



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Jelena B. Stanković

**MIKROPLASTIKA U SLATKOVODNIM
EKOSISTEMIMA: *IN-SITU* I *EX-SITU*
ISTRAŽIVANJA NA ODABRANIM MODEL
ORGANIZMIMA MAKROBESKIČMENJAKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010, 93/2012,
89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и
сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2022.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Jelena B. Stanković

**MIKROPLASTIKA U SLATKOVODNIM
EKOSISTEMIMA: *IN-SITU* I *EX-SITU*
ISTRAŽIVANJA NA ODABRANIM MODEL
ORGANIZMIMA MAKROBESKIČMENJAKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Jelena B. Stanković

**MICROPLASTIC IN FRESHWATER
ECOSYSTEMS: *IN-SITU* AND *EX-SITU*
RESEARCH ON SELECTED MODEL
ORGANISMS OF MACROINVERTEBRATES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

Др Ђурађ Милошевић, ванредни професор на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Др Маја Раковић, виши научни сарадник на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду

Наслов:

Микропластика у слатководним екосистемима: *in-situ* и *ex-situ* истраживања на одабраним модел организмима макробескичмењака

Резиме:

У овом докторату анализиран је утицај најчешћих типова полимера микропластике на различите нивое биолошке и еколошке организације бентосних макробескичмењака у слатководним екосистемима.

Спроведени су мултипараметарски биолошки тестови, на основу ОЕЦД протокола број 218 и 219, на модел врсту *Chironomus riparius* (Meigen, 1804). Анализиран је утицај мешавине честица микропластике (ПЕТ, ПС, ПВЦ, ПА, ПЕ, ПП) на низ стандардних биомаркера (морталитет, прежив-љавање, време и стопа развића и излетања). Коришћењем методе геометријске морфометрије анализиран је утицај на морфолошке структуре ларви (ментуми и мандибуле), као и адулта (крила). ОЕЦД тестови примењени су у *ex-situ* условима средине, али и на популације исте врсте у *in-situ* мезокозмама у језерском екосистему. Доказан је негативан утицај полимера микропластике на време развића ларви и на одлагање излетања адулта. Излагање јединки честицама микропластике резултовало је променом морфолошких структура ларви и адулта. Спроведена је анализа степена утицаја мешавине полимера микропластике (ПЕ, ПА и ПВЦ) на структуру заједнице макробескичмењака барског екосистема у микрокозмама, где је уочено 16 % разлике у диверзитету између контроле и третмана.

По први пут, извршена је анализа присуства честица микропластике у сливу Дунава, коришћењем одабраних врста из заједнице макробескичмењака. Анализа хемијског састава изолованих честица микропластике из ткива модел врсте *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) је прва анализа у сливу Дунава на 2040 речних километара. Микро-ФТИР спектроскопском

анализом потврђено је присуство честица микропластике у ткиву азијских шкољки, са доминантним присуством полиетилена терефталата.

Научна област:

Биологија

Научна
дисциплина:

Екотоксикологија

Кључне речи:

микропластика, биолошки есеји, микрокозме, мезокозме, Дунав, бентосни макробескичмењаци, модел организми, азијска шкољка, *Corbicula*, хирономиде, *Chironomus*, ОЕЦД протокол, геометријска морфометрија, микроФТИР

УДК:

678.7:[574.2/.6+592/595]

CERIF
класификација:

B 003; B 260

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

PhD Djuradj Milošević, associate professor, Department of biology and Ecology, Faculty of Sciences and mathematics, University of Niš

PhD Maja Raković, senior research associate, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade

Title:

Microplastic in freshwater ecosystems: *in-situ* and *ex-situ* research on selected model organisms of macroinvertebrates

Abstract:

In this doctoral dissertation, the influence of the most common types of microplastic polymers on different levels of biological and ecological organization of benthic macroinvertebrates in freshwater ecosystems is analyzed.

Multiparametric bioassays were conducted, based on OECD protocols Nos. 218 and 219, on the model species *Chironomus riparius* (Meigen, 1804). The influence of the mixture of microplastic particles (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) on a series of standard biomarkers (mortality, survival, time and rate of development and emergence) was analyzed. Using the method of geometric morphometry, the influence on the morphological structures of larvae (mentums and mandibles), as well as adults (wings) was analyzed. OECD tests have been applied in *ex-situ* environmental conditions, but also on populations of the same species in *in-situ* mesocosms in the lake ecosystem. The negative influence of microplastic polymers on the time of larval development and on the delay of adult hatching has been proven. Exposure of individuals to microplastic particles resulted in changes in the morphological structures of larvae and adults.

An analysis of the degree of influence of the mixture of microplastic polymers (PE, PA and PVC) on the structure of the macroinvertebrate community of the pristine pond ecosystem was performed, where 16 % of the difference in diversity between control and treatment was observed.

For the first time, an analysis of the presence of microplastic particles in the Danube basin was performed, using selected species from the macroinvertebrate community. The analysis of the chemical composition of isolated microplastic particles from the tissue model of the species *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) is the first analysis in the Danube basin at 2040 riverine kilometers. Micro-FTIR

spectroscopic analysis confirmed the presence of microplastic particles in the tissue of Asian clams, with a dominant presence of polyethylene terephthalate.

Scientific
Field:

Biology

Scientific
Discipline:

Ecotoxicology

Key Words:

Microplastics, bioassays, microcosms, mesocosms, Danube, benthic macroinvertebrates, model organisms, Asian clam, *Corbicula*, chironomids, *Chironomus*, OECD protocol, geometric morphometrics, microFTIR

UDC:

678.7:[574.2/.6+592/595]

CERIF
Classification:

B 003; B 260

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

MENTORI:

dr Đurađ Milošević, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

dr Maja Raković, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Milica Stojković Piperac, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

dr Vladica Cvetković, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

dr Momir Paunović, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane _____



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Јелена Б. Станковић
Ментор, МН:	Ђурађ Милошевић, Маја Раковић
Наслов рада, НР:	Микропластика у слатководним екосистемима: <i>in-situ</i> и <i>ex-situ</i> истраживања на одабраним модел организмима макробескичмењака
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2022.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	8 поглавља, 192 стране, 381 цитата, 15 табела, 33 слике, 7 прилога
Научна област, НО:	Биологија
Научна дисциплина, НД:	Екотоксикологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	микропластика, биолошки есеји, микрокозме, мезокозме, Дунав, бентосни макробескичмењаци, модел организми, азијска шкољка, <i>Corbicula</i> , хириномиде, <i>Chironomus</i> , ОЕЦД протокол, геометријска морфометрија, микроФТИР
УДК	678.7:[574.2/.6+592/595]
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	/

Извод, ИЗ:	<p>У овом докторату анализиран је утицај најчешћих типова полимера микропластике на различите нивое биолошке и еколошке организације бентосних макробескичмењака у слатководним екосистемима.</p> <p>Спроведни су мултипараметарски биолошки тестови, на основу ОЕЦД протокола број 218 и 219, на модел врсту <i>Chironomus riparius</i> (Meigen, 1804). Анализиран је утицај мешавине честица микропластике (ПЕТ, ПС, ПВЦ, ПА, ПЕ, ПП) на низ стандардних биомаркера (морталитет, преживљавање, време и стопа развића и излетања). Коришћењем методе геометријске морфометрије анализиран је утицај на морфолошке структуре ларви (ментуми и мандибуле), као и адулта (крила). ОЕЦД тестови примењени су у <i>ex-situ</i> условима средине, али и на популацију исте врсте у <i>in-situ</i> мезокозмама у језерском екосистему. Доказан је негативан утицај полимера микропластике на време развића ларви и на одлагање излетања адулта. Излагање јединки честицама микропластике резултовало је променом морфолошких структура ларви и адулта.</p> <p>Спроведена је анализа степена утицаја мешавине полимера микропластике (ПЕ, ПА и ПВЦ) на структуру заједнице макробескичмењака барског екосистема у микрокозмама, где је уочено 16 % разлике у диверзитету између контроле и третмана.</p> <p>По први пут, извршена је анализа присуства честица микропластике у сливу Дунава, коришћењем одабраних врста из заједнице макробескичмењака. Анализа хемијског састава изолованих честица микропластике из ткива модел врсте <i>Corbicula fluminea</i> (Muller, 1774) је прва анализа у сливу Дунава на 2040 речних километара. Микро-ФТИР спектроскопском анализом потврђено је присуство честица микропластике у ткиву азијских шкољки, са доминантним присуством полиетилена терефталата.</p>
Датум прихватања теме, ДП:	08.11.2021.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: Члан: Члан, ментор:



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Jelena B. Stanković
Mentor, MN :	Đurađ Milošević, Maja Raković
Title, TI :	Microplastic in freshwater ecosystems: <i>in-situ</i> and <i>ex-situ</i> research on selected model organisms of macroinvertebrates
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2022.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 192 pages, 381 references, 15 tables, 33 pictures, 7 appendixes
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	Ecotoxicology
Subject/Key words, S/KW :	Microplastics, bioassays, microcosms, mesocosms, Danube, benthic macroinvertebrates, model organisms, Asian clam, <i>Corbicula</i> , chironomids, <i>Chironomus</i> , OECD protocol, geometric morphometrics, microFTIR
UC	678.7:[574.2/.6+592/595]
Holding data, HD :	library
Note, N :	/

Abstract, AB :	<p>In this doctoral dissertation, the influence of the most common types of microplastic polymers on different levels of biological and ecological organization of benthic macroinvertebrates in freshwater ecosystems is analyzed.</p> <p>Multiparametric bioassays were conducted, based on OECD protocols Nos. 218 and 219, on the model species <i>Chironomus riparius</i> (Meigen, 1804). The influence of the mixture of microplastic particles (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) on a series of standard biomarkers (morality, survival, time and rate of development and emergence) was analyzed. Using the method of geometric morphometry, the influence on the morphological structures of larvae (mentums and mandibles), as well as adults (wings) was analyzed. OECD tests have been applied in <i>ex-situ</i> environmental conditions, but also on populations of the same species in <i>in-situ</i> mesocosms in the lake ecosystem. The negative influence of microplastic polymers on the time of larval development and on the delay of adult hatching has been proven. Exposure of individuals to microplastic particles resulted in changes in the morphological structures of larvae and adults.</p> <p>An analysis of the degree of influence of the mixture of microplastic polymers (PE, PA and PVC) on the structure of the macroinvertebrate community of the pristine pond ecosystem was performed, where 16 % of the difference in diversity between control and treatment was observed.</p> <p>For the first time, an analysis of the presence of microplastic particles in the Danube basin was performed, using selected species from the macroinvertebrate community. The analysis of the chemical composition of isolated microplastic particles from the tissue model of the species <i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774) is the first analysis in the Danube basin at 2040 riverine kilometers. Micro-FTIR spectroscopic analysis confirmed the presence of microplastic particles in the tissue of Asian clams, with a dominant presence of polyethylene terephthalate.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	08.11.2021.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	
President:	
Member:	
Member, Mentor:	

Обрзац Q4.09.13 - Издање 1

Zahvalnica

Doktorska disertacija „Mikroplastika u slatkovodnim ekosistemima: in-situ i ex-situ istraživanja na odabranim model organizmima makrobeskičmenjaka“ predstavlja rezultat mnogobrojnih saradnji zahvaljujući kojima je realizovana.

Pre svega, veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima dr Đurađu Miloševiću i dr Maji Raković na svim savetima, pomoći i usmeravanju tokom izrade doktorske disertacije.

Ujedno, neizmernu zahvalnost dugujem dr habil Borisu Jovanoviću koji mi je od početka do kraja bio kao mentor i iz čijih sugestija, saveta i konstruktivnih kritika sam jako puno naučila. Zauvek ću biti zahvalna na Vašoj nesebičnoj podršci sa samog početka doktorskih studija.

Zahvaljujem se članovima komisije dr Milici Stojković Piperac, dr Vladici Cvetkoviću i dr Momiru Paunoviću na korisnim sugestijama koje su doprinele finalnom izgledu ove doktorske disertacije.

Zhavaljujem se dr Meryem Beklioğlu sa Bliskoistočnog tehničkog Univerziteta (METU) u Ankari (Turska) i celom njenom timu na predivnoj saradnji, u čijoj laboratoriji sam odradila jedan deo svojih istraživanja u okviru HORIZON projekta.

Neizmerno sam zahvalna dr Momiru Paunoviću, rukovodiocu Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na saradnji u okviru JDS4 ekspedicije, kao i na uključivanju u nacionalni tim za istraživanje Dunava. Uz Vašu pomoć realizovala sam jako značajan deo doktorata. Bilo je zadovoljstvo biti deo ovakvog tima naučnika i istraživača.

Zahvaljujem se dr Katarini Radulović i dr Davoru Lončareviću iz Centra za materijale i metalurgiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Begoradu na saradnji i na pomoći u analizama hemijskog porekla čestica.

Veliku zahvalnost dugujem dr Miroslavu Kostiću sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja истраживања „Dr Josif Pančić“. Vaše priče inspirisale su me da nikad ne odustajem,

bez obzira na prepreke koja su preda mnom. Zauvek ću Vam biti zahvalna na svim poukama i savetima koje ste nesebično delili sa mnom.

Iako više nije među nama, veoma veliku zahvalnost i poštovanje dugujem dr Đorđu Hrستیću, koji je za života radio u Zavodu za ribarstvo Srbije i Zavodu za ribarstvo Ribarskog gazdinstva „Beograd“. Zahvaljujući njemu sam, još od malih nogu, imala cilj da postanem doktor nauka. Iako je moja vizija bila da sledim njegov put, put ihtiologije, sticajem okolnosti sam taj put modifikovala ali ostala dosledna svom cilju. Neizmerno sam zahvalna na svakom trenutku, a uspomene koje imam, biće sa mnom večno.

Hvala mojim koleginicima na divnim trenucima, na podršci i na prijateljstvu tokom doktorskih studija.

Želela bih da izrazim zahvalnost svojim dragim prijateljima koji bili tu pri svakom usponu i padu. Hvala mast. ekol. Daliboru Filipoviću na svim pravim rečima u pravim trenucima, ali i na najiskrenijem slavljenju svakog uspeha. Daki, hvala ti za sve navedeno ali i na osećaju da imam malo starijeg brata, uvek. Hvala mojoj Valentini Jovanović na svakom trenutku prisutnosti, na svim predivnim uspomenama, ali i na iskrenom prijateljstvu.

Hvala mom bratu, Milošu Petroviću, profesoru srpskog jezika i knjižvnosti Osnovne škole „Vuk Karadžić“ u Pirotu na lekturi doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem Miljanu Ristiću, mom Mikiju, na ljubavi, razumevanju i podršci protekle 4 godine. Hvala ti što si bio uz mene i što sam sa tobom mogla da podelim najlepše i najteže trenutke. Hvala za pomoć u laboratoriji, na terenu, ali i za razna grafička rešenja koja su mi u datim trenucima puno značila. A još veće hvala što sam od tebe puno naučila o primeni dizajna u naučne svrhe.

Na kraju, a svakako ne najmanje bitno, najzahvalnija sam svojim roditeljima Bobanu i Vidici. Hvala vam što ste uvek bili tu! Bez vas, vaše ljubavi i podrške bilo kakav uspeh ne bi bio moguć. Hvala vam na svemu što ste me naučili, na svemu što ste mi pružili- ovaj doktorat posvećujem vama!

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Direktive o mikroplastičnom otpadu	13
1.2. Akvatična toksikologija	14
1.2.1. Pristupi u ekotoksikološkim testovima	16
1.2.1.1. <i>Ex-situ</i> pristup	17
1.2.1.1.1. Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj (OECD)	18
1.2.1.2. Eksperimentalni model sistemi	20
1.2.1.2.1. Mikrokozme	20
1.2.1.2.2. Mezokozme	21
1.2.1.2.3. Makrokozme	22
1.2.1.3. <i>In-situ</i> pristup	22
1.2.2. Biomarkeri	23
1.2.3. Model organizmi	24
1.2.3.1. <i>Chironomus riparius</i> (Meigen, 1804)	25
1.2.3.1.1. Morfologija hironomida	26
1.2.3.1.1.1. Larve	26
1.2.3.1.1.2. Adulti	29
1.2.3.1.1. Životni ciklus familije Chironomidae	30
1.2.3.2. <i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774)	32
1.2.3.2.1. Životni ciklus azijske školjke	33
1.3. Dosadašnja istraživanja mikroplastike u slatkovodnim ekosistemima	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
3. MATERIJAL I METODE	39
3.1. Pristup u istraživanju	40
3.2. Protokoli za ekstrakciju mikroplastike iz tkiva organizama	40
3.2.1. Ekstrakcija čestica mikroplastike iz tkiva korišćenjem baznog agensa	41
3.3. Model ogranizmi	42
3.4. Karakterizacija čestica	42
3.5. Postavka eksperimenata	44
3.5.1. Testovi toksičnosti u <i>ex-situ</i> uslovima sredine	44
3.5.1.1. Dizajn eksperimenta	45
3.5.2. <i>In-situ</i> istraživanje u mikrokozmmama barskih ekosistemima	49
3.5.2.1. Dizajn eksperimenta	50
3.5.2.2. Funkcionalne grupe ishrane (eng. <i>Functional Feeding Group</i> - FFG)	53
3.5.2.3. Indeksi diverziteta	55

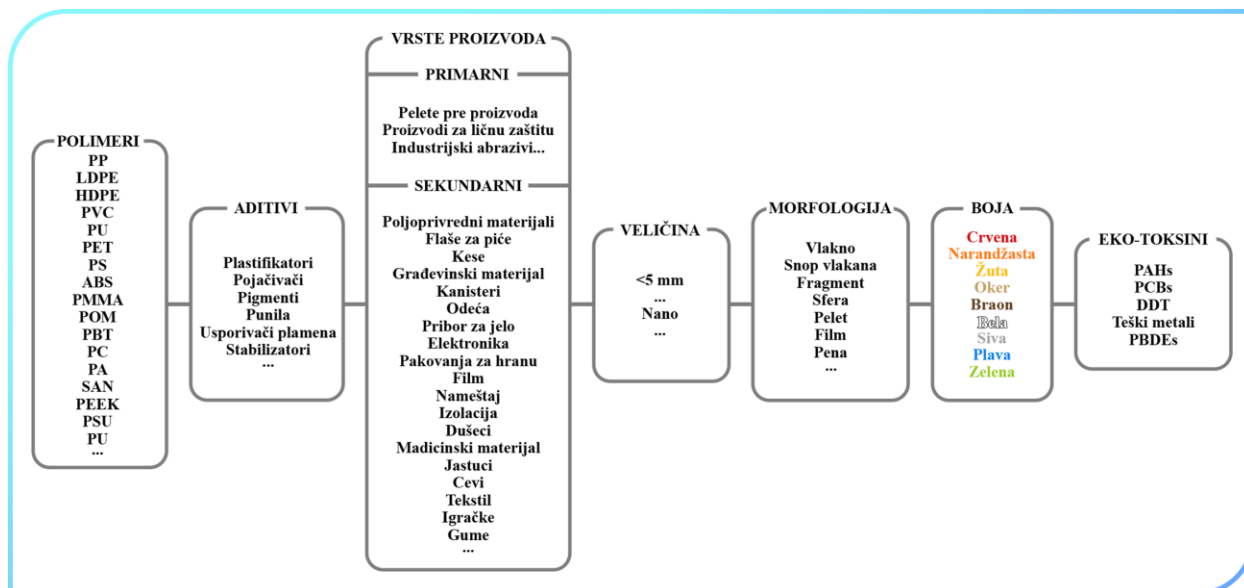
3.5.3. <i>In-situ</i> istraživanje u mezokozmama veštačkog jezerskog ekosistema	57
3.5.3.1. Dizajn eksperimenta	57
3.6. Pasivni monitoring prisustva čestica mikroplastike u slivu Dunava	59
3.6.1. Sliv Dunava	59
3.6.2. Metode prikupljanja i pripreme biološkog materijala	60
3.6.3. Metode izolovanja čestica mikroplastike	62
3.6.3.1. Izolovanje čestica mikroplastike iz tkiva vrsta: <i>L. naticoides</i> , <i>L. hoffmeisteri</i> i <i>C. acutiventris</i>	62
3.6.3.2. Izolovanje i identifikacija čestica mikroplastike iz tkiva azijske školjke <i>C. fluminea</i>	63
3.7. Analiza podataka	67
3.7.1. Testovi toksičnosti u laboratorijskim uslovima	67
3.7.2. Analiza podataka u mikrokozmmama	67
3.7.3. Analiza podataka u mezokozmmama	68
3.7.4. Analiza podataka pasivnog monitoringa (JDS4)	68
3.8. Furijeova transformišuća infracrvena spektroskopija (FTIR)	68
4. REZULTATI	70
4.1. Rezultati analize biomarkera bioloških testova	71
4.1.1. Razviće larvi	71
4.1.2. Analiza geometrijske morfometrije	73
4.1.2.1. Morfometrijske promene na krilima	73
4.2.1.2. Promene na morfološkim strukturama usnog aparata larvi	74
4.3. Rezultati <i>in-situ</i> istraživanja u mikrokozmmama barskih ekosistemima	78
4.2. Rezultati <i>in-situ</i> istraživanja u mezokozmmama veštačkog jezerskog ekosistema	82
4.2.1. Uticaj mešavine polimera mikroplastike na hironomide	82
4.3. Rezultati pasivnog monitoringa Dunava	85
4.3.1. Zajedničko istraživanje Dunava 3	85
4.3.2. Zajedničko istraživanje Dunava 4	88
4.4. Rezultati analize Furijeove transformišuće infracrvene spektroskopije (FTIR)	89
5. DISKUSIJA	94
5.1. Toksičnost mikroplastike u <i>ex-situ</i> uslovima sredine	95
5.2. <i>In-situ</i> istraživanje u mikrokozmmama barskih ekosistemima	97
5.3. <i>In-situ</i> istraživanje u mezokozmmama veštačkog jezerskog ekosistema	100
5.4. Pasivni monitoring prisustva čestica mikroplastike u slivu Dunava	102
5.4.1. Ingestija čestica mikroplastike kod <i>L. naticoides</i> , <i>L. hoffmeisteri</i> i <i>C. acutiventris</i>	102
5.4.2. Ingestija čestica mikroplastike kod <i>Corbicula fluminea</i>	103
6. ZAKLJUČCI	108

7. LITERATURA	112
8. PRILOZI	158
SPISAK SLIKA	159
SPISAK TABELA	163
IZVOD	165
SUMMARY	166
BIOGRAFIJA AUTORA	167
BIBLIOGRAFIJA	168
IZJAVE AUTORA	172

1. UVOD

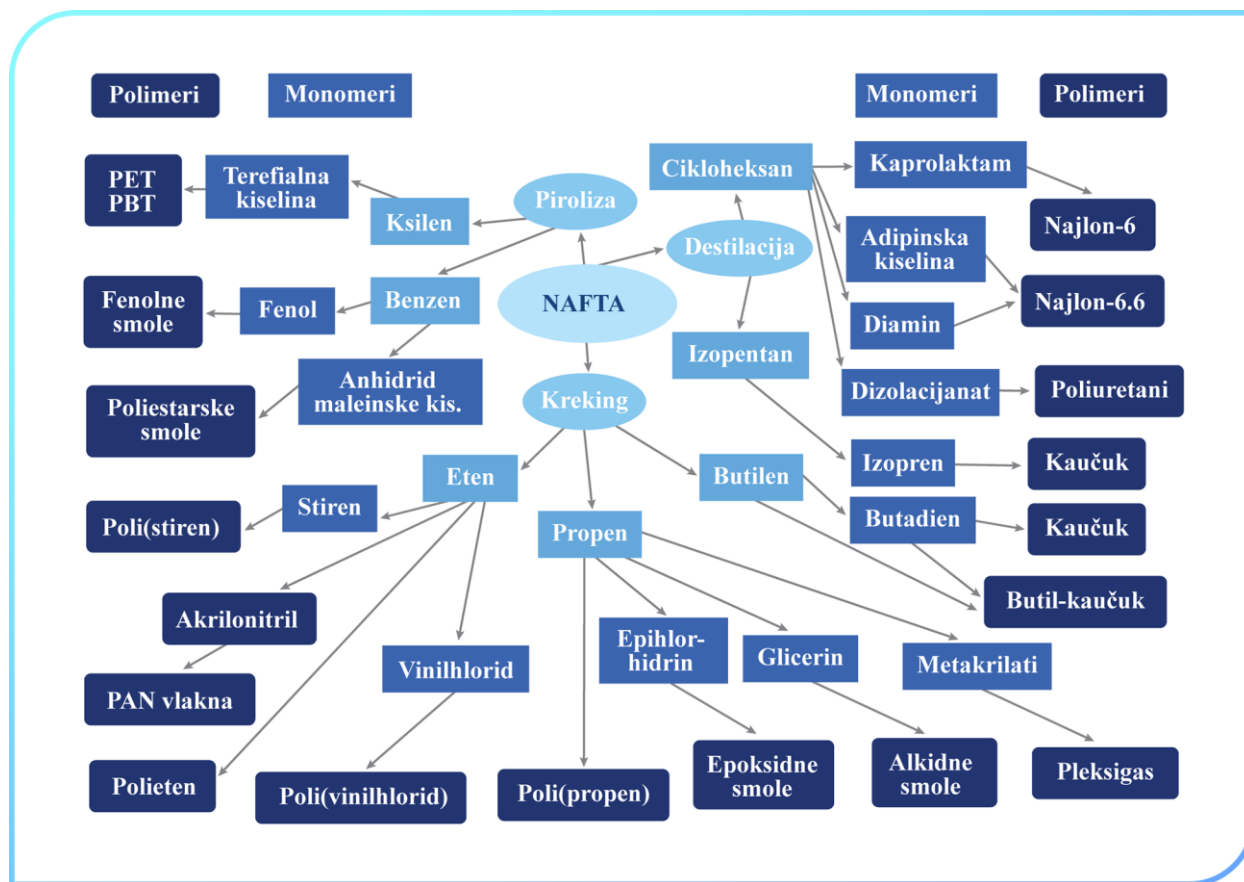
Početak industrijskog doba vezuje se za progresivni napredak društva i modernizaciju. Početkom XX veka, sintezom prvog plastičnog polimera, počela je masovna upotreba plastike, koja je pre svega dugotrajna, odličnih specifikacija, jeftina i lako dostupna. Stoga, postala je dominantni materijal, kako u industrijskoj proizvodnji, tako i u svakodnevnom životu ljudi (Van Cauwenberghe i sar., 2015). Prekomerna upotreba plastike dovela je do sintetičkog zagađenja prirode (eng. synthetic pollution), tj. do zagađenja plastikom globalnih razmera. Godišnje, između 4,8 i 12,7 miliona tona plastičnog otpada završi u vodi (Haward, 2020). Naučno interesovanje za problem sintetičkog zagađenja počelo je nakon prvog istraživanja mikroplastike na Sargasovom moru (Carpenter i Smith, 1972). Početkom XXI veka, istraživanja su postala intenzivnija, ali i dalje sa akcentom na morske ekosisteme (Fowler, 1987; Carpenter i sar., 1972; Coe i Rogers, 1996; Colton i sar., 1974). Tek nakon prve decenije XXI veka, istraživanja su usmerena i na slatkovodne ekosisteme (Dris i sar., 2018). Zagađenje akvatičnih ekosistemima mikroplastikom je veoma složeno, jer uključuje različita staništa, poput potoka, reka, ušća, privremenih i trajnih močvara, bara, akumulacija i jezera. Različita vodena tela imaju različite karakteristike u smislu hidrologije, fizičkih i hemijskih parametara vode, sastava zajednica flore i faune, ali i okolni slivovi i obrasci korišćenja zemljišta mogu uticati na abiotičke i biotičke karakteristike pojedinih tipova ovih sistema (Bank i Hanssan, 2022).

Mikroplastika je definisana kao sintetički polimer veličine od 1 μm do 5 mm (Sorensen i Jovanović, 2021). Može biti veoma raznovrsna, poreklom od različitih polimera, širokog spektra veličina, boja i morfologije, ali i hemijskih aditiva (Slika 1). Termin polimer izveden je iz grčkih reči „*poli*“ što znači mnogo i „*mer*“ što znači jedinica koja se ponavlja. Prema definiciji Međunarodne unije za čistu i primenjenu hemiju (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC), polimeri su supstance sastavljene od makromolekula, veoma velikih čestica čija se molekulska težina kreće od nekoliko hiljada do čak miliona g/mol. Takvi makromolekuli nastali su ponavljanjem velikog broja konstitucionih jedinica (monomera), spojenih kovalentnim vezama. U prevodu sa latinskog jezika, termin „*plasticus*“ znači „sposoban za oblikovanje“. Specifikacije polimera ogledaju se kroz parametre kao što su: specifična težina, termička svojstva, kristalna struktura, tvrdoća, zatezna čvrstoća, obradivost, mehanička svojstva i rastvorljivost.



Slika 1. Prikaz osnovnih parametara mikroplastike koji je definišu. Na osnovu definisanih parametara (hemijско poreklo, aditivi, primarni i sekundarni način nastanka, veličina, morfologija, obojenost i toksini) vrši se kategorizacija čestica mikroplastike u istraživanjima. Tri tačke na kraju svake kolone označavaju da liste nisu potpune. PP - polipropilen; LDPE - polietilen niske gustine; HDPE - polietilen visoke gustine; PVC - polivinilhlorid; PU - poliuretan; PET - polietilen tereftalat; PS - polistiren; ABS - akrilonitril butadien stiren; PMMA - polimetil metakrilat; POM - polioksimetilen; PBT - polibutilen tereftalat; PC - polikarbonat; PA - poliamida; SAN - stiren-akrilonitril; PEEK - polietar etar ketona; PSU - poliarilsulfona; PAH – policiklični aromatični ugljovodonik; PCB - polihlorovani bifenil; DDT - dihlorodifeniltrikloretan; PBDE - polibromovani difenil etri. Modifikovano prema Rochman i sar., 2019. (<https://doi.org/10.1002/etc.4371>).

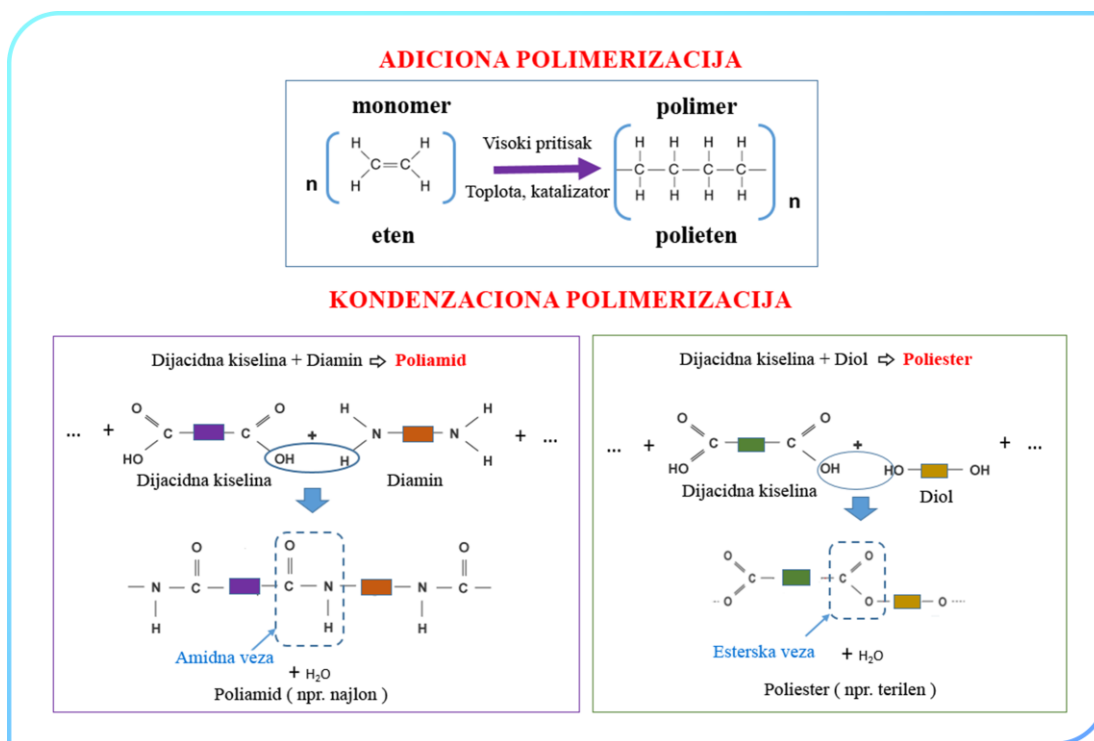
Polimerni materijali se mogu klasifikovati na više načina, među kojima se ubrajaju: poreklo i način nastanka, hemijski sastav monomera, fizička svojstava, prerada i primena. Poreklo polimera može biti prirodno ili sintetičko, u zavisnosti od supstance koja se koristi u procesu polimerizacije. Prirodni polimeri nastaju korišćenjem biopolimera poput celuloze, proteina, dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), hitina, vune, lignina, skroba i prirodnog kaučuka, za razliku od sintetičkih, gde osnovni resurs za njihovu proizvodnju predstavljaju nafta, prirodni gas i ugalj (Slika 2).



Slika 2. Šema prerade nafte u polimere. Modifikovano prema Jovanović i Đonlagić (2004).

Polimerizacija predstavlja hemijski proces u kome se laki olefini gasovi kao što su etilen, propilen, butilen (tj. monomeri) prevode u ugljovodonike veće molekularne težine (polimere), formiranjem polimernih lanaca. Postoje dva različita mehanizma polimerizacije: stupnjevita i lančana reakcija. Lančana reakcija polimerizacije može biti radikalna, katjonska, anjonska i koordinaciona, dok se stupnjevita reakcija polimerizacije deli na adiciju i kondenzaciju (Slika 3). Reakcijom adicione polimerizacije jedan monomer se povezuje sa sledećim (dimer), a dimer sa sledećim (trimer) i tako dalje. Ovakav proces praćen je prisustvom katalizatora, obično peroksida, i poznat kao polimerni rast lanca, zbog pojedinačnog dodavanja monomernih jedinica. Uobičajeni primeri adicijonih polimera su polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS) i polivinilhlorid (PVC). Kondenzaciona polimerizacija predstavlja spajanje dva ili više različitih monomera, uklanjanjem malih molekula, poput vode. Takođe je potreban katalizator da bi se reakcija odvijala između susjednih monomera. Ovakav proces poznat je i kao rast koraka, jer se na

postojeći lanac može dodati drugi lanac. Uobičajeni primeri kondenzacionih polimera su poliester i najlon.



Slika 3. Prikaz adicione i kondenzacione polimerizacije na primeru a) polietilena; b) poliamida i c) poliestra.

U zavisnosti od načina nastanka, mikroplastika može biti podeljena na primarnu i sekundarnu (Slika 1). Primarna mikroplastika predstavlja fabričke mikroskopske čestice kao što su pelet, fibrili (vlakna), sferne mikročestice za čišćenje lica (Chang, 2015; Napper i sar., 2015; Mato i sar., 2001; van Wezel i sar., 2015), ali takođe uključuje i pelete rasipane tokom transporta ili produkcije i plastične fibrile tekstila oslobođene tokom mašinskog pranja (Sundt i sar., 2014).

Sekundarna mikroplastika nastaje degradacijom makroplastike tokom vremena (Ryan i sar., 2009; Thompson i sar., 2004), pod uticajem fizičkih, bioloških ili hemijskih procesa (Browne i sar., 2007; Klein i sar., 2018). Fizički aspekt podrazumeva mehaničko usitnjavanje makroplastike do fragmenata manjih od 5 mm putem vetra, talasa, aktivnosti ljudi i životinja. Biološki procesi degradacije makroplastike odnose se prvenstveno na aktivnost mikroorganizama (bakterija, gljiva i algi). Hemijski aspekt odnosi se na oksidaciju i hidrolizu, ali i na fotodegradaciju pod uticajem

sunčevog zračenja, kada plastika postaje krhka i lako puca, čime nastaju manji fragmenti, koji se vremenom sve više usitnjavaju.

Najčešći način nastanka sekundarne mikroplastike jeste kombinacija svih prethodno navedenih procesa.

Hidalgo-Ruz (2012) podelio je čestice mikroplastike prema obliku na sledeće kategorije:

- 1) plastični fragmenti;
- 2) mikrofibrili (filamenti, vlakna);
- 3) peleti;
- 4) filmovi;
- 5) pene;
- 6) mikrozrna/mikroperle,

dok su potkategorije definisane na osnovu obojenosti čestica. Najdominantnije potkategorije mikroplastike u dosadašnjim istraživanjima su plava i crna (Rezania i sar., 2018; Fendall i Sewell, 2009; Lee i Kim, 2018; Li i sar., 2019), a potom crvena, bela, žuta i zelena (Kalčíková i sar., 2017; Li i sar., 2018; Naji i sar., 2018). Dominantnije prisustvo određene boje bi moglo da simulira vizuelne preferencije akvatičnih organizama ka odabiru hrane (Cole i sar., 2011; Wright i sar., 2013).

