу акватичних бескичмењака. Поред широке распрострањености великог броја таксона, ову групу карактеришу и стеновалентне врсте (селективност у погледу фактора окружења, а последично и у погледу станишта). Наведене карактеристике и дуга традиција у истраживању чине ларвене облике хириномида важном групом индикатора стања средине. И поред тога, ова група није саставни део рутинских мониторинг програма земаља, како у Европи, тако и на осталим континентима. Штавише, у научним круговима не постоји јединствен став о значају фамилије Chironomidae у процени еколошког статуса акватичних екосистема. Сложена и дуготрајна

идентификација, мали број стручњака који се бави овом фамилијом Diptera, као и велика природна варијабилност су главни разлози искључивања хириномида из процеса биолошког мониторинга статуса водених екосистема. Хириномиде су често запостављене чак и у истраживачком раду, из истих разлога. Контрадикторност резултата постојећих студија о значајности хириномида као биоиндикатора упућује на неопходно спровођење истраживања структуре и динамике ове групе, као и анализе ефекта таксономске резолуције на количину информација коју ова група пружа. Истраживања те врсте ће омогућити добијање неопходних информација и олакшати примену фамилије Chironomidae као индикатора у рутинским мониторинг програмима.

1.1 Животни циклус фамилије Chironomidae

За разумевање екологије врста и читаве фамилије Chironomidae неопходно је познавати њихов животни циклус. Фамилија Chironomidae представља групу организама у оквиру подреда Nematocera (ред Diptera). Без обзира на велико богатство врста у оквиру фамилије (Ferrington, 2008), сви представници ове групе припадају холометаболичким организмима пролазећи кроз све стадијуме развића (јаје, ларва пупа и адулт; Слика 1.).



Слика 1. Животни циклус фамилије Chironomidae (преузето из Walker (1987)).

Последња два стадијума развића трају веома кратко, док дужина трајања стадијума јајета и ларве широко варира од врсте до врсте. Животни циклус почиње стадијумом јајета, када женка адулт, након копулације, полаже јаја у желатинозни матрикс и угине. Читав процес траје од 10 минута до једног сата. Желатинозна маса јаја је обично везана за стабилан супстрат (камење, грање, јаке биљке) (Nolte, 1993). Ово није случај са врстама потфамилије *Telmatogetoninae*, чије женке полажу јаја појединачно, а не у маси (Armitage et al., 1995). Облик желатинозне масе типичан је за потфамилије где је за: *Tanypodinae* карактеристичан глобуларан облик, *Diamesinae* кончасти, *Chironomini* (*Chironominae*) цилиндрични, а *Orthoclaadiinae* линеарни или облик овалног пакетића. Код осталих група је забележена велика варијабилност облика (на пример, *Tanytarsini* (*Chironominae*)). Карактеристична морфологија јајета, која варира од врсте до врсте, омогућава идентификацију таксона чак и на овом стадијуму (Nolte, 1993). Број јаја по маси варира, како између врста, тако и унутар ње. У највећем броју случајева, број јаја се креће између 20 и 30. Што се тиче броја желатинозних маса, уобичајено је да једна женка полаже само једну желатинозну масу јаја. Међутим, Nolte (1993) је приметио да женке врсте *Pseudochironomus prasinatus* полажу и до 6 одвојених желатинозних перли.

Јаја се обично полажу уз обалу, на местима где постоји развијена вегетација. Непосредно након полагања, желатинозна маса неко време плута на површини, када може у лотичким системима, ношена дрифтом, да пређе одређену дистанцу. Након тога желатинозни матрикс абсорбује воду и маса јаја тоне на дно (Vallenduuk & Pillot, 2007). Стопа развића овог стадијума је високо корелисана са променом температуре воде и траје у просеку од 2.5 до 6 дана. Условљеност температуром доводи и до стадијума мировања, где је код неких врста забележена појава дијапаузе (нпр. *Tanytarsus holochlorus*; Vallenduuk & Pillot, 2007).

Следећи стадијум развића је ларвални, у којем јединке добијају морфолошке карактеристике типичне за представнике нематорцерних *Diptera* (неретрактилна главена чаура, развијене мандибуле које се крећу само у хоризонталној равни и издужено сегментисано тело без торакалних екстремитета). С друге стране, присуство лажних ножица, на првом торакалном и последњем абдоминалном сегменту, као и појава процерка са апикалном групом чекиња, издвајају ларве хирономида од осталих представника *Nematocera* (Armitage et al., 1995). Ментум, вентроменталне плоче, мандибуле, премандибуле и антене су структуре које се налазе на склеротизованој главној чаури и представљају главне морфолошке карактеристике на којима су

засновани сви идентификациони кључеви (Wiederholm, 1983; Moller Pillot, 1984a; Moller Pillot, 1984b; Schmid, 1993; Vallenduuk & Moller Pillot, 2007; Moller Pillot, 2009). Из јајета се развијају ларве које су на првом, од четири ступња развића. С обзиром да се први ступањ ларве (larvulae) морфолошки битно разликује од каснијих ступњева ларвалног стадијума, идентификација до нивоа врсте није могућа. На овом ступњу ларве, међутим, већ поседују карактеристичан облик главе и положај очију који омогућава њихову идентификацију до нивоа потфамилије. Јединке у овом периоду имају дуге абдоминалне чекиње и чине карактеристичне покрете у облику осмица, уз показивање позитивне фототаксије, што представља карактеристике битне за њихову дисперзију и одабир станишта (Vallenduuk & Pillot, 2007). На почетку првог ступња, док су у слободној води, индивидуе се хране ситним честицама детритуса. И поред карактеристика које им омогућавају кретање, дисперзија ларви првог ступња је великим делом препуштена воденој струји до тренутка док јединка не дотакне подлогу (Armitage et al., 1995). Дужина трајања првог ступња се креће између 2 и 8 дана, док се под неповољним условима продужава и до 14 дана. Ларве другог ступња развића могуће је идентификовати, с обзиром да поседују скоро све морфолошке и аутеколошке карактере који су специфични за врсту. Морфометријски односи другог ларвеног ступња се ипак разликују од оних на трећем и четвртном ступњу, што идентификационе кључеве који користе карактере тог типа чини неефикасним (Vallenduuk & Pillot, 2007; Orendt & Spies, 2012). Морфолошки карактери, битни за идентификацију, у потпуности су развијени тек на трећем и четвртном ступњу. Остале карактеристике, попут количине хемоглобина и обојености тела, постепено постају све интензивније, како се јединке приближавају четвртном ступњу развића. Стопа раста у овом стадијуму развића у највећем степену зависи од температуре и доступности хране (Vallenduuk & Moller Pillot, 2007). Сигурно је да и остали фактори (на пример, концентрација кисеоника, рН и фотопериодизам) значајно утичу на раст и развиће, међутим, мали је број студија које су тестирале ефекте њиховог утицаја.

При крају четвртог ступња, када се јединке налазе у међустадијуму који се назива препупа, долази до задебљавања торакалног и абдоминалног дела тела. Убрзо након тога јединка прелази у кратак стадијум пупе (од два сата до неколико дана) пролазећи кроз низ морфолошких промена на путу метаморфозе до коначног адултног стадијума (Vallenduuk & Moller Pillot, 2007). Јединке, на стадијуму пупе су у облику запете и имају увећан цефалоторакс који је дорзовентрално спљоштен (Armitage et al.,

1995). За овај стадијум је карактеристично да јединке мењају афинитете према средини, што за последицу има и промену микростаништа. На пример, *Chironomus plumosus* има веће захтеве за кисеоником на стадијуму пупе у односу на ларвалани стадијум. Након излетања из воде (еклозије), адулти се не хране и живе краће од једног дана (Vallenduuk & Moller Pillot, 2007).

С обзиром да температура представља један од главних параметара који утиче на брзину раста и развића, овај фактор детерминише број генерација по години. Број генерација варира, како између различитих врста, тако и у оквиру исте врсте. Анализом већег броја студија, Tokeshi (1995) је дошао до закључка да највећи број врста реализује једну или две генерације током године. Врсте са три и више генерација, углавном, припадају потфамилији Orthoclaadiinae, док су Chironominae, у највећем броју случајева, окарактерисане врстама са једном генерацијом током године. Број генерација показује одређену правилност и дуж просторног и временског градијента. Десетак студија је показало зависност броја генерација од географске ширине, приказавши њихову негативну корелисаност (Tokeshi, 1995). Поред тога, присуство годишњих флукуација у температури, доводи и до промене броја генерација у оквиру исте врсте (Janковић, 1971).

Када наступе неповољни услови, код представника фамилије Chironomidae је на стадијуму јајета, ларве и пупе забележена појава дијапаузе (Grodhaus, 1980). Врсте које насељавају борелани регион, поред дијапаузе, када ларве драстично смањују синтезу исхране, такође формирају и коконе, како би преживеле екстремно ниске температуре (Danks, 1971). Супротно томе, током летњих месеци, у тропским и субтропским регионима, поједине врсте у стању естивације преживљавају дуге и сушне периоде. И у овом случају је забележена појава кокона, као додатне заштите од неповољних услова (Grodhaus, 1980).

1.2 Просторна и временска дистрибуција ларви фамилије *Chironomidae* у лотичким системима

Познавање просторне и временске дистрибуције заједнице је главни предуслов за укључивање макроинвертебрата у методе процене еколошког статуса лотичких система (Park et al., 2003). Бројни аутори су наглашавали значај утицаја просторне и временске хетерогености на динамику популација (Lencioni & Rossaro, 2005). Одабир станишта акватичних инсеката неке врсте зависи искључиво од комбинације абиотичких и биотичких фактора који перманентно делују на јединке те врсте. Ова тврдња, такође важи и за ларве фамилије *Chironomidae*, као једне од најдоминантнијих група акватичних макроинвертебрата (Rosenberg, 1993). Промене у оквиру структуре фамилије могу објаснити последице које антропогене активности имају на лотичке системе (Armitage et al., 1995). Поред тога, заједница природно мења своју структуру дуж просторних и временских градијената. Приликом формулисања методе био процене акватичних екосистема је неопходно дефинисати природну варијабилност структуре и разликовати је од варијабилности изазване антропогеним променама.

У почетку, већи број студија које су проучавале динамику ларви фамилије хирономида су биле усредсређене на заједнице у лентичким системима (Rosenberg, 1992; Lindegaard et al., 1995). Са друге стране, студије које су се бавиле анализом заједнице у лотичким системима, разматрале су, углавном, високопланинске, бореалне, медитеранске и тропске регионе (Lencioni & Rossaro, 2005; Helson et al., 2006; Calle-Martínez & Casas, 2009; Puntí et al., 2009). Резултати студија у свим истраживаним областима су показали постојање како просторне, тако и временске правилности у распрострањењу ларви фамилије *Chironomidae*. Rossaro et al. (2005) су тврдили да је структура групе хирономида у рекама под снажним утицајем временске варијабилности. Исто су показали и резултати анализе коју су спровели Kerans & Karr (1994). Варијабилност у релативној бројности фамилије *Chironomidae*, која се јављала између две узастопне године, је премашивала варијабилност изазвану разликама у квалитету станишта. Због тога су аутори били принуђени да ову метричку особину (релативна бројност хирономида) искључе из мултиметричког индекса (**B**enthic **I**ndex of **B**iotic **I**ntegrity). Осим промена у квантитативном саставу, Lenat (1983) је уочио сезонске промене и у квалитативној структури заједнице, региструјући значајне разлике у диверзитету врста током различитих сезона. Raunio et al. (2007) у својој студији приказује број врста по сезонама у бореалном региону, са најнижим

вредностима у пролеће, које потом расту, достижу максимум почетком лета и поново, при крају летње сезоне почињу да опадају. Супротно томе, Rossaro et al. (2006), приказује највећи диверзитет врста у алпским лотичким системима током зимских месеци. Што се тиче медитеранске области, и ту је забележена јасна разлика између квалитативног и квантитативног састава хириномида током пролећа и лета (Puntí et al., 2009). Приликом израде и припреме временског плана програма биопроцене квалитета воде неопходно је узети у обзир значајне промене структуре заједнице хириномида током сезона. У супротном, снажна варијабилност заједнице, која се јавља на временској скали, може надјачати промене изазване антропогеним утицајем. Прилагођавање учесталости и времена прикупљања материјала један је од начина превазилажења проблема постојања значајне природне варијабилности у примењеним истраживањима. Овакав приступ умањења утицаја варијабилности предлажу Raunio & Muotka (2005) и објашњавају да се дуж градијента надморске висине мењају и други климатски параметри. Врхунац еклозије ларви временски се разликује на различитим надморским висинама, управо услед промене климатских фактора.

Поред сезонске варијабилности, заједница хириномида мења се и дуж речног континуума (Ward & Williams, 1986; Lindegaard et al., 1995). Главни фактор, који условљава промену и осталих срединских параметара дуж речног континуума (на пример, гранулометрија подлоге, температура воде, нагиб терена, брзина воде и природни садржај нутријената) је надморска висина. Промене у стурктури заједнице хириномида прате градијент надморске висине, због чега се класификације станишта засноване на биолошким и абиотичким параметрима поклапају (Calle-Martínez & Casas, 2009). Истраживачи Puntí et al. (2009) у студији хириномида дуж речног градијента, анализирајући структуру заједнице, издвојили су три групе локалитета које су се јасно разликовале у односу на класе (распоне) надморских висина. Наведени резултати указују на значај надморске висине као фактора распрострањења ове групе организама.

На основу досадашњих истраживања, може се доћи до закључка да нема довољно информација о просторној и временској дистрибуцији ларви фамилије хириномида на подручју умерених региона. С обзиром да је природна променљивост заједнице један од основних разлога искључивања ове велике групе макроинвертебрата из већине стандардних метода процене квалитета воде, потребно је више информација о структури заједнице и њеној динамици дуж просторног и временског градијента.

1.3 Утицај срединских параметара на структуру фамилије *Chironomidae*

Промене структуре заједнице макроинвертебрата резултат су варирања како срединских фактора, тако и интезитета антропогеног утицаја (Townsend et al., 1983). Према томе, одређивање кључних фактора и њихов степен утицаја на структуру заједнице макроинветебрата, представља још једну информацију битну за дефинисање ефикасних процедура биомониторинга вода. Постојање јасне везе између срединских градијената и структуре заједнице омогућава припрему предиктивних модела, као и ефикасну процену биодиверзитета хирономида и структуре заједнице у акватичним екосистемима региона (Raunio et al., 2011). Досадашње студије разматрале су величину и структуру станишта, рН вредност и параметре органског оптерећења као најзначајније параметре који утичу на квалитативни и квантитативни састав заједнице макроинвертебрата (Raunio et al., 2011). У случају ларви хирономида, показало се, на основу анализе различитих комбинација кључних параметара на различитим типовима станишта, да су најзначајнији фактори који утичу на дистрибуцију ове групе надморска висина и температурни режим. Ова два фактора обликују структуру хирономида у акватичним екосистемима (Rossaro, 1991; Puntí et al., 2009). Међутим, Puntí et al. (2009) износе да повезаност срединских параметара са биолошким подацима није значајна, при чему средински параметри, *a priori* означени као „кључни“, објашњавају мањи део варијабилности структуре заједнице хирономида. Резултати ове студије контрадикторни су са осталим сазнањима, што показује колико резултати истраживања зависе од примењене методологије рада.

Параметри средине, на чије промене утиче човек и који индикују присуство органског загађења у акватичним системима, битно утичу на квалитативне и квантитативне промене унутар заједнице хирономида. Потврђено је да измене концентрације амонијака и фосфата, као и варирање електропроводљивости и петодневне биолошке потрошње кисеоника (БПК₅), могу битно утицати на састав заједнице хирономида, што иде у прилог тврдњи да су хирономиде поуздани индикатори органског загађења (Wilson, 1992; Calle-Martínez & Casas, 2009).

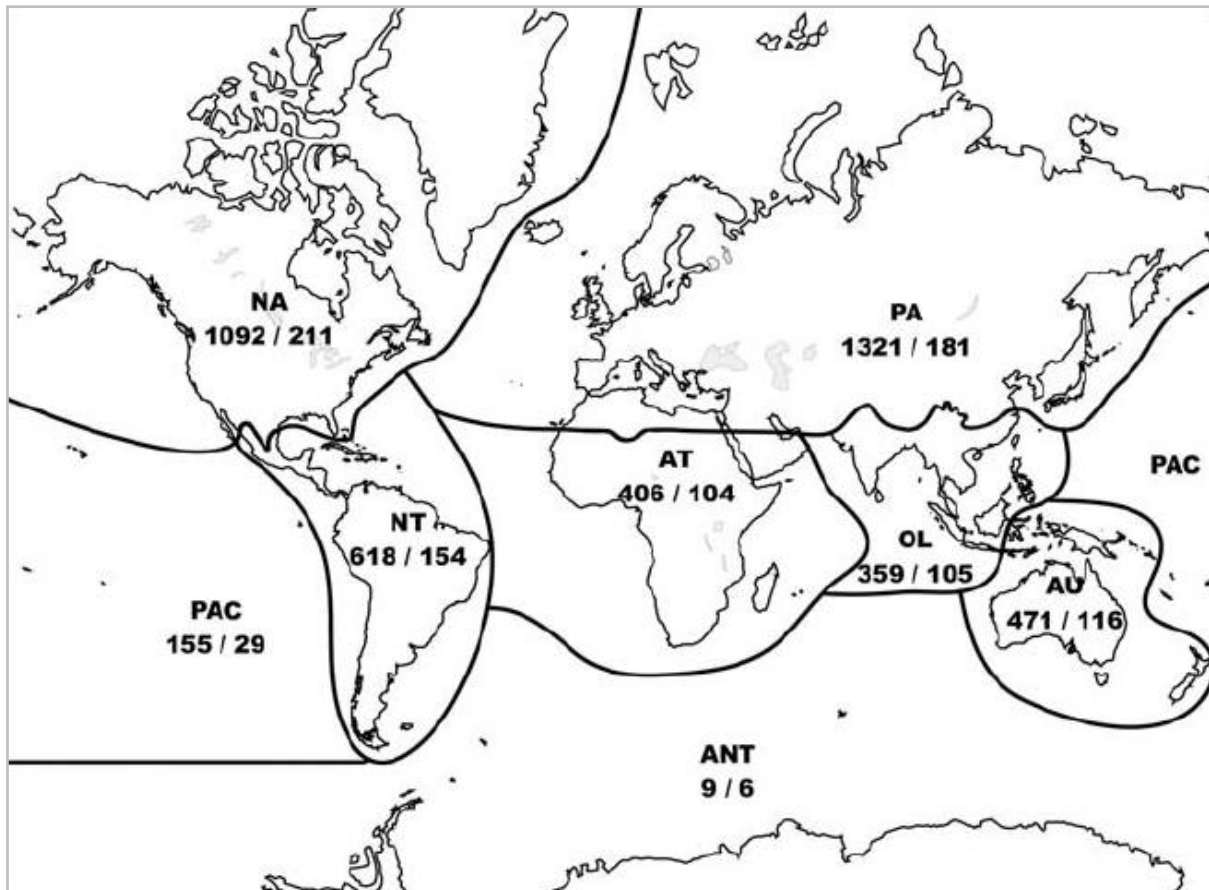
1.4 Диверзитет фамилије Chironomidae

Широко распрострањена фамилија хирономида представља групу са највећим диверзитетом и често највећом густином заједнице у оквиру макрозобентоса (Marziali et al., 2010). Глобални диверзитет фамилије Chironomidae је представљен са 11 потфамилија и 22 трибуса, у оквиру којих је дистрибуирано 339 родова и 4147 описаних врста (Ferrington, 2008) (Табела 1., Слика 2.). На основу податка из Fauna Europaea (<http://www.faunaeur.org>), у Европи је до сада забележено 1258 различитих врста сврстаних у 8 потфамилија (Buchonomyiinae, Chironominae, Diamesinae, Orthoclaadiinae, Podonominae, Prodiamesinae, Tanypodinae и Telmatogetoninae). Овако висок диверзитет у слатководним екосистемима омогућио је хирономидама да окупирају широк опсег еколошких ниша, са различитим врстама, које имају другачије еколошке афинитете, укључујући и различите начине исхране (Bazzanti et al., 1997; Franquet, 1999; Bazzanti, 2000).

Табела 1. Потфамилије и трибуси фамилије Chironomidae (Ferrington, 2008). *Трибуси накнадно додати (Moller Pilot, лична комуникација).

Потфамилија	Трибус
Telmatogetoninae	
Usambaromyiinae	
Aphroteniinae	
Chilenomyiinae	
Podonominae	Boreochlini Podonomini
Tanypodinae	Anatopynyiini Coelopuiini Coelotanypodini Macropelopiini Natarsiini Pentaneurini Procladiini Tanypodini
Buchonomyiinae	
Diamesinae	Boreoheptagyini Diamesini Harrisonini Heptagyini Lobodiamiesini Protanypodini
Prodiamesinae	
Orthoclaadiinae	Corynoneurini *Eurycnemini *Cardioclaadiini Metriocnemini Orthoclaadiini
Chironominae	Chironomini Pseudochironomini Tanytarsini

Индекси диверзитета комбинују информације о броју присутних таксона и степену уједначености дистрибуције јединки по врстама. Имајући у виду теорију да се ненарушене заједнице карактеришу великим богатством врста, у којима ниједан таксон не доминира по бројношћу, индекси диверзитета су у широкој примени у методама процене еколошког статуса акватичних система (Jones, 2008). С обзиром да хирономиде показују највећи диверзитет у оквиру заједнице макроинвертебрата, очекује се да ова група буде широко у употреби у методама које користе традиционалне индексе диверзитета за процену степена нарушености водених станишта. Међутим, то није случај у пракси, где су хирономиде, углавном, искључене из скоро свих широко примењиваних метода (Raunio et al., 2007). Сматра се да употреба хирономида у биомониторингу лотичких система не може да пружи додатне информације у односу на систем где се користе друге групе макробескичмењака, чија је примена далеко једноставнија. Та претпоставка се, међутим, показала као нетачна, због одсуства или прилично слабе корелације разноврсности хирономида и осталих група макроинвертебрата (Heino et al., 2009; Heino, 2010). С друге стране, као и код осталих група, таксономски и функционални диверзитет хирономида у лотичким системима је значајно под утицајем нивоа срединске деградације (Koperski, 2009). На основу тога се може закључити да диверзитет хирономида (индекси диверзитета) може пружити додатне информације у вези са квалитетом станишта, које нису доступне у обрасцима диверзитета осталих група. То би, такође, повећало поузданост већ постојећих метода у процени еколошког интегритета акватичних екосистема (Diggins & Stewart, 1998).



Слика 2. Глобална дистрибуција диверзитета фамилије Chironomidae по зоогеографским регионима (број врста/број родова). Скраћенице означавају имена зоогеографских региона (PA - Палеарктик, NA - Неарктик, NT - Неотропски, AT - Афротропски, OL - Оријентални, AU – Аустралијски, PAC - Пацифички, ANT - Антарктички) (преузето из Ferrington (2008)).

1.5 Примена фамилије Chironomidae у методама биопроцене

За процену стања еколошког статуса акватичних екосистема, према Оквирној директиви о водама (WFD) неопходно је укључити биотичку компоненту. Заједница макроинвертебрата, таксономска композиција, густина, однос толерантних и нетолерантних таксона, као и већи број других параметара заједнице, обавезан су део оцене еколошког статуса. У вези са тим, мултиваријантни и мултиметрички индекси представљају интегративну методологију у процесу процене еколошког статуса водених тела истовремено укључујући различите аспекте стања акватичних заједница (Hering et al., 2006).

Ларве хириномида играју главну улогу у укључивању детритуса у процесе рециклирања аутохтоне и алохтоне органске материје у акватичним екосистемима (Hirabayashi & Wotton, 1998; Jones & Grey, 2004). На основу тога хириномиде у

лотичким системима имају значајну улогу у кружењу материје и протицању енергије, чинећи тако битан део ланца исхране (Armitage et al., 1995). Као значајна карика функционалности екосистема, хириномиде представљају главне кандидате за процену еколошког статуса лотичких система, који пружају информације о квалитету воде током дужег временског периода, као и информације о ефектима природних и антропогених процеса. И поред тога, у научним и стручним круговима постоје подељени ставови о укључивању хириномида у програме биопроцене који детектују најчешће стресоре као што су: органско загађење, ацидификација и морфолошка деградација станишта. Тренутно стање је такво да у већини метода, које су већ у употреби у многим мониторинг програмима различитих земаља, ларве хириномида су или занемарене, или укључене на ниској таксономској резолуцији (Hilsenhoff, 1982; Armitage et al., 1983; Pauw & Vanhooren, 1983; Metcalfe, 1989; Wright et al., 1998). Постоји, међутим, неколико индекса који користе хириномиде на нивоу врсте или рода, укључујући их у рачунање финалног скорa квалитета станишта: River Oligochaeta-Chironomidae Index (Paasavirta, 1990), ECO (Verdonschot, 1990), BNBI (Simić & Simić, 1999) и сапробни индекси (Consortium, 2002). Аргументи који иду у прилог овој групи акватичних инсеката, као потенцијалних биоиндикатора су њихова широка распрострањеност, богатство врста и велика бројност, посебно у нарушеним екосистемима (Coffman WP, 1995; De Bisthoven et al., 2005; Ferrington, 2008). Ларве хириномида могу преживети екстремна варирања температуре, рН вредности, концентрације кисеоника и нивоа загађења, колонизујући станишта различитих карактеристика (са различитим супстратом, протоком и продуктивитетом) (Helson et al., 2006). Раније студије указале су на значајан потенцијал ове фамилије као индикатора и представиле услове под којим би се хириномиде користиле у детекцији различитих типова оптерећења станишта, чиме би се повећала прецизност метода за процену квалитета воде (Lenat, 1983; Edward et al., 2001; King & Richardson, 2002; Janssens de Bisthoven & Gerhardt, 2003; Waite et al., 2004a; Koperski, 2009).

Супротно овим чињеницама, друга група аутора указује на потешкоће коришћења ове групе у биомониторингу. Прва препрека у примени хириномида је природна променљивост структуре заједнице, која се меша са променама изазваним антропогеним утицајима, па их је често компликовано моделовати и протумачити (Ward & Williams, 1986; Kerans & Karr, 1994; Lindegaard et al., 1995; Langton & Casas, 1998; Rossaro et al., 2006). Ber & Hellenthal (1990) у свом раду детаљно анализирају

главне изворе варијабилности, указујући на бројне грешке током процеса узорковања, које могу постати главни извор варијабилности података. Аутори даље објашњавају да се приликом планирања узорковања морају узети у обзир следећи параметри: просторно-временске карактеристике популације, хетерогеност микростаништа и временско варирање компоненти, а то изискује организовање прелиминарних истраживања. Поред ове студије, многи аутори као други проблем истичу процес обраде материјала, који је веома захтеван, док је укључивање експерата за идентификацију ове групе неопходно (Raunio et al., 2011). Трећи разлог који се наводи у литератури је способност представника ове групе да се адаптирају на промене срединских услова (Jernelöv et al., 1981; Groenendijk et al., 1999).

Инспирисани потешкоћама које су изнете у претходно поменутих студијама, Rabeni & Wang (2001) су испитивали да ли су хириноиде, поред осталих група макроинвертебрата у програмима процене квалитета лотичких система, неопходне. Аутори су дошли до закључка да се укључивање хириноида у методе био процене, мерено временом и новцем који се утроше за анализу података, не исплати, као и да њихово искључивање из остатка бентосне заједнице неће значајно умањити осетљивост метода. Међутим, аутори такође потврђују да се ова група Diptera показала веома успешном у метричким особинама са малом таксономском резолуцијом. На пример, однос укупне бројности ларви Ephemeroptera, Plecoptera и Trichoptera (EPT група) са ларвама хириноида се правилно мењао са променама интензитета антропогеног утицаја (абундантност EPT/Chironomidae; EPT/Chironomidae + EPT; % ларви Chironomidae у узорку).

1.6 Таксономска резолуција

Методе процене квалитета акватичних екосистема заснивају се или на таксон-специфичној толерантности на загађење, заједно са информацијама о богатству врста и абундантности (биотички индекси), или на мултиваријантним информацијама о структури заједнице (мултиваријантни и мултиметрички индекси) (Carter et al., 2006). Група која се најчешће користи у биомониторингу акватичних екосистема је заједница макроинвертебрата (Rosenberg & Resh, 1993). Ова група је проблематична за идентификацију на основу морфолошких карактера, где број погрешно идентификованих таксона расте са порастом таксономске резолуције (Jiang et al., 2013). То је посебно тачно за фамилију Chironomidae, која представља таксономски

проблематичну групу и где у неким случајевима детерминација до нивоа врсте, на ларвалном стадијуму није могућа (Armitage et al., 1995).

У научним круговима постоји заједнички став о томе да подаци детерминисани до нивоа врсте пружају најпоузданије информације за ординацију узорака сакупљених на различитим локацијама и у различито време (Lenat & Resh, 2001; Melo, 2005; Verdonschot, 2006; Jones, 2008). Међутим, Ferraro & Cole (1992) сматрају да је довољна висина таксономске резолуције дефинисана захтевима за одређеном количином информација, и да углавном зависи од научних, финансијских и логистичких услова (King & Richardson, 2002). Тачније, циљеви студије би требало да поставе границе прихватљиве количине изгубљених информација. Бројне су студије рађене у правцу тестирања ефеката промене таксономског нивоа на метричке особине, најчешће коришћене у стандардним биомониторинг програмима (Jones, 2008). На првом месту је тестирано како богатство врста и индекси диверзитета, као мере еколошког интегритета, реагују на промене таксономске резолуције. Резултати су показали да постоји значајна корелација на таксономској скали, али и да коефицијент корелације опада са смањењем таксономске резолуције. И поред постојања везе између индекса диверзитета на различитим таксономским нивоима, група аутора сматра да се употребом индекса диверзитета са ниском таксономском резолуцијом прави велика грешка, чији степен зависи од таксономске конструкције групе (Jones, 2008). Тачније, усклађеност индекса диверзитета на различитим таксономским нивоима зависиће од броја чланова нижих таксономских нивоа, где са порастом њиховог броја опада и ниво корелације индекса (Wu, 1982; Lenat & Resh, 2001). Кад се разматра образац дистрибуције заједнице коришћењем мултиваријантних метода, многе студије показују да је потребно постићи што виши ниво таксономске резолуције (Hawkins et al., 2000; King & Richardson, 2002; Verdonschot, 2006). Разлог таквом ставу је чињеница да анализа материјала на грубљем таксономском нивоу за последицу има прикривање просторно-временске варијабилности заједнице, што доводи до опадања дискриминационе снаге у ординационим процесима. И поред тога, De Biasi et al. (2003) и Metzeling et al. (2006) су у различитим истраживањима добили сличне резултате, који иду у корист коришћењу ниске таксономске резолуције. У оба случаја, смањење таксономског нивоа није прикрило информације о просторном и временском обрасцу испитиване заједнице макроинвертебрата.

Још једна битна информација за биомониторинг програме је и утицај таксономске резолуције на однос срединских параметара и заједнице (Heino, 2008). Досадашње анализе потврђују да је утицај на међусобни однос абиотичких и биолошких матрица низак и да не утиче значајно на промену образаца на високим таксономским нивоима (Hewlett, 2000; Waite et al., 2004b).

Коначно, сви биотички индекси користе толерантност таксона као индикатора стања средине (Hilsenhoff, 1977; Rosenberg & Resh, 1993; Chessman, 2003). Упркос чињеници да унутар групе (род, потфамилија и фамилија) еколошки афинитети широко варирају, многи биотички индекси користе за улазну матрицу податке на високом таксономском нивоу – род, (Hilsenhoff, 1977), чак и фамилија (Chessman, 2003)). Бројни аутори расправљали су о нивоу грешке коју је дозвољено направити приликом употребе података са малом таксономском резолуцијом (Raunio et al., 2007; Bailey et al., 2011; de-la-Ossa-Carretero et al., 2012). Једини начин утврђивања најнижег употребљивог таксономског нивоа је да се дуж градијента деградације акватичних екосистема истовремено одреди дистрибуциони модел индикаторских врста на различитим таксономским нивоима (врста, род и потфамилија).

Као што је већ помињано у тексту, током идентификационог процеса ларви хириномида истраживачи се врло често суочавају са потешкоћама, као што су: погрешна идентификација, проблем са номенклатуром, немогућа идентификација врсте на нивоу ларве, недостатак идентификационих кључева одређених географских области и чињеница да је идентификација ларви хириномида временски захтеван процес (Armitage et al., 1995). Због недовољног броја студија које тестирају заједницу хириномида, ова велика фамилија Diptera је поново занемарена у научној дебати у вези таксономске резолуције. О великом утицају ове групе на заједницу макроинвертебрата говоре и резултати студије King & Richardson (2002), који су тестирали разлике у ординацији и класификацији локалитета са улазном базом података на различитим таксономским нивоима (врсте, рода и фамилије). У анализу је укључена и комбинована матрица, која је садржала податке различите таксономске резолуције (фамилија Chironomidae до таксономског нивоа врсте а остале групе макроинвертебрата до нивоа фамилије). Усаглашеност матрица је опадала са падом таксономске резолуције, што је било и очекивано. Међутим, када су упоређиване матрице највеће таксономске резолуције (ниво врсте) са комбинованом матрицом заједнице макроинвертебрата (хириномиде на нивоу врсте а остали представници на нивоу фамилије), није потврђена

значајна разлика у резултатима ординације, што говори о доминантном утицају хириномида у заједници макроинвертебрата. Имајући ову чињеницу на уму, мало је студија које дискутују о утицају таксономске скале на образац заједнице хириномида, тестирајући различите еколошке карактеристике ове групе (Raunio et al., 2007; Greffard et al., 2011). Greffard et al. (2011) су тестирали разлике у моделовању варијабилности заједнице ларви хириномида на различитим таксономским нивоима у лентичким системима Канаде. Додатни циљ те студије био је да се утврди да ли са променом таксономског нивоа долази и до промене кључних срединских параметара, одговорних за обликовање структуре заједнице. Сличне циљеве је поставио и Raunio et al. (2007), али за заједницу хириномида у лотичким системима, где су уместо ларви биле узорковане егзувије пупа. У обе студије је структура заједнице успешно процењена и на вишем таксономском нивоу, уз велики степен усаглашености између података на таксономским нивоима врсте и рода.

1.7 Истраживања ларви фамилије Chironomidae у Србији

Иако су хириномиде представљене као кључна група у заједници макроинвертебрата и називане инжењерима акватичних екосистема (Hirabayashi & Wotton, 1998; Jones & Grey, 2004; Olafsson & Paterson, 2004; Péry et al., 2004), мало је информација о њиховој квантитативној и квалитативној композицији заједнице доступно. То је посебно тачно за лотичке системе у Србији, где истраживање на ову тему није спроведено пуних 30 година (1981-2011). На свим већим сливовима у Србији током 70-их и 80-их година прошлог века рађена су опсежна истраживања фауне хириномида, што је резултирало низом публикација које се односе на истраживање састава и просторне дистрибуције фауна хириномида (Janković, 1979; Janković, 1980; Janković, 1982; Janković, 1983; Janković, 1985). Истраживања таквог типа су спроведена на рекама Велика Морава, Јужна Морава и Батлава. Осим у лотичким системима, истраживање овог типа је обављено и у лентичким системима (акумулациона језера Овчар бање и Међувршја). Поред тога, у Србији је тестиран и потенцијал ларви хириномида као биоиндикатора загађења у лотичким системима. Janković (1982) је, на основу двогодишњег истраживања којим су обухваћени сви типови подлоге, покушала да процени квалитет воде Велике Мораве на основу заједнице хириномида. Након истраживања установљено је присуство 35 врста са доминацијом потфамилије Chironomiinae. Дистрибуција ларви хириномида дуж различитих профила зависила је,

углавном, од брзине тока и квалитета подлоге, чиме је уочено постојање одређених комплекса врста. Утврђене заједнице су, осим брзине тока и квалитета подлоге, рефлектовале и остале постојеће еколошке услове: присуство органске материје у седименту, количину раствореног кисеоника у контактної води, што све заједно карактерише сапробно стање одређеног станишта. Према томе, утврђени модел дистрибуције заједница хирономида на истраживаном подручју је, осим степена органског загађења, показивао и квалитет супстрата.

У периоду интензивних истраживања фауне хирономида у Србији је укључен и слив Јужне Мораве (Јанковић, 1985). Том приликом је узорковано на Јужној Морави и ушћима главних притока. Тада је констатовано присуство 60 врста хирономида распоређених у три потфамилије (*Chironominae*, *Orthocladiinae* и *Tanytoidinae*). Распоред локалитета на сливу и фреквентност узорковања нису омогућили формирање комплетне слике о просторној и временској динамици ларви заједнице хирономида.

2. Циљеви рада

Узимајући у обзир да су подаци о просторној и временској динамици фамилије Chironomidae у литератури оскудни, а да су информације о потенцијалу њихове примене у процени еколошког статуса лотичких система контрадикторни, дефинисани су следећи циљеви истраживања:

1. Спровођење квалитативне и квантитативне анализе бентосне заједнице ларви фамилије Chironomidae и одређивање просторне и временске дистрибуције ове групе у сливу Јужне Мораве.
2. Испитивање степена утицаја абиотичких параметара на структуру заједнице хирономида у сливу Јужне Мораве.
3. Тестирање потенцијалних структурних особина заједнице хирономида у процени еколошког статуса текућица.
4. Дефинисање потенцијалних индикаторских таксона за процену квалитета воде и
5. Анализа степена утицаја таксономске резолуције на све тестиране биолошке параметре и дефинисање најнижег таксономског нивоа, довољног за примену ове групе у методама биопроцене.

3. Материјал и методе

3.1 Подручје истраживања

Река Јужна Морава, позната и као Биначка Морава, извире на планини Скопска Црна Гора, у Македонији, одакле отиче према северу. На свом 49. километру се, на 392 метара надмоске висине, спаја са Прешевском Моравицом и као Јужна Морава се, после 295 километара, улива у Велику Мораву, једну од највећих десних притока Дунава. Дуж тока Јужна Морава протиче кроз Грделичку клисуру (30 km), улази у Лесковачко поље и после 48 km се, кроз Корвинградску сутјеску, спушта у Нишко-алексиначку котлину. Након 85 km улази у клисуру дугачку 20 километара и испред Сталаћа се спаја са Западном Моравом. Укупна површина речног слива износи 15.469 километара квадратних, од којих се 14.372 km² (92,91%) налази у Србији, а 1.097 km² (7,09%) у Бугарској (део реке Нишаве, највеће десне притоке Јужне Мораве). Главном делу слива се придружије укупно 157 притока (75 са леве и 82 са десне стране), од којих значајан број пресушује током лета. Сталне леве притоке Јужне Мораве су: Јабланица, Ветерница, Топлица и Пуста Река. Укупна површина слива ових притока већа је од 500 km². С друге стране, од значајних десних притока треба поменути: Власину, Сокобањаску Моравицу и Нишаву, као најдужу притоку (Gavrilović & Đukić, 2002). На основу типологизације водотокова Србије већих од 4.000 km² на Јужној Морави су идентификована 2 типа водотокова (CS_Tip_1.2 и CS_Tip_1.3; Табела 2.).

3.1.1 Власина

Река Власина бујичног је карактера и већим делом тока протиче кроз клисуру, кад код места Власотинце улази у долину, поприма карактеристике равничарског тока, меандрира и улива се у Јужну Мораву. Током свог тока прима велики број мањих притока које су такође бујичарских одлика. Од значајнијих притока треба издвојити Пусту реку, Лужницу, Тегошницу и Градску реку. Укупна површина слива је 1.056 km² а дужина 67,7 km. Према усвојеној типологији река у Србији, у оквиру тока Власине се могу дефинисати четири типа водотока: средње брдске реке са силикатном подлогом (CS_P3_V2_SIL), средње планинске реке са силикатном подлогом (CS_P3_V3_SIL), средње високопланинске реке са силикатном подлогом (CS_P3_V4_SIL) и средње високопланинске реке са органском подлогом (CS_P3_V4_ORG; Табела 2.).

Табела 2. Типологизација водотокова у Србији (преузето из Рауповић et al. (2011)).

Водотокови са површином већом од 4.000 km²			
Тип	Опис типа		
CS_Tip_1.2	Врло велике, низијске реке, силикатна подлога, средњи нанос		
CS_Tip_1.3	Врло велике, брдске реке, силикатна подлога, средњи нанос		
CS_Tip_1.4	Велике, низијске реке, силикатна подлога, средњи нанос		
Водотокови са површином мањом од 4.000 km²			
Тип	Тип надморске висине (V)	Тип слива (P)	Тип геолошке подлоге
CS_P2_V1_SIL	<200 m n.m.	100-1.000 km ²	Силикати
CS_P2_V2_SIL	200-500 m n.m.	100-1.000 km ²	Силикати
CS_P2_V2_CAR	200-500 m n.m.	100-1.000 km ²	Карбонати
CS_P2_V3_SIL	500-800 m n.m.	100-1.000 km ²	Силикати
CS_P2_V3_CAR	500-800 m n.m.	100-1.000 km ²	Карбонати
CS_P2_V4_SIL	>800 m n.m.	100-1.000 km ²	Силикати
CS_P3_V2_SIL	200-500 m n.m.	1.000-4.000 km ²	Силикати
CS_P3_V3_SIL	500-800 m n.m.	1.000-4.000 km ²	Силикати
CS_P3_V4_ORG	>800 m n.m.	1.000-4.000 km ²	Органско тло

3.1.2 Ветерница

Река Ветерница настаје спајањем Манастирског и Језерског потока и након 63,5 km се, у Лесковачкој котлини, улива у Јужну Мораву, формирајући слив површине 560,4 km². Горњи ток реке протиче клисурастом долином и прима бројне притоке, углавном бујичавог карактера, од којих треба издвојити Вучанску реку и Сушицу. С обзиром да је у овој области карактеристичан исти геолошки супстрат, на Ветерници се, услед промене надморске висине, могу издвојити само два типа водотокова: мале брдске реке са силикатном подлогом (CS_P2_V2_SIL) и мале до средње планинске реке са силикатном подлогом (CS_P2_V3_SIL; Табела 2.).

3.1.3 Топлица

Од неколико речица на источним падинама Копаоника настају два већа водотока (Ђерекуша и Луковска река), чијим се спајањем формира највећа лева притока Јужне Мораве, Топлица. Њен ток углавном пролази кроз долину чија се ширина мења. Код Прокупља тече кроз клисурасту долину и након 102,3 km се улива у Јужну Мораву. Укупна површина водотока износи 2197,9 km². Од већих притока издвајају се Југбогдановачка, Јошаничка, Драгушка, Бачка, као леве, и Бејашница, Косаница, Бањска и Луковска река, као десне притоке. На основу типологизације издвојена су два

типа водотока: средње брдске реке са силикатном подлогом (CS_P3_V2_SIL) и средње планинске реке са силикатном подлогом (CS_P3_V3_SIL; Табела 2.).

3.1.4 Пуста река

Пуста река настаје спајањем више потока код села Доњи Статовац, одакле протиче кроз дубоку долину и у Лесковачкој котлини се, након 50,7 километара, улива у Јужну Мораву, формирајући површину слива од 576 km². Најдужа притока Пусте реке је Каменичка река, која се, као и река у коју се улива, карактерише бујичним током. Цео ток припада само једном типу водотока (мале брдске реке са силикатном подлогом; CS_P2_V2_SIL; Табела 2.).

3.1.5 Сокобањска Моравица

На падинама планине Девике извиру два потока који, на надморској висини од 450 метара, формирају Сокобањску Моравицу. Смењивањем клисура и котлина, река формира ток дужине 57 km и у Нишко-алексиначкој котлини се улива у Јужну Мораву. Река је на 38. километру у Бованској клисури преграђена, и ту је формирана акумулација Бован. Укупна површина коју покрива ток реке Моравице је 606 km². Поред Сесалачке реке, која представља главну притоку Моравице, значајна количина воде долази из отока врела Моравице. Дуж лонгитудиналног градијента реке долази до промене силикатне подлоге у карбонатну, због чега се могу препознати три типа водотока на Моравици: мала низијска река са силикатном подлогом (CS_P2_V1_SIL), мала брдска река са силикатном подлогом (CS_P2_V2_SIL) и мала брдска река са карбонатном подлогом (CS_P2_V2_CAR; Табела 2.).

3.1.6 Нишава

Река Нишава је највећа притока Јужне Мораве, која у оквиру свог слива укључује притоке првог и другог реда. Нишава настаје спајањем две реке (Гинска река и Врбинца), на 640 метара надморске висине, на територији Бугарске. На 67. километру, 6 km од Димитровграда улази у Србију, где кроз систем клисура (Сопотски теснац, теснац код Св. Оца, Сићевачка клисура) и котлина (Пиротска котлина Ђурђевпољска котлина, Белопаланачка котлина) тече ка Нишкој котлини и након 151 километра улива се у Јужну Мораву. Највећа клисура је Сићевачка, дугачка 17 km и дубока до 350 m. У том делу је река преграђена са две бране. Корито реке Нишаве

регулисано је у деловима који пролазе кроз Пирот и Ниш. Најзначајније притоке Нишаве су са десне стране Темска са Височицом (као притока другог реда) и са леве стране Кутинска, Црвена река и Јерма. На основу типологизације водотокова Србије већих од 4.000 km² на Нишави су идентификована два типа водотокова (CS_Tip_1.4 и CS_Tip_1.5; Табела 2.).

3.1.7 Темска

Водоток Темске, дужине 59,8 km, је прекогранични, од чега се 108 km² (18%) налази на територији Бугарске. Већи део површине слива се налази у Србији, где заједно са Височицом износи 827,5 km². Река се улива у Нишаву код села Станичење, 16 km низводно од Пирота. На основу типологије водотокова, Темска представља малу брдску реку са силикатном подлогом (CS_P2_V2_SIL), док Височица дуж водотока мења геолошку подлогу: мала средње-планинска река са силикатном подлогом (CS_P2_V3_SIL) и мала средње-планинска река са карбонатном подлогом (CS_P2_V3_CAR; Табела 2.)

3.1.8 Јерма

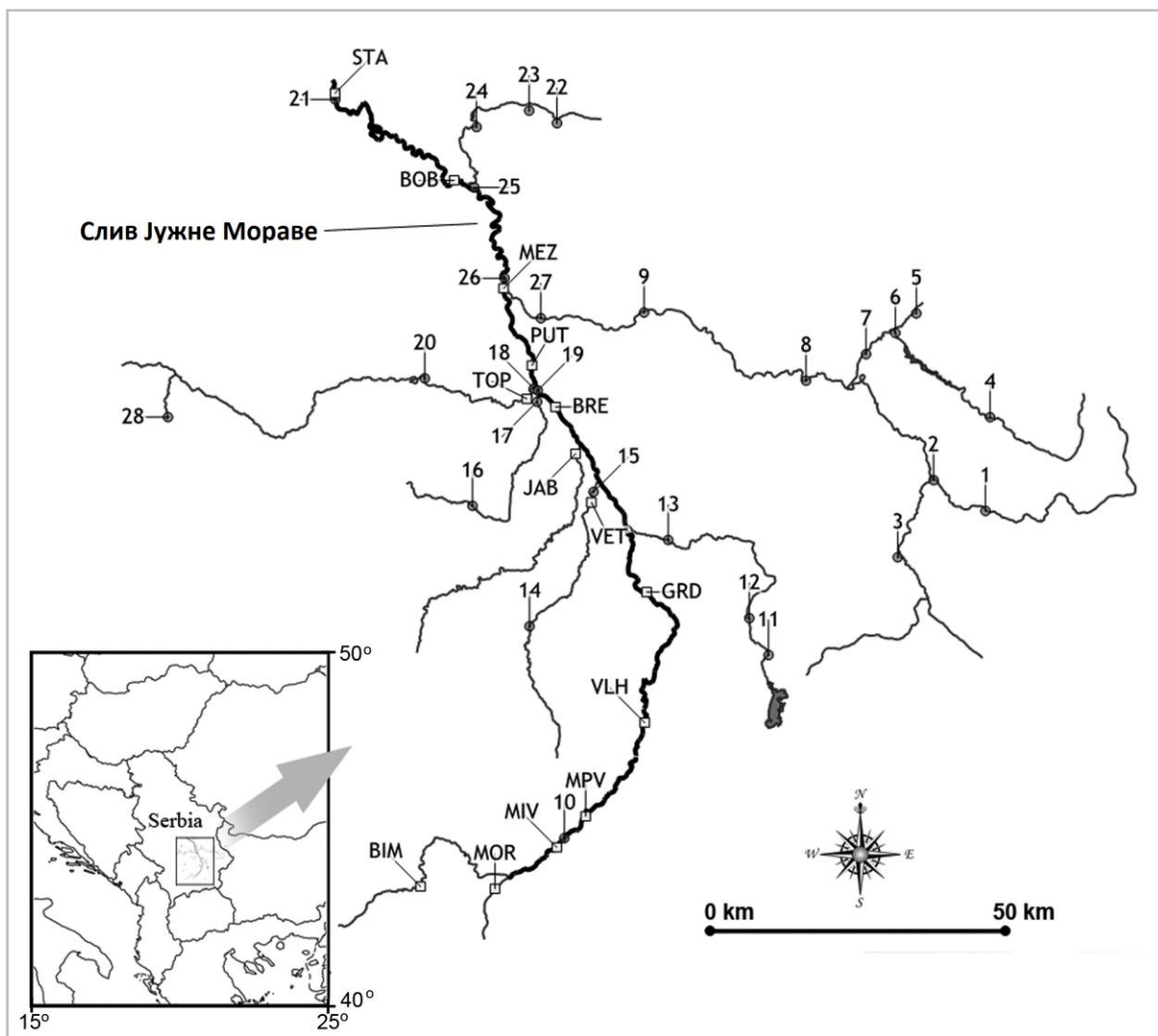
Јерма, као највећа лева притока Нишаве, такође је прекогранична река, која извире на источним падинама Власине, али код села Стразимировци улази у Бугарску и након 27 километара се враћа у Србију, код села Петачинци. Водоток реке је буичног карактера, па често продукује велике количине наноса, због чега је корито реке изразито нестабилно. Део воде Јерма добија из својих највећих притока: Јабланице, Лишковице и Погановске река. Међутим, одређена количина воде (0,05 m³/s) се и одводи каналом „Јерма“ у Власинско језеро. На основу геолошке подлоге и градијента надморске висине одређена су два типа водотока у оквиру Јерме: мала брдска река са карбонатном подлогом (CS_P2_V2_CAR), мала средњепланинска река са силикатном подлогом (CS_P2_V3_SIL) и мала високопланинска река са силикатном подлогом (CS_P2_V4_SIL; Табела 2.).

3.2 Период прикупљања материјала, карактеристике и класификација локалитета

Истраживање је спроведено у периоду од маја 2010. до марта 2011. године. У том периоду прикупљање материјала и пратећих података рађено је на 28 локалитета, распоређених дуж читавог слива Јужне Мораве (Табела 3.; Слика 3.). Током две године узорци су сакупљани два пута у свакој сезони, осим пролећа. Период високих вода спречио је узорковање током маја 2010. на локалитетима 2, 8 и 28. На локалитету 15, због великог степена органског оптерећења, нису пронађене јединке ларви хириномида у узорку у свим узоркованим месецима. Због тога је локалитет 15 искључен из анализе просторне и временске дистрибуције фамилије Chironomidae. Распоредом локалитета дуж слива Јужне Мораве тежило се задовољавању два критеријума. Први је био укључивање што већег диверзитета станишта, чиме би добијени узорак покрио велики степен променљивости фамилије Chironomidae. Други критеријум по коме су распоређени локалитети је претходно спроведена студија на фауни фамилије Chironomidae, која је укључивала 10 локалитета распоређених на Јужној Морави и на ушћима свих већих притока. Избор истих локалитета омогућио је тестирање способности хириномида у детекцији срединских промена током дугог временског периода (три деценије). Узимајући у обзир оба критеријума, поновљено је узорковање које је обавила Јанковић (1985) на истом терену, али са гушћом мрежом локалитета, која је обухватала читав слив Јужне Мораве, са девет притока (Слика 3.).

Табела 3. Локалитети узорковања на сливу Јужне Мораве са редом реке и географским координатама. Локалитети са звездицом се поклапају са локалитетима из студије Јанковић (1985).

Река	Локалитети	Ред реке	Географске координате	
			Н	Е
Нишава	1	2	43° 00' 50''	22° 48' 02''
Јерма	2	1	43° 03' 40''	22° 41' 24''
Јерма	3	1	42° 56' 41''	22° 37' 07''
Височица	4	1	43° 07' 12''	22° 48' 57''
Темшица	5	1	43° 19' 21''	22° 39' 36''
Височица	6	2	43° 17' 48''	22° 36' 42''
Темшица	7	2	43° 15' 39''	22° 33' 06''
Нишава	8	3	43° 13' 25''	22° 25' 47''
Нишава	9	3	43° 19' 51''	22° 04' 24''
Јужна Морава	10*	2	42° 43' 56''	22° 03' 43''
Власина	11	1	42° 47' 47''	22° 19' 58''
Власина	12	1	42° 50' 54''	22° 17' 24''
Власина	13*	2	42° 58' 23''	22° 07' 08''
Ветерница	14	2	42° 50' 37''	21° 49' 34''
Ветерница	15*	2	43° 03' 14''	21° 58' 11''
Пуста река	16	2	43° 01' 51''	21° 42' 07''
Пуста река	17*	2	43° 11' 36''	21° 50' 47''
Топлица	18*	2	43° 12' 46''	21° 50' 05''
Јужна Морава	19*	3	43° 12' 43''	21° 50' 48''
Топлица	20	2	43° 13' 56''	21° 36' 16''
Јужна Морава	21*	4	43° 40' 38''	21° 24' 55''
Сокобањска Моравица	22	1	43° 38' 06''	21° 53' 38''
Сокобањска Моравица	23	1	43° 39' 35''	21° 49' 51''
Сокобањска Моравица	24	1	43° 37' 30''	21° 42' 57''
Сокобањска Моравица	25*	1	43° 32' 09''	21° 42' 49''
Јужна Морава	26*	4	43° 23' 14''	21° 46' 24''
Нишава	27*	3	43° 49' 20''	21° 52' 21''
Луковска река	28	1	43° 09' 52''	21° 01' 56''



Слика 3. Локалитети истраживања на сливу Јужне Мораве. Квадрати (□) обележавају локалитете узорковане 1981, а кругови (●) локалитете из 2010/11.