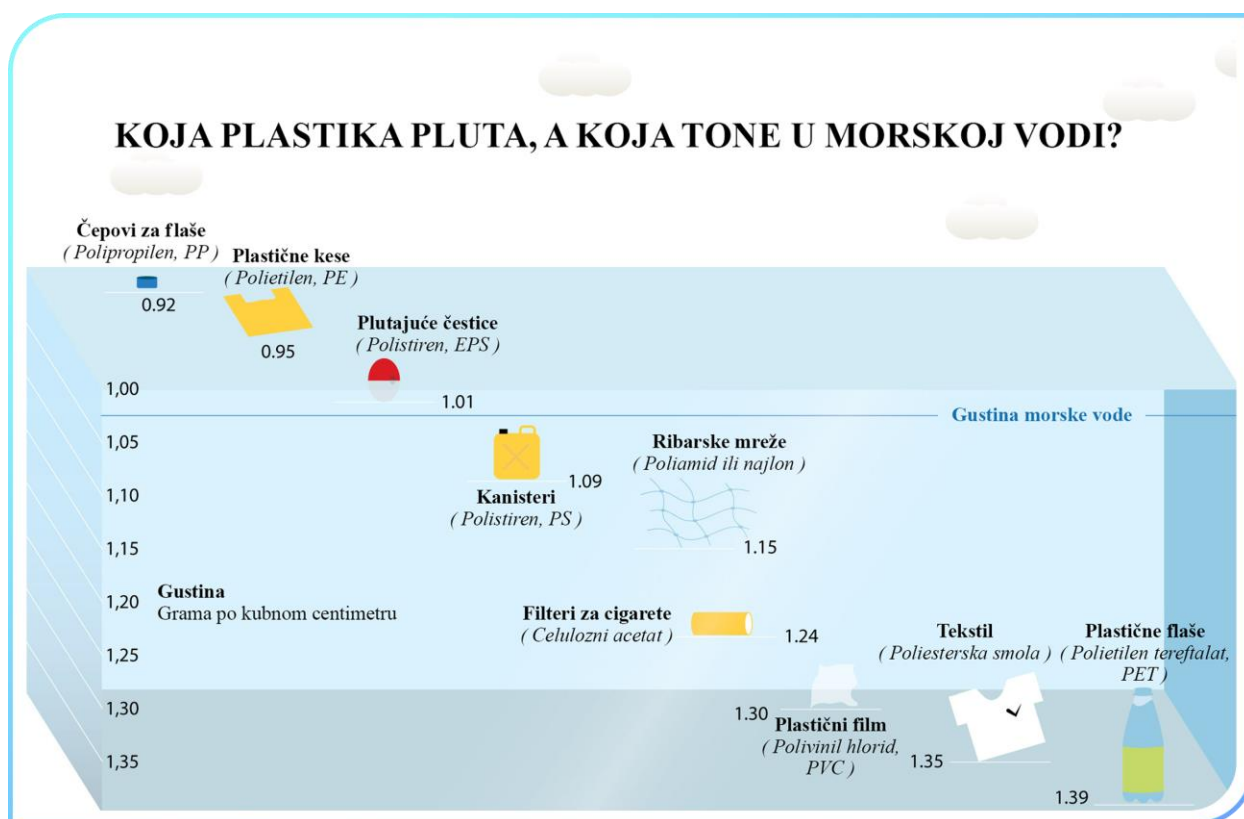
Mikroplastika, a i plastika uopšte, sadrži mešavinu hemikalija koje se unose tokom njihove proizvodnje, uključujući aditive, stabilizatore, usporivače plamena, pigmente, punila i plastifikatore (Hahladakis i sar., 2018), koji se mogu osloboditi kada mikroplastika uđe u vodenu sredinu. Pored toga, mikroplastika adsorbuje perzistentne organske zagađivače, polihlorovane bifenile (PBC), organohlorne pesticide (OCP), kao što su dihlrodifeniltrihloretan (DDT) i policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) (Rios i sar., 2007).

Aditivi imaju široku primenu u raznim granama industrije, međutim, pomena u obradi polimera je neizostavna. Predstavljaju hemikalije koje se dodaju tokom proizvodnje plastike zarad poboljšanja performansi plastičnih proizvoda poput boje ili transparentnosti, mehaničke, termičke i električne otpornosti, ali i otpornosti na razgradnju ozonom, temperaturom, svetlosnim zračenjem, bakterijama (Hahladakis i sar., 2018). Murphy (2001) je klasifikovao aditive prema nameni, tj. svojstvima koje nude, na: inertna ili ojačavajuća punila, pigmente, plastifikatore, stabilizatore i protivpožarne aditive. Iako aditivi poboljšavaju svojstva polimernih proizvoda,

mnogi od njih su toksični, a njihov potencijal za kontaminaciju zemljišta, vazduha i vode je visok (Hahladakis i sar., 2018).

Plastifikatori su niskomolekularne supstance, nerastvorljive u tečnostima i hemijski stabilne. Njihova uloga je u smanjenju privlačne sile između molekulskih lanaca kako bi se povećale pokretljivost, obradivost ili rastegljivost materijala (Marturano i sar., 2017). Plastifikatori na bazi ftalata i bisfenola A (BPA) impliciraju toksičnost plastičnih čestica (Oehlmann i sar., 2009) i mogu imati značajni procentualni udeo ukupne težine polimera (na primer, do 50 % ftalata u ukupnoj težini polivinil hlorida; Rochman i sar., 2019).

Svaki plastični polimer poseduje različitu specifičnu težinu, manju, istu ili veću od specifične težine vode (Moret-Ferguson i sar., 2010), što dovodi do različite distribucije mikroplastike u akvatičnoj sredini i može imati različite uticaje na akvatične organizme (Scherer i sar., 2018; Rezania i sar., 2018; Villarrubia-Gómez i sar., 2018; Slika 4).

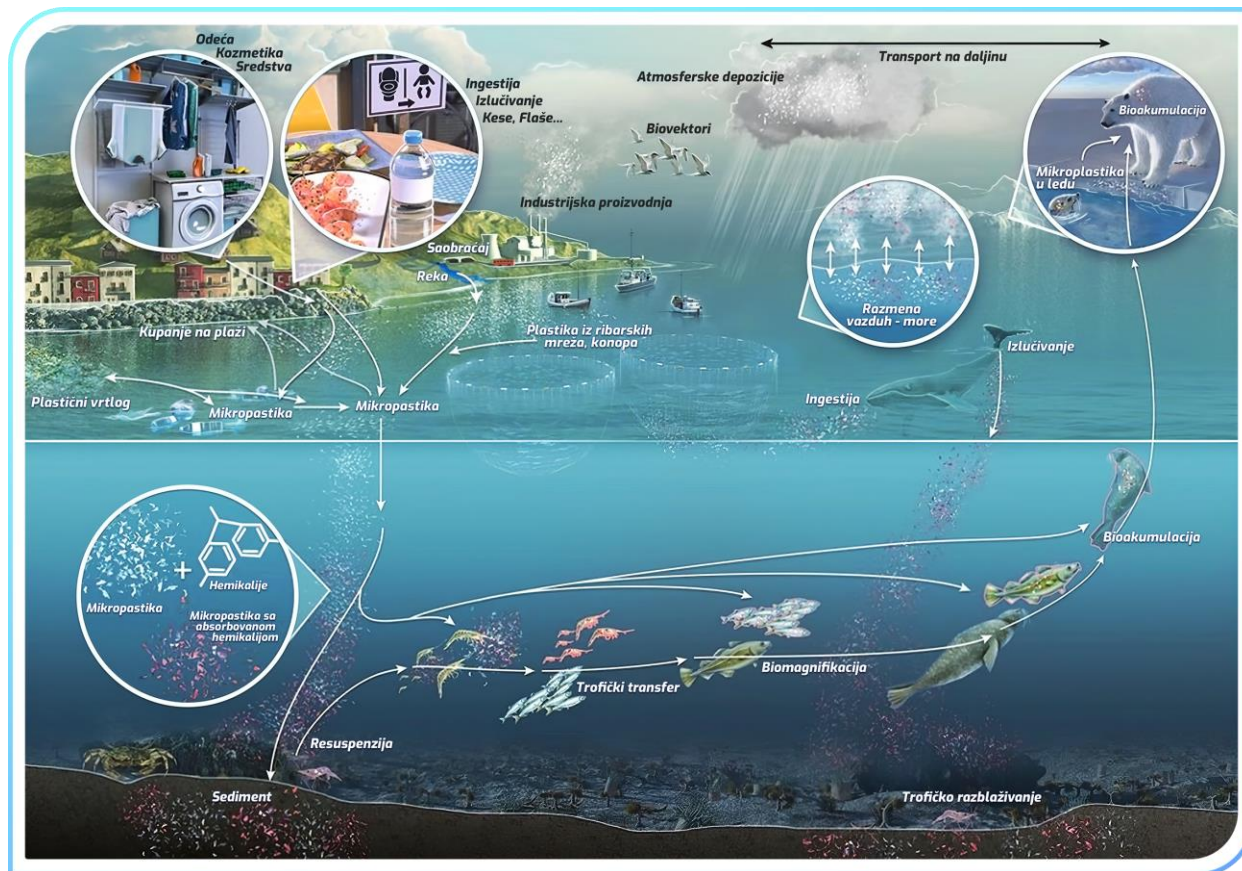


Slika 4. Distribucija različitih polimernih produkata u akvatičnom ekosistemu na osnovu njihove specifične težine. Modifikovano prema GESAMP, 2015. (<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3803.7925>).

Browne i sar. (2013) su potvrdili da velike koncentracije čestica mikroplastike i aditiva u vodenim ekosistemima štetno deluju na ekofiziološke funkcije organizma. Prisustvo mikroplastike na površini vode (Eriksen i sar., 2013; Faure i sar., 2015) ometa prolaz sunčevih zraka do dubljih slojeva akvatičnih sistema tako što upijaju deo zračenja, dok se tom prilikom ubrzava proces starenja samih čestica. Mikroplastika može negativno uticati i na brzinu fotosinteze fitoplanktona, kao i na rad i dejstvo biološke pumpe, izazivajući veću emisiju gasova staklene bašte (CO₂) koji su ostali neiskorišćeni usled nedostatka sunčevog zračenja (Shen i sar., 2020). U vodenom stubu, čestice mikroplastike plivaju i imaju ulogu vektora za različite hemikalije ili akvatične organizme (Mato i sar., 2001; Koelmans i sar., 2013; Rochman i sar., 2013), među kojima mogu biti i invazivne vrste (Barnes, 2002; Gregory, 2009), ili oportunistički patogeni (McCormick i sar., 2014; Zettler i sar., 2013). Čestice mikroplastike mogu za svoju površinu adsorbovati teške metale poput bakra, cinka (Brennecke, 2016), kadmijuma, žive, olova, selena, kalijuma, antimona, srebra, nikla, hroma, hlora, arsena (Turner, 2016) ili organske zagađivače i zajedno sa njima se prenositi putem lanaca ishrane (Endo i sar., 2005; Rios i sar., 2007; Colabuono i sar., 2010; Rochman i sar., 2013; Koelmans i sar., 2014). Potencijal čestica mikroplastike da se ponašaju kao vektori ili rezervoari različitih hemijskih agenasa u okruženju i njihova sposobnost prenosa na velike udaljenosti, kao i povećana biodostupnost ogranizmima, mogu značajno zavisiti od uslova životne sredine i svojstava polimera i adsorbovanog hemijskog agensa (Rodrigues i sar., 2019; Ma i sar., 2020; Santos-Echeandía i sar., 2020). Neki polimeri mogu biti kancerogeni ili mutageni na osnovu svojih hemijskih činioca (npr. PVC, poliuretan), dok se za druge smatra da su inertniji (npr. polietilen, polipropilen). Sa druge strane, mikroplastika sa velikim odnosom površine i zapremine (mala, izdužena ili nepravilnog oblika) ima veći kapacitet adsorpcije, što može dovesti do akumulacije štetnih hemikalija koje se mogu preneti na organizme koji gutaju mikroplastiku (Rochman, 2015). Mikroplastika je biodostupna velikom broju vrsta, naročito ogranizmima koji se hrane filtracijom (Wagner i Lambert, 2018). Konačno, skoro svaka čestica tokom vremena padne na dno vodenog staništa (Tibbetts i sar., 2018), bilo zbog originalne gustine, formiranje biofilma mikrobijalnom aktivnošću (Arias-Andres i sar., 2018) ili putem fekalnih peleta organizama koju su već ingestovali čestice mikroplastike (Cole i sar., 2016). Biofilm adsorbovan za površinu čestica mikroplastike povećava njihovu masu, pa čestice postaju teže i sa površine vode tonu ka sedimentu (Teuten i sar., 2007; Tibbetts i sar., 2018) kada postaju dostupne i bentosnim organizmima. Laboratorijske analize pokazale su da se mikroplastika sa adsorbovanim

toksičnim jedinjenjima može ingestovati i dovesti do unosa istih u lanac ishrane (Burns i Boxall, 2018), na osnovu čega se javlja zabrinutost da se toksična jedinjenja iz mikroplastike mogu akumulirati u vodenim organizmima, a na kraju mogu negativno uticati i na zdravlje ljudi (Liebmann i sar., 2018).

Sa ciljem razumevanja složenog zagađenja plastičnim otpadom (Thompson i sar., 2004; Windsor i sar., 2019) i njegovih tokova kroz ekosistem, definisan je novi koncept - plastični ciklus (Bank i Hansson, 2019) kao: “Kontinuirano i složeno kretanje plastičnih materijala između različitih abiotičkih i biotičkih komponenti ekosistema, uključujući ljude”. Ovaj koncept je proširen uključivanjem čestica makroplastike (Lechthaler i sar., 2020) i povezanost transporta i efekata zagađenja plastikom, uključujući izvor-receptor modele u životnoj sredini (Waldschläger i sar., 2020; Hoellein i Rochman, 2021). Početna tačka kretanja mikroplastike predstavljaju urbane sredine, odakle direktnim ili difuznim putem, u vidu primarne ili sekundarne mikroplastike, čestice dospevaju u reke, oticanjem reka do mora, dok putem morske disperzije dospevaju do okeanskih basena. Migratorne divlje životinje, reke, vetar (Jambeck i sar., 2015; Hurley i sar., 2018), oluje (Hitchcock, 2020), kiše (Xia i sar., 2020) i površinske vode uopšte se takođe smatraju važnim vektorima i pokretačima mehanizama protoka i distribucije zagađenja plastičnim otpadom u različitim ekosistemima, uključujući transfer iz kopnene u akvatičnu sredinu (Windsor i sar., 2019), zalazeći u udaljene regione, poput netaknutih planinskih regija, područja divljine i Arktik (Bergmann i sar., 2019; Brahney i sar., 2020), kao i najdublje rovove okeana (Jamieson i sar., 2019). Značaj mikroplastičnog ciklusa ogleda se u tome što integriše tri osnovne naučne sfere: biologiju (tj. trofički transfer), hemiju životne sredine i zdravlje ljudi (Slika 5).



Slika 5. Konceptualni model ciklusa zagađenja plastikom i interakcije između biogeohemije, trofičkog transfera i ljudskog zdravlja i izloženost. Strelice i prikazi nisu u razmeri, već samo u opisne svrhe. Modifikovano prema Bank i Hanson, 2019. (<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02942>).

Zbog sveopšteg prisustva i visoke biodostupnosti, čestice mikroplastike mogu biti usvojene od strane različitih akvatičnih organizama (Wright i sar., 2013; Kolandhasamy i sar., 2018). Dok mnoge studije istražuju efekat pojedinačnih polimera na akvatične organizme, iako to nije slučaj u prirodnim staništima, mikroplastični otpad je sastavljen od nekoliko polimera u različitom odnosu, sa specifičnim načinima vertikalnog transfera u akvatičnom ekosistemu.

Među deset najčešće korišćenih tipova polimera u industriji spadaju polietilen-tereftalat (PET), polietilen niske i visoke gustine (LDPE; HDPE), polistiren (PS), polivinil hlorid (PVC) i poliamid (PA) (Slika 5; PlasticsEurope, 2017). Upotrebljavaju se za proizvodnju produkata široke

upotrebe (građevinarstvo i konstrukcija, poljoprivreda, pakovanje, domaćinstvo, lična higijena itd.) (PlasticsEurope, 2018; Slika 6).



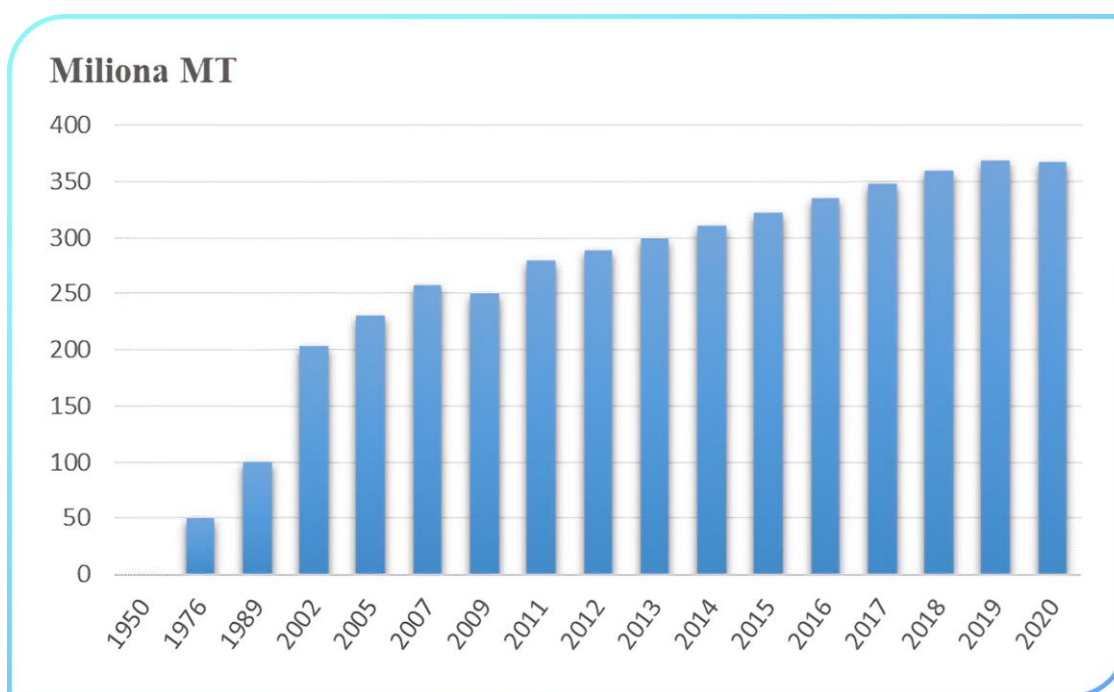
Slika 6. Najčešće vrste polimera i njihova primena u industriji pakovanja. Oznake u prvom redu predstavljaju standardne reciklažne kodove. Koloritne oznake za upotrebu plastike: zelena boja - bezbedna upotreba; žuta boja – upotreba uz oprez; crvena boja – izbegavati.

Prednosti polimernih materijala ogledaju se u tome što (Andrady i Neal, 2009; PlasticsEurope, 2009):

- plastična ambalaža štiti hranu i robu od rasipanja i/ili kontaminacije, čime se štede resursi;
- mala težina plastične ambalaže u poređenju sa drugim materijalima štedi gorivo i smanjuje emisije istog tokom transporta;
- plastični sistemi za vodosnabdevanje i kanisteri/cisterne/rezervoari mogu da obezbede čistu vodu;
- plastični materijali male gustine, koji se koriste kao zamena za metale ili keramiku u automobilima i avionima, štede gorivo i smanjuju emisije;
- plastična zaštitna odeća i sigurnosna oprema (npr. vatrootporni materijali, kacige, vazdušni jastuci) sprečavaju povrede;

- plastični proizvodi za medicinsku primenu doprinose poboljšanju zdravlja (npr. cevčice, špricevi, ambalaža za prenos krvi, proteze, itd.).

Raznovrsna potrošnja, međutim, dovodi do raznolikog toka otpada. Nastaju velike količine plastičnog otpada, uglavnom zbog kratkog upotrebnoog veka mnogih plastičnih proizvoda (procenjuje se da približno 40 % plastičnih proizvoda ima vek korišćenja kraći od 1 meseca). Velike količine ovog otpada stvaraju ozbiljne pritiske po životnu sredinu i probleme upravljanja (Achilias i sar., 2007). Svetska proizvodnja plastike nastavlja da raste (Slika 7) sa godišnjom proizvodnjom od 367 miliona metričkih tona (MT) u 2020 (PlasticsEurope, 2021), dok je 5 biliona metričkih tona plastike akumulirano od 1950. (Geyer i sar., 2017), koja ostaje u prirodi i degraduje se do mikroplastičnih čestica. Procenjuje se da će do kraja XXI veka biti $2,5 \times 10^7$ do $1,3 \times 10^8$ tona ostataka mikroplastike na površini okeana (Everaert i sar., 2018).



Slika 7. Pregled svetske produkcije plastike prema dostupnim podacima od 1950. do 2020. godine.

1.1. Direktive o mikoplastičnom otpadu

Aneks VIII Okvirne direktive o vodama (eng. *Water Framework Directive - WFD*) fokusira se na identifikaciju „specifičnih zagađivača“, kao što je mikroplastika, da bi se izveli standardi kvaliteta životne sredine (eng. *Environmental Quality Standards - EQS*) za ciljane hemikalije, kako bi se postigao dobar ekološki status površinskih voda (EU, 2000). Kako je mikroplastika postala globalni problem, Direktivama o ambalažnom otpadu (94/62/EC), otpadu (2008/98/EC), deponijama (1999/31/EC) i kanalizacionom mulju (86/278/EEC) (EC, 2014; EC, 2013) uspostavljen je monitoring izvora plastičnog otpada u slatkovodnim ekosistemima Evrope. Evropska komisija (eng. *European Commission - EC*) je 2013. godine predstavila „Zeleni dokument o evropskoj strategiji o plastičnom otpadu u životnoj sredini“ (eng. ‘*Green paper on a European strategy on plastic waste in the environment*’) (EC, 2013), Evropsku strategiju o plastičnom otpadu u životnoj sredini, posebno o mikoplastičnom otpadu, kao širi pregled zakonodavstva o otpadu. Direktiva o plastičnim kesama ustanovljena je sa ciljem da se smanji njihova upotreba kroz cene, poreze i namete/naplate, usvojena je 2015. godine (EC, 2015). Pošto je zabrinutost za ovo sintetičko zagađenje sve veća, zakonodavstvo Unije o hemikalijama (1907/2006/EC) propisuje količine proizvodnje plastičnih monomera i aditiva koji se koriste u proizvodnim procesima (EU, 2006). Evropska komisija je 2015. godine usvojila Paket cirkularne ekonomije za održivije korišćenje resursa koji se odnosi na plastiku, među pet prioritarnih sektora (EC, 2015). Inicijativa „Nova ekonomija plastike“ (World Economic Forum, 2016) ima za cilj da podstakne industriju i društvo da se kreću ka kružnom ekonomskom modelu, da plastika ne postaje otpad, već da se nakon upotrebe vraća u industriju kao novi resurs. Evropska komisija je predložila strategiju prema kojoj sva plastična ambalaža na tržištu EU treba da bude reciklirana do 2030. godine, potrošnja plastike za jednokratnu upotrebu smanjena, a namerna upotreba mikroplastike ograničena (EC, 2018).

Prema Evropskoj okvirnoj direktivi o vodama (EU, 2000), makrobeskičmenjaci se koriste u monitoring studijama za procenu ekološkog statusa akvatičnih ekosistema, kao grupa različitih bioindikatora organskog zagađenja. Uprkos velikom problemu koji predstavljaju čestice mikroplastike u životnoj sredini, ne postoje definisani indikatori za pasivno praćenje mikroplastike u vodenim ekosistemima. U Aneksu VIII nalazi se lista najznačajnijih zagađivača, između ostalog,

„perzistentne i bioakumulativne organske toksične supstance“ i „perzistentni ugljovodonici“ koji mogu uključivati sintetičke polimere (EU, 2000).

1.2. Akvatična toksikologija

Začeci toksikologije datiraju još od vremena praistorije, kada su se životinjski otrovi i biljni ekstrakti koristili za lov i ratovanje (Gallo i Doull, 1991). Razvoj toksikologije vezuje se za ekspanzivni razvoj organske hemije, usled sintetisanja velikog broja organskih jedinjenja sa štetnim efektima na zdravlje ljudi (Buikema i sar., 1982). Krajem 80-ih godina XX veka definisana je ekotoksikologija (Truhaut, 1975; Butler, 1978), kao grana toksikologije - nauke o toksičnim efektima prirodnih ili veštački sintetisanih supstanci na živi svet biosfere. Toksikant predstavlja bilo koji agens koji ima štetan efekat na biološke sisteme u pogledu strukture, funkcionalnosti ili letalnog ishoda. Toksičnost određenog agensa označava njegov potencijal za štetan uticaj na organizme, a zavisi od koncentracije, sastava i svojstava agensa kojem je organizam izložen (spoljašnji i unutrašnji uticaj) i dužini izlaganja istim. Deo ekotoksikologije koji se bavi izučavanjem vodenih ekosistema naziva se akvatična toksikologija. Zasnovana je na izučavanju efekata hemikalija i drugih antropogenih ili prirodnih agenasa na akvatične organizme, od najnižeg (subćelijskog), do najvišeg (ekosistemskog) nivoa organizacije (Slika 8). Efekti mogu biti pozitivni ili negativni, ali fokus akvatične toksikologije je primarno na negativnim efektima u prirodi. Na nivou organizma, efekti mogu biti subletalni i letalni. Subletalni efekti ukazuju na promene u ponašanju (plivanje, ishrana, privlačnost-odbojnost, predator-plen interakcije), fiziologiji (rast, razvoj, reprodukcija), biohemiji (krvni enzimi, nivoi jona u organizmu) i histologiji (struktura tkiva) (Sheenan i sar., 1984). Letalni efekti mogu biti kratkoročni ili dugoročni (izraženi preko mortaliteta ili preživljavanja). Svi predstavljeni efekti mogu se kvantifikovati nizom kriterijuma, kao što su broj uginulih (preživelih) organizama, reproduktivna uspešnost, stanje organa ili celog tela, broj teratogenih abnormalnosti ili incidenca tumora, enzimska aktivnost, kao i abundantnost vrsta date zajednice organizama.



Slika 8. Pojednostavljena šema koja ilustruje potencijalni uticaj izloženosti mikroplastici od najnižeg do najvišeg nivoa biološke organizacije. Modifikovano prema Galloway i sar., 2017. (<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>).

Toksični agensi u akvatičnoj sredini mogu se introdukovati i testirati u različitim medijumima: vodi, sedimentu, hrani, pa je definisanje njihove količine, koncentracije i biodostupnosti od presudnog značaja. Stoga, vitalna komponenta akvatične toksikologije predstavlja proučavanje izvora, transporta, distribucije, neorganske i organske transformacije i konačne sudbine toksičnih agenasa u akvatičnoj sredini. Neophodno je razumeti hemijske (hidroliza, oksidacija/redukcija i fotoliza), fizičke (molekularna struktura, rastvorljivost, isparljivost i adsorpcija) i biološke (biotransformacija) faktore koji utiču na koncentracije hemikalija u prirodi, da bi se utvrdilo kako se potencijalni agens ponaša u prirodi, kako prirodna sredina reaguje na isti, i da bi se procenio uticaj na akvatične organizme. Ekotoksikologija (identifikacija efekata) i hemija (identifikacija uzroka) su danas dve neodvojive komponente različitih pristupa za procenu štetnosti agenasa na živi svet (Blaise i sar., 1988). Evaluacija štetnog uticaja agenasa na organizme vrši se testovima toksičnosti u standardizovanim, ponovljivim

uslovima koji omogućavaju poređenje sa drugim hemikalijama ili test organizmima, kao i poređenje sličnih rezultata iz drugih laboratorija. Razlog tome je taj što biološki testovi i „krajnje tačke toksičnosti“ (eng. *endpoints*) daju brzu, pouzdanu i nedvosmisleno procenu uticaja na životnu sredinu (Rand, 1995). U proceni hemijski izazvanih efekata, važno je uzeti u obzir da u prirodnoj vodenoj sredini organizmi mogu biti izloženi ne jednoj supstanci, već mešavini različitih supstanci u isto ili približno isto vreme, što dovodi do toksikoloških interakcija (Alabaster i Lloyd, 1980; Calabrese, 1991).

U akvatičnoj toksikologiji, testovi toksičnosti se često nazivaju bioesejima, označavajući sprovođenje specifičnih procedura za određivanje jačine hemikalija (stimulusa) na osnovu stepena odgovora izazvanog u test organizmima. Finney (1978) definiše bioesej kao eksperiment za procenu prirode, konstitucije ili potencijala materijala (ili procesa) na osnovu reakcije koja prati njegovu primenu na živoj materiji. Bioesej uključuje: stimulus ili koncentraciju agensa merenog spoljašnjeg izlaganja ili adsorbovane doze od strane subjekta, tj. organizama čiji se odgovor na stimulus ogleda u promeni nekog od prethodno definisanih parametara. Mogu biti usmereni na testiranje pojedinačnih vrsta (eng. *single-species*), interakcije među vrstama (eng. *multispecies*) ili na zajednice nekog ekosistema. U pogledu dužine trajanja bioeseja, dele se na akutne (kratkoročne) i hronične (dugoročne). Akutni testovi predstavljaju izlaganje organizama određenom toksikantu jednom ili više puta u kratkom vremenskom intervalu, od par sati do par dana. Hronični testovi podrazumevaju kontinuirano ili isprekidano izlaganje organizma niskoj koncentraciji toksikanta na duži vremenski period (nedelje, meseci ili godine), u skladu sa dužinom životnog ciklusa organizma.

1.2.1. Pristupi u ekotoksikološkim testovima

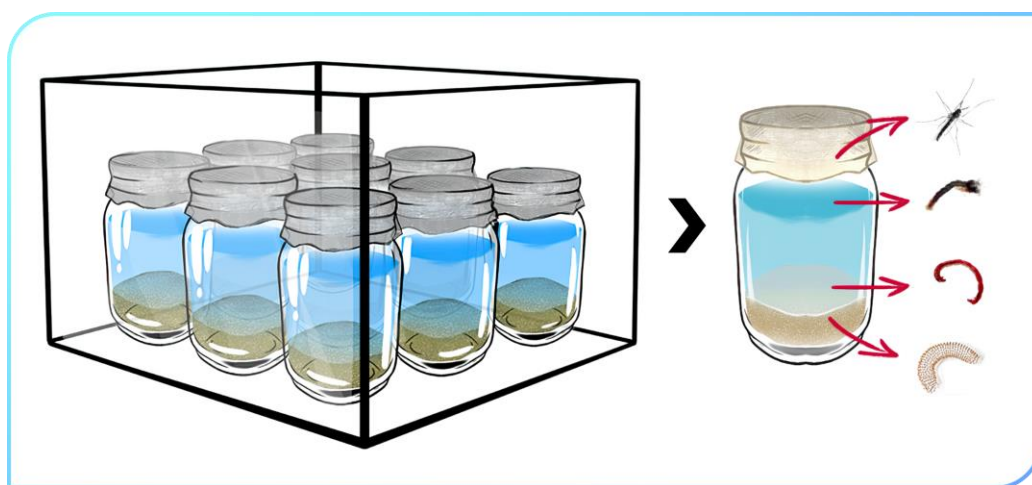
Postoje tri generalna pristupa za sprovođenje testova toksičnosti:

1. *ex-situ* pristup;
2. eksperimentalni model ekosistema;
3. *in-situ* pristup.

Svaki pristup ima svoje prednosti i ograničenja. Stoga, unapred definisani cilj određuje kako pristupiti istraživanju. Kratak osvrt na svaki od pristupa sledi u nastavku.

1.2.1.1. *Ex-situ* pristup

Laboratorijski pristup podrazumeva strogo kontrolisane uslove i sa ograničenim brojem varijabli. Najčešće se sprovode korišćenjem jedne vrste. Takav pristup može dati informacije o koncentracijama (McCarty i Mackay, 1993) i dužini izlaganja toksikantima koji izazivaju subletalne ili letalne efekte. Laboratorijski bioeseji dizajnirani su tako da daju podatke koji su lako proverljivi u *ex-situ* uslovima. Podaci dobijeni laboratorijskim pristupom se ne mogu direktno ekstrapolirati na prirodne ekosisteme, jer se baziraju na strogo kontrolisanim uslovima gde, neretko, jačina uticaja toksikanta biva pojačana ili ubrzana u odnosu na prirodne uslove (Pratt i sar., 1990). Uprkos tome, klasična procena bioloških efekata agenasa na akvatične organizme bazirana je upravo na rezultatima testova toksičnosti na pojedinačnim vrstama u laboratorijskim uslovima (Slika 9). Standardizacija ovih testova omogućila je efikasan pristup procene potencijalnih štetnih uticaja hemikalija na organizme (Rand i Petrocelli, 1985).



Slika 9. Postavka *ex-situ* eksperimenta. Prikaz akvarijuma sa eksperimentalnom postavkom seta ponovaka (levo). Prikaz jednog ponovka na primeru hironomida sa prostornom distribucijom svakog stadijuma životnog ciklusa (desno).

1.2.1.1.1. Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj (OECD)

Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD) je međunarodna organizacija, oformljena 1960. godine, kojoj pripadaju predstavnici 38 industrijalizovanih zemalja Severne Amerike, Evrope i Azije i pacifičkog regiona, sa sedištem u Parizu, Francuska. Smernice OECD-a za ispitivanje hemikalija su jedinstveno sredstvo za procenu potencijalnih efekata hemikalija na ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Oni su podeljeni u pet sekcija: (1) Fizičko-hemijska svojstva; (2) Efekti na biotičke sisteme; (3) Sudbina i ponašanje u životnoj sredini; (4) Zdravstveni efekti i (5) Ostale smernice za ispitivanje. Prihvaćene na međunarodnom nivou kao standardne metode za testiranje bezbednosti, standardni protokoli namenjeni su za testiranje i procenu hemikalija (industrijske hemikalije, pesticidi, proizvodi za ličnu negu, itd.). Smernice definisane od strane OECD-a se konstantno ažuriraju i proširuju kako bi se osiguralo da odražavaju najsavremenije naučne pristupe i tehnike za ispunjavanje regulatornih potreba zemalja članica. Smernice su definisane uz pomoć velikog broja stručnjaka iz regulatornih agencija, akademske zajednice, industrije, ekoloških organizacija i organizacija za zaštitu životinja. Smernice OECD-a za testiranje su pokrivena OECD-ovim sistemom uzajamnog prihvatanja podataka (MAD). Prema ovom sistemu, rezultati laboratorijskih ispitivanja u vezi sa bezbednošću hemikalija koje se proizvode u skladu sa OECD smernicama za ispitivanje i OECD principima dobre laboratorijske prakse, prihvataju se u svim zemljama OECD-a i zemljama članicama u svrhu procene bezbednosti i drugih upotreba u vezi sa zaštitom zdravlja ljudi i životne sredine.

U Odluci-preporuci Saveta o kooperativnom istraživanju i smanjenju rizika od postojećih hemikalija (C(90)163/Final) odlučeno je da zemlje-članice kooperativno ispituju uticaj hemikalija velikog obima proizvodnje (eng. *High Production Volume* - HPV), kako bi identifikovale one koje su potencijalno opasne po životnu sredinu i/ili po zdravlje ljudi (OECD, 2004a). Za potrebe ove Odluke-preporuke HPV hemikalije su one hemikalije uključene u OECD reprezentativnu listu hemikalija velike proizvodnje (HPV) koja sadrži hemikalije koje se proizvode na nivoima većim od 1.000 tona godišnje u najmanje jednoj zemlji članici/regionu. Na listi od 4.843 jedinjenja za praćenje, nalaze se polivinil hlorid, polistiren, polimeri propena (među kojima se ubraja polipropilen), ali i sva jedinjenja nastala polimerizacijom nafte, među kojima su svi sintetički polimeri (Slika 2).

Pored toga, definisana je Stokholmska konvencija kao globalni, međunarodni, sporazum o zaštiti ljudskog zdravlja i životne sredine od perzistentnih organskih zagađivača. U ovu grupu jedinjenja ubrajaju se pesticidi i industrijske hemikalije koje su postojane u životnoj sredini, koje se mogu bioakumulirati u organizmima, sa toksičnim efektom po ljudsko zdravlje i životnu sredinu i sa sposobnošću prenosa na velike daljine. Ujedno, aditivi (najčešće plastifikatori) u mikroplastici i plastici, uopšte, potiču iz grupe industrijskih perzistentnih organskih zagađivača. S obzirom na njihov transport na velike udaljenosti, nijedna vlada koja deluje sama ne može zaštititi svoje građane ili svoju životnu sredinu od perzistentnih organskih zagađivača.

Kao odgovor na globalni problem perzistentnih organskih zagađivača, Stokholmska konvencija je usvojena 2001. godine i stupila je na snagu 2004. Stokholmska konvencija na osnovu odluke POPRC-6/2 zahteva od svojih država-članica da preduzmu mere eliminacije ili smanjena ispuštanja perzistentnih organskih zagađivača u životnu sredinu (UNEP, 2015). Mere kontrole primenjuju se na uvoz, izvoz, proizvodnju, odlaganje i upotrebu perzistentnih organskih zagađivača (UNEP, 2013). Od članica se takođe zahteva da promovišu najbolje dostupne tehnike i najbolju ekološku praksu za zamenu perzistentnih organskih zagađivača, dok istovremeno sprečavaju proizvodnju i upotrebu novih. Na listi od 12 ključnih jedinjenja našli su se heksahlorbenzen koji se, između ostalog, koristi u proizvodnji veštačke gume i polihlorovani bifenili, kao često korišćeni aditivi u industriji, najčešće u bojama i plastici.