Како би се смањила природна променљивост, *a priori* класификацијом локалитета су дефинисани типови текућица. *A priori* класификација заснива се на следећим критеријумима (Рауповић et al., 2011):

(1) надморска висина (четири категорије):

- равничарске (до 200 m надморске висине),
- брдско-планинске (200-500 m надморске висине),
- планинске (500-800 m надморске висине) и
- високопланинске реке (преко 800 m надморске висине);

(2) површина речног слива (пет категорија):

- поток,
- мале,
- средње,
- велике и
- веома велике реке;

(3) геолошка подлога (три категорије):

- силицијум,
- карбонати и
- органска подлога;

(4) типови доминантних супстрата (три категорије):

- груб,
- средњи и
- фин седимент.

На основу свих наведених категорија, лотички системи у Србији подељени су на 5 различитих типова водотокова:

(1) равничарске, велике реке са доминацијом финог супстрата,

(2) велике реке са доминацијом средње финог супстрата,

(3) мале-средње реке, до 500 метара надморске висине са доминацијом грубог супстрата,

(4) мале-средње реке, преко 500 метара надморске висине са доминацијом грубог супстрата и

(5) равничарске реке које не припадају водотоковима типа 1.

У овом истраживању сви локалитети класификовани су у три *a priori* дефинисана типа водотокова: тип 2, 3 и 4.

На основу степена антропогеног утицаја, сви истраживани локалитети су класификовани у две категорије: нарушени и скоро-референтни/референтни, користећи модификован мултиметрички индекс за одређивање референтних локалитета (Koperski, 2010). У оквиру овог индекса укључена су три срединска фактора: тип коришћења земљишта, деградација рипаријалног станишта (%) и диверзитет акватичних станишта и четири абиотичке метричке особине (кондуктивитет (ЕС), концентрација ортофосфата (PO₄-P), нитрата (NO₃-N) и амонијака (NH₄-N)). Приликом укључивања метричких особина у индекс коришћен је 5-3-1 скор систем, у складу са кварталним опсезима (Barbour et al., 1996).

3.3 Методе мерења и одређивања срединских параметара (хидролошке, физичке и хемијске карактеристике)

Током студије мерени су следећи параметри који дефинишу карактеристике речног корита и водотока:

- надморска висина је одређена помоћу GPS-а (GARMIN's eTrex[®] Legend),
- ширина речног корита одређена је ласерским даљинометром,
- просечна дубина је одређена на основу средње вредности узастопних мерења дубине на левом, затим десном делу водотока и у делу где је најизраженија водена струја.

Физичке карактеристике воде су мерене на терену следећим методама:

- брзина речне струје је мерена брзинометром Aquatech GMH 3330,
- температура воде (t) и кондуктивитет (ЕС) су мерени сондирањем помоћу уређаја Photometer-System PC MultiDirect (Lovibond[®]),
- мутноћа (турбидитет) воде је на терену одређена помоћу фотометра Lovibond PC Checkit.

Хемијске анализе су рађене на терену и у лабораторијским условима, а вода са терена транспортована је до лабораторија на температури од +4 С°. Одређени су следећи хемијски параметри:

- вредности рН, концентрације кисеоника (DO-mg/l) и сатурације (DO%) су одређивани помоћу уређаја WTW multi 340 I probe (WTW GmbH, Weilheim).

- Концентрације нитрата ($\text{NO}_3\text{-N}$), ортофосфата ($\text{PO}_4\text{-P}$) и амонијака ($\text{NH}_4\text{-N}$) су одређивани спектрофотометријским методама коришћењем спектрофотометра Shimadzu UV-Vis.
- Укупна тврдоћа (Н) је одређивана ЕДТА титрационом методом уз присуство индикатора ериохром црно Т.
- Биохемијска потрошња кисеоника (БПК₅) је одређена применом стандардне методе према АРНА (1999).

3.4 Методе узорковања и идентификације

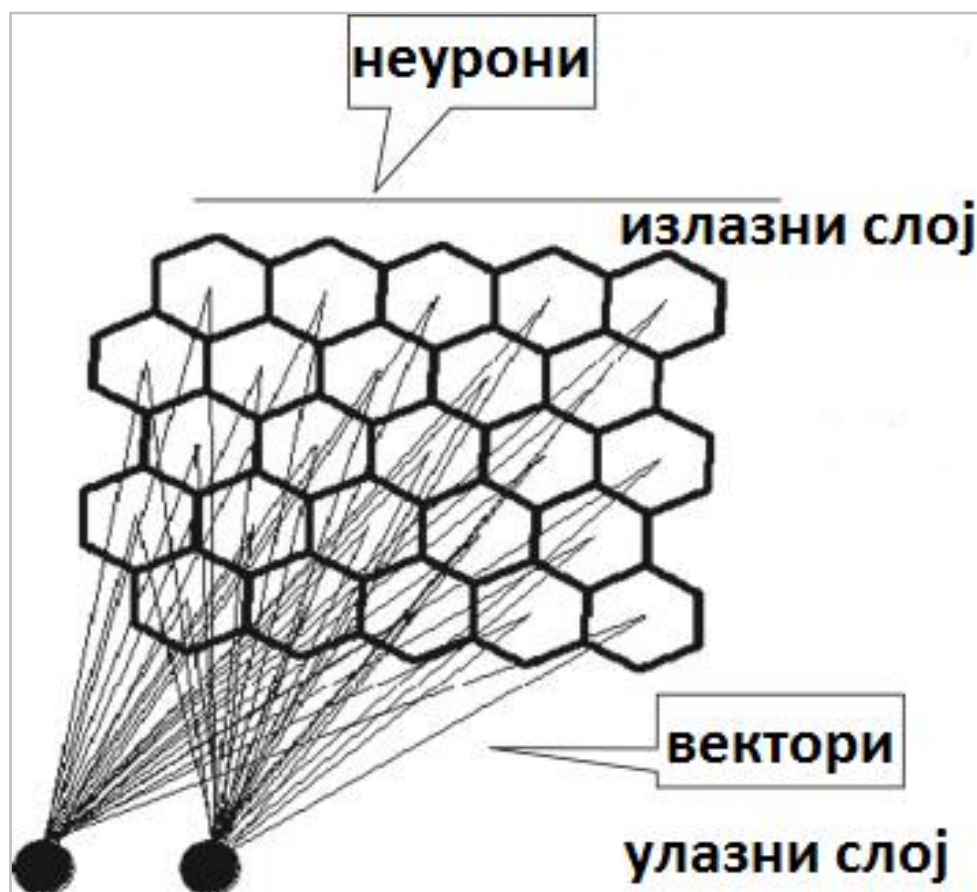
На сваком локалитеу је по изласку на терен узорковано три пута, Сурберовом мрежом захватне површине $0,0625 \text{ m}^2$ са промером окаца на мрежи од $250 \mu\text{m}$. Узорци бентоса су сакупљани унутар секције реке од 50 m , тако да обухвате различите супstrate и протоке воде. Метод узорковања је стандардизован, тако да је Сурберова мрежа постављена на површину седимента, уз троминутно енергично узнемиравање површине супстрата испред мреже. Сва три узорка са сваког локалитета (са различитих супстрата) су обједињени у један узорак. Узорци су на терену фиксирани 4% формалдехидом и транспортовани до лабораторија Природно-математичког факултета у Нишу. У лабораторијским условима ларве хирономида су издвојене од остатка акватичних организама и конзервиране у 70% етанолу.

Ларве хирономида су идентификоване до нивоа рода, подрода и врсте, употребом кључева за идентификацију за сваку потфамилију групе хирономида (Wiederholm, 1983; Moller Pillot, 1984a; Moller Pillot, 1984b; Schmid, 1993; Vallenduuk & Moller Pillot, 2007; Moller Pillot, 2009). Идентификација је спроведена помоћу бинокуларне лупе Leica MZ – A16A Stereomicroscope са камером Leica DFC320 Digital Camera и микроскопа Leica System Microscope DM2500, са дигиталном камером Leica DFC 490 Digital Camera. Таксономија коришћена у овој студији је према Spies & Sæther (2004), уз корекције Moller Pillot (лична комуникација). Резултати фауне хирономида из студије Janković (1985) су, такође, кориговани према новој таксономији и номенклатури (Spies & Sæther, 2004).

3.5 Анализа података

3.5.1 Самоорганизујуће мапе

Како би се представила просторно временска дистрибуција ларви фамилије Chironomidae и одредио модел повезаности заједнице са срединским факторима, коришћене су Кохонеове вештачке неуронске мреже, познате још и као самоорганизујуће мапе (енг. **S**elf **O**rganizing **M**aps - SOM; Kohonen, 1982). SOM је ординациона метода која успешно моделује и визуализује (пресликава) линеарне и нелинеарне везе, у високо димензионалном сету података, у виду нискодимензионалног простора (неуромреже). Због тога је ова метода погодна за представљање просторних и временских структура заједница које се састоје од великог броја врста. Структура SOM-а се састоји из два слоја: улазни и Кохоненов, или излазни слој (енг. *layer*) (Слика 4.).



Слика 4. Структура самоорганизујућих мапа. Тачке представљају променљиве неуроне улазног слоја. Линије представљају векторе, који се сликају у излазни слој неурона (преузето из Kalteh & Berndtsson (2007)).

Улазни слој се састоји из неурона чији број зависи од броја улазних променљивих. Унос података у СОМ је организован у облику улазне матрице која се у овој студији састоји од 185 редова (узоркованих локалитета) и 110 колона (таксона). Релативна бројност таксона је \log -трансформисана ($\log(x+1)$) и нормализована. На тај начин су променљиве заштићене од поседовања већег утицаја у односу на остале варијабле. Након што је матрица спремна за улаз у СОМ, почиње процес учења (тренирања), који се огледа у итеративном (секвенцијалном) укључивању сваког улазног вектора (ред (таксон) у улазној матрици) у мрежу. Током овог само-организујућег процеса (енг. *self-organizing procedure*), сваки улазни вектор пресликава се у одређени неурон излазне мреже, формирајући карактеристичан модел података (у овом случају заједнице хирономида). Процес је тако организован да долази до упоређивања представљеног улазног обрасца података са сваким излазним СОМ неуроном. Неурон који се према моделу, у највећем степену, поклапа по вредности еуклидове дистанце са улазним обрасцем, назива се победнички неурон, или најбоље уклапајући неурон (енг. *Best Matching Unit* – ВМУ). Излазни слој је организован у облику дводимензионалне решетке, која се састоји од излазних хексагоналних неурона. Разлике модела који су додељени неуронима расту са порастом њихове дистанце у мрежи. Тачније, суседна два неурона ће имати сличније моделе у односу на неуроне позициониране на супритним крајевима мреже. Укупна варијабилност присутна у улазној матрици података покривена је моделима са свих неурона (Penczak et al., 2006). Како би се формирале групе сличних неурона, коришћена је метода „*k-mean*” на тренираној СОМ мапи (Jain & Dubes, 1988).

На претходно тренираној СОМ мапи, пасивно су укључене срединске променљиве, чиме се омогућава тестирање везе између средине и структуре заједнице, а да притом средински параметри немају никакав утицај на ординационе и класификационе процесе, засноване на биолошким подацима. Након што је свака срединска променљива увезена у тренирану СОМ мрежу, израчуната је њихова средња вредност за сваки неурон у мрежи, окупиран бар једним улазним вектором (Park et al., 2003). Веза између срединских варијабли и СОМ мреже је представљена визуализационом техником компонентних графикана (енг. *component planes*), приказујући на истој мрежи дистрибуционе обрасце сваке променљиве појединачно. Ако дистрибуција срединских параметара показује јасан градијент (црно-беле боје) на СОМ мрежи, то значи да ти параметри значајно доприносе специфичном обрасцу

заједнице. С друге стране, уколико градијент није видљив, утицај таквог параметра је безначајан. Компонентни графикони коришћени су и за визуализацију дистрибуције такосна на мрежи како би се приказао утицај срединских фактора на дистрибуцију одређених таскона (Milošević et al., 2013).

Број неурона у излазној мрежи (резолюција мреже) веома је важан параметар за што верније приказивање структуре заједнице на графикону. Уколико је резолуција мреже погрешна, на пример сувише ниска, могуће је да важне разлике у варијабилности података буду прикривене. С друге стране, уколико је резолуција мреже превисока (где велики број неурона нема додељене узорке), разлике у моделима података су и сувише мале за тачну интерпретацију (Céréghino & Park, 2009). Нажалост, до сада није направљен теоријски метод за одређивање најбоље оптималне резолуције мреже. У овој студији коришћене су две, најчешће препоручиване методе (Vesanto et al., 2000; Park et al., 2003). У првом случају, предложен је метод Vesanto et al. (2000), где је оптимални број неурона на мапи близу $5\sqrt{n}$, где је n број тренинг узорака. Алтернативна метода (Park et al., 2003) одређује оптималну резолуцију помоћу локалног минимума квантизационе (QE) и топологизационе грешке (TE). Коришћењем симултано обе методе и избегавањем превеликог броја празних неурона (без додељених локалитета; Penczak et al. 2012), у овом истраживању је одређена оптимална величина мреже од 8×7 неурона. Математичке основе SOM методе детаљно су дискутоване у Kohonen (1982).

Претходне студије које приказују просторни и временски модел заједнице користе мултиваријантне технике, као што су анализа главних компоненти (PCA), кластер анализе и кореспондентна анализа (CA). Међутим, у последње време се у анализи динамике заједнице користе и вештачке неуромреже (Nijboer et al., 2005). SOM се прво користио за одређивање просторне и временске дистрибуције бентосних заједница макроинвертебрата (Chon et al., 1996). Од тада велики број аутора користи SOM за ординацију и класификацију, предикцију и моделовање података у различитим аспектима истраживања бентосних макроинвертебрата (Chon et al., 2000; Park et al., 2003; Park et al., 2004; Verdonschot, 2005; Tang et al., 2010; Chon, 2011). SOM анализа је такође била коришћена за моделовање динамике ларви хириномида на различитим профилима станишта (Penczak et al., 2006). Главна предност SOM методе је способност да моделује нелинеарну везу између варијабли и да је мање осетљива на утицај екстремних вредности (Park et al., 2004). Метода мултидимензионалног скалирања (енг. The Non-metric MultiDimensional Scaling – NMDS; Clarke & Gorley 2006) такође се

користи у студијама динамике заједница макроинвертебрата и успешно процесуира нелинеарне податке. Међутим, СОМ метода није лимитирана када се, за формирање улазних вектора, користе велике базе података, користећи током визуализационог процеса комплетан доступни простор на 2д-мрежи. Ово није случај са методом мултидимензионалног скалирања, где 2-д или 3-д апроксимација великог сета података може створити графиконе који су нечитљиви и непоуздани за интерпретацију резултата. Са порастом броја података, нарочито у случајевима када у улазној табели има доста нула (врста није присутна), интерпретација података помоћу наведених мултиваријантних метода може бити непоуздана, са великом грешком (на пример, код NMDS-а са високим „стресом“ као мером поузданости/непоузданости анализе, или малом варијабилношћу везаном за најзначајније осе код СА).

С обзиром да је у овој студији сет података обилан (са великим бројем параметара и реплика), нелинеаран, где велики број врста варира у својој густини кроз просторне и временске градијенте (Chon et al., 2000), СОМ метода је одговарајућа за анализу података такве природе.

СОМ анализа коришћена је и приликом упоређивања усаглашености ординационих и класификационих процеса на различитим таксономским нивоима. За овај тест формиране су три посебне улазне матрице, где су подаци о фауни хириномида представљени на три различита таксономска нивоа. Прва матрица је формирана од тест узорака (редови у матрици) и таксона (колоне) идентификованих, углавном, до нивоа врсте. У остале две базе података, група хириномида је представљена таксонима идентификованим до нивоа рода и потфамилије. Временска дистрибуција у ове три матрице приказана је сезонски, просечним вредностима бројности на основу две реплике у свакој сезони, осим пролећа, када је узорковано само једном (мај).

3.5.2 Индекси диверзитета

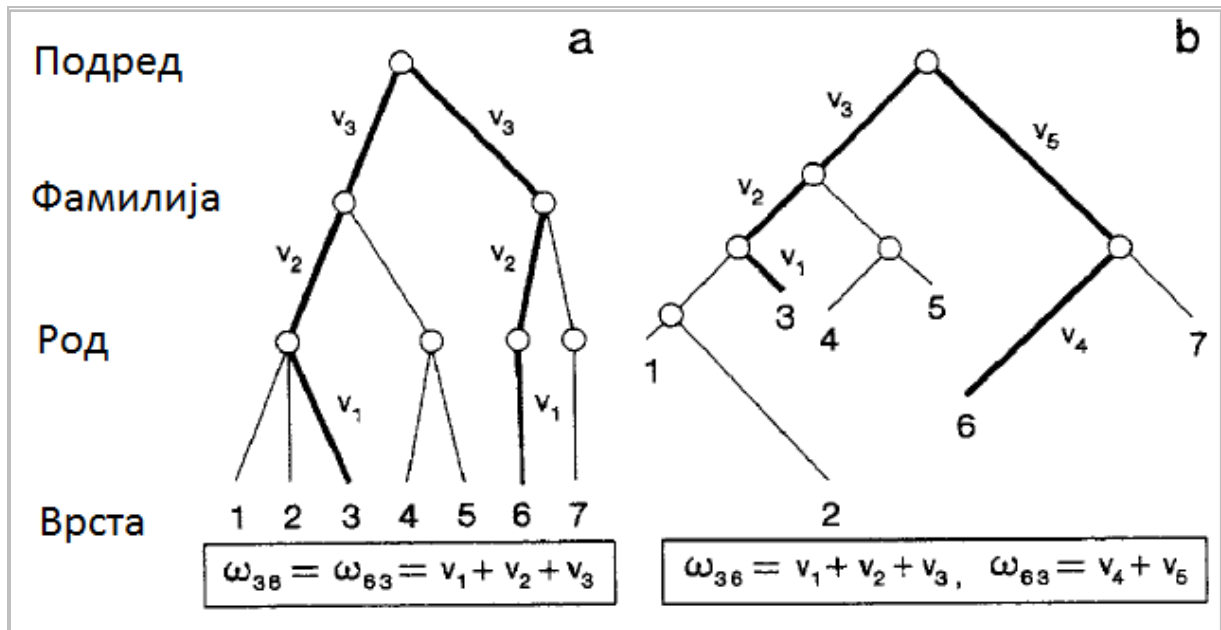
Индекси диверзитета традиционално се користе у процени варирања биодиверзитета између референтних станишта и станишта деградираних услед антропогеног утицаја (Magurran, 2004). Већина индекса користи богатство таксона и еквитабилност, као параметре који су осетљиви на методу узорковања и тип станишта. Овакав недостатак представља озбиљну препреку у спровођењу студија које покривају велике просторне и временске скале. Индекси таксономског диверзитета могућа су решења овог проблема (енг. *Taxonomic distinctness index*; Clarke & Warwick, 1998).

Њихова главна предност је потпуна независност од метода и учесталости узорковања, омогућавајући примену ове методе у поређењу студија без података о темпу и начину узорковању и типу станишта (Clarke & Warwick, 1999). Супротно традиционалним индексима специјског диверзитета, индекси таксономске различитости засновани су на филогенетској, таксономској и функционалној варијабилности између врста у оквиру заједнице (Heino et al., 2005). Овај концепт прво је развијен за употребу у моринским екосистемима (Warwick & Clarke, 1998; Rogers et al., 1999; Warwick et al., 2002), док се данас његова примена проширила и на заједнице слатководних екосистема (Heino et al., 2005; Abellán et al., 2006; Bhat & Magurran, 2006; Heino et al., 2007; Marchant, 2007; Milošević et al., 2012).

Заједница хирономида је у овој студији представљена са два различита таксономска индекса диверзитета. Први је просечна таксономска различитост (Δ^+), који се дефинише као просечна дужина таксономског пута између било које две случајно изабране врсте, следећи Linnae-ову, или филогенетску класификацију доступног сета врста (Clarke & Warwick, 1998). Δ^+ се рачуна на основу следеће формуле:

$$\Delta^+ = \frac{\sum \sum_{i < j} \omega_{ij}}{m(m-1)/2},$$

где је m број врста а ω тежина додељена путу који повезује врсту i и j . За израчунавање ω је неопходно дефинисати и доделити одређене тежине (v) за сваку секцију пута која представља корак који повезује два суседна таксономска нивоа (Слика 5.). У овој студији је коришћено пет таксономских нивоа (фамилија, потфамилија, трибус, род и врста) где је свакој секцији пута између два нивоа додељивана тежина $v=1$.



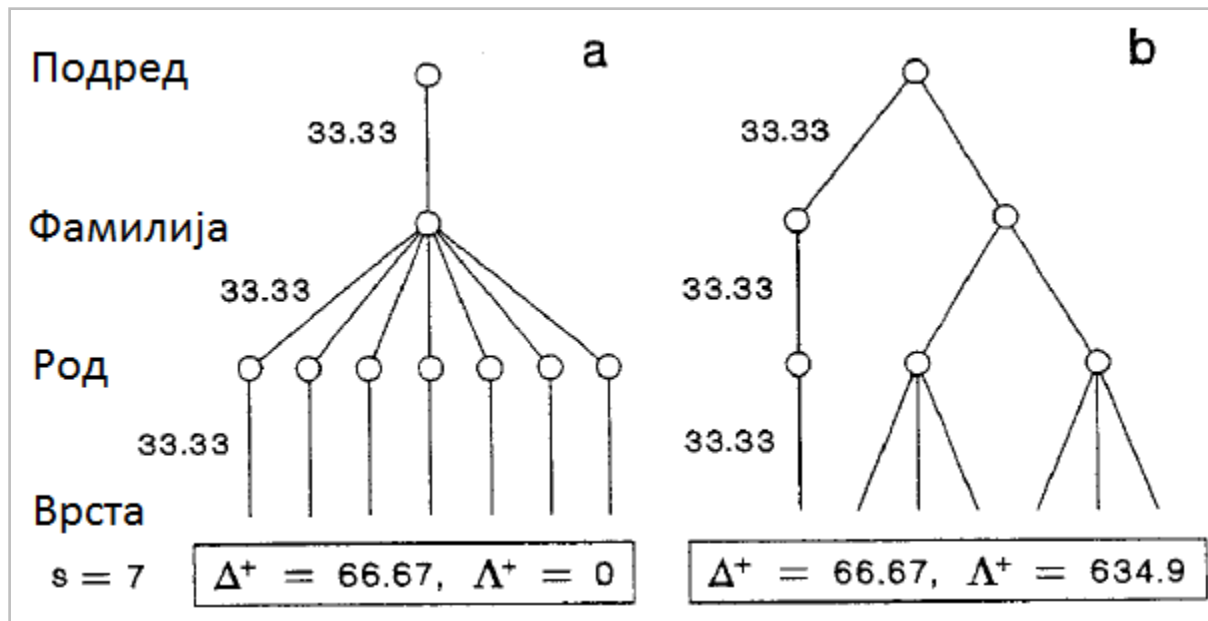
Слика 5. Пример (а) таксономског, (б) филогенетског стабла и дефинисаних тежина таксономског пута (ω_{ij}) од врсте i до врсте j , за узорак од 7 врста. Дужина пута је једнака суми дужина таксономских корака (v) до првог заједничког чвора одређеног пара врста у узорку. Средња вредност дужине таксономских путева свих парова врста у узорку представља индекс таксономске различитости (δ^+) (преузето из Clarke & Warwick (2001b)).

Други индекс таксономског диверзитета коришћен у овој студији је варијанса таксономске различитости (λ^+), која открива уједначеност дистрибуције таксона дуж хиерархијског таксономског стабла.

λ^+ се рачуна као:

$$\lambda^+ = \frac{\sum \sum_{i \neq j} \left(\omega_{ij} - \bar{\omega} \right)^2}{m(m-1)/2}$$

Приказујући карактеристике таксономске структуре (Слика 6.), овај индекс обезбеђује додатне информације о нереално прекомерном или умањеном утицају присутних таксона у узорку.



Слика 6. Пример два стабла (а; б) са истим вредностима просечне таксономске различитости (Δ^+), али са различитим вредностима индекса Λ^+ (варијанса таксономске различитости), који рефлектује већу неуједначеност структуре стабла б у односу на стабло а, где је структура максимално уједначена. Дужина таксономских корака (v) је стандардизована тако да је максимална вредност $\omega=100$ (Преузето из Clarke & Warwick (2001b)).

Конусни графикони (енг. *funnel plot*) са границама 95% интервала поверења за Δ^+ и Λ^+ су конструисани према Warwick & Clarke (1998). Како би се одредиле очекиване вредности Δ^+ и Λ^+ на основу регионалног скупа врста (мастер листа), коришћен је тест рандомизације (случајног избора). Очекиване вредности индекса омогућавају процену степена одступања добијених од очекиване вредности. Уколико добијене вредности испадају ван граница 95% интервала поверења, сматра се да су локалитети са тако смањеним вредностима таксономске различитости изложени одређеном степену антропогеног утицаја (нпр. органско и токсично оптерећење, ацидификација и морфолошка нарушеност станишта). У овој студији је формирана комбинована мастер листа на основу истраживања спроведених 1981. и 2010. године која садржи 109 таксона. Такође је конструисан дводимензионални графикон са симулираним вредностима Δ^+ и Λ^+ , израчунатих на основу података из мастер листе. Визуализација симулираних вредности индекса је конструисана како би се тестирало постојање унутрашње корелисаности, изазване таксономском структуром мастер листе (Warwick & Clarke, 2001). Као и у 95% конусним графиконима, у случају графикона расипања симулираних вредности Δ^+ и Λ^+ , елипсе приказују

границе 95% интервала поверења. Графикони расипања приказују симулиране вредности са нултом хипотезом да су узорци врста из мастер листе формирану по принципу случајности (свака врста из мастер листе има једнаку вероватноћу да се јави на сваком локалитету, узорку) (Clarke & Warwick, 2001b).

Како би се утврдило постојање везе између delta+ индекса и традиционалних индекса специјског диверзитета, за сваки локалитет одређене су вредности: укупан број врста (S), Shannon-Wiener-ов индекс диверзитета (H')

$$H' = - \sum_i^S p_i \log p_i$$

Simpson-ов индекс (1-D):

$$1-D = 1 - \sum_i^S p_i^2$$

и Pielou-ов индекс уједначености (J')

$$J' = \frac{H'}{\log S}$$

где је p_i просечна бoroјност врсте i , а S укупан број врста (Dash, 2001).

За рачунање поменутих индекса диверзитета коришћена је матрица са три реплике током две сезоне, лета (јун, август) и јесени (септембар). Избор месеца је рађен са циљем да се смањи временска варијабилност која је карактеристична за ову фамилију (видети: Резултати, 4.2 Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae). Овако формирана база података одговара периоду узоркавања у студији из 1981. године, што омогућава верну компарацију резултата.

3.5.3 Мултиваријантни и униваријантни тестови

Биplot презентација нормализоване анализе главних компоненати (енг. *Principal Component Analysis*, PCA) искоришћена је како би се графички представио однос између локалитета и њихових вредности, срединских параметара и индекса delta+. Поред тога, иста анализа је примењена за тестирање степена повезаности срединских варијабли и традиционалних индекса диверзитета (Shannon-Wiener-ов индекс диверзитета (H'), Simpson-ов индекс (1-D) и Pielou-ов индекс уједначености (J')). Матрица података која је коришћена као улаз за PCA методу садржала је 11 срединских променљивих – концентрација нитрата (NO₃-N), ортофосфата (PO₄-P), амонијака (NH₄-N) и кисеоника (DOmg/l), засићеност (сатурација) кисеоником (DO%),

тврдоћа воде (Н), електрична проводљивост (ЕС), рН вредност, петодневна биолошка потрошња кисеоника (БПК5), температура воде (t) и мутноћа (турбидитет). Улазна матрица је такође садржала, у првом тесту вредности delta+ индекса, као меру структуре заједнице хириномида. У другом тесту је структура заједнице била представљена горе наведеним, традиционалним индексима диверзитета. Свих 12 променљивих, у првом случају, и 16 променљивих у другом, представљало је колоне улазне матрице, мерене на 28 локалитета (редови матрице). С обзиром да су подаци квантитативни и да променљиве нису представљене у истим јединицама, приликом анализе података је коришћена нормализована PCA. Нормализација података је спроведена према следећој једначини:

$$y_i = \frac{x_i - \bar{X}_i}{SD_i}$$

где је y_i трансформисана вредност променљиве i , x_i оригинална вредност променљиве, средња вредност варијабле i за све податке у узорку и SD_i је стандардна девијација варијабле i . Након анализе, добијене вредности координата свих локалитета на првој и другој PCA оси су стандардизоване (на вредности између -1 и 1). Вредности координата локалитета најзначајнијих оса коришћене су за класификацију локалитета у групе, на основу Ward-овог алгоритма (Everitt et al., 2001). PCA и кластер анализа рађене су у статистичком пакету ADE-4 software (Thioulouse et al., 1997).

С обзиром да COM анализа не приказује статистичке индикације врста одговорних за одвајање кластера, додатна интерпретација приказаних образаца еколошких података је спроведена применом IndVal методе (the **Indicator Values**; Dufrière & Legendre, 1997). Да би се идентификовале значајне врсте са вредностима IndVal параметра већим од 25%, примењен је Monte Carlo тест значајности са 1000 пермутација. Такве врсте су репрезентативне за групу локалитета са релативном фреквенцом и густином не мањом од 50%. Врсте које имају IndVal вредност мању од 25%, а статистички су значајне ($p < 0,05$), представљају таксоне који су важни за групу. Ове врсте обезбеђују додатне информације о групи, али нису репрезентативне, јер имају ниске вредности релативне фреквенце. Анализа IndVal методе је спроведена тако што се користио PC-ORD 4.0 програмски пакет (McCune & Mefford, 1999).

Како би се тестирао утицај таксономске резолуције на индикаторску снагу таксона у процени укупне деградације станишта, примењена је IndVal метода на две базе података са различитом таксономском резолуцијом (ниво врсте и рода). У првом

кораку су локалитети ординисани и класификовани COM методом, на основу 15 срединских параметара. Након тога, IndVal метода је истовремено примењена на матрицама са подацима на оба таксономска нивоа, са дивизионим обрасцем, заснованим на срединским параметрима.

Како би се упоредила класификациона способност на различитим таксономским нивоима, коришћена је метода процене класификационе снаге (**C**lassification **S**trength). Ова метода процењује како модели (класификационе шеме), добијени на основу података на нивоу рода и потфамилије, могу да опишу (покрију) варијабилност у композицији заједнице на најфинијем могућем таксономском нивоу. Класификациона снага је одређена за поделе локалитета, према подацима на три различита таксономска нивоа, добијена COM методом. Према Van Sickle & Hughes (2000) CS је рачунат коришћењем приступа „средње сличности“, при чему је $CS=W-B$. У овој једначини променљиве W и B представљају средњу унутаргрупну сличност и средњу међугрупну сличност, респективно. Дендрограм средње сличности базиран је на Sorensen-овом коефицијенту сличности (Karadžić & Marinković, 2009), чије се вредности налазе у опсегу између 0 (нема сличности) и 1 (комплетна сличност). Тачније, када је $CS=0$, онда је $W=B$ и нема сличности између класа. С друге стране, када је $CS=1$, онда нема разлике између класа (у том случају је $W=1$ и $B=1$). Ова анализа је спроведена коришћењем „Multiresponse Permutation Procedure“ (MRPP) анализе у PC-ORD 4.0 programskom paketu (McCune & Mefford, 1999) и MRPP екстензије (MRPPCONV.exe) која је доступна у MEANSIM 6 (Van Sickle & Hughes, 2000).

Да би се приказала усаглашеност између структуре заједнице на таксономском нивоу врсте, фамилије и потфамилије, коришћена је RELATE анализа (Clarke & Warwick, 2001a), компаративни тест матрица сличности заснованих на Spearman-овој корелацији (Karadžić & Marinković, 2009). Улазне матрице за ову анализу су конструисане за сва три таксономска нивоа у виду Bray-Curtis-ових матрица сличности (Clarke & Warwick, 2001a).

За одређивање утицаја таксономске резолуције на однос заједнице са срединским факторима истовремено је примењена BIO-ENV анализа (Clarke & Ainsworth, 1993) за сва три таксономска нивоа. Поред улазних матрица сличности са биолошким подацима, ова анализа користи и матрице еуклидових дистанци срединских параметара. BIO-ENV анализа функционише тако што пореди ординације на основу биотичких и срединских конфигурација, трагајући за корелацијом између Bray-Curtis-

ових матрица сличности и матрица еуклидових дистанци. Као резултат анализа приказује сет срединских параметара који обезбеђује највећи степен корелације између матрица заједнице и срединских фактора. У циљу боље интерпретације резултата BIO-ENV анализе, COM анализом је истовремено представљена дистрибуција вредности срединских параметара које је BIO-ENV приказао као значајне за структуру заједнице хирономида.

Pearson-ов корелациони тест (Karadžić & Marinković, 2009) примењен је за корелацију различитих индекса диверзитета. Овај тест је такође коришћен за одређивање степена усаглашености богатства врста и индекса диверзитета између различитих таксономских нивоа. У циљу одређивања разлике између вредности delta+ две базе података, из 1981. и 2010., као и између нарушених и референтних локалитета, коришћен је Student-ов t тест (Zar, 2009).

Значајне разлике у структури заједнице хирономида између сезона (месеца) су одређене помоћу Kruskal-Wallis-овог теста (Karadžić & Marinković, 2009). За поређење група локалитета формираних на основу абиотичких параметара је такође примењен Kruskal-Wallis-овог теста, док је за појединачна поређења група коришћен Mann-Whitney-ев тест (Karadžić & Marinković, 2009). Степен утицаја временске варијабилности је процењен ета квадратом (η^2), чија се вредност креће у опсегу од 0 до 1. Овај параметар индикује да временска варијабилност може имати слаб ($\eta^2=0,01$), средњи ($\eta^2=0,06$) или јак ($\eta^2=0,14$) утицај на композицију заједнице хирономида

Једнофакторска ANOVA коришћена је за тестирање разлика срединских фактора између група локалитета формираних на основу биолошких података. *Post hoc* анализа је рађена помоћу Tukey HSD теста (Zar, 2009). Сви униваријантни статистички тестови су примењени помоћу статистичког пакета SPSS, верзија 15.

4. Резултати

4.1 Таксономски састав фауне хирономида на сливу Јужне Мораве

Током истраживања од укупно 35.185 анализираних јединки, констатовано је присуство 111 таксона у оквиру 65 родова, дистрибуираних у 5 потфамилија (Табела 4.). Најразноврснија потфамилија у оквиру фамилије Chironomidae била је Orthoclaadiinae, са регистрованих 51 таксоном и потфамилија Chironominae, са укупно 38 таксона. Након тога следи потфамилија Tanypodinae, са 17 таксона, Diamesinae, са три и Prodiamesinae са само два забележена таксона. Род са навећим бројем забележених врста током истраживања био је *Eukiefferiella* (10 таксона). Након тога следи *Polypedilum* са 8 и *Cricotopus* са 5, док су родови *Orthocladus* и *Corynoneura* били присутни са по четири таксона. Од преосталих родова, највећи број (44) је био заступљен са само једном врстом, 14 родова са по две, а само два рода са по три врсте.

Табела 4. Таксономски састав заједнице фамилије Chironomidae констатован током истраживања на подручју слива Јужне Мораве, у периоду од маја 2010. до марта 2011. године.

Таксон	Таксон
Потфамилија Tanypodinae	Потфамилија Orthoclaadiinae
<i>Ablabesmyia longistyla</i> Fittkau 1962	<i>Brillia bifida</i> (Kieffer 1909)
<i>Ablabesmyia phatta</i> (Egger 1864)	<i>Brillia flavifrons</i> (Johannsen 1905)
<i>Anatopynia plumipes</i> (Fries 1823)	<i>Cardiocladius fuscus</i> Kieffer 1924
<i>Apsectrotanypus trifascipennis</i> (Zetterstedt 1838)	<i>Corynoneura</i> cf. <i>antennalis</i> sensu Schmid (1993)
<i>Arctopelopia barbitarsis</i> (Zetterstedt 1850)	<i>Corynoneura coronata</i> Edwards 1924
<i>Conchapelopia melanops</i> (Meigen 1818)	<i>Corynoneura lobata</i> Edwards 1924
<i>Krenopelopia</i> sp.	<i>Corynoneura scutellata</i> Winnertz 1846
<i>Macropelopia adaucta</i> Kieffer 1916	<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen 1818)
<i>Macropelopia nebulosa</i> (Meigen 1804)	<i>Cricotopus</i> gr. <i>sylvestris</i> sensu Hirvenoja 1973
<i>Natarsia</i> sp.	<i>Cricotopus tremulus</i> (Linnaeus 1758)
<i>Nilotanypus dubius</i> (Meigen 1804)	<i>Cricotopus triannulatus</i> agg. sensu Moller Pillot 1984
<i>Procladius</i> spp.	<i>Cricotopus trifascia</i> Edwards 1929
<i>Rheopelopia</i> sp.	<i>Epoicocladius ephemerae</i> (Kieffer 1924)
<i>Tanypus kraatzi</i> (Kieffer 1912)	<i>Eukiefferiella brevicar</i> (Kieffer 1911)
<i>Tanypus punctipennis</i> Meigen 1818	<i>Eukiefferiella claripennis</i> (Lundbeck 1898)
<i>Thienemannimyia</i> sp.	<i>Eukiefferiella clypeata</i> (Kieffer 1923)
<i>Zavreliomyia</i> sp.	<i>Eukiefferiella coerulescens</i> (Kieffer 1926)
Potfamilija Chironominae	<i>Eukiefferiella fittkai</i> Lehmann 1972
<i>Chironomus</i> spp.	<i>Eukiefferiella gracei</i> (Edwards 1929)
<i>Cladotanytarsus</i> spp.	<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i> (Edwards 1929)
<i>Cryptochironomus</i> sp.	<i>Eukiefferiella lobifera</i> Goetghebuer 1934
<i>Demicryptochironomus vulneratus</i> (Zetterstedt 1838)	<i>Eukiefferiella minor</i> (Edwards 1929)
<i>Dicrotendipes nervosus</i> (Staeger 1839)	<i>Eukiefferiella tirolensis</i> Goetghebuer 1938
<i>Dicrotendipes notatus</i> (Meigen 1818)	<i>Heleniella ormaticollis</i> (Edwards 1929)
<i>Endochironomus albipennis</i> (Meigen 1830)	<i>Krenosmittia</i> sp.
<i>Endochironomus dispar</i> (Meigen, 1830)	<i>Limnophyes</i> sp.
<i>Glyptotendipes</i> sp.	<i>Nanocladius dichromus</i> (Kieffer 1906)
<i>Harnischia</i> sp.	<i>Nanocladius rectinervis</i> (Kieffer 1911)

<i>Microchironomus tener</i> (Kieffer 1918)	<i>Orthocladius (Euorthocladius) sp.</i>
<i>Micropsectra bidentata</i> Goetghebuer 1921	<i>Orthocladius (Orthocladius) spp.</i>
<i>Micropsectra sp.</i>	<i>Orthocladius frigidus</i> (Zetterstedt 1838)
<i>Microtendipes pedellus</i> agg. sensu Moller Pillot (1984)	<i>Orthocladius lignicola</i> Kieffer 1914
<i>Parachironomus frequens</i> (Johannsen 1905)	<i>Orthocladius rivulorum</i> Kieffer 1909
<i>Paracladopelma laminatum</i> (Kieffer 1921)	<i>Paracladius conversus</i> (Walker 1856)
<i>Paracladopelma nigrifulum</i> (Goetghebuer 1942)	<i>Paracricotopus niger</i> (Kieffer 1913)
<i>Paralauterborniella nigrohalteralis</i> (Malloch 1915)	<i>Parakiefferiella smolandica</i> (Brundin 1947)
<i>Paratanytarsus austriacus</i> (Kieffer 1924)	<i>Parametriocnemus stylatus</i> (Spaerck 1923)
<i>Paratanytarsus dissimilis</i> (Johannsen 1905)	<i>Paratrachocladus rufiventris</i> (Meigen 1830)
<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen 1818)	<i>Paratrissocladus excerptus</i> (Walker 1856)
<i>Phaenopsectra sp.</i>	<i>Psectrocladius calcaratus</i> (Edwards 1929)
<i>Polypedilum albicorne</i> (Meigen 1838)	<i>Rheocricotopus chalybeatus</i> (Edwards 1929)
<i>Polypedilum convictum</i> (Walker 1856)	<i>Rheocricotopus effusus</i> (Walker 1856)
<i>Polypedilum cultellatum</i> Goetghebuer 1931	<i>Rheocricotopus fuscipes</i> (Kieffer 1909)
<i>Polypedilum laetum</i> (Meigen 1818)	<i>Rheosmittia spinicornis</i> (Brundin 1956)
<i>Polypedilum nubeculosum</i> (Meigen 1804)	<i>Smittia sp.</i>
<i>Polypedilum pedestre</i> (Meigen 1830)	<i>Synorthocladus semivirens</i> (Kieffer 1909)
<i>Polypedilum scalaenum</i> (Schränk 1803)	<i>Thienemanniella clavicornis</i> (Kieffer 1911)
<i>Polypedilum uncinatum</i> Goetghebuer 1921	<i>Thienemanniella majuscula</i> (Edwards 1924)
<i>Pseudochironomus prasinatus</i> (Staeger 1839)	<i>Tvetenia bavarica</i> (Goetghebuer 1934)
<i>Rheotanytarsus spp.</i>	<i>Tvetenia calvescens</i> (Edwards 1929)
<i>Saetheria reissi</i> Jackson 1977	<i>Tvetenia discoloripes</i> (Goetghebuer & Thienemann 1936)
<i>Saetheria sp.</i>	Потфамилија Diamesinae
<i>Stempellinella brevis</i> (Edwards 1929)	<i>Diamesa sp.</i>
<i>Stictochironomus maculipennis</i> (Meigen 1818)	<i>Pothastia gaedii</i> (Meigen 1838)
<i>Stictochironomus pictulus</i> (Meigen 1830)	<i>Pothastia longimanus</i> Kieffer 1922
<i>Tanytarsus spp.</i>	Потфамилија Prodiamesinae
	<i>Odontomesa fulva</i> (Kieffer 1919)
	<i>Prodiamesa olivacea</i> (Meigen 1818)

Коригован списак врста студије Јанковић (1985) приказује присуство 54 таксона који су, по потфамилијама, распоређени следећим обрасцем: Orthoclaadiinae са 26, Chironominae са 20, Tanypodinae 6 и Prodiamesinae и Diamesinae са по једном врстом (Табела 5.).

Табела 5. Таксони хирономида присутни (X)/одсутни (-) у две одвојене студије спроведене на сливу Јужне Мораве током 1981. и 2010. године.

Таксон	1981	2010	Таксон	1981	2010
Потфамилија Tanypodinae			Потфамилија Orthoclaadiinae		
<i>Ablabesmyia longistyla</i> Fittkau 1962	X	X	<i>Brillia flavifrons</i> (Johannsen 1905)	-	X
<i>Ablabesmyia phatta</i> (Egger 1864)	-	X	<i>Brillia bifida</i> (Kieffer 1909)	-	X
<i>Anatopynia plumipes</i> (Fries 1823)	-	X	<i>Bryophaenocladus subvernalis</i> (Edwards 1929)	X	-
<i>Apsectrotanypus trifascipennis</i> (Zetterstedt 1838)	-	X	<i>Cardiocladus fuscus</i> Kieffer 1924	-	X
<i>Arctopelopia barbitarsis</i> (Zetterstedt 1850)	-	X	<i>Corynoneura celeripes</i> Winnertz 1852	X	-
<i>Conchapelopia melanops</i> (Meigen 1818)	X	X	<i>Corynoneura lobata</i> Edwards 1924	-	X
<i>Krenopelopia</i> sp.	-	X	<i>Corynoneura scutellata</i> Winnertz 1846	X	X
<i>Larsia curticalcar</i> (Kieffer 1918)	X	-	<i>Cricotopus triannulatus</i> agg. sensu Moller Pilot 1984	X	X
<i>Macropelopia adaucta</i> Kieffer 1916	-	X	<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen 1818)	X	X
<i>Macropelopia nebulosa</i> (Meigen 1804)	-	X	<i>Cricotopus</i> gr. <i>sylvestris</i> sensu Hirvenoja 1973	X	X
<i>Nilotanypus dubius</i> (Meigen 1804)	-	X	<i>Cricotopus tremulus</i> (Linnaeus 1758)	X	X
<i>Procladius</i> sp.	X	X	<i>Cricotopus trifascia</i> Edwards 1929	X	X
<i>Rheopelopia</i> sp.	-	X	<i>Epoicocladus ephemerae</i> (Kieffer 1924)	-	X

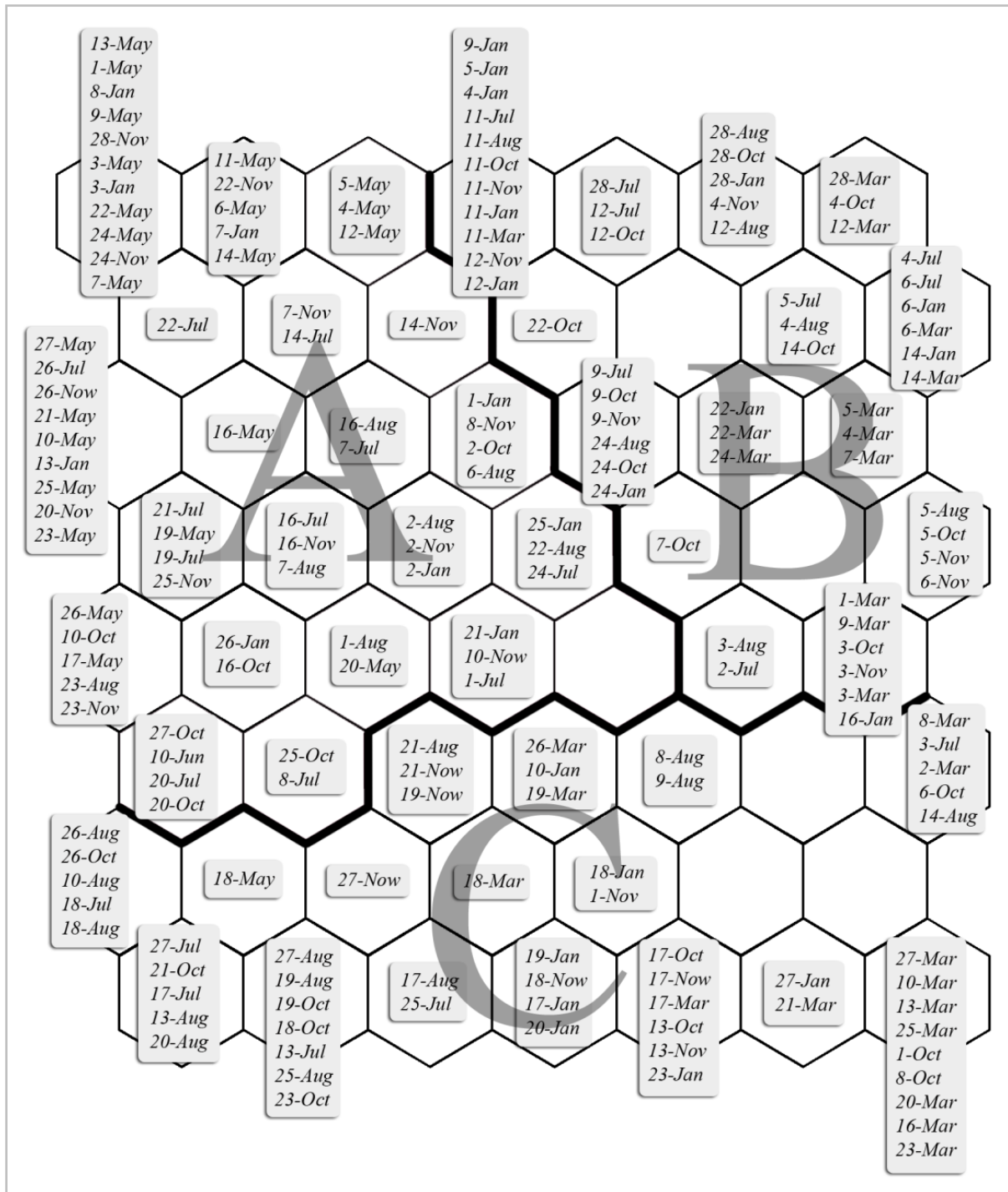
<i>Tanyrus punctipennis</i> Meigen 1818	X	X	<i>Eukiefferiella brevicar</i> (Kieffer 1911)	X	X
<i>Thienemannimyia</i> sp.	–	X	<i>Eukiefferiella claripennis</i> (Lundbeck 1898)	X	X
<i>Trissopelopia flavida</i> Kieffer 1923	X	–	<i>Eukiefferiella clypeata</i> (Kieffer 1923)	–	X
<i>Zavrelimyia</i> sp.	–	X	<i>Eukiefferiella gracei</i> (Edwards 1929)	X	X
Потфамилија Chironominae			<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Beckidia zabolotzkyi</i> (Goetghebuer 1938)	X	–	<i>Eukiefferiella lobifera</i> Goetghebuer 1934	X	–
<i>Chernovskii orbicus</i> (Townes 1945)	X	–	<i>Eukiefferiella minor</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Chironomus</i> sp.	X	X	<i>Eukiefferiella</i> sp.	X	–
<i>Cladotanytarsus</i> sp.	X	X	<i>Heleniella ornaticollis</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Cryptochironomus</i> sp.	X	X	<i>Hydrobaenus</i> sp.	X	–
<i>Demicryptochironomus vulneratus</i> (Zetterstedt 1838)	X	X	<i>Limnophyes</i> sp.	X	X
<i>Dicrotendipes nervosus</i> (Staeger 1839)	–	X	<i>Nanocladius bicolor</i> (Zetterstedt 1838)	–	X
<i>Dicrotendipes notatus</i> (Meigen 1818)	–	X	<i>Nanocladius rectinervis</i> (Kieffer 1911)	X	X
<i>Endochironomus albipennis</i> (Meigen 1830)	–	X	<i>Orthocladius (Euorthocladius)</i> sp.	X	X
<i>Endochironomus dispar</i> (Meigen, 1830)	–	X	<i>Orthocladius (Orthocladius)</i> sp.	X	X
<i>Glyptotendipes cauliginellus</i> (Kieffer 1913)	X	–	<i>Orthocladius lignicola</i> Kieffer 1914	–	X
<i>Harnischia fuscimanus</i> Kieffer 1921	X	–	<i>Orthocladius frigidus</i> (Zetterstedt 1838)	–	X
<i>Micropsectra bidentata</i> Goetghebuer 1921	–	X	<i>Paracladius conversus</i> (Walker 1856)	–	X

<i>Micropsectra</i> sp.	X	X	<i>Paracricotopus niger</i> (Kieffer 1913)	–	X
<i>Microtendipes pedellus</i> (De Geer 1776)	–	X	<i>Parakiefferiella gracillima</i> (Kieffer 1922)	X	–
<i>Parachironomus frequens</i> (Johannsen 1905)	–	X	<i>Parametriocnemus stylatus</i> (Spaerck 1923)	–	X
<i>Paracladopelma laminatum</i> (Kieffer 1921)	–	X	<i>Paratrichocladius rufiventris</i> (Meigen 1830)	–	X
<i>Paracladopelma nigritulum</i> (Goetghebuer 1942)	X	X	<i>Paratrissocladius excerptus</i> (Walker 1856)	–	X
<i>Paralauterborniella nigrohalteralis</i> (Malloch 1915)	–	X	<i>Psectrocladius calcaratus</i> (Edwards 1929)	X	X
<i>Paratanytarsus austriacus</i> (Kieffer 1924)	–	X	<i>Pseudosmittia danconai</i> (Marcuzzi 1947)	X	–
<i>Paratanytarsus dissimilis</i> (Johannsen 1905)	X	X	<i>Rheocricotopus chalybeatus</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen 1818)	X	X	<i>Rheocricotopus effusus</i> (Walker 1856)	X	X
<i>Phaenopsectra</i> sp.	X	X	<i>Rheocricotopus fuscipes</i> (Kieffer 1909)	–	X
<i>Polypedilum albicorne</i> (Meigen 1838)	–	X	<i>Rheosmittia spinicornis</i> (Brundin 1956)	–	X
<i>Polypedilum convictum</i> (Walker 1856)	X	X	<i>Smittia</i> sp.	X	–
<i>Polypedilum cultellatum</i> Goetghebuer 1931	–	X	<i>Synorthocladius semivirens</i> (Kieffer 1909)	X	X
<i>Polypedilum laetum</i> (Meigen 1818)	X	X	<i>Thienemanniella clavicornis</i> (Kieffer 1911)	–	X
<i>Polypedilum pedestre</i> (Meigen 1830)	X	X	<i>Thienemanniella majuscula</i> (Edwards 1924)	X	X
<i>Polypedilum scalaenum</i> (Schrank 1803)	X	X	<i>Tvetenia bavarica</i> (Goetghebuer 1934)	–	X
<i>Polypedilum uncinatum</i> Goetghebuer 1921	–	X	<i>Tvetenia calvescens</i> (Edwards 1929)	–	X

<i>Pseudochironomus prasinatus</i> (Staeger 1839)	X	–	<i>Tvetenia discoloripes</i> (Goetghebuer & Thienemann 1936)	–	X
<i>Rheotanytarsus</i> sp.	X	X	Потфамилија Diamesinae		
<i>Saetheria reissi</i> Jackson 1977	–	X	<i>Diamesa</i> sp.	X	X
<i>Saetheria</i> sp.	X	X	<i>Potthastia gaedii</i> (Meigen 1838)	–	X
<i>Stempellinella brevis</i> (Edwards 1929)	–	X	<i>Potthastia longimanus</i> Kieffer 1922	–	X
<i>Stictochironomus maculipennis</i> (Meigen 1818)	–	X	Потфамилија Prodiamesinae		
<i>Stictochironomus pictulus</i> (Meigen 1830)	–	X	<i>Odontomesa fulva</i> (Kieffer 1919)	–	X
<i>Tanytarsus</i> sp.	X	X	<i>Prodiamesa olivacea</i> (Meigen 1818)	X	X

4.2 Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae

СОМ анализа је, на основу података заједнице хирономида, формирала 3 групе локалитета (А, Б, Ц; Слика 7.). Ниво класификације одређен је на основу броја локалитета по кластеру, довољним за даље статистичке анализе. IndVal анализа је верификовала резултате класификационе методе, имајући за циљ да одреди индикаторске таксоне сваке групе (А и Б). На основу анализе издвојени су таксони са значајним индикаторским вредностима за две групе (Табела 6.).