Sa druge strane, OECD organizacija definisala je određene smernice za kontrolu supstanci koje se nalaze u životnoj sredini kao otpad (C(2004)20) (OECD, 2004b). U okviru Bazelske konvencije o kontroli otpada i opasnih materija, Aneksom I definisane su kategorije otpada koje treba kontrolisati, čime se propisuje praćenje supstanci koje sadrže ili su kontaminirane polihlorovanim bifenilima (PCB) i/ili polihlorovani terfenili (PCT) i/ili polibromovani bifenili (PBB), koje nastaju od proizvodnje i upotrebe smola, lateksa, plastifikatora, lepkova, kao ostaci od površinske obrade metala i plastike ili operacija odlaganja industrijskog otpada. Potencijalne opasnosti koje predstavljaju određene vrste otpada još nisu u potpunosti dokumentovane. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se razvila sredstva za karakterizaciju potencijalnih opasnosti koje predstavljaju po čoveka i/ili životnu sredinu ovim otpadom. Standardizovani testovi su izvedeni u odnosu na čiste supstance i materijale.

1.2.1.2. Eksperimentalni model sistemi

Eksperimentalni model sistemi koriste se za testiranje uticaja nekog agensa na više vrsta u kontrolisanim (laboratorijskim) ili prirodnim uslovima. Primarni razlog sprovođenja ovakvih testova jeste da se odredi realističniji režim izlaganja nekom hemijskom agensu koji će dati podatke uporedive sa stanjem u prirodnim ekosistemima. Pre svega se dele na lotičke i lentičke model sisteme, jer su primenjivi i u tekućim i stajaćim vodama. Na osnovu zapremine koju obuhvataju, dele se na mikrokozme, mezokozme i makrokozme.

1.2.1.2.1. Mikrokozme

Mikrokozma se nazivaju postrojenja u prirodnim, ali i laboratorijskim uslovima zapremine do 1 m³. Pogodne za istraživanje zajednica bara i manjih jezera, a naročito su pogodne prilikom izučavanja uticaja toksikanata na zajednicu organizama na duži ili kraći vremenski period. U prirodnim uslovima mogu se dobiti relevantniji podaci o realnom uticaju toksikanata na organizme. Postoje prednosti i ograničenja u primeni mikrokozmi. Značaj mikrokozmi u prirodi ogleda se u tome što se eksperimentalne postavke iz strogo kontrolisanih uslova mogu primeniti i istraživati u prirodnoj sredini. Njihova prednost ogleda se u brzini izvođenja eksperimenata u odnosu na mezokozme, sa dužinom trajanja od 2 do 6 meseci. Ekonomičnije su zbog veličine, a ujedno i lakše za korišćenje. Stoga, mogu imati veći broj jedinica i uključiti veći broj uslova i tretmana, što je u direktnoj vezi sa preciznijim statističkim podacima. Sa druge strane, zbog njihove veličine, antropogeni pritisak je izraženiji u kontekstu lakšeg narušavanja sistema. Osetljivije su na prirodne katastrofe u odnosu na veće sisteme i veća je varijacija u rekolonizaciji mikrokozmi, ali zbog ograničenog prostora, ograničen je potencijal populacije.

1.2.1.2.2. Mezokozme

Mezokozme su ograničene i delimično zatvorene spoljne eksperimentalne jedinice koje blisko simuliraju prirodno okruženje, naročito vodenu životnu sredinu (Odum, 1984). Ovaj pristup pogodan je za izučavanje interakcije vrsta i struktura zajednice umesto pojedinačnih vrsta, bilo da se primenjuju u kratkoročnim ili dugoročnim eksperimentima. Mezokozme su postrojenja zapremine od 1 do 1000 m³, tipične dubine od 1 do 2 m, a najčešća upotreba je u većim jezerima i priobalju mora i okeana. Mogu biti predstavljene pojedinačnim postrojenjima (burad, cilindri, kade) u nekom većem ekosistemu ili to mogu biti zemljani (Giddings i sar., 1985; 1993; Weber i sar., 1992; Johnson i sar., 1993) ili betonski (Crossland, 1982; Crossland i Bennett, 1989) bazeni posebno dizajnirani za namene istraživanja. Novonastalim eksperimentalnim postrojenjima potrebno je 6-12 meseci kako bi se kolonizacijom ili rekolonizacijom uspostavila populacija, pre izlaganja toksikantu (Graney i sar., 1994).

Prednost korišćenja mezokozmi ogleda se u mogućnosti sprovođenja eksperimenata u prirodnim uslovima uz kontrolu određenih promenljivih koje je lako pratiti. Omogućava i dugoročno praćenje dinamike populacije među trofičkim nivoima. Mogu se pratiti prisustvo i distribucija hemijskih jedinjenja. Laboratorijski eksperimenti mogu previše pojednostaviti stvarnu situaciju na terenu, jer su izloženost toksičnim supstancama, uslovi životne sredine i ekološka interakcija veoma različiti. Sprovođenje eksperimenata u mezokozmama omogućava proučavanje efekata zagađivača na organizme i zajednice u simuliranim, ali identičnim i kontrolisanim, polu-prirodnim uslovima. Ne samo da se direktni toksikološki efekti mogu posmatrati i kvantifikovati, već postaju očigledne i indirektne ekološke implikacije. Ove studije mogu na kraju omogućiti da se podaci o toksičnosti dobijeni iz laboratorije ekstrapoliraju na prirodne zajednice i ekosisteme.

Nedostaci primene mezokozmi ogledaju se u finansijskim i praktičnim ograničenjima u pogledu njihove veličine i broja organizama, takođe, zbog „efekta zida“ koji je rezultat upotrebe kontejnera, viši trofički nivoi ne mogu se pratiti (Petersen i sar., 2009).

1.2.1.2.3. Makrokozme

Makrokozme se, uglavnom, koriste za marinska istraživanja. Zapremina makrokozmi nepraktična je za većinu slatkovodnih ekosistema, ali je zato vrlo pogodna za velika morska prostranstva, gde se na velikoj zapremini mogu pratiti različiti uticaji, ali i odnosi organizama u prisustvu toksikanata ili odsustvu nekog od test parametara.

1.2.1.3. *In-situ* pristup

Vodena sredina predstavlja krajnju destinaciju za većinu antropogenih zagađivača koji se oslobađaju iz industrije, poljoprivrede, urbanih sredina, transporta, turizma i svakodnevnog života (Amiard-Triquet i sar., 2015). Među akvatičnim organizmima, makrobescičmenjaci predstavljaju najdiverzitetniju grupu organizama. Veličine njihovog tela veća je od 0,5 mm pa su stoga i vidljivi golim okom (Simić i Simić, 2009). Organizmi koji bar jedan deo životnog ciklusa provode na dnu vodenih staništa nazivaju se bentosni makrobescičmenjaci i prepoznati su kao pouzdani indikatori ekološkog stanja vodenih tela (Paunović i sar., 2007a; Raković i sar., 2013; Tubić i sar., 2017; Popović i sar., 2020). Dobri su indikatori zato što provode ceo ili veći deo životnog ciklusa u vodi i razlikuju se po svojoj tolerantnosti na stepen zagađenja u vodi i sedimentu (Coffman i Ferrington, 1996; Wilson, 1992; Calle-Martínez i Casas, 2009). Zajednica makrobescičmenjaka reflektuje stanje lokalnih uslova zato što je sačinjavaju grupe sedentarnih i semisedentarnih organizama koji mogu prelaziti samo kratke prostorne distance. Promene u strukturi i kompoziciji zajednice bentosnih makrobescičmenjaka mogu reflektovati promene u kvalitetu životne sredine, tj. staništa (Rosenberg i Resh, 1993). Stresori u životnoj sredini utiču na strukturu zajednice kroz gubitak osetljivih taksona, dok oportunisti (tolerantne vrste) postaju dominantni (Gray, 1989). Njihova različita osetljivost na sredinske pritiske čini ih dobrim pokazateljima stanja akvatičnih ekosistema u kojima žive (Mandeville, 2002; Popović i sar., 2020). Promena u specijskom diverzitetu akvatičnih ekosistema omogućava korisne informacije u kontesktu statusa kvaliteta vode i tipologije vodnih tela površinskih voda (Paunović i sar., 2007a; Paunović i sar., 2012; Tubić i sar., 2013; Atanacković et al., 2020; Popović i sar., 2020; Raković i sar., 2021).

Bentosnu zajednicu makrobeskičmenjaka slatkovodnih ekosistema čine: sunđerari (Spongilidae: Polifera), dupljari (Cnidaria), pljosnati crvi (Platyhelminthes), mekušci (Mollusca), člankoviti crvi (Annelidae: Oligochaeta, Hirudinea, Polychaeta), rakovi (Crustacea), paukolike životinje (Arachnidae) i insekti (Insecta) (Tomović i sar., 2012; Martinović-Vitanović i sar., 2013; Tubić i sar., 2013; Zorić i sar., 2014; Andjus i sar., 2018; Atanacković i sar., 2020; Marinković i sar., 2020). Do danas je opisano oko milion vrsta insekata, a procenjuje se da ima 6-10 puta više (FAO, 2013). Pored insekata, kao abundantne grupe u slatkovodnim ekosistemima navode se zajednice Oligochaeta, Crustacea (Amphipoda) i Mollusca (Bivalvia i Gastropoda) (Paunović i sar., 2007b; 2012; Tubić i sar., 2013; Atanacković i sar., 2020; Popović i sar., 2020; Raković i sar., 2021; 2022).

In-situ monitoring značajan je pristup u izučavanju stanja prirodnih ekosistema. Kako bi se procenilo stanje ekosistema, može se vršiti aktivni i pasivni *in-situ* monitoring. Aktivni monitoring podrazumeva proučavanje efekata sredinskog stresa kod organizama *in-situ*, koji su na određeni vremenski period izloženi istom. Pasivnim monitoringom na određenoj prostornoj ili vremenskoj skali mogu se dobiti vredne informacije o prisustvu nekog stresora u prirodnom staništu. Monitoring, pre svega, predstavlja sistematsko merenje varijabli i procesa tokom određenog vremena u odnosu na specifični problem (Spellerberg, 1991). Može se odnositi na posmatranje i merenje bioloških, hemijskih i fizičkih parametara sa ciljem prikupljanja dovoljno podataka radi procene kvaliteta životne sredine (Rand, 1995).

1.2.2. Biomarkeri

Biomarkeri predstavljaju merljive biološke parametre koji ukazuju na strukturne ili funkcionalne promene usled uticaja hemijskih agenasa iz spoljašnje sredine (Rand, 1995). Promene koje se mogu detektovati mogu biti genetičke, enzimske, fiziološke ili morfološke. Procena i minimalizacija rizika na životnu sredinu može se postići standardizovanim, visoko osetljivim, reakcijski specifičnim i široko primenljivim skupom biomarkera (Hansen, 2003). Kao mera predostrožnosti zaštite akvatičnih organizama, biomarkeri pružaju značajne informacije o stanju sistema. Principi povezani sa različitim skalama biohemijskih odgovora zavise od kinetike bioloških sistema. Reakcija biomarkera u biološkim sistemima može biti detektovana od

molekularnog do ekosistemskog nivoa u zavisnosti od vremena izloženosti agensu. Suštinski, biomarkeri predstavljaju odgovor određenog nivoa organizacije živog sistema na stresor izazvan prisustvom strane materije, tj. toksikanta. Na molekularnom nivou može izazivati mutacije DNK molekula. Ćelijski odgovor ogleda se u neoplastičnoj transformaciji, poremećaju proliferacije i diferencijacije ćelija, dok na nivou organa izaziva malformacije, poremećaje u funkcionisanju i tumore. Viši nivoi organizacije (organizmi, populacije, zajednice i ekosistemi) reaguju na stres smanjenjem vijabilnosti, fertiliteta, veličine populacije ili izumiranjem, što dovodi do smanjenja diverziteta vrsta (Hansen, 2003). Odgovor individua na prisustvo stresa ogleda se preko subletalnih (promene u ponašanju, rastu, razvoju, reprodukciji, unosu toksina i detoksikaciji, strukturi i aktivnosti tkiva, promena u fenotipu organizama) i letalnih efekta (stope mortaliteta ili preživljavanja) koji mogu biti kratkoročni i dugoročni. Populacioni parametri koji se mogu pratiti kao odgovor na stres uključuju promene u genotipu ili fenotipu vrsta, kao i promene u broju, relativnoj abundanci i fiziološkom stanju vrsta u datoj populaciji koja je pod stresom.

U pogledu toksikoloških testova, koncentracija test agensa, dužina trajanja izloženosti, kao i starost (stadijum razvika) model organizma utiču na reakciju biomarkera (Rand, 1995; Kolarević i sar., 2015; Kračun-Kolarević i sar., 2015; Jovanović-Maić, 2020). Ispoljavanje biomarkera se prvo manifestuje subletalno, što ukazuje na uticaj test supstance i promene izazvane istom, a potom može dovesti do letalnog ishoda, usled dužeg izlaganja ili pri većim koncentracijama toksikanta.

1.2.3. Model organizmi

Veliki deo znanja o nasleđivanju, razvoju, fiziologiji i osnovnim ćelijskim i molekularnim procesima potiče iz studija referentnih ili model organizama, iako predstavljaju samo mali deo biodiverziteta Zemlje. Kako bi se sproveo ekotoksikološki značajan test, neophodno je odabrati adekvatni organizam kao model. S tim u vezi, nekoliko kriterijuma treba ispoštovati prilikom odabira model organizma za testove toksičnosti:

- ako postoji mogućnost, treba koristiti grupu vrsta koje predstavljaju širok spektar osetljivosti, iz razloga što senzitivnost među vrstama dosta varira;

- koristiti vrste koje poseduju široki areal rasprostranjenosti i veliku abundantnost;

- testirati autohtone (ako postoji mogućnost) ili reprezentativne vrste ekosistema koji može biti pod uticajem toksikanta;
- vrste koje se koriste u rekreativne, komercijalne svrhe ili koje su bitne sa ekološkog aspekta;
- vrste koje su podložne rutinskom rukovanju, i tehnike koje omogućavaju uzgoj kultura u laboratoriji kako bi se olakšalo sprovođenje akutnih i horničnih testova toksičnosti;
- dostupnost informacija o fiziologiji, genetici i ponašanju vrste olakšava interpretaciju podataka.

Potencijalni model organizmi mogu biti poreklom sa prirodnog staništa, predstavljajući divlju populaciju date vrste, kupljenji od komercijalnog dobavljača ili uzgajani u laboratoriji. U slučaju nedostatka konkretne vrste, može se odabrati druga vrsta istog roda (Rand, 1995). Za sprovođenja testova toksičnosti, sve jedinke moraju biti istog porekla.

1.2.3.1. *Chironomus riparius* (Meigen, 1804)

Među najdominantnijim organizmima u zajednici makrobeskičmenjaka nalaze se hironomide (Diptera: Chironomidae). Predstavljaju široko rasprostranjenu grupu organizama sa najvećim diverzitetom i neretko najvećom abundantnošću u zajednici makrozobentosa (Marziali i sar., 2010; Čerba i sar., 2010; Popović i sar., 2013; Milošević i sar., 2018). Često se veliki broj vrsta hironomida može naći u malom vodenom telu (Pinder, 1986). Predstavljaju grupu biljnih komaraca (eng. “*non-biting midges*”), čiji je veći deo životnog ciklusa vezan za vodu. Vodeno stanište može biti veoma raznoliko, obzirom da naseljavaju najrazličitije tipove staništa sa širokim spektrom abiotičkih faktora. Hironomide uglavnom čine preko 50% insekata u zajednici makrozoobentosa, pa su zato veoma bitan deo trofičke mreže ishrane i ciklusa kruženja nutrijenata (Coffman i Ferrington, 1996; Milošević i sar., 2018; Popović i sar., 2013; Čerba i sar., 2010). Kod različitih vrsta, različiti stadijumi u razviću mogu biti osetljivi ili tolerattni na određene zagađivače. Stoga, hironomide su pouzdani indikatori organskog zagađenja vodenih ekosistema, jer je poznata njihova tolerantnost na različite zagađivače i njihovo prisustvo/odsustvo ukazuje na

stanje akvatičnog ekosistema (Wilson, 1992; Calle-Martínez i Casas, 2009). Velika abundantnost i sveopšte prisustvo čini ih potencijalnim plenom za široki spektar organizama, od beskičmenjaka, preko riba i vodozemaca, do ptica i sisara (Armitage i sar., 1995). Ujedno, u laboratorijskim uslovima imaju relativno kratak životni ciklus sa jasno uočljivim stadijumima razvića, što omogućava lakše sprovođenje i praćenje eksperimenta (Lopes i sar., 2005). *Chironomus riparius* je vrsta koja se koristi u testovima toksičnosti, a uvršćena je u standardne protokole od strane Organizacije za ekonomsku koopeaciju i razvoj (OECD, 2004c,d).

1.2.3.1.1. Morfologija hironomida

Svaki stadijum u razviću hironomida poseduje morfološke specifičnosti koje predstavljaju taksonomske karaktere na osnovu kojih se može vršiti identifikacija jedinki do nivoa vrste, uz pomoć identifikacionih ključeva, a od strane usko specijalizovanih i obučanih sktručnjaka za ovu grupu Diptera. Iako je moguće i na stadijumima jaja i pupe identifikovati vrstu, u ovom odeljku biće reči samo o stadijumima larve i adulta, na kojima smo u ovom doktoratu radili.

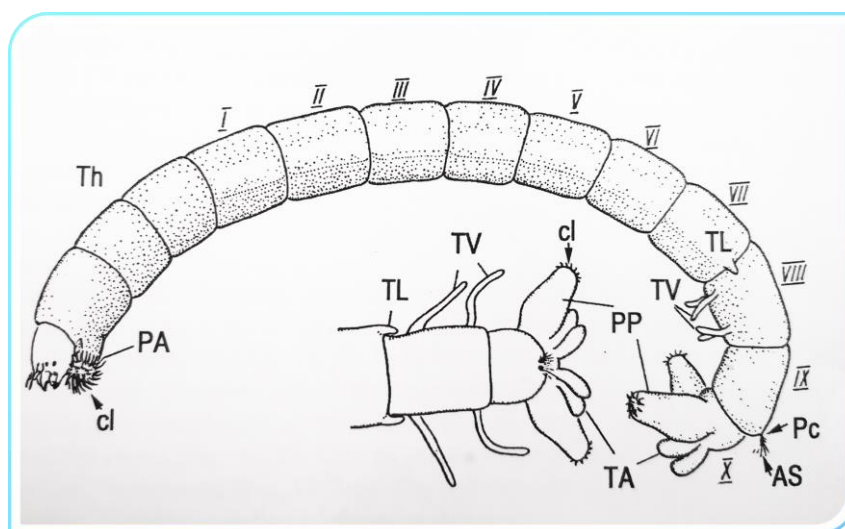
1.2.3.1.1.1. Larve

Larve hironomida mogu se razlikovati od drugih nematoceroznih larvi samo po kombinovanim karakteristikama (Armitage i sar., 1995):

- spirakulumi su uglavnom odsutni (apneustični), iako se metapneustično stanje (samo sa zadnjim spirakulama) javlja kod nekih predstavnika Podonominae;
- noge, koje se javljaju na prvom torakalnom i terminalnom trbušnom segmentu, su uparene, iako se javlja varijabilna fuzija i/ili redukcija, posebno kod kopnenih vrsta;
- završni trbušni segment nosi uparene procerke, od kojih svaki na vrhu ima čuperak seta.

Iako se većina morfoloških i taksonomskih zapažanja vrši na posljednjem stupnju, čini se da je većina struktura prisutna u ranijim fazama (Olafsson, 1992). Međutim, mnoge karakteristike larve IV stupnja, posebno odnosi i oblici, ne važe za ranije stupnjeve razvića (Mozley, 1979).

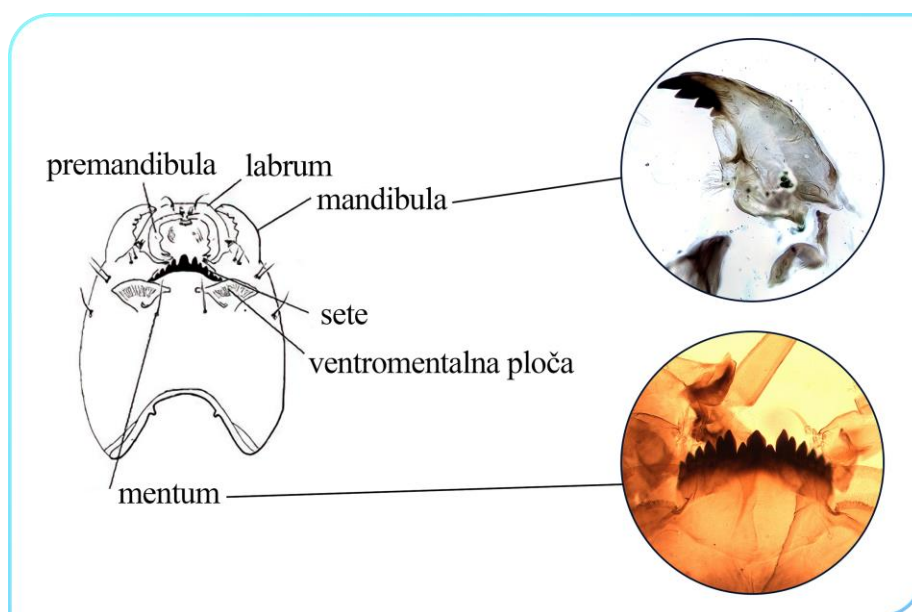
Građa larvi sastoji se iz jasno izdvojene glave, toraksa (od 3 segmenta) i abdomena (od 10 segmenata) (Slika 10). Glava hironomida je potpuno sklerotizovana (izgrađena od hitina), u vidu specifične, neretraktilne, glavene čaure (gule) koja se sastoji od dorzalnog apotoma i para bočnih gena ili obraza. Ova tri sklerita su odvojena ekdizijalnim linijama slabosti, duž kojih se integument može podeliti tokom mitarenja.



Slika 10. Građa larvi hironomida. Rimskim brojevima od I-X naznačeni su abdominalni segmenti; cl- kandže; PA – torakalne parapodije (lažne nožice); Th- toraks; TL- lateralne tubule; TV- ventralne tubule; Pc- procerci; AS- analne sete; PP- abdominalne parapodije; TA- analne tubule. Modifikovano prema Kiknadze i sar. (1991).

Strukture na guli koje predstavljaju osnovne morfološke karakteristike jesu: mentum, ventromentalne ploče, mandibule, premandibule i antene (Vallenduuk, 2017; Slika 11). Od navedenih taksonomskih karakteristika, u ovom doktoratu, vršena je analiza delova usnog aparata, mentuma i mandibula. Mentum predstavlja nazubljenu ploču, koja se nalazi na ventralnoj strani glave, iza submentuma. Iako izgleda kao jedna ploča, mentum čine dve ventromentalne ploče

(zidovi) - srednji ventralni zid (ventromentum) i dorzalni zid (dorsomentum). Mandibule su uparene, zglobne čeljusti, koje deluju u kosoj ravni između labruma i maksile. Predstavljaju nazubljene strukture na kojima se mogu uočiti: spoljni dorzalni zub, dominantni apikalni zub i dva ili tri unutrašnja zuba. Mogu se identifikovati tri grupe seta koje imaju ulogu u usmeravanju hrane u usta: češljasti pecten mandibularis na mezoj subapikalnoj površini; seta subdentalis na molu unutrašnje u odnosu na unutrašnje zube; razgranati internalni set, obično na unutrašnjoj površini mandibule (Armitage i sar., 1995).

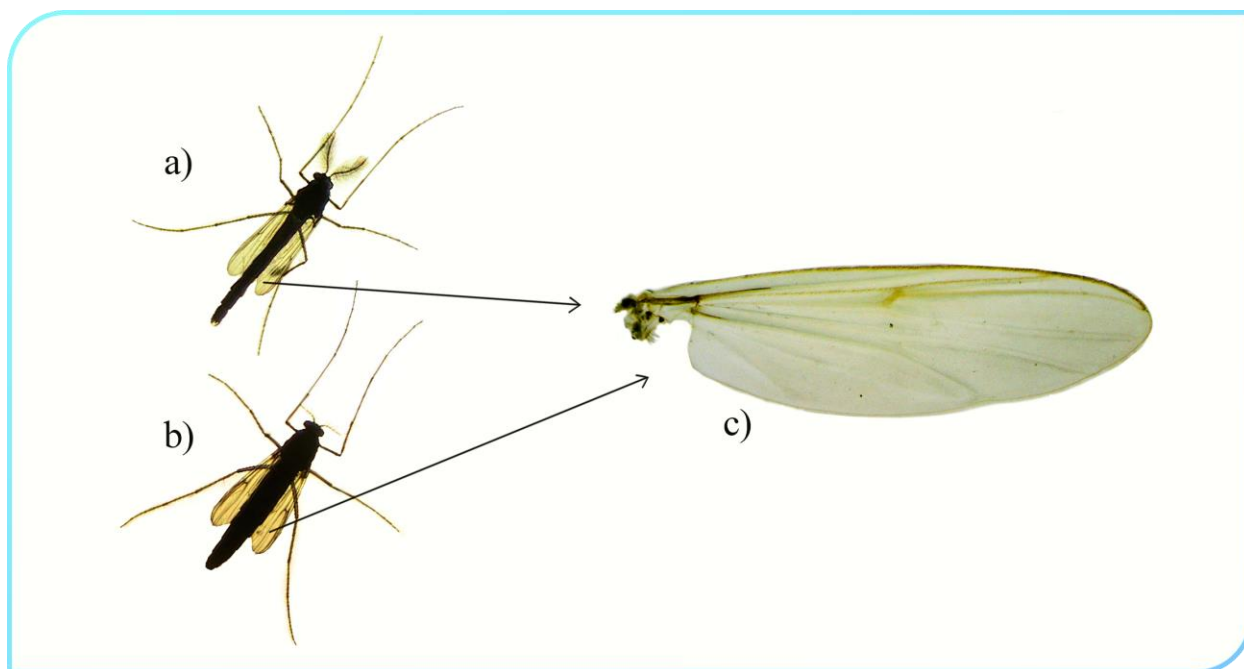


Slika 11. Glavna čaura larve hironomida sa osnovnim strukturama i izdvojenim prikazom mentuma i mandibule vrste *C. riparius*. (URL: <https://aipa.myspecies.info/es/file/40>).

Sa druge strane, od struktura koje su korisne pri identifikaciji hironomida jesu parapodije (lažne nožice) na prvom torakalnom i poslednjem abdominalnom segmentu. Abdomen, pored parapodija, na VIII segmentu poseduje ventralni par tubula, dok su su kod roda *Chironomus* prisutne i lateralne tubule.

1.2.3.1.1.2. Adulti

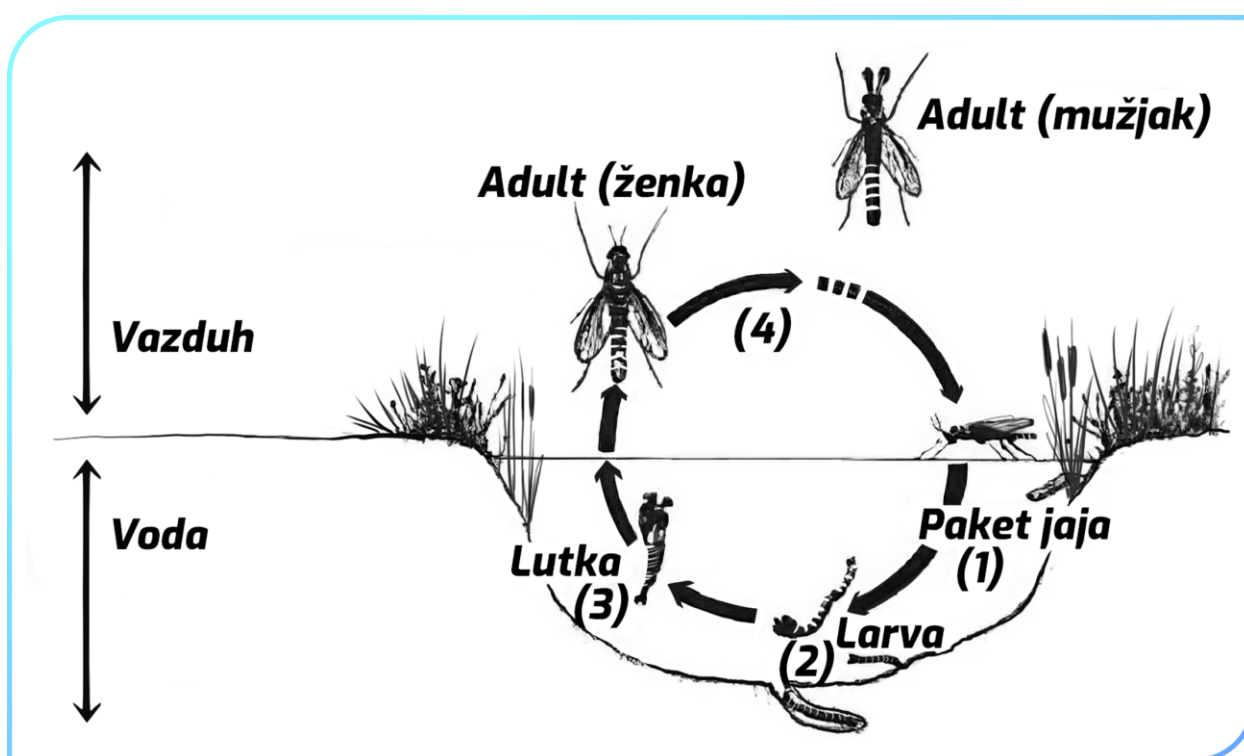
Adulti hironomida u fizičkom pogledu podsećaju na komarce iz familije Culicidae (Diptera), ali se od njih razlikuju u građi usnog aparata i odsustvu kilnih ljušpi. U adultnom stadijumu hironomida postoje jasne razlike u morfologiji ženki i mužjaka usled polnog dimorfizma. Mužjaci hironomida poseduju čekinjaste antene i tanak i izdužen abdomen, na čijem kraju se nalazi karakterističan par „kopči“ koje imaju ulogu u parenju (Armitage i sar., 2012). Ženke, sa druge strane, imaju kratke antene u vidu niti i skraćen i zdepast abdomen. Krila predstavljaju parnu strukturu koja je karakteristična za svaku vrstu, a u okviru iste vrste se na osnovu oblika može utvrditi pol (Slika 12).



Slika 12. Prikaz adulta (a) mužjaka i (b) ženke, sa zasebno izdvojenom strukturom krila (c).

1.2.3.1.1. Životni ciklus familije Chironomidae

U optimalnim uslovima u umerenom klimatu, životni ciklus traje od tri do četiri nedelje (Mackey, 1977). Pripadnicima familije Chironomidae je zajedničko holometabolno razviće, sa 4 stadijuma (jaje, larva, lutka/pupa i adult) (Slika 13). Stadijum larve karakterišu 4 stupnja. Dužina trajanja svakog stadijuma varira u zavisnosti od vrste, međutim stadijum lutke i stadijum adulta su kod svih vrsta kraći u odnosu na preostala dva stadijuma (Pinder, 1986).



Slika 13. Životni ciklus familije Chironomidae. Modifikovano prema Lopes i sar., 2005. (<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.05.004>).

Ženke polažu jaja u želatinoznu matriks, koji se pričvršćuje za stabilan supstrat u prirodi pri površini vode, najčešće za granje, kamenje i listove biljaka (Nolte, 1993), dok u laboratorijskim uslovima, ženke želatinoznu masu sa jajima lepe za zidove akvarijuma, takođe u površinskom delu vode. Želatinozna masa se pasivno može kretati u lotičkim sistemima, sve dok ne absorbuje vodu,

čime postaje teža i tone na dno gde se nastavlja razviće (Vallenduuk i Pillot, 2007). Temperatura diktira dužinu trajanja ovog stadijuma, sa prosekom od 2,5 do 6 dana, dok u nepovoljnim temperaturnim uslovima dolazi do dijapauze, tj. stadijuma mirovanja (Vallenduuk i Pillot, 2007). Dužina trajanja ovog stadijuma ustanovljena je na osnovu laboratorijskih eksperimenata, s obzirom da se u prirodnim uslovima ne može precizno pratiti (Oliver, 1971).

Iz jaja se izležu larve prvog stupnja, koji može trajati od 2 do 8 dana u optimalnim uslovima, a u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine i do 14 dana. Larvalni stupnjevi se međusobno razlikuju po dužini i/ili širini glavene kapsule (Berg, 1950; Czczuga i sar., 1968), a stopa rasta direktno zavisi kako od faktora sredine, fotoperiodizma, temperature, kao i dostupnosti resursa hrane (Vallenduuk i Moller Pillot, 2007). Larve su fototrofične, tj. fotopozitivne (Lelhik, 1968) i u svom prvom stupnju su planktonske, sve dok ne nađu odgovarajuće stanište za dalji razvoj (Hilsenhoff, 1966). Stadijum larve se odvija u površinskim slojevima sedimenta, uglavom do dubine od 10 cm (Cole, 1953; Ford, 1962), ređe i do 40 cm dubine.

Međustadijum koji nastupa zadebljavanjem torakalnog i abdoiminalnog dela tela larvi, naziva se prepupa ili prelutka. U ovom međustadijumu je moguće uočiti kako se jedinke postepeno ulutkavaju, tako da je telo ulutkano, dok je glava larve i dalje van. Ovaj međustadijum je izuzetno kratak i nakon njega nastupa stadijum lutke (Vallenduuk i Moller Pillot, 2007) koji traje od par sati do par dana (Brock, 1960; Darby, 1962), a dužina ovog procesa je negativno korelisana sa temperaturom sedimenta (Hilsenhoff, 1966). U stadijumu lutke, jedinke poseduju dorzoventralno spljošten cefalotoraks koji je uvećan (Armitage i sar., 1995). Pored morfoloških promena tokom metamorfoze, u ovom stadijumu dolazi do promene i u preferenciji staništa. Pre izleganja, pupa pliva do površine vode, što je omogućeno akumuliranom vazduhu u prostoru između ulutkanog dela i toraksa jedinke. Sam proces izletanja je vrlo kratak i traje od 10 sekundi do par minuta i adulti su odmah sposobni da lete (Mundie, 1956). Vreme izletanja definisano je na osnovu dužine stadijuma larve i abiotičkih parametara (Oliver, 1971). Postoji pik izletanja koji je najintenzivniji (Darby, 1962; Hamilton, 1965; Sandberg, 1969) i zavisi prvenstveno od temperature, svetlosti ili od kombinacije oba parametra (Palmén, 1955; Kureck, 1979; Wartinbee, 1979) u umerenom klimatu, dok se na Arktiku pik izletanja vremenski poklapa sa porastom temperature vode (Danks i Oliver, 1972).

Hironomide kao adulti svoj život provode van vode. Uglavnom se ne hrane, već svoju energiju usmeravaju na reprodukciju, tj. ostavljanju potomstva. Parenje se najčešće odvija u rojevima, koji su sastavljeni uglavnom od mužjaka i imaju ulogu u privlačenju ženki (Coffman i Ferrington Jr., 1996; Foote, 1987; McCafferty, 1983).

1.2.3.2. *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)

Mekušci (Mollusca: Bivalvia i Gastropoda) predstavljaju važnu komponentu makrozoobentosa, kao drugi po broju vrsta, nakon predstavnika filuma Oligochaeta i Arthropoda (Bouchet, 1991; Atanacković i sar., 2013; Raković, 2015). Zbog njihove osetljivosti na promene u životnoj sredini, koja se odražava promenom u strukturi i sastavu zajednice, mogu se koristiti kao tipološki indikatori vodenog tela (Paunović i sar., 2007a; Burdett i sar., 2015, Raković i sar., 2021). Relativno dug životni ciklus i slaba pokretljivost ih čini pogodnim za procenu i praćenje stanja i stepena degradacije vodenih staništa na dugoročnom planu. Školjke, kao predstavnici klase Bivalvia, široko su rasprostranjene u slatkovodnim ekosistemima (Csányi, 2002; Paunović i sar., 2007b, 2008; Graf i sar., 2008, Raković i sar., 2013; Tomović i sar., 2014; Raković, 2015; Raković i sar. 2016; Zorić i sar. 2020) i predstavljaju jednu od najinvazivnijih faunističkih grupa akvatičnih ekosistema.

Azijska školjka, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), ima širok areal rasprostranjenja u različitim slatkovodnim staništima, uključujući čitav plovni deo Dunava (Paunović i sar., 2015) i često se koristi kao bioindikator zagađenja vode (Baudrimont i sar., 1999; Andres i sar., 1999). Značajne su sa stanovišta samoprečišćavanja i održavanja funkcionalnosti akvatičnog ekosistema (Ostrovsky i sar., 1993; Ogilvie i Mitchell, 1995; Vanderploeg i sar., 1995; Welker i Walz, 1998; Soto i Mena, 1999) zahvaljujući filtraciji jer mogu filtrirati čestice u rasponu od 5 do 30,000 μm^2 (Wallace i sar. 1977). Kao intenzivni filtratori bentosnog načina života, školjke akumuliraju znatne količine mikroplastike iz okoline, a poslednjih godina se često koriste u studijama ispitivanja mikroplastike (Li i sar., 2018). *Corbicula fluminea* je jedna od najprodornijih invazivnih vrsta u slatkovodnim ekosistema i smatra jednom od 100 najinvazivnijih u Evropi (DAISIE, 2009). Invazivni uspeh azijske školjke više se ogleda u njenim karakteristikama (npr. brzi rast, ranija polna zrelost, veliki fekunditet, ekstenzivni kapacitet disperzije), kao i u povezanosti sa ljudskim

aktivnostima, nego u fiziološkoj toleranciji (McMahon, 2002). Čak u poređenju sa drugim predstavnicima školjki, *C. fluminea* je osetljivija na fluktuacije poput povišene temperature, hipoksije, emerzije, niske pH vrednosti i niske koncentracije kalcijuma (Byrne i McMahon, 1994; McMahon, 2000; Johnson i McMahon, 1998; McMahon i Bogan, 2001; Sousa i sar., 2007; 2008b).