Слика 7. Визуализација просторне и временске дистрибуције заједнице Chironomidae у сливу Јужне Мораве помоћу СОМ мреже. За кластеровање неурона на мрежи је коришћена к-меап метода. Велика слова (А, В и С) означавају различите групе. Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете, узорковане у различитим месецима. Број у коду означава одређени локалитет, док три слова означавају месец узорковања (сезону).

Табела 6. Репрезентативни и значајни таксони хириномида за групе (Гр) формиране СОМ анализом. Подвучено - таксони који су репрезентативни таксони групе и имају IndVal вредности (InV) веће од 25%. Остали наведени таксони су значајни за групу.

Таксон	Гр	InV	Таксон	Гр	InV
<u><i>Parametriocnemus stylatus</i></u>	B	56.1***	<u><i>Cricotopus triannulatus agg.</i></u>	C	82.3***
<u><i>Tvetenia bavarica</i></u>	B	53.8***	<u><i>Rheocricotopus chalybeatus</i></u>	C	71.7***
<u><i>Epoicocladus ephemerae</i></u>	B	52.3***	<u><i>Paratrichocladus rufiventris</i></u>	C	70.6***
<u><i>Rheocricotopus fuscipes</i></u>	B	46***	<u><i>Cricotopus bicinctus</i></u>	C	58.2***
<u><i>Prodiamesa olivacea</i></u>	B	34.9***	<u><i>Polypedilum scalaenum</i></u>	C	57.6***
<u><i>Orthocladus (E.) sp.</i></u>	B	31.2*	<u><i>Tvetenia calvescens</i></u>	C	50.4***
<u><i>Thienemannimyia sp.</i></u>	B	29.9***	<u><i>Cryptochironomus sp.</i></u>	C	48.5***
<u><i>Paratrissocladius excerptus</i></u>	B	25.2***	<u><i>Orthocladus (O.) spp.</i></u>	C	43.5***
<i>Polypedilum laetum</i>	B	21.2*	<u><i>Synorthocladus semivirens</i></u>	C	42.4***
<i>Brillia bifida</i>	B	20.9**	<u><i>Thienemanniella majuscule</i></u>	C	41.4***
<i>Corynoneura lobata</i>	B	20.6***	<u><i>Microtendipes pedellus agg.</i></u>	C	41.1*
<i>Heleniella ornatcollis</i>	B	19***	<u><i>Rheopelopia sp.</i></u>	C	38.3**
<i>Macropelopia nebulosa</i>	B	16.2**	<u><i>Eukiefferiella lobifera</i></u>	C	37.5***
<i>Eukiefferiella brevicar</i>	B	15.9***	<u><i>Chonchapelopia melanops</i></u>	C	36.6***
<i>Odontomesa fulva</i>	B	15.1**	<u><i>Rheotanytarsus spp.</i></u>	C	36.6**
<i>Tvetenia discoloripes</i>	B	15.1*	<u><i>Chironomus spp.</i></u>	C	35.4*
<i>Potthastia gaedii</i>	B	15*	<u><i>Cladotanytarsus spp.</i></u>	C	28.3***
<i>Orthocladus rivulorum</i>	B	12.1*	<u><i>Eukiefferiella ilklejensis</i></u>	C	27.7**
<i>Orthocladus lignicola</i>	B	10.2**	<u><i>Cricotopus trifascia</i></u>	C	26.4***
<i>Rheocricotopus effuses</i>	B	10.1**	<u><i>Potthastia longimanus</i></u>	C	25*
<i>Rheosmittia spinicornis</i>	B	6.5*	<i>Paratanytarsus dissimilis</i>	C	22.9***
			<i>Cardiocladus fuscus</i>	C	21.3***
			<i>Phaenopsectra sp.</i>	C	21***
			<i>Eukiefferiella gracei</i>	C	20.2**
			<i>Dicrotendipes nervosus</i>	C	19.8**
			<i>Harnischia sp.</i>	C	19***
			<i>Polypedilum pedestre</i>	C	15**
			<i>Brillia flavifrons</i>	C	14.4***
			<i>Saetheria reissi</i>	C	11.6*
			<i>Polypedilum nubeculosum</i>	C	6.9*
			<i>Polypedilum cultellatum</i>	C	5.2*

*<0.05, **<0.01, ***<0.001 - ниво значајности

Највеће одступање у структури заједнице појавило се између групе Б и Ц, које су се разликовале како према *a priori* класификацији, тако и према просторном распореду локалитета. (Слика 7.; Табела 7.). Према *a priori* класификацији, 73% (42 од 57) локалитета групе Б је припадало типу 4, док је остатак (27%) припадао типу 3. IndVal метода је за ову групу представила 8 репрезентативних таксона и 13 таксона чија је индикаторска вредност била мања од 25%, али са одређеном статистичком значајношћу (Табела 6.).

Табела 7. *A priori* класификација локалитета на сливу Јужне Мораве.

Река	Локалитет	<i>A priori</i> класификација
Нишава	1	3
Јерма	2	3
Јерма	3	4
Височица	4	4
Темшица	5	4
Височица	6	4
Темшица	7	3
Нишава	8	3
Нишава	9	3
Јужна Морава	10	2
Власина	11	4
Власина	12	4
Власина	13	3
Ветерница	14	3
Ветерница	15	3
Пуста река	16	3
Пуста река	17	3
Топлица	18	3
Јужна Морава	19	2
Топлица	20	3
Јужна Морава	21	2
Соковањска	22	3
Моравица		
Соковањска	23	3
Моравица		
Соковањска	24	3
Моравица		
Соковањска	25	3
Моравица		
Соковањска	26	2
Моравица		
Нишава	27	2
Луковска река	28	4

Супротно групи Б, у групи Ц су се углавном (60,8%) налазили локалитети типа 3, *a priori* класификације (35 од 58 локалитета). Остатак локалитета био је распоређен у

остала два типа према следећем обрасцу: 34% је припадало типу 2 и 5,2% типу 4. IndVal анализа издвојила је 20 значајних таксона, као репрезентативне чланове заједнице, описујући групу Ц (Табела 6.). Поред тих таксона је издвојено и 11 значајних таксона, али са нижом релативном фреквенцом.

На крају, у групу А сврстани су локалитети који углавном припадају типу 3 (65,7%; 46 од 70 локалитета), према *a priori* класификацији, док остали локалитети припадају типу 2 (21,5%) и типу 4 (12,8%). IndVal анализа није издвојила ни један значајан таксон за ову групу.

Поред вертикалног градијента локалитета условљеним различитим географским распоредом дуж лонгитудиналног градијента речног слива, на СОМ мрежи је очигледан и временски образац. Локалитети, како они који су узорковани током зимских месеци, тако и они где је забележена ниска температура током свих сезона, распоређени су на крајњем десном делу СОМ мреже (96%; 48 локалитета од укупно 50). Сви локалитети узорковани током пролећа груписани су на левој страни мреже. Доњи леви део, (где су констатоване највише вредности температуре; Слика 8.), као и средњи део СОМ мреже, окарактерисани су присуством локалитета који су узорковани током лета и јесени (Слика 7.).

Kruskal-Wallis-ов тест је приказао утицај сезонске варијабилности на квалитативно-квантитативну структуру заједнице хирономида дуж свих локалитета. Двадесет таксона показало је значајну разлику између временских јединица (месеци). Међутим, временска варијабилност је у највећем степену утицала на 10 таксона, са вредностима η^2 већим од 0,14 (Табела 8.).

Табела 8. Kruskal-Wallis-ов тест представља таксоне хирономида чија се релативна бројност значајно ($p < 0,05$) разликује између месеци, са вредностима: ета квадрата (η^2), χ^2 , степена слободе (df) и месецима са највећим средњим рангом (Md*).

Потфамилија	Таксон	η^2	χ^2	df	p	Md*
Chironominae	<i>Cladotanytarsus</i> spp.	0.11	21.081	6	.027	July-111,24
Chironominae	<i>Polypedilum convictum</i>	0.25	46.166	6	.000	March-110.31
Chironominae	<i>Polypedilum scalaenum</i>	0.07	14.096	6	.029	August-116.59
Chironominae	<i>Saetheria reissi</i>	0.19	36.786	6	.000	August-109.35
Chironominae	<i>Tanytarsus</i> spp.	0.09	16.839	6	.010	August-115.35
Diamesinae	<i>Diamesa</i> sp.	0.19	36.337	6	.000	March-113.02
Orthoclaadiinae	<i>Cricotopus tremulus</i>	0.10	19.465	6	.003	July-104.69
Orthoclaadiinae	<i>Cricotopus triannulatus</i> agg.	0.26	48.653	6	.000	October-120.94
Orthoclaadiinae	<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i>	0.26	48.693	6	.000	March-136.76
Orthoclaadiinae	<i>Eukiefferiella lobifera</i>	0.08	15.102	6	.019	March-112.20
Orthoclaadiinae	<i>Nanocladius rectinervis</i>	0.08	15.637	6	.016	Oct-104,76
Orthoclaadiinae	<i>Nilotanytus dubius</i>	0.08	15.405	6	.017	Aug-112,13
Orthoclaadiinae	<i>Orthocladus rivulorum</i>	0.18	33.400	6	.000	March-116.22
Orthoclaadiinae	<i>Orthocladus (E.)</i> sp.	0.41	75.725	6	.000	March -159.81
Orthoclaadiinae	<i>Orthocladus (O.)</i> spp.	0.38	70.804	6	.000	March -161.19
Orthoclaadiinae	<i>Parametrioctenus stylatus</i>	0.17	32.540	6	.000	March -128.19
Orthoclaadiinae	<i>Rheocricotopus fuscipes</i>	0.08	16.452	6	.012	Oct-111.13
Orthoclaadiinae	<i>Synorthocladus semivirens</i>	0.21	38.979	6	.000	March -128.26
Orthoclaadiinae	<i>Orthocladus lignicola</i>	0.11	20.167	6	.003	March -106.67
Tanypodinae	<i>Conchapelopia melanops</i>	0.07	14.283	6	.027	Aug-116.31

4.3 Утицај срединских фактора на композицију заједнице хирономида

Једнофакторска ANOVA је приказала да се 10 срединских параметара (надморска висина, ширина речног корита, температура воде, електрична проводљивост, турбидитет, брзина, тврдоћа, NO₃-N, PO₄-P и БПК5) значајно разликује

између група формираних „к-mean“ методом у СОМ анализи. Даљом анализом помоћу Tukey HSD теста, приказане су значајне разлике између сваке групе понаособ (Табела 8.). СОМ метода је такође визуализовала дистрибуцију вредности срединских параметара и абунданце индикаторских таксона (са IndVal вредностима већим од 25%) (Слика 8.; Слика 9.). Вредности срединских параметара су се на СОМ мрежи углавном мењале у правцу од доњег левог ка горњем десном углу. Надморска висина је била највећа на горњем десном углу мреже, одакле је опадала према доњем левом углу мреже, дуж успостављеног градијента. С друге стране, температура, ширина, кондуктивитет, тврдоћа, NO₃-N и PO₄-P су се мењали дуж истог правца, само супротним смером, формирајући јасан градијент на мрежи. Остали мерени параметри нису показали уочљив градијент на СОМ мрежи (Слика 8.).

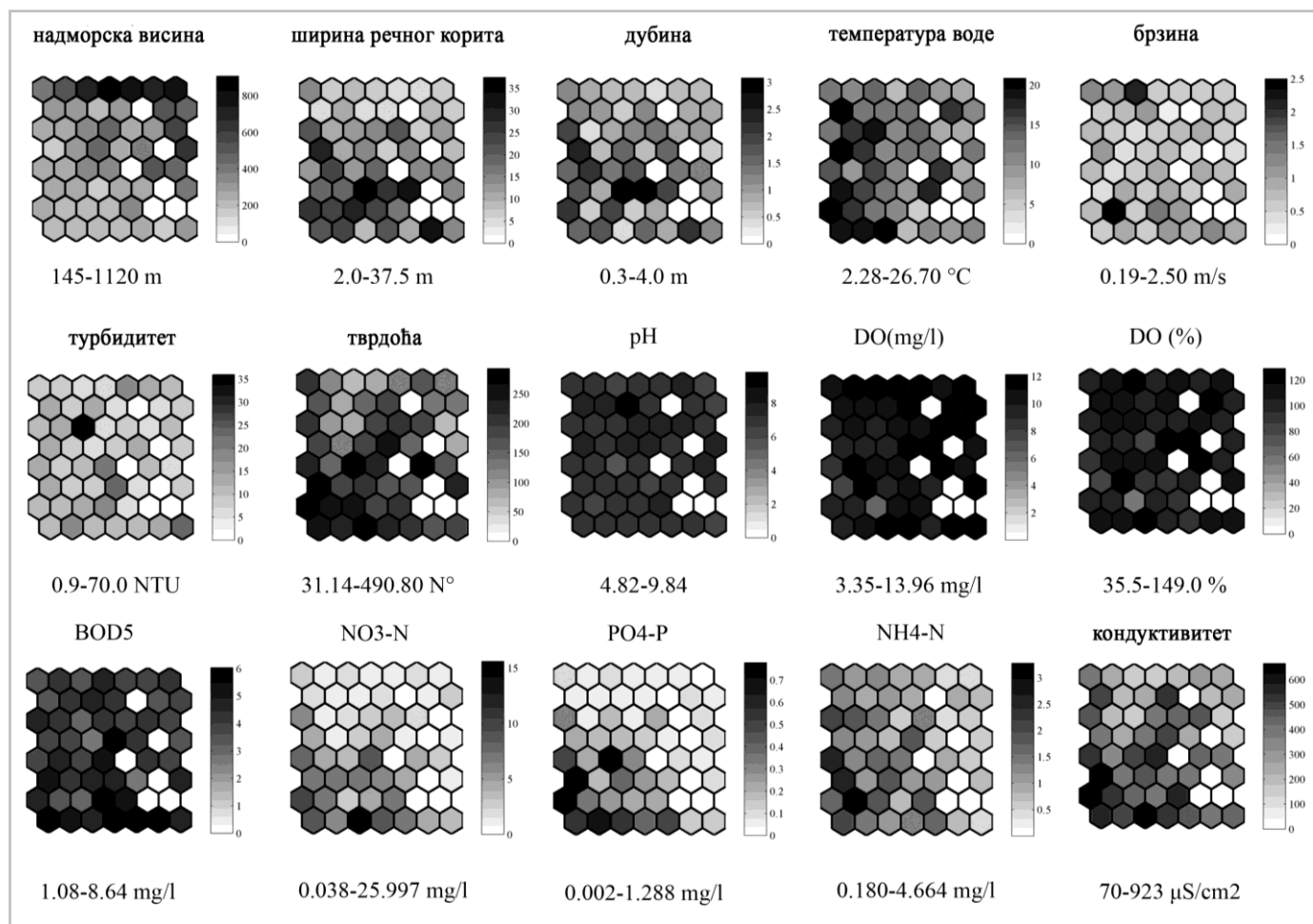
Праћењем главног градијента срединских параметара, издвојиле су се две групе таксона. На једној страни, сви индикаторски таксони групе Б (Табела 6.), осим *Orthocladus (E.)* sp., имали су највећу бројност у горњем десном углу мреже, опадајући према левом доњем крају (Слика 9.). Присуство ових таксона карактеристично је за групу локалитета који су позиционирани на већим надморским висинама и са ниским вредностима температуре и ширине корита. Ови локалитети су, такође, незагађени (ниске вредност БПК₅ и PO₄-P), са ниским садржајем соли (ниске вредности кондуктивитета, NO₃-N и тврдоће) (Слика 8.; Табела 9.). Са друге стране, супротно претходном дистрибуционом обрасцу, 21 таксон је био најбројнији у доњем левом делу мреже. Ови таксони, осим *Orthocladus (E.)* sp., су индикатори групе Ц (Табела 6.), који чине комплекс локалитета позиционираних на нижим надморским висинама, са високим вредностима температуре и ширине корита. Ови локалитети су, такође, имали повећане вредности концентрације соли (високе вредности тврдоће, кондуктивитета и NO₃-N), са повећаним степеном загађења (високе вредности БПК₅ и PO₄-P). Локалитети који припадају групи А представљају средњу групу на основу свих измерених срединских параметара (Слика 8.; Табела 9.), али без посебно издвојених репрезентативних таксона.

Табела 9. Средње вредности ± 1 стандардна девијација параметара по групама.

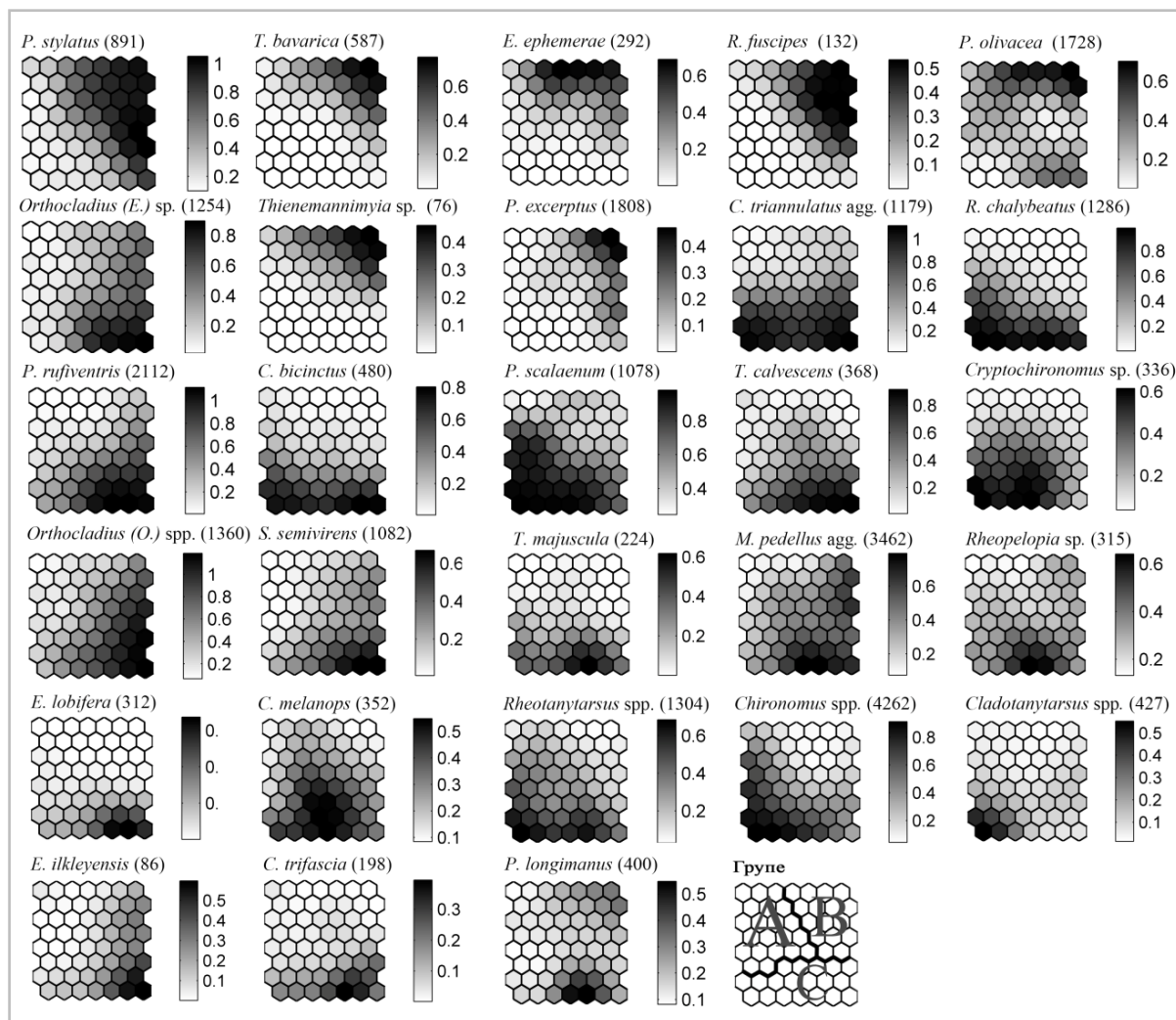
Средински параметри	Група		
	А	В	С
Надморска висина (m)	405.43 \pm 220.993	512.63 \pm 287.226	256.88 \pm 109.618
Ширина речног корита (m)	14.56 \pm 10.511 ^a	12.60 \pm 10.286 ^a	19.84 \pm 11,368 ^b
Температура воде (°C)	12.990 \pm 6.058 ^a	10.229 \pm 4.665 ^b	13.641 \pm 5.864 ^a
Кондуктивитет ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	362.12 \pm 160.498 ^a	332.58 \pm 165.487 ^a	471.14 \pm 151.385 ^b
Турбидитет (NTU)	11.1139 \pm 8.574 ^{a,b}	8.0458 \pm 5.42 ^a	13.6562 \pm 12.40 ^b
Брзина (m/s)	0.679 \pm 0.298 ^b	0.899 \pm 0.609 ^a	0.859 \pm 0.392 ^a
Тврдоћа (N°)	169.428 \pm 67.983 ^a	161.536 \pm 90.491 ^a	206,230 \pm 68.168 ^b
NO ₃ -N (mg/l)	3.83707 \pm 3.924 ^a	2.30451 \pm 1.754 ^a	6.18217 \pm 5.511 ^b
PO ₄ -P (mg/l)	0.24849 \pm 0.342 ^a	0.12464 \pm 0.149 ^a	0.46173 \pm 0.452 ^b
БПК5 (mgO ₂ /l)	4.342 \pm 1.260 ^{a,b}	3.966 \pm 1.381 ^a	4.869 \pm 1.482 ^b

Вредности које у истом реду не деле исти суперскрипт су статистички различите: ^{a,b} $p < 0.05$.

Ако суперскрипт недостаје, све вредности су међусобно статистички значајно различите.



Слика 8. Визуализација дистрибуције 15 срединских параметара на претходно тренираној COM мрежи (где је: DO(mg/l)–концентрација кисеоника; DO(%)-сатурација; NO₃-N, концентрација нитрата; PO₄-P–концентрација ортофосфата, NH₄-N–концентрација амонијака). Скала за сваку мапу представља мерене вредности параметара. Црна засенченост је за сваки параметер високо корелисан са максималном вредношћу забележеном током студије. Светлије нијансе индикују опадање вредности представљених параметара



Слика 9. Визуализација дистрибуције 28 индикаторских таксона (са IndVal већим од 25%) на СОМ мапи. Скала за сваку мапу представља абундантност индикаторских таксона (у загради, максимални број индивидуа по m^2). Црна засенченост је за сваки таксон високо корелисана са максималном абунданцом забележеном током студије. Светлије нијансе индикују опадање густине представљених таксона.

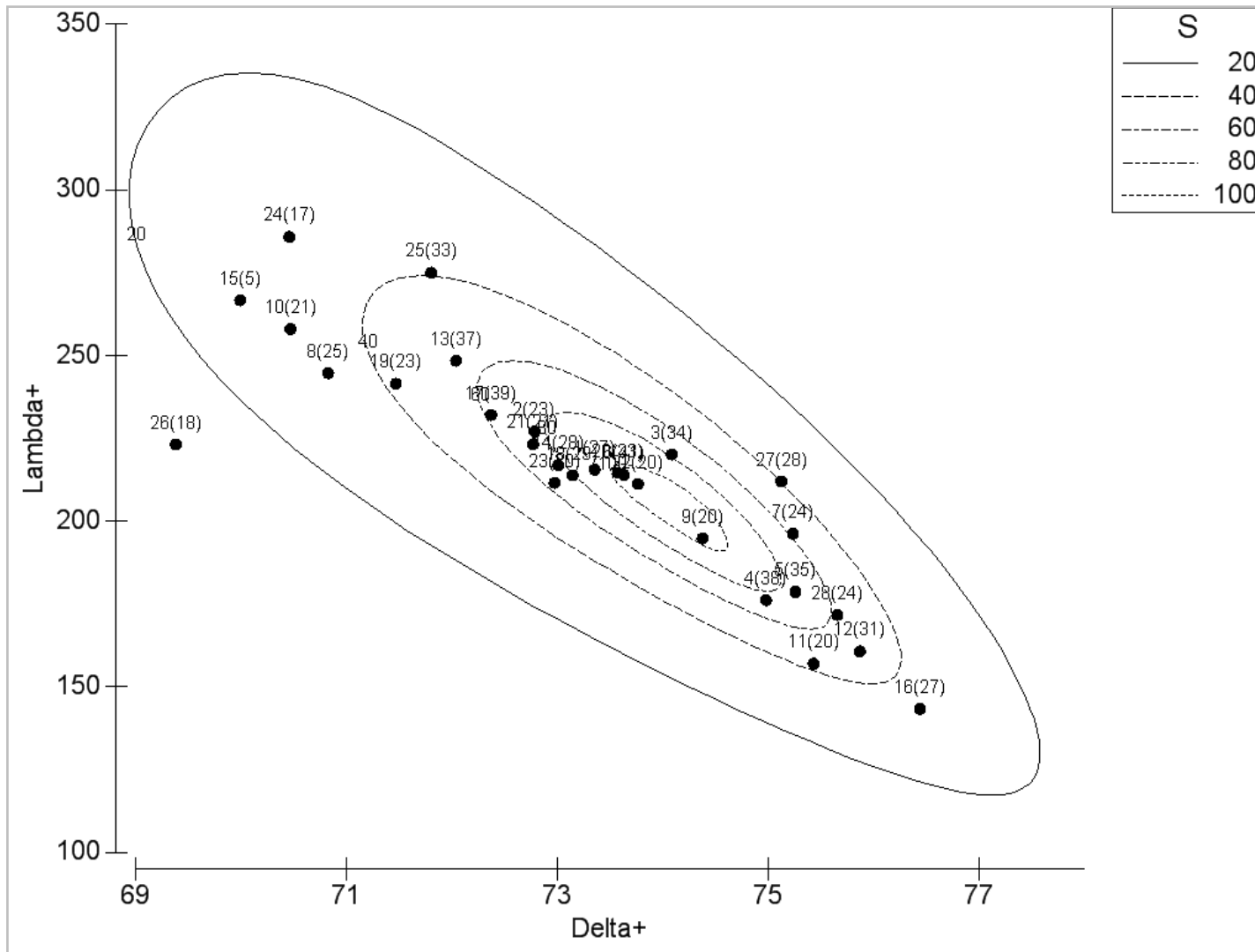
4.4 Потенцијалне метричке особине заједнице хирономида у процени еколошког статуса лотичких система

Delta+ и lambda+ показују јаку негативну корелисаност са коефицијентом од $r = -0,87$ ($p < 0,01$). Овакав резултат потврђен је на 2-д графикону, који приказује симулиране вредности параметра delta+ и lambda+ (Слика 10.). Delta+ је такође био корелисан са богатством врста (S; $p < 0,05$), док то није био случај са осталим индексима диверзитета (Табела 10.).

Табела 10. Корелација delta+ са осталим индексима диверзитета

Индекси диверзитета	Delta+
S	0.375*
H'	0.316
1-D	0.236
J'	0.225
Lambda+	-0.873**

БС без значајности, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



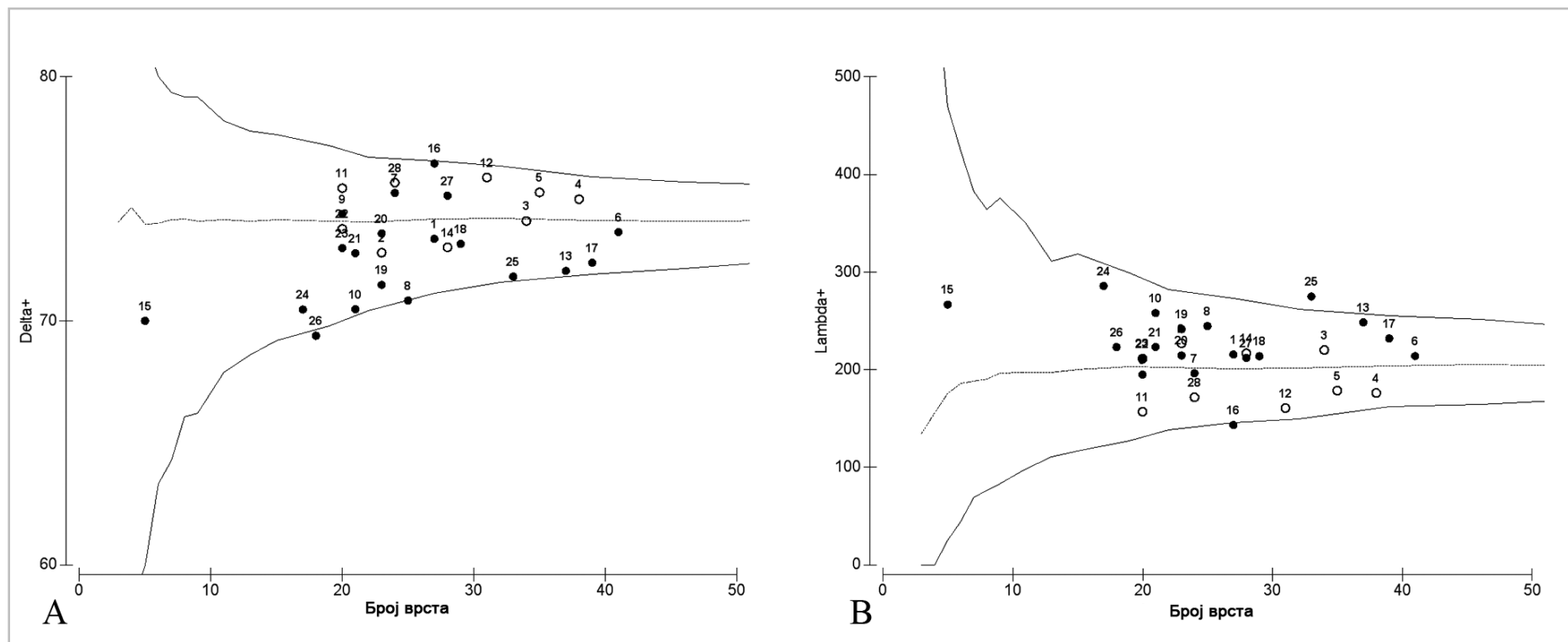
Слика 10. Однос Δ^+ и Λ^+ дистрибуције са контурама 95% интервала поверења. Вредности су израчунате из опсега вредности броја врста (S), са 100.000 симулација.

Левкасти графикон са 95% интервалом поверења је, за податке из 2010. године, приказао све референтне локалитете у оквиру интервала поверења, без видљиве тенденције да буду распоређени на некој од страна очекиване вредности. Два локалитета, који су под утицајем стреса, испали су ван граница 95% интервала поверења (Слика 11. А, Б).

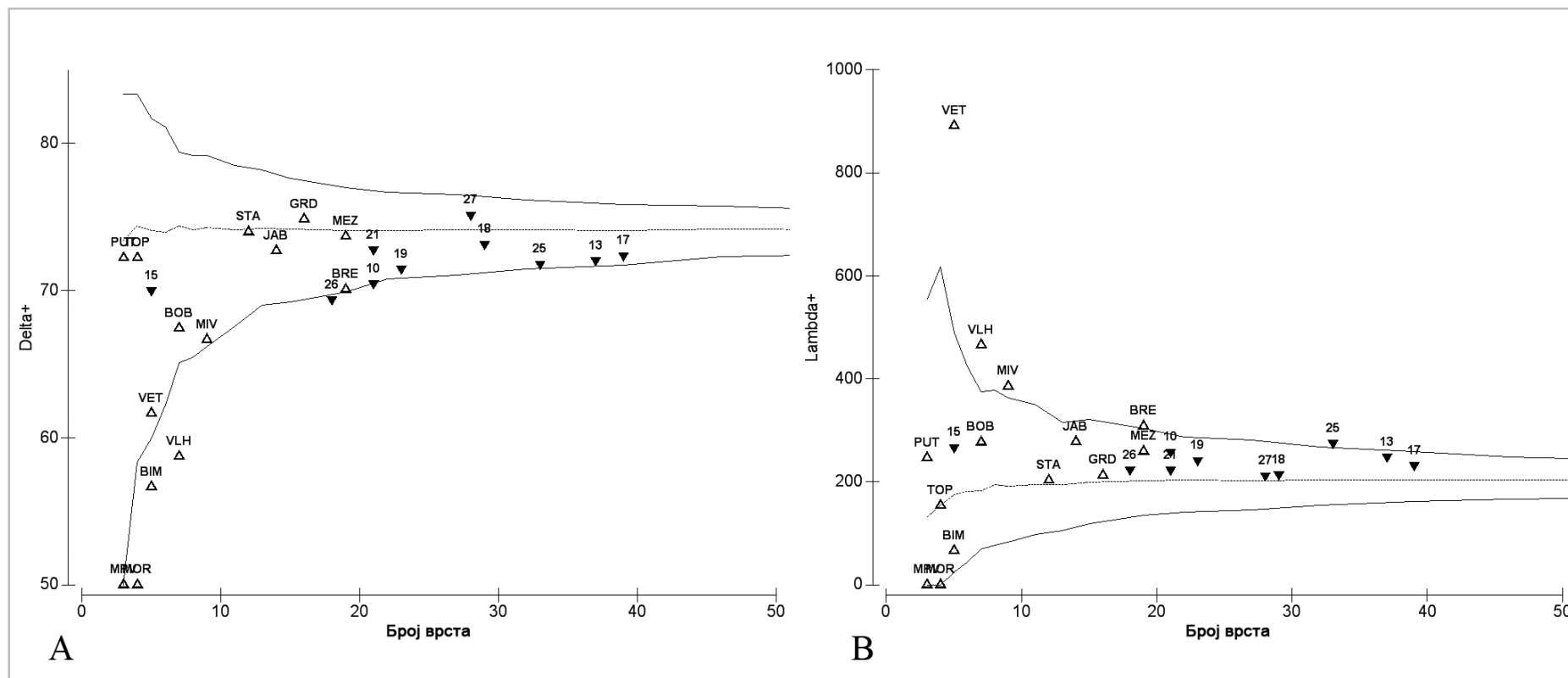
Средња вредност delta^+ израчуната за референтне и нарушене локалитете није се статистички значајно разликовала ($t=1,690$; $p=0,103$). То није био случај са поређењем средњих вредности delta^+ у 2010. и 1981., када је delta^+ индекс био значајно виши у 2010. години ($t=12,322$; $p<0,001$). Поређење локалитета на основу delta^+ и lambda^+ вредности из 2010. и 1981. је представљено на левкастом графикону са 95% интервалом поверења (Слика 12. А; Б). На основу података из 1981., четири локалитета су позиционирана ван граница интервала поверења 95% (Слика 12. А; Б).

Као резултат анализе главних компоненти (РСА), примењене на подацима о срединским параметрима и биолошким подацима (delta^+ заједнице хирономида), издвојиле су се прва и друга оса, које објашњавају 44% и 20% варијабилности, респективно (Слика 13.). Прва оса је, у највећој мери, дефинисана параметрима: delta^+ , DO, DO% и PO₄-P (Слика 13.). Друга оса је, у великом степену, повезана са минералним саставом воде, представљеним параметрима, као што су кондуктивитет, тврдоћа и концентрација нитрата (NO₃-N). Турбидитет и pH нису показали статистички значајну корелацију са осталим параметрима.

Ward-ов алгоритам је поделио локалитете у 4 групе (Слика 13., Табела 11.). Локалитети који су припадали групи 1 су показивали високе вредности delta^+ . За ову групу је такође карактеристична висока концентрација кисеоника (DOmg/l и DO%), као и одсуство органског загађења (ниске вредности БПК5, PO₄-P и NH₄-N) и ниске концентрације соли (ниске вредности ЕС, Н, NO₃-N). Група 2 је, са друге стране, обухватила локалитете са високим концентрацијама соли (високе вредности ЕС, Н, NO₃-N) и средњим степеном органског загађења (БПК5, PO₄-P и NH₄-N), као и са високим delta^+ . Групу 3 чинио је само један локалитет, 15, који се одликује ниским минералним саставом, али са високим степеном органског загађења, (веома високе вредности БПК5, PO₄-P и NH₄-N) и са ниским вредностима кисеоника (DOmg/l и DO%) и delta^+ . Остали локалитети припадају групи 4, и они су у анализи позиционирани близу центра РСА координантног система.



Слика 11. Графички приказ таксономске различитости (А) и варијансе таксономске различитости (Б) добијених података о фауни хирономида на сливу Јужне Мораве, Србија у 2010. години и броја врста. Референтни и нарушени локалитети су означени празним (○) и пуним круговима (●), респективно. Графикон приказује теоријску средњу вредност и 95% интервал поверења. Поузданост анализе расте дуж вертикалне осе са порастом броја врста.



Слика 12. Графички приказ таксономске различитости (А) и варијансе таксономске различитости (Б) добијених података о фауни хирономида на сливу Јужне Мораве, Србија за 10 селектованих локалитета у 2010. години (пуни троуглови (▲)) и за 14 локалитета из студије из 1981. (празни троуглови (△)) (према Јанковић, 1985) и броја врста. Графикон приказује теоријску средњу вредност и 95% интервал поверења. Поузданост анализе расте дуж вертикалне осе са порастом броја врста.

Delta+ је позитивно корелисана са DO ($r=0,439$, $p<0,05$) и DO% ($r=0,433$, $p<0,05$), док је са осталим параметрима, осим рН и турбидитета, показала различит ниво негативне корелације. Од њих треба издвојити кондуктивитет и PO₄-P са највећим степеном негативне корелације од $r=-0,534$ ($p<0,01$) и $r=-0,556$ ($p<0,01$), респективно.

Када је заједница хирономида била представљена традиционалним индексима диверзитета, анализа главних компоненти је приказала сличан резултат где су се такође издвојиле прва и друга оса које објашњавају 44,61% и 18,71% варијабилности, респективно (Слика 14.). Прва оса је и у овом случају дефинисала градијент квалитета воде, док је друга приказивала њен минерални састав. Индекси диверзитета су са порастом квалитета воде (пораст вредности DOmg/l и DO% и пад вредности БПК₅, NO₃-N, PO₄-P и NH₄-N) показивали позитиван раст. Као у случају са индексом таксономске различитости (delta+), индекси диверзитета су били високо позитивно корелисани са DOmg/l и DO%. Супротно томе, укупна абундантност јединки хирономида повећавала се са погоршањем квалитета воде, односно порастом концентрација амонијака (NH₄-N) и ортофосфата (PO₄-P) (Слика 14., Табела 12.).

Табела 11. Средња вредност ± 1 стандардна девијација delta+ и срединских параметара по групама.

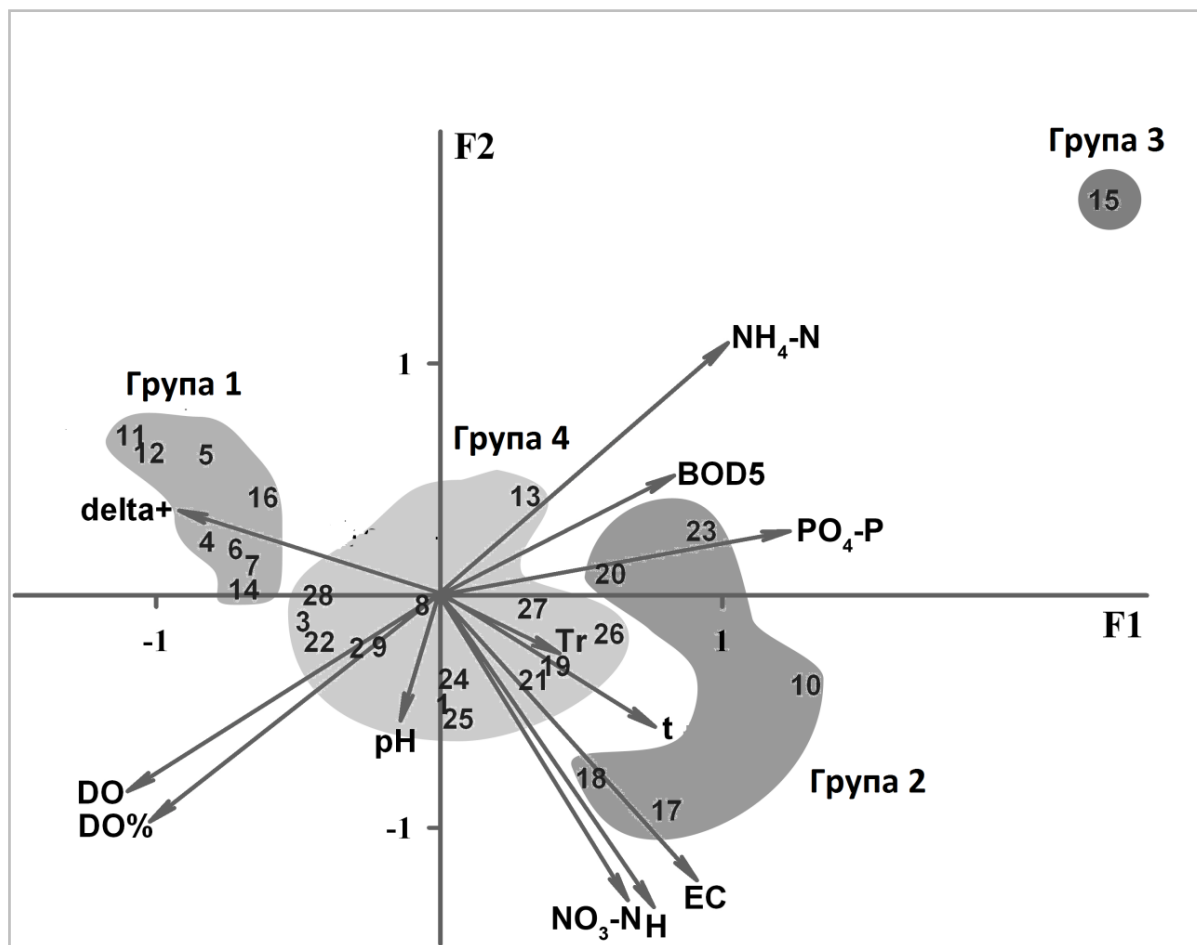
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4
Delta+	75.0 \pm 0.4	72.5 \pm 0.5 ^b	70	72.7 \pm 0.5 ^b
Температура воде (°C)	11.6 \pm 0.7 ^a	13.9 \pm 0.8 ^{a,b}	14.9	13.5 \pm 0.5 ^b
Кондуктивитет ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	183 \pm 22	623 \pm 33	380	434 \pm 17
Турбидитет (NTU)	9.0 \pm 0.9 ^a	12.2 \pm 3.4 ^a	10.6	10.6 \pm 1.3 ^a
pH	6.97 \pm 0.07 ^a	6.92 \pm 0.12 ^a	6.86	7.07 \pm 0.05 ^a
DO (mg/l)	11.0 \pm 0.2	9.0 \pm 0.6	4.5	10.3 \pm 0.2
DO (%)	108 \pm 1 ^a	91 \pm 8 ^{a,b}	42	103 \pm 1 ^b
БПК5 (mgO₂/l)	3.9 \pm 0.2 ^a	4.7 \pm 0.3 ^b	6.4	4.4 \pm 0.2 ^{a,b}
NO₃-N (mg/l)	1.7 \pm 0.3	9.1 \pm 2.7 ^b	2.4	4.4 \pm 0.5 ^b
PO₄-P (mg/l)	0.08 \pm 0.01	0.63 \pm 0.05	1.41	0.25 \pm 0.04
NH₄-N (mg/l)	0.92 \pm 0.05	2.48 \pm 0.48	10.72	1.37 \pm 0.11
Тврдоћа (N°)	98 \pm 13	267 \pm 9	147	206 \pm 6

Вредности које у истом реду не деле исти суперскрипт су статистички различите: ^{a,b}
 $p < 0.05$

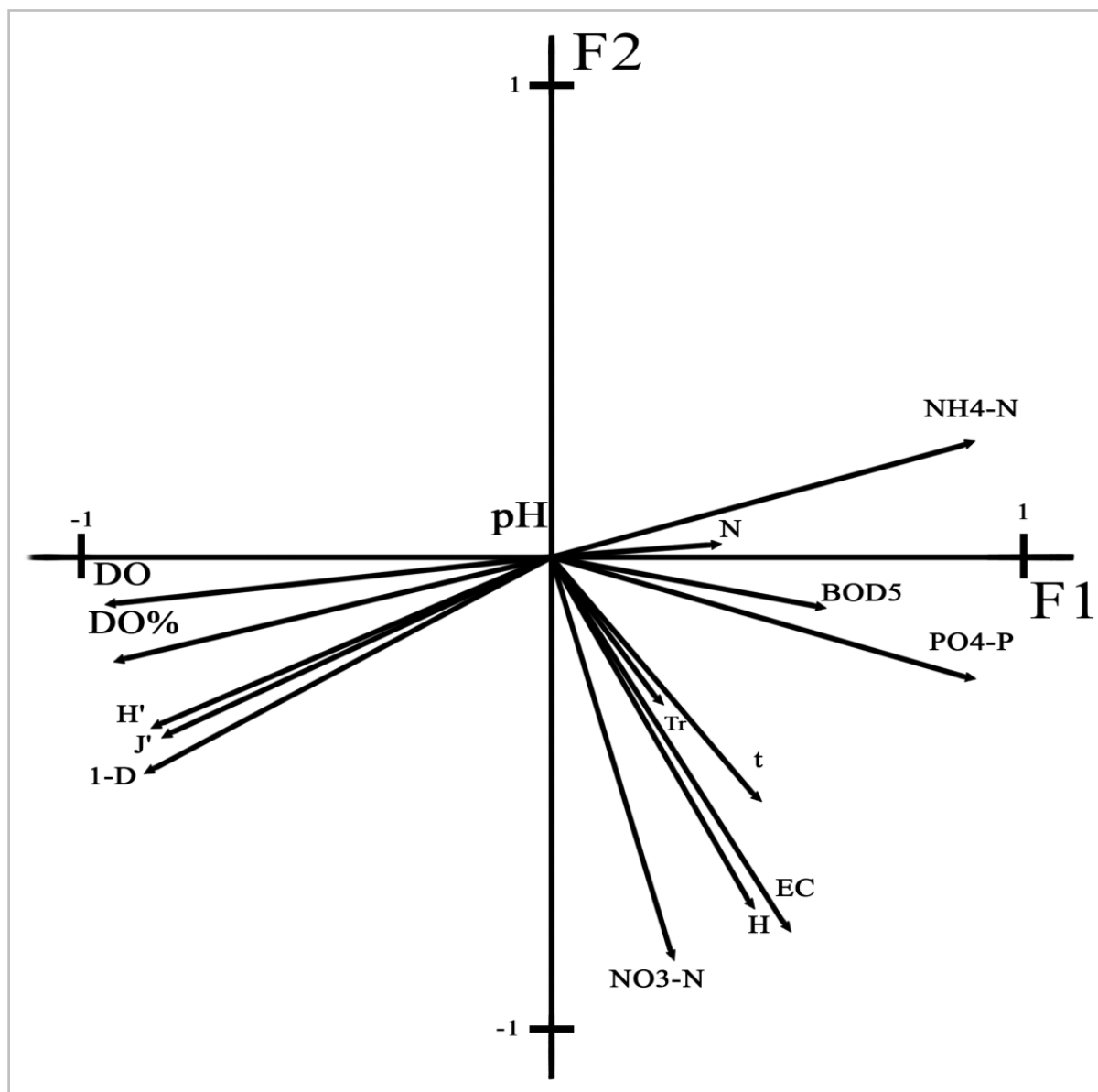
Табела 12. Корелација индекса диверзитета са срединским параметрима

Индекси диверзитета	DOmg/l	DO%	PO4-P	NH4-N
H'	0.690**	0.714**	-0.543**	-0.699**
1-D	0.732**	0.763**	-0.568**	-0.777**
J'	0.668*	0.681	-0.518**	-0.655**

БС без значајности, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



Слика 13. Резултати анализе главних компоненти (PCA) показују везу између локалитета (арапски бројеви), срединских параметара и $\delta+$ индекса као меру структуре заједнице Chironomidae (вектори). Средински параметри су: концентрација нитрата – $\text{NO}_3\text{-N}$, ортофосфата – $\text{PO}_4\text{-P}$; амонијака – $\text{NH}_4\text{-N}$, кисеоника – DO, сатурације - $\text{DO}\%$, тврдоћа – H, кондуктивитет - EC и pH, биолошка потрошња кисеоника – BOD₅, температуре воде – t и турбидитет - Tr. Кластери, који су резултат Ward-овог алгоритма, представљени су пољима обојеним различитом нијансом сиве боје.



Слика 14. Анализа главних компоненти (PCA) срединских параметара и индекса диверзитета (Shannon-Wiener-ов индекс диверзитета (H'), Pielou-ов индекс уједначености (J'), Simpson-ов индекс ($1-D$) и укупна бројност хириномида у узорку (N)). Средински параметри су: концентрација нитрата – NO_3-N , ортофосфата – PO_4-P ; амонијака – NH_4-N , кисеоника – DO , сатурације - $DO\%$, тврдоћа – H , кондуктивитет - EC и pH , биолошка потрошња кисеоника – BOD_5 , температуре воде – t и турбидитет - Tr .

4.5 Таксономска резолуција

4.5.1 Утицај таксономске резолуције на структуру групе хирономида

Вредности богатства таксона (S), израчунате за три различита таксономска нивоа (врста, род и потфамилија) биле су значајно корелисане (Табела 13.). Коефицијент корелације опадао је са порастом нивоа таксономске прецизности. У случају осталих индекса диверзитета, забележена корелација је била висока између матрица на таксономским нивоима врсте и рода. На вишем таксономском нивоу, матрици потфамилије, није забележена значајна корелација са подацима где је структура заједнице била представљена врстама.

Табела 13. Корелација између индекса диверзитета на различитим таксономским нивоима.

	Врста-S	Врста-Н'	Врста-1-D
Род-S	0.962**		
Род-Н'		0.950**	
Род-1-D			0.928**
Потфамилија-S	0.349**		
Потфамилија-Н'		0.149	
Потфамилија-1-D			0.173

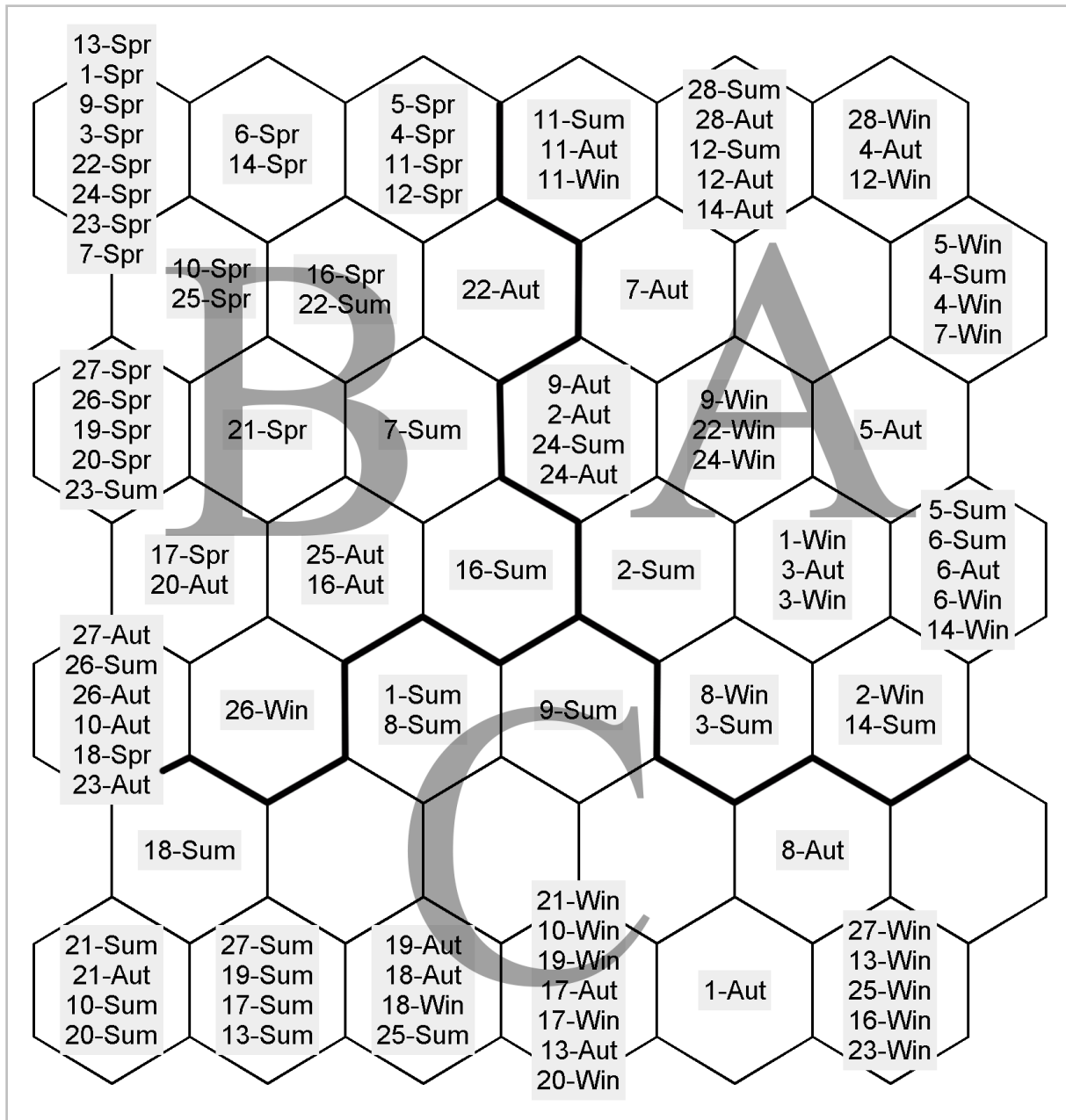
БС-није значајно, *-p<0.05, **-p<0.01

СОМ анализа је на основу података заједнице хирономида, са таксономском резолуцијом до нивоа врсте, рода и потфамилије, такође формирала 3 групе локалитета (Слика 15.; 16.; 17.). Просторна и временска дистрибуција заједнице хирономида на нивоу врсте и рода била је слична и сачињена од кластера сличних композиција локалитета. На СОМ мрежи, где је представљена структура групе хирономида на нивоу рода, кластер А је садржао 72,1% локалитета који су такође били сврстани у кластер А, класификације спроведене на нивоу врсте. Поклапајући образац кластера Б и Ц износио је 71,5% и 74%, респективно. Када је класификација на нивоу врсте била процењена на највишем таксономском нивоу (потфамилије), степен поклапања композиције кластера по саставу локалитета, две различите таксономске резолуције (врста и потфамилија) је био знатно нижи. СОМ мрежа на нивоу потфамилије садржала је кластере А и Ц, са по 53,1% и 53,5% локалитета, респективно, који су припадали истим кластерима СОМ

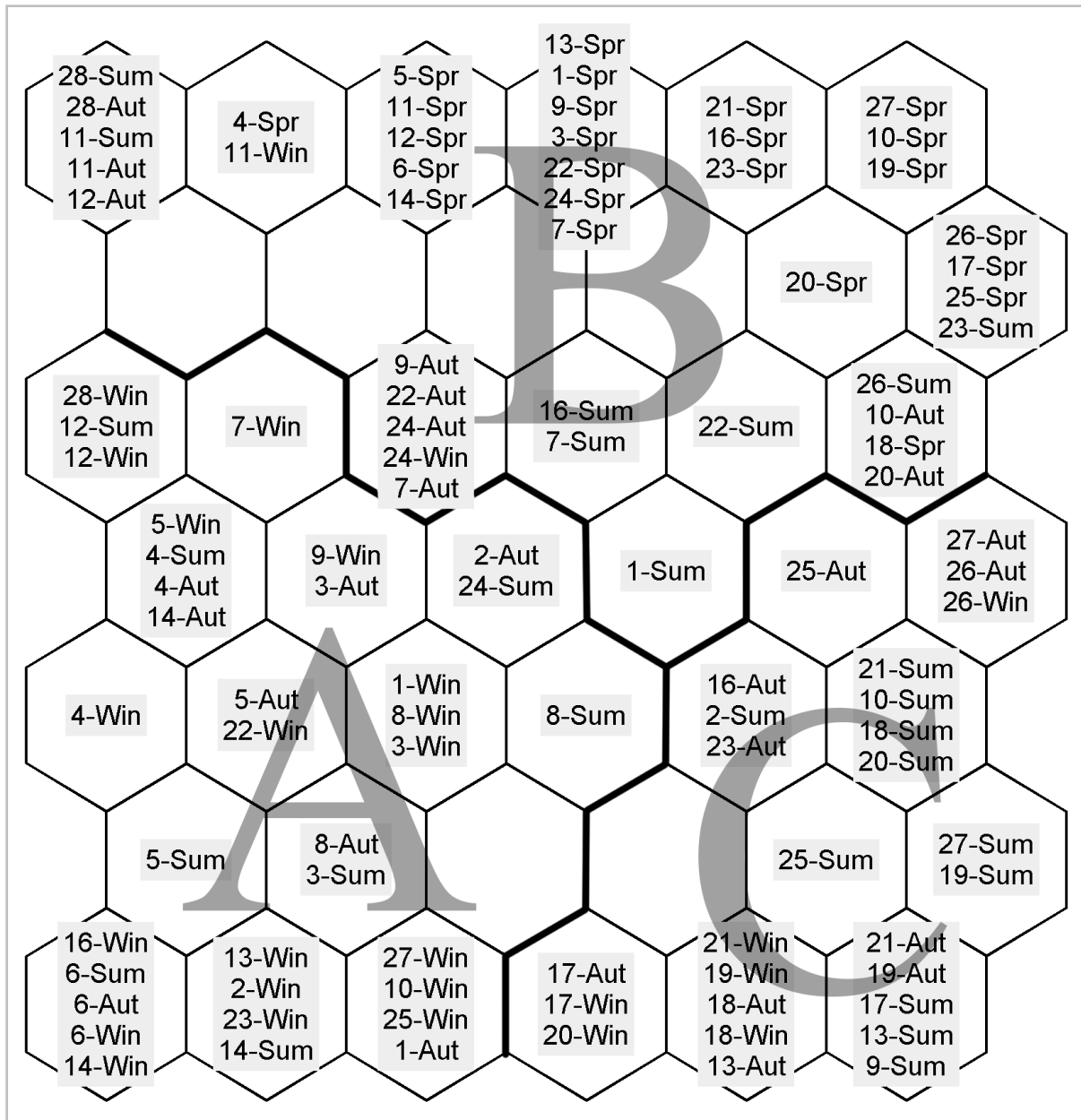
мреже, али на таксономском нивоу врсте. Образац поклапања кластера Б на нивоу врсте и потфамилије био је изненађујуће висок (76%).

Претходни резултат потврђен је и анализом класификационе снаге, где је ниво потфамилије показао најнижу класификациону снагу (CS: 0,034), док је ниво рода био значајно виши, са вредностима (CS: 0,088) приближним класификационој снази на највећој таксономској резолуцији (CS: 0,093).

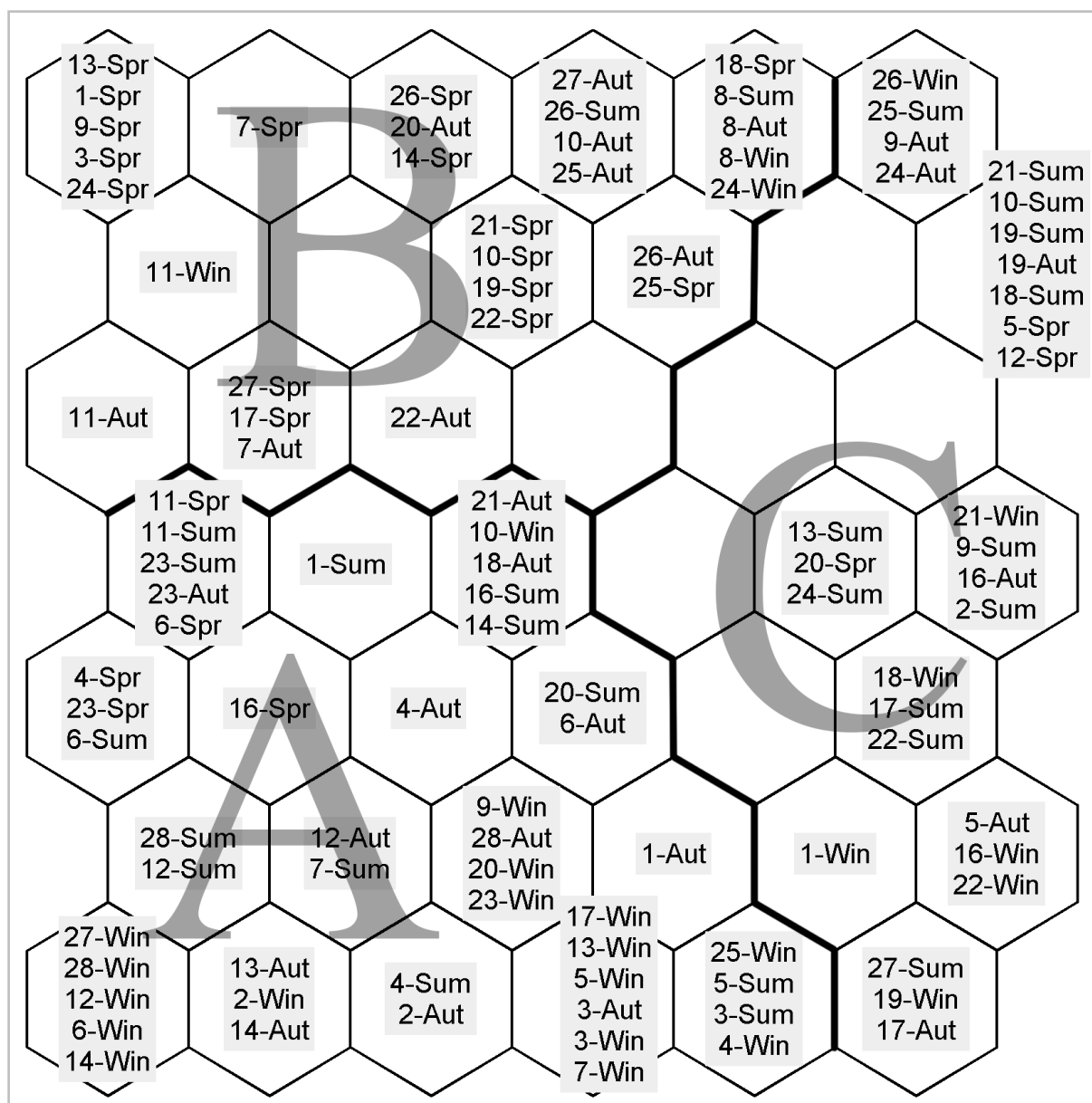
Корелација матрица сличности, различитих таксономских нивоа, RELATE анализом је показала јасну разлику у структурама између матрица на нивоу врсте и потфамилије, са ниским коефицијентом корелације ($p=0,001$; $Rh0=0,259$). Супротно томе, забележен је висок степен усаглашености матрица сличности на нивоу врсте и рода ($p=0,001$; $Rh0=0,259$).



Слика 15. Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae на сливу Јужне Мораве. СОМ анализа на основу бројности таксона идентификованих до нивоа врсте. Слова А, Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „к-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).



Слика 16. Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae на сливу Јужне Мораве. СОМ анализа на основу бројности представника појединих родова. Слова А, Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „k-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).



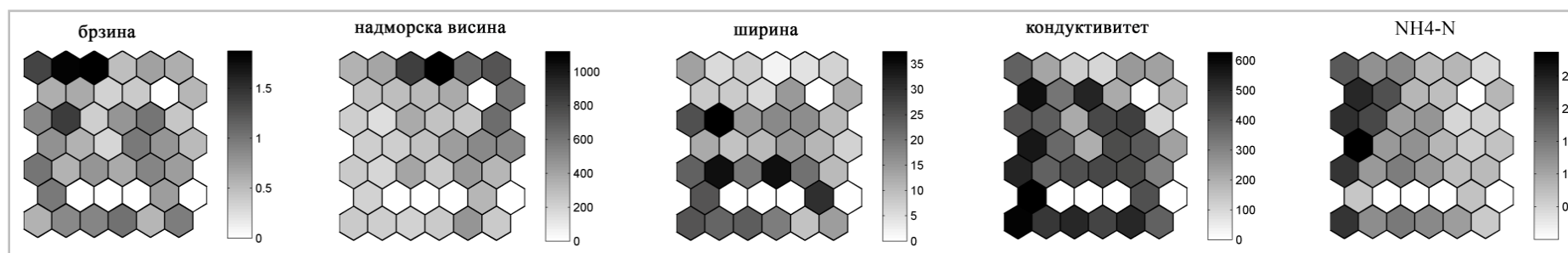
Слика 17. Просторна и временска дистрибуција фамилије Chironomidae на сливу Јужне Мораве. СОМ анализа на основу бројности представника потфамилија. Слова А, Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „к-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win- Зима).

4.5.2 Утицај таксономске резолуције на повезаност срединских параметара и фамилије Chironomidae

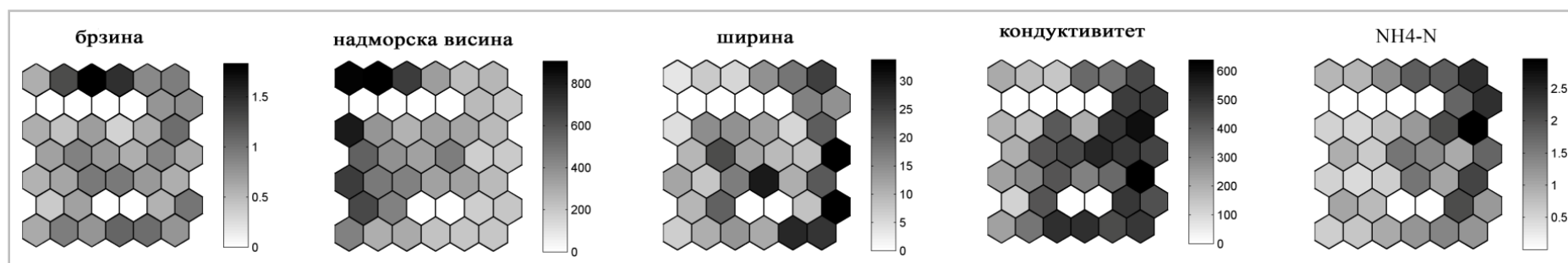
BIO-ENV анализа је приказала статистички значајан модел, издвојивши три срединска параметра, одговорна за структурирање заједнице хирономида са највећом могућом таксономском резолуцијом ($Rh_0=0,499$, $p=0,01$; Табела 14.). Исти резултат забележен је и за структуру групе представљене на таксономском нивоу рода, само са нешто нижим коефицијентима корелације ($Rh_0=0,471$, $p=0,01$). Осим најзначајнијег модела, са три приказане срединске променљиве, BIO-ENV је за оба таксономска нивоа представио другу и трећу најбољу комбинацију срединских параметара, са додатним, за групу значајним, срединским параметрима у моделу (Табела 14.). У случају матрице на таксономском нивоу потфамилије, формиран је модел са другачијом комбинацијом срединских параметара, али са ниским коефицијентом корелације и без статистичке значајности ($Rh_0=0,16$, $p=0,15$). Дистрибуција вредности свих срединских параметара које је BIO-ENV представио као значајне за структуру заједнице хирономида, је визуализована компонентним графиконима помоћу COM методе (Слика 18. и 19.). Осим за брзину протока, дистрибуција свих параметра показује јасан градијент на компонентним графиконима, што индикује њихов значај у структурирању групе хирономида.

Табела 14. BIO-ENV анализа: прве три најбоље комбинације варијабли на нивоу врсте и рода са вредностима Spearman-овог коефицијента корелације (Rho) и r .

Ранг (ниво врсте)	r	Rho	Најбоља комбинација променљивих
1	0.01	0.499	брзина; NH_4-N ; надморска висина
2	0.01	0.470	брзина; NH_4-N ; надморска висина; ширина
3	0.01	0.469	брзина, кондуктивитет; надморска висина; ширина
Ранг (ниво рода)			
1	0.01	0.471	брзина; NH_4-N ; надморска висина
2	0.01	0.444	брзина, кондуктивитет; надморска висина; ширина
3	0.01	0.436	брзина; NH_4-N ; надморска висина



Слика 18. SOM визуализација срединских параметара, значајних за заједницу хириномида (таксономски ниво врсте) према BIO-ENV анализи (NH₄-N-амонијак). Скала на свакој мапи представља мерене вредности параметара. Засенченост црне боје за сваки параметар је високо корелисана са максималним вредностима у студији. Опадање степена засенчености индикује и опадање вредности параметара.



Слика 19. COM визуализација срединских параметара, значајних за заједницу хириномида (таксономски ниво рода) према BIO-ENV анализи (NH₄-N-амонијак). Скала на свакој мапи представља мерене вредности параметара. Засенченост црне боје за сваки параметар је високо корелисан са максималним вредностима у студији. Опадање степена засенчености индикује и опадање вредности параметара.

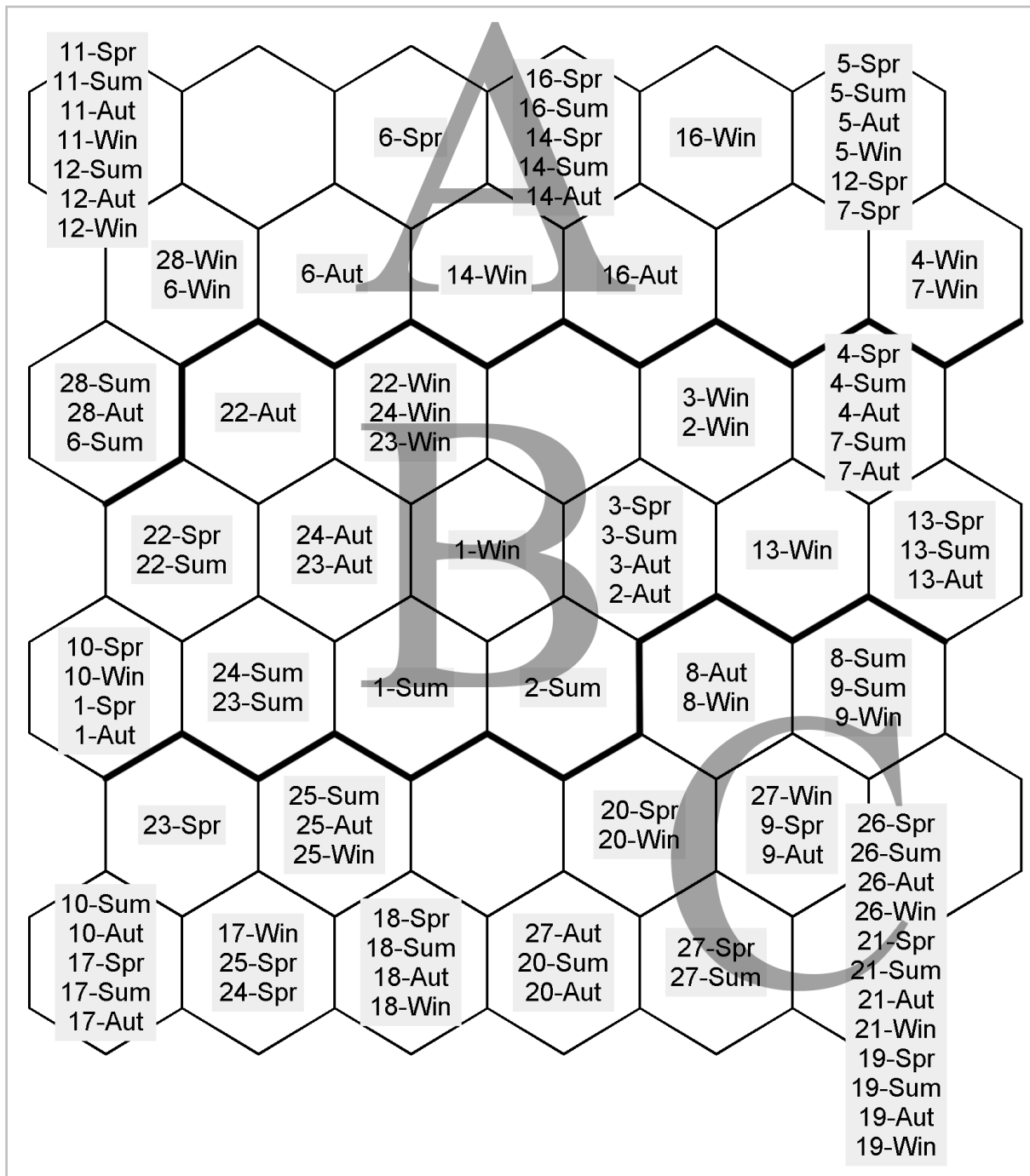
4.5.3 Утицај таксономске резолуције на индикаторске таксоне

СОМ анализа, заснована на срединским параметрима као улазним векторима, формирала је три групе локалитета са различитим профилима срединских услова (Табела 15. и Слика 20.). Група А сачињена је од локалитета без органског оптерећења, са забележеним ниским вредностима кондуктивитета, БПК₅, PO₄-P и NH₄-N. На локалитетима групе Б регистроване су повећане вредности ових параметара, што их је чинило умерено загађеним. Коначно, група Ц садржала је веома загађене локалитете, са највишим вредностима кондуктивитета, БПК₅, PO₄-P, и NH₄-N. На оба нивоа таксономске скале (врста и род) IndVal анализа је идентификовала представнике све три групе локалитета (Табела 16.). Највећи број индикаторских таксона на нивоу врсте је представљен за групу А (12), чији је број опадао за групу Ц (10) и Б (2). Сличан образац се појавио и за индикаторске таксоне на нивоу рода, где је највећи број родова (11) био нетолерантан на органско оптерећење (индикатори групе А). Група Ц је била представљена са 8 индикаторских родова, док је група Б имала само једног, статистички значајног представника са IndVal вредностима мањим од 25% (Табела 16.).

Табела 15. Средња вредност ± 1 стандардна девијација срединских параметара по групама формираних СОМ анализом.

Параметри	Групе		
	А	В	С
Т	10.78±4.88 ^a	11.71±4.91 ^{ab}	14.27±4.96 ^b
V	0.850±0.637 ^a	0.869±0.463 ^a	0.881±0.395 ^a
Ер	187.73±85.15	408.41±107.20	494.03±114.65
Мутноћа	9.189±5.144 ^a	11.562±9.961 ^a	11.609±6.136 ^a
Ph	6.83±0.59 ^a	7.02±0.43 ^a	6.92±0.50 ^a
O₂mg	11.08±0.96 ^a	10.49±1.34 ^a	10.40±1.66 ^a
O₂	107.30±11.38 ^a	102.42±14,10 ^a	103.87±14.97 ^a
БПК₅	3.92±0.83 ^a	3.93±0.10 ^a	4.79±1.19 ^b
NO₃-N	1.384±0.807	2.785±1.581	7.059±4.104
PO₄-P	0.070±0.043	0.146±0.142	0.401±0.247
NH₄-N	0.872±0.503	1.320±0.893	1.616±0.799
Тврдоћа	100.73±53.88 ^a	195.55±54.10 ^{ab}	217.88±51.60 ^b
Надморска висина	608.23±293.40	399.16±140.30	217.74±56.93
Ширина	6.82±3.70	10.70±3.37	24.52±11.84
Дубина	0.58±0.34	1.22±0.38	1.82±1.20

Вредности које у истом реду не деле исти суперскрипт су статистички различите: ^{a,b} p<0.05. Ако суперскрипт недостаје, све вредности су међусобно статистички значајно различите.



Слика 20. SOM мрежа са дистрибуираним локалитетима на основу срединских параметара. Слова А; Б и Ц означавају различите групе неурона, формиране класификационом методом „к-mean“. Ознаке (кодови) у оквиру неурона представљају различите локалитете, узорковане у различитим сезонама. Број у оквиру кода означава локалитет, док три слова означавају сезону (Spr-пролеће, Sum- лето, Aut-јесен, Win-зима)

Табела 16. Индикаторски таксони, на различитим таксономским нивоима (врста и род) за СОМ групе (Гр), формиране на основу срединских параметара. Таксони са IndVal вредностима (InV) већим од 25% представљају репрезентативне таксоне група и у табели су подвучени. Остатак таксона у табели је значајан за групу (видети: Материјал и методе).

Таксон	Гр	InV	Таксон	Гр	InV	Таксон	Гр	InV
<u><i>Epoicocladus flavens</i></u>	A	67.3***	<u><i>Potthastia gaedii</i></u>	B	30.6** *	<u><i>Cricotopus triannulatus agg.</i></u>	C	62.2***
<u><i>Tvetenia bavarica</i></u>	A	57.6***	<u><i>Paracladopelma laminatum</i></u>	B	29.8*	<u><i>Chironomus spp.</i></u>	C	58.9**
<u><i>Prodiamesa olivacea</i></u>	A	51.4**	<i>Paracladius conversus</i>	B	17.7*	<u><i>Polypedilum scalaenum</i></u>	C	54.6***
<u><i>Thienemanniella clavicornis</i></u>	A	43.1***	<i>Cricotopus tremulus</i>	B	10.9*	<u><i>Rheocricotopus chalybeatus</i></u>	C	47.5***
<u><i>Brillia bifida</i></u>	A	39.9***	<i>Eukiefferiella claripennis</i>	B	9.4*	<u><i>Cricotopus bicinctus</i></u>	C	45.8***
<u><i>Paratrissocladus excerptus</i></u>	A	38.6***				<u><i>Cryptochironomus sp.</i></u>	C	42.4***
<u><i>Thienemannimyia sp.</i></u>	A	38.3***				<u><i>Paratrichocladus rufiventris</i></u>	C	39.1*
<u><i>Micropsectra bidentata</i></u>	A	36.4***				<u><i>Paratanytarsus dissimilis</i></u>	C	33.3***
<u><i>Stictochironomus maculipennis</i></u>	A	35.1***				<u><i>Chonchapelopia melanops</i></u>	C	30.2*
<u><i>Corynoneura lobata</i></u>	A	33.9***				<u><i>Dicrotendipes nervosus</i></u>	C	27.4**
<u><i>Rheocricotopus fuscipes</i></u>	A	31.5**				<i>Harnichia sp.</i>	C	18.4**
<u><i>Eukiefferiella brevicealcar</i></u>	A	27.7**						
<i>Macropelopia nebulosa</i>	A	24.3**						
<i>Orthocladus frigidus</i>	A	23.4**						
<i>Odontomesa fulva</i>	A	22.5**						
<i>Heleniella ornaticollis</i>	A	17.1**						
<i>Nanocladus dichromus</i>	A	16.7***						

<i>Stempellinella brevis</i>	A	16.7**						
<i>Apsectrotanypus trifascipennis</i>	A	16.5**						
<u>Epoicocladius</u>	A	67.3***	<i>Paracladius</i>	B	17.7*	<u>Cricotopus</u>	C	62.6***
<u>Prodiamesa</u>	A	51.4**				<u>Chironomus</u>	C	58.9**
<u>Micropsectra</u>	A	47.8**				<u>Polypedilum</u>	C	45.9*
<u>Tvetenia</u>	A	40.3*				<u>Cryptochironomus</u>	C	42.4***
<u>Stictochironomus</u>	A	40***				<u>Paratrachocladius</u>	C	39.1*
<u>Corynoneura</u>	A	39.8***				<u>Paratanytarsus</u>	C	35.7***
<u>Paratrissocladius</u>	A	38.6***				<u>Chonchapelopia</u>	C	30.2*
<u>Thienemannimyia</u>	A	38.3***				<u>Dicrotendipes</u>	C	27.4**
<u>Nanocladius</u>	A	33.3*				<i>Harnichia</i>	C	18.4**
<u>Brillia</u>	A	28.7**				<i>Tanypus</i>	C	9.3*
<u>Macropelopia</u>	A	25.7**						
<i>Odontomesa</i>	A	22.5**						
<i>Heleniella</i>	A	17.1**						
<i>Stempellinella</i>	A	16.7**						
<i>Apsectrotanypus</i>	A	16.5**						

праг значајности * <0.05, ** <0.01, *** <0.001

5. Дискусија

5.1 Диверзитет фамилије хирономида и потенцијалне метричке особине у процени еколошког статуса

Тренд повећавања диверзитета од полова ка екватору, са највећим вредностима у тропској области, није одговарајући модел у описивању дистрибуције врста фамилије Chironomidae. Ferrington (2008) је у свом раду приказао глобалну дистрибуцију диверзитета врста и родова ове фамилије по зоогеографским регионима (Слика 2.). Највеће богатство врста фамилије јавља се у умереном појасу, средњих географских ширина. Неочекиван образац распрострањења диверзитета групе хирономида по зоогеографским регионима треба узети у обзир са одређеном дозом опреза, јер је богатство врста у различитим регионима у високом степену повезано са различитом количином напора уложеног у описивању локалне фауне макроинвертебрата. У палеарктичком региону забележено је чак 1.321 врста, распоређених у 181 род. Од тога у Европи је до сада регистровано присуство 1.250 врста хирономида (Brabec et al., 2007). На Балканском полуострву је за само неколико земаља познат диверзитет хирономида. Према литературним подацима, као и на основу податка из Fauna Europaea (<http://www.faunaeu.org>), у Румунији су забележене 403 врсте, у Бугарској 179 и Мађарској, као земљи у окружењу 350 врста. Када је реч о акватичним екосистемима Србије, до сада је заједно са овом студијом регистровано 236 таксона из 6 потфамилија. Највећим бројем таксона је заступљена потфамилија Orthoclaadiinae (107) па за њом Chironominae, са забележена 84 и Tanypodinae са 34 таксона. Са најмање таксона су присутне потфамилије Diamesinae (8) и Prodiamesinae (2) и Podonomidae (1). Веродостојност овог података о диверзитету је дискутабилна јер због сталних промена у номенклатури, са једне стране, и дужег прекида у истраживању фауне хирономида у Србији са друге, постоји велика могућност појаве синонимизације. Због ове појаве, реалан број врста у Србији је вероватно и мањи од представљеног. Како би се дошло до реалног стања диверзитета фауне хирономида у Србији, неопходно је извршити корекције свих публикованих чек-листа, а у случајевима, где је то могуће, и ревидирати материјал.

Посебно је потребно нагласити да је у односу на остале истраживане регионе у Европи и на Балкану, брдско-планинска област Србије, с обзиром на положај и (палео) историјска кретања фауне, један од центара биолошке разноврсности (Blaženčić et al., 1995). Све упућује на то да се у оквиру слива Јужне Мораве може очекивати висок диверзитет, узимајући у обзир широк опсег надморских висина и велики диверзитет

станишта укључених у истраживање. Janković, (1985) је на реци Јужној Морави и ушћима главних притока забележила присуство 54 таксона. У поновљеној студији 2010. године, са гушћом мрежом локалитета, идентификовано је 111 таксона. Када је у поновљеној студији узета у обзир само Јужна Морава са ушћима притока првог реда (област истраживања која се у потпуности поклапа са студијом из 1981.) поново је констатован већи број врста (70) у поређењу са резултатима које је представила Janković (1985).

Са друге стране, према подацима Raunio et al. (2007), у истраживању спроведеном на лотичким системима бореалне области, на 22 локалитета су у 77 родова идентификоване 162 врсте хириномида. Слатководни екосистеми у бореалном региону се карактеришу ниским глобалним диверзитетом због кратког развојног периода од последњег леденог доба. У поређењу са регионима који нису прошли кроз период последње глацијације, бореални регион би требало да приказује знатно сиромашнију фауну акватичних макроинвертебрата, која је генерално окарактерисана ниским глобалним диверзитетом (Heino, 2008). На хидрографској мрежи Србије, са великом разноврсношћу станишта и поред очекивања високог биолошког диверзитета, резултати студије су показали чак нешто нижи диверзитет фамилије Chironomidae од очекиваног. Регистровано богатство врста је поготову ниско ако се упореди са студијом лотичких система бореалног региона (Raunio et al., 2007). С друге стране, биогеографске студије фауне макроинвертебрата се спроводе под различитим околностима (величина истраживане области, ниво таксономске резолуције, метода и фреквентност узорковања (ларве или егзувије пупа), па је због тога и разумљиво зашто број таксона широко варира у чек-листама различитих подручја. Према томе, дискутабилно је да ли је забележени образац диверзитета фауне хириномида у сливу Јужне Мораве висок или низак у односу на очекивану вредност.

У поређењу са 1981. годином током 2010. су забележене значајно више вредности $\Delta+$ и богатства врста (S). Овакав резултат се може објаснити падом индустријске производње након економске кризе у Србији током 1990-тих (Stojković et al., 2013). Податак који иде у прилог овој претпоставци је да, за разлику од лентичких система, лотички системи се могу брзо опоравити од органског оптерећења, док морфолошка нарушеност станишта може оставити дугорочније последице (Yount & Niemi, 1990). Реколонизација претходно нарушених станишта је вођена фамилијом Chironomidae, док остале групе макроинвертебрата долазе касније по одређеном

редоследу. До почетка 90-тих година, индустријски развој југа Србије је био веома висок. Због тога је горњи део реке Јужне Мораве током истраживања 1981. (локалитети MIV, MPV, MOR и BIM; Слика 3.) био дистрибуиран ван граница 95% интервала поверења (Слика 12. А). Важно је нагласити да су наведени екстремни локалитети, у погледу добијених вредности $\Delta+$ били позиционирани на најширем делу левкастог графикана, где је статистичка снага анализе била и најнижа (Marchant, 2007). Према томе, такав резултат се може приписати и малом броју забележених врста на тим локалитетима.

На левкастом графикону, који презентује податке из 2010. године, показало се да је већина локалитета дистрибуирана у оквиру граница 95% интервала поверења. Постепено одступање од очекиване вредности $\Delta+$, али у оквиру 95% граница поверења, је последица варијабилности таксономске различитости која прати варијабилност срединских фактора (Warwick & Clarke, 1998). Принцип примене очекиваних вредности и 95% интервала поверења $\Delta+$ индекса у процени степена антропогеног утицаја је конципиран тако да се они локалитети који су позиционирани ван 95% граница поверења сматрају нарушеним и према својим карактеристикама могу бити јасно одвојени од референтних локалитета (Abellán et al., 2006). Супротно очекивањима, у овом истраживању није пронађена значајна разлика између референтних и нарушених локалитета. Недовољан капацитет индекса да детектује антропогени утицај може се објаснити релативно ниским диверзитетом виших таксономских група (Abellán et al., 2006; Marchant, 2007). На пример, Marchant (2007) је показао да, када је за конструкцију мастер листе узео у обзир само представнике Ephemeroptera, Plecoptera и Trichoptera (ЕРТ група), резултати $\Delta+$ су били монотони у односу на срединске промене на тест локалитетима, без икакве тенденције груписања. У том случају сви локалитети су били дистрибуирани у оквиру граница 95% интервала поверења, без обзира на степен антропогеног утицаја, којим су тестирани локалитети били изложени. Очекивана вредност $\Delta+$ је била такође нижа од оне, израчунате на основу мастер листе, која је садржала све групе макробескичмењака. Аутор је то објаснио податком да је мастер листа, сачињена од ЕРТ групе, садржала 31 фамилију, док је мастер листа свих макроинвертебрата бројала чак 91 фамилију. Оваква разлика у броју фамилија доводи до смањивања капацитета таксономског диверзитетa мастер листе, а тиме и до пада снаге и сензитивности индекса. Супротно закључцима до којих су дошли Abellán et al., (2006), за коришћење појединих група у израчунавању $\Delta+$

индекса, према Koperski (2009) индекс таксономске различитости примењен на једној групи макроинвертебрата (фамилија Chironomidae) се показао као добра метричка особина, способна да процени умерен степен деградације лотичких система. Међутим, у тој студији су вредности $\Delta+$ у референтним и нарушеним стаништима компарирани без укључивања очекиваних вредности и 95% интервала поверења. Узимајући у обзир све наведене резултате долази се до закључка да је за примену индекса таксономске различитости, као поузданог параметра процене стања еколошког статуса слатководних екосистема, неопходно укључити све групе акватичних макроинвертебрата (Marchant, 2007).

Са друге стране, улазна листа анализе таксономске различитости између локалитета слива Јужне Мораве је била састављена од 104 таксона, 16 трибуса и 5 потфамилија, фамилије Chironomidae. Искључивањем групе која је тако таксономски и функционално разнолика из процене таксономске различитости, такође би довело до пада дискриминационе снаге $\Delta+$ индекса, тако да метода, са озбиљним недостацима у мастер листи, не би функционисала. До сличног закључка је дошао и Heino et al. (2007) претпоставивши да би искључивање хирономида из његове студије водило до губитка очекиваног сигнала срединске деградације. Сличан став је изнео и Marchant (2007), тврдећи да изостављање ниско диверзитетних група (Mecoptera, Megaloptera, Neuroptera и Lepidoptera) не би значајно изменило способност $\Delta+$ индекса у детекцији степена нарушености станишта. Међутим, овако нешто није могуће за групе као што су Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera (EPT), Coleoptera, Diptera, Odonata и Hemiptera. Резултати истраживања фауне хирономида у сливу Јужне Мораве откривају да фамилија Chironomidae као самостална група такође умањује дискриминациону снагу $\Delta+$ индекса.

Индекс $\Delta+$ је био корелисан са индексима диверзитета који су традиционално у употреби приликом процене биодиверзитета. Значајна корелација је забележена између $\Delta+$ и укупног броја таксона (S), што је открило да је опадање броја врста праћено нестанком оних таксона који се разликују на вишем таксономском нивоу, док врсте које припадају истом роду остају присутне у узорку (Heino et al., 2005). Детектована корелација може бити важна информација, узимајући у обзир следеће предности $\Delta+$ индекса:

1. Независност у односу на методу узорковања (утрошен труд), што га чини атрактивним у студијама великог просторног и временског обима, где се метода и количина узорковања, често, веома разликују,
2. Једноставан статистички метод, којим је могуће лако одредити очекиване вредности. То омогућава поређење између добијених вредности таксономске различитости са њеним очекиваним опсегом варирања,
3. И, коначно, постојање мастер листе омогућава одређивање потенцијалних представника референтних стања.

Међутим, према Heino et al. (2005), богатство врста и $\delta+$ широко варирају дуж лонгитудиналног градијента реке. Неопходно је тако снажну природну варијабилност узети у обзир пре примене ових индекса у процени еколошког статуса акватичних екосистема. Како би испитао природну варијабилност, Coffman (1989) је приликом одређивања обрасца богатства врста фамилије хирономида у лотичким системима узео у обзир следеће факторе: еколошка хетерогеност, величина реке, надморска висина, географска ширина и биогеографски потенцијал. Ово истраживање је показало да богатство врста расте са порастом реда реке до трећег реда кад се зауставља и почиње да опада (Ferrington, 2008). Према Coffman (1989), од укупног богатства врста $S=152$, забележен је следећи дистрибуциони модел према типовима река: 26 (10-64) за први тип водотокова, 44 (13-144) за други, 63 (25-157) трећи, 51 (25-83) четврти, 47 (11-86) пети, 47 (10-99) шести и 45 (12-148) за седми тип река. Сличан образац се приказао и у студији на сливу Јужне Мораве, где је богатство врста у водотоковима четвртог типа било ниже (средње богатство врста = 17) него на локалитетима река трећег типа (средње богатство врста = 23). У поређењу са резултатима Coffman (1989), богатство врста на трећем и четвртом типу водотокова слива Јужне Мораве је било неочекивано ниже. То се може објаснити прилично лошим стањем тестираних станишта и великим антропогеним утицајем, коме су изложени сви делови тока на нижим надморским висинама. Ово потврђује да је забележени диверзитет у сливу Јужне Мораве ипак нижи у поређењу са речним сливовима у окружењу. Због недостатка референтних локалитета на трећем и четвртом типу водотока није било могуће тестирати на који начин варирају укупан број врста и $\delta+$ дуж природног срединског градијента.

Индекси $\delta+$ и $\lambda+$ показали су јаку негативну корелисаност на свим тест локалитетима слива Јужне Мораве. Warwick & Clarke (2001) су у својој студији нагласили да је веома битно проверити евентуално постојања корелације између $\delta+$

и $\lambda+$ индекса, као резултат унутрашње корелације. Аутори објашњавају појам унутрашње корелације као последицу конструкције таксономског стабла. То значи да корелација између симулираних вредности $\delta+$ и $\lambda+$ може бити великим степеном одговорна за добијену корелацију актуелних база података. На Слици 9. се јасно види да је јака негативна корелација између добијених вредности $\delta+$ и $\lambda+$ последица конструкције мастер листе. Инверзна корелација се добија на основу симулираних вредности индекса. Сличне резултате је представио и Marchant (2007). Он наглашава да ова два параметра не захтевају посебна мерења, па није зачуђујуће зашто $\lambda+$ не може да понуди додатне информације о антропогеном утицају, које већ нису обезбеђене индексом $\delta+$. Према томе, за методе процене биодиверзитета станишта и степена нарушености акватичних екосистема није потребно користити више индекса таксономске различитости јер, услед њихове високе корелисаности, нису комплементарни и не пружају додатне информације о стању еколошког статуса акватичних екосистема.

На основу резултата анализе главних компоненти (PCA), $\delta+$ показује правилну промену у односу на градијент квалитета воде. Сличне резултате је добио и Marchant (2007), али са нешто другачијим факторима средине. У тој студији је $\delta+$ негативно корелисана са параметрима \log -турбидитет, \log -тотални фосфор и \log -тотални азот (TKN). И у овом истраживању је индекс $\delta+$ био негативно корелисан са параметрима органског загађења (кондуктивитет и концентрације ортофосфата, нитрата и амонијака). Поред тога је забележено да концентрација и сатурација раствореног кисеоника (DOmg/l и DO\%) показују високу позитивну корелисаност са $\delta+$, што није био случај са осталим студијама. Ово може бити објашњено чињеницом да је кисеоник један од најважнијих фактора који утичу на дистрибуцију и развиће ларви хирономида (Vallenduuk & Pillot, 2007). Тачније, на локалитетима са најнижим концентрацијама кисеоника, заједница макроинвертебрата се углавном састоји од представника потфамилије Chironominae, који су квалитативно и квантитативно доминантни. Главна карактеристика ове потфамилије је да све, или скоро све врсте имају одређену количину хемоглобина у телесној течности (Moller Pillot, 2009). Због тога на локалитету 10, на пример, где је количина кисеоника међу најнижим, забележено је присуство 13 таксона који припадају потфамилији Chironominae, 6 потфамилији Orthoclaadiinae и 2 Tanypodinae. Таква доминација потфамилије Chironominae снажно утиче на промену вредности индекса $\delta+$

смањујући диверзитет на вишим таксономским нивоима. Утицај би вероватно био и већи да је у овој анализи род *Chironomus* био детерминисан до нивоа врсте. То би додатно повећало број врста које припадају истом роду и смањило вредности δ^+ . Потврђена линеарна веза између δ^+ и квалитета воде је обећавајући резултат јер представља δ^+ као нову потенцијалну метричку особину чије би евентуално укључивање у методе повећало осетљивост мултиметричких индекса квалитета воде.

Анализа главних компоненти (РСА) показала је да и остали индекси диверзитета (H' , J' и $1-D$), показују правилност дуж градијента квалитета воде. Сви традиционални индекси диверзитета су повећавали своју вредност са порастом кисеоника и падом концентрације амонијака, фосфата и вредности БПК₅, што је у сагласности са резултатима које је представио Коперски (2010). Супротно индексима диверзитета, укупна бројност јединки хирономида (N) је расла са падом квалитета воде, што потврђује резултате претходних студија да су хирономиде посебно бројне у нарушеним стаништима, где опада број присутних таксона, али расте њихово процентуално учешће у оквиру заједнице бентосних макроинвертебрата (De Bisthoven et al., 2005). Овакви резултати додатно подижу значај хирономида, у процени еколошког статуса акватичних екосистема и чине их незаобилазним приликом конструисања метода и мониторинг програма за процену квалитета воде.

5.2 Просторна и временска варијабилност заједнице хирономида

Фамилија Chironomidae је хетерогена група таксона са варијабилним одговорима на срединске градијенте (Lencioni & Rossaro, 2005). Због тога су многи аутори тврдили да су хирономиде као група осетљиве на промене дуж речног континуума и мењају своју структуру са променама надморске висине, типа водотока и ширине канала (Ward & Williams, 1986; Lindegaard et al., 1995; Puntí et al., 2009). У овој студији, базираној на композицији и абундантности заједнице хирономида, СОМ анализа је формирала три групе локалитета. Група Б је представљена углавном са локалитетима распоређеним дуж горњих делова тока река (*a priori* тип 4). То није био случај са групом А и Ц где није забележена апсолутна доминација неке од *a priori* група. Таксони који су били типични представници групе Б припадају потфамилији Orthoclaadiinae (71%) што је очекиван резултат с обзиром на чињеницу да су у горњим деловима тока карактеристичне заједнице у којима доминирају представници потфамилије Orthoclaadiinae (Ward & Williams, 1986; Rossaro, 1991; Ferrington et al., 1993; Lindegaard

et al., 1995). Таксони који припадају овој групи углавном преферирају чисте воде са високим концентрацијама раствореног кисеоника (Helson et al., 2006). Ларве трибуса *Chironomini* су обично ретке у горњим токовима река, док су доминантне у низијским заједницама акватичних макроинвертебрата (Pinder, 1995). Међутим, у овој студији је врста *Polypedilum laetum* била дистрибуирана у горњим токовима, због чега је према IndVal анализи сврстана у групу значајних представника групе Б. Иако се ова врста у литаратури наводи као високо толерантна на органско оптерећење (Orendt, 2002), али и као становник средњих делова тока река (Puntí et al., 2009), врста је често детектована у чистим и умерено загађеним водама горњих делова тока (Moller Pillot, 2009). Дистрибуција врсте *P. laetum* указује на њену еуривалентност у погледу већине срединских фактора, што је чини непоузданим индикатором у рутинским мониторинг програмима. Већина таксона из групе Б нема IndVal вредности веће од 25%, што те таксоне чини важним, али не и репрезентативним за групу. Тачније, такви таксони су присутни само у једној групи и само на одређеним локалитетима, због чега имају веома ниску релативну фреквенцију. Оваква појава би могла бити објашњена чињеницом да су планинске врсте стеновалентне и имају уске еколошке нише, што последично умањује њихову релативну фреквенцију, као и IndVal вредност (Penczak, 2009). Према Rossaro (1991) и резултатима ове студије, врсте *Eukiefferiella brevicar*, *Heleniella ornaticollis* и *Orthocladius rivulorum*, преферирају станишта са високим концентрацијама кисеоника, док је њихова дистрибуција ограничена само на горње делове водотокова. С друге стране, врста *Orthocladius lignicola* има такође ниске вредности релативне фреквенције, што се објашњава чињеницом да је ова врста специјалиста по питању станишта, јер се храни остацима дрвета у води (према Brabec et al. (2007) врста је ксилофар). Због овакве дистрибуције ове врсте имају ниске IndVal вредности. Ово није био случај и са представницима групе Ц, где у средњим и доњим деловима тока доминирају врсте које се карактеришу широким распрострањењем (Calle-Martínez & Casas, 2009; Puntí et al., 2009).

Класификација локалитета, базирана на бројности различитих врста ларви хирономида није само под утицајем природне варијабилности већ и под различитим степеном антропогеног утицаја. То је посебно био случај са групом Ц, где вредности хемијских фактора индикују присуство органског оптерећења (Табела 9., Слика 8.). Таксони који представљају ову групу локалитета добро су познати као индикатори загађених вода у свим регионима и водотоковима различитог типа (Wilson, 1992;

Bazzanti, 2000; García & Laville, 2000; Calle-Martínez & Casas, 2009). Међутим, супротно очекивањима *Orthocladius* (*Orthocladius*) spp. је такође сврстан у комплекс индикаторских таксона ове групе. Овај резултат се може објаснити присуством сезонске варијабилности која је у заједници хирономида веома изражена. Високу сезонску варијабилност показује и читав род *Orthocladius*, који припада групи зимских таксона чија абундантност и фреквентност рапидно расте током ове сезоне (Marziali et al., 2010). Такође Kruskal-Wallis-ов тест потврђује горе наведене тврдње, показујући да је, поред осталих таксона (Табела 8.) *Orthocladius* (*Orthocladius*) spp. веома осетљив на варијабилност, на шта упућује и вредност η^2 , која је највећа за овај таксон.

С обзиром да таксони као што су *Orthocladius* (*Orthocladius*) spp. обухватају велики број врста са различитим еколошким афинитетима, овај резултат би требало узети са одређеном дозом опреза због ниске таксономске резолуције. Међутим, SOM метода може да детектује да ли унутар таксона постоји одређена варијабилност у екологији врсте, тако што визуализује образац дистрибуције бројности таксона кроз простор и време (Слика 9.). Тачније, ако таксон садржи врсте без разлике у аутокологији, њихов образац бројности ће имати највише вредности у само једном делу неуромреже, групе неурона који су окарактерисани локалитетима са одређеним профилем станишта. У супротном, дистрибуција таксона би била разбацана по мрежи без икакве правилности. Према томе, SOM анализа се може користити као ефикасан метод у откривању довољног таксономског нивоа различитих индикаторских група. Истовременом визуализацијом дистрибуције врста, локалитета и вредности срединских параметара могуће је препознати потенцијалне индикаторске таксоне у одређивању степена нарушености екосистема.

Поред просторне димензије, на SOM мрежи је уочљива и временска димензија структуре заједнице хирономида. Локалитети који су узорковани углавном током зимских месеци налазе се на десној страни мреже. Kruskal-Wallis-ов тест открива да су таксони потфамилије Orthoclaadiinae најодговорнији за појаву сезонске варијабилности. Marziali et al. (2010) тврди да је током зимског периода број врста које припадају потфамилијама Orthoclaadiinae и Diamesinae у порасту, што је у складу и са резултатима истраживања на сливу Јужне Мораве. Постојање сезонског обрасца потврђује и податак да се временски период еклозије (излетања адултних јединки из воде) разликује између зимских форми потфамилија Orthoclaadiinae Diamesinae и Podonominae, и летњих форми Tanypodinae и Chironominae (García & Añón Suárez, 2007). Kruskal-Wallis тест је показао

исти шаблон, по коме таксони који припадају потфамилијама Chironominae (осим *Polypedilum convictum*) и Tanypodinae имају највише вредности средњег ранга током јула и августа, а Orthoclaadiinae и Diamesinae у марту (Табела 8.). Међутим, родови потфамилије Orthoclaadiinae су варијабилнији од осталих родова који припадају другим потфамилијама. На пример, током марта, на локалитетима доњих делова водотокова (10, 13, 17, 20, 21, 23, и 27) релативна фреквентност потфамилије Orthoclaadiinae рапидно расте (67, 43, 48, 46, 57, 51 и 58% респективно), достижући највеће вредности у поређењу са другим месецима. То је посебно уочљиво за род *Orthocladius* (са највећим вредностима η^2 ; Табела 8.) који на истим локалитетима нагло постаје најбројнији таксон у узорцима. Род *Orthocladius* је генерално карактеристичан за брзотекуће воде (Moller Pillot, 2013). Puntí et al. (2009) у својој студији, о дистрибуцији хириномида у референтним водама Шпаније, *Orthocladius* називају толерантним родом са недефинисаним дистрибуционим обрасцем према градијентима срединских фактора. Према налазима Moller Pillot (лична комуникација), може се претпоставити да *Orthocladius* не може провести цео животни циклус у загађеним водама али ларве на последњим ступњевима развића имају способност да колонизују макрофите у органски оптерећеним водама и опстану у таквим условима. На основу свих поменутих резултата, може се закључити да род *Orthocladius* у сливу Јужне Мораве вероватно мигрира током зиме у доње делове тока, који током ове сезоне постају хладнији и самим тим богатији кисеоником (забележене су високе вредности концентрације раствореног кисеоника: DOmg/l и DO%). Таква ефемерна промена услова средине, са ниским температурама и високим вредностима раствореног кисеоника, далеко је повољнија за овај род. Значајан пораст абундантности представника потфамилије Orthoclaadiinae током зимске сезоне може водити ка збуњујућем дистрибуционом обрасцу у доњим деловима водотокова, где је доминантно присуство ове потфамилије неочекивано (Nelson et al., 2006). Коначно, забележене промене у квалитативној и квантитативној структури представљају ефекат природне варијабилности који може значајно умањити прецизност система за биопроцену квалитета воде који су базирани на мултиметричким информацијама структуре заједнице макроинвертебрата (у овом случају фамилије Chironomidae).

На другој страни СОМ мреже, супротно групи локалитета узоркованих током зиме, концентрисани су локалитети узорковани током пролећне сезоне, окупљени у групи А (Слика 7.). Оваква дистрибуција је вероватно последица високог водостаја који

је био присутан током читаве пролећне сезоне 2010. године. Тако повишен водостај је одговоран за специфичну структуру заједнице хирономида која је, без обзира на утицај просторне дистрибуције, била слична на свим узоркованим локалитетима. Неки аутори су забележили да период високих вода редукује густину заједнице хирономида, што је довољно да изазове значајне промене у специјској композицији те групе (Schmid, 1992; Grzybewska et al., 1996; Lobinske et al., 1996). То указује да би значајна пролећна повишења водостаја могла бити нови извор варијабилности и могућа препрека за инкорпорирање хирономида у рутинске мониторинг програме.

5.3 Заједница хирономида и средински параметри

Веома важна информација за методе биопроцене лотичких система је ниво којим средински фактори утичу на структуру заједнице хирономида. СОМ мрежа показује јасан градијент (од доњег левог угла ка горњем десном углу мреже) срединских фактора (Слика 8.), који може бити интерпретиран као лонгитудинална зонација река (Vannote et al., 1980). Неке студије су истраживале како лонгитудинални градијент утиче на заједницу хирономида у површинским водама медитеранске области (Casas & Vilchez-Quero, 1993; Puntí et al., 2009) наглашавајући да градијент надморских висина има највећи ефекат на структуру заједница.

У истраживању на сливу Јужне Мораве, спроведеном током 2010. и 2011. године, лонгитудинални градијент надморских висина је у највећем степену управљао класификацијом, базираном на заједници хирономида, одвајајући водотокове на великим и средње/малим надморским висинама, што је у складу са резултатима Puntí et al. (2009). Дубина и ширина реке, која расте са падом надморских висина (Vannote et al., 1980) су такође утицале на дистрибуцију заједнице дуж лонгитудиналног градијента (Слика 8. и 9.). Такву просторну варијабилност, која је навећим делом условљена градијентом надморских висина, требало би узети у обзир пре примене ове групе у методама биопроцене. Током одабира области истраживања (селекције локалитета) неопходно је избећи превелики опсег надморских висина у циљу смањивања природне варијабилности. AQEM (AQEM, 2002) препоручује да се током истраживања не узима у обзир превелики опсег надморских висина, због чега је у свом програму дефинисао 29 типова река, где од свих дефинисаних еколошких ентитета ни један нема шири градијент надморских висина од 600 метара (Hering et al., 2004). Пратећи ову препоруку, Marziali et al. (2010) је дефинисао потенцијалну метричку особину која се

базира на заједници хирономида и која успешно одваја класе вода различитог квалитета у медитеранским рекама. Raunio & Muotka (2005) су показали у својој студији да темпо узорковања варира због градијента надморских висина, објашњавајући да су разлике у временским периодима еклозије ларви другачије на различитим надморским висинама. Према томе, уколико студија ипак укључује велики опсег надморских висина, неопходно је прилагодити стратегију узорковања како би се избегла велика временска варијабилност и тиме јасније детектовале промене структуре заједнице хирономида као одговор на одређен степен антропогеног утицаја у рекама бореалне области. С друге стране, брзи протокол биопроцене (**R**apid **B**ioassessmen **P**rotocol; Barbour et al., 1999) је предложио да се смањење природне варијабилност спроводи након селекције локалитета, употребом одређених метода у анализи добијених података. Такође, процес класификације водотокова се спроводи пре одабира потенцијалних метричких особина. Овај протокол одређује надморску висину као најбитнију класификациону варијаблу, објашњавајући да су промене у структури макрзообентоса у већем степену усаглашене са надморском висином него са променама екорегiona. На основу овог приступа, хомогенизација локалитета (смањење природне варијабилности) спроводи се на основу података о географским, физичким и хемијским карактеристикама станишта. Након прве класификације се спроводи и фино подешавање увођењем података о структури заједнице макрзообентоса. На тај начин RBP разврстава тест локалитете по групама са циљем да минимизира унутаргрупну варијабилност и повећава варијансе између група.