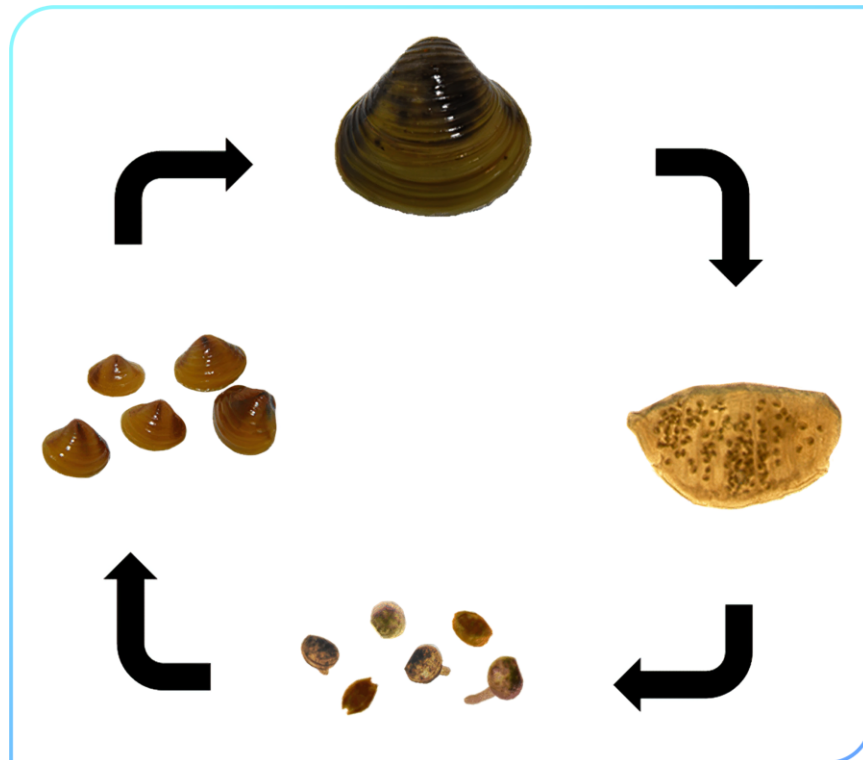
Zbog široke prostorne distribucije, prisustva u različitim sredinama, velike invazivnosti (Phelps, 1994; Sousa i sar., 2008b), lakog održavanja populacije u laboratorijskim uslovima, intenzivnog kapaciteta filtracije koji omogućava usvajanje velikih količina zagađujućih materija, veličine odraslih jedinki i jednostavnog manipulisanja jedinkama, *C. fluminea* predstavlja pogodnu vrstu za ekotoksikološke studije. Nekoliko terenskih studija je pokazalo da je azijska školjka dobar bioindikator teških metala i drugih zagađivača (Doherty, 1990; Inza i sar., 1997; Cataldo i sar., 2001b), međutim, zbog otpornosti alohtonih vrsta na hemijsko zagađenje akvatičnih staništa, uticaji stranih agenasa treba ispitivati na vrstama iz native populacije zbog njihove veće senzitivnosti na iste (Kolarević i sar., 2015).

1.2.3.2.1. Životni ciklus azijske školjke

Proces fertilizacije hermafroditne vrste *C. fluminea* (Sousa i sar., 2008a) se odvija u palealnoj šupljini. Larve prolaze kroz stadijum trohofora. Kada dostignu određeni nivo zrelosti ispuštaju se u spoljašnju sredinu i tada prelaze u sledeći stadijum - veliger larve (Sousa, 2008a), a nakon toga u stadijum pediveliger larve, oslobađaju se u obliku slova D sa ravnim šarkama (Slika 14) (Mackie i Claudi, 2010). U larvalnom stadijumu su veoma malih dimenzija (250 μm) i veoma lako zauzimaju vodotokove i čine značaj udeo u zajednici zooplanktona. Tada su potpuno formirane jedinke (McMahon, 2002). Nakon oslobađanja, jedinke se pričvršćuju za čvrstu podlogu, ne duže od 4 dana (Mackie i Claudi, 2010), ali se mogu i resuspendovati turbulentnim tokovima i raspršiti na velike udaljenosti, uglavnom u smeru nizvodno (McMahon, 1999).

Žive od 1 do 5 godina i u tom periodu mogu produkovati larve 1 do 3 puta godišnje u zavisnosti od biotičkih i abiotičkih faktora sredine (Mc Mahon, 2000; Sousa, 2008b). Period sazrevanja se javlja u prvih tri do šest meseci kada dužina ljuske dostigne 6 do 10 mm (McMahon, 1999).

Azijska školjka ima veoma veliki fekunditet od 25,000 do 75,000 larvi po jedinci površine i zbog ove životne adaptacije prilikom ulaska u novo stanište vrlo brzo dobijaju status dominantne vrste. Iako je stopa preživljavanja juvenilnih jedinki niska, a stopa smrtnosti adulta visoka, jedinke imaju sposobnost brzog rasta, zbog visoke stope filtracije i asimilacije, ali i zbog energije usmerene na rast i reprodukciju, što je karakteristično za oportunističke vrste (Mc Mahon, 2002).



Slika 14. Prikaz životnog ciklusa azijske školjke, modifikovano prema Sousa i sar., 2008a.

(<https://doi.org/10.1051/limn:2008017>).

1.3. Dosadašnja istraživanja mikroplastike u slatkovodnim ekosistemima

Mikroplastika predstavlja stresor u akvatičnoj sredini i pri većim koncentracijama može biti novi limitirajući faktor za rast i razvoj jedinki. Obim izlaganja mikroplastici i unos, pored sve većeg prisustva zbog konstantne akumulacije tokom vremena, jako je izražen u bentosnoj fauni zbog njihove nemogućnosti da razlikuju čestice hrane od čestica plastike (Bellasi i sar., 2020).

Sa prvim detektovanjem čestica mikroplastike ranih 1970-ih u Sargasovom moru (Carpenter i Smith, 1972), počela je ekspanzija *in-situ* istraživanja morskih ekosistema (Fowler, 1987; Carpenter i sar., 1972; Coe i Rogers, 1996; Colton i sar., 1974).

Kasnije je usledio niz *in-situ* (Bugoni i Krause, 2001; Bugoni i sar., 2001; Tomas i Guitart, 2002; Mascarenhas i sar., 2004; Rios i sar., 2007; von Moos i sar., 2012; Browne i sar., 2008; Cole i sar., 2015; Mazurais i sar., 2015; Sun i sar., 2020; Hurley i sar., 2021; Tang i sar., 2021) i *ex-situ* istraživanja na morskim organizmima (Moore i sar., 2001; Boerger i sar., 2010; Tourinho i sar., 2010; Cole i sar., 2013, 2014; Van Cauwenberghe i Janssen, 2014; Watts i sar., 2014; Lusher i sar., 2013, 2016; Van Cauwenberghe i sar., 2015; Sussarellu i sar., 2016; Vendel i sar., 2017). U poređenju sa marinskim ekosistemima, broj studija o potencijalnim negativnim efektima na akvatičnu biotu uzrokovanu izlaganjem mikroplastici je oskudan za slatkovodne ekosisteme (Wagner i Lambert, 2018). Procenjuje se da je 77 % ekotoksikoloških studija mikroplastike sprovedeno na morskim, a 23 % na slatkovodnim organizmima (Katare i sar., 2022). Dostupne studije dokumentovale su različite efekte čestica mikroplastike na žive organizme, izražene kao mehaničke povrede (Cole i sar., 2011; Jovanović, 2017), smanjena stopa filtracije (Pedersen i sar., 2020), prenos čestica mikroplastike sa larve na adulta (Nelms i sar., 2018; Setyorini i sar., 2020), smanjeno izletanje i preživljavanje (Ziajahromi i sar., 2018), redukovani rast (Besseling i sar., 2014; Au i sar., 2015; Ziajahromi i sar., 2018; Redondo-Hasselerharm i sar., 2018), uticaj na reprodukciju (Besseling i sar., 2014), kao i deformiteti usnog aparata i odloženo vreme razvića *C. riparius* (Silva i sar., 2019; Stanković i sar., 2020).

Nekoliko studija sprovedeno je u mikrokozmmama ili mezokozmmama (Fueser i sar., 2020; Redondo-Hasselerharm i sar., 2020; Huang i sar., 2021). Za sada, jedino Redondo-Hasselerharm i sar., (2020) su istraživali efekte čestica mikroplastike na bentosnoj zajednici makrobescičmenjaka u spoljašnjim uslovima u eksperimentalnoj terenskoj stanici.

Prisustvo čestica mikroplastike dokumentovano je širom sveta u urbanim rekama u Velikom Parizu (Dris i sar., 2015), austrijskom delu Dunava (Lechner i sar., 2014), Temzi (Morritt i sar., 2014), Laurentijskim Velikim jezerima (Eriksen i sar., 2013), jezerima Ontario i Hjuron u Kanadi (Corcoran i sar., 2015; Zbyszewski i Corcoran, 2011), jezerima Patagonije u Južnoj Americi (Alfonso i sar., 2020), jezeru Viktorija u Istočnoj Africi (Biginagwa i sar., 2016) u subalpinskom jezeru Garda u Italiji (Imhof i sar., 2013), na području Rajna-Majna u Nemačkoj (Klein i sar., 2015), srednjeg i donjeg toka Jangce basena (Su i sar., 2018) i dr. U jezeru Taihu u Kini dokumentovano je 0,2–12,5 mikroplastičnih čestica/g mokre mase u tkivu *C. fluminea* (Su i sar., 2016).

Pored toga što remeti osnovne životne procese, mikroplastika predstavlja odličan vektor za transport i bioakumulaciju toksičnih materija u organizmu (Barnes i sar., 2009, Zettler i sar., 2013). Pesticidi, teški metali, ftalati i policiklični aromatični ugljovodonici imaju negativan uticaj na mužjake vrste *C. riparius*, jer dovode do odlaganja izletanja (Arambourou i sar., 2019), dok su polimeri poput PVC i PET, koji u sebi sadrže jedinjenje di(2-etilheksil) ftalat, dokazani kao uzrok defortimeteta usnog aparata hironomida (Park i Kwak, 2008; Keresztes i sar., 2013).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj ovog istraživanja je ispitivanje uticaja šest tipova mikroplastičnih polimera, koji se mogu naći u prirodi kao činioci antropogenog zagađenja, na različite nivoe biološke i ekološke organizacije bentosnih makrobeskičmenjaka u slatkovodnim ekosistemima.

Specifični ciljevi istraživanja postavljeni su u skladu sa opštim ciljem:

- ispitivanje uticaja najčešćih mikroplastičnih polimera (polietilen tereftalata - PET, polistirena - PS, polivinil hlorida - PVC, poliamida - PA, polietilena - PE i polipropilena - PP) na životne osobine i morfološke strukture larvi hironomida (mentumi i mandibule), kao i adulta (krila) model organizma *C. riparius* (Meigen, 1804) u *ex-situ* uslovima sredine.
- analiza stepena uticaja mešavine polimera (PE, PA i PVC) na strukturu bentosne zajednice makrobeskičmenjaka barskog ekosistema u mikrokozmana;
- utvrđivanje uticaja najčešćih polimera mikroplastike (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) na populaciju hironomida, korišćenjem vrste *C. riparius* (Meigen, 1804) kao model organizma u *in-situ* mezokozmana u jezerskom sistemu;
- određivanje prisustva čestica mikroplastike u slivu Dunava, korišćenjem odabranih vrsta iz zajednice bentosnih makrobeskičmenjaka (Gastropoda: *Lithoglyphus naticoides*; Bivalvia: *Corbicula fluminea*; Oligochaeta: *Limnodrilus hoffmeisteri* i Chironomidae: *Chironomus riparius*) i sprovođenje uporedne analize detektovanih čestica pasivnim monitoringom tokom 2013. i 2019. godine;
- ispitivanje hemijskog porekla izolovanih čestica iz tkiva odabranog model organizma *C. fluminea* (Muller, 1774) u slivu Dunava.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Pristup u istraživanju

Istraživanje predstavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvata različite pristupe u analizi najčešćih polimera mikroplastike koji se nalaze u prirodi u vidu otpada, a koji su dostupni bentosnim makrobeskičmenjacima. Istraživanje je koncipirano tako da obuhvata laboratorijske eksperimente, eksperimentalne postavke u prirodnim i veštačkim ekosistemima i pasivni monitoring Dunava. Na taj način, obezbeđen je širi okvir istraživanja polimera zarad dobijanja informacija o njihovom prisustvu, hemijskom poreklu i uticaju na slatkovodne makrobeskičmenjake.

3.2. Protokoli za ekstrakciju mikroplastike iz tkiva organizama

Imajući u vidu da još uvek ne postoje standardni protokoli rada sa mikroplastikom i izolaciju iste, u ovim istraživanjima korišćeno je nekoliko metoda, adaptiranih za sprovođenje eksperimenata. Veliki broj protokola, razvijenih za ekstrakciju mikroplastike iz tkiva organizama, se konstantno testira na različitim morskim i slatkovodnim vrstama i, za sada, postoji okvirna podela na 4 tipa protokola, koji se od vrste do vrste dodatno adaptiraju. U zavisnosti od agenasa koji se koriste za degradaciju tkiva, protokoli su podeljeni na: kiselinske (acidne), bazne (alkalne), oksidativne i enzimске. Cilj je odrediti protokol kojim se tkivo organizama može razgraditi bez uticaja na potencijalne mikroplastične polimere u njemu.

Postoji potreba da se standardizuju metodologije da bi se dobili uporedivi rezultati, kao i da bi se povećala pouzdanost merenja, odnosno eliminisali, ili umanjili, „šumovi“. Idealan standardni protokol treba da omogući kvantifikaciju svih čestica mikroplastike, bez obzira na veličinu, ili specifičnu gustinu čestica. Da bi se postigla standardizacija metoda, treba uporediti postojeće protokole u pogledu njihove pogodnosti za ekstrakciju mikroplastike. Pogodnost se može utvrditi procenom efikasnosti digestije tkiva, uticajem na degradaciju plastike i mogućnošću prikupljanja mikroplastike iz digestovanih uzoraka (Catarino i sar., 2017; Cole i sar., 2014; Courtene-Jones i sar., 2017; Karami i sar., 2017). Uz to, treba optimizovati protokol tako da troškovi budu prihvatljivi, da se za relativno kratak vremenski period sprovedu svi koraci

protokola i da postoji minimalna ili nikakava potencijalna opasnost od reagenasa koji se koriste tokom digestije (Thiele i sar., 2019).

3.2.1. Ekstrakcija čestica mikroplastike iz tkiva korišćenjem baznog agensa

Baze razgrađuju meko tkivo rastvaranjem masti i proteina (Masse i sar., 2001; Undeland i sar., 2002). Predstavljaju manje agresivne agense od kiselina i oksidativnih sredstava, ali varijacija u koncentraciji i vrsti baze značajno utiče na efikasnost digestije.

Dehaut i sar. (2016) testirali su 6 protokola (klasifikovanih u 4 tipa) i utvrdili da 5 od 6 značajno razgrađuju čestice plastike ili nedovoljno razgrađuju tkivo. Alkalni metod (adaptiran prema Foekema i sar. (2013)) pokazao se kao najefikasniji protokol za izolaciju mikroplastike iz bioloških uzoraka, stoga je i korišćen u ovoj studiji.

Protokol je baziran na upotrebi 10 % rastvora kalijum-hidroksida (KOH) kao medijuma za digestiju tkiva. Inkubacija se vršila u vodenom kupatilu na temperaturi od 60 °C u periodu od 24 sata. Ovim protokolom se postiže efikasno razlaganje bioloških tkiva bez značajne degradacije ispitivanih polimera, sa izuzetkom celuloznog acetata (Dehaut i sar., 2016). KOH je takođe najekonomičniji i najefikasniji metod. Njegova opasnost po ljudsko zdravlje je manja od drugih reagenasa koji se koriste za digestiju tkiva (Thiele i sar., 2019). Stoga se predlaže za primenu u daljim studijama praćenja i izolovanja čestica mikroplastike.

Filtriranje uzoraka nakon digestije vršeno je pomoću vakuum pumpe, korišćenjem mlinarske svile (promerom okaca 10 µm) ili Wathman filtera sa staklenim mikrovlaknima (promer pora 0,5 µm, 47 mm GF/B). Filtrirani materijal je lokalno tretiran 30 % vodonik-peroksidom kako bi se uklonila preostala organska materija.

Pored baznog protokola, u upotrebi su i kiselinski (Avio i sar., 2015; Karami i sar., 2017), enzimski (Catarino i sar., 2017; Cole i sar., 2014; Karlsson i sar., 2017) i oksidativni (Nuelle i sar., 2014; Avio i sar., 2015) protokoli, a njihova efikasnost i primenjivost zavise od konkretnog hemijskog agensa kojim se vrši degradacija tkiva.

3.3. Model organizmi

U ovoj studiji, korišćena su dva model organizma. Prvi model organizam, *C. riparius*, korišćen je za ispitivanje uticaja mešavine najčešćih mikroplastičnih polimera (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) na definisane biomarkere na populacionom nivou larvi i deformitete na određenim taksonomski relevantnim strukturama larvi (mentumi i mandibule) i adulta (krila). Drugi model organizam, *C. fluminea*, korišćen je za određivanje prisustva i hemijskog porekla čestica mikroplastike u slivu Dunava.

3.4. Karakterizacija čestica

Pre sprovođenja eksperimenata vršena je karakterizacija čestica polimera poznatih proizvođača (Tabela 1; Tabela 2). Karakterizacija čestica vršena je nasumičnim odabirom po 100 čestica svakog polimera. Veličina čestica određena je pomoću stereomikroskopa pre postavljanja eksperimenata. Imajući u vidu da su eksperimenti iz sekcija 3.5.1. (laboratorijski pristup) i 3.5.3. (eksperimentalne mezokozme) postavljeni uporedo, karakterizacija čestica u tabeli 1, podjednako se primenjuje na oba eksperimenta, dok je u tabeli 2 prikazana karakterizacija čestica za eksperiment iz sekcije 3.5.2. (eksperimentalne mikrokozme).

Tabela 1. Distribucija i karakterizacija čestica mikroplastike koje su korišćene u svakom eksperimentalnom sloju. PE- polietilen; PP- polipropilen; G-PE- fluorescentni zeleni polietilen; R-PE- fluorescentni crveni polietilen; PS- polistiren; PET- polietilen tereftalat; PVC- polivinil hlorid; PA- poliamid.

Polimer	Distribucija	Procentualna zastupljenost polimera u slojevima (%)	Prosečna dužina čestica (μm) \pm SD*	Prosečna širina čestica (μm) \pm SD*
PE	Površina vode	50	22 \pm 30	15 \pm 11
PP	Površina vode	50	336 \pm 90	253 \pm 67
G-PE	Vodena kolona	50	56 \pm 3 (dijametar)	
R-PE	Vodena kolona	50	27 \pm 8 (dijametar)	
PS	Sediment	20	118 \pm 37	82 \pm 24
PET	Sediment	45	42 \pm 31	21 \pm 17
PVC	Sediment	20	110 \pm 27	88 \pm 21
PA	Sediment	15	99 \pm 36	71 \pm 25

* SD= standardna devijacija

Tabela 2. Polimeri korišćeni u eksperimentu sa mikrokozma i karakterizacija na uzorcima od po 100 nasumično odabranih čestica svakog polimera. PE- polietilen; PVC- polivinil hlorid; PA- poliamid.

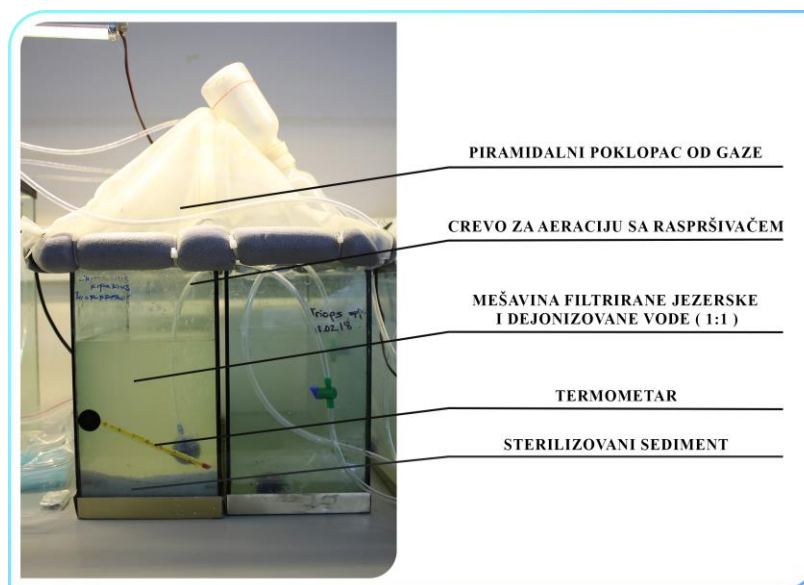
Polimer	Procentualna zastupljenost polimera u sedimentu (%)	Prosečna dužina čestica (μm) \pm SD*	Prosečna širina čestica (μm) \pm SD*
PE	50	41,10 \pm 11,60	30,68 \pm 9,17
PVC	25	90,43 \pm 40,77	66,15 \pm 31,57
PA	25	43,66 \pm 13,74	27,98 \pm 8,98

* SD= standardna devijacija

3.5. Postavka eksperimenata

3.5.1. Testovi toksičnosti u *ex-situ* uslovima sredine

Laboratorijsko ispitivanje uticaja najčešćih mikroplastičnih polimera na model organizam *C. riparius* sprovedeno je na Bliskoistočnom tehničkom Univerzitetu (eng. *Middle East Technical University* (METU)) u Ankari, Turska, gde je formirana populacija hironomida. Populacija je održavana pri temperaturi od $20,5 \pm 0,5$ °C, sa fotoperiodom od 16 h (8 h mraka), uz konstantnu aeraciju u akvarijumu zapremine 10 L. Akvarijum je prekriven gazom kako bi adulti pri izletanju ostali u istom prostoru (Slika 15). Sterilizovani kvarcni pesak korišćen je kao supstrat, dok je vodeni medijum činila jednaka mešavina filtrirane jezerske vode i dejonizovane vode. Jedinke su hranjene rastvorom TetraMin® hrane za akvarijumske ribice. Želatinozni paketi jaja iz oformljene populacije prikupljeni su i pojedinačno stavljani u Petrijeve posude u medijumu od filtrirane jezerske vode i dejonizovane vode u odnosu 1:1.



Slika 15. Akvarijum za uzgajanje populacije hironomida.

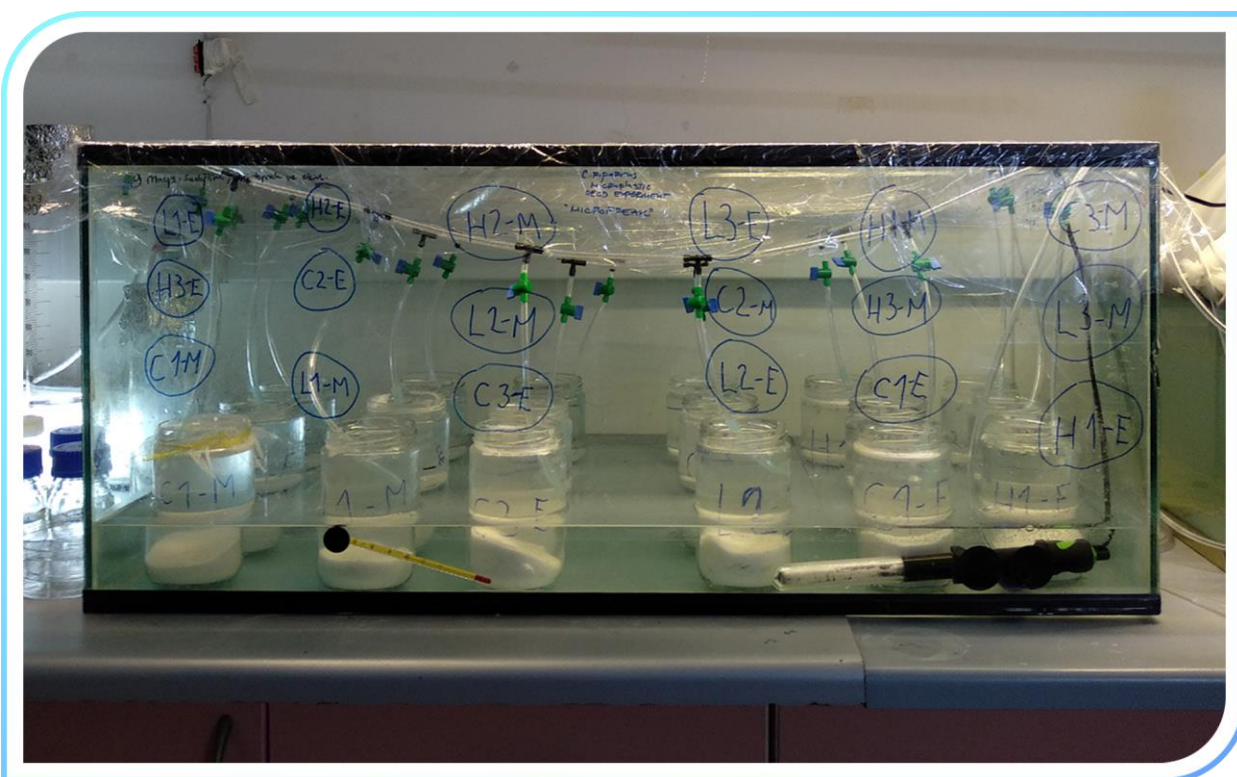
3.5.1.1. Dizajn eksperimenta

Eksperiment je dizajniran tako da reprezentuje prisustvo najčešćih mikroplastičnih polimera (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) u prirodnim akvatičnim ekosistemima sa definisanim koncentracijama i distribucijom istih (Tabela 3). Istovremenim sprovođenjem OECD protokola broj 218 i 219, vršila se procena efekata produženog izlaganja hemikalijama kroz toksikovani sediment i vodu (OCED, 2004c, d) na model organizam *C. riparius*. Eksperiment je sadržao dva tretmana i kontrolu.

Tabela 3. Specifikacije, distribucija i procentualni udeo čestica mikroplastike koje su korišćene u svakom eksperimentalnom sloju. PE- polietilen; PP- polipropilen; G-PE- fluorescentni zeleni polietilen; R-PE- fluorescentni crveni polietilen; PS- polistiren; PET- polietilen tereftalat; PVC- polivinil hlorid; PA- poliamid.

Polimer	Distribucija	Procentualna zastupljenost polimera u slojevima (%)	Gustina polimera u (g cm⁻³)	Proizvođač	Kataloški broj
PE	Površina vode	50	0,94	Aldrich Chemistry	434272
PP	Površina vode	50	0,90	Aldrich Chemistry	428175
G-PE	Vodena kolona	50	1,00	Cospheric LLC	UVPMS-BR
R-PE	Vodena kolona	50	0,99	Cospheric LLC	UVPMS-BR
PS	Sediment	20	1,06	Aldrich Chemistry	331651
PET	Sediment	45	1,68	Aldrich Chemistry	429252
PVC	Sediment	20	1,4	Aldrich Chemistry	81387
PA	Sediment	15	1,14	Aldrich Chemistry	02395

Svi ponovci (staklene čaše od 600 mL - prečnika 8 cm) sadržali su kvarcni sloj (sediment) od 2 cm i mešavinu dejonizovane i filtrirane vode iz eksperimentalnog jezera (METU, Ankara, Turska), ukupne zapremine 400 mL, u odnosu 1:1 (Slika 16). Voda iz jezera je prvo filtrirana kroz sito promera 500 μm . Fizičko-hemijske karakteristike jezerske vode bile su: 2,9 mEq L^{-1} - ukupni alkalitet; 2,3 mg L^{-1} - rastvorljivi reaktivni fosfor; 30,5 mg L^{-1} - ukupni fosfor; 582 ppb - ukupni azot; 8,4 – pH vrednost. Parametri fiziko-hemije eksperimentalne mešavine vode predstavljeni su u Tabeli 4.



Slika 16. Postavka eksperimenta u laboratorijskim uslovima- laboratorijska mikrokozma.

Tabela 4. Fizičko-hemijske karakteristike vodenog medijuma bioeseja.

Parametar	Vrednost
temperatura	20 °C
provodljivost	0,6 mS cm ⁻¹
ukupne rastvorene čvrste materije	0,4 mg L ⁻¹
salinitet	0,3 ‰
rastvoreni O₂	8,5 mg L ⁻¹
pH	7,8

Odnos sediment-voda bio je 1:4, prema preporukama OECD protokola br. 218. Da bi se sediment toksikovao, mešavina odgovarajuće koncentracije mikroplastike dodata je vlažnom sedimentu i ravnomerno raspoređena ručnim mešanjem. Koristeći proporciju, izračunata je tačna količina svakog plastičnog polimera za sve ponovke jednog tretmana. Čestice mikroplastike dodate su u mokri pesak i mešane metalnom kašikom 3 minuta. Da bi se voda toksikovala, suspenzija fluorescentne mikroplastike je dodata u vodeni stub tretmana koji sadrže toksikovani sediment, nakon čega je dodata mešavina plutajuće mikroplastike na površinu vode. Kontrola je postavljena na isti način kao i tretmani, ali bez kontaminacije mikroplastikom. Organizmi su istovremeno bili izloženi polimerima sa površine vode, unutar vodenog stuba, kao i sedimentu.

Hironomide su bile izložene niskim i visokim koncentracijama mikroplastike, pored kontrole. Tretman niske koncentracije sadržao je 0,007 g m⁻² mešavinu polimera za površinu vode, 2 g m⁻³ za vodeni stub i 8 g m⁻² za sediment. Smatralo se da su ove koncentracije mikroplastike relevantne za životnu sredinu. Odabrane su prema prethodno sprovedenim studijama (Moore i sar., 2011; Castañeda i sar., 2014; Lechner i sar., 2014; Zhang i sar., 2015; Li i sar., 2018) i zasnovane su na podacima koji su izmereni, procenjeni ili pretvoreni u masu/broj čestica (pod pretpostavkom savršene sfere) sa različitih lokacija za uzorkovanje. Za eksperimentalno izlaganje odabrane su najveće koncentracije dobijene na ovaj način. Sastav mikroplastike odabran je na osnovu literaturnih podataka o mikroplastici u slatkovodnim ekosistemima (Imhof i sar., 2013; Faure i sar., 2015; Corcoran i sar., 2015; Zhang i sar., 2015). Tretman visoke koncentracije je sadržao 10 puta veću koncentraciju mikroplastike od tretmana niske koncentracije. Veličina čestica

mikroplastike korišćenih u eksperimentu varirala je između 10 i 400 μm , sa dominacijom čestica u rasponu od 20 do 100 μm . PS, PET i PP kupljeni su u obliku peleta koji su mleveni mlinom za kafu, a zatim filtrirani kroz mrežu 200-500 μm . PA, PVC i PE su obezbeđeni u obliku praha, tako da dodatno usitanjavanje nije bilo potrebno. I tretmani i kontrola sastojali su se od šest ponovaka. Po tri ponovka kontrole i tretmana korišćene su za analizu morfometrijskih parametara preživelih larvi (morfometrijski bioesej), dok su ostale tri korišćene za analizu životnih osobina i morfometrijskih parametara adulta (biološki test životnih osobina). Svakom ponovku je dodato 25 larvi prvog stupnja. Broj lutki, izletanje odraslih jedinki, odnos ženki i mužjaka i broj odraslih jedinki beleženi su svakodnevno, dok se broj uginulih larvi procenjivao na kraju eksperimenta, oduzimanjem broja preživelih larvi od ukupnog broja larvi po ponovku na početku eksperimenta. Eksperiment kojim su praćeni biomarkeri na populacionom nivou trajao je ukupno 28 dana i prekinut je pet dana nakon izletanja poslednjeg adulta iz kontrole.

Za potrebe biološkog testa, gde su praćeni biomarkeri koji se zasnivaju na morfometrijskim parametrima, larve iz 3 ponovka (tretmani i kontrola) su sakupljene nakon 12 dana izlaganja, kada su stigle do IV stupnja svog životnog ciklusa i bile spremne za pupaciju. Larve su sakupljene i konzervirane u 70 % etil alkoholu. Odrasle jedinke su konzervirane u 95 % etil alkoholu. Da bi se testirale morfološke varijacije u krilima, nasumično su odabrane odrasle jedinke. Ukupno 40 desnih krila ženki i 44 desna krila mužjaka su bila pogodna za analizu (dobro očuvana, bez morfoloških oštećenja). Krila su postavljena na predmeta stakla koristeći Berlezov medijum, nakon čega su pregledana i fotografisana pomoću stereomikroskopa sa digitalnom kamerom pod uvećanjem od 10 puta.

Na kraju eksperimenta pH, temperatura, tvrdoća, koncentracija amonijaka i rastvorenog kiseonika (koristeći ISI 556 MPS sondu) su izmereni u svim ispitnim sudovima. Ukupna vlažna masa larvi sakupljenih iz svake replike tretmana je izmerena na analitičkoj vagi i procenjena je srednja individualna vlažna masa. Da bi se izvršila geometrijska morfometrijska analiza delova usnog aparata larvi, mehanički je uklonjeno ukupno 197 glavenih čaura i selektovano u odgovarajuće bočice od 1,5 mL napunjene 15 % KOH. Gularni sklerit je omekšan kuvanjem bočica sa glavenim čaurama u trajanju od 15 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi blizu 100 °C, nakon čega je usledilo hlađenje pod mlazom vode u trajanju od 2 minuta. Mandibule su uklonjene iz glavenih čaura pomoću entomoloških igala. Mandibule i mentumi su postavljeni na

mikroskopske pločice koristeći Berlezov medijum. Glavene čaure su postavljene na predmetnu pločicu zauzimajući ventralni aspekt, što je ispravan položaj za posmatranje mentuma.

3.5.2. *In-situ* istraživanje u mikrokozmmama barskih ekosistemima

Istraživanje je sprovedeno u bari kod Pirota (43,12911 N; 22,543506 E; Slika 17) u periodu od septembra do januara 2018/2019. godine u trajanju od 100 dana, u cilju procene stepena uticaja polimera na strukturu populacije makrobeskičmenjaka. Površinski sloj sedimenta (mulj) prikupljen je iz prirodne bare. Dalja obrada sedimenta i priprema za eksperiment vršena je u laboratorijama Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Mulj je ispiran kroz sito promera 500 μm kako bi se uklonile sve veće primese granja, kamenja i antropogenog otpada. Potom je sterilizovan u pećnici na temperaturi od 180 °C kako bi se otklonili potencijani ostaci biološkog materijala. Ukupan organski ugljenik u sedimentu određen je korišćenjem standardne procedure (Walkley i Black, 1934).



Slika 17. Prirodna eksperimentalna bara

Vremenski okvir i period godine odabrani su da kontrolišu prirodnu sezonsku varijabilnost strukture zajednice uzrokovanu fenološkim obrascima vodenih insekata. Nakon 100 dana izloženosti u prirodnim uslovima, mikrokozme su pažljivo prikupljene iz bare, a sediment sa organizmima konzerviran je u 70 % etil alkoholu. Da bi se procenila biomasa jedinki, svaka vrsta je sušena u pećnici na 105 °C (Leuven i sar., 1985). Svi uzorci iste vrste iz istog uzorka stavljeni su u staklenu Petrijevu posudu i sušeni 2 h. Zatim su jedinke izmerene na analitičkoj vagi i vraćene u renu na još 1 h. Mase su ostale iste nakon drugog sušenja, što se smatralo kao konačna suva težina (Slika 18).



Slika 18. Sušenje larvi hironomida

3.5.2.1. Dizajn eksperimenta

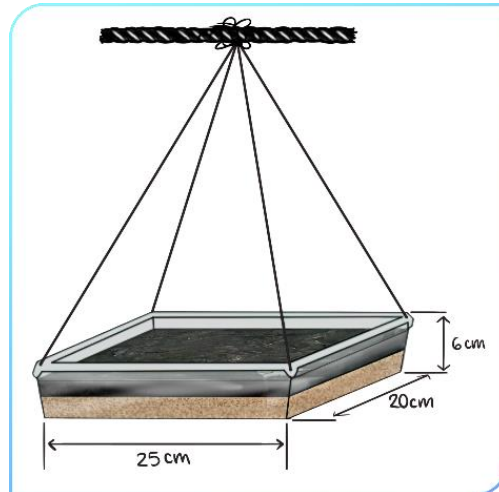
Za potrebe eksperimenta, test sediment bio je sačinjen od dva sloja u odnosu 1: 1 (Slika 19). Donji sloj činio je sterilizovani komercijalni pesak, dok je gornji sloj činio sterilizovani mulj prikupljen iz prirodne bare. Sterilizacija je vršena zasebno za svaki sloj pri temperaturi od 180 °C u pećnici u trajanju od 2 sata po sloju. Za svaku podjedinicu eksperimenta, slojevi su sterilisani

zasebno zbog malog kapaciteta pećnice, a potom prikupljeni u veću posudu sa poklopcem. Gornji sloj sterilizovanog sedimenta podeljen je na dva jednaka dela. Jedan deo sačuvan je za kontrolnu postavku, dok je druga polovina iskorišćena za tretman. Nakon hlađenja, drugoj polovini gornjeg sloja sedimenta dodata je smeša polietilena (PE), polivinil hlorida (PVC) i poliamida (PA) u predefinisanom odnosu (Tabela 5).

Tabela 5. Procentualni odnos polimera u sedimentu i njihove specifikacije. PE- polietilen; PVC- polivinil-hloid; PA- poliamid.

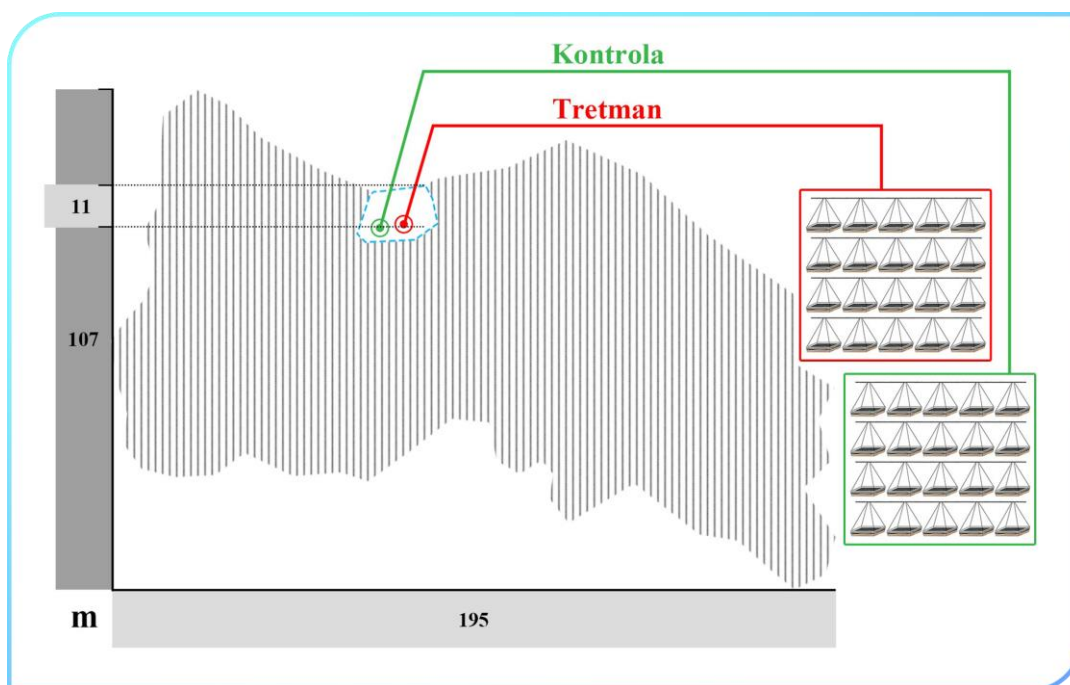
Polimer	Procentualna zastupljenost polimera u sedimentu (%)	Gustina polimera (g cm^{-3})	Proizvođač	Kataloški broj
PE	50	0,94	Aldrich Chemistry	434272
PVC	25	1,4	Aldrich Chemistry	81387
PA	25	1,14	Carl Roth	9620.1

Sva tri tipa polimera bila su iregularnog oblika, koji je i u prirodi verovatniji i češći od idealno sferičnog, usled fragmentisanja makroplastike. Na osnovu prethodnog eksperimenta (3.5.1.), relevantna koncentracija mikroplastike u prirodi iznosi 8 g m^{-2} mokre mase sedimenta (Stanković i sar., 2020). Za tretman eksperimenta uzeta je koncentracija 10 puta veća od prethodno navedene, kao ekstremno negativni scenario. Kontrolu je sačinjavalo 20 pojedinačnih mikrokozmi sa sedimentom, dok je tretmanu sa istim brojem ponovaka (mikrokozmi) dodata mešavina PE, PVC i PA u odnosu 2:1:1, redom. Za pripremu tretmana, 32 kg sterilizovanog sedimenta pomešano je sa 80 g smeše mikroplaste. Kako bi se obezbedilo ravnomerno raspoređivanje čestica u sedimentu, mešanje je vršeno bušilicom (Bosch GSB 18-2 RE) sa nastavkom za mešanje u trajanju od 30 minuta uz 3 ponavljanja. Dimenzije pojedinačne mikrokozme iznosile su $25 \times 20 \times 6 \text{ cm}$ (L \times W \times H) (Slika 19).



Slika 19. Ilustracija pojedinačne mikrokozme. Braon bojom predstavljen je sloj sterilizovanog peska, dok je tamnosivom bojom predstavljen sloj sterilizovanog mulja (Autor: M. Ristić).

Mikrokozme su poređane u 8 transekata sa po 5 ponovaka, gde su po 4 transekta predstavljala tretman i 4 kontrolu, a potom potpoljene u bari. Svi ponovci u pojedinačnom transektu bili su povezani kanapom i metalnim prstenom. Svaka mikrokozma bila je fiksirana za metalni prsten uz pomoć 4 strune jednake dužine, uz dodatno povezivanje za sledeću mikrokozmu u istom transektu radi povećavanja stabilnosti celog sistema (Slika 20).



Slika 20. Položaj kontrolnih i eksperimentalnih mikrokozmi za tretman u eksperimentalnoj bari. Šrafirano područje predstavlja obrasli deo bare; plava isprekidana linija definiše deo bare bez vegetacije.

3.5.2.2. Funkcionalne grupe ishrane (eng. *Functional Feeding Group*- FFG)

Strategije hranjenja su tipične osobine koje odražavaju prilagođavanje vrsta na uslove životne sredine. Funkcionalne grupe ishrane (eng. *Functional Feeding Group*- FFG) korisne su za procenu taksonomskog sastava zajednice (Statzner i sar., 2004). Makrobeskičmenjaci imaju bitnu ulogu u akvatičnim ekosistemima, kao deo trofičke piramide, predstavljajući posrednike za prenos materije, bilo pod kontrolom predatora (eng. *top-down control*), bilo usled limitiranosti nutrijenata (eng. *bottom-up control*) (Wallace i sar., 1999). Različiti su izvori hrane koju koriste bentosni makrobeskičmenjaci. Epilitski sloj koji se razvija na površini supstrata u svojoj ishrani koriste strugači. Grubi detritus, sastavljen uglavnom od lišća koje opada sa priobalne vegetacije konzumiraju sekači. Fini detritus u vidu taloga na podlozi konzumiraju sakupljači, a kada je

detritus suspendovan u vodenom stubu kozumiraju ga filtratori organizmi, dok se živim jedinkama hrane predatori organizmi (Merritt i sar., 2002). Kompozicija faune makrobeskičmenja na osnovu FFG-a može umnogome pomoći pri proceni funkcionisanja ekosistema (Minshall i sar., 1992) i samim tim ukazati na potencijalne promene u životnoj sredini.

Radi procene uticaja mikroplastike na sastav i strukturu bentosne zajednice, svakoj detektovanoj vrsti makrobeskičmenjaka dodeljena je funkcionalna grupa ishrane (FFG): sakupljači, filtratori, strugači, sekači ili predatori prema Schmidt-Kloiber i Hering (2015) (Tabela 6).

Tabela 6. Karakterizacija funkcionalnih grupa ishrane i izvora hrane. Modifikovano prema Merritt i Cummins, 1996.

Tip FFG*	Mehanizam hranjenja	Dominantni resurs hrane	Raspon veličine čestica hrane (mm)
Sekači	Grickanje biljnog materijala	CPOM** - dekompozicija vaskularnih biljaka	>1,0
Filtratorni kolektori	Filtriranje suspenzije čestica iz vodene kolone	FPOM*** – dekompozicija detritusa, algi, bakterija i fecesa	0,001-1,0
Kolektori	Depozitorna ishrana-ingestovanje čestica	FPOM*** – dekompozicija detritusa, algi, bakterija i fecesa	0,05-1,0
Grebači	Grebanje površna kamenja i drveća	Perifiton	0,001-1,0
Predatori	Hvatanje plena	Plen- žive životinje	>0,5

* FFG - funkcionalne grupe ishrane

** CPOM – gruba čestična organska materija

*** FPOM – fina čestična organska materija

I učestalost i dominacija određeni su prema Tišlerovoj metodi (1949). Učestalost (F) je izražena kao procenat uzoraka u kojima je data vrsta pronađena, na sledeći način: F = 75–100 %, eukonstanta; F = 50–75 %, konstantna; F = 25–50 %, povremena; i F = 0–25 %, slučajna. Dominacija (D) je izražena kao relativna brojnost vrste unutar zajednice i predstavljena na sledećoj skali: D > 10 %, eudominantna; D = 5–10 %, dominantna; D = 2–5 %, subdominantna; D = 1–2 %, recedentna; i D < 1, subrecedentna.

3.5.2.3. Indeksi diverziteta

Živi svet, bilo u terestričnim, bilo u akvatničnim ekosistemima, predstavlja se diverzitetom, tj. raznolikošću prisutnih vrsta. Kako bi se vršilo poređenje različitih zajednica organizama, u ekologiji su definisani alfa (α), beta (β) i gama (γ) diverzitet. α -diverzitet označava diverzitet na minimumu areala, tj. lokalni biodiverzitet. β -diverzitet odnosi se na promenu diverziteta duž nekog gradijenta, povezujući α - i γ -diverzitet (Whittaker, 1972), dok γ -diverzitet predstavlja sveobuhvatni diverzitet određenog područja.

Da bi se procenio diverzitet, koriste se različiti indeksi diverziteta. Peet (1974) grupisao je indekse u dva tipa. Tipu 1 pripadaju indeksi koji su najosetljiviji na promene retkih vrsta u uzorku zajednice, a jedan od najčešće korišćenih je Šenon-Vinerov indeks diverziteta (Shannon i Waever, 1949). Tip 2 predstavlja grupu indeksa koji su najosetljiviji na promene u dominantnim vrstama, među kojima je Simpsonov indeks raznolikosti (Simpson, 1949).

Diverzitet je procenjen Šenonovim indeksom diverziteta (H) i Simpsonovim indeksom raznolikosti (D). Šenonov indeks diverziteta (H), izračunat za svaku mikrokozmu prema formuli:

$$H = - \sum p_i \ln p_i \quad (1),$$

gde je p_i relativna abundantnost taksona i , izračunato kao proporcija jedinki u datom taksonu u odnosu na ukupan broj jedinki u zajednici, a n je broj taksona u zajednici. Relativna brojnost zajednice (N) izračunata je za svaku mikrokozmu kao ukupan zbir pojedinačnih vrsta prisutnih u svakoj eksperimentalnoj jedinici, izražena kao broj individua/cm.

Simpsonov indeks raznolikosti (D), koji se ponekad naziva Simpsonova ravnomernost, koji predstavlja verovatnoću da će dve jedinke koje su nasumično odabrane iz uzorka pripadati različitim vrstama prema sledećoj formuli:

$$D = 1 - \left(\sum_{i=1}^n \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)} \right) \quad (2),$$

gde je n ukupan broj jedinki određene vrste, a N je ukupan broj jedinki svih vrsta (Simpson, 1949).

β dverzitet je procenjen pomoću Jaccard (Sj) (Jaccard, 1901), Sørensen–Dice (Ss) (Dice, 1945; Sørensen, 1948) i Czekanowski (Sc) (Czekanowski, 1909) indeksa sličnosti.

Jaccardov indeks sličnosti (3) i kvalitativni indeks sličnosti Sørensen–Dice (4) izračunati su korišćenjem formule:

$$S_j = c / (A + B - c) \quad (3)$$

$$S_s = 2c / (A + B) \quad (4),$$

gde je A ukupan broj vrsta u kontroli, B je ukupan broj vrsta u tretmanu, a c je broj zajedničkih vrsta.

Indeks sličnosti Czekanowski se preporučuje kao najpogodniji indeks za merenje nivoa uticaja toksične supstance na zajednicu, jer može da opiše najvažnije promene u zajednici nakon unošenja toksičnih supstanci u ekosistem (Sanchez-Baio i Goka 2012; Jovanović i sar., 2016). Kvantitativni indeks sličnosti Czekanowski (5) izračunat je na osnovu sledeće formule:

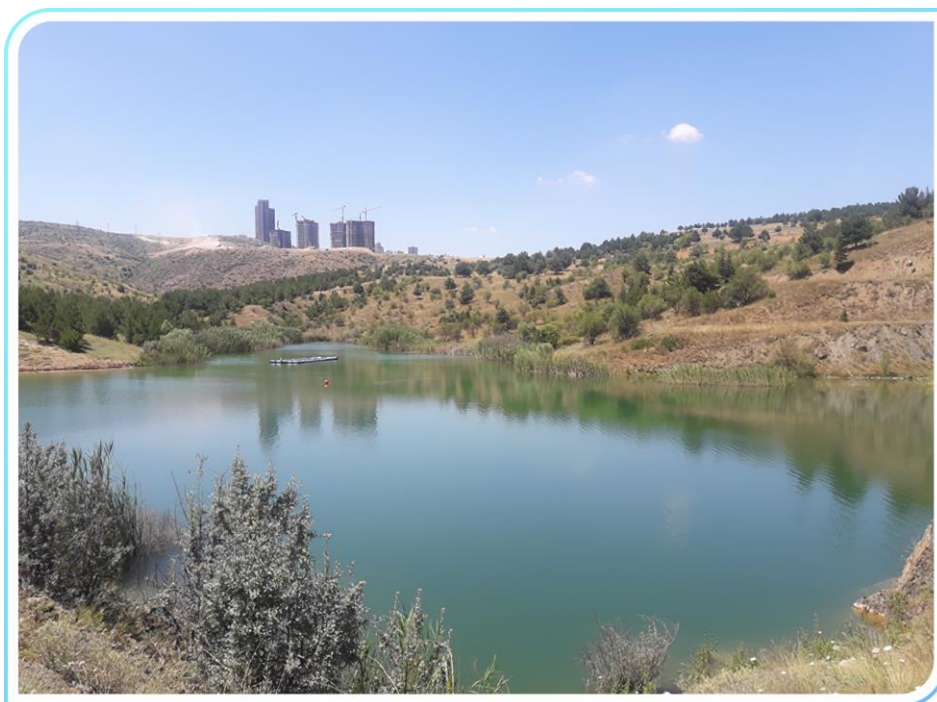
$$S_c = 2c / (A + B) \quad (5),$$

gde su A i B apsolutna brojnost zajednice za tretman i kontrolu, respektivno, a c je najniža brojnost od svih vrsta zajedničkih za obe grupe.

Bogatstvo vrsta (S), brojnost vrsta (N), biomasa vrste (B), Šenonov indeks raznovrsnosti (H) i Simpsonov indeks raznovrsnosti (D) za kontrolnu i tretiranu grupu su statistički upoređeni sa Mann-Whitney testom korišćenjem SPSS-a. softver Verzija 15.0.

3.5.3. In-situ istraživanje u mezokozmama veštačkog jezerskog ekosistema

Ispitivanje uticaja mešavine različitih vrsta polimera na populaciju vrste *C. riparius* u mezokozmama vršeno je 2018. godine u eksperimentalnom jezeru Bliskoistočnog tehničkog Univerziteta (METU, Ankara, Turska; 39° 52'13,18 "N, 32° 46'31,92 "E, 998 m n.v.; Slika 21).

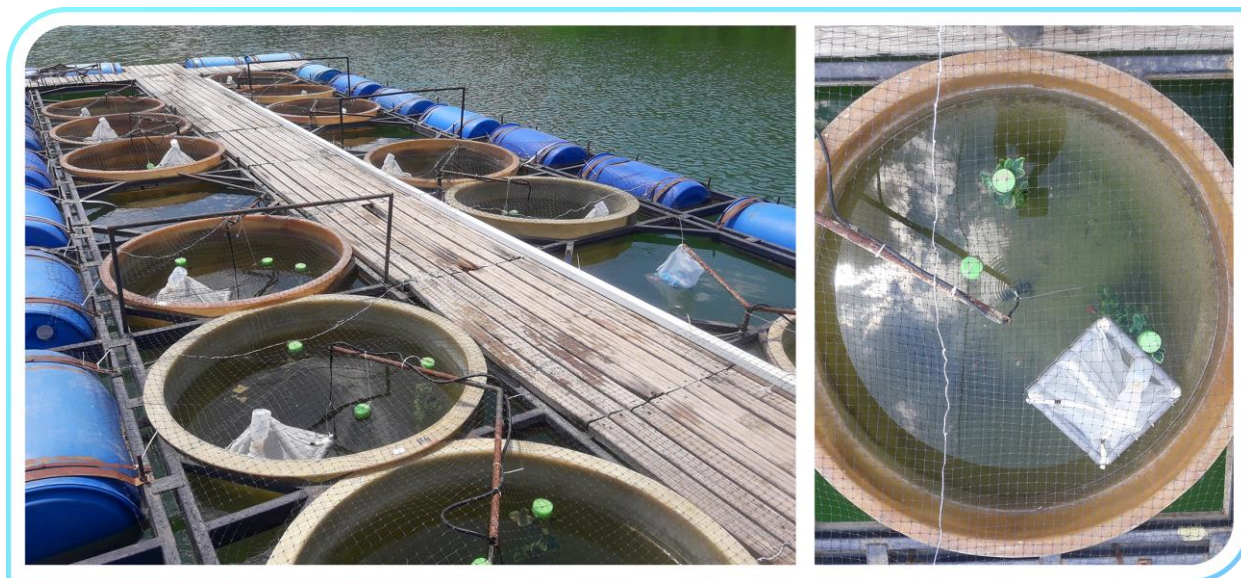


Slika 21. Veštačko eksperimentalno jezero sa postavljenom mezokozmom.

3.5.3.1. Dizajn eksperimenta

Eksperiment je trajao 3 meseca (od juna do avgusta 2018. godine). Postavka eksperimenta bila je identična laboratorijskom eksperimentu (3.5.1.1.; Tabela 3), sa razlikom u broju ponovaka po tretmanu, kojih je u ovom slučaju bilo 4. Pojedinačno postrojenje mezokozme (Slika 22) sačinjeno je od fiberglasa, dimenzija 1,2 m dubine i 1,2 m širine. Zapremina jednog postrojenja iznosila je 1.360 L. Svaka mezokozma sadržala je sloj od 10 cm sedimenta koji je sačinjen od 10

% prirodne mešavine sedimenata iz četiri oligotrofna jezera (jezera Gölcük, Abant, Çubuk i Poyrazlar) i 90 % ispranog i sterilisanog sedimenta granulacije manje od 1 mm. Sediment je u laboratoriji pre eksperimenta uravnotežen do željene eksperimentalne koncentracije ukupnog fosfora (TP) od $20 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$.



Slika 22. Mezokozma u veštačkom jezeru (levo), sačinjena od pojedinačnih postrojenja, tj. ponovaka (desno).

Definisane mešavine polimera su dodate na površinu, u vodeni stub i u sediment, u niskim i visokim koncentracijama (Tabela 3). Ukupne koncentracije mikroplastike u mezokozmama sa niskim tretmanom iznosile su $0,007 \text{ g m}^{-2}$ za površinu vode, 2 g m^{-3} u vodenom stubu i 8 g m^{-2} u sedimentu, dok su koncentracije za iste slojeve u mezokozmama sa visokim tretmanom bile 10 puta veće. Za tretmane, površinskom sloju sedimenta debljine 2 cm dodata je odgovarajuća mešavina mikroplastike pre nego što su mezokozme napunjene jezerskom vodom, koja je filtrirana kroz sito promera $500 \text{ }\mu\text{m}$, deset dana pre početka eksperimenta. Da bi se sprečilo ponovno suspendovanje sedimenta, drveni disk je postavljen na vrh sedimenta u svakoj mezokozmi tokom dodavanja jezerske vode. Isti postupak primenjen je i za kontrole, bez dodavanja čestica mikroplastike. Odgovarajuća mešavina mikroplastike dodata je vodenoj koloni i površini vode na

početku eksperimenta (dan 0). Da bi se sprečila agregacija čestica mikroplastike, 5 mL TWEEN80 je dodato u svaku mezokozmu (uključujući i kontrole).

Larve hironomida su uzorkovane iz istog močvarnog područja i dodate su tri dana pre početka eksperimenta. Svakoj mezokozmi je dodato 200 mL larvi, identifikovanih relevantnim identifikacionim ključevima (Andersen i sar., 2013; Vallenduuk i Pillot, 2007; Vallenduuk, 2017).

Plutajuće zamke u obliku piramida (35 x 35 cm bazne osnove) sa bocom za sakupljanje adulta, zapremine 250 mL koja sadrži glicerovani etanol (Cadmus i sar., 2016) su postavljene u svaku mezokozmu nultog dana. Sve mezokozme su bile prekrivene mrežom (promera okaca 3 x 3 cm) da bi se sprečio potencijalni spoljni uticaj ptica, kornjača i riba. Voda u mezokozmama je mešana pumpom da bi oponašala prirodno kretanje vode (na primer, usled dejstva vetra). Nitrati i fosfati su dodati svakoj mezokozmi da bi se održale stabilne koncentracije hranljivih materija. Uzorkovanje adulta vršeno je pet puta nedeljno tokom prve tri nedelje eksperimenta, nakon čega je uzorkovanje vršeno dva puta nedeljno do kraja eksperimenta.

3.6. Pasivni monitoring prisustva čestica mikroplastike u slivu Dunava

U narednom delu teksta prikazujemo rezultate analize prisustva i tipa čestica mikroplastike u biološkim uzorcima na lokacijama na Dunavu i najvećim pritokama.

3.6.1. Sliv Dunava

Međunarodni sliv Dunava obuhvata teritoriju 19 zemalja, zauzimajući površinu od 801.463 km² sa preko 80 miliona stanovnika u blizini (BSC, 2009). Sliv reke Dunav se nalazi u devet ekoregiona i klasifikovan je kao posebna studija slučaja u smislu očuvanja i upravljanja (Sommerwerk i sar., 2009).

Dunav nastaje spajanjem reka Breg i Brigah u regiji Crna šuma u Nemačkoj i uliva se u Crno more. Dužina njegovog toka iznosi 2.857 km, što ga čini drugom najvećom rekom Evrope.

Dunavski sliv može se podeliti na tri sektora (Lászlóffy, 1967; Literáthy i sar., 2002):

- gornji (alpski) sektor (2.857 – 1.880 rkm),
- srednji (panonski) sektor (1.879 – 1.103 rkm) i
- donji (pontski) podregion sa deltom (1.102 – 0 rkm).

Podela je uslovljena velikim planinskim lancima Alpa i Karpatu koji dele sliv Dunava na tri dela, a koji se međusobno bitno razlikuju po svojim hidromorfološkim osobinama.

Dužina srpskog dela Dunava iznosi 588 km i predstavlja 20,6 % ukupne dužine ove reke. Prosečna širina Dunava u Srbiji je oko 1 km, površina vode 52.000 ha, dok plavna područja zauzimaju duplo više (Simonović i sar., 2010, Raković, 2015). 92 % vodene teritorije Srbije pripada crnomorskom slivu i sve veće reke se preko Dunava ulivaju u Crno more (Gavrilović i Dukić, 2002). U Srbiji, Dunav se proteže od Bezdana (tromeđa Srbije, Mađarske i Hrvatske) do ušća Timoka (tromeđa Srbije, Bugarske i Rumunije), a glavne pritoke na teritoriji Srbije su reke Tisa, Sava, Tamiš, Nera, Velika Morava, Mlava, Pek i Timok.

Krajem 1960-ih godina počela su prva ispitivanja basena Dunava većih razmera (Liepolt, 1967; Cousteau Equipe, 1993; Russev, 1998) sa ciljem dobijanja uporedivih i pouzdanih informacija o kvalitetu i zagađenju vode reke Dunav i njegovih pritoka, kao i podizanje svesti o značaju Dunava i održivom upravljanju vodama.

U poslednjih 50 godina, kvalitet vode opao je usled brzog industrijskog razvoja, loše kontrole kvaliteta vode i prisustva zagađivača, naročito u srednjem i donjem sektoru (Schmidt, 2001; Sommerwerk i sar., 2009).

3.6.2. Metode prikupljanja i pripreme biološkog materijala

Tokom izrade doktorske disertacije, prikupljanje biološkog materijala, tj. makrobeskičmenjaka, vršeno je na više načina. Uz pomoć multi-habitat procedure (AQEM, 2002), uzorkovanje makrobeskičmenjaka vršeno je ručnom bentosnom mrežom (25 cm × 25 cm, promer okaca 500 µm) primenjivanjem kick & sweep (K&S) tehnike uzorkovanja (EN 27828:1994). Uzorkovanje u dubljim slojevima akvatičnih ekosistema vršeno je trouglastom dredžom (25 x 25 cm, promer okaca 500 µm), povlačenjem mreže pet puta po mestu uzorkovanja u dužini od 80 cm. Svaki transekt je okarakterisan kao zasebni uzorak. Detaljan opis metodologije uzorkovanja prezentovan je od strane Liška i sar. (2015).

Pregledavanje i pripema uzoraka za dalje analize vršena je korišćenjem stereomikroskopa: Nikon SZM 754T, Leica M125 i Leica MZ16A (10 X/21 B okular; od 10 X do 50 X uvećanja objektivu). Brojanje i fotografisanje čestica mikroplastke i morfoloških struktura organizama vršeno je korišćenjem Nikon SMZ 745T stereomikroskopa, Leica DFC320 Digital Camera system i Leica DFC295 digitalnog mikroskopa i softvera LAS V4.6.2.

Identifikacija organizama vršena je do najnižeg mogućeg taksonomskog nivoa korišćenjem relevantnih ključeva za identifikaciju makrobeskičmenjaka (Vallenduuk i Moller Pillot, 2007; Moller Pillot, 1984a; 1984b; Zhadin, 1952; Pflieger, 1999; 2000; Bole, 1969; Epler, 2001; Schmid, 1993; Timm, 2009; Brinkhurst i Cook, 1974; Hrabč, 1981; Macan i Cooper, 1994; Nilsson, 1997).

U zavisnosti od potrebne analize podataka, korišćeni su sledeći softveri: MorphoJ, ImageJ (Ferreira i Rasband, 2012), MakeFan6, Statistica (Stat Soft Inc. Version 7.0).

In-situ istraživanje sprovedeno je na 68 lokacija u slivu Dunava u dužini od 2.500 rečnih kilometara u okviru međunarodne ekspedicije „Zajedničko istraživanje Dunava“, JDS3 i JDS4 (eng. *Joint Danube Survey*) tokom 2013. i 2019. godine. Prikupljeni uzorci obrađeni su na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu.

Tokom 2013. god. u okviru međunarodne ekspedicije „Zajedničko istraživanje Dunava“, JDS3 prikupljeni su uzorci na šest lokacija duž Dunava (JDS3-4, JDS3-14, JDS3-22, JDS3-33, JDS3-38 i JDS3-62). Po jedan predstavnik mekušaca, oligoheta i hironomida korišćen je kao model organizam. Vrste koje su ušle u analizu su: *Lithoglyphus naticoides* (C. Pfeiffer, 1828), *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862 i *Chironomus acutiventris* Wuelker, Ryser & Scholl, 1983, redom po grupama. *Limnodrilus hoffmeisteri* (Naididae: Tubificidae) predstavlja jednu od najdominantnijih vrsta duž celog toka reke Dunav, tolerantnu na organsko zagađenje (Atanacković i sar, 2013). *L. naticoides* ima ponto-kaspijsko poreklo i smatra se kriptogenom za gornji i srednji deo Dunava, dok je autohton za Donji Dunav (Paunović i sar, 2015). *Chironomus acutiventris* je jedan od predstavnika hironomida, koji se smatraju korisnim bioindikatorima pogodnim za određivanje bioloških efekata različitih zagađivača u vodenoj sredini (Pinder, 1986). Pošto su hironomide nespecifične po načinu ishrane, gutanje čestica mikroplastike umesto čestica hrane je veoma česta pojava (Scherer i sar., 2017).

U okviru JDS4 ekspedicije, azijska školjka *C. fluminea* odabrana je kao model organizam za *in-situ* istraživanja u cilju utvrđivanja prisustva i analize hemijskog porekla prisutnih čestica mikroplastike u slivu Dunava.

3.6.3. Metode izolovanja čestica mikroplastike

3.6.3.1. Izolovanje čestica mikroplastike iz tkiva vrsta: *L. naticoides*, *L. hoffmeisteri* i *C. acutiventris*

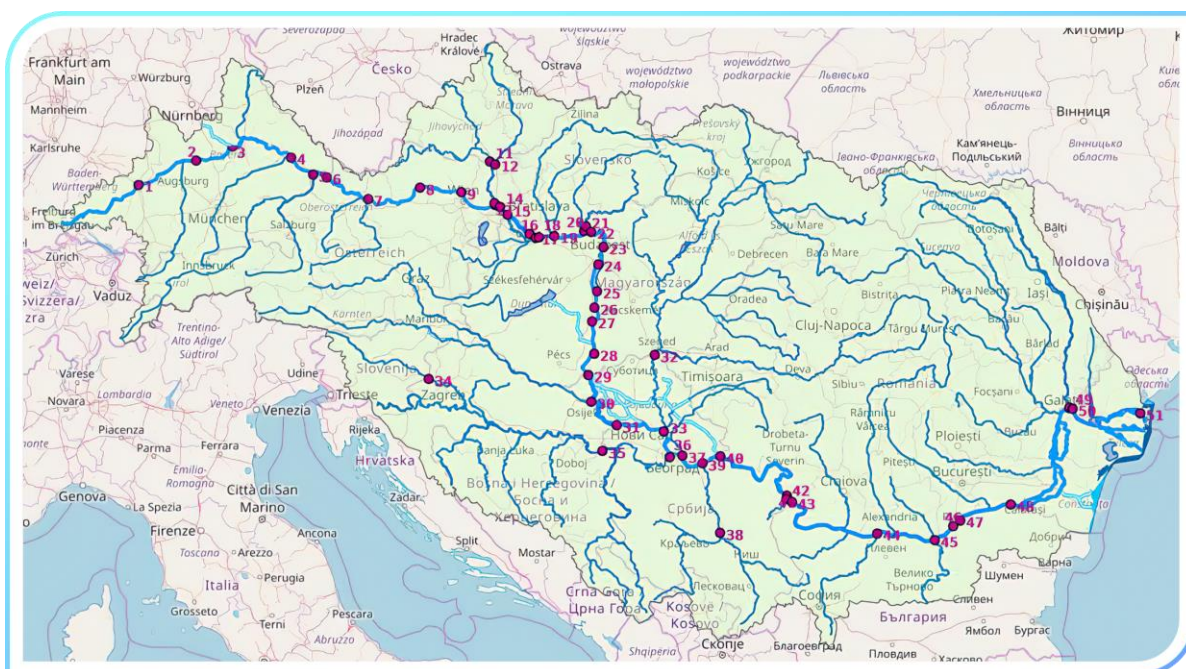
Uzorci makrobeskičmenjaka sortirani su u laboratoriji i jedinke oligoheta, mekušaca i hironomida su brojane, izdvajane i identifikovane do najnižeg taksonomskog nivoa. Od svake vrste 180 jedinki je nasumično odabrano sa 6 lokaliteta (30 jedinki po lokalitetu) i podeljeno u uzorke. Jedan uzorak sadržao je 10 jedinki, odnosno 3 ponovka po lokalitetu. Ukupno 540 jedinki izmerene su radi dobijanja podataka o biomasi istih, na osnovu čega se procenjivao potencijalni broj čestica mikroplastike. Kontrolni tretman nije sadržao ni jednu jedinku.

Primenjen je alkalni metod razaranja tkiva na sve 3 vrste. Dok se meko tkivo maločekinjastih crva i puževa razgradilo, većina hironomida ostala je intaktna. Uzorci *C. acutiventris* su ostali nesvareni nakon predloženog vremena inkubacije, zbog prisustva hitina. Za njegovu degradaciju, uzorci su dodatno tretirani dvostrukom zapreminom nitratne kiseline (HNO_3) u kontrolisanim uslovima– bočice sa uzorcima su stavljene u hladnu vodu sa ledom u digestoru. Pažljivo je mikropipetom dodato 3 mL HNO_3 . Polovina HNO_3 je korišćena za neutralizaciju rastvora, a polovina za stvaranje kalijum nitrata (KNO_3), koji je započeo trenutnu reakciju sa hitinom i rastvorio tkivo *C. acutiventris*.

Za proces filtracije korišćena je mlinarska svila promera pora 10 μm . Filtrirani materijal je tretiran 30 % vodonik-peroksidom po potrebi, u slučaju da je ostalo nedigestovanih delova tkiva. Čestice su fotografisane i kategorisane u 5 kategorija: fibrili, tvdra plastika, najlon, guma i nedifinisana plastika. Kategorije su podeljene na potkategorije na osnovu obojenosti čestica.

3.6.3.2. Izolovanje i identifikacija čestica mikroplastike iz tkiva azijske školjke *C. fluminea*

Metodologija uzorkovanja predstavljena u prethodnoj sekciji (3.6.3.1.) primenjena je i u istraživanjima prisustva mikroplastike u bioti, tokom ekspedicije JDS4 2019. godine. Studija je sprovedena na reci Dunav i njenim glavnim pritokama. Od 51 lokaliteta ukupno, na 23 lokaliteta je prikupljena vrsta *C. fluminea*, 15 lokaliteta na glavnom toku Dunava i 8 lokaliteta na pritokama (Hron, Tisa, Sava, Velika Morava, Iskar i Jantra) (Slika 23; Tabela 7).



Slika 23. Područje istraživanja. Ljubičaste tačke označavaju lokalitete duž Dunava i njegovih pritoka.

Po deset jedinki odabrano sa svakog od 23 lokaliteta. Na 3 lokaliteta broj uzorkovanih jedinki bio je manji od 10 (Niederalteich – Muhlau (JDS4-4) - 2/10 jedinki; Kamenica (JDS4-20) - 5/10 jedinki; Budimpešta uzvodno - Međeri most (JDS4-23)) 9/10 jedinki).

Tabela 7. Lista lokaliteta koji su korišćeni za analizu podataka u okviru JDS4 ekspedicije.

Kod lokaliteta	Naziv	Država	Geografska širina	Geografska dužna	Reka	Rkm*
JDS4-3	Uzvodno od Klösterl - Kelheim	DE	48,91761	11,865727	Dunav	2.415
JDS4-4	Niederalteich - Mühlau	DE	48,77453	13,00914	Dunav	2.258
JDS4-9	Klosterneuburg	AT	48,33012	16,32987	Dunav	1.942
JDS4-17	Vének	HU	47,736167	17,781583	Dunav	0,1
JDS4-20	Kamenica	SK	47,82608	18,72334	Hron	1,7
JDS4-22	Szob	HU/SK	47,8134	18,863233	Dunav	1.707
JDS4-23	Budimepšta uzvodno	HU	47,616033	19,101767	Dunav	1.660
JDS4-24	Budimepšta nizvodno	HU	47,3883	19,004083	Dunav	1.630
JDS4-27	Paks	HU	46,633733	18,880417	Dunav	1.532
JDS4-29	Hercegszanto / Batina / Bezdan	HU/HR/ RS	45,91455	18,805933	Dunav	1.434
JDS4-31	Ilok / Bačka Palanka	HR/RS	45,231583	19,3606	Dunav	1.300
JDS4-32	Tiszasziget / Martonoš	HU/RS	46,18552	20,10467	Tisa	163
JDS4-33	Ušće Tise	RS	45,147	15,692	Tisa	1
JDS4-35	Jamena	RS/BA	44,87828	19,08364	Sava	205
JDS4-36	Ušće Save	RS	44,793	20,396067	Sava	7
JDS4-37	Nizvodno od Pančeva	RS	44,814467	20,644433	Dunav	1.151

JDS4-38	Varvarin	RS	43,74	21,38	Velika Morava	154
JDS4-40	Banatska Palanka / Bazias	RS/RO	44,8051	21,3838	Dunav	1.073
JDS4-41	Uzvodno od Timoka (Rudujevac / Gruia)	RS/RO	44,260917	22,684983	Dunav	847
JDS4-44	Ušće Iskra	BG	43,7299	24,443817	Iskar	0,3
JDS4-45	Ušće Jantre	BG	43,637483	25,569867	Jantra	1
JDS4-47	Nizvodno od Ruse/Giurgi u (Marten)	BG/RO	43,91083	26,06696	Dunav	488
JDS4-48	Chiciu/Silistra	RO/BG	44,13693	27,05112	Dunav	375

* Rkm – rečni kilometar.

Dejonizovana voda korišćena za ispiranje jedinki filtrirana je kroz pore veličine 0,5 μm , 47 mm GF/B staklenih mikrovlakana (Whatman), da bi se eliminisalo potencijalno prisustvo čestica mikroplastike i kontaminacija iz vazduha. Procena kontaminacije vršena je pomoću „blanko“ filtera, gde je proces filtracije destilovanom vodom ponovljen 10 puta i 2 od tih 10 „blanko“ filtera su proverena na kontaminaciju mikroplastikom.