Поред природне варијабилности, заједница хирономида је осетљива и на антропогене утицаје. Многи аутори су успешно презентовали како су срединске варијабле, које индикују органско оптерећење, повезане са променама у структури заједнице хирономида. Wilson (1992) представља амонијак, фосфате и БПК5 као одговорне факторе за промене у композицији заједнице. Тестирајући индикаторску заједницу, аутор је забележио веома високу корелацију у односу на рангиране локалитете дуж срединског градијента квалитета воде, базираним на концентрацијама амонијака и биолошке потрошње кисеоника. Резултати, презентовани у виду РСА графикона са дистрибуираним врстама и срединским параметрима упућивали су на могућност формирања комплекса индикаторских врста толерантних и нетолерантних на органско загађење. Поред ове студије, Calle-Martinez et al. (2009) су такође показали постојање везе између квалитета воде и структуре заједнице хирономида. Скоро половина идентификованих врста је показивала високу корелисаност са другом ССА

осом, која је представљала градијент квалитета воде и била позитивно корелисана са великим бројем хемијских параметара који индикују органско загађење ($\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, БПК5, кондуктивитет). У нашој студији је на два различита начина приказана веза између заједнице хирономида и квалитета воде. Када је заједница хирономида била представљена индексом таксономске различитости, $\text{delta}+$ индекс је био значајно корелисан са DO, БПК5 $\text{PO}_4\text{-P}$ $\text{NO}_3\text{-N}$ и кондуктивитет. Међутим, у том случају је структура заједнице била представљена бинарном променљивом (1-врста присутна, 0-врста одсутна), што је била улазна матрица за рачунање индекса таксономске различитости ($\text{delta}+$). Када су биле укључене све сезоне и подаци о квалитативној и кватитативној структури, резултати су били усаглашени, осим у случају раствореног кисеоника. Недостатак градијента DO на СОМ мрежи је последица неочекиваног скока концентрације кисеоника у групи Ц, где су иначе концентрисани локалитети средњег и доњег тока река у сливу Јужне Мораве, који су окарактерисани највећим степеном антропогеног притиска. Локалитети који су узорковани током зимске сезоне су највероватније одговорни за пораст просечне концентрације кисеоника на неуронима групе Ц. Такви локалитети су у оквиру групе Ц концентрисани у доњем десном углу СОМ мреже (Слика 8.).

СОМ анализа је потврдила (Слика 9.) да су таксони *Chironomus* spp., *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg., *Paratrichocladius rufiventris* и *Rheocricotopus chalybeatus* чланови комплекса врста које се обично јављају у водама, окарактерисаним органским загађењем (Wilson, 1992; Calle-Martínez & Casas, 2009). Wilson (1992) и Calle-Martínez & Casas (2009) су такође покушали да дефинишу индикаторе квалитета воде у лотичким системима са два различита приступа. Wilson (1992) је, тестирајући корелацију између присутних врста и комплекса срединских параметара, пронашао велики број индикаторских таксона. Са друге стране, Calle-Martínez & Casas (2009) су применили приступ референтних стања и показали да само 6 врста представља индикаторе нарушених станишта. Остали таксони, који су били у корелацији са ССА осом, интерпретираном као градијент квалитета воде, нису имали довољно високе вредности IndVal за групу нарушених локалитета. Аутори сматрају да је овакав резултат последица недостатка референтних стања на мањим надморским висинама. Они такође наводе да се индикаторски таксони референтних стања разликују између два анализирана региона (два различита слива), што није био случај са индикаторима нарушених локалитета. Обе студије наводе пет таксона (*Chironomus riparius*,

Eukiefferiella claripennis, *Paratrichocladius rufiventris*, *Rheocricotopus chalybeatus* и *Cricotopus bicinctus*) који су се у западној Европи показали као осетљиви индикатори органског загађења, без обзира на тип водотока и регион. Према досадашњим студијама, чини се да поседују велики потенцијал у процени широког опсега деградације квалитета станишта. Када је у питању слив Јужне Мораве, од тих познатих индикатора загађења, и упркос томе што су неки од њих показивали високе IndVal вредности, само су *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg. и *Rheocricotopus chalybeatus* имали униформну дистрибуцију дуж читаве групе Ц на СОМ мрежи показујући отпорност на варирање температуре, изазвано променама сезона (Слика 8. и 9.). Остали представници високо загађених локалитета су сензитивни на промену температуре и преферирају високе температуре (*Chironomus* spp., *Cladotanytarsus* spp., *Polypedilum scalaenum*) или су присутни са навећом бројношћу на локалитетима нижих температура (*Cricotopus trifascia*, *Eukiefferiella ilkleyensis*, *P. rufiventris*, *Synorthocladius semivirens*, *Tvetenia calvescens*). То указује да се само неколико таксона могу сматрати одговарајућим индикаторима органског загађења, због њихове толерантности према променама температуре. Употребом само ових врста у методама биопроцене избегла би се варијабилност коју изазивају просторни и временски градијенти и повећала прецизност методе.

5.4 Методе биопроцене: могућности и примена

У досадашњим програмима биопроцене било је уобичајено да се хириномиде искључе из улазних база података, углавном због проблема идентификације. Такође, као проблем се наводи и висока природна варијабилност у тој групи, која обично превазилази ону индуковану антропогеним утицајем. У овој студији, велики део сезонске варијабилности је забележен током зиме, када је дошло до значајних промена у структури заједнице. И период високих вода је имао сличан ефекат на заједницу хириномида, надјачавши утицај свих осталих градијената (просторни и градијент нарушености станишта). Неки аутори препоручују искључивање зиме као периода узорковања из мониторинг програма због екстремних температурних услова и хидролошког режима (Gabriels et al., 2010) и због логистичких разлога (Šporka et al., 2006). Познато је да искључивање сезона из анализе структуре заједнице макроинвертебрата не може довести до значајнијих губитака информација за потребе мониторинга квалитета воде (Milošević et al., 2013). Чак је и Furse et al. (1984)

препоручио да три сезоне представљају задовољавајући број реплика, који обезбеђује довољно података за карактеризацију годишњег обрасца варирања заједнице макроинвертебрата. У оквиру програма мултиметричког AQEM система процене (AQEM, 2002), режим узорковања је развијен тако да испуни све захтеве Европске директиве о заштити вода. AQEM захтева да се приликом одређивања временске стратегије узорковања укључе бар две различите сезоне које ће дефинисати најповољнији период узорковања за одређену групу таксона. Имајући у виду велику разноликост у животном циклусу различитих група макроинвертебрата, различите сезоне су се показале повољним за одређене групе таксона. Због тога је RBP препоручио да се селекција одговарајуће сезоне узорковања синхронизује са сезонском варијабилношћу посматране групе макроинвертебрата. Такође се сматра да би селекција одговарајућег временског периода узорковања требало да доведе до минимализовања природне варијабилности између две суседне године, максимализовања ефикасности и брзине узорковања и повећања доступности циљне заједнице. И RBP протокол предлаже избегавање зимског периода за узорковање, упозоравајући на потешкоће приликом узорковања у условима екстремно ниских температура. Такве околности прилично успоравају рад на терену. Такође, током периода ниских температура бентос се налази дубље у супстрату, испод дела који је доступан за узорковање. RBP упозорава и да висок водостај током пролећних месеци, није одговарајући за временску стратегију узорковања рутинских мониторинг програма. Raunio & Muotka (2005) су нагласили потребу да се детерминише временски оквир у стратегији узорковања када је у питању фамилија хирономида и њихова имплементација у програме биопроцене. Аутори су резултатима показали да је потребно укључити три различите сезоне (пролеће, средину лета и касно лето/јесен) како би детектовали довољан сигнал из заједнице хирономида у бореалним рекама. Имајући све горе наведено на уму, и према презентованим резултатима у овој студији, може се предложити искључивање, како зимске сезоне, тако и периоде високих вода (обично рано пролеће) из мониторинг програма који прате квалитет акватичних екосистема умерених области. Главни циљ предложене мере је смањење унутаргрупне варијабилности фамилије хирономида. Друга солуција би била укључивање установљене варијабилности приликом постављања граничних вредности класа квалитета воде у формулацији индекса биопроцене.

С друге стране, у студији Rossaro et al. (2006) током зимске сезоне је забележено највеће богатство таксона, када је заједница хириномида била и најбројнија. Аутор наглашава да је ово најзначајнија сезона за фауну хириномида када је средински стрес (низак проток, стабилан водостај, висока транспарентност, велика абундантност алги (углавном *Vacillariophyta*)) најнижи и када се могу боље пратити и разумети везе између фауне хириномида и средине. Због тога се предлаже да зимска сезона буде обавезно укључена у даља еколошка истраживања хириномида. Ове тврдње су тачне када је реч о студијама биодиверзитета јер се неке врсте јављају само током зимских месеци. Међутим, за примену хириномида у рутинским мониторинг програмима, управо та сезона, када се значајно мења структура заједнице и јављају ретке врсте са ниском фреквенцијом чини заједницу хириномида „неупотребљивом“.

У оквиру AQEM пројекта формирана је листа таксона која садржи податке о аутекологији индивидуалних таксона (Hering et al., 2004). Од укупно 9.446 европских таксона макроинвертебрата доступних у бази, чак 1.250 таксона (распоређених у 189 родова) су представници фамилије Chironomidae (Brabec et al., 2007). Међутим, у оквиру толико велике групе таксона мало је информација доступно о аутекологији. На пример, у бази www.freshwaterecology.info, за чак 98,6% таксона нису доступне информације о сапробним валенцама. И за остале карактеристике недостаје значајна количина информација: лонгитудинална зонација (нема података за 62,2% таксона), афинитети према брзини тока (нема података за 70,8% таксона), афинитети према типовима микростаништа (нема података за 55,4% таксона), афинитети према типу исхране (нема података за 44,8% таксона) и тип кретања (нема података за 70,8% таксона). С обзиром да је ова база података основ за израчунавање свих метричких особина предвиђених AQEM програмом, разумљиво је зашто само неколико користи таксоне хириномида. То даље указује на потребу за више корисних студија које прате заједницу хириномида и аутекологију индикаторских таксона у различитим биогеографским регионима. Истраживачки пројекти као овај унапређују различите метричке особине, обезбеђујући детаљне информације о великом броју таксона у различитим условима станишта. Такође, нови приступ у припреми и публикавању идентификационих кључева, који поред таксономски описаних врста садрже и велики број информација о аутекологији таксона (Vallenduuk & Moller Pillot, 2007; Orendt & Spies, 2012), могу решити проблем мањка аутеколошких информација и олакшати процес компликоване идентификације.

Укључивање хирономида у тип-специфичне методе процене квалитета воде, што је предложено Оквирном директивом о водама, омогућило би брзу процену присуства различитих стресора, што би такође унапредило неке индексе који су већ деценијама широко у примени (индекси сапробности, BMWP скор и његове унапређене верзије (AQEM, 2002).

Сапробни индекси су широко у примени, а њихове предности и ограничења су већ добро познати. Према томе, проширење индикаторске листе укључивањем таксона хирономида био би обећавајући корак напред у процесу повећавања осетљивости саме методе. С друге стране, оригиналне и модификоване верзије BMWP скорова су већ део AQEM система у Републици Чешкој, Мађарској, Немачкој, Грчкој, Италији и Шведској. BMWP скор је такође део националног система процене Републике Словачке и Србије. Ове методе се базирају на употреби виших таксономских јединица (таксономске групе). Са одређеним унапређењем таксономске резолуције, чиме би се искључили одређени таксони из група који су већ у употреби, поузданост индекса би се унапредила (одвајање селектованих таксона хирономида и додељивање другачијих индикаторских вредности). Могућности примене BMWP скорa да процени еколошки статус различитих типова лотичких система је управо оно што препоручује WFD. Осим тога, BNBI индекс (**B**alka**N** **B**iotic **I**ndex; Simić & Simić, 1999), развијен да процени квалитет воде површинских водотокова Балканског полуострва, обећавајућа је основа, која уз укључивање хирономида може повећати своју дискриминациону снагу и осетљивост у процени еколошког статуса лотичких система. BNBI, индекс развијен да функционише не само на Балкану већ и у осталим областима, нуди могућност истовремене употребе података на различитим нивоима таксономске резолуције. Ова карактеристика индекса омогућава да приликом укључивања хирономида у анализу, таксономска резолуција индикаторских група буде различита и да се одређује на основу унутаргрупне варијабилности еколошких афинитета. BNBI је већ укључен у официјалне тип-специфичне методе процене еколошког статуса у Србији, а његова поузданост је добро тестирана. Све ово подржава став да би индекс требало да претрпи додатне адаптације (укључивање свих група макроинвертебрата) и нађе своју примену на ширем подручју.

5.5 Степен усаглашености података на таксономској скали

Резултати компаративне анализе различитих метричких особина на различитим таксономским нивоима су усаглашени са досадашњим студијама (Marshall et al., 2006; Raunio et al., 2007; Jones, 2008; Greffard et al., 2011). На основу свих резултата, усаглашеност на таксономској скали постоји, а њен степен опада са опадањем таксономске резолуције. Jones (2008) претпоставља да су главни фактори, одговорни за ефекат таксономске резолуције: богатство врста коју истраживана област подржава, таксономски детаљи (структура таксономског стабла), варијабилност еколошких афинитета која се јавља унутар група, величина области истраживања, што је повезано са вредностима диверзитета, метода узорковања, и коначно, прецизност сигнала који треба да буде детектован. Чини се да су скоро сви наведени фактори директно одговорни за резултате добијене у овој студији.

Веома висока позитивна корелација индекса диверзитета, различитих таксономских нивоа, може бити објашњена таксономским детаљима у оквиру фамилије Chironomidae (Jones, 2008). Прецизније, уједначеност дистрибуције таксона дуж хиерархијског таксономског стабла је главни фактор који снажно мења степен корелације између различитих таксономских нивоа (врста-род-потфамилија). С обзиром да је у бази података, овог истраживања, већина родова представљена само једном врстом, а да само 8 има више од две врсте, разумљиво је зашто је губитак информација у процени индекса диверзитета на нивоу рода миноран. С друге стране, величина корелације драматично опада између нивоа врсте и потфамилије, што се објашњава великим разликама у таксономским детаљима (структури таксономског стабла). Неједнака дистрибуција таксона по потфамилијама снажно утиче на усаглашеност индекса, посебно Shannon Winner-овог и Simpson-овог индекса, који су у овој студији показали ниске вредности корелационих коефицијената, без статистичке значајности. Овако ниска корелација у случају Shannon Winner-а и Simpson-а се може објаснити “*Wu* ефектом” (Wu, 1982). У тој студији су локалитети, ранжирани на основу индекса диверзитета, показивали различите ординационе шеме у зависности од таксономског нивоа. Wu (1982) је нагласио да су индекси који садрже информације о еквитабилности, дистрибуцији јединки по врстама (Shannon Winner и Simpson), посебно осетљиви на промену таксономске резолуције. Степен грешке, приликом процене диверзитета на нижој таксономској резолуцији је био виши у случају високих вредности еквитабилности. Једина могућност да се избегне грешка приликом процене

диверзитета са ниском таксономском резолуцијом јесте да сви тест узорци имају исти број врста и идентичну дистрибуцију јединки по врстама, што је мало вероватно.

Ефекат таксономске резолуције је показао сличан образац у случају ординационих и класификационих процеса на основу података о заједници хириномида. Као што се и очекивало карактеристичан образац заједнице хириномида, детерминисан до нивоа врсте, раздвојио је локалитете дуж просторних и временских градијената (Milošević et al., 2013). Слично томе, заједница хириномида детерминисана до нивоа рода, успешно је апроксимирала ординацију са ниским нивоом девијације, што је такође потврђено другим студијама (Ruse, 2002; Raunio et al., 2007). Вредности класификационе снаге (CS) су биле сличне на нивоу врсте и рода, индикујући да класификација, базирана на подацима на таксономском нивоу рода, покрива варијабилност заједнице скоро на исти начин као и подаци детерминисани до таксономског нивоа врсте. Међутим, то није био случај са подацима на нивоу потфамилије, који су показивали другачије резултате класификационих и ординационих процеса. Висок степен девијације и ниске вредности CS методе индикују да таксономски ниво потфамилије није довољна таксономска резолуција која би, без значајнијег губитка информација, представила варијабилност заједнице хириномида. Неопходно је поменути да упркос постојању просторног и временског обрасца на нивоу потфамилије (Helson et al., 2006), СОМ анализом се није добио такав образац. Са друге стране, поклапање је ипак постојало, и то везано за групу Б, где је чак 75% присутних локалитета такође припадало групи Б на СОМ мапи, формираној на основу података детерминисаних до нивоа врсте. Групу Б у оба случаја карактеришу локалитети узорковани током пролећних месеци, када је био забележен период високих вода. Овакви услови средине доводе до озбиљних промена у структури заједнице смањујући диверзитет на свим узоркованим локалитетима током овог периода. Све то последично доводи до појаве заједница са поједностављеним таксономским детаљима. Само под таквим условима је апроксимација структуре на нивоу потфамилије исправна. Генерално, разлози слабе процене структуре заједнице помоћу таксономског нивоа потфамилије је вероватно изазван великим диверзитетом фамилије хириномида (Ferrington, 2008). Hawkins & Norris (2000) тврде да су фамилије са високим бројем врста током адаптивне радиације обликовали широк опсег различитих еколошких профила у оквиру група (фамилија). Због тога је ниска резолуција, као што је ниво потфамилије недовољна и води ка губитку велике количине података. Ово је снажан

аргумент против метода биопроене, које се ослањају на грубу таксономску резолуцију заједнице хириномида (фамилија или потфамилија) (Hilsenhoff, 1982; Armitage et al., 1983; Pauw & Vanhooren, 1983; Metcalfe, 1989; Wright et al., 1998).

Кључни средински параметри који објашњавају структуру заједнице хириномида су већ документовани у доступној литератури (Calle-Martínez & Casas, 2009; Puntí et al., 2009). Исти модел се појављује када се анализирају подаци о заједници детерминисаној до нивоа рода, што говори да је већина родова састављена од врста које на исти начин реагују на срединске факторе. Heino (2008) је показао да су односи заједнице и срединских параметара имуни на ефекат промене таксономске резолуције и да је усаглашеност веома висока чак и на нивоу фамилије. Међутим, резултати студије у сливу Јужне Мораве, на нивоу потфамилије показују непостојање везе између заједнице хириномида и композиције срединских параметара. Heino (2008) објашњава тако снажну усаглашеност података на два различита таксономска нивоа (врста и фамилија) са регионалним разликама у фауни макроинвертебрата када је дискутовао да су бореални региони карактеризовани сиромашним диверзитетом, што вероватно онемогућава развој велике аутоколошке варијабилности у оквиру групе. У нашем истраживању усаглашеност се јавља само на таксономском нивоу рода. Ово је додатна потврда већ поменутих аргумената да је таксономски ниво потфамилије лош сурогат који прикрива информације корисне за програме биопроене.

Коначно, IndVal анализа је омогућила да се идентификују таксони који генеришу варијабилност унутар групе и умањују усаглашеност база података на нивоу врсте и рода. Ова анализа је излистала индикаторске врсте и родове за све три групе локалитета у којима квалитет воде постепено опада (од групе А, са највећим квалитетом до групе Ц са најмањим квалитетом воде; Табела 15.). На вишем таксономском нивоу, већина индикаторских родова, који су претходно представљени у листи индикаторских врста, повећава своју индикаторску вредност, али са нешто нижом статистичком значајношћу. Ово може бити објашњено чињеницом да на нивоу рода, због пада мултидимензионалности расте фреквентност посматраних таксона, где могућност одсуства неке врсте, због њене временске варијабилности постаје мало вероватна. У исто време, виша таксономска резолуција укључује врсте са различитим еколошким афинитетима, што увећава количину варијабилности. Последица је да, када се неки таксон представи као индикатор на нивоу рода, приказује ниже индикаторске вредности у поређењу са врстама индикаторима тог рода. У овој студији род *Tvetenia*

чине три врсте са супротним еколошким афинитетима (Слика 9.). Такође, неки родови се појављују истовремено као индикаторске врсте за више група локалитета (на пример, *Rheocricotopus*, *Eukiefferiella*, *Cricotopus*). На вишем таксономском нивоу ови родови или нестају са листе индикатора или представљају неку од група локалитета у зависности који од еколошких профила доминира унутар рода. У том случају, род *Rheocricotopus* и *Eukiefferiella* су изгубиле своје индикаторске карактеристике, док је род *Cricotopus* постао индикатор веома загађених локалитета. Све ове разлике изазване таксономском резолуцијом указују да се индикаторска снага мења у зависности од таксономских детаља група. На основу презентованих резултата, неопходно је спровести даља истраживања која би тестирала унутаргрупну варијабилност свих потенцијалних индикаторских таксона на нивоу рода и дефинисала поуздане таксоне који нису значајно под утицајем таксономске резолуције.

6. Закључак

На основу резултата спроведеног истраживања може се закључити:

- Фамилија Chironomidae представља значајну компоненту заједнице макробескичмењака, како по броју врста, тако и у односу на густину заједнице. Њихова константност и доминантност, поготово на локалитетима на којима се бележи антропогени утицај, чине ову групу неопходним биолошким елементом у анализи еколошког статуса лотичких система.
- Слатководни екосистеми Србије не представљају изузетак у односу на значај представника фамилије Chironomidae. Познато је да је подручје Балкана, па и Србије, због географског положаја, карактеристика рељефа и (палео)историјског развоја фауне, један од центара биолошке разноврсности инсеката европског континента, укључујући и фамилију Chironomidae.
- У проучавању ове фамилије инсеката у Србији постоји дужи застој. Истраживања приказана у овој дисертацији представљају прва детаљна истраживања у Србији након више од три деценије. У раду је детаљно разматрана просторна и временска променљивост заједница хирономида слива Лужне Мораве. Имајући у виду недостатак новијих података о овој фамилији двокрилаца, обим истраживања, као и положај и величину истраживаног слива, ова студија представља допринос општем познавању фауне и екологије акватичних инсеката, пружајући додатне информације о биодиверзитету Србије, Балкана и Европе.
- Метода самоорганизујућих мрежа (COM) показала се као ефикасна процедура за визуализацију просторних и временских образаца заједнице хирономида, која је

у стању да детектује и нелинеарну зависност, успешно моделујући променљиве са великим бројем реплика. Истовремена презентација вишедимензионалних активних променљивих, и пасивно увежених променљивих на истом дводимензионалном графикону (СОМ мрежа) омогућава анализу степена повезаности биотичких и абиотичких компоненти. Овај мултиваријантни приступ обезбеђује не само информације о разликама и сличностима анализираних ентитета већ и информације о томе које променљиве, то јест који таксони су одговорни за резултате ординације и класификације. Због адекватне природе података за овакву методу, долази се до закључка да се СОМ може применити и за анализу осталих група акватичних макроинвертебрата.

- У оквиру фамилије Chironomidae забележено је постојање просторног и временског обрасца на сливу Јужне Мораве. Лонгитудинална зонација снажно утиче на распрострањење врста дуж водотокова и у највећој мери је под утицајем градијента надморске висине. Врсте из потфамилије Chironominae и Tanypodinae, регистроване током овог истраживања, показале су временску варијабилност са максималним средњим рангом у јулу и августу (осим *Polypedilum convictum*), представљајући летње форме, док Orthoclaadiinae и Diamesinae представљају зимске форме у оквиру заједнице хирономида. Највећа природна сезонска варијабилност забележена је у оквиру рода *Orthocladius*, који припада зимским таксонима и чија густина популација и фреквентност значајно расте током зимске сезоне. Оваква појава може довести до погрешних закључака у тумачењу просторног дистрибуционог обрасца заједнице хирономида, умањујући њихову тачност у процени степена антропогеног утицаја. Промене у водостају река су један од најважнијих параметара одговорних за промене у композицији врста фамилије Chironomidae и морају се узети у обзир приликом формулисања мониторинг програма.
- Ларве хирономида су и значајан типолошки параметар, с обзиром на висок степен корелације срединских фактора који се мењају дуж водотокова са параметрима заједнице. Надморска висина и везани параметри су, према овој студији, као и према ранијим подацима, најзначајнија група дескриптора који одређују дистрибуцију заједнице хирономида. Од укупно 15 срединских параметара, анализе су показале да 10 (надморска висина, ширина, температура, електрична проводљивост, мутноћа/турбидитет, брзина воде, тврдоћа, NO₃-N,

PO₄-P и БПК₅) значајно утиче на структуру заједнице хирономида. Концентрација кисеоника и сатурација (DOmg/l и DO%) су такође повезане са таксономском композицијом фамилије хирономида, али је детектована веза сезонски варијабилна и опада током зимских месеци. Антропогени утицај, рефлектован концентрацијом нитрата, фосфата и БПК₅, може такође значајно да мења композицију заједнице и њену бројност.

- Према овим истраживањима, врсте *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg. и *Rheocricotopus chalybeatus* су се показале као ефикасни индикатори органског загађења, због њиховог присуства на свим локалитетима, без обзира на варијације у већем броју срединских фактора, посебно температуре воде.
- Анализом таксономских индекса диверзитета ($\Delta+$ и $\lambda+$) утврђено је да су њихова дискриминациона снага и осетљивост на промене у варијаблама окружења под великим утицајем диверзитета на вишим таксономским нивоима. Због тога индекс таксономске различитости може успешно одвајати референтне локалитете од нарушених, само уколико се у анализу укључе све диверзитетне групе у оквиру заједнице макроинвертебрата. У том случају, фамилија хирономида није довољна за израчунавање вредности индекса таксономске различитости, али је незаобилазна у том процесу. Линеарна веза $\Delta+$ индекса са градијентом квалитета воде отвара могућност за формирање метричке особине, независне од методе узорковања, и њено укључивање у већ постојеће мултиметричке мониторинг програме. Поред тога, и остали традиционални индекси диверзитета, употребљени на заједници хирономида, високо су корелисани са променом квалитета воде. Применом неког од наведених индекса диверзитета, могуће је верно проценити еколошки статус акватичних екосистема.
- На основу резултата ових истраживања, све тестиране метричке особине, које се најчешће користе у мониторинг програмима, неосетљиве су на утицај таксономске скале од нивоа врсте до нивоа рода. Према томе, ниво рода је задовољавајућа таксономска резолуција за примену хирономида у методама биопроцене, што може да олакша проблем идентификације, који се наводи као најважнији у процесу имплементације макроинвертебрата, посебно ларви хирономида.

- У овој студији анализиран је један велики речни слив, који се одликује присуством различитих типова текућих вода. Додатно, присутни су сектори водотокова који су под различитим типом и интензитетом антропогеног притиска, од референтних локалитета и оних који су под незнатним утицајем човека, па све до система који су под утицајем значајног органског загађења или хидроморфолошке деградације. Стога се резултати ове студије могу применити и на шире подручје, али са извесним ограничењем. За поуздану примену закључака ових истраживања на широк простор (Балкан или југоисточну Европу), у погледу идентификације поузданог таксономског нивоа и анализу унутаргрупне варијабилности, као и еколошког афинитета појединих таксона, потребно је извршити истраживање на већем подручју. Овакве прелиминарне анализе би биле неопходан корак, приликом примене заједнице хирономида у мониторинг програму ширег подручја, који би допринео процени таксономске структуре фамилије хирономида, а самим тим и њене задовољавајуће таксономске резолуције.
- Коначно, према претходним студијама (Raunio et al., 2011) и према резултатима студије на сливу Јужне Мораве, фамилија Chironomidae је једна од најразноврснијих и најабундантнијих фамилија акватичних инвертебрата, представљајући есенцијалну групу у процени интегритета акватичних екосистема. Њихово могуће искључивање из програма биопроцене може довести до озбиљних грешака у процени биодиверзитета, а самим тим и до погрешних процена еколошког статуса лотичких екосистема. С друге стране, коришћење хирономида у тип- и стресор-специфичним методама процене еколошког статуса омогућило би брзу процену присуства стрес фактора, што води ка унапређењу различитих биолошких индекса. На основу резултата студије, приликом укључивања хирономида у методе биопроцене неопходно је прилагодити дизајн узорковања како би се минимизирала природна променљивост, а таксономску резолуцију максимално смањити до нивоа рода. Искључивање зимске сезоне и периода високих вода (обично рано пролеће) као примарних извора природне варијабилности у оквиру заједнице хирономида, из програма биопроцене у лотичким системима умерених области може допринети побољшању тачности процене квалитета воде и еколошког статуса станишта.

7. Референце

- Abellán P, Bilton D, Millán A, Sánchez-Fernández D, Ramsay P. Can taxonomic distinctness assess anthropogenic impacts in inland waters? A case study from a Mediterranean river basin. *Freshwater Biology*. 2006;51(9):1744-1756.
- Apha. Standard methods for the Examination of water and wastewater, 9th, American Public Helth Association, Washington, DC.1999.
- Aqem. Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. *Contract No: EVK1-CT1999-00027*). 2002.
- Armitage P, Cranston P, Pinder L. The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges, Chapman and Hall, London.1995.
- Armitage P, Moss D, Wright J, Furse M. The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water research*. 1983;17(3):333-347.
- Bailey RC, Norris RH, Reynoldson TB. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *Journal of the North American Benthological Society*. 2011;20:280-286.
- Barbour M, Gerritsen J, Griffith G, Frydenborg R, Mccarron E, White J, Bastian M. A framework for biological criteria for Florida streams using benthic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*. 1996;185-211.
- Barbour MT, Gerritsen J, Snyder B, Stribling J. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers. *USEPA, Washington*. 1999.
- Bazzanti M. Ecological requirements of chironomids (Diptera: Chironomidae) on the soft bottom of the river Arrone, Central Italy. *Journal of Freshwater Ecology*. 2000;15(3):397-409.
- Bazzanti M, Seminara M, Baldoni S. Chironomids (Diptera: Chironomidae) from three temporary ponds of different wet phase duration in central Italy. *Journal of Freshwater Ecology*. 1997;12(1):89-99.
- Berg, M, Hellenthal, R. Data variability and the use of Chironomids in environmental studies: the standard error of the midge. In: Davis WS (Eds.), *Proceedings of the 1990 Midwest Pollution Control Biologists Meeting*. U.S. Environtonmental Protection Agency Region V, Environmental Sciences Division, Chicago. 1990;pp.1-8.
- Bhat A, Magurran A. Taxonomic distinctness in a linear system: a test using a tropical freshwater fish assemblage. *Ecography*. 2006;29(1):104-110.

- Blaženčić J, Stevanović V, Vasić V. Biodiverzitet Jugoslavije: sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja, Ecolibri, Beograd.1995.
- Brabec K, Janecsek B, Rossaro B, Spies M, Bitusik P, Syrovatka V, Schmidt-Kloiber A 2007. Chironomidae indicator database. Euro-limpacs projects, workpackage 7-indicators of ecosystem health, task4.
- Calle-Martínez D, Casas JJ. Chironomid species, stream classification, and water-quality assessment: the case of 2 Iberian Mediterranean mountain regions. *Journal of North American Benthological Society*. 2009;25:465-476.
- Carter J, Resh V, Hannaford M, Myers M. Macroinvertebrates as biotic indicators of environmental quality. In: Hauer F, Lamberti G (Eds.), *Methods in stream ecology*. Academic Press, Amsterdam. 2006;pp. 805-833.
- Casas J, Vilchez-Quero A. Altitudinal distribution of lotic chironomid (Diptera) communities in the Sierra Nevada mountains (Southern Spain). *Annales de Limnologie* 1993;29:157-187.
- Céréghino R, Park YS. Review of the Self-Organizing Map (SOM) approach in water resources: Commentary. *Environmental Modelling & Software*. 2009;24(8):945-947.
- Chessman BC. New sensitivity grades for Australian river macroinvertebrates. *Marine and Freshwater Research*. 2003;54(2):95-103.
- Chon T. Self-organizing maps applied to ecological sciences. *Ecological Informatics*. 2011;6(1):50-61.
- Chon TS, Park YS, Moon KH, Cha EY. Patternizing communities by using an artificial neural network. *Ecological modelling*. 1996;90(1):69-78.
- Chon TS, Park YS, Park JH. Determining temporal pattern of community dynamics by using unsupervised learning algorithms. *Ecological modelling*. 2000;132(1):151-166.
- Clarke K, Ainsworth M. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology-Progress Series*. 1993;92:205-205.
- Clarke K, Gorley R. PRIMER v6: user manual/tutorial.,(PRIMER-E Ltd: Plymouth, UK).2006.
- Clarke K, Warwick R. A taxonomic distinctness index and its statistical properties. *Journal of Applied Ecology*. 1998;35(4):523-531.
- Clarke K, Warwick R. The taxonomic distinctness measure of biodiversity: weighting of step lengths between hierarchical levels. *Marine Ecology Progress Series*. 1999;18:421-29.

- Clarke K, Warwick R. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd ed. PRIMER-E, Ltd., Plymouth, United Kingdom. 2001a.
- Clarke K, Warwick R. A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Marine Ecology Progress Series*. 2001b;216:265-278.
- Coffman W. Factors that determine the species richness of lotic communities of Chironomidae. *Acta Biologica Debrecina, Supplementum Oecologica Hungarica*. 1989;395-100.
- Coffman Wp. Conclusions. In: Armitage Pd, Cranston Pj, Pinder Lcv (Eds.), *The chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges*. Chapman & Hall, London. 1995;pp. 436-447.
- Consortium A. Manual for the application of the AQEM system. *A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Ver. 1.0*. 2002;202.
- Danks H. Overwintering of some north temperate and Arctic Chironomidae: II. Chironomid biology. *The Canadian Entomologist*. 1971;103(12):1875-1910.
- Dash M. Fundamentals of ecology, Tata McGraw-Hill Education, New Delhi. 2001.
- De-La-Ossa-Carretero J, Simboura N, Del-Pilar-Ruso Y, Pancucci-Papadopoulou M, Giménez-Casalduero F, Sánchez-Lizaso J. A methodology for applying Taxonomic Sufficiency and benthic biotic indices in two Mediterranean areas. *Ecological Indicators*. 2012;23:232-241.
- De Biasi A, Bianchi C, Morri C. Analysis of macrobenthic communities at different taxonomic levels: an example from an estuarine environment in the Ligurian Sea (NW Mediterranean). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2003;58(1):99-106.
- De Bisthoven L, Gerhardt A, Soares AM. Chironomidae larvae as bioindicators of an acid mine drainage in Portugal. *Hydrobiologia*. 2005;532(1):181-191.
- Diggins T, Stewart K. Chironomid deformities, benthic community composition, and trace elements in the Buffalo River (New York) Area of Concern. *Journal of the North American Benthological Society*. 1998;311-323.
- Dufrêne M, Legendre P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological monographs*. 1997;67(3):345-366.
- Edward D, Storey A, Smith M. Assessing river health in south-western Australia: comparison of macroinvertebrates at family level with Chironomidae at species level. *Verh. Int.*

- Ver. Theor. Angew. Limnol./Proc. Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol./Trav. Assoc. Int. Limnol. Theor. Appl.* 2001;27(4):2326-2335.
- Everitt B, Landau S, Leese M. Cluster analysis. 4th Edition, Oxford University Press, Inc., New York.2001.
- Ferraro SP, Cole FA. Taxonomic Level Sufficient for Assessing a Moderate Impact on Macroinvertebrate Communities in Puget Sounds Washington, USA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 1992;49(6):1184-1188.
- Ferrington LC. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. *Hydrobiologia.* 2008;595(1):447-455.
- Ferrington LC, Buzby K, Masteller E. Composition and temporal abundance of Chironomidae emergence from a tropical rainforest stream at El Verde, Puerto Rico. *Journal of the Kansas Entomological Society.* 1993;66:167-180.
- Franquet E. Chironomid assemblage of a Lower-Rhône dike field: relationships between substratum and biodiversity. *Hydrobiologia.* 1999;397:121-131.
- Furse M, Moss D, Wright J, Armitage P. The influence of seasonal and taxonomic factors on the ordination and classification of running-water sites in Great Britain and on the prediction of their macro-invertebrate communities. *Freshwater Biology.* 1984;14(3):257-280.
- Gabriels W, Lock K, De Pauw N, Goethals P. Multimetric Macroinvertebrate Index Flanders (MMIF) for biological assessment of rivers and lakes in Flanders (Belgium). *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters.* 2010;40(3):199-207.
- García P, Añón Suárez D. Community structure and phenology of chironomids (Insecta: Chironomidae) in a Patagonian Andean stream. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters.* 2007;37(1):109-117.
- García X, Laville H. First inventory and faunistic particularities of the chironomid population from a 6th order section of the sandy River Loire (France). *Archiv für Hydrobiologie.* 2000;147(4):465-484.
- Gavrilović L, Dukić D. Reke Srbije, Zavod za udzbenike i nastavna sredstva, Beograd.2002.
- Greffard M, Saulnier-Talbot É, Gregory-Eaves I. A comparative analysis of fine versus coarse taxonomic resolution in benthic chironomid community analyses. *Ecological Indicators.* 2011;11(6):1541-1551.

- Grodhaus G. Aestivating chironomid larvae associated with vernal pools. In: Murray D (Ed.) *Chironomidae. Ecology, systematics, cytology and physiology*. Pergamon Press, New York. 1980;pp. 315-322.
- Groenendijk D, Van Opzeeland B, Dionisio Pires L, Postma J. Fluctuating life-history parameters indicating temporal variability in metal adaptation in riverine chironomids. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 1999;37(2):175-181.
- Grzybkowska M, Temech A, Dukowska M. Impact of long-term alternations of discharge and spate on the chironomid community in the lowland Widawka River (Central Poland). *Hydrobiologia*. 1996;324(2):107-115.
- Hawkins C, Norris R. Effects of taxonomic resolution and use of subsets of the fauna on the performance of RIVPACS-type models. In: Wright J, Sutcliffe D, Furse M (Eds.), *Assessing the biological quality of fresh waters: RIVPACS and other techniques*. . Freshwater Biological Association, Ambleside, UK. 2000;pp. 217-228.
- Hawkins C, Norris R, Hogue N, Feminella W. Development and evaluation of predictive models for measuring the biological integrity of streams. *Ecological Applications*. 2000;10:1456-1477.
- Heino J. Influence of taxonomic resolution and data transformation on biotic matrix concordance and assemblage-environment relationships in stream macroinvertebrates. *Boreal Environment Research*. 2008;13(4):359-369.
- Heino J. Are indicator groups and cross-taxon congruence useful for predicting biodiversity in aquatic ecosystems? *Ecological Indicators*. 2010;10(2):112-117.
- Heino J, Myrka H, Hamalainen H, Aroviita J, Muotka T. Responses of taxonomic distinctness and species diversity indices to anthropogenic impacts and natural environmental gradients in stream macroinvertebrates. *Freshwater Biology*. 2007;52(9):1846-1861.
- Heino J, Soininen J, Lappalainen J, Virtanen R. The relationship between species richness and taxonomic distinctness in freshwater organisms. *Limnology and Oceanography*. 2005;50(3):978-986.
- Heino J, Tolonen K, Kotanen J, Paasivirta L. Indicator groups and congruence of assemblage similarity, species richness and environmental relationships in littoral macroinvertebrates. *Biodiversity and Conservation*. 2009;18(12):3085-3098.
- Helson J, Williams D, Turner D. Larval chironomid community organization in four tropical rivers: human impacts and longitudinal zonation. *Hydrobiologia*. 2006;559(1):413-431.

- Hering D, Feld C, Moog O, Ofenböck T. Cook book for the development of a Multimetric Index for biological condition of aquatic ecosystems: experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia*. 2006;566(1):311-324.
- Hering D, Moog O, Sandin L, Verdonschot P. Overview and application of the AQEM assessment system. *Hydrobiologia*. 2004;516(1-3):1-20.
- Hewlett R. Implications of taxonomic resolution and sample habitat for stream classification at a broad geographic scale. *Journal of the North American Benthological Society*. 2000;19(2):352-361.
- Hilsenhoff W. Use of arthropods to evaluate water quality of streams, Wisconsin Department of Natural Resources. 1977.
- Hilsenhoff W. Using a biotic index to evaluate water quality in streams, Department of Natural Resources Madison, Wisconsin. 1982.
- Hirabayashi K, Wotton R. Organic matter processing by chironomid larvae (Diptera: Chironomidae). *Hydrobiologia*. 1998;382(1):151-159.
- Jain A, Dubes R. Algorithms for clustering data, Prentice-Hall, Inc. 1988.
- Janković M. Anzahl der Generationen der Art Chironomus plumosus in den Karpfenteichen Serbiens. *Limnologica*. 1971;8:203-210.
- Janković M. Communities of Chironomid larvae in the Velika Morava river. *Hydrobiologia*. 1979;64(2):167-173.
- Janković M. The Fauna of Chironomids in the Catchment area of the River Batlava. *Proceedings on the fauna of SR Serbia*. 1980;11:7-29.
- Janković M. Chironomid larvae as bioindicators of the organic pollution. *Proceedings on the fauna of SR Serbia*. 1982.
- Janković M. The study of Chironomidae (Diptera) in the drainage system of the river Veliki pek. *Proceedings on the fauna of SR Serbia* 1983;2:55-147.
- Janković M. The investigation of the chironomid fauna in the South Morava and its components rivers. *Proceedings on the Fauna of SR Serbia*. 1985;3:71-110.
- Janssens De Bisthoven L, Gerhardt A. Chironomidae (Diptera, Nematocera) fauna in three small streams of Skania, Sweden. *Environmental monitoring and assessment*. 2003;83(1):89-102.

- Jernelöv A, Nagell B, Svenson A. Adaptation to an acid environment in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from Smoking Hills, NWT, Canada. *Ecography*. 1981;4(2):116-119.
- Jiang X, Xiong J, Song Z, Morse J, Jones FC, Xie Z. Is coarse taxonomy sufficient for detecting macroinvertebrate patterns in floodplain lakes? *Ecological Indicators*. 2013;27:48-55.
- Jones F. Taxonomic sufficiency: the influence of taxonomic resolution on freshwater bioassessments using benthic macroinvertebrates. *Environmental Reviews*. 2008;16:45-69.
- Jones R, Grey J. Stable isotope analysis of chironomid larvae from some Finnish forest lakes indicates dietary contribution from biogenic methane. *Boreal Environment Research*. 2004;9(1):17-24.
- Kalteh AM, Berndtsson R. Interpolating monthly precipitation by self-organizing map (SOM) and multilayer perceptron (MLP). *Hydrological Sciences Journal*. 2007;52(2):305-317.
- Karadžić B, Marinković S. Kvantitativna ekologija, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd.2009.
- Kerans B, Karr JR. A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecological Applications*. 1994;4(4):768-785.
- King R, Richardson C. Evaluating subsampling approaches and macroinvertebrate taxonomic resolution for wetland bioassessment. *Journal of the North American Benthological Society*. 2002;21(1):150-171.
- Kohonen T. Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biological cybernetics*. 1982;43(1):59-69.
- Koperski P. Reduced diversity and stability of chironomid assemblages (Chironomidae, Diptera) as the effect of moderate stream degradation. *Polish Journal of Ecology*. 2009;57(1):125-138.
- Koperski P. Diversity of macrobenthos in lowland streams: ecological determinants and taxonomic specificity. *Journal of Limnology*. 2010;69(1):88-101.
- Langton P, Casas J. Changes in chironomid assemblage composition in two Mediterranean mountain streams over a period of extreme hydrological conditions. *Hydrobiologia*. 1998;390(1):37-49.

- Lenat D. Chironomid taxa richness: natural variation and use in pollution assessment. *Freshwater Invertebrate Biology*. 1983;2:192-198.
- Lenat D, Resh V. Taxonomy and stream ecology: the benefits of genus-and species-level identifications. *Journal of the North American Benthological Society*. 2001;20(2):287-298.
- Lencioni V, Rossaro B. Microdistribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) in Alpine streams: an autoecological perspective. *Hydrobiologia*. 2005;533(1):61-76.
- Lindegaard C, Brodersen K, Cranston P. Distribution of Chironomidae (Diptera) in the river continuum, CSIRO Melbourne, Australia. 1995.
- Lobinske RJ, Ali A, Stout IJ. Qualitative and quantitative studies on Chironomidae (Diptera) and selected physico-chemical parameters in two tributaries of the Wekiva River, central Florida. *Florida Entomologist*. 1996;79(4):531-542.
- Magurran A. Measuring biological diversity, Blackwell, Oxford, United Kingdom. 2004.
- Marchant R. The use of taxonomic distinctness to assess environmental disturbance of insect communities from running water. *Freshwater Biology*. 2007;52(8):1634-1645.
- Marshall J, Steward A, Harch B. Taxonomic resolution and quantification of freshwater macroinvertebrate samples from an Australian dryland river: the benefits and costs of using species abundance data. *Hydrobiologia*. 2006;572(1):171-194.
- Marziali L, Armanini D, Cazzola M, Erba S, Toppi E, Buffagni A, Rossaro B. Responses of Chironomid larvae (insecta, Diptera) to ecological quality in Mediterranean river mesohabitats (South Italy). *River Research and Applications*. 2010;26(8):1036-1051.
- Mccune B, Mefford M. PC-ORD: multivariate analysis of ecological data. Version 4 for Windows (User's Guide), MjM Software Design. 1999.
- Melo A. Effects of taxonomic and numeric resolution on the ability to detect ecological patterns at a local scale using stream macroinvertebrates. *Archiv für Hydrobiologie*. 2005;164(3):309-323.
- Metcalfe J. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental pollution*. 1989;60(1):101-139.
- Metzeling L, Perriss S, Robinson D. Can the detection of salinity and habitat simplification gradients using rapid bioassessment of benthic invertebrates be improved through finer taxonomic resolution or alternative indices? *Hydrobiologia*. 2006;572(1):235-252.

- Milošević D, Simić V, Stojković M, Čerba D, Mančev D, Petrović A, Paunović M. Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: toward the use of non-biting midges in bioassessment programs. *Aquatic Ecology*. 2013;47(1):37-55.
- Milošević D, Simić V, Stojković M, Živić I. Chironomid faunal composition represented by taxonomic distinctness index reveals environmental change in a lotic system over three decades. *Hydrobiologia*. 2012;683(1):69-82.
- Moller Pillot H. De larven der Nederlandse Chironomiae (Diptera). 1A: Inleiding, Tanypodinae en Chironomini, St. E.I.S Nederland, Leiden.1984a.
- Moller Pillot H. De larven der Nederlandse Chironomiae (Diptera). 1B: Orthoclaadiinae sensu lato, St. E.I.S Nederland, Leiden.1984b.
- Moller Pillot H. Chironomidae larvae. Biology and ecology of the Chironomini, KNNV Publishing, Zeist.2009.
- Moller Pillot H. Chironomidae larvae of the Netherlands and adjacent lowlands. Biology and ecology of the aquatic Orthoclaadiinae - Prodiamesinae - Diamesinae - Buchonomyiinae - Podonominae - Telmatogetonina, KNNV Publ, Zeist.2013.
- Nijboer R, Park Y, Lek S, Verdonschot P. Comparison of clustering and ordination methods implemented to the full and partial data of benthic macroinvertebrate communities in streams and channels. In: Nijboer R (Ed.) *The myth of communities: determining ecological quality of surface waters using macroinvertebrate community patterns*. Alteterra, Wageningen. 2005;pp. 105.
- Nolte U. Egg masses of Chironomidae (Diptera): a review, including new observations and a preliminary key. *Scandinavian Entomology Limited*. 1993;4:35-75.
- Olafsson J, Paterson D. Alteration of biogenic structure and physical properties by tube-building chironomid larvae in cohesive sediments. *Aquatic Ecology*. 2004;38(2):219-229.
- Orendt C. Die Chironomidenfauna des Inns bei Mühldorf (Oberbayern). *Lauterbornia*. 2002;44:109-120.
- Orendt C, Spies M. Chironomini (Diptera: Chironomidae: Chironominae). Keys to Central European larvae using mainly macroscopic characters, Leipzig.2012.
- Paasavirta L. The macrozoobenthos studies in the upper part of the Vanajavesi catchment area in the years of 1985 and 1988, with a comparison to earlier data. *Ass. Wat. Poll. Control (the Kokemaenjoki river) Publ*. 1990;225:1-24.

- Park Y, Céréghino R, Compin A, Lek S. Applications of artificial neural networks for patterning and predicting aquatic insect species richness in running waters. *Ecological Modelling*. 2003;160(3):265-280.
- Park Y, Chon T, Kwak I, Lek S. Hierarchical community classification and assessment of aquatic ecosystems using artificial neural networks. *Science of the Total Environment*. 2004;327(1):105-122.
- Paunović M, Simić V, Simić S, Vuković D, Petrović A, Vasiljević B, Zorić K, Tomović J, Atanacković A, Marković V. Biological Quality Elements in WFD implementation in Serbia – typology, reference conditions and ecological status class boundaries. Technical Report, Contracts No. 01-772, Institute for Biological Research „Siniša Stanković“, Beograd.2011.
- Pauw N, Vanhooren G. Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia*. 1983;100(1):153-168.
- Penczak T. Fish assemblage compositions after implementation of the IndVal method on the Narew River system. *Ecological modelling*. 2009;220(3):419-423.
- Penczak T, Głowacki Ł, Kruk A, Galicka W. Implementation of a self-organizing map for investigation of impoundment impact on fish assemblages in a large, lowland river: Long-term study. *Ecological modelling*. 2012;227:64-71.
- Penczak T, Kruk A, Grzybkowska M, Dukowska M. Patterning of impoundment impact on chironomid assemblages and their environment with use of the self-organizing map (SOM). *Acta Oecologica*. 2006;30(3):312-321.
- Péry A, Mons R, Garric J. Energy-based modeling to study population growth rate and production for the midge *Chironomus riparius* in ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology*. 2004;13(7):647-656.
- Pinder L. The habitats of chironomid larvae. In: Armitage P, Cranston P, Pinder L (Eds.), *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Chapman and Hall, London. 1995;pp. 107-135.
- Puntí T, Rieradevall M, Prat N. Environmental factors, spatial variation, and specific requirements of Chironomidae in Mediterranean reference streams. *Journal of North American Benthological Society*. 2009;28:247-265.
- Rabeni C, Wang N. Bioassessment of streams using macroinvertebrates: are the chironomidae necessary? *Environmental Monitoring and Assessment*. 2001;71(2):177-185.

- Raunio J, Heino J, Paasivirta L. Non-biting midges in biodiversity conservation and environmental assessment: findings from boreal freshwater ecosystems. *Ecological Indicators*. 2011;11(5):1057-1064.
- Raunio J, Muotka T. The use of chironomid pupal exuviae in river biomonitoring: the importance of sampling strategy. *Archiv für Hydrobiologie*. 2005;164(4):529-545.
- Raunio J, Paavola R, Muotka T. Effects of emergence phenology, taxa tolerances and taxonomic resolution on the use of the Chironomid Pupal Exuvial Technique in river biomonitoring. *Freshwater Biology*. 2007;52(1):165-176.
- Rogers S, Clarke KR, Reynolds J. The taxonomic distinctness of coastal bottom-dwelling fish communities of the North-east Atlantic. *Journal of Animal Ecology*. 1999;68(4):769-782.
- Rosenberg D. Freshwater biomonitoring and Chironomidae. *Aquatic Ecology*. 1993;26(2):101-122.
- Rosenberg D, Resh V. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates, Chapman & Hall, London.1993.
- Rosenberg DM. Freshwater biomonitoring and Chironomidae. *Aquatic Ecology*. 1992;26(2):101-122.
- Rossaro B. Chironomids and water temperature. *Aquatic Insects*. 1991;13(2):87-98.
- Rossaro B, Lencioni V, Boggero A, Marziali L. Chironomids from Southern Alpine Running Waters: Ecology, Biogeography*. *Hydrobiologia*. 2006;562(1):231-246.
- Ruse L. Chironomid pupal exuviae as indicators of lake status. *Archiv für Hydrobiologie*. 2002;153:367-390.
- Schmid P. Community structure of larval Chironomidae (Diptera) in a backwater area of the River Danube. *Freshwater Biology*. 1992;27(2):151-167.
- Schmid P. A key to the larval Chironomidae and their instars from Austrian Danube Region streams and rivers: Part 1. Diamesinae, Prodiamesinae and Orthocladiinae, Federal Institute for Water Quality of the Ministry of Agriculture and Forestry, Wien.1993.
- Simić V, Simić S. Use of the river macrozoobenthos of Serbia to formulate a biotic index. *Hydrobiologia*. 1999;416:51-64.
- Spies M, Sæther O. Notes and recommendations on taxonomy and nomenclature of Chironomidae (Diptera). *Zootaxa*. 2004;75:21-90.

- Stojkovic M, Simic V, Milosevic D, Mancev D, Penczak T. Visualization of fish community distribution patterns using the self-organizing map: A case study of the Great Morava River system (Serbia). *Ecological Modelling*. 2013;248:20-29.
- Šporka F, Vlek H, Bulánková E, Krno I. Influence of seasonal variation on bioassessment of streams using macroinvertebrates. *Hydrobiologia*. 2006;566(1):543-555.
- Tang H, Song M, Cho W, Park Y, Chon T. Species abundance distribution of benthic chironomids and other macroinvertebrates across different levels of pollution in streams. *Ann Limnol*. 2010;46:53-66.
- Thioulouse J, Chessel D, Dole' Dec S, Olivier J. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software, Springer.1997.
- Tokeshi M. Life cycles and population dynamics. In: Armitage P, Cranston P, Pinder L (Eds.), *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Chapman and Hall, London. 1995;pp. 225-268.
- Townsend C, Hildrew A, Francis J. Community structure in some southern English streams: the influence of physicochemical factors. *Freshwater Biology*. 1983;13(6):521-544.
- Vallenduuk H, Moller Pillot H. Chironomidae larvae of the Netherlands and Adjacent Lowlands: general ecology and Tanypodinae, KNNV Publishing, Zeist.2007.
- Vallenduuk HJ, Pillot HM. Chironomidae larvae of the Netherlands and Adjacent Lowlands: general ecology and Tanypodinae, Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging.2007.
- Van Sickle J, Hughes RM. Classification strengths of ecoregions, catchments, and geographic clusters for aquatic vertebrates in Oregon. *Journal of North American Benthological Society*. 2000;19:370-384.
- Vannote R, Minshall G, Cummins K, Sedell J, Cushing C. The river continuum concept. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*. 1980;37(1):130-137.
- Verdonschot P. 1990. *Ecological characterization of surface waters in the province of Overijssel(the Netherlands)*. Landbouwniversiteit te Wageningen.
- Verdonschot P. Macroinvertebrate community assemblages. Introduction. In: Lek S, Scardi M, Verdonschot P, Descy J, Park Y (Eds.), *Modelling community structure in freshwater ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin. 2005;pp. 131-132.
- Verdonschot P. Data composition and taxonomic resolution in macroinvertebrate stream typology. *Hydrobiologia*. 2006;566(1):59-74.