Za izolaciju čestica mikroplastike korišćeno je ukupno 216 jedinki *C. fluminea*. Morfometrijski parametri (širina i dužina) *C. fluminea* mereni su korišćenjem nonijusa. Ukupna masa je zabeležena na analitičkoj skali. Ljuštura školjki otvarana je nožem za disekciju i merena je telesna masa nakon uklanjanja ljušture, sa ciljem da se proceni potencijalni broj čestica mikroplastike po jedinki i po biomasi (g mokre mase tkiva). Meko tkivo svakog uzorka je ponovo isprano prethodno filtriranom dejonizovanom vodom.

Uzorci su obrađeni alkalnim protokolom (Li i sar., 2018) – tretman 10 % kalijum-hidroksidom (KOH) u vodenom kupatilu sa brzinom rotacije od 80 rpm pri temperaturi od 65 °C

u periodu od 12 h. Ova modifikacija originalnog protokola predložena je kao pogodna za konkretnu vrstu. Rastvor je filtriran kroz filtere od staklenih mikrovlakana veličine 0,5 μm . Svaki uzorak je čuvan u čistoj i sterilnoj staklenoj Petrijevoj posudi. Filtrirani materijal je lokalno tretiran 30 % vodonik-peroksidom da bi se uklonila preostala organska materija.

Čestice su svrstane u kategorije na osnovu broja izolvanih čestica po lokalitetu (S; M; H), veličine (S; M; L), oblika (fragmenti i fibrili) i boje detektovanih čestica (10). Minimalna veličina ispitivanih čestica iznosila je 20 μm . Čestice su klasifikovane u dve osnovne kategorije: fragmenti i fibrili.

3.7. Analiza podataka

3.7.1. Testovi toksičnosti u laboratorijskim uslovima

Prema smernicama OECD protokola (2004c; d), za hironomide je izračunata stopa izletanja (ER), vreme razvića (DT) i stopa razvića (DR). Razlike u biomasi, dužini tela i vremenu razvića potvrđene su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), a potom i Dunett-ovim *post hoc* testom, za preciznije potvrđivanje razlika između grupa (tretmana). Analiza morfometrijskih promena delova usnog aparata je sprovedena pomoću kanonijske analize varijanse (eng. *Canonical Variate Analysis* - CVA), dok su potencijalna razdvajanja jedinki u 2d prostoru potvrđena jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), zatim Dunett-ovim *post hoc* testom i multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA). Izvedene su na punom setu veličine i oblika promenljive, kako bi se vizuelizovala varijabilnost i geometrijsko morfometrijski podaci. Svi podaci su analizirani korišćenjem softvera Statistica (Stat Soft Inc. Verzija 7.0).

3.7.2. Analiza podataka u mikrokozmmama

Neparametrijsko višedimenzionalno skaliranje (NMDS) je korišćeno da bi se vizuelizovala svaka razlika u kvalitativnoj i kvantitativnoj strukturi zajednice makrobescičmenjaka. Da bi se testirao efekat mešavine mikroplastike na strukturu zajednice makrobescičmenjaka, primenjena je permutaciona multivarijantna analiza varijanse zasnovana na udaljenosti (PERMANOVA). Fiksni faktor za analizu bio je tretman (prirustvo mešavine mikroplastike u sedimentu). Sve analize su zasnovane na Bray-Curtis-ovom indeksu sličnosti prethodno transformisanih podataka (četvrti koren).

Da bi se istražilo da li tretman mikroplastikom utiče na sastav funkcionalne grupe za hranjenje unutar zajednice makrobescičmenjaka, korišćena je PERMANOVA analiza zasnovana na Bray-Curtis-ovom indeksu sličnosti.

3.7.3. Analiza podataka u mezokozmama

Da bi se izmerila veličina krila za svaku grupu odabranih orijentira, izračunata je veličina centroida (CS). Proračun superimpozicije CS i Prokrust-ova analiza su izvršeni u softveru MorphoJ (Klingenberg, 2011). Da bi se vizuelizovali rezultati geometrijske morfometrije, sprovedena je kanonska analiza varijanse (CVA). Varijacija u veličini je statistički testirana jednofaktorskom ANOVA-om na CS i varijacija u obliku multivarijantnom analizom varijanse, primenjena je MANOVA na Prokrust-ovim koordinatama, korišćenjem softvera Statistica 7.0.

3.7.4. Analiza podataka pasivnog monitoringa (JDS4)

Morfometrijski parametri jedinki, čestica po organizmu i po g^{-1} telesne mase statistički su opisani sa prosečnom vrednošću i standardnom devijacijom (SD). Odnos između metrike zasnovane na morfometriji (dužina, visina, ukupna masa i masa tela) i količine izolovanih MP je dobijen korišćenjem neparametarskog Spearman-ovog testa korelacije ranga.

3.8. Furijeova transformišuća infracrvena spektroskopija (FTIR)

Analiza hemijskog porekla izolovanih čestica iz tkiva odabranog model organizma *C. fluminea* u slivu Dunava vršena je Furijeovom transformišućom ultracrvenom spektroskopijom na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu. OMNIC Spectra software (Thermo Scientific™ OMNIC™ Picta Software) korišćen je za poređenje uzoraka sa bazama standarda: HR Nicolet Sampler Library i Hummel Polymer Sample Library.

Furijeova transformišuća infracrvena spektroskopija je jedan od najpouzanimijih metoda za određivanje hemijskog sastava i porekla čestica (Hidalgo-Ruz i sar., 2012). Važnost korišćenja pouzdane metode identifikacije ilustruju Eriksen i sar. (2013), koji su proučavali elementarni sastav čestica koje su vizuelno identifikovane kao mikroplastika. Otkrili su da su mnoge čestice

koje su prvobitno identifikovane kao plastika zapravo aluminijum silikati i da su one u nekim uzorcima činile 20 % frakcije čestica veličine 0,355-1 mm.

Kako bi se utvrdilo hemijsko poreklo izolovanog mikrootpada, za FTIR spektroskopijsku analizu odabrano je 46 čestica iz tkiva školjki i pripremljeno za microFTIR. Vlakna su isključena iz FTIR analize iz tehničkih razloga. Odabrane su najmanje po 3, najveće, čestice fragmenta iz 14 uzoraka, tako da u analizu budu uključeni lokaliteti sa najvećim brojem detektovanih čestica mikroplastike, ali i da postoji kontinuitet u anlizi duž toka Dunava. Ukupno je analizirano 46 fragmenata MP. Infracrvena merenja su izvršena korišćenjem Nicolet iN10 Furijeove transformacije infracrvenog mikroskopa sa mikro oslabljenom totalnom refleksijom (ATR) i MCT detektorom hlađenim tečnim azotom u ATR režimu, korišćenjem 128 skeniranja pri rezoluciji od 4 cm^{-1} .

4. REZULTATI

4.1. Rezultati analize biomarkera bioloških testova

4.1.1. Razviće larvi

Izlaganje mešavini 8 polimera mikroplastike (Tabela 3) imalo je za rezultat povećanje biomase i dužine tela (Tabela 8). Razlike u biomasi (ANOVA, $p < 0,05$; $F = 2,97$) i dužini tela (ANOVA, $p < 0,05$; $F = 4,84$) nakon izlaganja mikropastici bile su statistički značajne. Prosečna telesna masa pokazala je statistički značajno povećanje u tretmanu LC (Dunnettov test, $p < 0,05$), dok se prosečna dužina tela značajno povećala i u LC i HC tretmanima (Dunnettov test, $p < 0,05$). Nije bilo statistički značajne razlike u mortalitetu larvi (Tabela 9). Vreme razvića *C. riparius* (od larve prvog stupnja do adulta) se statistički značajno razlikovalo nakon izloženosti mikropastici (ANOVA, $p < 0,05$; $F = 4,84$). U oba tretmana vreme razvića hironomida značajno je produženo (Dunnettov test, $p < 0,05$) (Tabela 9; Slika 24).

Tabela 8. Prosečne vrednosti mokre telesne mase (BM) i dužine tela (BL) larvi četvrtog stupnja u kontroli i tretmanima: LC- niska koncentracija mešavine mikroplastike, HC- visoka koncentracija mešavine mikroplastke.

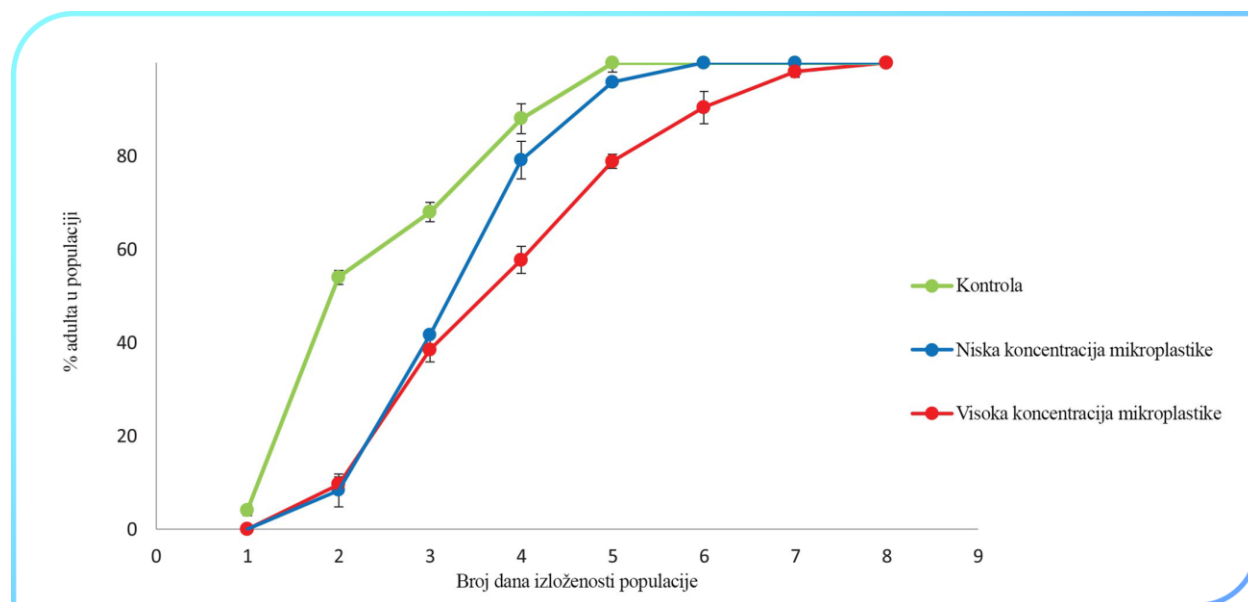
Koncentracija mešavine mikroplastike (mg kg ⁻¹)	0 (Kontrola)	LC	HC
BM (mg) ± SD	5,7 ± 0,5	6,8 ± 0,7*	6,5 ± 0,1
BL (mm) ± SD	10 ± 1,4	10 ± 1,3*	11 ± 1,5*

* Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$).

Tabela 9. Standardni životni parametri (parametri životnog ciklusa): Stopa preživljavanja (ER) - % izletelih jedinki na kraju eksperimenta; stopa mortaliteta (M) - % uginulih jedinki na kraju eksperimenta; vreme razvića (DT) – broj dana od početka eksperimenta (larve prvog stupnja) do izletanja (adulti); stopa razvića (DR) - prosečan % izletelih jedinki po danu.

Koncentracija mešavine mikroplastike (mg kg ⁻¹)	0 (Kontrola)	LC	HC
ER ± SD (%)	83,3 ± 12,5	80 ± 17,3	86,6 ± 15,2
M ± SD (%)	16,6 ± 12,5	20 ± 17,3	13,3 ± 15,2
DT ± SD (dan)	13,8 ± 0,5	14,3 ± 0,6*	15,2 ± 0,5*
DR ± SD (% izletelih jedinki/dan)	7 ± 0,3	7 ± 0,3	7 ± 0,2

* Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (p < 0,05).

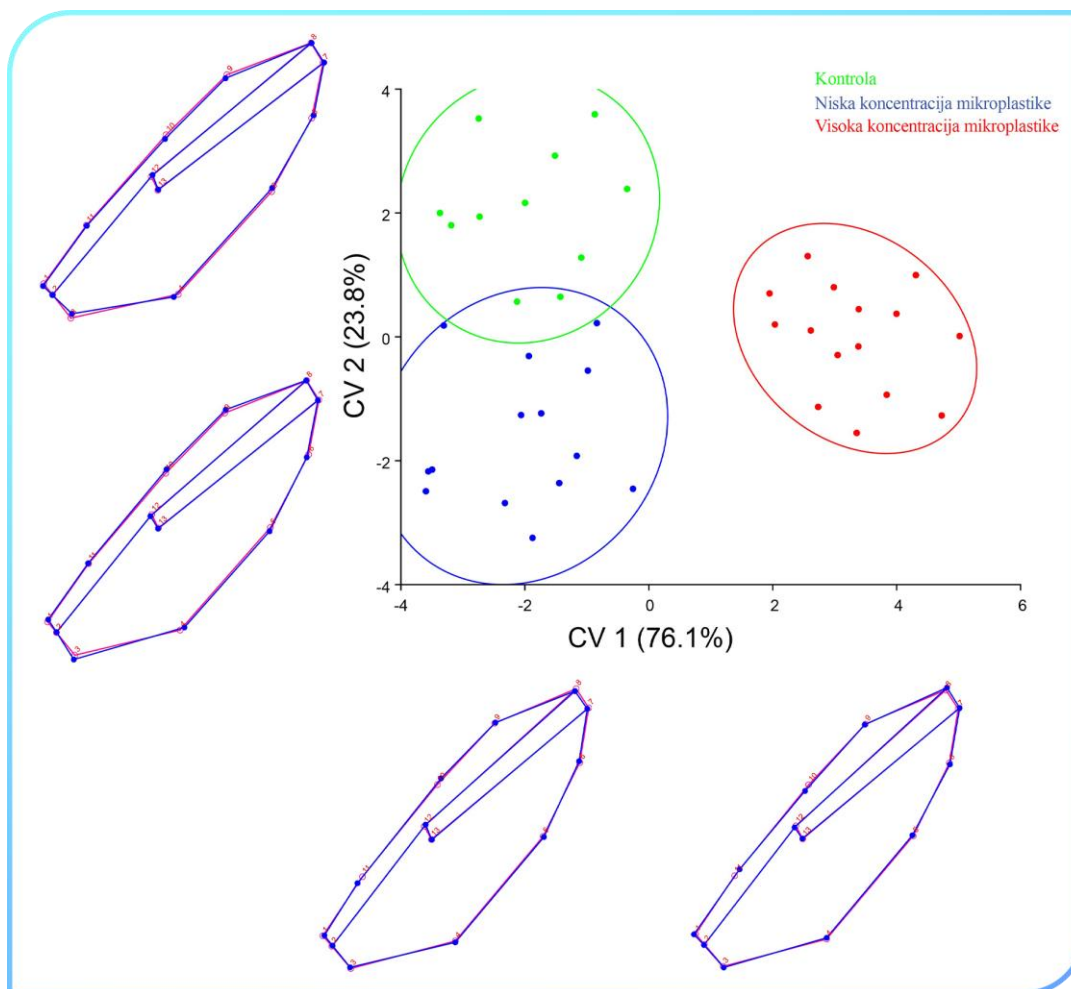


Slika 24. Vreme razvića larvi *Chironomus riparius* izloženih mikroplastici.

4. 1.2. Analiza geometrijske morfometrije

4. 1.2. 1. Morfometrijske promene na krilima

Statistička analiza desnih krila ženki pokazala je značajne promene u obliku i veličini krila u tretmanima, dok promene nisu detektovane na desnim krilima mužjaka. Analiza varijanse je pokazala statistički značajne promene u veličini krila ženki (ANOVA, $p < 0,01$; $F = 7,29$). Multivarijantna analiza varijanse pokazala statistički značajne razlike u obliku krila ženki (MANOVA, $p < 0,01$; Wilks' $\lambda = 0,03$; $F = 3,03$). U dvodimenzionalnom morfoprostoru koga formiraju dve kanonijske varijable (eng. *Canonical Variables - CV*): CV1 (faktor skale 12) i CV2 (faktor skale 8) ose primećena je diferencijacija tretmana visoke koncentracije u odnosu na kontrolu i tretman niske koncentracije (Slika 25). Morfometrijska geometrijska analiza pokazala je tendenciju širenja krila u prisustvu mikroplastike, odnosno u tretmanima.

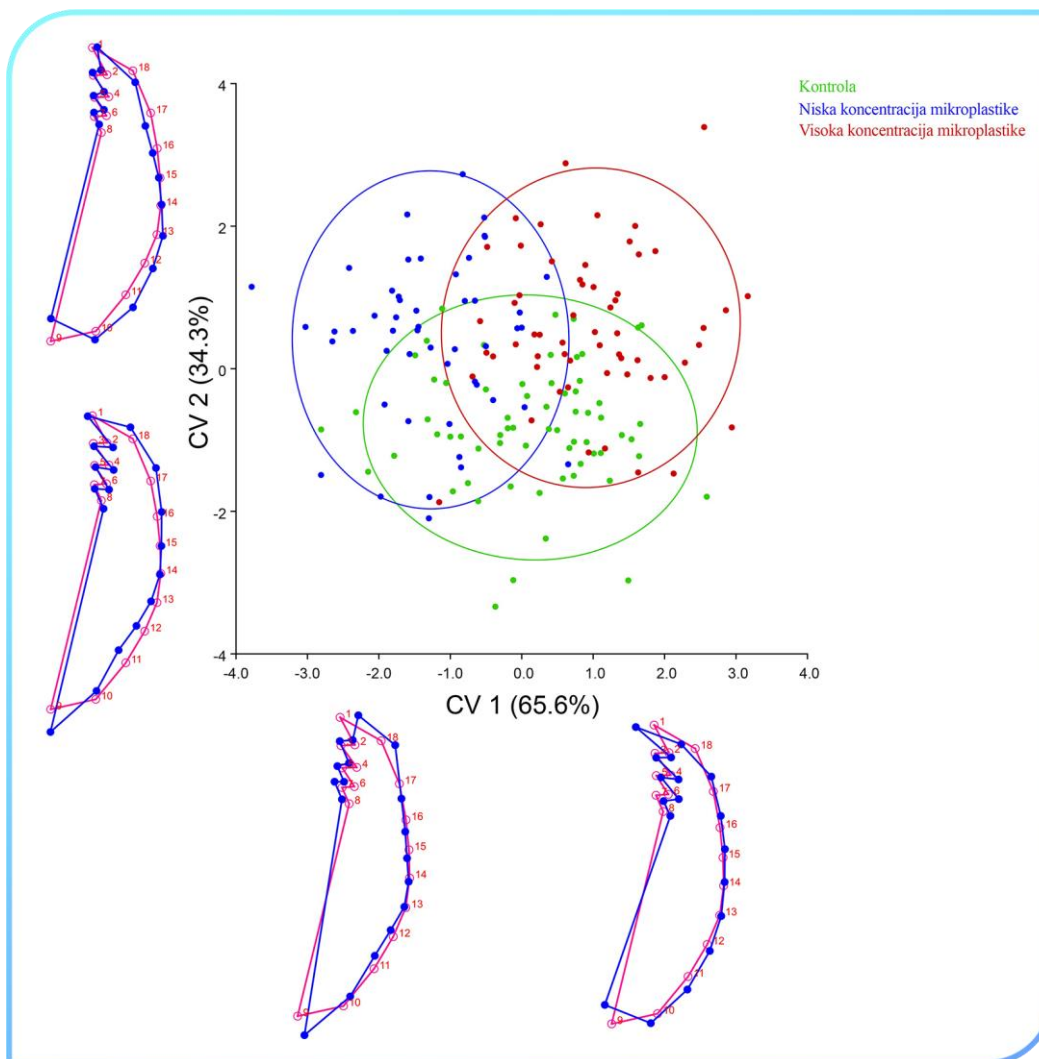


Slika 25. CVA koja pokazuje CV 1 u odnosu na CV 2 sa elipsama jednake veličine. Specifični digitalizovani orijentiri od 1 do 13 opisuju konture krila; svetlo roze linije predstavljaju početni oblik krila; plave linije predstavljaju varijacije oblika krila u datom kvadrantu u morfoprostoru.

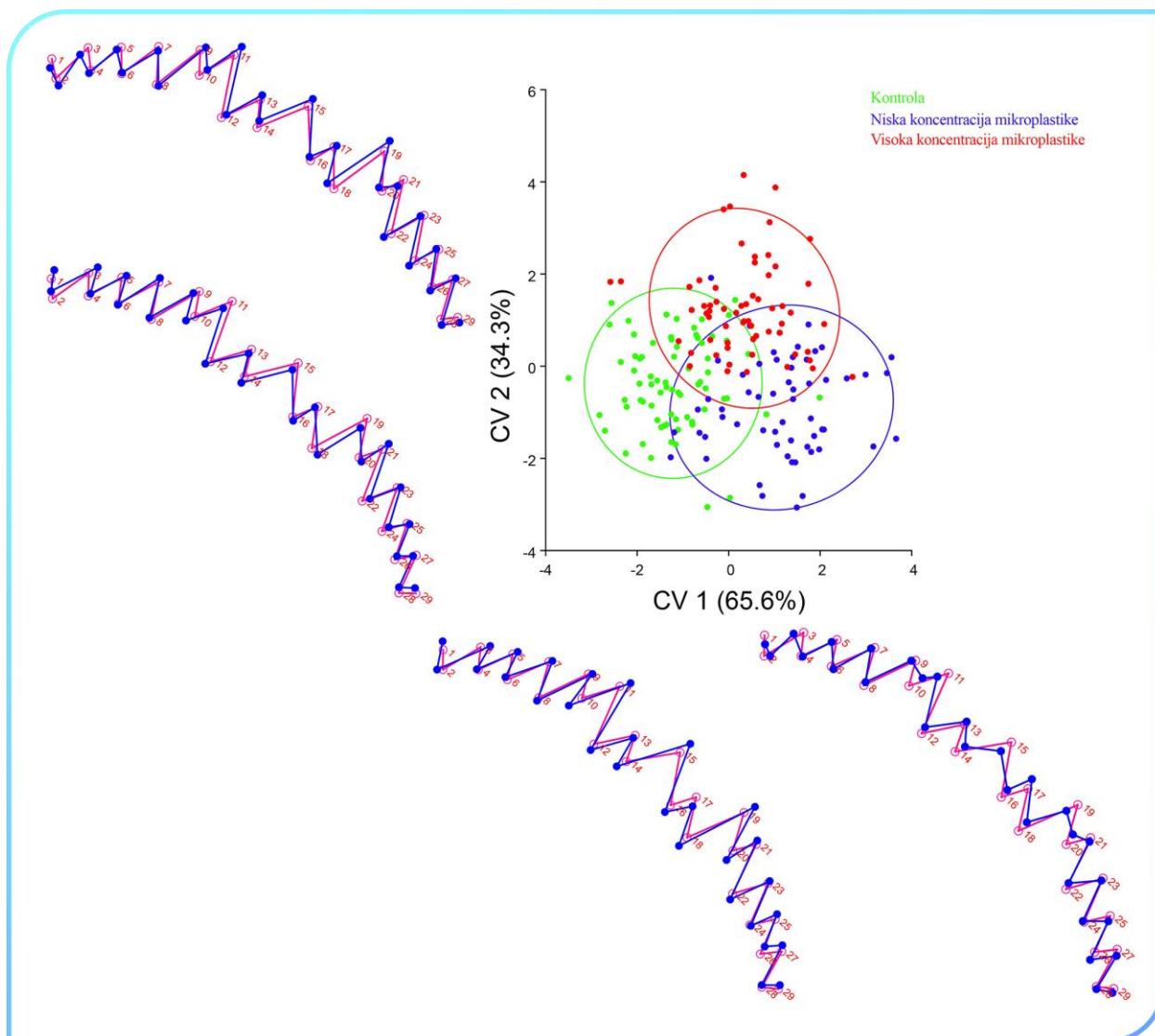
4.2.1.2. Promene na morfološkim strukturama usnog aparata larvi

Analiza mentuma je od ukupno 197 struktura obuhvatila 191, s obzirom da je 6 larvenih čaura bilo oštećeno u predelu mentuma. Ukupno 173 para mandibula je analizirano, dok je 24 para bilo isključeno, uglavnom zbog slučajnog oštećenja leve, desne ili para mandibula tokom pripreme.

Analizom usnog aparata vrste *C. riparius* uočene su statistički značajne promene u obliku i veličini mandibula i mentuma nakon izlaganja mikroplastici. Varijabilnost u veličini mandibula bila je statistički značajna (jednofaktorska ANOVA, $p < 0,01$; $F = 22,2$), kao i promene u obliku (MANOVA, $p < 0,01$; Wilks' $\lambda = 0,37$; $F = 2,4$). U tretmanima LC i HC, gornji (vršni) deo mandibula pokazao je tendenciju širenja, kao i sklonost ka izduženju apikalnog zuba (Slika 26). I kod analize veličine mentuma (ANOVA, $p \ll 0,01$; $F = 11,6$) i oblika (MANOVA, $p \ll 0,01$; Wilks' $\lambda = 0,27$; $F = 2,06$) uočene su značajne razlike između tretmana. U CVA morfoprostoru (faktor skale 8 za mandibule; faktor skale 8 za osu CV1 i 12 za osu CV2 za mentume), kod mandibula i kod mentuma primetno je delimično razdvajanje kontrole od tretmana sa niskom koncentracijom mikroplastike, kao i značajno izdvajanje analiziranih jedinki iz tretmana visoke koncentracije u odnosu na prethodna dva. Analiza je pokazala tendenciju skraćivanja srednjeg zuba mentuma i unutrašnjih bočnih zuba prilikom izlaganja mikroplastici (Slika 27).



Slika 26. CVA analiza koja pokazuje varijacije u obliku i veličini mandibula nakon izlaganja larvi *C. riparius* mešavini mikroplastike, posmatrano pomoću linijskih grafika sa 18 digitalizovanih orijentira. Deformiteti su predstavljeni plavim linijama; svetloružičaste linije predstavljaju početni oblik mandibula.

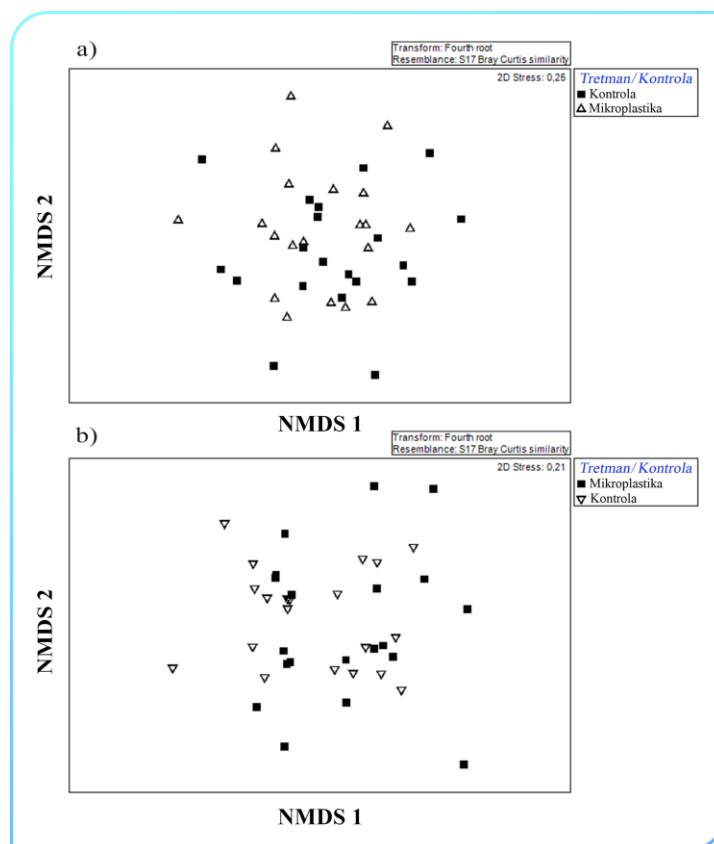


Slika 27. CVA analiza varijacije mentuma definisana sa 29 specifičnih orijentira koji opisuju njegov oblik i veličinu (svetlo ružičaste linije žičanih grafikona predstavljaju prosečan oblik mentuma u svim tretmanima; plave linije predstavljaju rezultat deformacije primeraka u datom delu morfoprostora).

4.3. Rezultati *in-situ* istraživanja u mikrokozmmama barskih ekosistemima

Svih 40 ponovaka je uspešno prikupljeno i analizirano. U svim uzorcima je ukupno identifikovano 22 taksona markobeskičmenjaka (17 taksona u kontroli i 18 taksona u tretmanu), sa ukupnom brojnošću od 415 i 504 jedinki, respektivno. Ukupno 12 taksona su bila zajednička za kontrolu i tretman. U tretiranoj zajednici identifikovano je 8 vrsta familije Chironomidae, 6 vrsta Gastropoda, 2 vrste familije Ceratopogonidae i po jedna vrsta Bivalvia i Hirudinea, dok je u kontroli identifikovano 7 vrsta familije Chironomidae, 6 vrsta Gastropoda i po jedna vrsta Bivalvia, Hirudinea, Oligochaeta i Ceratopogonidae. Sve vrste mekušaca bile su zastupljene u kontroli i tretmanu. Od ukupno 11 vrsta familije Chironomidae, 5 vrsta su bile zajedničke kontroli i tretmanu, dok su ostale bile zastupljene samo u jednom od njih. Najdominantnija grupa u eksperimentalnim ponovcima bio je red Diptera, Insecta, sa izuzetno velikom brojnošću jedinki vrsta iz porodice Chironomidae. Dominantna vrsta u kontroli i tretmanu sa mikroplastikom bila je *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758), sa procentualnim učešćem od 28,7 % i 34,7 % u zajednicama, respektivno. Druga po dominantnosti bila je klasa Gastropoda, u okviru koje je vrsta *Planorbis sp.* bila eudominantna, čineći 20 % i 16 % ukupnog uzorka, respektivno. Učestalost vrsta *C. plumosus* i *Planorbis sp.* je eukonstantna u svim ponovcima, dok se vrsta *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) izdvaja kao eukonstantna u kontroli, a vrsta *Acroloxus lacustris* (Linnaeus, 1758) u tretmanu. Od funkcionalnih grupa ishrane, najdominantniji su bili strugači i kolektori.

Obrazac distribucije uzoraka na osnovu sličnosti strukture zajednice bentosnih makrobekičmenjaka na NMDS grafikonu nije otkrio značajne razlike u pogledu strukture zajednice predstavljene brojnošću taksona i biomasom (Slika 28). Pored toga, rezultati PERMANOVE nisu pokazali značajne razlike u strukturi zajednice između kontrole i tretmana ($F= 0,993$, $p= 0,456$ i $F= 0,344$, $p= 0,797$, respektivno).



Slika 28. Prikaz neparametrijskih višedimenzionalnih dijagrama skaliranja. Na grafikonu se može videti obrazac distribucije lokacija za uzorkovanje u smislu strukture zajednice, predstavljene (A) brojnošću taksona i (B) biomasom.

Tretman mikroplastikom nije uticao na abundancu i biomasu funkcionalnih grupa ishrane unutar zajednice makrobeskičmenjaka ($F = 1,810$, $p = 0,137$ i $F = 0,377$, $p = 0,736$, respektivno). Nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe u odnosu na: bogatstvo vrsta (S), brojnost vrsta (N), biomasu (B), Šenonov indeks različitosti (H) i Simpsonov indeks različitosti (D; Tabela 10). Vrednost indeksa kvantitativne sličnosti Czekanowski iznosio je 0,84, što ukazuje da je 84 % zajednice tretmana i kontrole bilo slično, dok se 16 % zajednice razlikovalo. Jaccard-ov i Sorensen-ov indeks kvalitativne sličnosti imali su vrednosti od 0,66 i 0,80, respektivno, što ukazuje da je indeks sličnosti po Jaccard-u detektovao manje sličnosti u

kvalitativnim sastavu vrsta između kontrolne i tretirane grupe (Tabela 10). Zastupljenost svake FFG i biomasa izračunate su za svaku pojedinačnu mikrokozmu (Tabela 11).

Tabela 10. Razlike u strukturi zajednice bentosnih makrobeskičmenjaka izloženih mikroplastici.

Parametar	Tretman (srednja vrednost ± SE)	Kontrola (srednja vrednost ± SE)	Ukupna vrednost
S	7 ± 1,86	6,65 ± 1,22	
N	7 ± 1,86	20,75 ± 6,86	
B	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	
H	1,64 ± 0,28	1,66 ± 0,17	
D	0,78 ± 0,10	0,81 ± 0,04	
Sj			0,66
Ss			0,80
Sc			0,84

SE = standardna greška; S = bogatstvo vrsta; N = brojnost vrsta; B = biomasa; H = Šenon-ov indeks različitosti; D = Simpson-ov indeks različitosti; Sj = Jaccard-ov indeks sličnosti; Ss = Sørensen–Dice kvantitativni indeks sličnosti; Sc = Kvantitativni indeks sličnosti Czekanowski

Tabela 11. Kompozicija funkcionalnih grupa ishrane (FFG) detektovanih vrsta u eksperimentu. Dominantnost (D) i učestalost (C) svakog predstavnika makrobeskičmenjaka u kontroli i tretmanu. EC – eukonstantna; C – konstantna; AC – povremena; AD – slučajna; E– eudominantna; D– dominantna; S – subdominantna; R – recedentna; SR – subrecedentna; scr- strugači; c-g – kolektori, c-f – filtratorni kolektori, prd – predatori.