- Vesanto J, Himberg J, Alhoniemi E, Parhankangas J. SOM toolbox for Matlab 5, Citeseer.2000.
- Waite I, Herlihy A, Larsen D, Urquhart NS, Klemm D. The effects of macroinvertebrate taxonomic resolution in large landscape bioassessments: an example from the Mid-Atlantic Highlands, USA. *Freshwater Biology*. 2004a;49(4):474-489.
- Waite IR, Herlihy AT, Larsen DP, Urquhart NS, Klemm DJ. The effects of macroinvertebrate taxonomic resolution in large landscape bioassessments: an example from the Mid-Atlantic Highlands, USA. *Freshwater Biology*. 2004b;49(4):474-489.
- Walker I. Chironomidae (Diptera) in paleoecology. *Quaternary Science Reviews*. 1987;6(1):29-40.
- Ward A, Williams DD. Longitudinal zonation and food of larval chironomids (Insecta: Diptera) along the course of a river in temperate Canada. *Ecography*. 1986;9(1):48-57.
- Warwick R, Ashman C, Brown A, Clarke K, Dowell B, Hart B, Lewis R, Shillabeer N, Somerfield P, Tapp J. Inter-annual changes in the biodiversity and community structure of the macrobenthos in Tees Bay and the Tees estuary, UK, associated with local and regional environmental events. *Marine ecology. Progress series*. 2002;23:41-13.
- Warwick R, Clarke K. Taxonomic distinctness and environmental assessment. *Journal of Applied Ecology* 1998;35:532-543.
- Warwick R, Clarke K. Practical measures of marine biodiversity based on relatedness of species. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 2001;39:207-231.
- Wiederholm T. Chironomidae of the Holarctic region: keys and diagnoses, Publishing House of the Swedish Research Councils, Stockholm.1983.
- Wilson R. Monitoring organic enrichment of rivers using chironomid pupal exuvial assemblages. *Aquatic Ecology*. 1992;26(2):521-525.
- Wright J, Furse M, Moss D. River classification using invertebrates: RIVPACS applications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 1998;8(4):617-631.
- Wu R. Effects of taxonomic uncertainty on species diversity indices. *Marine Environmental Research*. 1982;6(3):215-225.
- Yount JD, Niemi G. Recovery of lotic communities and ecosystems from disturbance—a narrative review of case studies. *Environmental Management*. 1990;14(5):547-569.
- Zar J. Biostatistical Analysis 5th edition Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.2009.

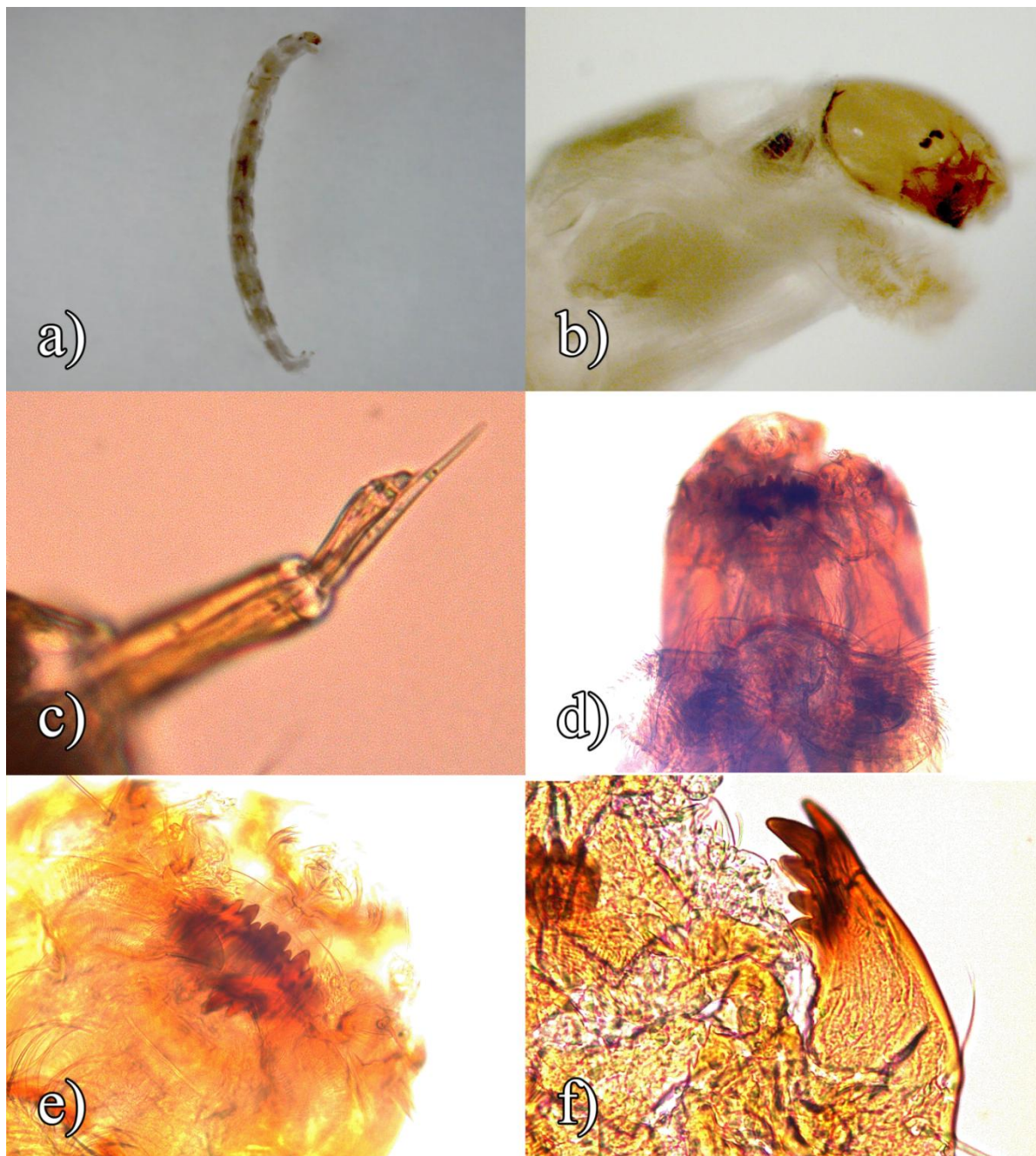
8. Прилог

Микрографије

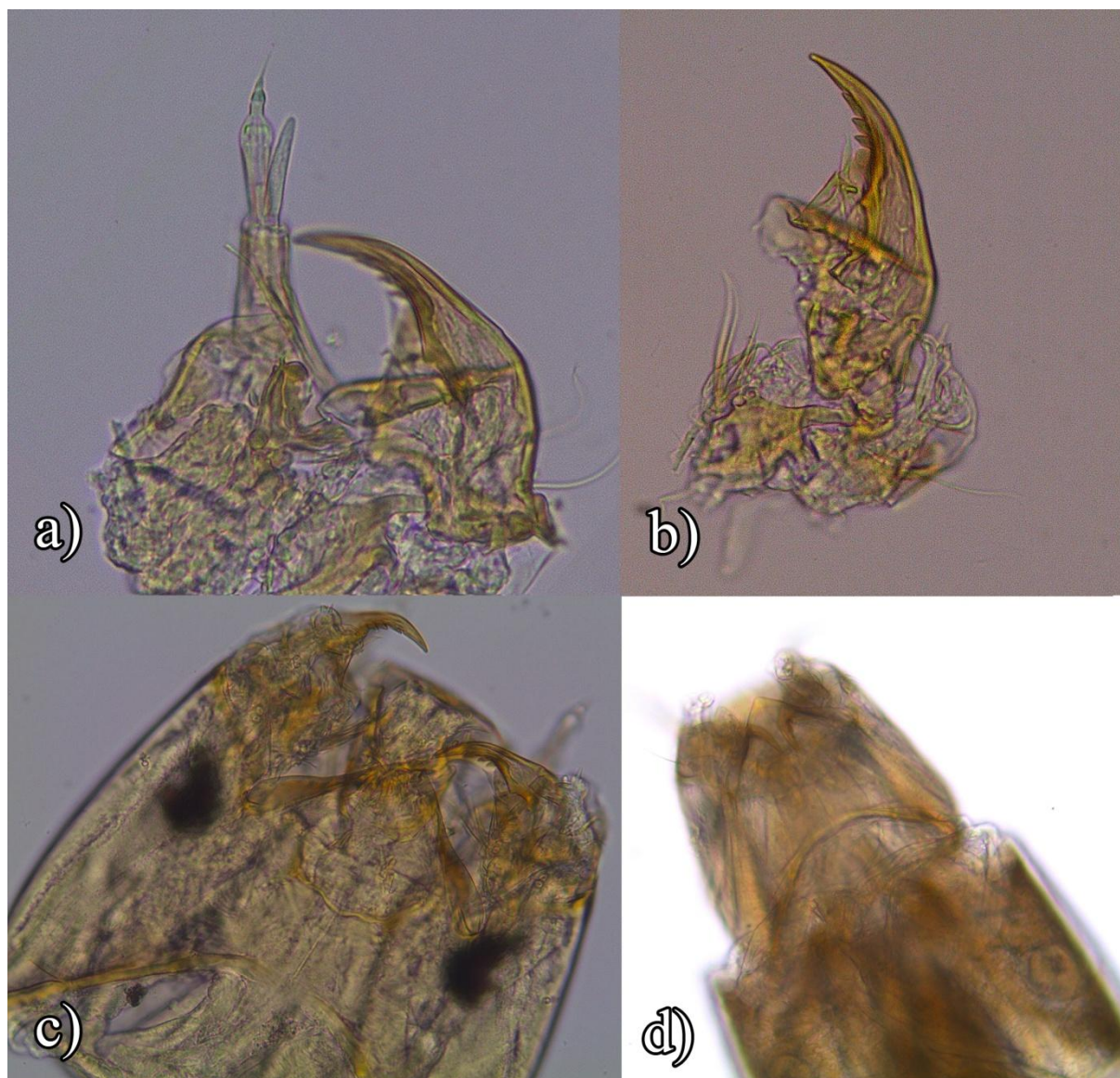
Слика (Прилог) 1. *Polypedilum scalaenum*; а) бочни изглед ларве, б) бочни изглед главене чауре, ц) антена, д) вентрални изглед главене чауре, е) ментум, ф) мандибула.

Слика (Прилог) 2. *Parakiefferiella smolandica*; а) антена, б) мандибула, с) ментум, d) вентрални изглед главене чауре.

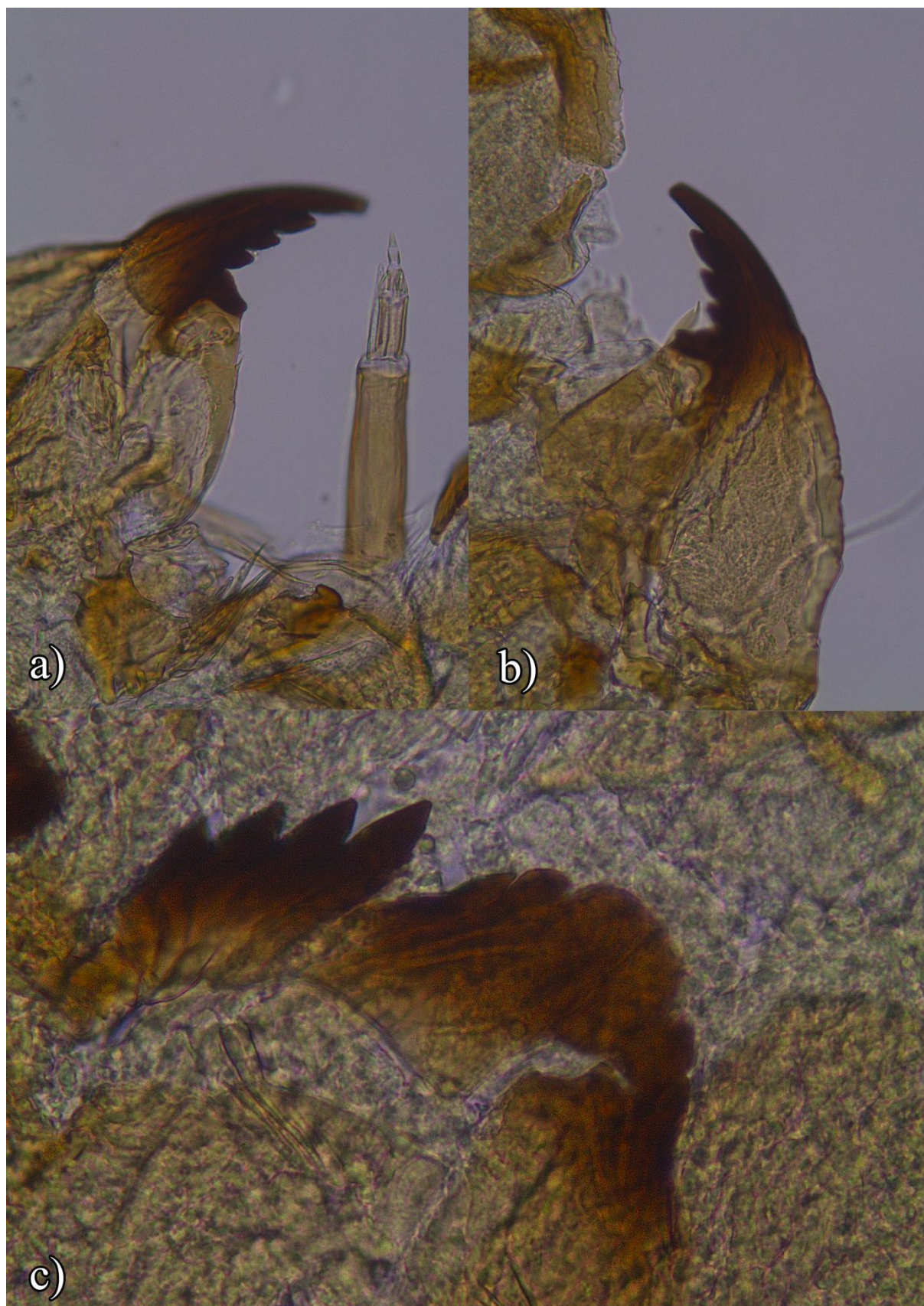
Слика (Прилог) 3. *Cricotopus bicinctus*; а) антена, б) мандибула, с) ментум.



Слика (Прилог) 1. *Polypedilum scalaenum*; а) бочни изглед ларве, б) бочни изглед главене чауре, ц) антена, д) вентрални изглед главене чауре, е) ментум, ф) мандибула.



Слика (Прилог) 2. *Parakiefferiella smolandica*; a) антена, b) мандибула, c) ментум, d) вентрални изглед главене чауре.



Слика (Прилог) 3. *Cricotopus bicinctus*; a) антена, b) мандибула, c) ментум.

Биографија са публикацијама кандидата

Бурађ Милошевић рођен је 04.08.1983. године у Нишу. Основну и средњу школу завршио је са одличним успехом у Нишу. Уписао је студије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, студијска група Биологија са екологијом, школске 2002./03. године и дипломирао 2008. године са просечном оценом 9,73 и оценом 10 на дипломском испиту.

Школске 2008./09. године уписао је докторске студије на Биолошком факултету у Београду, модул Хидроекологија. У школској 2010./11., након што је одслушао две године и положио све испите предвиђене програмом, студије наставља на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, смер Хидробиологија и заштита вода.

Од 13. фебруара 2009. године запослен је као сарадник у настави за област Заштита животне средине, на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Нишу. Дана 23.02.2011. године је изабран у звање асистента за исту научну област. Током овог периода је изводио практичну наставу из предмета: Општа екологија, Основи конзервационе биологије (Основне академске студије БИОЛОГИЈА), Заштита животне средине (Дипломске академске студије БИОЛОГИЈА), Урбана екологија, Заштита биолошке разноврсности, Заштићене врсте и подручја Србије, Конзервациона биологија, Законска регулатива у заштити природе, Глобална екологија (Дипломске академске студије ЕКОЛОГИЈА И ЗАШТИТА ПРИРОДЕ). Од 2011. године учествује у реализацији научно-истраживачког пројекта под називом: „Биосенсинг технологије и глобални систем за континуирана истраживања и интегрисано управљање екосистемима“, финансиран од стране Министарства просвете и науке Републике Србије (бр. ИИИ43002).

Од 2012. године члан је уређивачког одбора међународног часописа „*Journal of Entomological and Acarological Research*“ и националног часописа „*Biologica Nyssana*“.

Током 2009. године похађао је тренинг детерминације ларви фамилије Chironomidae у Тилбургу и Ајндховену, Холандија. Курс детерминације је организовао и водио др Henk K.M. Moller Pillot.

Резултати истраживања спроведених у оквиру ове докторске дисертације објављени су у следећим публикацијама:

1. Milošević Dj., Simić, V., Stojković, M., Živić, I. (2012) Chironomid faunal composition represented by taxonomic distinctness index reveals environmental change in a lotic. *Hydrobiologia*. 683:69-82 (ISSN 0018-8158)
2. Milosevic Dj., Simic V., Stojkovic M., Čerba D., Mancev D., Petrovic A., Paunovic M. (2013). Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: toward the use of non-biting midges in bioassessment programs. *Aquatic Ecology*. (ISSN 1386-2588)
3. Milšević Dj., Simić V., Todosijević I., Stojković M. (2011). Checklist of the family Chironomidae (Diptera) of Southern Morava River basin, Serbia. *Biologica Nyssana*. 2-123-128

4. Milošević Dj., Stojković M., Simić V. (2011). A comparative analysis of chironomid community by applying the taxonomic distinctness index. 18th International Symposium on Chironomidae. Museum of Natural History and Archaeology. Book of abstracts. Trondheim, Norway. 35-36.

Радови аутора објављени из области истраживања:

1. Stojković M., Simić V., Milošević Dj., Mančev D., Penczak T, (2013). Visualization of fish community distribution patterns using the self-organizing map: A case study of the Great Morava River system (Serbia). *Ecological Modelling* 248: 20-29. (ISSN 0304-3800)
2. Stojković M., Milošević Dj., Simić V. (2011). Ichthyological integral indices, the history of development and possible application on rivers in Serbia. *Biologica nyssana*. 2:43-50.

Chironomid faunal composition represented by taxonomic distinctness index reveals environmental change in a lotic system over three decades

Djuradj Milošević · Vladica Simić ·
Milica Stojković · Ivana Živić

Received: 16 July 2011 / Revised: 15 October 2011 / Accepted: 25 October 2011 / Published online: 11 November 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract The widely distributed family of the Chironomidae represents the most diverse and abundant group of macroinvertebrate fauna and potentially provides information on stream water quality and the effect of anthropogenic disturbances. Change in the chironomid faunal composition in the Southern Morava River basin (Serbia) was examined by comparing data from 1981 and 2010. We tested the performance of the parameter “taxonomic distinctness” (δ^+) as an indicator of water quality and examined the possible relationship between δ^+ and water quality using PCA. The 2010 survey yielded 96 taxa in 28 localities over three seasons. In total, 10,179 specimens represented the five subfamilies. Chironomid diversity was captured with the index δ^+ that is based upon taxonomic distinctiveness and purported to be independent of sampling effort. δ^+ was correlated to total species richness and is significantly

higher now than it was in 1981. In keeping with PCA results, δ^+ was increasing in accordance with water quality increase. We conclude that δ^+ is a useful measure for estimating anthropogenic disturbance over time. The linear relationship between δ^+ and the water quality gradient gives rise to a novel metric, independent of sampling effort, in the multimetric approaches of analyzing macroinvertebrate assemblage data for bioassessments.

Keywords Chironomidae · Taxonomic distinctness index (δ^+) · PCA analysis · Southern Morava River

Introduction

It is widely recognized that increasing anthropogenic development threatens biodiversity and disturbs the integrity of natural ecosystems. The resulting environmental degradation calls for the monitoring of the environment and proper conservation planning (Raunio et al., 2011). Of all the freshwater organisms that have been considered for use in biological monitoring, benthic macroinvertebrates are most often recommended (Carter et al., 2006). The widely distributed Chironomidae family presents the most diverse (Ferrington, 2008; Marziali et al., 2010) and frequently most abundant group of macrozoobenthos. In inland freshwater ecosystems, Chironomidae occupy a wide variety of niches, with different species

Handling editor: P. Nöges

D. Milošević (✉) · M. Stojković
Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences
and Mathematics, University of Nis, 18000 Nis, Serbia
e-mail: djuradj@pmf.ni.ac.rs

V. Simić
Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology,
University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

I. Živić
Faculty of Biology, University of Belgrade, 11000
Belgrade, Serbia

exhibiting different life styles including different feeding behaviors (Bazzanti et al., 1997; Franquet, 1999; Bazzanti, 2000). As a group, the Chironomidae play the most important role in detritus processing in freshwater ecosystems, recycling natural and introduced organic matter (Hirabayashi & Wotton, 1998; Jones & Grey, 2004). Likewise, they present an important part of the food chain (Armitage et al., 1995). Because of these characteristics, the Chironomidae are a prime candidate for the environmental assessment of the lotic ecosystems, which can potentially provide information on water quality and, over time, on the effects of natural processes and anthropogenic disturbance. It has, conversely, been common place to *exclude* chironomids from water quality assessments, because the Chironomidae are a complex group, for which the required taxonomic expertise is often not available. In parallel to this position, it has also been suggested that the Chironomidae diversity does not add much relevant information and that other groups capture the needed information more easily for the lotic system at the level of the assemblage (Raunio et al., 2011). This idea has, however, been invalidated by the absence of, or at best weak, correlation in species richness of Chironomidae and other taxonomic groups (Heino et al., 2009; Heino, 2010). As in other groups, the taxonomic and functional diversity of lotic chironomid assemblages seems to be crucially affected by the level of environmental degradation (Koperski, 2009). It then follows that the Chironomidae may present information regarding the quality of habitat that is not captured by other groups. Indeed, their incorporation in a community assessment, whose purpose would be to assess the ecosystem health, is more than justified as it gives additional strength to biomonitoring methods (Diggins & Stewart, 1998).

Diversity indices have traditionally been used to assess biodiversity variation for near-pristine versus impacted ecosystems (Magurran, 2004). The majority of indices describe species richness and species “evenness” and are, as such, sensitive to sampling effort as a function of phenology and habitat type. This represents a serious disadvantage for any indicator group for which workload cannot easily be controlled. The average taxonomic distinctness (or Δ^+ , Clarke & Warwick, 1998) aims to circumvent this problem. Δ^+ is formulated as the average taxonomic distance measured among every pair of species. Its main advantage is that it is largely independent of sampling effort, with the

implication that it can be directly compared across studies with unknown or different sampling efforts (Clarke & Warwick, 1999). In contrast to the other diversity measures, it accounts for phylogenetic, taxonomic, and functional variability among species in a community (Heino et al., 2005). While Δ^+ was first used for communities of marine biota (Warwick & Clarke, 1998; Rogers et al., 1999; Warwick et al., 2002) it has by now frequently been applied to freshwater biota, too (Heino et al., 2005, 2007; Abellán et al., 2006; Bhat & Magurran, 2006; Marchant, 2007). Unfortunately, most of the listed studies did not take chironomids into account. For example Heino et al. (2007) did not identify chironomids, presuming that he missed a proper signal of environmental degradation due to the fact that many species of chironomids were common at impacted localities.

Although, chironomids have been regarded as keystone members and ecosystem engineers in aquatic ecosystems (Hirabayashi & Wotton, 1998; Jones & Grey, 2004; Olafsson & Paterson, 2004; Péry et al., 2004), little information on their quantitative or qualitative composition is available at the moment. This is specifically true for lotic systems in Serbia, where research on this topic has not been conducted for 29 years (1981–2010). Indeed, the only results published so far were those of Jankovic (1985), who sampled across the entire drainage basin of the Southern Morava River, Serbia, in 1981.

We repeated the survey of Jankovic (1985) over the same range, with a denser network of study localities, with the aim of examining the changes in the Southern Morava River basin over a period spanning 29 years. We also tested the performance of the Δ^+ to assess the differences in the chironomid community as a response to environmental degradation and examined the possible relationship between Δ^+ and water quality.

Materials and methods

Study area and sampling

The Southern Morava River, also known as the Binačka Morava, has its source in the Skopska Crna Gora Mountains, Macedonia, and flows roughly toward the north. At km 49 it joins up with the Preševska Moravica and at km 295 it flows into the Morava, which itself eventually flows into the Black

Sea. The Southern Morava River has a catchment area of 15,469 km² of which 14,372 km² (92.91%) are situated in Serbia and 1,097 km² (7.09%) in Bulgaria, through this river's right-hand tributary, the river Nišava. The Southern Morava has 157 tributaries most of which dry out during summer. Larger, permanent left-hand tributaries are the Jablanica, Veternica, Toplica, and Pusta Reka rivers. Right-hand tributaries are the Vlasina, Nišava (the longest), and Sokobanjska Moravica rivers (Gavrilovic & Dukic, 2002).

We studied the chironomid faunal composition in the spring, summer and autumn of 2010 at 28 localities, chosen across the Southern Morava range to include different stream orders and a variety of habitats (Fig. 1). Local habitats were classified as “impacted” versus “near-pristine” or reference, using the multimetric index for establishing reference localities (Koperski, 2010). We included five environmental (the type of land use, degradation of bottom substrate (%), degradation of riparian vegetation (%), diversity of aquatic habitats, and diversity of riparian vegetation) and four abiotic [electroconductivity (EC), concentrations of: ortho-phosphate, nitrate, ammonia] metrics. To include these metrics in the multimetric index, we used a 5, 3, or 1 score system with respect to the quartile ranges (Barbour et al., 1996). For the purpose of comparison with the study carried out by Jankovic (1985), which would be as direct as possible, ten localities were selected so as to match the 1981 sampling scheme (Table 1).

Three benthic samples were taken from the most common substrate types with a 0.625 m² Surber sampler of 250 μm mesh. All three benthic samples were composited into a single sample. Chironomids were separated from the remainder and identified up to the genus- or species level with established keys (Smith & Distler, 1981; Wiederholm, 1983; Pillot, 1984a, b, 2009; Vallenduuk & Pillot, 2007). The taxonomy used here is that of Spies & Sæther (2004), with adjustments following H. M. Pillot (personal communication).

The physicochemical parameters were measured twice in each season with a WTW multi 340i probe for temperature, EC, pH and oxygen content [dissolved oxygen (DO) and oxygen saturation (DO%)]. The biochemical oxygen demand (BOD5) was estimated using the standard methodology recommended by APHA (1999). The concentrations of ammonia nitrogen, nitrate nitrogen, and orthophosphates were measured with the Spectrophotometer Shimatzu UV-Vis.

The transparency of the water was measured with a Lovibond PC Checkit and velocity was determined with a flow meter Aquatech GMH 3330.

Data analysis

To describe the chironomid community, two indices of taxonomic diversity were used. The first one, average taxonomic distinctness, or delta⁺, is defined as the average taxonomic path length between any two randomly chosen species, traced through a Linnaean or phylogenetic classification of the full set of species involved (Clarke & Warwick, 1998), as follows:

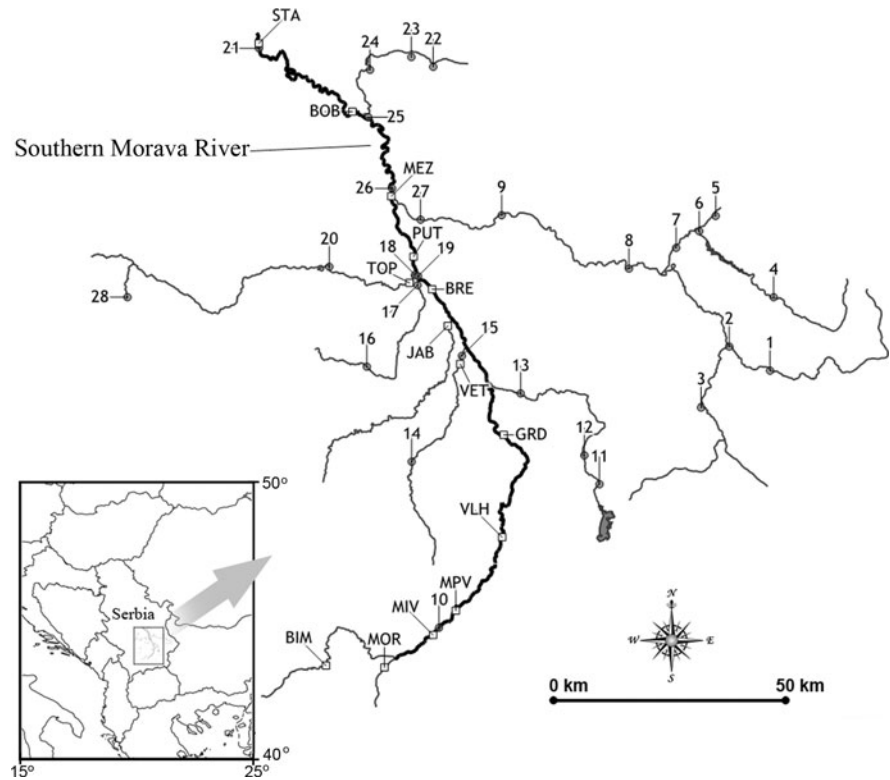
$$\Delta^+ = \frac{\sum \sum_{i < j} \omega_{ij}}{m(m-1)/2},$$

where m is the number of species and ω is the weight attached to the path length linking species i and j . To calculate ω , it is necessary to define the weights (v) assigned to each section of the path, where the section is the step linking one taxonomic level with the next coarsest division. We used five taxonomic levels (subgenus, genus, tribe, subfamily, and family) with step lengths between them used as units ($v = 1$). The second taxonomic diversity index used, variation in taxonomic distinctness (lambda⁺), reveals the evenness of the distribution of taxa across the hierarchical taxonomic tree. More precisely, this index provides additional information regarding the extent to which particular taxa are over- or under-represented in samples. It is defined as:

$$\Lambda^+ = \frac{\sum \sum_{i \neq j} (\omega_{ij} - \bar{\omega})^2}{m(m-1)/2}$$

Funnel plots with 95% confidence limits for delta⁺ and lambda⁺ were constructed according to Warwick & Clarke (1998). In this approach, a randomization test was used to detect the expected delta⁺ and lambda⁺ values derived from a regional species pool (master list). This made it possible for us to measure the extent of deviation between the observed and expected values of delta⁺ and lambda⁺. The observed data which fall under the lower 95% confidence limit represent impacted localities with less taxonomic distinctness than would be expected from a random distribution derived from the master list. In our study, the master list from the combined 1981 and 2010 studies contained 109 taxa (Table 2).

Fig. 1 Sampling localities over the Southern Morava River. *Squares* indicate localities studied in 1981 and *circles* indicate localities studied in 2010



Also, a two-dimensional (2D) plot of simulated δ^+ versus λ^+ values (calculated from the master list) was constructed to detect a possible intrinsic correlation, reflecting the underlying structure of the master list (Warwick & Clarke, 2001). Just like in the 95% funnel plots, “ellipses” in the 2D plot present 95% probability contours of the pairs of δ^+ and λ^+ values expected under the null hypothesis that samples of species behave as if randomly drawn from the master list (i.e., every species in the master list has an equal probability to exist at all locations) (Clarke & Warwick, 2001).

All index calculations and plot constructions were performed using PRIMER version 6 (Clarke & Gorley, 2006).

To check for a possible correlation with δ^+ , we also calculated several traditional species diversity indices (the total number of species— S , Shannon-Wiener diversity index— H' , Simpson index— $1-D$, and the Pielou evenness index— J') (Dash, 2001). We aimed to establish if there was a statistically significant difference between δ^+ over the datasets (e.g., 1981 and 2010) and the same index over the reference and impacted localities. For this purpose we used the Student's t test. In

addition, we used Pearson's r to conduct correlation analyses among the indices. SPSS v15.0 software was used for all these statistical calculations.

The biplot presentation of a normalized principal components analysis (PCA) of the data matrix was used to graphically present the relationships between sampling localities and their environmental characteristics and the δ^+ index. The data matrix comprised 11 environmental variables (concentration of nitrate nitrogen, orthophosphate, ammonia nitrogen, and DO, water oxygen saturation, water hardness, EC, pH, biochemical oxygen demand, water temperature and transparency). In addition, the matrix also comprised the δ^+ index, as a measure of the Chironomidae community structure. This total of 12 variables is given in columns, as measured along the 28 sampling localities (given in rows). Since, the data is quantitative and variables are not expressed in the same units, the normalized (correlation matrix) PCA was used to analyze this data set. After performing the normalized PCA, the column coordinates were standardized (norm equals 1), which enabled them to be superimposed with sampling localities coordinates in the biplot presentation. The sampling localities were

Table 1 Geographic coordinates, stream order, and Ward's clustering group of sampled localities in the Southern Morava River basin

River	Locality	Ward's clustering group	Stream order	Geographic coordinates	
				N	E
Nišava	1	4	2	43° 00' 50"	22° 48' 02"
Jerma	2	4	1	43° 03' 40"	22° 41' 24"
Jerma	3	4	1	42° 56' 41"	22° 37' 07"
Visočica	4	1	1	43° 07' 12"	22° 48' 57"
Temšica	5	1	1	43° 19' 21"	22° 39' 36"
Visočica	6	1	2	43° 17' 48"	22° 36' 42"
Temšica	7	1	2	43° 15' 39"	22° 33' 06"
Nišava	8	4	3	43° 13' 25"	22° 25' 47"
Nišava	9	4	3	43° 19' 51"	22° 04' 24"
Southern Morava River	10*	2	2	42° 43' 56"	22° 03' 43"
Vlasina	11	1	1	42° 47' 47"	22° 19' 58"
Vlasina	12	1	1	42° 50' 54"	22° 17' 24"
Vlasina	13*	4	2	42° 58' 23"	22° 07' 08"
Veternica	14	1	2	42° 50' 37"	21° 49' 34"
Veternica	15*	3	2	43° 03' 14"	21° 58' 11"
Pusta River	16	1	2	43° 01' 51"	21° 42' 07"
Pusta River	17*	2	2	43° 11' 36"	21° 50' 47"
Toplica	18*	2	2	43° 12' 46"	21° 50' 05"
Southern Morava River	19*	4	3	43° 12' 43"	21° 50' 48"
Toplica	20	2	2	43° 13' 56"	21° 36' 16"
Southern Morava River	21*	4	4	43° 40' 38"	21° 24' 55"
Sokobanjska Moravica	22	4	1	43° 38' 06"	21° 53' 38"
Sokobanjska Moravica	23	2	1	43° 39' 35"	21° 49' 51"
Sokobanjska Moravica	24	4	1	43° 37' 30"	21° 42' 57"
Sokobanjska Moravica	25*	4	1	43° 32' 09"	21° 42' 49"
Southern Morava River	26*	4	4	43° 23' 14"	21° 46' 24"
Nišava	27*	4	3	43° 49' 20"	21° 52' 21"
Lukovska River	28	4	1	43° 09' 52"	21° 01' 56"

Localities with an asterisk are chosen to match the 1981 sampling scheme of Jankovic (1985)

classified into clusters using Ward's algorithm. PCA and cluster analyses were conducted with the ADE-4 software (Thioulouse et al., 1997).

Results

Taxonomic composition

The 10,179 specimens of Chironomidae collected in 2010 were distributed over 94 taxa and belonged to the following five subfamilies: Chironominae (33), Diamesinae (3), Orthocladiinae (41), Prodiamesinae (2), and Tanypodynae (15). Jankovic (1985) listed 54 species over the same five subfamilies. The most commonly observed

species was *Polypedilum scalaenum* at $n = 8$ (57.14%) in 1981 and $n = 24$ (85.71%) in 2010 of the study localities. The overall qualitative composition of Chironomidae fauna in 1981 and 2010 is presented in Table 2.

Taxonomic distinctness and other diversity indices

Delta⁺ and lambda⁺ were strongly negatively correlated at $r = -0.87$ ($P < 0.01$). In the 2D plot of simulated delta⁺ versus lambda⁺ values (Fig. 2) a clear inverse correlation was also seen for simulated variables. Delta⁺ was also correlated with S ($P < 0.05$) and not with any of the other biodiversity measures (Table 3). In the funnel plot for 2010 all near-pristine localities fell within the 95% confidence

Table 2 Chironomid species observed (X) and not observed (–) in 1981 and 2010 across the Southern Morava River study area

Taxon	1981	2010
Subfamily Chironominae		
<i>Beckidia zabolotzkyi</i> (Goetghebuer 1938)	X	–
<i>Chernovskia orbicus</i> (Townes 1945)	X	–
<i>Chironomus</i> sp.	X	X
<i>Cladotanytarsus</i> sp.	X	X
<i>Cryptochironomus</i> sp.	X	X
<i>Demicryptochironomus vulneratus</i> (Zetterstedt 1838)	X	X
<i>Dicrotendipes nervosus</i> (Staeger 1839)	–	X
<i>Dicrotendipes notatus</i> (Meigen 1818)	–	X
<i>Endochironomus albipennis</i> (Meigen 1830)	–	X
<i>Endochironomus dispar</i> (Meigen, 1830)	–	X
<i>Glyptotendipes cauliginellus</i> (Kieffer 1913)	X	–
<i>Harnischia fuscimanus</i> Kieffer 1921	X	–
<i>Micropsectra bidentata</i> Goetghebuer 1921	–	X
<i>Micropsectra</i> sp.	X	X
<i>Microtendipes pedellus</i> (De Geer 1776)	–	X
<i>Parachironomus frequens</i> (Johannsen 1905)	–	X
<i>Paracladopelma laminatum</i> (Kieffer 1921)	–	X
<i>Paracladopelma nigrifulum</i> (Goetghebuer 1942)	X	X
<i>Paralauterborniella nigrohalteralis</i> (Malloch 1915)	–	X
<i>Paratanytarsus austriacus</i> (Kieffer 1924)	–	X
<i>Paratanytarsus dissimilis</i> (Johannsen 1905)	X	X
<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen 1818)	X	X
<i>Phaenopsectra</i> sp.	X	X
<i>Polypedilum albicorne</i> (Meigen 1838)	–	X
<i>Polypedilum convictum</i> (Walker 1856)	X	X
<i>Polypedilum cultellatum</i> Goetghebuer 1931	–	X
<i>Polypedilum laetum</i> (Meigen 1818)	X	X
<i>Polypedilum pedestre</i> (Meigen 1830)	X	X
<i>Polypedilum scalaenum</i> (Schrank 1803)	X	X
<i>Polypedilum uncinatum</i> Goetghebuer 1921	–	X
<i>Pseudochironomus prasinatus</i> (Staeger 1839)	X	–
<i>Rheotanytarsus</i> sp.	X	X
<i>Saetheria reissi</i> Jackson 1977	–	X
<i>Saetheria</i> sp.	X	X
<i>Stempellinella brevis</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Stictochironomus maculipennis</i> (Meigen 1818)	–	X
<i>Stictochironomus pictulus</i> (Meigen 1830)	–	X
<i>Tanytarsus</i> sp.	X	X
Subfamily Diamesinae		
<i>Diamesa</i> sp.	X	X
<i>Pothastia gaedii</i> (Meigen 1838)	–	X
<i>Pothastia longimanus</i> Kieffer 1922	–	X
Subfamily Orthoclaadiinae		
<i>Brillia flavifrons</i> (Johannsen 1905)	–	X

Table 2 continued

Taxon	1981	2010
<i>Brillia bifida</i> (Kieffer 1909)	–	X
<i>Bryophaenocladus subvernalis</i> (Edwards 1929)	X	–
<i>Cardiocladius fuscus</i> Kieffer 1924	–	X
<i>Corynoneura celeripes</i> Winnertz 1852	X	–
<i>Corynoneura lobata</i> Edwards 1924	–	X
<i>Corynoneura scutellata</i> Winnertz 1846	X	X
<i>Cricotopus triannulatus</i> agg. sensu Moller Pillot 1984	X	X
<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen 1818)	X	X
<i>Cricotopus</i> gr. <i>sylvestris</i> sensu Hirvenoja 1973	X	X
<i>Cricotopus tremulus</i> (Linnaeus 1758)	X	X
<i>Cricotopus trifascia</i> Edwards 1929	X	X
<i>Epoicocladius ephemerae</i> (Kieffer 1924)	–	X
<i>Eukiefferiella brevicealcar</i> (Kieffer 1911)	X	X
<i>Eukiefferiella claripennis</i> (Lundbeck 1898)	X	X
<i>Eukiefferiella clypeata</i> (Kieffer 1923)	–	X
<i>Eukiefferiella gracei</i> (Edwards 1929)	X	X
<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Eukiefferiella lobifera</i> Goetghebuer 1934	X	–
<i>Eukiefferiella minor</i> Edwards 1929	–	X
<i>Eukiefferiella</i> sp.	X	–
<i>Heleniella ornaticollis</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Hydrobaenus</i> sp.	X	–
<i>Limnophyes</i> sp.	X	X
<i>Nanocladius bicolor</i> (Zetterstedt 1838)	–	X
<i>Nanocladius rectinervis</i> (Kieffer 1911)	X	X
<i>Orthocladius</i> (<i>Euorthocladius</i>) sp.	X	X
<i>Orthocladius</i> (<i>Orthocladius</i>) sp.	X	X
<i>Orthocladius lignicola</i> Kieffer 1914	–	X
<i>Orthocladius frigidus</i> (Zetterstedt 1838)	–	X
<i>Paracladius conversus</i> (Walker 1856)	–	X
<i>Paracricotopus niger</i> (Kieffer 1913)	–	X
<i>Parakiefferiella gracillima</i> (Kieffer 1922)	X	–
<i>Parametriocnemus stylatus</i> (Spaerck 1923)	–	X
<i>Paratrichocladius rufiventris</i> (Meigen 1830)	–	X
<i>Paratrissocladius excerptus</i> (Walker 1856)	–	X
<i>Psectrocladius calcaratus</i> (Edwards 1929)	X	X
<i>Pseudosmittia danconai</i> (Marcuzzi 1947)	X	–
<i>Rheocricotopus chalybeatus</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Rheocricotopus effusus</i> (Walker 1856)	X	X
<i>Rheocricotopus fuscipes</i> (Kieffer 1909)	–	X
<i>Rheosmittia spinicornis</i> (Brundin 1956)	–	X
<i>Smittia</i> sp.	X	–
<i>Synorthocladius semivirens</i> (Kieffer 1909)	X	X
<i>Thienemanniella clavicornis</i> (Kieffer 1911)	–	X
<i>Thienemanniella majuscula</i> (Edwards 1924)	X	X

Table 2 continued

Taxon	1981	2010
<i>Tvetenia bavarica</i> (Goetghebuer 1934)	–	X
<i>Tvetenia calvescens</i> (Edwards 1929)	–	X
<i>Tvetenia discoloripes</i> (Goetghebuer & Thienemann 1936)	–	X
Subfamily Prodiamesinae		
<i>Odontomesa fulva</i> (Kieffer 1919)	–	X
<i>Prodiamesa olivacea</i> (Meigen 1818)	X	X
Subfamily Tanypodinae		
<i>Ablabesmyia longistyla</i> Fittkau 1962	X	X
<i>Ablabesmyia phatta</i> (Egger 1864)	–	X
<i>Anatopynia plumipes</i> (Fries 1823)	–	X
<i>Apsectrotanypus trifascipennis</i> (Zetterstedt 1838)	–	X
<i>Arctopelopia barbitarsis</i> (Zetterstedt 1850)	–	X
<i>Conchapelopia melanops</i> (Meigen 1818)	X	X
<i>Krenopelopia</i> sp.	–	X
<i>Larsia curticalcar</i> (Kieffer 1918)	X	–
<i>Macropelopia adauca</i> Kieffer 1916	–	X
<i>Macropelopia nebulosa</i> (Meigen 1804)	–	X
<i>Nilotanypus dubius</i> (Meigen 1804)	–	X
<i>Procladius</i> sp.	X	X
<i>Rheopelopia</i> sp.	–	X
<i>Tanypus punctipennis</i> Meigen 1818	X	X
<i>Thienemannimyia</i> sp.	–	X
<i>Trissopelopia flavida</i> Kieffer 1923	X	–
<i>Zavreliomyia</i> sp.	–	X

Localities were 14 in 1981 (Jankovic, 1985) and 28 in this study (see Table 1)

limit, with no tendency to be positioned at either side of the average. Two impacted localities fell out of the confidence limits (Fig. 3A, B). We also found no significant difference in the mean δ^+ between the reference and impacted localities ($t = 1.690$; $P = 0.103$). For a comparison of δ^+ and λ^+ from 1981 and 2010, see Fig. 4A, B. The mean value of δ^+ was significantly higher in 2010 than in 1981 ($t = 12.322$; $P < 0.001$). For the 1981 data four localities fell outside the confidence limit.

Taxonomic distinctness and physico-chemical composition

In the PCA of the environmental and biological data the first and second axis accounted for 44 and 20% of the observed variation, respectively (Fig. 5). The first axis had high loadings of δ^+ , DO, oxygen saturation (DO%), and orthophosphate concentration (PO₄-P, Fig. 5). The second axis was mostly associated with water mineral content, represented by EC,

hardness (H), and nitrate nitrogen concentration (NO₃-N). Water transparency and pH showed no statistically significant correlation with any other parameter.

Using Ward's clustering algorithm, the sampling localities were organized into four groups (Fig. 5; Table 4). Group 1 localities are characterized by a high δ^+ . The group is also highly oxygenated (high DO and DO%) and the water is unpolluted (low BOD5 and NH₄-N) with low mineral content (low values of EC, H , NO₃-N, and PO₄-P). Group 2 localities are rich in salts (high values of EC, H , NO₃-N, and PO₄-P) and ammonia nitrogen, with a moderate level of organic pollution (high BOD5 and δ^+). Group 3 is composed of the single locality 15 and is characterized by a low mineral content except for PO₄-P and is otherwise similar to group 1, but highly polluted with high values of BOD5 and NH₄-N, poorly oxygenated and with a low δ^+ . The remainder of the localities is classified into group 4. Localities in this group are positioned near the center of the PCA plot, indicating the absence of a differential physico-chemical or chironomid signature.

Fig. 2 Fitted 95% probability contours of the joint Δ^+ and λ^+ distributions, from 10,000 simulations, for a range of values of S , the number of species. Dots indicate observed (λ^+ , Δ^+) values for species list recorded from 28 localities

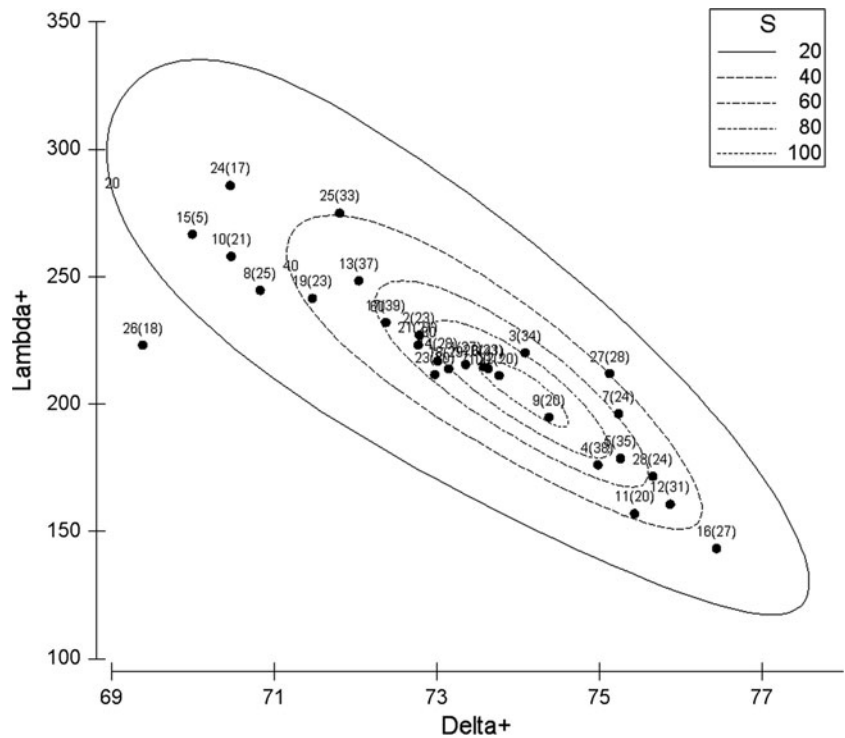


Table 3 Correlation of Δ^+ with other diversity indices

Diversity index	Δ^+
S	0.375*
H'	0.316 NS
$1-D$	0.236 NS
J'	0.225 NS
λ^+	-0.873**

NS not significant

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A positive correlation with Δ^+ was found for DO ($r = 0.439$, $P < 0.05$) and DO% ($r = 0.433$, $P < 0.05$) whereas all other parameters, except pH and transparency, were significantly negatively correlated with Δ^+ . Of those, EC and $\text{PO}_4\text{-P}$ showed the strongest correlation at $r = -0.534$ ($P < 0.01$) and $r = -0.556$ ($P < 0.01$), respectively.

Discussion

Values for Δ^+ and S were significantly higher for 2010 than for 1981. These results may be explained by the decrease in industrial production after the

economic crisis in Serbia in the 1990s. It is necessary to emphasize that, unlike lakes, the lotic system can recover quite rapidly from pollution and long recovery times are related only to physical disturbance (Yount & Niemi, 1990). Recolonization of previously impacted localities is faster with the Chironomidae than with other groups (Smith & Distler, 1981). Until the 1990s, industrial development in the region of the city of Vranje was extremely high. Consequently, the localities situated along the upper course of the Southern Morava River basin (MIV, MPV, MOR, and BIM) were distributed out of 95% confidence limits (Fig. 4A). The outlier localities were, however, all located at the broadest part of the funnel plot where statistical power is the lowest (Marchant, 2007), therewith suggesting that the result may be an artifact caused by the low number of species observed.

The “present funnel plot” showed that the majority of sampling localities were distributed within the 95% confidence interval. A gradual deviation from the expected value, but within confidence limits, was presented as the variability in taxonomic distinctness due to natural environmental factors (Warwick & Clarke, 1998). These sampling localities which fell outside the lower confidence limits are considered disturbed, and can be clearly distinguished from the

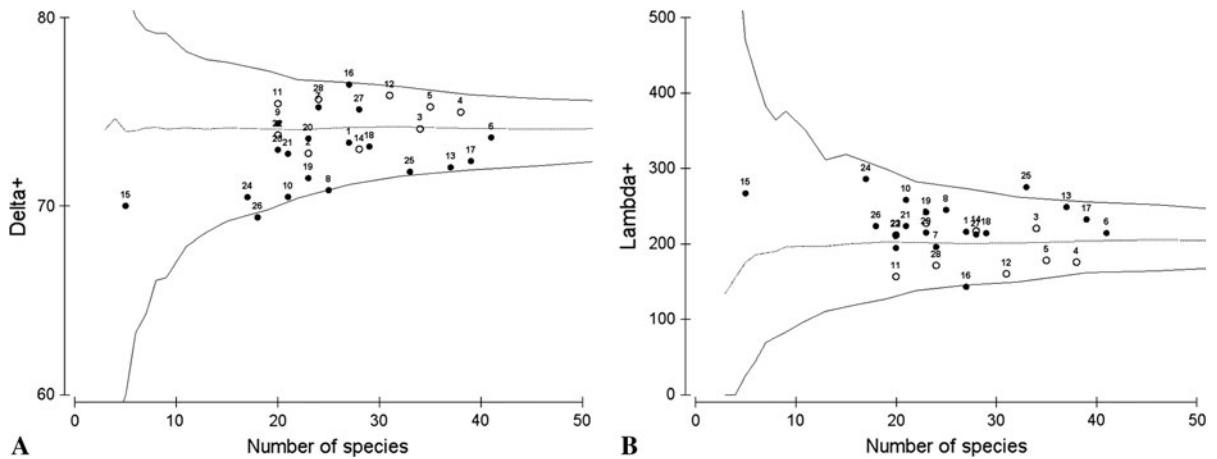


Fig. 3 Taxonomic distinctness (A) and variance in the taxonomic distances (B) observed for the chironomid fauna of the Southern Morava River, Serbia in 2010, plotted against “number of species”. Near-pristine and impacted localities are indicated by *open round symbols* and *solid round symbols*,

respectively. Funnel plots show the theoretical mean value (*solid line*) and 95% confidence interval (*interrupted lines*). Note that explanatory power along the vertical axis increases with the number of species observed (horizontal axis)

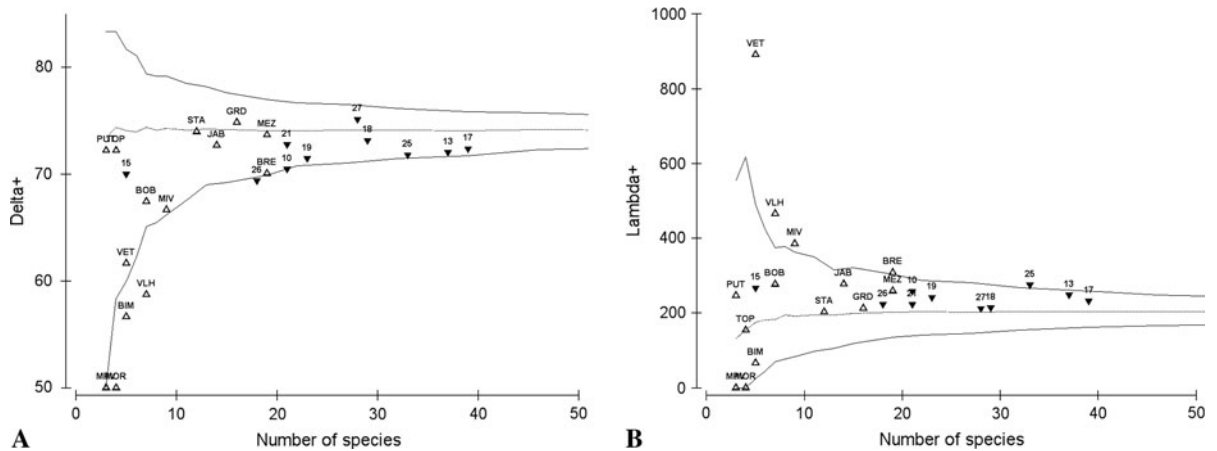


Fig. 4 Taxonomic distinctness (A) and variance in the taxonomic distances (B) observed for the chironomid fauna of the Southern Morava River, Serbia in 10 selected localities in 2010 (*solid symbols*) and for 14 localities studied in 1981 (*open symbols*, Jankovic, 1985), plotted against “number of species”.