			Tretman	Kontrola	Tretman	Kontrola
FFG			Dominantnost (D)		Učestalost (C)	
Gastropoda						
<i>Acroloxus</i>	<i>lacustris</i>	<i>gra/scr</i>	E	E	EC	C
(Linnaeus, 1758)						
<i>Bithynia</i>	<i>tentaculata</i>	<i>gra/scr</i>	D	D	C	C
(Linnaeus, 1758)						
<i>Lithoglyphus</i>	<i>naticoides</i>	<i>c-g</i>	R	R	AD	AD
(C. Pfeiffer, 1828)						
<i>Physella</i>	<i>acuta</i>	<i>gra/scr</i>	E	E	C	EC
(Draparnaud, 1805)						
<i>Radix peregra</i>	(Müller,	<i>gra/scr</i>	R	S	AC	AC
1774)						
<i>Planorbis</i> sp.		<i>gra/scr</i>	E	E	EC	EC
Bivalvia						
<i>Pisidium</i> sp.		<i>c-f</i>	S	S	AC	AC
<i>Oligochaeta</i>						
<i>Haplotaxis</i>	<i>gordioides</i>	<i>c-g</i>	-	SR	-	AD
(Hartmann, 1821)						
Hirudinea						
<i>Helobdella</i>	<i>stagnalis</i>	<i>prd</i>	S	S	AC	AD
(Linnaeus, 1758)						
Ceratopogonidae						
<i>Culicoides</i>	<i>simulator</i>	<i>prd</i>	S	S	AC	AD
Edwards, 1939						

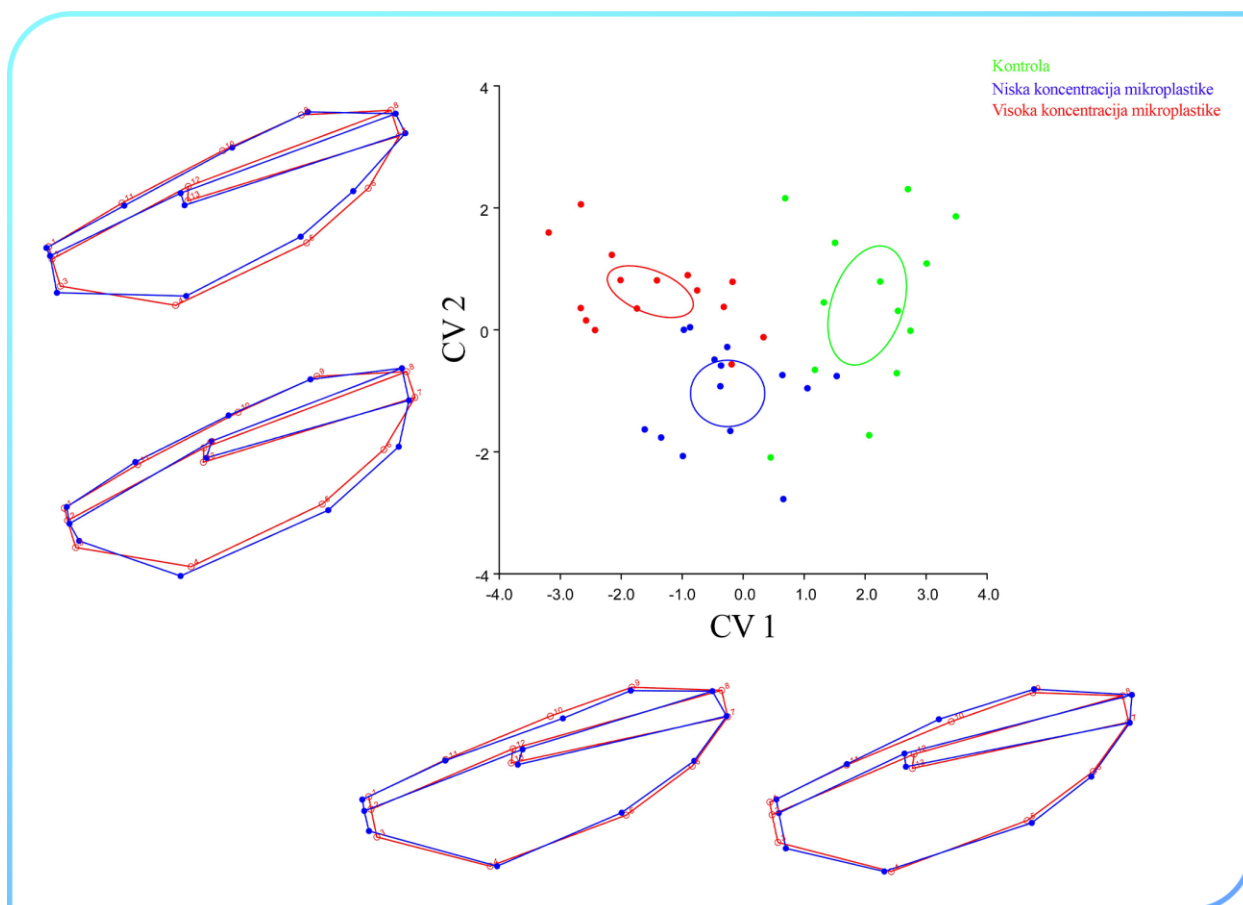
<i>Ceratopogon</i> sp.	<i>prd</i>	S	-	AD	-
Chironomidae					
<i>Chironomus plumosus</i> agg	<i>c-g</i>	E	E	EC	EC
<i>Chironomus riparius</i>	<i>c-g</i>	-	SR	-	AD
Meigen, 1804					
<i>Chironomus tentans</i>	<i>c-g</i>	SR	SR	AD	AD
Fabricius, 1805					
<i>Chironomus vallenduuki</i>	<i>c-g</i>	SR	SR	AD	AD
Ashe & O'Connor 2015					
<i>Chironomus</i> sp.	<i>c-g</i>	SR	-	AD	-
<i>Dicrotendipes lobiger</i>	<i>c-g</i>	-	SR	-	AD
(Kieffer, 1921)					
<i>Endochironomus gr.dispar</i>	<i>c-g</i>	SR	SR	AD	AD
<i>Procladius</i> sp.	<i>prd</i>	SR	-	AD	-
<i>Psectrocladius</i> sp.	<i>c-g</i>	SR	-	AD	-

4.2. Rezultati in-situ istraživanja u mezokozmama veštačkog jezerskog ekosistema

4.2.1. Uticaj mešavine polimera mikroplastike na hironomide

Nakon 3 meseca izloženosti mešavini mikroplastike veličina (ANOVA, $F_5 = 3,22$, $p = 0,01$) i oblik krila (MANOVA, Wilks' $\lambda = 0,004$; $F_{110} = 4,89$; $p = 0,001$) razlikovali su se između mužjaka i ženki vrste *C. riparius*. Regresiona analiza nije pokazala značajan efekat alometrije ni kod ženki (samo 4,9 % promena u obliku krila je bilo pod uticajem veličine krila, $p = 0,073$) ni kod mužjaka (samo 2,4 %, $p = 0,44$). Veličina i oblik krila ženke *C. riparius* i oblik krila mužjaka iste vrste nisu se značajno razlikovali među tretmanima (ANOVA ženke, $F_2 = 0,44$, $p = 0,65$; MANOVA ženke, Wilks' $\lambda = 0,190$; $F_{110} = 1,05$; $p = 0,434$; MANOVA mužjaci, Wilks' $\lambda =$

0,131; $F_{110} = 1,52$; $p = 0,095$), dok je veličina krila mužjaka varirala u tretmanima (veličina krila: ANOVA, $F_2 = 6,66$, $p = 0,03$). Individue iz kontrolne grupe i tretmana sa niskim i visokim koncentracijama mikroplastike su jasno razdvojene duž prve dve CV ose (koji čine 65,5 % i 34,5 % ukupne varijabilnosti, respektivno; Slika 29).



Slika 29. Kanonska analiza varijanse (CVA) oblika krila kod mužjaka *C. riparius*. Dijagrami duž obe ose ilustruju promene oblika krila od uobičajenog osnovnog oblika (plave linije) do oblika karakterističnog za dati kvadrant u morfoprostoru (crvene linije). Digitalizovani orijentiri (brojevi 1–13, tačke na konturama krila) opisuju konturu krila. Elipse predstavljaju 90 % intervala poverenja za svaki tretman.

Primetna je tendencija proširenja krila mužjaka u tretmanima, sa najistaknutijim promenama u tačkama 1, 4 i 10. Mahalanobisova distanca se značajno razlikovala između svih grupa, sa najvećim rastojanjem između onih iz kontrola i visokim koncentracijama mešavine čestica mikroplastike (Tabela 12).

Tabela 12. CVA analiza oblika desnih krila adulta mužjaka *C. riparius* iz različitih tretmana mikroplastike. Podaci iznad dijagonale = Mahalanobisove distance između grupe; podaci ispod dijagonale = p-vrednosti dobijene testom permutacije (n = 10000 permutacije) Mahalanobisovih distanci.

		Mahalanobisove distance		
Tretmani		Kontrola	Niska koncentracija	Visoka koncentracija
p- vrednosti	Kontrola	-	3,264	3,507
	Niska koncentracija	<0,0001*	-	2,706
	Visoka koncentracija	<0,0001*	<0,0001*	-

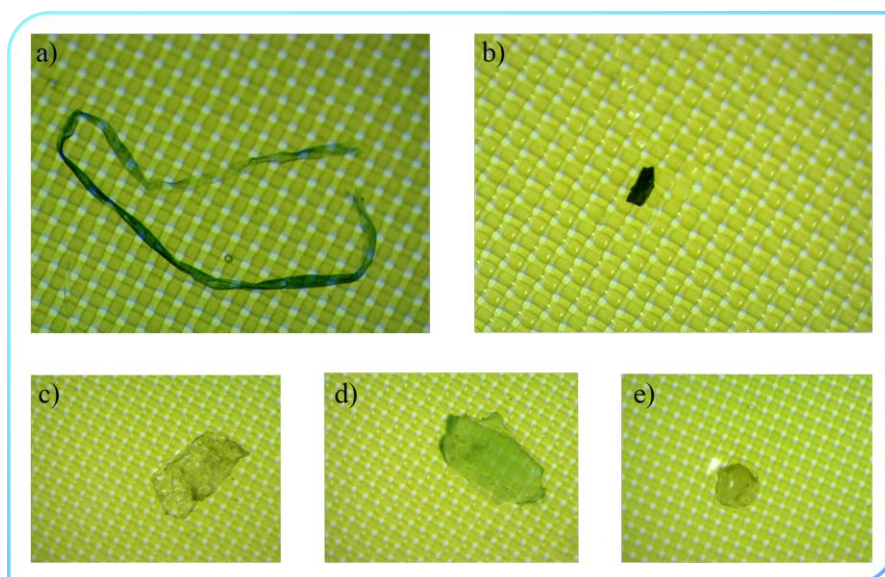
* statistički značajne razlike, $p < 0,05$.

4.3. Rezultati pasivnog monitoringa Dunava

4.3.1. Zajedničko istraživanje Dunava 3

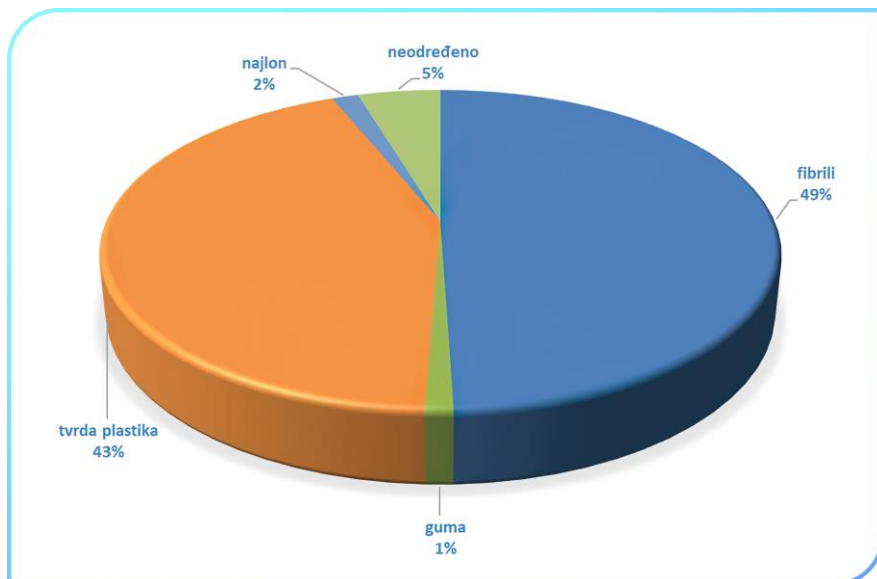
U okviru JDS3 ekspedicije, najdiverzitetnije taksonomske grupe bile su Chironomidae (Diptera), Oligochaeta i Mollusca (ICPDR, 2014). Sve čestice u uzorcima kategorizovane su na osnovu porekla i svrstane u jednu od 5 glavnih kategorija: fibrili, tvrda plastika, najlon, guma i neodređeno (Slika 30).

Ukupno 877 čestica mikroplastike je izolovano iz organizama, gde je većinski deo čestica pronađen u uzorcima *L. hoffmeisteri* (61,6 %), potom *L. naticoides* (21,8 %), a najmanji u *C. acutiventris* (16,6 %). U proseku, $4,64 \pm 1,59$; $1,64 \pm 0,46$ i $1,24 \pm 0,34$ čestica/organizmu ili $0,000421 \pm 0,000409$; $0,009661 \pm 0,005247$ i $0,001465 \pm 0,000598$ čestica/g mokre mase izolovano je iz *L. hoffmeisteri*, *L. naticoides* and *C. acutiventris*, respektivno.



Slika 30. Fotografije izolovanih čestica mikroplastike po kategorijama: a) fibril; b) tvrda plastika; c) najlon; d) guma; e) neodređeno.

Fibrili su predstavljali dominantnu kategoriju mikroplastike sa 49,48 %, dok je druga kategorija po kvantitetu bila tvrda plastika sa 43,21 % ukupnog broja čestica (Slika 31).



Slika 31. Glavne kategorije čestica mikroplastike sa procentualnim udelom u celokupnom uzorku.

Veličina čestica određena je merenjem dužine čestice. Dužina čestica fibrila kretala se u rasponu od 0,19 do 4,87 mm, dok su čestice tvrde plastike imale raspon dužina od 0,046 do 0,23 mm (Tabela 13).

Tabela 13. Procentualni udeo i dužina čestica svih potkategorija mikroplastike u uzorcima.

Potkategorija	Broj čestica	Procentualni udeo [%]	Minimalna dužina [mm]	Maksimalna dužina [mm]	Prosečna dužina [mm] ± SD*
plavi fibrili	349	39,79	1,97	4,8	2,62 ± 0,55
crveni fibrili	85	9,69	0,19	4,87	1,35 ± 0,65
crvena guma	5	0,57	0,096	0,026	0,066 ± 0,025
zelena guma	3	0,34	0,085	0,11	0,097 ± 0,012
bela guma	2	0,23	0,058	0,14	0,099 ± 0,041
crna tvrda plastika	79	9	0,05	0,16	0,083 ± 0,03
plava tvrda plastika	64	7,29	0,07	0,199	0,119 ± 0,085
bela tvrda plastika	54	6,16	0,064	0,23	0,152 ± 0,122
siva tvrda plastika	12	1,37	0,052	0,077	0,065 ± 0,008
braon tvrda plastika	39	4,45	0,1	0,21	0,144 ± 0,037
krstalna tvrda plastika	33	3,76	0,046	0,11	0,084 ± 0,019
transparentna tvrda plastika	98	11,18	0,046	0,086	0,067 ± 0,013
Beli najlon	3	0,34	0,11	0,15	0,127 ± 0,017
Transparentni najlon	10	1,15	0,055	0,89	0,225 ± 0,239
neodređeno	41	4,68	0,059	0,14	0,106 ± 0,019

* SD – standardna devijacija.

4.3.2. Zajedničko istraživanje Dunava 4

Većina analiziranih jedinki *C. fluminea* bila je srednje veličine, dužine $14,23 \pm 3,78$ mm (srednja vrednost \pm SD) i širine $15,81 \pm 3,89$ mm. Prosečne vrednosti ukupne mase i telesne mokre mase bile su $1,80 \pm 0,97$ g i $0,34 \pm 0,21$ g. Čestice mikroplastike su otkrivene u svim uzorcima *C. fluminea*, prosečno $5,59 \pm 3,71$ fibrila i $4,37 \pm 2,46$ fragmenata po organizmu; ili $40,77 \pm 73,75$ fibrila i $25,84 \pm 33,17$ fragmenata po g telesne mase, ukupno 1.998 čestica. Dominantne su bile čestice mikroplastike srednje veličine, sa prosečnom dužinom od $0,43$ mm \pm $0,26$ u Dunavu i $0,49$ mm \pm $0,26$ u pritokama (Tabela 14). Fibrili plave boje bili su dominantni među detektovanim česticama vlakana (81 %), dok su prozirni fragmenti mikroplastike bili najzastupljeniji među tvrdim česticama (42,8 %).

Tabela 14. Kategorizacija izolovanih čestica mikroplastike iz uzoraka sa (a) Dunava i (b) njegovih pritoka.

a)

	Male	Srednje	Velike
Raspon veličine [mm]	< 100 μ m	100 μ m-1mm	> 1 mm
Broj čestica	156	1.107	216
%	10,54767	74,84787	14,60446

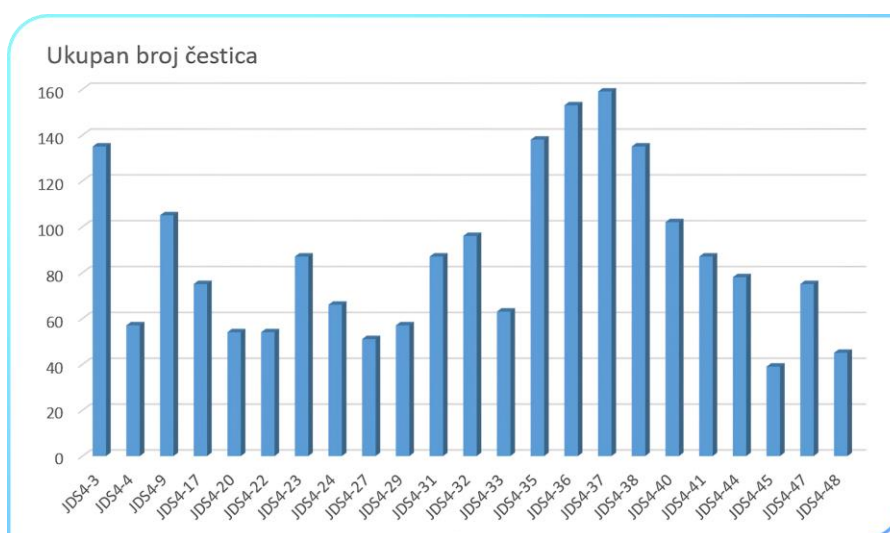
b)

	Male	Srednje	Velike
Raspon veličine [mm]	< 100 μ m	100 μ m-1mm	> 1 mm
Broj čestica	108	546	156
%	13,33	67,41	19,26

Čestice mikroplastike su detektovane u svim uzorcima *C. fluminea*, od 1,3 do 5,3 fragmenata/individui po lokalitetu. Ovo isključuje rezultate uzorka JDS4-4 (veličina uzorka < 5), gde je u proseku bilo 9,5 čestica po jedinki. U „praznim“ filterima (proces filtriranja ponovljen sa

destilovanom vodom) identifikovano je u proseku 5 vlakana, što ukazuje na kontaminaciju iz vazduha. Korelacija između morfometrijskih parametara i količine izolovanih čestica mikroplastike nije bila značajna (Spearmanov test korelacije ranga; $p > 0,05$).

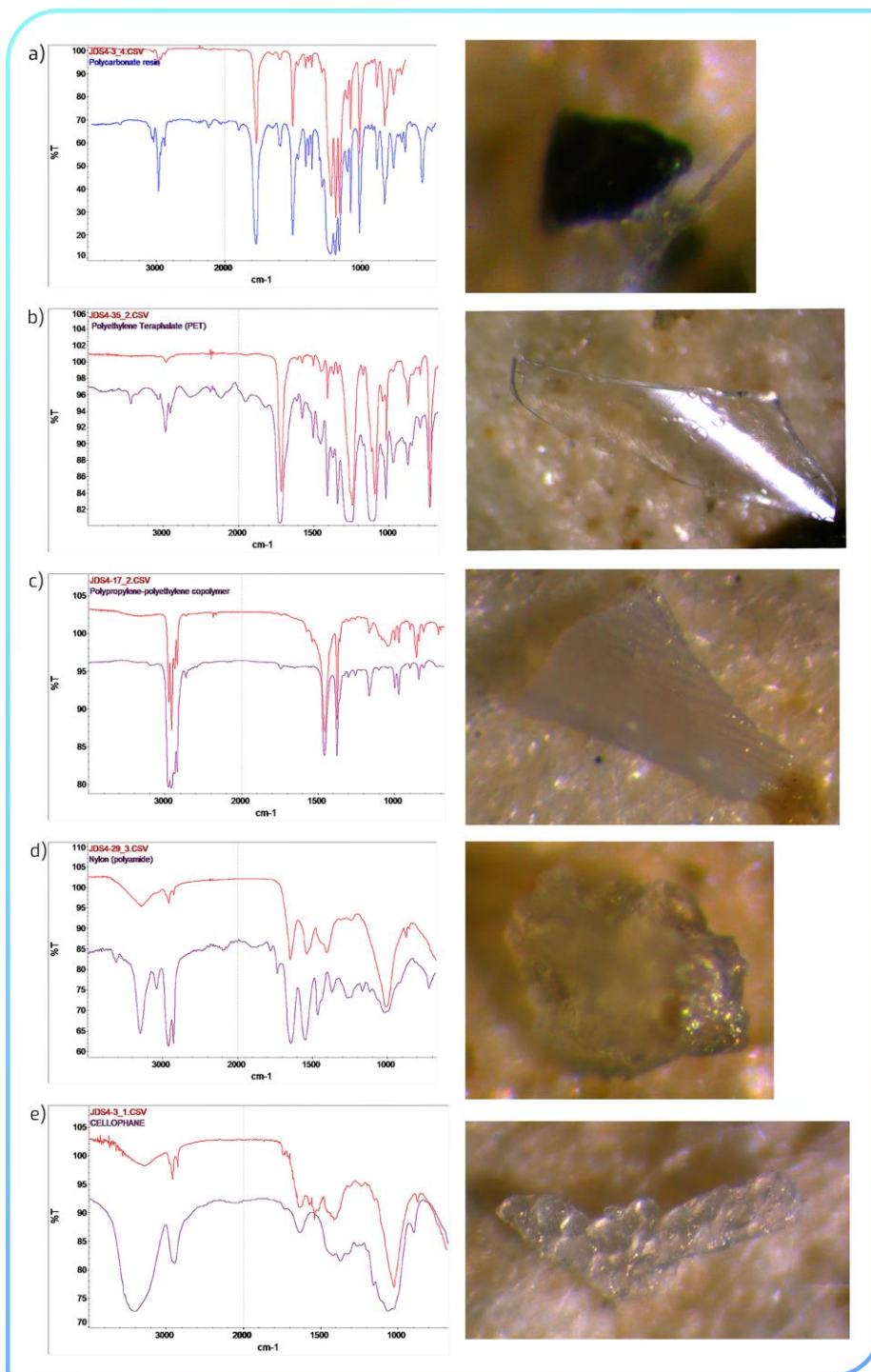
Rezultati pokazuju veće prisustvo čestica mikroplastike u jedinkama na lokacijama JDS4-23 (Budimpešta uzvodno), JDS4-24 (Budimpešta nizvodno), JDS4-40 (Banatska Palanka) i JDS4-41 (uzvodno od ušća Timoka, Radujevac) u Dunavu, kao i na pritokama: JDS4-35, JDS4-36 (Sava), JDS4-38 (Velika Morava), JDS4-44 (Iskar) (Slika 32).



Slika 32. Grafički prikaz ukupnog broja čestica mikroplastike po lokalitetima.

4.4. Rezultati analize Furijeove transformišuće infracrvene spektroskopije (FTIR)

Od 46 čestica sa 14 odabranih lokaliteta, za 40 je potvrđeno da su plastični polimeri (87 %) pomoću microFTIR spektroskopije. Analizirane čestice su detektovane kao polikarbonati (PC), polietilen tereftalat (PET), kopolimer polipropilen-polietilen, najlon (poliamid) i celofan (Slika 33, Tabela 15).



Slika 33. Rezultati mikroFTIR analize (crvena linija) u poređenju sa podacima iz baze podataka o hemijskim supstancama (plava/ljubičasta linija), praćene slikama čestica: a) Polikarbonat - JDS4-3_4; b) Polietilen tereftalat (PET) - JDS4-35_2; c) Polipropilen-polietilen kopolimer-JDS4-17_2; d) ljubičasta linija; g) Najlon (poliamid) - JDS4-29_3; e) Celofan - JDS4-3_1.

Među fragmentima, najdominantnija potkategorija bila je transparentna, praćena plavom, crnom, braon, belom i zelenom sa 1 do 4 čestica. Od polimera, najzastupljeniji bio je polietilen tereftalat. Potkategorije braon i bela identifikovane su kao kalcijum karbonat. Stoga, navedene potkategorije se mogu ubuduće izbegavati za mikroFTIR analizu kako bi se izbeglo detektovanje neorganskog materijala, odnosno da se prednost daje potkategorijama intenzivnih boja (crvena i plava).

Tabela 15. Broj jedinki *C. fluminea* po uzorku, broj analiziranih čestica pomoću mikroFTIR spektroskopije i detektovani tipovi polimera.

Kod lokaliteta*	Broj jedinki	FTIR uzorci	Tip polimera
JDS4-3	10	JDS4-3_1	Celofan
		JDS4-3_2	-**
		JDS4-3_3	Polikarbonat
		JDS4-3_4	Polikarbonat
JDS4-4-	2		
JDS4-9	10	JDS4-9_1	-**
		JDS4-9_2	-**
		JDS4-9_3	Polikarbonat
JDS4-17	10	JDS4-17_1	Celofan
		JDS4-17_2	Kopolimer polipropilen-polietilen
		JDS4-17_4	Polietilen tereftalat (PET)
JDS4-20	5	JDS4-20_1	Polikarbonat
		JDS4-20_2	Polikarbonat
		JDS4-20_3	Polikarbonat
JDS4-22	10		
JDS4-23	9		
JDS4-24	10	JDS4-24_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-24_2	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-24_3	Kopolimer polipropilen-polietilen
		JDS4-24_4	Polietilen tereftalat (PET)
JDS4-27	10	JDS4-27_1	-**
		JDS4-27_2	Kopolimer polipropilen-polietilen
		JDS4-27_3	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-27_4	Polikarbonat
JDS4-29	10	JDS4-29_1	-**
		JDS4-29_2	Polikarbonat
		JDS4-29_3	Najlon (Poliamid)

		JDS4-29_4	Polietilen tereftalat (PET)
JDS4-31	10	JDS4-31_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-31_2	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-31_3	5,8,11,14,17- eikozapentaenska kiselina
JDS4-32	10		
JDS4-33	10		
JDS4-35	10	JDS4-35_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-35_2	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-35_3	Polietilen tereftalat (PET)
JDS4-36	10		
JDS4-37	10	JDS4-37_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-37_2	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-37_3	Polietilen tereftalat (PET)
JDS4-38	10		
JDS4-40	10		
JDS4-41	10	JDS4-41_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-41_2	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-41_3	Polietilen tereftalat (PET)
JDS4-44	10	JDS4-44_1	Polikarbonat
		JDS4-44_2	-**
		JDS4-44_3	Polikarbonat + neorgansko
JDS4-45	10		
JDS4-47	10	JDS4-47_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-47_2	Polikarbonat
		JDS4-47_3	Polikarbonat
JDS4-48	10	JDS4-48_1	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-48_2	Polietilen tereftalat (PET)
		JDS4-48_3	Polietilen tereftalat (PET)

*Kodovi lokaliteta detaljno su prikazani u

** Čestice su identifikovane kao neorganski materijal.

5. DISKUSIJA

Prisustvo mikroplastike je prepoznato kao značajan pritisak na slatkovodne ekosisteme (Silva i sar., 2020). Čestice mikroplastike (organskih polimera) mogu uticati na strukturu i funkcionisanje vodenih ekosistema (Bucci i sar., 2020; Foley i sar., 2018), a njihovo sveopšte prisustvo i akumulacija u sedimentu može potencijalno da promeni procese bioturbacije gde glavnu ulogu imaju makrobeskičmenjaci (Morad i sar., 2010). Još uvek nedostaju informacije o stepenu zagađenja mikroplastikom u slatkovodnim ekosistemima zbog nedostatka podataka o prisustvu i količinama čestica mikroplastike, kako u vodenom stubu i sedimentu, tako i u biotičkim elementima ekosistema. Nedostaju i podaci o dejstvu čestica plastike na pojedine populacije i zajednice, pogotovo kada se u obzir uzme i složen proces adsorpcije organskih zagađivača na površini ovih čestica (Amelia i sar., 2021).

Rezultati prikazani u ovom radu, po više osnova, analiziraju prisustvo mikroplastike u većem broju organizama, u *ex-situ* i *in-situ* uslovima, čime se povećava pouzdanost razmatranja. Dodatno *in-situ* analize vršene su u različitim dimenzijama, mikro-, mezokosmama, ali i na značajnom delu toka Dunava i najvećim pritokama.

5.1. Toksičnost mikroplastike u *ex-situ* uslovima sredine

Laboratorijska ispitivanja toksičnosti polimera na akvatičnu faunu uglavnom se zasnivaju na testovima toksičnosti za jednu vrstu i izloženosti jednom polimeru mikroplastike (Scherer i sar. 2017; Redondo-Hasselerharm i sar. 2018; Ziajahromi i sar. 2018, 2019; Silva i sar. 2019). U našem slučaju, ispitivanja su vršena izlaganjem mešavini mikroplastike, praćenjem većeg broja morfoloških osobina, uključujući i geometrijsku morfometriju, zatim stepena ingestije čestica, ali i intenziteta rasta.

Hironomide imaju uticaj na biogeoheimijske cikluse, sekvestriranje ugljenika, kao inženjeri ekosistema (Holker i sar., 2015). Praćenje uticaja mikroplastičnih čestica na razvojnu mehaniku vodenih insekata uopšte, kada su u pitanju morfološke osobine, kod vrste *C. riparius* ukazalo je na negativne efekte mešavine mikroplastike na vreme razvića (DT) i morfološke promene na krilima, mandibulama i mentumu. Izlaganje mešavini mikroplastike imalo je značajan uticaj na

biomarkere na populacionom nivou vrste *C. riparius* (posebno na DT), praćeno veoma značajnim deformitetima usnog aparata larvi četvrtog stupnja.

Larve hironomida mogu lako da ingestuju čestice mikroplastike koje su reda veličine čestica hrane koju inače konzumiraju, od 20 do 200 μm u zavisnosti od stupnja razvića (starosti jedinki). Zamena čestica mikroplastike česticama hrane dešava se zato što su larve *C. riparius* neselektivne po načinu ishrane, pa sama dostupnost mikroplastike u okruženju (eksperimentalnim tretmanima) predstavlja potencijalnu zamenu unosa umesto hrane (Armitage i sar., 1995; Henriques-Oliveira i sar., 2003). Scherer i sar. (2017) detektovali su ingestiju čestica polistirena kod *C. riparius* u rasponu veličine od 10 do 90 μm , sa frekvencijom unosa od 226 čestica na sat. U nedavnoj studiji Silva i sar. (2019) primećeno je da su larve *C. riparius*-a ingestovale polietilen veličine 32-63 μm , što je dovelo do značajnog negativnog uticaja na biomarkere na populacionom nivou i do smanjenog rasta. Značajan deo mešavine mikroplastike u ovoj studiji bio je polietilen sa veličinom čestica skoro identičnom onoj korišćenoj u studiji Silva i sar. (2019). Često unošenje čestica mikroplastike je potencijalno smanjilo količinu unesene hrane i/ili smanjilo fizički prostor u crevima za obradu hrane, iz čega je proisteklo odloženo razviće jedinki, ali ne i smanjeni rast kao što je ranije primećeno (Silva i sar., 2019).

U ovom doktoratu primećena je korelacija rasta hironomida sa veličinom ingesovane mikroplastike. Uočene razlike mogu dalje biti povezane sa različitim uticajima. Dok su Silva i sar. (2019) izložili hironomide polietilenu preko sedimenta, izloženost polietilenu u našoj studiji bila je preko sedimenta i vodenog stuba. Stoga, izvesno je da su larve ingestovale čestice mikroplastike i iz sedimenta i iz vodenog stuba. Pokazano je da male čestice mikroplastike polietilena (1-54 μm) mogu da potisnu rast *C. tepperi*, dok čestice u opsegu od 100 do 126 μm ne mogu (Ziajahromi i sar., 2018). Štaviše, čestice $>100 \mu\text{m}$ najviše su doprinele kašnjenju u DT (Ziajahromi i sar., 2018). Predloženi mehanizam isključivanja veličine uključuje agregaciju mikroplastike u crevima hironomida. Dok čestice sedimenta ne formiraju agregate u crevima hironomida i njihov unos i eliminacija su u ravnoteženi (Bervoets i sar., 2003), mikroplastika male veličine se agregira u crevima hironomida, što može dovesti do dužeg zadržavanja mikroplastike u organizmu (Ziajahromi i sar., 2018) i do supresije rasta. Dakle, uočeno kašnjenje u DT i nedostatak supresije rasta u ovoj studiji se mogu pripisati boljoj dostupnosti čestica mikroplastike $>100 \mu\text{m}$ u odnosu na čestice $<100 \mu\text{m}$. Treba uzeti u obzir da čestice mikroplastike mogu biti i vektori opasnih

toksina i dodatni put bioakumulacije toksičnih hemikalija u organizmima (Barnes i sar., 2009; Zettler i sar., 2013). Dokazano je da pesticidi, teški metali, ftalati i policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) povećavaju odgovor ćelije na stres i odlažu izletanje mužjaka *C. riparius* (Arambourou i sar., 2019).

Analiza geometrijske morfometrije krila mužjaka nije pokazala statistički značajnu razliku u tretmanima, dok su desna krila ženki pokazala statistički značajne razlike u obliku krila, sa tendencijom širenja krila u tretmanima mikroplastikom, što je bio i slučaj u prisustvu pesticida, ftalata i policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) (Arambourou i sar., 2019). Deformiteti usnog aparata larvi četvrtog stupnja praćeni su veoma značajnim promenama, kako na mandibulama, tako i na mentumima. Deformiteti uočeni na usnom aparatu i razlike u obliku ne mogu se objasniti promenom tvrdoće podloge, iz razloga što je mikroplastika mekša od kvarcnog peska, niti se mogu objasniti adsorpcijom metala ili postojanih organskih zagađivača iz razloga što su za eksperiment korišćeni komercijalni peleti polimera. Uzrok promena predstavljaju aditivi/plastifikatori iz čestica mikroplastike. Bisfenol A (BPA) je aditiv povezan sa mikroplastikom i poznat kao endokrini disruptor kod beskičmenjaka čak i u koncentracijama merljivim u ng i mg L⁻¹ (Cole i sar., 2011), sa potencijalnim negativnim uticajem na razviće organizama (Anderson i sar., 2016). Konkretno, ftalati su često prisutni u PVC-u i poznati su kao endokrini disruptori (Latini i sar., 2004; Park i Kvak, 2010), što potencijalno može objasniti efekat na razvoj krila u ovom istraživanju, primećen isključivo kod ženki. Poznato je da ftalati, posebno DEHP (di (2-etilheksil) ftalat), uobičajeni aditivi/plastifikatori PVC-a, izazivaju deformitete usnog organa kod hironomida (Park i Kvak, 2008), a mogu biti prisutni i u PET-u, iako komercijalni peleti PET-a imaju niske koncentracije DEHP-a (Keresztes i sar., 2013).

5.2. *In-situ* istraživanje u mikrokozmmama barskih ekosistemima

U ovoj studiji korišćena je mešavina 3 polimera (PE, PVC i PA), koji su među 10 najrasprostranjenijih polimera u industriji i najčešće u upotrebi u svakodnevnom životu (PlasticsEurope, 2018). Smeša se uglavnom sastojala od polimera visoke specifične gustine kako bi se osiguralo da ostanu u sedimentu.

Prethodne studije pokazale su stopu ingestije mikroplastike za brojne taksone (Scherer i sar. 2017; Fueser i sar. 2019, 2020). Međutim, implikacije ingestije mikroplastike su još uvek nejasne. de Sá i sar. (2018) su naglasili da postoji nedostatak saznanja o efektima različitih vrsta mikroplastike na vodene organizme, osim riba i pojedinih vrsta rakova. Mišljenja smo da znanje o dejstvu prisustva mikroplastike nedostaje i za pomenute grupe životinja.

Poznato je da su puževi organizmi koji imaju visok kapacitet ingestije mikroplastike (Wagner i Lambert, 2018). Slatkovodni puževi, međutim, imaju sistem za varenje koji omogućava odvajanje svarljivih i nesvarljivih čestica (Weber i sar., 2021), stoga se očekuje da se čestice mikroplastike izbacuju kroz sistem za varenje. U ovoj studiji, Gastropoda (Mollusca) je bila druga grupa vodenih makrobeskičmenjaka po dominantnosti i u tretmanu i u kontroli. Na osnovu rezultata, nije uočena razlika u sastavu zajednice gastropoda između tretirane i kontrolne grupe. Stoga se pretpostavlja da njihov adaptivni potencijal na okruženje bogato česticama može biti ključni mehanizam koji ograničava toksičnost mikroplastike (Weber i sar., 2021). Na primer, Weber i sar. (2021) jasno su naglasili da uprkos visokom nivou ingestije, čestice mikroplastike nisu uticale na rast i reprodukciju slatkovodne vrste gastropoda *Limnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758).

Hironomide, kao grupa sa značajnim udelom u ukupnoj biomasi zajednice makrobeskičmenjaka (Milošević i sar., 2020) i dominantna grupa u ovoj studiji, nisu pokazali razlike u sastavu i strukturi zajednice bentosnih makrobeskičmenjaka između kontrole i tretmana mikoplastikom, slično laboratorijskim eksperimentalnim studijama (Silva i sar., 2019; Stanković i sar., 2020), koje su pokazale odsustvo letalnog efekta u tretmanima mikoplastikom. Međutim, prethodno otkriveni subletalni efekti mikroplastike, kao što su morfološke promene usnog aparata i krila hironomida (Stanković i sar., 2020), ne moraju nužno da se odraze na strukturu zajednice, bar ne u jednoj sezoni. Silva i sar. (2021) su potvrdili da zadržavanje mikroplastike >10 µm u crevima vrste *C. riparius* može izazvati mehanička/proteolitička oštećenja u epitelnim ćelijama lumena creva i indukovati imuni odgovor kroz aktivaciju sistema fenoloksidaze. Studija na otvorenom sa sličnom eksperimentalnom postavkom pokazala je da su kod hironomida samo predstavnici podfamilije Orthocladiinae reagovali na nanoplastiku, pri čemu se značajno menjala njihova zastupljenost (Redondo-Hasselerharm i sar., 2020). U ovoj studiji, zajednicu hironomida

su uglavnom činile larve Chironominae, koje su, u poređenju sa predstavnicima podfamilije Orthocladiinae, načelno otpornije na antropogeno zagađenje (Milošević i sar., 2013).

Znanje o ingestovanju i biološkim efektima mikroplastike uglavnom dolazi iz laboratorijskih studija, često sa ograničenim značajem za životnu sredinu zbog pojednostavljenih ekotoksikoloških protokola (npr. jedan jedini plastični polimer i veličina i/ili izuzetno visoke koncentracije, sa kratkim vremenom izlaganja; Scherer i sar., 2020). Zaključke dobijene iz laboratorijskih eksperimenata treba uzeti u obzir oprezno, jer oni možda neće pružiti identične informacije kao zaključci sa terena, izučavanjem prirodnih ekosistemima. Pored toga, nedostaju ekološki procesi koji pokreću promene zajednice na duži vremenski period, kao što su različite abiotičke i biotičke interakcije. Scherer i sar. (2017) su pokazali da prisustvo prirodne materije (hrana, sediment) značajno smanjuje unos mikroplastike kod slatkovodnih beskičmenjaka. Tačnije, čini se da je unutrašnja izloženost manja u testovima hronične toksičnosti i eksperimentima u prirodnim staništima, gde je dostupnost čestica mnogo veća. Stoga bi studije koje istražuju efekte mikroplastike trebalo češće sprovoditi u terenskim uslovima i na mnogo duže periode, kako bi se svi ovi procesi uzeli u obzir (Redondo-Hasselerharm i sar., 2020). Do sada su samo Redondo-Hasselerharm i sar. (2020) sproveli eksperiment na otvorenom, kako bi procenili dugoročne efekte nano- i mikroplastike na prirodnu rekolonizaciju sedimenta od strane zajednice makrobeskičmenjaka u ekološki realnim uslovima. Tačnije, njihova studija je razmatrala efekte različitih koncentracija nepravilnih fragmenata polistirena na abundantnost i raznolikost zajednice slatkovodnih makrobeskičmenjaka. Rezultati su pokazali da povećano prisustvo fragmenata polistirena uzrokuje manju ukupnu brojnost makrobeskičmenjaka, što je bilo u korelaciji sa manjim brojem predstavnika familije Naididae, dok su ukupan broj taksona makrobeskičmenjaka i Šenon-ov indeks diverziteta ostali nepromenjeni. U ovoj studiji, mikroplastična mešavina polietilena, polivinil hlorida i poliamida nepravilnog oblika u koncentraciji 10 puta većoj od ekološki relevantne nije imala uticaj na abundantnost i biomasu zajednice makrobeskičmenjaka. Kvalitativni indeksi sličnosti koji su korišćeni, posebno Jaccard-ov indeks sličnosti, pokazali su manju razliku u pogledu strukture zajednice u tretmanu i kontroli. Međutim, kvalitativni indeksi sličnosti zasnivaju se na broju zajedničkih vrsta i broju vrsta prisutnih u istraživanim skupovima. Njihovi osnovni nedostaci su ravnopravan tretman retkih i rasprostranjenih vrsta (Jovanović i sar., 2016). Stoga se sve više koriste kvantitativni indeksi koji odražavaju abundancu. Indeks kvantitativne sličnosti Czekanowski, kao pogodan indikator toksičnih efekata različitih

zagađivača, otkrio je da je 16 % zajednice reagovalo na zagađenje mikroplastikom. Dakle, na osnovu ovog rezultata, može se potvrditi da je ova koncentracija mikroplastike imala uticaj na zajednicu makrobeskičmenjaka u periodu od 3 meseca (100 dana).