Funnel plots show the theoretical mean value (*solid line*) and 95% confidence interval (*interrupted lines*). Note that explanatory power along the vertical axis increases with the number of species observed (horizontal axis)

reference localities. Contrary to our expectations, we found no significant difference between the reference and impacted localities. As suggested by Marchant (2007) and also found by Abellán et al. (2006), such a result might be due to the relative low diversity of the higher taxa observed, which affected the sensitivity of Δ^+ . In contrast to the conclusion of Abellán et al. (2006), and according to Koperski (2009), taxonomic distinctness, applied on the subset of taxa (the Chironomidae family), had high sensitivity and was

able to assess moderate degradation in the lotic system. However, in that study, the values of Δ^+ in near-pristine and impacted localities were compared without taking into account the expected value and 95% confidence limits. All these studies revealed that a master list applied to all aquatic invertebrate groups for all basins in the region is necessary to enable this index to distinguish anthropogenically altered localities from reference ones successfully (Marchant, 2007). In the Southern Morava River

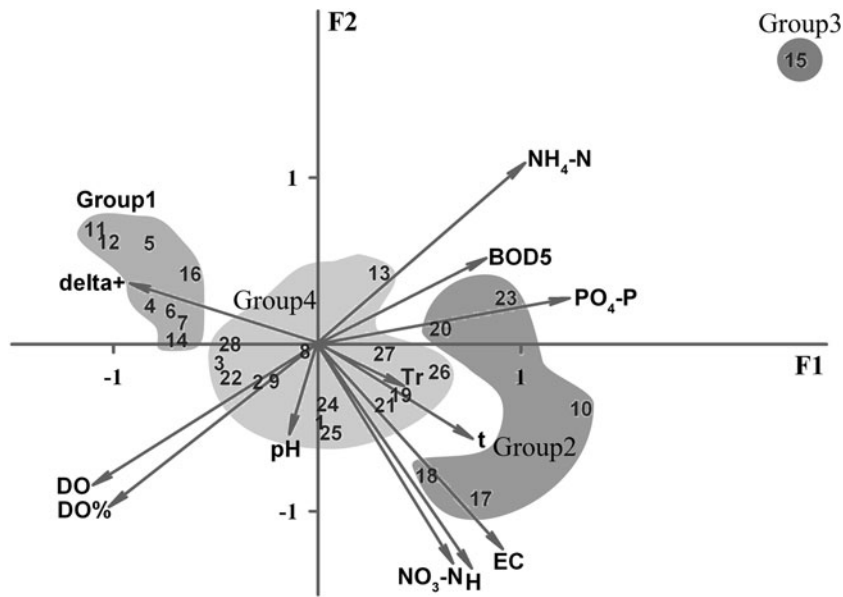


Fig. 5 Normalized PCA biplot showing relationships between sampling localities (*Arabic numbers*) and their environmental characteristics and δ^+ index as a measure of Chironomidae community structure (vectors). Environmental parameters are: concentration of nitrate nitrogen— $\text{NO}_3\text{-N}$, orthophosphate— $\text{PO}_4\text{-P}$; ammonia nitrogen— $\text{NH}_4\text{-N}$, dissolved oxygen—DO,

water oxygen saturation—DO%, water hardness— H , electro-conductivity—EC, and acidity—pH, the degree of organic pollution measured as biochemical oxygen demand—BOD5, water temperature— t , and transparency—Tr. Four clusters of sampling localities derived from Ward’s algorithm are shown by areas in different shades of gray

Table 4 Mean values \pm 1 standard deviation for δ^+ and environmental parameters per group

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Delta ⁺	75.0 \pm 0.4	72.5 \pm 0.5 ^b	70	72.7 \pm 0.5 ^b
Water temperature (°C)	11.6 \pm 0.7 ^a	13.9 \pm 0.8 ^{a,b}	14.9	13.5 \pm 0.5 ^b
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	183 \pm 22	623 \pm 33	380	434 \pm 17
Transparency (NTU)	9.0 \pm 0.9 ^a	12.2 \pm 3.4 ^a	10.6	10.6 \pm 1.3 ^a
pH	6.97 \pm 0.07 ^a	6.92 \pm 0.12 ^a	6.86	7.07 \pm 0.05 ^a
DO (mg/l)	11.0 \pm 0.2	9.0 \pm 0.6	4.5	10.3 \pm 0.2
DO saturation (%)	108 \pm 1 ^a	91 \pm 8 ^{a,b}	42	103 \pm 1 ^b
BOD5 (mgO ₂ /l)	3.9 \pm 0.2 ^a	4.7 \pm 0.3 ^b	6.4	4.4 \pm 0.2 ^{a,b}
NO ₃ -N (mg/l)	1.7 \pm 0.3	9.1 \pm 2.7 ^b	2.4	4.4 \pm 0.5 ^b
PO ₄ -P (mg/l)	0.08 \pm 0.01	0.63 \pm 0.05	1.41	0.25 \pm 0.04
NH ₄ -N (mg/l)	0.92 \pm 0.05	2.48 \pm 0.48	10.72	1.37 \pm 0.11
Hardness (N°)	98 \pm 13	267 \pm 9	147	206 \pm 6

Values within the same row not sharing a common superscript letter are significantly different: ^{a,b} $P < 0.05$

basin, 104 taxa, 16 tribus, and 5 subfamilies were recorded. Our opinion is that the exclusion of such a taxonomically and functionally diverse group from the master list may lead to a decrease of δ^+ power. Heino et al. (2007) assumed that omitting chironomids from his study led to the loss of expected signal of environmental degradation. A similar assumption was given by Marchant (2007) who supposed that not taking into account low diverse groups (Mecoptera,

Megaloptera, Neuroptera, and Lepidoptera) would not affect the strength of δ^+ . However, this would not be possible for groups such as Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, (EPT), Coleoptera, Diptera, Odonata, and Hemiptera.

Delta⁺ was correlated with four traditionally used indices for biodiversity. A significant correlation was recorded between δ^+ and the total number of species, pointing out that a decrease in the number of

species was followed by a disappearance of species from highly differing taxonomic levels, and that mainly congeneric species remained (Heino et al., 2005). This correlation could be a useful sign, considering the fact that Δ^+ does not adhere to sampling effort and habitat type. However, according to Heino et al. (2005), species richness and Δ^+ strongly varied across the longitudinal river gradient. It is necessary to consider such a variation in both before applying these indices to the anthropogenic effects assessment. Factors such as ecological heterogeneity, size of stream, altitude, latitude, and biogeographical potential were used by Coffman (1989) to determine the pattern of lotic chironomid richness across the river gradient. These studies revealed that species richness increases with increasing stream order up to the third order and then levels off or decreases in higher order rivers (Ferrington, 2008). A similar pattern emerged in our study, where species richness on the fourth order localities was lower (mean species richness = 17) than in the third order localities (mean species richness = 23). In comparison with Coffman's (1989) results, species richness on the third and the fourth order localities was unexpectedly lower. It could be explained by the bad condition of all localities on the 3rd and 4th order, which were obviously impacted. In the absence of reference localities on the 3rd and 4th orders, in this study we could not test the way in which a total number of species and Δ^+ vary across natural environmental gradients.

A strong negative correlation between Δ^+ and λ^+ was recorded. In their study, Warwick & Clarke (2001) pointed out that it is important to check the possible correlation between Δ^+ and λ^+ for the real data against any innate correlation that would be expected from the construction of the taxonomic tree. It means that the correlation between simulated Δ^+ and λ^+ values can be largely responsible for the observed correlations for the actual datasets. In Fig. 2, it is clearly visible that a strong negative correlation between the observed values of Δ^+ and λ^+ is an intrinsic property of the master list, where inverse correlation for simulated Δ^+ and λ^+ showed up. The same pattern was recorded in Marchant's study (2007). Thus, λ^+ does not offer any additional information about anthropogenic impact which would not have been provided by the Δ^+ index already.

According to PCA results, Δ^+ increased in accordance with water quality increase. Similar results were presented by Marchant (2007), but factors which were correlated with the axis 1 (water quality gradient) were different. In this study, Δ^+ was inversely correlated with log turbidity, log total phosphorous, and log total Kjeldahl nitrogen (TKN). For example, DO in our study was highly positively correlated with Δ^+ , contrary to the previous study. It could be easily explained because oxygen is one of the most important factors influencing the distribution and development of chironomid larvae (Vallenduuk & Pillot, 2007). More precisely, at localities with the lowest concentration of oxygen, species from the subfamily Chironominae were qualitatively and quantitatively dominant. The main characteristic of this subfamily is that all or almost all species have some quantity of hemoglobin in the body fluid (Pillot, 2009). Consequently, at locality 10, for example, where a very low concentration of oxygen was detected, 13 taxa belong to the subfamily Chironominae, 6 to Orthocladinae, and 2 to Tanypodinae. Such domination of Chironominae subfamily strongly affected Δ^+ decreasing the diversity at higher taxonomic levels. Influence could have been even stronger if genus *Chironomus* had been determined to species level. It would have additionally increased the number of congeneric species and consequently decreased the value of Δ^+ . A confirmed linear relationship between Δ^+ and water quality gradient is a promising result which can be used in the assessment of water quality level at tested localities.

According to previous studies (King & Richardson, 2002; Raunio et al., 2011) and our results, the Chironomidae, one of the most diverse and abundant families of aquatic invertebrates, represent an essential group for the assessment of ecosystem health. Their possible exclusion from the assessment method could lead to serious errors in the biodiversity assessment process and, thus, to the wrong ecosystem health assessment (Raunio et al., 2011). Concerning the taxonomy diversity indices, the strength of Δ^+ is strongly influenced by the diversity at higher taxonomic levels. Therefore, taxonomic distinctness could be a useful tool for estimating anthropogenic disturbance only taking into account all diverse groups of aquatic biota. In this case, the family of Chironomidae is not sufficient for the calculation of the taxonomy diversity indices, but is unavoidable in this

process. The linear relationship which exists between Δ^+ and the water quality gradient gives rise to a novel metric, independent of sampling effort, in the multimetric approaches of analyzing macroinvertebrate assemblage data for bioassessments (Carter et al., 2006).

Acknowledgments This study was supported by grant # 043002 (“Biosensing technologies and global system for long-term research and integrated management of ecosystems”) by Serbian Ministry of Education and Science. We want to thank *H. M. Pillot* (Tilburg, The Netherlands) for the great support and useful advice about this study. *J. W. Arntzen* (Leiden, The Netherlands) assisted with the final presentation. Also we want to thank Dr K. R. Clarke, Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK, for help with data analysis.

References

- Abellán, P., D. Bilton, A. Millán, D. Sánchez Fernández & P. Ramsay, 2006. Can taxonomic distinctness assess anthropogenic impacts in inland waters? A case study from a Mediterranean river basin. *Freshwater Biology* 51: 1744–1756.
- APHA, 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 9th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Armitage, P. D., P. Cranston & L. Pinder, 1995. *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges*. Chapman & Hall, London.
- Barbour, M. T. J., G. E. Gerritsen, R. Griffith, E. Frydenborg, J. S. McCarron, M. L. White & A. Bastian, 1996. A framework for biological criteria for Florida streams using benthic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* 15: 185–211.
- Bazzanti, M., 2000. Ecological requirements of chironomids (Diptera: Chironomidae) on the soft bottom of the river Arrone, Central Italy. *Journal of Freshwater Ecology* 15: 397–409.
- Bazzanti, M., M. Seminara & S. Baldoni, 1997. Chironomids (Diptera: Chironomidae) from three temporary ponds of different wet phase duration in Central Italy. *Journal of Freshwater Ecology* 12: 89–99.
- Bhat, A. & A. E. Magurran, 2006. Taxonomic distinctness in a linear system: a test using a tropical freshwater fish assemblage. *Ecography* 29: 104–110.
- Carter, J., V. Resh, M. Hannaford & M. Myers, 2006. Macroinvertebrates as biotic indicators of environmental quality. In Hauer, F. R. & G. A. Lamberti (eds), *Methods in Stream Ecology*. Academic Press, Amsterdam: 805–833.
- Clarke, K. & R. Gorley, 2006. *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Clarke, K. & R. Warwick, 1998. A taxonomic distinctness index and its statistical properties. *Journal of Applied Ecology* 35: 523–531.
- Clarke, K. & R. Warwick, 1999. The taxonomic distinctness measure of biodiversity: weighting of step lengths between hierarchical levels. *Marine Ecology Progress Series* 184: 21–29.
- Clarke, K. & R. Warwick, 2001. A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Marine Ecology Progress Series* 216: 265–278.
- Coffman, W., 1989. Factors that determine the species richness of lotic communities of Chironomidae. *Acta Biologica Debrecina, Supplementum Oecologica Hungarica* 3: 95–100.
- Dash, M. C., 2001. *Fundamentals of Ecology*. Tata McGraw-Hill, New Delhi.
- Diggins, T. P. & K. M. Stewart, 1998. Chironomid deformities, benthic community composition, and trace elements in the Buffalo River (New York) Area of Concern. *Journal of the North American Benthological Society* 17: 311–323.
- Ferrington, L. C., 2008. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 447–455.
- Franquet, E., 1999. Chironomid assemblage of a Lower-Rhône dike field: relationships between substratum and biodiversity. *Hydrobiologia* 397: 121–131.
- Gavrilovic, L. & D. Dukic, 2002. *Reke Srbije*. Zavod za udzbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Heino, J., 2010. Are indicator groups and cross-taxon congruence useful for predicting biodiversity in aquatic ecosystems? *Ecological Indicators* 10: 112–117.
- Heino, J., J. Soininen, J. Lappalainen & R. Virtanen, 2005. The relationship between species richness and taxonomic distinctness in freshwater organisms. *Limnology and Oceanography* 50: 978–986.
- Heino, J., H. Mykrä, H. Hämäläinen, J. Aroviita & T. Muotka, 2007. Responses of taxonomic distinctness and species diversity indices to anthropogenic impacts and natural environmental gradients in stream macroinvertebrates. *Freshwater Biology* 52: 1846–1861.
- Heino, J., K. T. Tolonen, J. Kotanen & L. Paasivirta, 2009. Indicator groups and congruence of assemblage similarity, species richness and environmental relationships in littoral macroinvertebrates. *Biodiversity and Conservation* 18: 3085–3098.
- Hirabayashi, K. & R. S. Wotton, 1998. Organic matter processing by chironomid larvae (Diptera: Chironomidae). *Hydrobiologia* 382: 151–159.
- Jankovic, M., 1985. The investigation of the chironomid fauna in the South Morava and its components rivers. *Proceedings on the Fauna of SR Serbia* 3: 71–110.
- Jones, R. I. & J. Grey, 2004. Stable isotope analysis of chironomid larvae from some Finnish forest lakes indicates dietary contribution from biogenic methane. *Boreal Environment Research* 9: 17–24.
- King, R. S. & C. J. Richardson, 2002. Evaluating subsampling approaches and macroinvertebrate taxonomic resolution for wetland bioassessment. *Journal of the North American Benthological Society* 21: 150–171.
- Koperski, P., 2009. Reduced diversity and stability of chironomid assemblages (Chironomidae, Diptera) as the effect of moderate stream degradation. *Polish Journal of Ecology* 57: 125–138.
- Koperski, P., 2010. Diversity of macrobenthos in lowland streams: ecological determinants and taxonomic specificity. *Journal of Limnology* 69: 88–101.

- Magurran, A. E., 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell, Oxford.
- Marchant, R., 2007. The use of taxonomic distinctness to assess environmental disturbance of insect communities from running water. *Freshwater Biology* 52: 1634–1645.
- Marziali, L., D. G. Armanini, M. Cazzola, S. Erba, E. Toppi, A. Buffagni & B. Rossaro, 2010. Responses of Chironomid larvae (insecta, Diptera) to ecological quality in Mediterranean river mesohabitats (South Italy). *River Research and Applications* 26: 1036–1051.
- Olafsson, J. S. & D. M. Paterson, 2004. Alteration of biogenic structure and physical properties by tube-building chironomid larvae in cohesive sediments. *Aquatic Ecology* 38: 219–229.
- Péry, A. R. R., R. Mons & J. Garric, 2004. Energy-based modeling to study population growth rate and production for the midge *Chironomus riparius* in ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology* 13: 647–656.
- Pillot, H. K. M. M., 1984a. De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). 1A: Inleiding, Tanypodinae en Chironomini. St. E.I.S. Nederland, Leiden.
- Pillot, H. K. M. M., 1984b. De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). 1B: Orthocladiinae sensu lato. St. E.I.S. Nederland, Leiden.
- Pillot, H. K. M. M., 2009. Chironomidae Larvae of the Netherlands and adjacent lowlands: biology and ecology of the chironomini. KNNV Publishing, Zeist.
- Raunio, J., J. Heino & L. Paasivirta, 2011. Non-biting midges in biodiversity conservation and environmental assessment: findings from boreal freshwater ecosystems. *Ecological Indicators* 11: 1054–1064.
- Rogers, S. I., K. R. Clarke & J. D. Reynolds, 1999. The taxonomic distinctness of coastal bottom dwelling fish communities of the North east Atlantic. *Journal of Animal Ecology* 68: 769–782.
- Smith, D. L. & D. A. Distler, 1981. Recovery of a benthic macroinvertebrate community following a toxic chemical discharge in a sandy plains stream. *The Southwestern Naturalist* 25: 547–551.
- Spies, M. & O. A. Sæther, 2004. Notes and recommendations on taxonomy and nomenclature of Chironomidae (Diptera). *Zootaxa* 752: 1–90.
- Thioulouse, J., D. Chessel, S. Doledec & J. M. Olivier, 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7: 75–83.
- Vallenduuk, H. J. & H. K. M. M. Pillot, 2007. *Chironomidae larvae of the Netherlands and Adjacent Lowlands: general ecology and Tanypodinae*. KNNV Publishing, Zeist.
- Warwick, R. & K. Clarke, 1998. Taxonomic distinctness and environmental assessment. *Journal of Applied Ecology* 35: 532–543.
- Warwick, R. & K. Clarke, 2001. Practical measures of marine biodiversity based on relatedness of species. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 39: 207–231.
- Warwick, R., C. Ashman, A. Brown, K. Clarke, B. Dowell, B. Hart, R. Lewis, N. Shillabeer, P. Somerfield & J. Tapp, 2002. Inter-annual changes in the biodiversity and community structure of the macrobenthos in Tees Bay and the Tees estuary, UK, associated with local and regional environmental events. *Marine Ecology Progress Series* 234: 1–13.
- Wiederholm, T., 1983. *Chironomidae of the Holarctic region: keys and diagnoses*. Publishing House of the Swedish Research Councils, Stockholm.
- Yount, J. D. & G. J. Niemi, 1990. Recovery of lotic communities and ecosystems from disturbance—a narrative review of case studies. *Environmental Management* 14: 547–569.

Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: toward the use of non-biting midges in bioassessment programs

Djuradj Milošević · Vladica Simić ·
Milica Stojković · Dubravka Čerba ·
Dejan Mančev · Ana Petrović · Momir Paunović

Received: 26 July 2012 / Accepted: 28 November 2012 / Published online: 25 December 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract We employed the self-organizing map (SOM) method to investigate the spatio-temporal pattern of the Chironomidae community in the Southern Morava River basin (Serbia) and to examine to what extent the Chironomidae community is affected by environmental factors. Additionally, this study explores the problems of utilizing chironomids in bioassessment programs. The SOM analysis of the

chironomid community data produced 3 groups of sites. The indicator species analysis presented indicator taxa for two groups. Twenty taxa (at species, species group and genus level), according to the Kruskal–Wallis test, showed the most pronounced differences among the temporal units. Out of 15 measured environmental parameters, one-way ANOVA pointed out that 10 significantly differ between the groups. Elevation had the most important influence on the chironomid community, also affecting other environmental parameters. According to our findings, the winter season and the periods with high water level are the main sources of natural variability. To avoid such variability and to successfully incorporate Chironomidae in bioassessment programs, we suggest exclusion of the arguable months from monitoring programs.

Handling Editor: Piet Spaak.

D. Milošević (✉) · M. Stojković
Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences
and Mathematics, University of Niš, Visegradska 33,
18000 Niš, Serbia
e-mail: djuradj@pmf.ni.ac.rs

V. Simić · A. Petrović
Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science,
University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12,
34000 Kragujevac, Serbia

D. Čerba
Department of Biology, University of J. J. Strossmayer
in Osijek, Cara Hadrijana 8A, 31000 Osijek, Croatia

D. Mančev
Department of Computer Sciences, Faculty of Sciences
and Mathematics, University of Niš, Visegradska 33,
18000 Niš, Serbia

M. Paunović
Institute for Biological Research “Siniša Stanković”,
University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142,
11000 Belgrade, Serbia

Keywords Chironomidae larvae · Community pattern · Bioassessment · Self-organizing map (SOM) method

Introduction

Members of the family Chironomidae (Diptera), as one of the most dominant group among the aquatic macroinvertebrates, are commonly used in bioassessment (Rosenberg 1993; Edwards et al. 2000; Puntí et al. 2009). Understanding community pattern is the main prerequisite for including benthic macroinvertebrates in assessment programs (Park et al. 2003). This is also

true for the Chironomidae family, since the changes in community structure can elucidate the consequences which anthropogenic activities, or natural deterioration, have on the lotic ecosystem (Armitage et al. 1995). Initially, the majority of studies on chironomid larvae were focused on the communities in lentic ecosystems (Rosenberg 1993; Lindegaard and Brodersen 1995). On the other hand, the studies presenting lotic systems usually reveal data about the chironomid communities in arctic or tropical regions (Helson et al. 2006; Lencioni et al. 2007). According to the literature, there is no common stance on incorporating chironomids in bioassessment programs focused on common stressors, such as organic pollution, acidification and degradation in stream morphology. In the majority of assessment methods most commonly applied in the standard monitoring programs of different countries, Chironomidae larvae are either not used or family or sub-family levels are applied (Hilsenhoff 1982; Armitage et al. 1983; De Pauw and Vanhooren 1983; Metcalfe 1989; Wright et al. 1998). However, there are several indices which include some species or genera of Chironomidae in calculating the final quality score (e.g. River Oligochaeta-Chironomidae Index, Paasavirta 1990; ECO, Verdonshot 1990, Saprobic indices, AQEM 2002). The argument for the inclusion of chironomids in any biodiversity, monitoring, and environmental assessment programs lies in their ubiquity, species richness, high ecological diversity, and very high numbers of individuals (Coffman 1995; Ferrington 2008), especially in deteriorated parts of lotic systems (De Bisthoven et al. 2005). Larvae can survive extreme temperatures, pH values, oxygen concentrations, or pollution and are representants of different species living in various habitats with different substrates, current velocity, or productivity (Helson et al. 2006). Earlier studies have explained how the chironomid community can be used in different bioassessment programs, e.g., the estimation of specific types of pollution (Lenat 1983), and thus improve and enhance bioassessment accuracy (Edwards et al. 2000; King and Richardson 2002; Janssens de Bisthoven and Gerhardt 2003; Waite et al. 2004; Koperski 2009; Milošević et al. 2012).

On the other hand, many authors have decided to excluded them from water quality assessment or have not extended the determination above the family level which creates room for errors (Raunio et al. 2011). For example, Kerans and Karr (1994) in their study

excluded the metric, “relative abundance” of chironomids, because of the great year-to-year differences which exceeded the site-to-site differences. Also, they concluded that it was necessary to carry out identifications up to genus or species level for invertebrates known to have pollution tolerance. Similar results were presented by Lenat (1983) where seasonal differences in species richness were significant. He warned that the taxa richness of Chironomidae, due to natural variation caused by stream size and season, must be used cautiously in environmental assessment. In addition, Langton and Casas (1998) and Rossaro et al. (2006) stated that the Chironomidae community structure in streams is strongly influenced by temporal variability. Besides their temporal variability, some studies have shown that chironomid community composition is also affected by spatial variability along the river continuum (Ward and Williams 1986; Lindegaard and Brodersen 1995). The other reasons why Chironomidae have been neglected in bioassessment programs, apart from their natural variability, are firstly that it is difficult to identify them up to genus or species level, and, secondly, their ability to adapt to changing environmental conditions (Raunio et al. 2011). Inspired by the obstacles in the previous study, Rabeni and Wang (2001) tested whether Chironomidae are necessary when utilizing macroinvertebrates in the bioassessment of streams. They concluded that incorporation of Chironomidae in the bioassessment method is not cost-effective and their exclusion from the rest of the macroinvertebrate community will not significantly diminish the sensitivity of the assessment method. Such strong natural variability has to be considered before applying changes in the chironomid assemblage structure to the anthropogenic effects assessment. Therefore, knowledge of the community pattern is a fundamental basis for solving problems with incorporating chironomids in bioassessment programs.

Some previous studies have tried to identify the spatial and temporal community patterns of chironomids in lotic systems (Lindegaard and Brodersen 1995; Lencioni and Rossaro 2005; Calle-Martínez and Casas 2006; Puntí et al. 2009). The listed authors used multivariate techniques such as principal component analysis, cluster analysis, and correspondence analysis. However, Kohonen artificial neural networks, also known as a self-organizing map (SOM), have been recently used to determine spatio-temporal patterns of

macroinvertebrate communities (Nijboer et al. 2005). The SOM was first used in patterning the benthic community by Chon et al. (1996). Since then, many authors have used SOM for clustering, classification, estimation, prediction, and data mining in various aspects of benthic macroinvertebrate research (Chon et al. 2000; Park et al. 2003; Park et al. 2004; Verdonschot 2005; Tang et al. 2010; Chon 2011). The SOM has also been used for the analysis of chironomid assemblages in various habitats and for the presentation of the assemblage patterns (Penczak et al. 2006). The main advantage of the SOM method is the ability to treat nonlinear relationships between variables, and SOM is less affected by outliers (Park et al. 2004). The non-metric multidimensional scaling (NMDS; Clarke and Gorley 2006) method, which can process nonlinear data, can also be applied in community pattern analysis. However, the SOM method is not limited when large data sets are included, *sensu* visual presentation, making full use of the available map space. It is not true for NMDS where 2-d or 3-d approximation of large data sets could be unreadable.

Since our data sets are large, nonlinear and composed of many species varying over different locations and time (Chon et al. 2000), and also have different distribution and density, they are more suitable for processing with the SOM method. Thus, we have chosen the SOM method to present our findings on the Chironomidae community pattern in the Southern Morava River basin (Serbia). The aim of the study was to (1) analyze spatial and temporal variations in the chironomid community, (2) investigate the importance of variations in environmental factors and their influence on the community pattern, and (3) explore the usefulness, and potential problems, of using chironomid larvae in bioassessment.

Materials and methods

Study area and sampling

The Southern Morava River is the largest river in southeastern Serbia. Its source is in the Skopska Crna Gora Mountains, Macedonia, from where it flows roughly northwards (Fig. 1). At 344 river km, it joins up with the Western Morava River, creating the Great Morava River, which flows into the Black Sea. The Southern Morava River has a catchment area of

15,469 km², of which 14,372 km² (92.91 %) is situated in Serbia and 1,097 km² (7.09 %) in Bulgaria, through this river's right-hand tributary, the river Nisava. According to Paunović et al. (2012), the catchments area is situated in ecoregion 5. The Southern Morava has numerous tributaries most of which dry out during the summer. The largest permanent left-hand tributaries are the Jablanica, Veternica, Toplica, and Pusta Reka rivers. The right-hand tributaries are the Vlasina, Nisava (the longest), and Sokobanjska Moravica rivers (Gavrilović and Dukić 2002).

Field campaigns were conducted from May 2010 till March 2011 at 28 sites along the Southern Morava River. In both years, samples were taken twice per season, except in the spring, when high water levels prohibited sampling in April. Site 15 was not included in the present analysis due to the absence of the Chironomidae species during four of the sampling months and heavy water pollution. Also, we were not able to sample on sites 2, 8, and 28 in May due to the high water level. Further, on site 23, sampled in July, Chironomidae specimens were not recorded. Sampling sites were selected according to their position and characteristics so as to ensure diverse habitat conditions, i.e., to include different stream orders and a variety of habitats (Fig. 1).

We used a priori classification of sites in order to define stream types and diminish the natural variability. A priori landscape classification is based on the following variables: (1) elevation (four categories: lowland (up to 200 m.a.s.l.), submontane (200–500 m.a.s.l.), montane (500–800 m.a.s.l.) and highland (over 800 m.a.s.l.)); (2) the size of the catchment area (five categories: creek, small, medium, large, very large river); (3) type of bed material (three categories: siliceous, calcareous, organic); (4) types of dominant substrate material (three categories: rough, medium fine and fine sediment). Finally, running water types are separated into the five types of watercourses: (1) lowland, large rivers with predominance of fine substrate; (2) large rivers with predominance of medium fine substrate; (3) small to medium-sized streams, up to 500 m.a.s.l., with predominance of rough substrate; (4) small to medium-sized streams, over 500 m.a.s.l., with domination of rough substrate highland; (5) lowland streams, except those classified in type 1. In this study, all sites investigated are classified into three, a priori defined, types of watercourses (Type 2, 3 and 4, see Table 1) (Paunović et al. 2011). All these parameters

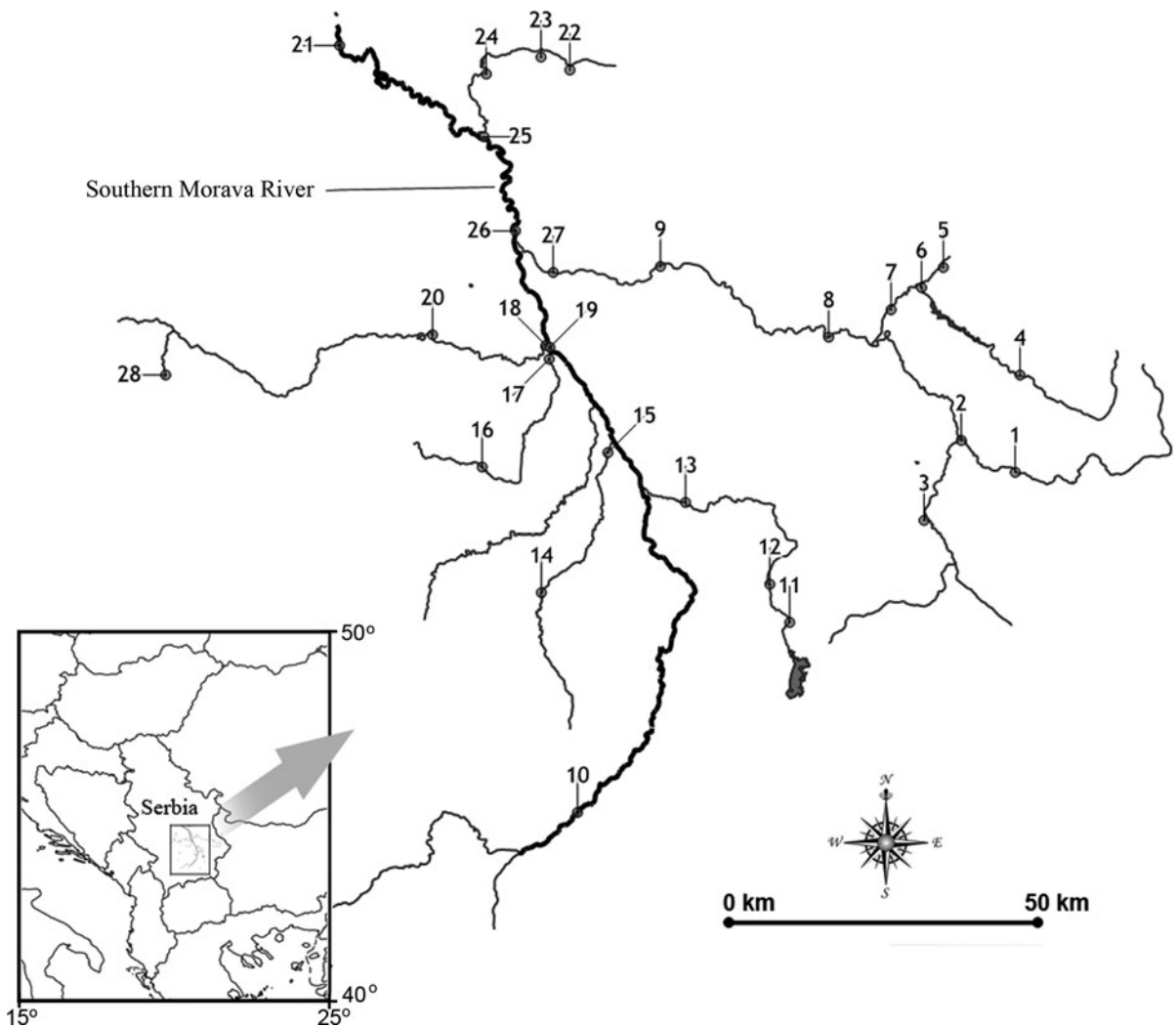


Fig. 1 Sampling sites over the Southern Morava River system

used in a priori classification are independent of any anthropogenic impact.

At each site, three subsamples of zoobenthos were collected from the most common substrate types with a 0.0625 m² Surber sampler of 250 mm mesh. The subsamples were merged to a single sample. Chironomid larvae specimens were separated from the rest of the macroinvertebrates, identified up to the genus, subgenus, or species level with established keys (Wiederholm 1983; Moller Pillot 1984a; Moller Pillot 1984b; Schmid 1993; Vallenduuk and Moller Pillot 2007), and counted (ind/m²). The taxonomy used here follows Spies and Sæther (2004) with adjustments according to H. Moller Pillot (pers. comm.).

Simultaneously with benthos sampling, the physicochemical parameters of water were measured in all seasons with a WTW multi 340i probe (WTW GmbH, Weilheim) for temperature, conductivity, pH and oxygen content (DO), and saturation (DO%). Oxygen demand (BOD₅) was estimated using the standard methodology recommended by (APHA 1999). The Shimatzu UV–Vis Spectrophotometer was used for measuring the concentrations of ammonia nitrogen (NH₄-N), nitrate nitrogen (NO₃-N), and orthophosphates (PO₄-P). Water transparency was measured with a Lovibond PC Checkit and velocity was determined with a flow meter Aquatech GMH 3330.

Table 1 Geographic coordinates and a priori classification of sampled sites in the Southern Morava River basin

River	Site	A priori river types	Geographic coordinates	
			N	E
Nisava	1	3	43°00' 50"	22°48' 02"
Jerma	2	3	43°03' 40"	22°41' 24"
Jerma	3	4	42°56' 41"	22°37' 07"
Visocica	4	4	43°07' 12"	22°48' 57"
Temsica	5	4	43°19' 21"	22°39' 36"
Visocica	6	4	43°17' 48"	22°36' 42"
Temsica	7	3	43°15' 39"	22°33' 06"
Nisava	8	3	43°13' 25"	22°25' 47"
Nisava	9	3	43°19' 51"	22°04' 24"
Southern Morava River	10	2	42°43' 56"	22°03' 43"
Vlasina	11	4	42°47' 47"	22°19' 58"
Vlasina	12	4	42°50' 54"	22°17' 24"
Vlasina	13	3	42°58' 23"	22°07' 08"
Veternica	14	3	42°50' 37"	21°49' 34"
Veternica	15	3	43°03' 14"	21°58' 11"
Pusta River	16	3	43°01' 51"	21°42' 07"
Pusta River	17	3	43°11' 36"	21°50' 47"
Toplica	18	3	43°12' 46"	21°50' 05"
Southern Morava River	19	2	43°12' 43"	21°50' 48"
Toplica	20	3	43°13' 56"	21°36' 16"
Southern Morava River	21	2	43°40' 38"	21°24' 55"
Sokobanjska Moravica	22	3	43°38' 06"	21°53' 38"
Sokobanjska Moravica	23	3	43°39' 35"	21°49' 51"
Sokobanjska Moravica	24	3	43°37' 30"	21°42' 57"
Sokobanjska Moravica	25	3	43°32' 09"	21°42' 49"
Southern Morava River	26	2	43°23' 14"	21°46' 24"
Nisava	27	2	43°49' 20"	21°52' 21"
Lukovska River	28	4	43°09' 52"	21°01' 56"

Data analysis

To present the spatio-temporal distribution of the Chironomidae community and to pattern it with environmental factors, we used the Kohonen unsupervised artificial neural network, also known as a SOM (Kohonen 1982). When applied to community data, the SOM can visualize and explore linear and nonlinear relationships in high-dimensional data sets. The input for the SOM is the input matrix which, in our study, consists of 185 rows (sampling sites) and 110 columns (taxa). The relative abundance data were log-transformed ($\log(x + 1)$) and then normalized. Each input vector (a row of the input matrix) was sent

through the network throughout the learning process. During this process, a model of the community data was created in each output neuron. All these neurons present the output layer represented by a codebook matrix. It consists of two-dimensional grids, where the differences between neurons, i.e., models carried by the neurons, increase in accordance with mutual distance increase. The total variability observed in the data set was covered by models from all neurons (Penczak et al. 2006). To distinguish subsets of neurons on the trained SOM map, we used the k -means method (Jain and Dubes 1988).

In the previous trained SOM, environmental variables were included as a passive variable which could

not influence ordination and clustering based on biological data. We subjected each environmental variable to the SOM and calculated the mean value of each environmental variable in each output neuron of the trained SOM, which was occupied by at least one input vector (Park et al. 2003). The relationship between environmental variables and the SOM map was presented by a visualization technique (named component planes) produced by SOM software in the form of a grayness gradient. If the environmental parameter, distributed on the SOM map, forms a clear gradient, it means that it highly contributed to the community pattern. On the other hand, if there is no clear gradient, the influence of this pattern is insignificant. The component planes of chironomid taxa were also used to provide more detailed information on how environmental factors influence the distribution of particular taxa.

The number of output neurons (map resolution) is a very important parameter for the detection of deviation in the data. If the resolution of the network is wrong, for example, too low, some important differences in data variability might be omitted. On the other hand, if the map resolution is too high (many neurons without assigned samples), the differences are too small for a plausible interpretation (Céréghino and Park 2009). Unfortunately, there is no conventional theoretical method for the determination of the best optimal map resolution. In our study, we used the two most recommended methods (Vesanto et al. 2000; Park et al. 2003). In the first, proposed by Vesanto et al. (2000), the optimal number of neurons in the map is close to $5\sqrt{n}$, where n is the number of training samples. In the alternative method, the optimal resolution is determined by considering the local minimum quantization error (QE) and topographic error (TE) (Park et al. 2003). Using these methods and trying to avoid a large number of empty output neurons (Penczak et al. 2012), we found that an 8×7 grid is most appropriate for our study.

To obtain a better interpretation of the displayed patterns from the ecological data, the indicator values (IndVal) of Dufrêne and Legendre (1997) were used, since the SOM analysis does not provide any statistical indications on species responsible for the distinguished clusters. We applied the Monte Carlo significance test with 1,000 permutations to identify significant species with IndVal more than 25%. Those species are representative for their group of sites, and their relative frequency and abundance are at least 50% within that

group of sites. Species which have IndVal values less than 25%, with statistical significance ($P > 0.05$), are important for the group, providing supplementary information, but with low values of relative frequency. Analysis of IndVal was performed using the PC-ORD 4.0 for Windows software (McCune and Mefford 1999).

Significant differences in the composition of the Chironomidae community between months were tested using the Kruskal–Wallis test. The effect size of temporal variability was based on “eta-squared” (η^2) which can range from 0 to 1.0. This measure of effect size indicates that temporal variation can have weak ($\eta^2 = 0.01$), intermediate ($\eta^2 = 0.06$) and strong effect ($\eta^2 = 0.14$) on community composition (Cohen 1988). Also, one-way ANOVA was used to test differences in environmental factors between the groups based on biological data (see “Results”). Post hoc, pairwise comparisons were tested using Tukey’s HSD test. All ANOVA-based analyses were conducted in SPSS version 15.0.

Results

Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community

During the study, a total of 35,185 specimens were recorded, distributing over 5 subfamilies, 65 genera, and 110 taxa (Table 2). The SOM analysis of the chironomid community data produced 3 groups of sites (A, B and C; Fig. 2). To provide an optimal number of sites per group for the statistical analysis, we did not consider any further cluster divisions. These groups were validated by the IndVal analysis which produced indicator taxa for each group. The IndVal analysis estimates significant IndVal of taxa for the two groups (Table 3). The most significant differences emerged between groups B and C, which differ considerably according to a priori classification, as well as the spatial origin of the sites (Fig. 2; Table 1). According to a priori classification, 73% (42 out of 57) of present sites in group B belongs to type 4 and the rest to type 3. The IndVal method revealed 8 representative taxa and 13 taxa with IndVal lower than 25% (Table 3).

In contrast to group B, group C was composed of sites which mainly (60.8%) belong to type 3 of the a priori classification (35 out of 58 sites). The rest of the

Table 2 Chironomid taxa of the Southern Morava river system recorded during the sampling period

Taxa	Taxa
Subfamily Chironominae	<i>Eukiefferiella claripennis</i> (Lundbeck 1898)
<i>Chironomus</i> spp.	<i>Eukiefferiella clypeata</i> (Kieffer 1923)
<i>Cladotanytarsus</i> spp.	<i>Eukiefferiella coerulea</i> (Kieffer 1926)
<i>Cryptochironomus</i> sp.	<i>Eukiefferiella fittkaui</i> Lehmann 1972
<i>Demicryptochironomus vulneratus</i> (Zetterstedt 1838)	<i>Eukiefferiella gracei</i> (Edwards 1929)
<i>Dicrotendipes nervosus</i> (Staeger 1839)	<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i> (Edwards 1929)
<i>Dicrotendipes notatus</i> (Meigen 1818)	<i>Eukiefferiella lobifera</i> Goetghebuer 1934
<i>Endochironomus albipennis</i> (Meigen 1830)	<i>Eukiefferiella minor</i> (Edwards 1929)
<i>Endochironomus dispar</i> (Meigen, 1830)	<i>Eukiefferiella tirolensis</i> Goetghebuer 1938
<i>Glyptotendipes</i> sp.	<i>Heleniella ornaticollis</i> (Edwards 1929)
<i>Harnischia</i> sp.	<i>Krenosmittia</i> sp.
<i>Microchironomus tener</i> (Kieffer 1918)	<i>Limnophyes</i> sp.
<i>Micropsectra bidentata</i> Goetghebuer 1921	<i>Nanocladius dichromus</i> (Kieffer 1906)
<i>Micropsectra</i> sp.	<i>Nanocladius rectinervis</i> (Kieffer 1911)
<i>Microtendipes pedellus</i> agg. sensu Moller Pillot (1984)	<i>Orthocladius (Euorthocladius)</i> sp.
<i>Parachironomus frequens</i> (Johannsen 1905)	<i>Orthocladius (Orthocladius)</i> spp.
<i>Paracladopelma laminatum</i> (Kieffer 1921)	<i>Orthocladius frigidus</i> (Zetterstedt 1838)
<i>Paracladopelma nigrifulvum</i> (Goetghebuer 1942)	<i>Orthocladius lignicola</i> Kieffer 1914
<i>Paralauterborniella nigrohalteralis</i> (Malloch 1915)	<i>Orthocladius rivulorum</i> Kieffer 1909
<i>Paratanytarsus austriacus</i> (Kieffer 1924)	<i>Paracadius conversus</i> (Walker 1856)
<i>Paratanytarsus dissimilis</i> (Johannsen 1905)	<i>Paracricotopus niger</i> (Kieffer 1913)
<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen 1818)	<i>Parametriocnemus stylatus</i> (Spaerck 1923)
<i>Phaenopsectra</i> sp.	<i>Paratrichocladius rufiventris</i> (Meigen 1830)
<i>Polypedilum albicorne</i> (Meigen 1838)	<i>Paratrissocladius excerptus</i> (Walker 1856)
<i>Polypedilum convictum</i> (Walker 1856)	<i>Psectrocladius calcaratus</i> (Edwards 1929)
<i>Polypedilum cultellatum</i> Goetghebuer 1931	<i>Rheocricotopus chalybeatus</i> (Edwards 1929)
<i>Polypedilum laetum</i> (Meigen 1818)	<i>Rheocricotopus effusus</i> (Walker 1856)
<i>Polypedilum nubeculosum</i> (Meigen 1804)	<i>Rheocricotopus fuscipes</i> (Kieffer 1909)
<i>Polypedilum pedestre</i> (Meigen 1830)	<i>Rheosmittia spinicornis</i> (Brundin 1956)
<i>Polypedilum scalaenum</i> (Schränk 1803)	<i>Smittia</i> sp.
<i>Polypedilum uncinatum</i> Goetghebuer 1921	<i>Synorthocladius semivirens</i> (Kieffer 1909)
<i>Pseudochironomus prasinatus</i> (Staeger 1839)	<i>Thienemanniella clavicornis</i> (Kieffer 1911)
<i>Rheotanytarsus</i> spp.	<i>Thienemanniella majuscula</i> (Edwards 1924)
<i>Saetheria reissi</i> Jackson 1977	<i>Tvetenia bavarica</i> (Goetghebuer 1934)
<i>Saetheria</i> sp.	<i>Tvetenia calvescens</i> (Edwards 1929)
<i>Stempellinella brevis</i> (Edwards 1929)	<i>Tvetenia discoloripes</i> (Goetghebuer & Thienemann 1936)
<i>Stictochironomus maculipennis</i> (Meigen 1818)	Subfamily Prodiamesinae
<i>Stictochironomus pictulus</i> (Meigen 1830)	<i>Odontomesa fulva</i> (Kieffer 1919)
<i>Tanytarsus</i> spp.	<i>Prodiamesa olivacea</i> (Meigen 1818)
Subfamily Diamesinae	Subfamily Tanypodinae
<i>Diamesa</i> sp.	<i>Ablabesmyia longistyla</i> Fittkau 1962
<i>Potthastia gaedii</i> (Meigen 1838)	<i>Ablabesmyia phatta</i> (Egger 1864)
<i>Potthastia longimanus</i> Kieffer 1922	<i>Anatopynia plumipes</i> (Fries 1823)
Subfamily Orthoclaadiinae	<i>Apsectrotanypus trifascipennis</i> (Zetterstedt 1838)
<i>Brillia bifida</i> (Kieffer 1909)	<i>Arctopelopia barbaris</i> (Zetterstedt 1850)

Table 2 continued

Taxa	Taxa
<i>Brillia flavifrons</i> (Johannsen 1905)	<i>Conchapelopia melanops</i> (Meigen 1818)
<i>Cardiocladius fuscus</i> Kieffer 1924	<i>Krenopelopia</i> sp.
<i>Corynoneura</i> cf. <i>antennalis</i> sensu Schmid (1993)	<i>Macropelopia adauca</i> Kieffer 1916
<i>Corynoneura coronata</i> Edwards 1924	<i>Macropelopia nebulosa</i> (Meigen 1804)
<i>Corynoneura lobata</i> Edwards 1924	<i>Natarsia</i> sp.
<i>Corynoneura scutellata</i> Winnertz 1846	<i>Nilotanypus dubius</i> (Meigen 1804)
<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen 1818)	<i>Procladius</i> spp.
<i>Cricotopus</i> gr. <i>sylvestris</i> sensu Hirvenoja 1973	<i>Rheopelopia</i> sp.
<i>Cricotopus tremulus</i> (Linnaeus 1758)	<i>Tanypus kraatzi</i> (Kieffer 1912)
<i>Cricotopus triannulatus</i> agg. sensu Moller Pillot 1984	<i>Tanypus punctipennis</i> Meigen 1818
<i>Cricotopus trifascia</i> Edwards 1929	<i>Thienemannimyia</i> sp.
<i>Epoicocladius ephemerae</i> (Kieffer 1924)	<i>Zavreliomyia</i> sp.
<i>Eukiefferiella brevicar</i> (Kieffer 1911)	

The bold letters indicate subfamily names

sites are distributed into two a priori types (34 % in type 2 and 5.2 % in type 4). Twenty taxa with high and significant IndVal values are listed as representative members of the assemblage describing group C (Table 3). Also, 11 significant taxa with a low value of relative frequency were recorded for this group.

Finally, group A consists of sampling sites belonging mainly to a priori type 3 (65.7 %; 46 out of 70). The rest of the sites belong to type 2 (21.5 %) and type 4 (12.8 %). The IndVal analysis did not show any indicator taxa for this group.

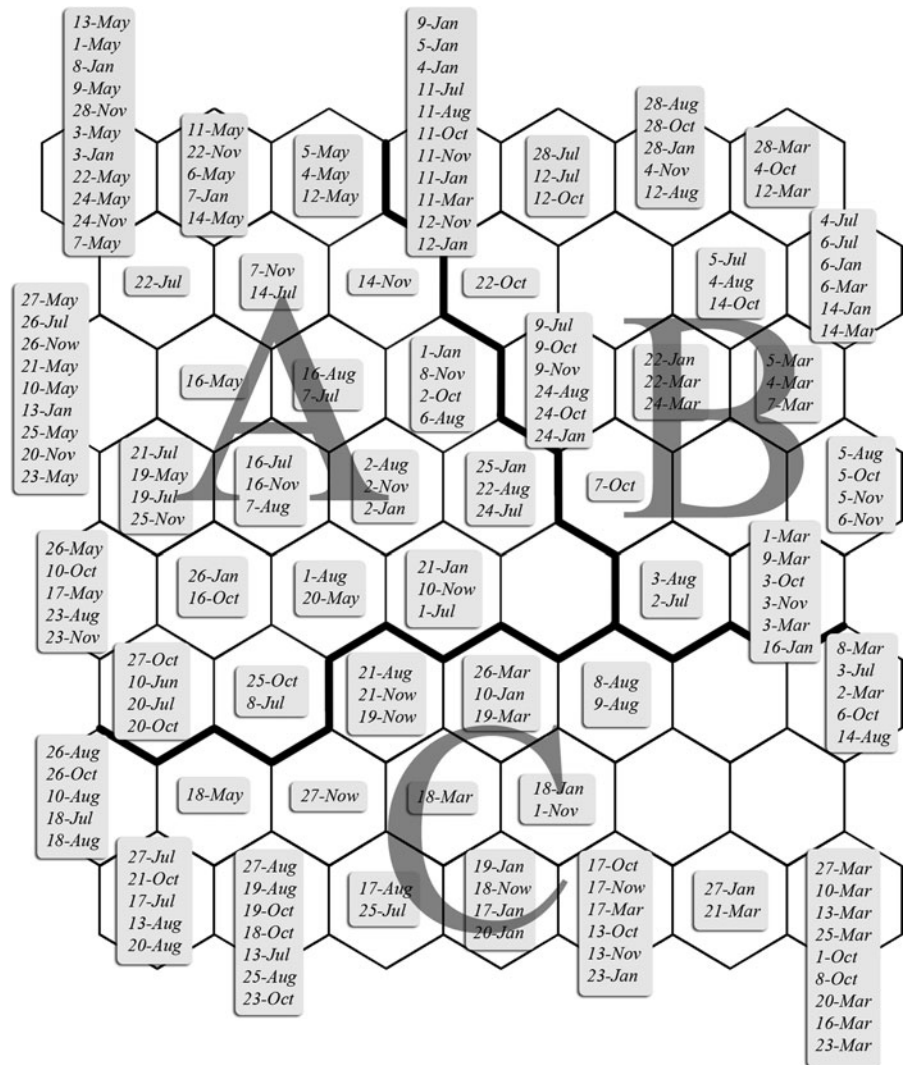
Besides the vertical gradient of the sites due to the spatial origin on the SOM map, the temporal pattern is also obvious (Fig. 2). The sites from the winter season, as well as those characterized by low temperature over the all seasons, are mostly distributed on the right part of the SOM map (96 %; 48 out of 50 samples). All sites sampled during the spring time are clustered on the left side of the map. The lower left part of the SOM map (where the highest recorded temperatures are found; Fig. 3a), as well as the middle part of the map, is characterized by the presence of sites mainly sampled in summer and autumn (Fig. 2).

The Kruskal–Wallis test revealed how seasonal variability affects the qualitative–quantitative composition of the chironomid community along all sites. Twenty taxa showed the most pronounced differences between temporal units (months). However, temporal variability had the strongest effect on 10 taxa which had η^2 values of more than 0.14 (Table 4).

Environmental pattern and water quality

From the 15 measured environmental parameters, one-way ANOVA pointed out that 10 (elevation, width, temperature, conductivity, transparency, velocity, hardness, NO₃–N, PO₄–P and BOD5) significantly differ between the groups divided by the k-means method in SOM analysis. Further analysis using Tukey's HSD test revealed which groups are significantly different for each environmental parameter (Table 5). Distribution of environmental parameters and abundance of indicator taxa (with IndVal values of more than 25 %) were visualized by SOM (Fig. 3a, b). Values of environmental parameters mainly changed from the lower left to the upper right course on the map. Elevation had the highest values in the upper right area and started decreasing toward the lower left corner of the map. On the other hand, temperature, width, conductivity, hardness, NO₃–N, and PO₄–P changed along the same line but in the opposite direction, showing a clear gradient over the map. BOD5 had a different distribution pattern with the highest values on the lower area of the map. The rest of the measured parameters did not show clear gradient over the SOM map. Following the main gradient direction of the mentioned parameters, two groups of taxa were presented. On the one side, all indicator taxa for group B (Table 3), except *Orthocladus* (*E.*) sp., had the highest abundance in the upper right corner, decreasing toward the bottom-left part of the SOM map (Fig. 3b).

Fig. 2 The map trained by SOM for patterning the Chironomidae community from different sites and months in the Southern Morava basin. To cluster neurons on the map, the k -means method was applied. Capital letters (A, B, and C) stand for different groups. The labels (codes) assigned to each neuron on the map present different sites sampled in different months. The number of the code defines a site, while three letters stand for particular months



These taxa were assigned to group B sites which were characterized by high elevation and low values of temperature and width. Sites from this group were also unpolluted (low values of BOD₅ and PO₄-P) with low mineral content (low values of conductivity, NO₃-N and mainly hardness) (Fig. 3a; Table 5). On the other side, unlike the previous distribution pattern, 21 taxa had the highest abundance in the lowest part of the map. These taxa, except *Orthocladius* (*E.*) sp., are indicators of group C (Table 3) which consists of the sites placed at lower elevation, with high values of temperature and width. Likewise, this group is rich in salt (high values of hardness, conductivity, NO₃-N) with a high level of pollution (high values of BOD₅ and PO₄-P). Sites from group A represent the intermediate

group according to all measured parameters (Fig. 3a; Table 5) but with no representative taxa.

Discussion

Spatio-temporal variability

The Chironomidae family, as a heterogeneous group of species with variable responses to environmental gradients (Lencioni and Rossaro 2005), is claimed to be sensitive to changes along the river continuum in association with elevation, stream order, and channel width (Ward and Williams 1986; Lindegaard and Brodersen 1995; Puntí et al. 2009). In our study, based

on the chironomid community composition and abundance, SOM analysis clustered three groups of sites. Group B was mostly presented by sites in headwaters (a priori type 4), which was not the case with group A and C, where absolute dominance of a particular a priori type has not been recorded. Taxa indicating for group B mostly belonged to the Orthoclaadiinae subfamily (71 %). This was expected since the headwaters are characterized by Orthoclaadiinae-dominated communities (Ward and Williams 1986; Rossaro 1991; Ferrington et al. 1993;

Fig. 3 a, b Visualization of (a) 15 environmental parameters in the previous trained SOM in gray scale (where: DO(mg/l)—dissolved oxygen; DO(%)—water oxygen saturation; NO₃-N—nitrate nitrogen; PO₄-P—orthophosphate; NH₄-N—ammonia nitrogen) with the presented range of variability for each parameter and (b) distribution pattern of 28 indicator taxa (with IndVal values of more than 25 %) on the SOM map Bars for each map represent (a) the measured values of the parameters or (b) abundance of indicator taxa (in brackets, the maximum number of specimens per m²). The shade of black for each parameters/taxa is highly correlated with its maximum value/abundance measured in the study. A lighter shade of gray indicates a decline of these parameters/taxa

Table 3 Representative and significant Chironomidae taxa for the SOM clusters

Taxa	Gr.	InV	Taxa	Gr.	InV
<u><i>Parametriocnemus stylatus</i></u>	B	56.1***	<u><i>Cricotopus triannulatus</i></u> agg	C	82.3***
<u><i>Tvetenia bavarica</i></u>	B	53.8***	<u><i>Rheocricotopus chalybeatus</i></u>	C	71.7***
<u><i>Epoicocladus ephemerae</i></u>	B	52.3***	<u><i>Paratrichocladus rufiventris</i></u>	C	70.6***
<u><i>Rheocricotopus fuscipes</i></u>	B	46***	<u><i>Cricotopus bicinctus</i></u>	C	58.2***
<u><i>Prodiamesa olivacea</i></u>	B	34.9***	<u><i>Polypedilum scalaenum</i></u>	C	57.6***
<u><i>Orthocladus (E.) sp.</i></u>	B	31.2*	<u><i>Tvetenia calvescens</i></u>	C	50.4***
<u><i>Thienemannimyia sp.</i></u>	B	29.9***	<u><i>Cryptochironomus sp.</i></u>	C	48.5***
<u><i>Paratrissocladius excerptus</i></u>	B	25.2***	<u><i>Orthocladus (O.) spp.</i></u>	C	43.5***
<i>Polypedilum laetum</i>	B	21.2*	<u><i>Synorthocladus semivirens</i></u>	C	42.4***
<i>Brillia bifida</i>	B	20.9**	<u><i>Thienemanniella majuscula</i></u>	C	41.4***
<i>Corynoneura lobata</i>	B	20.6***	<u><i>Microtendipes pedellus</i></u> agg.	C	41.1*
<i>Heleniella ornatocollis</i>	B	19***	<u><i>Rheopelopia sp.</i></u>	C	38.3**
<i>Macropelopia nebulosa</i>	B	16.2**	<u><i>Eukiefferiella lobifera</i></u>	C	37.5***
<i>Eukiefferiella brevicealcar</i>	B	15.9***	<u><i>Chonchapelopia melanops</i></u>	C	36.6***
<i>Odontomesa fulva</i>	B	15.1**	<u><i>Rheotanytarsus spp.</i></u>	C	36.6**
<i>Tvetenia discoloripes</i>	B	15.1*	<u><i>Chironomus spp.</i></u>	C	35.4*
<i>Potthastia gaedii</i>	B	15*	<u><i>Cladotanytarsus spp.</i></u>	C	28.3***
<i>Orthocladus rivulorum</i>	B	12.1*	<u><i>Eukiefferiella ilkleyensis</i></u>	C	27.7**
<i>Orthocladus lignicola</i>	B	10.2**	<u><i>Cricotopus trifascia</i></u>	C	26.4***
<i>Rheocricotopus effusus</i>	B	10.1**	<u><i>Potthastia longimanus</i></u>	C	25*
<i>Rheosmittia spinicornis</i>	B	6.5*	<i>Paratanytarsus dissimilis</i>	C	22.9***
			<i>Cardiocladius fuscus</i>	C	21.3***
			<i>Phaenopsectra sp.</i>	C	21***
			<i>Eukiefferiella gracei</i>	C	20.2**
			<i>Dicrotendipes nervosus</i>	C	19.8**
			<i>Harnischia sp.</i>	C	19***
			<i>Polypedilum pedestre</i>	C	15**
			<i>Brillia flavifrons</i>	C	14.4***
			<i>Saetheria reissi</i>	C	11.6*
			<i>Polypedilum nubeculosum</i>	C	6.9*
			<i>Polypedilum cultellatum</i>	C	5.2*

Underlined, bold taxa are representative taxa of the group, and they have IndVal values (InV) of more than 25 %. Other listed taxa are significant for groups (see discussion). Asterisks next to IndVal values indicate their significance level: * <0.05, ** <0.01, *** <0.001

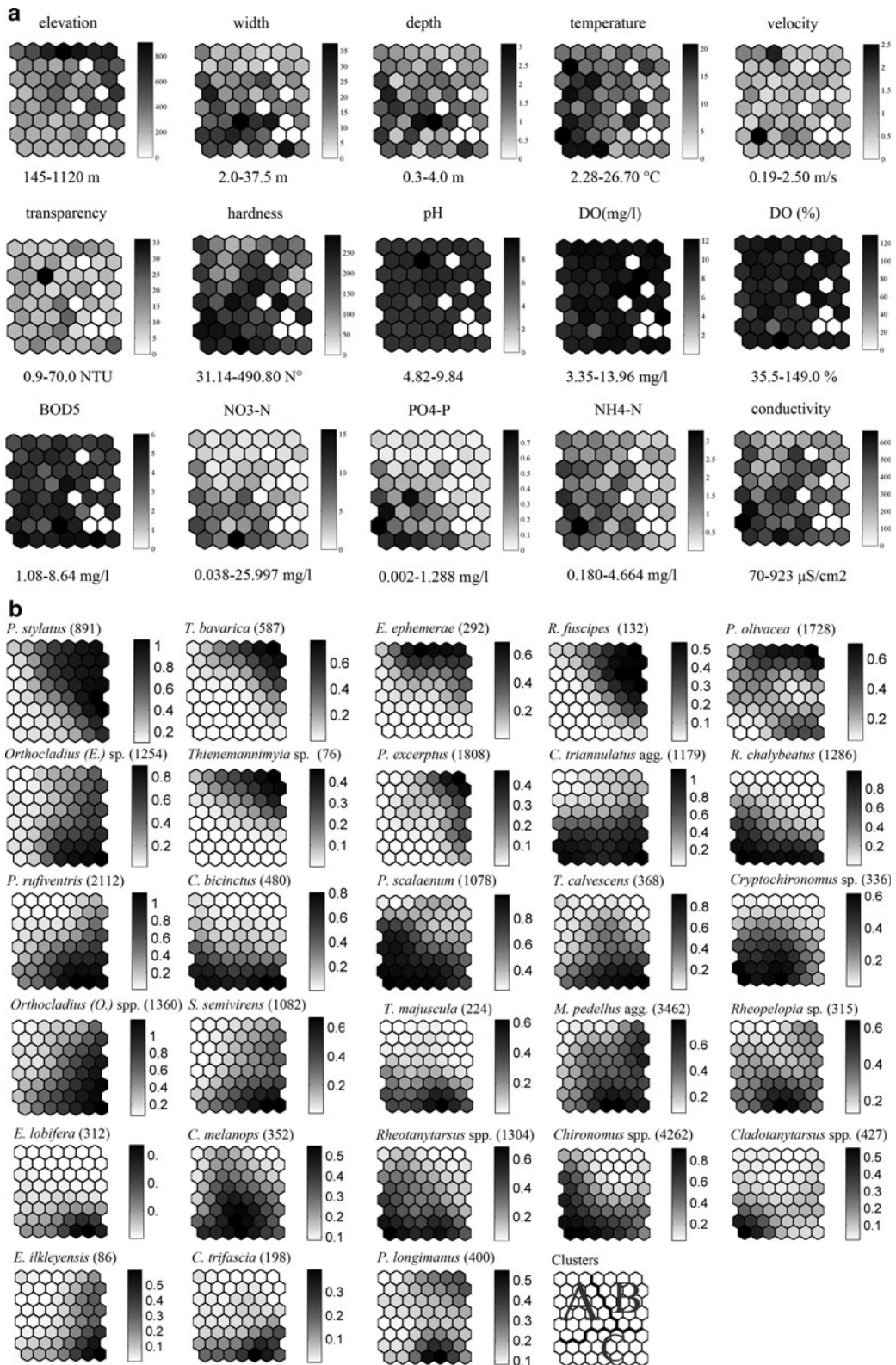


Table 4 The Kruskal–Wallis test presents Chironomidae taxa whose relative abundance differed significantly ($P < 0.05$) between months, with values of eta square (η^2), Chi square, degrees of freedom (df), and months with the highest Mean Rank (Md*)

Subfamily	Taxa	η^2	Chi square	df	P	Md*
Chironominae	<i>Cladotanytarsus</i> spp.	0.11	21.081	6	0.027	July-111.24
Chironominae	<i>Polypedilum convictum</i>	0.25	46.166	6	0.000	March-110.31
Chironominae	<i>Polypedilum scalaenum</i>	0.07	14.096	6	0.029	August-116.59
Chironominae	<i>Saetheria reissi</i>	0.19	36.786	6	0.000	August-109.35
Chironominae	<i>Tanytarsus</i> spp.	0.09	16.839	6	0.010	August-115.35
Diamesinae	<i>Diamesa</i> sp.	0.19	36.337	6	0.000	March-113.02
Orthoclaadiinae	<i>Cricotopus tremulus</i>	0.10	19.465	6	0.003	July-104.69
Orthoclaadiinae	<i>Cricotopus triannulatus</i> agg.	0.26	48.653	6	0.000	October-120.94
Orthoclaadiinae	<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i>	0.26	48.693	6	0.000	March-136.76
Orthoclaadiinae	<i>Eukiefferiella lobifera</i>	0.08	15.102	6	0.019	March-112.20
Orthoclaadiinae	<i>Nanocladius rectinervis</i>	0.08	15.637	6	0.016	Oct-104.76
Orthoclaadiinae	<i>Nilotanypus dubius</i>	0.08	15.405	6	0.017	Aug-112,13
Orthoclaadiinae	<i>Orthoclaadius rivulorum</i>	0.18	33.400	6	0.000	March-116.22
Orthoclaadiinae	<i>Orthoclaadius</i> (E.) sp.	0.41	75.725	6	0.000	March -159.81
Orthoclaadiinae	<i>Orthoclaadius</i> (O.) spp.	0.38	70.804	6	0.000	March -161.19
Orthoclaadiinae	<i>Parametriocnemus stylatus</i>	0.17	32.540	6	0.000	March -128.19
Orthoclaadiinae	<i>Rheocricotopus fuscipes</i>	0.08	16.452	6	0.012	Oct-111.13
Orthoclaadiinae	<i>Synorthoclaadius semivirens</i>	0.21	38.979	6	0.000	March -128.26
Orthoclaadiinae	<i>Orthoclaadius lignicola</i>	0.11	20.167	6	0.003	March -106.67
Tanypodinae	<i>Conchapelopia melanops</i>	0.07	14.283	6	0.027	Aug-116.31

Table 5 Mean values \pm 1 standard deviation for environmental parameters per group

Env. parameter	Group		
	A	B	C
Elevation (m ²)	405.43 \pm 220.993	512.63 \pm 287.226	256.88 \pm 109.618
Width (m)	14.56 \pm 10.511 ^a	12.60 \pm 10.286 ^a	19.84 \pm 11,368 ^b
Water temperature (°C)	12.990 \pm 6.058 ^a	10.229 \pm 4.665 ^b	13.641 \pm 5.864 ^a
Conductivity (μ S/cm ²)	362.12 \pm 160.498 ^a	332.58 \pm 165.487 ^a	471.14 \pm 151.385 ^b
Transparency (NTU)	11.1139 \pm 8.574 ^{a,b}	8.0458 \pm 5.42 ^a	13.6562 \pm 12.40 ^b
Velocity (m/s)	0.679 \pm 0.298 ^b	0.899 \pm 0.609 ^a	0.859 \pm 0.392 ^a
Hardness (N°)	169.428 \pm 67.983 ^a	161.536 \pm 90.491 ^a	206,230 \pm 68.168 ^b
NO ₃ -N (mg/l)	3.83707 \pm 3.924 ^a	2.30451 \pm 1.754 ^a	6.18217 \pm 5.511 ^b
PO ₄ -P (mg/l)	0.24849 \pm 0.342 ^a	0.12464 \pm 0.149 ^a	0.46173 \pm 0.452 ^b
BOD5 (mgO ₂ /l)	4.342 \pm 1.260 ^{a,b}	3.966 \pm 1.381 ^a	4.869 \pm 1.482 ^b

Values within the same row not sharing a common superscript letter are significantly different: ^{a,b} $P < 0.05$. If superscript letters are missing, all the values are significantly different

Lindegaard and Brodersen 1995). Out of these, the taxa recorded prefer pure and well-oxygenated waters (Helson et al. 2006). Larvae of the Chironomini tribe are usually scarce in headwaters and dominant in potamal communities (Pinder 1995). However,

Polypedilum laetum is presented in our study as a significant species for the headwater sites. Although this species was presented as being very tolerant to organic pollution (Orendt 2002) and has been found in mid/low-reaches (Puntí et al. 2009), it is often

characteristic for the pure or moderately polluted upper courses of rivers (Moller Pillot 2009). Most of the taxa listed for group B do not have IndVal values of more than 25 % which makes them important, but not representative for this group. The explanation could be that most of the mountain species are stenobiotic and have a small niche which consequently diminishes their relative frequency and in addition, their IndVal values (Penczak 2009). For example, the species *Eukiefferiella brevicealcar*, *Heleniella ornaticollis*, *Orthocladus rivulorum*, according to Rossaro (1991) and our data, prefer cold and well-oxygenated habitats, which restrict their distribution only to upper courses. In addition, the species *Orthocladus lignicola* has a low relative frequency as well, which could be explained by the fact that this xylophagous species is a habitat specialist (Brabec et al. 2007). Consequently, these species had low IndVal values (Table 3). This was not the case with the taxa describing group C with mid- and low-reaches where the dominance of ubiquitous species is expected (Calle-Martínez and Casas 2006; Puntí et al. 2009).

Site classification, based on biotic data, is not only influenced by natural variability, but also by human-related disturbance. This was particularly the case with group C, where mean values of chemical factors pointed to the presence of organic enrichment (Table 5; Fig. 3a). The taxa which represented this group (Table 3) are well known as the indicators of water quality impairment in all regions and all stream types (Wilson 1992; Bazzanti 2000; García and Laville 2000; Calle-Martínez and Casas 2006). However, contrary to our expectations, *Orthocladus* (*Orthocladus*) spp. emerged as an indicator taxa of this group too. Such a result could be explained by the presence of seasonal variability, since genus *Orthocladus* belongs to a group of winter taxa whose abundance and frequency rapidly increases during this season (Marziali et al. 2010). Likewise, the Kruskal–Wallis test confirmed the above statement, showing that besides other taxa (Table 4), *Orthocladus* (*O.*) spp. is also sensitive to seasonal variability, which will be discussed below. Since the taxa such as *Orthocladus* can comprise various species with different ecological preferences, these results should be interpreted with some caution due to the taxonomic resolution. However, the SOM method can detect whether the taxa has among-group differences related to species level, visualizing its abundance pattern over

time and space (see Fig. 3b). More precisely, if taxa contained a species with no significant differences in autecology, its abundance pattern would have the highest value only in one part (group of neurons) of the map, which is characterized by sampling sites with a particular habitat profile. Otherwise, it would be scattered over the map with no precision or regularity. Having this in mind, SOM can be used as a useful method of revealing sufficient taxa resolution for different indicator groups.

The temporal pattern is also visible on the SOM map. Sites sampled mainly during the winter are placed on the right side of the map. The Kruskal–Wallis test reveals that the taxa responsible for seasonal variability mainly belong to the subfamily Orthoclaadiinae. Marziali et al. (2010) claims that during winter time, the number of species belonging to Orthoclaadiinae and Diamesinae increases, which coincides with our findings. Also, this corresponds with the fact that the emergence patterns are different between Orthoclaadiinae, Diamesinae and Podonominae, which are considered to be spring forms, and Tanypodinae and Chironominae as mainly summer forms (García and Añón Suárez 2007). In our study, the Kruskal–Wallis test showed the same pattern, where taxa of Chironominae and Tanypodinae had the highest values of Mean Rank in July–August (except *Polypedilum convictum*), and Orthoclaadiinae and Diamesinae in March (Table 4). However, genera from the subfamily Orthoclaadiinae are more variable during the seasons than genera from other subfamilies. For example, during March in low-reach sites (10, 13, 17, 20, 21, 23, 27), the relative frequency of the subfamily Orthoclaadiinae rapidly increased (67, 43, 48, 46, 57, 51, and 58 %, respectively), having the highest values in comparison with the other months. This is especially true for genus *Orthocladus* (with the highest values of η^2 , see Table 4), which on the same sites rapidly became the most abundant taxa in the samples. According to the findings of H. Moller Pillot (pers. comm.), it can be assumed that *Orthocladus* cannot spend its whole life cycle in polluted streams, but older larvae have the ability to colonize the macrophytes in hypertrophic water and thus survive above the heavily polluted bottom. Therefore, *Orthocladus* presumably migrates during winter to the lower reaches, when water becomes colder and consequently well-oxygenated. Such temporarily altered conditions are more favorable for this genus. A significant increase of

Orthoclaadiinae abundance during the winter season could lead to confusing distribution pattern in low-reaches where dominance of this subfamily is unexpected (Helson et al. 2006). Finally, such changes in qualitative and quantitative composition, found in all seasons during the investigation, represent the natural variability effect which can decrease the accuracy of the impairment assessment.

On the other side of the SOM map (left side), sites sampled during the spring season are concentrated in group A (Fig. 2), possibly due to the influence of the high water level, which is responsible for changes in species composition. Some authors have recorded that spates reduce the density of chironomid species, which is sufficient to significantly alter the species composition of this group (Schmid 1992; Grzybkowska et al. 1996; Lobinske et al. 1996). Therefore, this could be a new source of variability and a new obstacle in incorporating chironomids in bioassessment programs.

The Chironomid community and environmental factors

It is very important for bioassessment programs to estimate to which extent environmental factors influence the chironomid community. The SOM map signifies a clear gradient (the lower left-upper right course) of environmental factors (Fig. 3a) which can be interpreted as a longitudinal zonation of the river (Vannote et al. 1980). Some studies investigating how longitudinal zonation has influenced Chironomidae in Mediterranean streams (Casas and Vilchez-Quero 1993; Puntí et al. 2009) have stressed that altitudinal gradient has the most important effect on assemblage composition. In our study, the longitudinal-elevation gradient to a great extent governs the river classification based on the chironomid community, discriminating high-elevation and mid/low-elevation groups of sites, which mainly coincides with the results presented by Puntí et al. (2009). River depth and width, which increase in accordance with altitudinal decrease (Vannote et al. 1980), also influence chironomid community distribution along the longitudinal gradient (Fig. 3a, b). Such spatial variability, which is mostly determined by altitudinal gradient, should be taken into consideration prior to the bioassessment research. During the site selection process, to avoid natural variability, AQEM (AQEM 2002) recommends not to take a huge altitudinal gradient into

consideration. Consequently, 29 river types have been defined in order to successfully formulate an assessment system. In all of these ecological entities, the elevation gradient is not wider than 600 m (Hering et al. 2004). Following this recommendation, Marziali et al. (2010) created a metric, based on the chironomid community, which successfully discriminates quality classes in Mediterranean rivers. Raunio and Muotka (2005) showed that sampling strategy can vary spatially, explaining the differences in emergence periods at different altitudes. On the other hand, the Rapid Bioassessment Protocol (RBP; Barbour et al. 1999) proposes the diminishing of natural variability after the site selection, by means of data analysis. According to this approach, homogenization of sites could be based on both physicochemical and biogeographical attributes or biotic information.

Besides natural variability, the chironomid community is sensitive to anthropogenic impact. Many studies have successfully pointed out how environmental variables, which indicate organic enrichment, are connected with changes in the chironomid community. According to Wilson (1992), ammonia, phosphorus, and BOD can be connected with shifts in the chironomid community. Also, chironomids can be correlated with other environmental parameters, such as a gradient of water quality impairment with increasing $\text{NO}_3\text{-N}$ concentration and conductivity (Calle-Martínez and Casas 2006). A similar pattern was shown by Milošević et al. (2012), where the Chironomidae community was significantly correlated with DO, BOD5, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, and conductivity. However, the community in that study was presented by a taxonomic distinctness index using only present/absent data. In the present study, where we included all seasons and both the qualitative and quantitative composition of chironomids, their relationship with environmental factors was consistent with the previous study, except for DO. The lack of gradient on the SOM map for this factor appeared due to an unexpected increase in oxygen concentration in group C, which includes low-reaches and mid-reaches with the highest level of impairment. Sites sampled in the winter are most likely responsible for the recorded increase in the C group, since the oxygen increase is usual during winter, thus increasing the average of oxygen concentration assigned to C group neurons where the winter months have been recorded (see Fig. 3a).

Finally, SOM analysis confirmed (Fig. 3b) that taxa such as *Chironomus* spp., *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg., *Paratrichocladius rufiventris*, and *Rheocricotopus chalybeatus* are members of an assemblage tolerant to organic pollution (Wilson 1992; Calle-Martínez and Casas 2006). Out of these well-known indicators of pollution, despite having high IndVal in our study, only *C. bicinctus*, *C. triannulatus* agg., and *R. chalybeatus* had uniform distribution along group C on the SOM map showing their resistance to temperature variation (Fig. 3a, b). Other taxa of highly polluted sites were sensitive to temperature and either preferred only a high temperature (*Chironomus* spp., *Cladotanytarsus* spp., *Polypedilum scalaenum*) or had the highest value of abundance at lower temperatures (*Cricotopus trifascia*, *Eukiefferiella ilkleyensis*, *P. rufiventris*, *Synorthocladius semivirens*, *Tvetenia calvescens*). It means that only a few taxa (*C. bicinctus*, *C. triannulatus* agg. and *R. chalybeatus*) could be considered as suitable indicators of organic pollution, due to their tolerance to temperature variation.

Bioassessment: possibilities and applications

It has been common to exclude chironomids from bioassessment programs because the complex identification of these macroinvertebrates requires taxonomic expertise. Likewise, the huge natural variability in this group usually overcomes that which is induced by anthropogenic impairment. In our study, most seasonal variation was seen during winter, which significantly altered the community structure. Also, the period of high water level could have had a similar effect on the chironomid community. Some authors have recommend excluding winter from monitoring and assessment programs because of extreme hydrological regimes and temperatures (Gabriels et al. 2010) and for logistical reasons (Šporka et al. 2006). It is known that excluding seasons from macroinvertebrate community investigations could lead to the loss of important information for bioassessment; nevertheless, Furse et al. (1984) recommend that three seasons are sufficient for the characterization of the annual pattern of the macroinvertebrate community. Within the scope of the multimetric AQEM assessment system (Hering et al. 2004), a sampling procedure has been developed to fulfill the requirements of the EU water framework directive. The AQEM requires

the inclusion of at least two seasons to identify the period best suitable for the assessment. Bearing in mind the differences in life cycles within macroinvertebrate groups, different seasons are found to be suitable for particular indicator groups. Therefore, RBP recommends that the selection of the season should be synchronized with the seasonality of the target group. Raunio and Muotka (2005) stress the necessity for determining the temporal framework for sampling strategy when the Chironomidae family is used in biomonitoring programs. The authors point out that it is necessary to include three different seasons (spring, mid-summer, and late summer/autumn) to catch “the signal” from the chironomid community in boreal rivers. Having this in mind, we would suggest the exclusion of both the winter season and high water level periods (usually early spring), from the bioassessment programs of temperate aquatic systems, to diminish variability within the Chironomidae assemblage. Another solution could be taking into account seasonal variation in setting quality class thresholds.

The AQEM procedure generated the taxa list which includes autecological information for the individual taxa (Hering et al. 2004). Out of 9,446 listed European macroinvertebrate taxa, the Chironomidae family has a remarkably high number of 1,250 taxa (189 genera) but with great data deficiency regarding autecological information, for example: saprobic valence, altitudinal, temperature, current or feeding preference (Brabec et al. 2007). Having in mind that this data set is the base for all metric calculations in the AQEM program, it is understandable why there are few metrics applied to chironomid taxa. This further stresses the need for more comprehensive studies concerning the chironomid community and the autecology of indicator taxa in various biogeographical regions. Research projects such as ours could contribute to the improvement of different metrics, providing detailed information on many taxa in diverse habitat conditions. Also, the new approach to the preparation and publication of identification keys, including useful autecological information in description of listed species (Vallenduuk and Moller Pillot 2007; Orendt and Spies 2012), cannot only resolve the problem of lack of information, but can also facilitate the difficult larvae identification process.

The inclusion of chironomids in type-specific water status assessment, as proposed by the EU water framework directive, as well as in the screening

programs, allows a rapid assessment of the presence of different stress factors which would improve some widely used indices, e.g., saprobic indices or BMWP (AQEM 2002). Saprobian indices are widely used in the world and their advantages and limits are already well known. Thus, the improvement of indicator lists by inclusion of indicator values for selected Chironomidae taxa would be a promising step forward regarding the increase in the saprobic indices sensitivity. On the other hand, original and modified versions of BMWP scores are based on the use of higher taxonomical units (taxa groups). With certain improvements in taxonomical resolution, that is, by excluding specific taxa from the general taxa group, the confidence of index could be significantly improved (e.g., separating selected chironomid taxa from the Chironomidae group and giving them a different indicator value).

In conclusion, the species of Chironominae and Tanyptodinae recorded during this research which showed temporal variability had the highest values of Mean Rank in July and August (except *Polypedilum convictum*), representing summer forms, while Orthocladiinae and Diamesinae represent the spring forms. The highest natural seasonal variability can be seen in genus *Orthocladus*, which belongs to a group of winter taxa whose abundance and frequency rapidly increases during this season. This could lead to wrong conclusions on the spatial distribution pattern of the chironomid community, diminishing the accuracy of the impairment assessment.

Changes in the water level are one of the most important parameters responsible for the changes in the species composition and chironomid community pattern and should be taken into consideration during bioassessment programs. Also, longitudinal zonation influences the chironomid community distribution along the longitudinal gradient, which is mostly determined by elevation gradient. Anthropogenic influence, reflected in the concentrations of nitrogen, phosphorus, and BOD₅, can also significantly alter the community composition and abundance, and in this study, *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg., and *Rheocricotopus chalybeatus* could be considered indicators of organic pollution, due to their presence at all disturbed sites regardless of temperature variation. The use of chironomids in type-specific water status assessment and screening programs allows a rapid assessment of the presence of stress factors which could lead to the improvement of

different biological indices. Finally, the exclusion of both the winter season and high water level periods (usually early spring), as the prime source of natural variability within the Chironomidae assemblage, from the bioassessment programs of temperate aquatic systems, would contribute to the accurate assessment of water quality and habitat status.

Acknowledgments This study was supported by grants #043002 (“Biosensing technologies and global system for longterm research and integrated management of ecosystems”) and # 174013 by the Serbian Ministry of Education and Science. We want to thank H. M. Pillot (Tilburg, The Netherlands) for the great support and useful advice about this study. Also we want to thank Professor B. Rossaro, Dipartimento di Biologia, Sezione di Ecologia, Università degli Studi di Milano, Italy, and Professor T. Penczak (Poland) for help with data analysis.

References

- APHA (1999) Standard methods for the Examination of water and wastewater. 9th American Public Health Association, Washington
- AQEM (2002) Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Contract No: EVK1-CT1999-00027)
- Armitage PD, Moss D, Wright JF, Furse MT (1983) The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Res* 17:333–347. doi: [10.1016/0043-1354\(83\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90188-4)
- Armitage PD, Cranston P, Pinder LCV (1995) The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges. Chapman and Hall, London
- Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB (1999) Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish, 2nd edn. EPA 841-b-99-002. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC
- Bazzanti M (2000) Ecological requirements of chironomids (Diptera: chironomidae) on the soft bottom of the river Arnone, Central Italy. *J Freshw Ecol* 15:397–409. doi: [10.1080/02705060.2000.9663758](https://doi.org/10.1080/02705060.2000.9663758)
- Brabec K, Janecek BFU, Rossaro B, Spies M, Bitusik P, Syrovatka V, Schmidt-Kloiber A (2007) Chironomidae indicator database. Euro-limpacs project, workpackage 7—indicators of ecosystem health, task 4. www.freshwatercolony.info. Version 5.0
- Calle-Martínez D, Casas JJ (2006) Chironomid species, stream classification, and water-quality assessment: the case of 2 Iberian Mediterranean mountain regions. *J North Am Benthol Soc* 25:465–476. doi: [10.1899/0887-3593\(2006\)25\[465:CSSCAW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[465:CSSCAW]2.0.CO;2)
- Casas J, Vilchez-Quero A (1993) Altitudinal distribution of lotic chironomid (Diptera) communities in the Sierra Nevada

- mountains (Southern Spain). *Ann Limnol* 29:175–185. doi: [10.1051/limn/1993016](https://doi.org/10.1051/limn/1993016)
- Céréghino R, Park YS (2009) Review of the Self-Organizing Map (SOM) approach in water resources: commentary. *Environ Modell Softw* 24:945–947. doi: [10.1016/j.envsoft.2009.01.008](https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2009.01.008)
- Chon TS (2011) Self-organizing maps applied to ecological sciences. *Ecol Inform* 6:50–61. doi: [10.1016/j.ecoinf.2010.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2010.11.002)
- Chon TS, Park YS, Moon KH, Cha EY (1996) Patternizing communities by using an artificial neural network. *Ecol Model* 90:69–78. doi: [10.1016/0304-3800\(95\)00148-4](https://doi.org/10.1016/0304-3800(95)00148-4)
- Chon TS, Park YS, Park JH (2000) Determining temporal pattern of community dynamics by using unsupervised learning algorithms. *Ecol Model* 132:151–166. doi: [10.1016/S0304-3800\(00\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(00)00312-4)
- Clarke KR, Gorley RN (2006) PRIMER v6: user manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth
- Coffman WP (1995) Conclusions. In: Armitage PD, Cranston PJ, Pinder LCV (eds) *The chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Chapman and Hall, London, pp 436–447
- Cohen J (1988) *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Lawrence Erlbaum, Hillsdale
- De Bisthoven LJ, Gerhardt A, Soares AMVM (2005) Chironomidae larvae as bioindicators of an acid mine drainage in Portugal. *Hydrobiologia* 532:181–191. doi: [10.1007/s10750-004-1387-z](https://doi.org/10.1007/s10750-004-1387-z)
- De Pauw N, Vanhooren G (1983) Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia* 100:153–168. doi: [10.1007/BF00027428](https://doi.org/10.1007/BF00027428)
- Dufrêne M, Legendre P (1997) Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol Monogr* 67:345–366. doi: [10.1890/0012-9615\(1997\)067\[0345:SAAI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1997)067[0345:SAAI]2.0.CO;2)
- Edwards DHD, Storey AW, Smith MJB (2000) Assessing the river health in south-western Australia: comparison of macroinvertebrates at family level with Chironomidae at species level. *Verh Int Ver Theor Angew Limnol* 27: 2326–2335
- Ferrington LC (2008) Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:447–455. doi: [10.1007/s10750-007-9130-1](https://doi.org/10.1007/s10750-007-9130-1)
- Ferrington LC, Buzby K, Masteller E (1993) Composition and temporal abundance of Chironomidae emergence from a tropical rainforest stream at El Verde, Puerto Rico. *J Kans Entomol Soc* 66:167–180
- Furse M, Moss D, Wright J, Armitage P (1984) The influence of seasonal and taxonomic factors on the ordination and classification of running-water sites in Great Britain and on the prediction of their macro-invertebrate communities. *Freshw Biol* 14:257–280. doi: [10.1111/j.1365-2427.1984.tb00040.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00040.x)
- Gabriels W, Lock K, De Pauw N, Goethals PLM (2010) Multimetric Macroinvertebrate Index Flanders (MMIF) for biological assessment of rivers and lakes in Flanders (Belgium). *Limnologia* 40:199–207. doi: [10.1016/j.limno.2009.10.001](https://doi.org/10.1016/j.limno.2009.10.001)
- García PE, Añón Suárez DA (2007) Community structure and phenology of chironomids (Insecta: Chironomidae) in a Patagonian Andean stream. *Limnologia* 37:109–117. doi: [10.1016/j.limno.2006.09.005](https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.09.005)
- García X, Laville H (2000) First inventory and faunistic particularities of the chironomid population from a 6th order section of the sandy River Loire (France). *Arch Hydrobiol* 147:465–484
- Gavrilović L, Dukić D (2002) *Rivers of Serbia*. Bureau of textbooks, Belgrade [in Serbian: Reke Srbije]
- Grzybkowska M, Temech A, Dukowska M (1996) Impact of long-term alternations of discharge and spate on the chironomid community in the lowland Widawka River (Central Poland). *Hydrobiologia* 324:107–115. doi: [10.1007/BF00018171](https://doi.org/10.1007/BF00018171)
- Helson JE, Williams DD, Turner D (2006) Larval chironomid community organization in four tropical rivers: human impacts and longitudinal zonation. *Hydrobiologia* 559: 413–431. doi: [10.1007/s10750-005-0977-8](https://doi.org/10.1007/s10750-005-0977-8)
- Hering D, Moog O, Sandin L, Verdonshot PFM (2004) Overview and application of the AQEM assessment system. *Hydrobiologia* 516:1–20. doi: [10.1007/978-94-007-0993-5_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0993-5_1)
- Hilsenhoff WL (1982) Using a biotic index to evaluate water quality in streams. Wisconsin Department of natural resources, Technical bulletin no. 132, Madison
- Jain AK, Dubes RC (1988) *Algorithms for clustering data*. Prentice-Hall, New Jersey
- Janssens De Bisthoven L, Gerhardt A (2003) Chironomidae (Diptera, Nematocera) fauna in three small streams of Skania, Sweden. *Environ Monit Assess* 83:89–102. doi: [10.1023/A:1022494222666](https://doi.org/10.1023/A:1022494222666)
- Kerans B, Karr JR (1994) A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecol Appl* 4: 768–785. doi: [10.2307/1942007](https://doi.org/10.2307/1942007)
- King RS, Richardson CJ (2002) Evaluating subsampling approaches and macroinvertebrate taxonomic resolution for wetland bioassessment. *J North Am Benthol Soc* 21: 150–171. doi: [10.2307/1468306](https://doi.org/10.2307/1468306)
- Kohonen T (1982) Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biol Cybern* 43:59–69. doi: [10.1007/BF00337288](https://doi.org/10.1007/BF00337288)
- Koperski P (2009) Reduced diversity and stability of chironomid assemblages (Chironomidae, Diptera) as the effect of moderate stream degradation. *Pol J Ecol* 57:125–138
- Langton PH, Casas J (1998) Changes in chironomid assemblage composition in two Mediterranean mountain streams over a period of extreme hydrological conditions. *Hydrobiologia* 390:37–49. doi: [10.1023/A:1003589216389](https://doi.org/10.1023/A:1003589216389)
- Lenat DR (1983) Chironomid taxa richness: natural variation and use in pollution assessment. *Freshw Invertebr Biol* 2:192–198
- Lencioni V, Rossaro B (2005) Microdistribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) in Alpine streams: an autoecological perspective. *Hydrobiologia* 533:61–76. doi: [10.1007/s10750-004-2393-x](https://doi.org/10.1007/s10750-004-2393-x)
- Lencioni V, Maiolini B, Marziali L, Lek S, Rossaro B (2007) Macroinvertebrate assemblages in glacial stream systems: a comparison of linear multivariate methods with artificial neural networks. *Ecol Model* 203:119–131. doi: [10.1016/j.ecolmodel.2006.04.028](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.04.028)
- Lindgaard C, Brodersen K (1995) Distribution of Chironomidae (Diptera) in the river continuum. In: Cranston P (ed)

- Chironomids: from genes to ecosystems. CSIRO, Melbourne, pp 257–271
- Lobinske RJ, Ali A, Stout IJ (1996) Qualitative and quantitative studies on Chironomidae (Diptera) and selected physico-chemical parameters in two tributaries of the Wekiva River, central Florida. *Fla Entomol* 79:531–542
- Marziali L, Armanini DG, Cazzola M, Erba S, Toppi E, Bufagni A, Rossaro B (2010) Responses of Chironomid larvae (Insecta, Diptera) to ecological quality in Mediterranean river mesohabitats (South Italy). *River Res Appl* 26: 1036–1051. doi:[10.1002/rra.1303](https://doi.org/10.1002/rra.1303)
- McCune B, Mefford MJ (1999) PC-ORD: Multivariate analysis of ecological data; version 4 for windows [user's guide]. MjM Software Design
- Metcalfe JL (1989) Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environ Pollut* 60: 101–139. doi:[10.1016/0269-7491\(89\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90223-6)
- Milošević D, Simić V, Stojković M, Živić I (2012) Chironomid faunal composition represented by taxonomic distinctness index reveals environmental change in a lotic system over three decades. *Hydrobiologia* 683:62–82. doi:[10.1007/s10750-011-0941-8](https://doi.org/10.1007/s10750-011-0941-8)
- Moller Pillot H (1984a) De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). 1A: Inleiding, Tanypodinae en Chironomini. St. E.I.S Nederland, Leiden
- Moller Pillot H (1984b) De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). 1B: Orthocladiinae sensu lato. St. E.I.S Nederland, Leiden
- Moller Pillot H (2009) Chironomidae larvae. Biology and ecology of the Chironomini. KNNV Publishing, Zeist
- Nijboer R, Park Y, Lek S, Verdonchot P (2005) Comparison of clustering and ordination methods implemented to the full and partial data of benthic macroinvertebrate communities in streams and channels. In: Nijboer R (ed) *The myth of communities: determining ecological quality of surface waters using macroinvertebrate community patterns*. Wageningen, Alterra, pp 105–136
- Orendt C (2002) The chironomid community of the River Inn near Mühldorf (Upper Bavaria, Germany). *Lauterbornia* 44: 109–120
- Orendt C, Spies M (2012) Chironomini (Diptera: Chironomidae: Chironominae). Keys to Central European larvae using mainly macroscopic characters. Second revised edition, Leipzig
- Paasavirta L (1990) The macrozoobenthos studies in the upper part of the Vanajavesi catchment area in the years of 1985 and 1988 with a comparison to earlier data. *Ass Wat Poll Control (The Kokemaenjoki river)* 225:1–24
- Park YS, Céréghino R, Compin A, Lek S (2003) Applications of artificial neural networks for patterning and predicting aquatic insect species richness in running waters. *Ecol Model* 160:265–280. doi:[10.1016/S0304-3800\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(02)00258-2)
- Park YS, Chon TS, Kwak IS, Lek S (2004) Hierarchical community classification and assessment of aquatic ecosystems using artificial neural networks. *Sci Total Environ* 327: 105–122. doi:[10.1016/j.scitotenv.2004.01.014](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.014)
- Paunović M, Simić V, Simić S, Vuković D, Petrović A, Vasiljević B, Zorić K, Tomović J, Atanacković A, Marković V (2011) Biological Quality Elements in WFD implementation in Serbia—typology, reference conditions and ecological status class boundaries. Technical Report, Contracts No. 01-772. Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Beograd
- Paunović M, Tubić B, Kračun M, Marković V, Simić V, Zorić K, Atanacković A (2012) Ecoregions delineation for the territory of Serbia. *Water Res Manag* 2:65–74
- Penczak T (2009) Fish assemblage compositions after implementation of the IndVal method on the Narew River system. *Ecol Model* 220:419–423. doi:[10.1016/j.ecolmodel.2008.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.11.005)
- Penczak T, Kruk A, Grzybkowska M, Dukowska M (2006) Patterning of impoundment impact on chironomid assemblages and their environment with use of the self-organizing map (SOM). *Acta Oecol* 30:312–321. doi:[10.1016/j.actao.2006.05.007](https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.05.007)
- Penczak T, Głowacki Ł, Kruk A, Galicka W (2012) Implementation of a self-organizing map for investigation of impoundment impact on fish assemblages in a large, lowland river: long-term study. *Ecol Model* 227:64–71. doi:[10.1016/j.ecolmodel.2011.12.006](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2011.12.006)
- Pinder LCV (1995) The habitats of chironomid larvae. In: Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV (eds) *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Chapman and Hall, New York, pp 107–135
- Puntí T, Rieradevall M, Prat N (2009) Environmental factors, spatial variation, and specific requirements of Chironomidae in Mediterranean reference streams. *J North Am Benthol Soc* 28:247–265. doi:[10.1899/07-172.1](https://doi.org/10.1899/07-172.1)
- Rabeni CF, Wang N (2001) Bioassessment of streams using macroinvertebrates: are the chironomidae necessary? *Environ Monit Assess* 71:177–185. doi:[10.1023/A:1017523115381](https://doi.org/10.1023/A:1017523115381)
- Raunio J, Muotka T (2005) Use of chironomid pupal exuviae in river biomonitoring: the importance of sampling strategy. *Arch Hydrobiol* 164:529–545. doi:[10.1127/0003-9136/2005/0164-0529](https://doi.org/10.1127/0003-9136/2005/0164-0529)
- Raunio J, Heino J, Paasivirta L (2011) Non-biting midges in biodiversity conservation and environmental assessment: findings from boreal freshwater ecosystems. *Ecol Indic* 11:1057–1064. doi:[10.1016/j.ecolind.2010.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.12.002)
- Rosenberg DM (1993) Freshwater biomonitoring and Chironomidae. *Aquat Ecol* 26:101–122. doi:[10.1007/BF02255231](https://doi.org/10.1007/BF02255231)
- Rossaro B (1991) Chironomids and water temperature. *Aquat Insects* 13:87–98. doi:[10.1080/01650429109361428](https://doi.org/10.1080/01650429109361428)
- Rossaro B, Lencioni V, Boggero A, Marziali L (2006) Chironomids from Southern Alpine running waters: ecology, biogeography. *Hydrobiologia* 562:231–246. doi:[10.1007/s10750-005-1813-x](https://doi.org/10.1007/s10750-005-1813-x)
- Schmid P (1992) Community structure of larval Chironomidae (Diptera) in a backwater area of the River Danube. *Freshw Biol* 27:151–167. doi:[10.1111/j.1365-2427.1992.tb00530.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1992.tb00530.x)
- Schmid P (1993) A key to the larval Chironomidae and their instars from Austrian Danube Region streams and rivers: part 1. Diamesinae, Prodiamesinae and Orthocladiinae. Federal Institute for Water Quality of the Ministry of Agriculture and Forestry, Wien
- Spies M, Sæther OA (2004) Notes and recommendations on taxonomy and nomenclature of Chironomidae (Diptera). *Zootaxa* 752:1–90
- Šporka F, Vlek HE, Bulánková E, Krno I (2006) Influence of seasonal variation on bioassessment of streams using

- macroinvertebrates. *Hydrobiologia* 566:543–555. doi:[10.1007/s10750-006-0073-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0073-8)
- Tang H, Song MY, Cho WS, Park YS, Chon TS (2010) Species abundance distribution of benthic chironomids and other macroinvertebrates across different levels of pollution in streams. *Ann Limnol* 46:53–66. doi:[10.1051/limn/2009031](https://doi.org/10.1051/limn/2009031)
- Vallenduuk HJ, Moller Pillot H (2007) Chironomidae larvae of the Netherlands and Adjacent Lowlands: General ecology and Tanypodinae. KNNV Publishing, Zeist
- Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, Sedell JR, Cushing CE (1980) The river continuum concept. *Can J Fish Aquat Sci* 37:130–137
- Verdonschot PFM (1990) Ecological characterization of surface waters in the province of Overijssel (The Netherlands). Phd thesis, University of Wageningen
- Verdonschot PFM (2005) Macroinvertebrate community assemblages. Introduction. In: Lek S, Scardi M, Verdonschot PFM, Descy JP, Park YS (eds) *Modelling community structure in freshwater ecosystems*. Springer, Berlin, pp 131–132
- Vesanto J, Himberg J, Alhoniemi E, Parhankangas J (2000) Som toolbox for matlab 5. Technical Report A57. Neural Network Research Centre, Helsinki University of Technology, Helsinki
- Waite IR, Herlihy AT, Larsen DP, Urquhart NS, Klemm DJ (2004) The effects of macroinvertebrate taxonomic resolution in large landscape bioassessments: an example from the Mid-Atlantic Highlands, USA. *Freshw Biol* 49:474–489. doi:[10.1111/j.1365-2427.2004.01197.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01197.x)
- Ward AF, Williams DD (1986) Longitudinal zonation and food of larval chironomids (Insecta: Diptera) along the course of a river in temperate Canada. *Ecography* 9:48–57. doi:[10.1111/j.1600-0587.1986.tb01190.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1986.tb01190.x)
- Wiederholm T (1983) Chironomidae of the Holarctic region: keys and diagnoses. Publishing House of the Swedish Research Councils, Stockholm
- Wilson R (1992) Monitoring organic enrichment of rivers using chironomid pupal exuvial assemblages. *Aquat Ecol* 26:521–525. doi:[10.1007/BF02255285](https://doi.org/10.1007/BF02255285)
- Wright JF, Furse MT, Mielke PW (1998) River classification using invertebrates: RIVPACS application. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 8:617–631. doi:[10.1002/\(SICI\)1099-0755\(199807/08\)8:4<617::AID-AQC255>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0755(199807/08)8:4<617::AID-AQC255>3.0.CO;2-#)

БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Ђурађ Милошевић
Ментор	Проф. Др Владица Симић
Наслов рада	Ларве фамилије Chironomidae (Diptera, Insecta) слива Јужне Мораве и њихова примена у процени еколошког статуса текућих водених екосистема
Језик публикације	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2013.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Васе Чарапића 27, 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Хидробиологија
Предметна одредница/кључне речи	Ларве фамилије Chironomidae, логички системи, вештачке неуромреже, биоиндикације, таксономска резолуција
Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Важна напомена	
Извод	
Хирономиде (Chironomidae, Diptera), као широко распрострањена и разноврсна група акватичних бескичмењака, поседују велики потенцијал у процени стања еколошког статуса акватичних екосистема. Због контрадикторних резултата о корисности ове групе у методама био процене, већина рутинских мониторинг програма не укључује ларве фамилије Chironomidae. Овакво стање упућује на неопходност познавања просторне и временске дистрибуције заједнице хирономида.	

Циљеви овог истраживања били су: анализа структуре и динамике заједнице хирономида и дефинисање модела њихове повезаности са абиотичким параметрима, тестирање потенцијалних структурних особина заједнице и потенцијалних индикаторских таксона у процени еколошког статуса акватичних екосистема и, коначно, одређивање најнижег таксономског нивоа, довољног за примену ове групе у методама биопроцене.

Како би се представила мултидимензионална структура заједнице хирономида и одредила веза са параметрима средине, коришћена је мултиваријантна метода вештачких неуромрежа (самоорганизујуће мапе, енгл. Self organizing map - SOM). Способност моделовања нелинеарних веза, мања осетљивост на утицај екстремних вредности и успешно процесуирање и визуализација великог броја параметара и реплика, чини ову методу одговарајућом за анализу структуре заједнице хирономида кроз просторне и временске градијенте. За представљање заједнице фамилије хирономида коришћен је индекс просечне таксономске различитост (Δ^+), чија је главна предност потпуна независност од метода и учесталости узорковања, што омогућава примену ове методе у поређењу студија без података о темпу и начину узорковању и типу станишта.

Истраживање је спроведено у периоду од маја 2010. до марта 2011. године, када су узорковане ларве хирономида на 28 локалитета распоређених дуж читавог слива Јужне Мораве. Током истраживања, од укупно 35.185 анализираних јединки, констатовано је присуство 111 таксона у оквиру 65 родова, дистрибуираних у 5 потфамилија (*Orthocladiinae* (51), *Chironominae* (38), *Tanyrodinae* (17), *Diamesinae* (3) и *Prodiamesinae* (2)).

SOM анализа је, на основу структуре заједнице хирономида, формирала три групе локалитета на SOM мрежи. Анализа индикаторских врста (IndVal) је представила индикаторске таксоне за две групе локалитета. Двадесет таксона је показало значајну варијабилност у абундантности у односу на временске јединице (месеце). Врсте из потфамилије *Chironominae* и *Tanyrodinae*, регистроване током овог истраживања, показале су временску варијабилност са максималним средњим рангом у јулу и августу (осим *Polypedilum convictum*), представљајући летње форме, док су *Orthocladiinae* и *Diamesinae* представљале зимске форме у оквиру групе хирономида. Од 15 мерених срединских параметара, one way ANOVA је показала да се 10 значајно разликује између група локалитета дефинисаних SOM методом. Надморска висина је имала најзначајнији утицај на структуру заједнице, и такође је утицала и на остале срединске параметре. На основу резултата, зима и период високих вода су се показали као главни извори природне варијабилности. У овој студији врсте *Cricotopus bicornis*, *Cricotopus triannulatus* agg. и *Rheocricotopus chalybeatus* су се показале као индикатори органског загађења. Таксономски индекси диверзитета су на подручју слива Јужне Мораве детектовали значајну промену структуре заједнице у временском периоду од три деценије. Анализом главних компоненти, (PCA) је приказано постојање линеарне везе Δ^+ и традиционалних индекса диверзитета са градијентом квалитета воде. SOM метода, заједно са анализом класификационе снаге (CS) и RELATE тестом, открила је да ниво рода најтачније апроксимира структуру заједнице на највећој могућој таксономској резолуцији. BIOENV анализа је показала да таксономска скала од врсте до рода не утиче на везу између структуре заједнице и срединских параметара. IndVal анализа је представила индикаторе квалитета воде на таксономском нивоу рода који обезбеђују скоро исту количину информација као и врсте индикатори.

Резултати нашег истраживања су приказали квалитативни и квантитативни састав заједнице хирономида на подручју слива Јужне Мораве и дефинисали модел промене структуре заједнице на просторном и временском градијенту, што доприноси општем познавању фауне и екологије акватичних инсеката и пружају додатне информације о биодиверзитету Србије, Балкана и Европе. Откривање главних извора природне варијабилности структуре заједнице, приказивање постојања линеарне везе индекса диверзитета са степеном нарушености акватичних екосистема и одређивање „довољне“ таксономске резолуције значајно доприноси примени фамилије *Chironomidae* у процени еколошког статуса текућих водених екосистема.

Датум прихватања теме од стране ННВ	
Датум одбране	
Чланови комисије	Проф. др Владица Симић Виши научни сарадник др Момир Пауновић Доц. др Дубравка Черба



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Djuradj Milošević
Mentor	Prof. Dr Vladica Simić
Title	Larvae of Chironomidae family (Diptera, Insecta) in Southern Morava river basin and their application in assessing the ecological status of lotic systems
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2013.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Vase Čarapića 27, 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Hydrobiology
Key words	Larvae of Chironomidae family, lotic systems, artificial neural networks, bioindications, taxonomic resolution
Holding data	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	

Abstract

The widely distributed family of the Chironomidae presents the most diverse group of macroinvertebrate fauna and they are the prime candidate for the ecological status assessment of the lotic ecosystems. Due to the contradictory results in previous studies regarding comprehensiveness of the group in bioassessment, it has been a commonplace to exclude chironomids from the monitoring programs. This further stresses the need for more studies concerning spatio-temporal pattern of the Chironomidae community.

The aim of the study was to analyze spatial and temporal variation in the chironomid community, to investigate the importance of variations in environmental factors and their influence on the community pattern, and to test the strength of potential community metrics and indicator taxa in assessing the ecological status of

lotic systems. Finally, we wanted to determine the sufficient taxonomical level of the chironomid community, which could provide reliable information for the bioassessment.

To present multidimensional structure of chironomid community and to pattern it with environmental factors we used Kohonen unsupervised artificial neural networks (Self organizing map – SOM). The ability to treat nonlinear relationships, less sensitivity to outliers, successful processing, and visualization of large data sets, make this method suitable for the community structure analysis. To describe the chironomid community, the average taxonomic distinctness (delta+) was used. Its main advantage is that it is largely independent of sampling effort with the implication that it can be directly compared across studies with unknown or different sampling efforts.

The field campaign was conducted from May 2010. to March 2011, when larvae were sampled at 28 sites distributed along the whole Southern Morava river basin. During the study, a total of 35.185 specimens were recorded, distributing over 5 subfamilies, 65 genera, and 111 taxa (Orthoclaadiinae (51), Chironominae (38), Tanypodinae (17), Diamesinae (3) and Prodiamesinae (2)).

The SOM analysis of the chironomid community data produced three groups of sites. The indicator species analysis (IndVal) presented indicator taxa for two groups of sites. Twenty taxa according to Kruskal-Wallis test showed the most pronounced differences among the temporal units (months). The species of Chironominae and Tanypodinae recorded during this research, which showed temporal variability, had the highest values of Mean Rank in July and August (except *Polypedilum convictum*), representing summer forms, while Orthoclaadiinae and Diamesinae represent the spring forms. Out of 15 measured environmental parameters, one way ANOVA pointed out that 10 significantly differ between the groups. Elevation had the most important influence on the chironomid community, also affecting other environmental parameters. According to our finding, the winter season and the periods of high water level are the main sources of natural variability. In this study, *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus* agg and *Rheocricotopus chalybeatus* could be considered indicators of organic pollution. The indices of taxonomic diversity detected substantial changes of chironomide community structure over three decades. Principal component analysis (PCA) revealed the linear relationship between diversity indices (delta+ and traditional diversity indices) and water quality gradient. The SOM method, together with Classification strength (CS) analysis and the RELATE test, revealed that the genus-level most accurately approximated the species-level community pattern. BIO-ENV analyses presented the same set of important environmental parameters at species- and genus-level. IndVal analysis showed that indicator genera provide information very close to that gained from species indicators.

The results of this study present the qualitative and quantitative structure of chironomid community as well as its changes along spatial and temporal gradients in lotic systems of Southern Morava river basin. Furthermore, this study contributes to the general knowledge of fauna and ecology of aquatic insects, providing additional information about biodiversity of Serbia, Balkan Peninsula and whole Europe. Revealing the main source of natural variability, defining the linear relationship between diversity indices and the extent of anthropogenic influence and presenting the sufficient taxonomic resolution of chironomid community lead to the implementation of this group in assessing the ecological status of lotic ecosystems.

Accepted by Scientific Board on	
Defended on	
Commission	Prof. dr Vladica Simić Scientific Associates dr Momir Paunović Prof. dr Dubravka Čerba