Rezultati u ovom doktoratu su pokazali da nema razlike u abundanci i biomasi funkcionalnih grupa ishrane unutar zajednice makrobeskičmenjaka nakon izlaganja mikroplastici. Iako su mnogi autori potvrdili da način ishrane u velikoj meri utiče na ingestovanje mikroplastike (Scherer i sar., 2017), visoka stopa unosa čestica od strane jedinki ne izaziva nužno značajne, ili negativne efekte na nivou zajednice. Ovo posebno važi za slatkovodne gastropode, koji mogu postati tolerantniji na zagađenje mikroplastikom zbog specifičnih adaptacija u pogledu ishrane, uprkos visokim stopama ingestije (Weber i sar., 2021), ili za slatkovodne oligohete, čija izloženost mikroplastici nije rezultovala smrtonosnim, ili subletalnim efektima (Castro i sar., 2020; Silva i sar., 2020), kao i za amfipode i izopodne rakove (Redondo-Hasselerharm i sar., 2020).

U okviru *in-situ* eksperimenta nisu uočene statistički značajne razlike u bogatstvu vrsta (S), brojnosti (N), biomasi (B), Šenonov-om indeksu raznovrsnosti (H) ili Simpsonov-om indeksu (D) između kontrolne i tretirane grupe. Navedeni indeksi raznolikosti opisuju strukturu zajednice, koja je oblikovana lokalnim faktorima životne sredine, disperzijom i biotičkim interakcijama (Medeiros i sar., 2020).

5.3. *In-situ* istraživanje u mezokozmama veštačkog jezerskog ekosistema

Kao što je već napomenuto, čestice mikroplastike koje mogu ingestovati bentosni organizami, mogu uticati na njihovu morfologiju (Silva i sar., 2019; Stanković i sar., 2020). Promene u veličini i obliku krila hironomida mogu bitno uticati na rasprostranjenje populacije i njenu vijabilnost, jer su krila ključna za disperziju (McLachlan, 1985; Vepsäläinen, 1986). U ovoj studiji, oblik krila mužjaka *C. riparius* se razlikovao između tretmana različitih koncentracija mikroplastike. Sličan efekat je primećen i kod ženki *C. riparius* u kontrolisanim laboratorijskim uslovima sa istom mešavinom polimera i koncentracijama kao u mezokozmama (Stanković i sar., 2020). Specifičnost pola je mogla proizaći iz temperaturnih uslova; vreme razvoja se razlikuje među polovima (Stevens i sar., 1998) i zavisi od temperature (Frouz i sar., 2009). Temperaturni

faktor je mogao da utiče na individualni odgovor svakog pola na prisustvo čestica mikroplastike, jer je temperatura u mezokozmama (prosečno $24,2 \pm 0,18$ °C) bila znatno viša od 20 °C, koliko je bilo u laboratorijskom eksperimentu (Stanković i sar., 2020).

Korišćenjem različitih pristupa, dobili smo različite podatke o uticaju mikroplastike na akvatične makrobeskičmenjake, sa posebnim osvrtom na vrstu *C. riparius*, koja je bila jedan od osnovnih model organizama u ovoj studiji. Sprovođenjem ekotoksikološkog *ex-situ* eksperimenta u strogo kontrolisanim uslovima na vrsti *C. riparius*, ustanovili smo da mešavina 8 polimera mikroplastike utiče na larveni (telesna masa, dužina tela, vreme razvića, deformiteti usnog aparata) i adultni stadijum (deformiteti krila ženki). Sa druge strane, kratkoročno *in-situ* istraživanje uticaja istih polimera u mezokozmama veštačkog jezerskog ekosistema, uticalo je samo na promenu veličine krila mužjaka. Pređenjem ovih rezultata može se zaključiti da postoje prednosti i nedostaci svakog od pristupa istraživanju. Prednost laboratorijskog pristupa ogleda se u tome što se za relativno kratko vreme može dobiti informacija o uticaju određenog agensa, u našem slučaju mikroplastike, na konkretnu vrstu (*C. riparius*), međutim, takvi podaci se ne mogu primeniti na prirodne ekosisteme direktno, već se moraju uzeti u obzir sa rezervom, kao jedan od mogućih ekstremnih scenarija. Sa druge strane, eksperimentalne postavke u prirodi mogu uključiti prirodnu zajednicu i realnije uslove sredine, i u takvim uslovima, mešavina mikroplastike u periodu od 3 meseca nema značajnog uticaja, što indikuje da kratkotrajni uticaji nemaju efekte. Prednost ovakvog pristupa jeste u tome što se podaci dobijeni ovim putem direktno odnose na prirodno stanište, prikazujući realnije uticaje ispitivanog agensa u trenutku sprovođenja istraživanja. Međutim, nedostatak ovog pristupa ogleda se u tome što su ovakva istraživanja, pre svega, finansijski izuzetno zahtevna, ali i u selektivnom odabiru ispitivane zajednice, čime se određeni trofički nivoi isključuju. Ujedno, treći pristup, *in-situ* ispitivanje uticaja 3 tipa polimera u mikrokozmmama barskog ekosistema, u periodu od 3 meseca dao je slične rezultate kao prethodni *in-situ* pristup. Za razliku od prethodnog, ovaj pristup je ekonomičniji za sprovođenje, a zbog veličine ponovaka, moguće je uvrstiti više ponovaka (u ovoj studiji ukupno 40) u odnosu na mezokozme (ukupno 12). Nedostatak je ograničeni potencijal populacije koji može da se prati, zbog zapremine samih postavki, ali i zbog podložnosti uticaju prirodnih katastrofalnih događaja čime se ceo sistem narušava. Zajedničko za eksperimentalne postavke u prirodi je to što se tek pri dužim izloženostima nekom agensu mogu uočiti neki od efekata koji se u laboratorijskim ulovima uočavaju po završetku jednog životnog ciklusa.

5.4. Pasivni monitoring prisustva čestica mikroplastike u slivu Dunava

Lechner i sar. (2014) procenili su da je unos plastičnog otpada u Crno more preko Dunava u proseku oko 7,5 g na 1.000 m³s⁻¹ pri srednjem protoku (4,2 t dnevno, ili 1.533 t godišnje). Hohenblum i sar. (2015) sprovedli su preliminarna istraživanja u Austriji na reci Dunav i procenili su opsege koncentracija od 0,039–0,205 mg/m³ i 0,029–0,516 mg/m³, na ulaznim i izlaznim tačkama Dunava u zemlji, respektivno. Preko 50 % ekstrahovanih plastičnih čestica sastojalo se od fragmenata, 4–10 % su bile pelete i 2,1–2,8 % zelene sočivaste ljuspice. Prosečan godišnji raspon transportnih čestica mikroplastike izračunat je na 6 do 66 kg dnevno u austrijskom delu toka Dunavu (Hohenblum i sar., 2015).

5.4.1. Ingestija čestica mikroplastike kod *L. naticoides*, *L. hoffmeisteri* i *C. acutiventris*

U ovoj studiji, čestice mikroplastike zabeležene su u tkivima ispitivanih vrsta, *L. naticoides*, *L. hoffmeisteri* i *C. acutiventris*, u reci Dunav, što ide u prilog ranijim izveštajima o prisustvu mikroplastike širom sveta (Woodall i sar., 2014; Mani i sar., 2015; Horton i sar., 2018). Iako u literaturi nedostaju podaci o ingestiji mikroplastike kod vrsta *L. naticoides*, *L. hoffmeisteri* i *C. acutiventris*, u ispitivanjima ingestije mikroplastike korišćeni su drugi predstavnici grupa Mollusca, Oligochaeta i Chironomidae (Diptera). Kategorizacija čestica se razlikuje u različitim studijama zbog nedostatka standardizacije kategorija mikropastičnih čestica. U tkivu slatkovodnog puža *Sinotaia aeruginosa* (Reeve, 1863) iz jezera Taihu, vlakna i fragmenti su najčešće kategorije. Crvena i plava potkategorija bile su kodominantne unutar kategorije vlakana, dok je transparentna potkategorija bila dominantna u kategoriji fragmenata (Xu i sar., 2020). Akindele i sar. (2019) detektovali su samo vlakna u tkivu slatkovodnih puževa *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774) i *Theodoxus fluviatilis* (Linnaeus, 1758) i vlakna i filmove u tkivu *Lanistes varicus* (Muller, 1774). Većina izolovanih čestica iz tkiva *Tubifex tubifex* (Muller, 1774) u basenu Salford Kuais (Mančester Siti, Engleska) predstavljena je kategorijom vlakana (87 %), dok su fragmenti predstavljali ostatak čestica (Hurley i sar., 2017). Lin i sar. (2021) detektovali su mikrogranule (0–

28 %), mikrofilmove (0–16 %), mikrofragmente (3–47 %) i mikrovlakna (40–64 %) unutar larvi muve (Diptera: Chironomidae) na 5 lokaliteta sliva reke Vu (Tajvan).

Prema dosadašnjim istraživanjima, vlakna su bila najdominantnija kategorija u mekom tkivu *B. aeruginosa* (Xu i sar., 2020), *M. tuberculata*, *T. fluviatilis*, *L. varicus*. (Akindele i sar., 2019), *C. fluminea* (Su i sar., 2018), *Thienemannimiiia spp.*, *Chironomus spp.* i *Orthocladius spp.* (Akindele i sar., 2019), što je u skladu sa ovom studijom (49,48 %). Stope ingestije *B. aeruginosa* (Xu i sar., 2020), *L. varicus*, *T. fluviatilis* (Akindele i sar., 2019), *C. fluminea* (Stanković i sar., 2022) bile su veće od stopa ingestije *L. hoffmeisteri*, *L. naticoides* i *C. acutiventris*. Xu i sar. (2020) otkrili su 96,67 % do 100 % jedne ili više vrsta mikroplastike u slatkovodnom pužu *B. aeruginosa* iz jezera Taihu, Kina, sa dominacijom polivinil acetatnih vlakana ($88,0 \pm 12,1$ %), polistirenskih vlakana ($66,3 \pm 17$ %), poliamida ($49,7 \pm 22,4$ %) i polietilen tereftalata ($30,0 \pm 7,4$ %). Scherer i sar. (2017) demonstrirao je unos polistirena među različitim slatkovodnim grupama beskičmenjaka, uključujući crnog crva *L. variegatus* (Oligochaeta), slatkovodnog puža *P. acuta* (Mollusca) i *C. riparius* (Chironomidae, Diptera), sa 8 čestica/h, 118 čestica/h i 226 čestica/h, respektivno.

U našoj studiji, među kategorijom fragmenata, najdominantnije su bile transparentne čestice (11,18 %), a potom crne (9 %), plave (7,29 %) i bele (6,16 %), dok su ostale potkategorije imale udeo manji od 5 % u ukupnom uzorku. U uzorcima mekog tkiva *L. hoffmeisteri* je detektovano preko 50 % čestica iz svake od potkategorija, među kojima se potkategorije transparentnih (68,4 %) i crnih (67 %) fragmenata izdvajaju kao dominantnije. U uzorcima tkiva *L. naticoides* je detektovano 11,2–40,7 % fragmenata, gde je najmanji udeo čestica bio iz potkategorije transparentnih, a najveći iz potkategorije belih fragmenata. U mekom tkivu vrste *C. acutiventris* uočen je najmanji udeo belih fragmenata (7,4 %), dok su ostale potkategorije imale udeo od 20,2–25 % u kategoriji fragmenata.

5.4.2. Ingestija čestica mikroplastike kod *Corbicula fluminea*

Istraživanja u okviru JDS4 ekspedicije pružila su uporedive informacije o prisustvu čestica mikroplastike duž značajnog dela Dunava, i tako predstavlja doprinos opštem znanju o njihovoj

distribuciji u biološkim sistemima. Prema našim saznanjima, pored studija Su i sar. (2018), ovo je druga studija o prisustvu čestica mikroplastike u tkivu *C. fluminea* u velikim rekama.

Nije potvrđena korelacija veličine jedinki sa količinom unesenih čestica mikroplastike. Slični nalazi su dokumentovani i za ribe (Güven i sar., 2017) i školjke (Naji i sar., 2018). Veličina organizma ne utiče na količinu unesenih čestica mikropastke.

Su i sar. (2016) detektovali su četiri kategorije čestica mikroplastike u tkivu slatkovodne azijske školjke *C. fluminea*: vlakna, peleti, filmovi i fragmenti, sa dominacijom vlakana (48–84 %) u uzorcima. U okviru kategorije fragmenata, potkategorija plavih fragmenata je bila dominantna na površini vode (50–63 %), dok su transparentni i beli fragmenti bili češći u organizmima i sedimentima (29–44 %). U ovim istraživanjima, čestice mikroplastike izolovane iz *C. fluminea*, sakupljene duž 2.040 km Dunava, bile su predstavljene vlaknima, sa dominacijom plave potkategorije, i fragmentima – dominacija transparentne potkategorije.

Negativni efekti mikroplastike na *C. fluminea* su ranije dokumentovani. Kada je izložena česticama mikroplastike, azijska školjka je pokazala statistički značajno smanjenje kondicije i povećanje lipidnog oksidativnog oštećenja, ali je otkrivena i neurotoksičnost (Oliveira i sar., 2018). U vezi sa polihlorovanim bifenilima (PCB), izloženost mikroplastici dovodi do tubularne dilatacije (Rochman i sar., 2017). Rezultati analize čestica mikroplastike u *C. fluminea* u rekama, jezerima i estuarnim oblastima srednjeg i donjeg sliva reke Jangce pokazali su da je azijska školjka dobar bioindikator za opisivanje zagađenja mikroplastikom, posebno za sediment (Su i sar., 2018). U tom istraživanju čestice mikroplastike detektovane su u 61 od 63 uzorka azijskih školjki, sa rasponom od 0,3–4,9 čestica/g vlažne telesne mase i 0,4–5,0 čestica/individui po lokaciji. Ingestija mikroplastike od strane *C. fluminea* iz jezera Taihu (Kina) predstavljena je rasponom od 0,2–12,5 čestica/g vlažne mase (Su i sar., 2016). Baldwin i sar. (2020) su izolovali od 18 do 105 čestica mikroplastike po jedinki, sa srednjom vrednošću od 51,7 čestica/organizmu. Naši rezultati su pokazali veću zastupljenost čestica mikroplastike u azijskim školjkama koje su istraživane u poređenju sa pomenutim studijama u Kini, što ukazuje na postojeći povećan pritisak izazvan zagađenjem plastičnim otpadom u slivu Dunava. Opseg veličina svih čestica mikroplastike u ovoj studiji bio je od 0,02 do 4,67 mm, što je vrlo slično rasponu veličina čestica koje su ingestovale azijske školjke iz sliva reke srednjeg i donjeg Jangcea, od 0,021 do 4,02 mm (Su i sar., 2018), i jezero Taihu, od 0,05 do 5 mm (Su i sar., 2016). Pored toga, sva dosadašnja istraživanja (Su i sar.,

2016; Su i sar., 2018; Baldwin i sar., 2020) su dokumentovala dominaciju vlakana koja je unosila *C. fluminea*. Su i sar. (2016) detektovali su celofan, polietilen tereftalat, poliester i polipropilen u azijskim školjkama iz jezera Taihu, sa dominacijom celofana, praćenog PET-om. Naše istraživanje je pokazalo da čestice PET-a (koji se koristi za proizvodnju plastičnih flaša) dominiraju u uzorcima *C. fluminea* iz Dunava, dok su čestice celofana pronađene u gornjem i srednjem Dunavu, sa nižom zastupljenošću. Dominacija PET fragmenata u uzorcima, pored potencijalno velikih količina u Dunavu, mogla bi biti posledica toga što su školjke intenzivni filtratori. Li i sar. (2019) su pokazali veći unos PET vlakana (4,1 čestica/g) od 5 drugih tipova polimera (1 čestica/g ili manje). Pored toga, čestice prirodnih boja (braon i bele) identifikovane su kao kalcijum karbonat. Stoga, prilikom selekcije čestica po boji može doći do greške, ali nakon provere hemijskog porekla same čestice jasno se može utvrditi da li su bele i braon čestice neorganskog porekla ili polimeri.

PET, koji se koristi u proizvodnji plastičnih boca, iako ima veću stopu recikliranja od bilo koje druge vrste plastike, samo 7 % se reciklira bez zadržavanja u prirodi nakon upotrebe (WEF, 2016). Ostatak iskorišćene ambalaže može se naći kako pluta u rekama i nagomilava se uz rečne obale u velikim količinama. Vremenom, mehaničke sile, sunčeva svetlost i biološki procesi u potpunosti razgrađuju makroskopske plastične boce na manje komade, koji su postali dostupni manjim organizmima. Specifična gustina PET-a je $1,38 \text{ g cm}^{-3}$, što je već samo po sebi dovoljno gusto/teško da potone na dno vodenog tela. Pored toga, nakon naseljavanja mikroba ili algi na plastičnoj površini, čestice mikroplastike postaju teže i lakše tonu u sedimente. Veće prisustvo u nizvodnom delu Dunava može se objasniti lokalnim zagađenjem, ali i plutajućim plastičnim ostacima iz gornjeg toka Dunava, koji protiče kroz razvijenije urbane sredine. Podaci iz ove studije mogli bi da ukažu na značajan uticaj pritoka na opterećenje mikroplastkom u Dunavu. Porast prisustva čestica mikroplastke na lokalitetima JDS4-37 (nizvodno Pančevo), JDS4-40 (Banatska Palanka/Baziaš) i JDS4-41 (uzvodno ušće Timoka, Radujevac/Gruia), pored uticaja pritoka (Sava i Velika Morava) moglo bi ukazivati na uticaj Beograda.

Marinske školjke se široko koriste u ishrani ljudi. Komercijalno uzgajane školjke *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 i *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) sadrže u proseku $0,36 \pm 0,07$ i $0,47 \pm 0,16$ čestica g^{-1} ww (vlažne težine, eng. *wet weight*), respektivno (Van Cauvenberghe i Janssen, 2014). Ista studija je zaključila da 250 g ww dagnji ili 100 g ww ostriga rezultira igestijom 90 odnosno 50 čestica mikroplastike od strane ljudi, respektivno. Procenjuje se da godišnje ljudi

unosu 11.000 čestica mikroplastike samo putem ishrane školjkama (Van Cauvenberghe i Janssen, 2014). Prisustvo čestica mikroplastike u morskim plodovima može potencijalno predstavljati pretnju za bezbednost hrane zbog aditiva u plastici, uglavnom endokrinih disruptora – ftalata i bisfenola A (Oehlmann i sar., 2009) ili kapaciteta adsorpcije POPs, PCB, PAH, organsko-halogenih pesticidi, nonilfenol i dioksini (Endo i sar., 2005; Ogata i sar., 2009; Hirai i sar. 2011) na površini čestica mikroplastke. Slatkovodne školjke su lošijeg nutritivnog sastava od morskih vrsta, pa se ređe koriste u ishrani ljudi. Kako su slatkovodne školjke deo lanca ishrane u vodenim ekosistemima, povećano prisustvo plastičnog otpada u mesu školjki, neposredno, može imati i negativan uticaj na čoveka.

Slatkovodne azijske školjke su invazivne vrste (Sousa i sar., 2008), široko rasprostranjene i korisni bioindikator zagađivača (dos Santos i Martinez, 2014; Cid i sar., 2015) uključujući i čestice mikroplastike (Su i sar., 2016). Zbog sve većeg sintetičkog zagađenja vodene sredine, postoji potreba uključivanja polimera mikroplastike u standardne procedure analize vode, kako bi se prikupilo više podataka o prisustvu i pristicima mikroplastike u akvatičnoj sredini. Naše istraživanje na značajnom geografskom području potvrđuje da je prisustvo mikroplastike globalan problem u slatkovodnim ekosistemima.

U ovom doktoratu, analizirane su četiri vrste makrobeskičmenjaka iz Dunava, sa ukupno 756 jedinki. Fibrili su u oba istraživanja Dunava bili najdominantnija kategorija, dok su fragmenti činili ostatak izolovanih čestica (JDS4), ili drugu kategoriju po dominantnosti (JDS3). Fibrili plave boje bili su dominantni među detektovanim česticama vlakana 80-81% u svim. Upotrebom „blanko“ filtera, odnosno negativnih kontrola, detektovana je kontaminacija fibrilima iz vazduha. Zbog njihovog prisustva u negativnim kontrolama, fibrili su isključeni iz analize hemijskog porekla polimera. Tvrda plastika ili fragmenti, u oba ispitivanja je bila zastupljena sa po 7 subkategorija. Transparentna subkategorija fragmenata je bila najzasupljenija sa 25,8 do 42,8 % u uzorcima. U proseku, $4,64 \pm 1,59$; $1,64 \pm 0,46$ i $1,24 \pm 0,34$ svih čestica/organizmu ili $0,000421 \pm 0,000409$; $0,009661 \pm 0,005247$ i $0,001465 \pm 0,000598$ svih čestica/g mokre mase izolovano je iz *L. hoffmeisteri*, *L. naticoides* and *C. acutiventris*, respektivno. Kod vrste *C. fluminea* broj ingestovanih čestica je znatno viši, prosečno $5,59 \pm 3,71$ fibrila i $4,37 \pm 2,46$ fragmenata/organizmu ili $40,77 \pm 73,75$ fibrila i $25,84 \pm 33,17$ fragmenata/g mokre mase. Razlike u broju izolovanih čestica (877 čestica iz vrsta *L. hoffmeisteri*, *L. naticoides* i *C. acutiventris*; 1.998

čestica iz vrste *C. fluminea*) uslovljene su, sa jedne strane, biomasom samih jedinki, ali i načinom ishrane, sa druge strane. Iako su sve vrste kolektori, način ishrane vrsta *L. hoffmeisteri*, *L. naticoides* i *C. acutiventris* zasniva se na sakupljanju hrane (eng. *gathering collectors*), dok se vrsta *C. fluminea* hrani filtriranjem vode (eng. *filtrator collector*), gde je stopa unosa čestica znatno veća.

Analizirane vrste, mogu se smatrati i reprezentativnim predstavnicima najučestalijih grupa u okviru zajednice makrobeskičmenjaka slatkovodnih ekosistema. Njihove ekološke predispozicije uključuju široke areale rasprostranjenja, visoku tolerantnost i adaptibilnost na novonastale uslove u životnoj sredini koja ih okružuje. Prisustvo ovih vrsta u svim tipovima vodnih tela površinskih voda, čini ih i sastavnim delom lanca ishrane različitih vrsta kozumnih riba (Čanak-Atlagić i sar., 2021; Foley i sar., 2018; Lusher i sar., 2017; Foekima i sar., 2013; Rochman i sar., 2013). Stoga, analiza i detekcija prisustva čestica mikroplastike u površinskim vodama, zatim procena ingestije od strane makrobeskičmenjaka postaje veoma važna i u pogledu zdravlja ljudi, što ovim istraživanjima daje još veći značaj.

Za detaljnije proučavanje distribucije različitog plastičnog otpada duž velikih geografskih razmera (npr. unutar sliva reke Dunav), potrebna je gušća mreža uzorkovanja. Pored toga, da bi se postigla veća preciznost podataka, veći udeo detektovanih čestica u uzorcima treba analizirati korišćenjem FTIR spektroskopije. Dodatne metode za karakterizaciju polimera takođe se mogu primeniti da bi se dobili tačniji rezultati (Raković i sar., 2021).

Razlika rezultata dobijenih analizom sadržaja različite plastike u suspendovanoj određenoj materiji (eng. *Suspended Particulate Matter*- SPM, Asenova i sar., 2021) i naše studije koje su rezultat različitih ciljnih matrica (SPM naspram tkiva) u studijama koje izazivaju zabrinutost pokazuje da pouzdano praćenje mikroplastike zahteva analizu više od jedne ciljne matrice (tkiva), kao i standardizaciju procedura.

6. ZAKLJUČCI

Opšti cilj ovog istraživanja je ispitivanje uticaja šest tipova mikroplastičnih polimera, koji se mogu naći u prirodi kao činioci antropogenog zagađenja, na različite nivoe biološke i ekološke organizacije bentosnih makrobeskičmenjaka u slatkovodnim ekosistemima.

Na osnovu istraživanja može se zaključiti da:

- Mešavina polimera mikroplastike (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) može imati negativan uticaj na biomarkere na populacionom nivou, kao i na određene morfološke strukture model organizma *C. riparius* (Meigen, 1804) u *ex-situ* uslovima sredine.
 - Larve hironomida mogu lako da ingestuju čestice mikroplastike koje su reda veličine hrane koju inače konzumiraju, od 20 do 200 μm u zavisnosti od stupnja razvića (starosti jedinki).
 - Vreme razvića larvi (DT) se značajno produžava u prisustvu mešavine mikroplastike. Uočeno kašnjenje u DT i nedostatak supresije rasta u ovoj studiji se mogu pripisati boljoj dostupnosti čestica mikroplastike $>100 \mu\text{m}$ u odnosu na čestice $<100 \mu\text{m}$.
 - Izloženost mikroplastici dovodi do deformiteta usnog aparata (mandibula i mentuma) larvi, koje se ogledaju u promeni oblika i veličine struktura. Kod mandibula, javlja se tendencija širenja gornjeg (vršnog) dela mandibula i izduživanja apikalnog zuba, dok se kod mentuma javlja tendencija skraćivanja srednjeg zuba i unutrašnjih bočnih zuba.
 - Kod adulta, uočene su značajne promene u veličini krila ženki, sa tendencijom širenja krila u prisustvu mikroplastike.
 - Uočeni deformiteti usnog aparata larvi i razlike u veličini krila ne mogu se objasniti promenom tvrdoće podloge, niti se mogu objasniti adsorpcijom metala ili postojanih organskih zagađivača iz razloga što su za eksperiment korišćeni komercijalni peleti polimera, na osnovu čega se može zaključiti da je razlog prisustvo aditiva/plastifikatora u česticama mikroplastke.
 - Rezultati studije potvrdili su da je *C. riparius* pogodan model organizam za proučavanje efekata mikroplastike u laboratorijskim uslovima.

- Izloženost prirodne zajednice mikrobescičmenjaka mešavini polimera mikroplastike nepravilnog oblika (PE, PVC, PA) u *in-situ* uslovima u mikrokozmana prirodnog barskog ekosistema u periodu od 3 meseca nije uticala na kolonizaciju.
 - Rezultati eksperimenata pokazali su da nema razlike u abundanci i biomasi funkcionalnih grupa ishrane unutar zajednice makrobescičmenjaka pri kraktoročnom prisustvu čestica mikroplastike.
 - Primećen je neposredni uticaj na strukturu zajednce, sa aspekta kvantitativne sličnosti, gde je 16 % zajednice reagovalo na introdukovano zagađenje.
- Izloženost populacije *C. riparius* (Meigen, 1804) mešavini polimera mikroplastike (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) u periodu od 3 meseca u *in-situ* uslovima u mezokozmana veštačkog jezerskog ekosistema imala je uticaj na morfologiju krila mužjaka sa tendencijom sužavanja krila.
- Pasivnim monitoringom odabranih vrsta zajednice bentosnih makrobescičmenjaka (Gastropoda: *Lithoglyphus naticoides*; Bivalvia: *Corbicula fluminea*; Oligochaeta: *Limnodrilus hoffmeisteri* i Chironomidae: *Chironomus riparius*) u slivu Dunava utvrđeno je prisustvo čestica mikroplastike, korišćenjem alkalnog protokola za digestiju tkiva.
- Ispitivanjem hemijskog porekla izolovanih čestica iz tkiva odabranog model organizma *C. fluminea* (Muller, 1774) u slivu Dunava detektovano je prisustvo i bioraspoloživost 5 tipova polimera – celofana, poliamida, polipropilen-polietilen kopolimera, polikarbonata i polietilena-tereftalata, koji je bio najdominantniji i najčešći polimer (58%).
 - Analizirani parametri (broj čestica mikroplastike po lokalitetu, prosečni broj čestica mikroplastike po jedinki po lokalitetu i prosečni broj čestica mikroplastike po telesnoj masi – g/mokra masa) ukazuju na veće opterećenje pritoka česticama mikroplastike; kao i značajan uticaj pritoka i naseljenih područja na prisustvo mikroplastike u Dunavu;
 - Dominacija PET-a, osnovnog gradivnog materijala većine plastičnih flaša, u uzorcima ukazuje na dominaciju ovog polimera u slivu Dunava, bilo u vidu primarne, bilo u vidu sekundarne mikoplastike (usitnjavanjem plastičnih flaša);
 - Rezultati ove studije potvrdili su da su školjke efikasni test organizmi za procenu opterećenja slatkovodnih ekosistema mikroplastikom.

- Analizom čestica mikroplastike sa različitih aspekata, od laboratorijskog do pasivnog monitoringa, može se zaključiti da je neophodno uvrstiti mikroplastiku kao obavezni parametar standardne procedure analize vode, radi dobijanja relevantnih informacija o njenom prisustvu i pritiscima, kako u životnoj sredini, tako i u organizmima.

Ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos, pre svega u pogledu prikazanih rezultata o detekciji, analizi hemijskog porekla i uticaja mikroplastike na akvatične makrobeskičmenjake u različitim tipovima slatkovodnih ekosistema. Ujedno, predstavlja, osnovu za buduća istraživanja i standardizaciju metoda za praćenje i analizu zagađenja površinskih voda plastičnim otpadom, procene uticaja na biodiverzitet akvatičnih organizama, ali i mogućnost štetnog uticaja na život i zdravlje ljudi. Zahvaljujući podacima iz ove doktorske disertacije, ali i brojnim literaturnim podacima na temu mikroplastike, može se zaključiti da je zagađenje voda sintetičkim produktima, a i ostalih delova biosfere, značajno i da je neophodno razmatrati ovaj problem iz holistički, kako bismo došli do podataka na osnovu koji ćemo biti u mogućnosti da pristupimo rešavanju zagađenja prirode mikroplastikom.

Da bi se upotpunilo znanje o količini, tipu zagađenja ovim polimerima, ali i njihovom dejstvu na živi svet, istraživanje je potrebno vršiti sa različitim pristupima – analiza vode, sedimenta, uzorkovanje pasivnim uzorkivačima, korišćenje različitih vodenih organizama, upotreba kombinacija postavki eksperimenata i analitičkih pristupa. Dodatno, kako bi se moglo zaključivati o globalnom prisustvu i dejstvu plastičnih polimera na većem geografskom prostoru, potrebno je standardizovati metode analize i interpretacije, ali i optimizovati istraživanja.

7. LITERATURA

Achilias, D.S., Roupakias, C., Megalokonomos, P., Lappas, A.A. & Antonakou, E.V., 2007. Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP). *Journal of Hazardous Materials*, 149, 536–542. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.076>

Akindele, E.O., Ehlers, S.M. & Koop, J.H.E., 2019. First empirical study of freshwater microplastics in West Africa using gastropods from Nigeria as bioindicators. *Limnologica*, 78, 125708. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2019.125708>

Alabaster, J.S. & Lloyd, R. (eds), 1980. *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*. London, *Butterworths for the Food and Agriculture Organisation*.

Alfonso, M.B., Scordo, F., Seitz, C., Mavo Manstretta, G.M., Ronda, A.C., Arias, A.H., Tomba, J.P., Silva, L.I., Perillo, G.M.E. & Piccolo, M.C., 2020. First evidence of microplastics in nine lakes across Patagonia (South America). *Science of The Total Environment*, 733, 139385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139385>

Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C. & Mouneyrac, C. (eds.), 2015. *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Elsevier Inc, 125 London Wall, London EC2Y 5AS, UK. Amelia, T.S.M., Khalik, W.M.A.W.M., Ong, M.C., Shao, Y.T., Pan, H.-J. & Bhubalan, K., 2021. Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans. *Progress in Earth and Planetary Science*, 8, 12. <https://doi.org/10.1186/s40645-020-00405-4>

Andersen, T., Cranston, P.S. & Epler, J.H., 2013. The larvae of Chironomidae (Diptera) of the Holarctic region – keys and diagnoses. *Insect Systematics & Evolution, Supplement*, 66, 7-12. DOI: <https://doi.org/10.5324/cjcr.v0i26.1656>

Anderson, J.C., Park, B.J. & Palace, V.P., 2016. Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian ecosystems. *Environmental Pollution*, 218, 269-280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.074>

Andrady, A.L. & Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics, *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 36(1526), 1977–1984. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>

Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. & Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2462–2471. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620181112>

Andjus, S., Nikolić, N., Dobričić, V., Marjanović, A., Gačić, Z., Branković, G., Raković, M. & Paunović, M., 2018. Contribution to the knowledge on the distribution of freshwater sponges - the Danube and Sava rivers case study. *Journal of Limnology*, 77(2), 199–208, DOI: <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1677>

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 2002; Contract No:EVK1-CT1999-00027.

Arambourou, H., Planello, R., Llorente, L., Fuertes, I., Barata, C., Delorme, N., Noury, P., Herrero, O., Villeneuve, A. & Bonnineau, C., 2019. *Chironomus riparius* exposure to field-collected contaminated sediments: from subcellular effect to whole-organism response. *Science of the Total Environment*, 671, 874–882. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.384>

Arias-Andres, M., Kettner, M.T., Miki, T. & Grossart, H-P., 2018. Microplastics: New substrates for heterotrophic activity contribute to altering organic matter cycles in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 635, 1152–1159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.199>

Armitage, P.D., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V., 1995. The Chironomidae: Biology and Ecology of On-Biting Midges, first ed. Chapman and Hall, London, New York. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0715-0.B>

Asenova, M., Gerhard Bannick, C., Bednarz, M., Kerndorff, A., Obermaier, N., Ricking, M., Bordós, G., Braun, U., Eisentraut, P., Kittner, M., Hohenblum, P., Humer, F., Hudcova, H., Němejcová, D., István, T.G., Kirchner, M., Liška, I., Marushevska, O., Oswald, P., Slobodnik, J., Paunović, M., Sengl, M., Spanowsky, K., Tudorache, M. & Wagensohn, H., 2021. Occurrence of microplastics in the Danube River – A first screening. Scientific Report:

A Shared Analysis of the Danube River. *International Commission for the Protection of the Danube River*. 487-500. URL: www.danubsurvey.org/jds4/full-report

Atanacković, A.D., Šporka, F., Csányi, B., Vasiljević, B.M., Tomović, J.M. & Paunović, M.M., 2013. Oligochaeta of the Danube River – a faunistical review. *Biologia*, 68, 269–277. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0155-9>

Atanacković, A.D., Zorić, K.S., Tomović, J.M., Vasiljević, B.M. & Paunović, M.M., 2020. Distributional patterns of aquatic Oligochaeta communities (Annelida: Clitellata) in running waters in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 72(3), 359–372. DOI: <https://doi.org/10.2298/ABS200303030A>

Au, S.Y., Bruce, T.F., Bridges, W.C. & Klaine, S.J., 2015. Responses of *Hyaella azteca* to acute and chronic microplastic exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(11), 2564-2572. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3093>

Avio, C.G., Gorbi, S. & Regoli, F., 2015. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014>

Baldwin, A.K., Spanjer, A.R., Rosen, M.R. & Thom, T., 2020. Microplastics in Lake Mead National Recreation Area, USA: Occurrence and biological uptake. *PLoS ONE*, 15(5), e0228896. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228896>

Bank, M.S. & Hansson, S.V., 2019. The plastic cycle: a novel and holistic paradigm for the Anthropocene. *Environmental Science and Technology*, 53(13), 7177–7179. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02942>

Bank, M.S. & Hansson, S.V., 2022. The Microplastic Cycle: An Introduction to a Complex Issue. In: Bank M.S. (eds) *Microplastic in the Environment: Pattern and Process. Environmental Contamination Remediation and Management. Springer, Cham*. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-78627-4_1

Barnes, D.K.A., 2002. Invasions by marine life on plastic debris. *Nature*, 416, 808-809. DOI: <https://doi.org/10.1038/416808a>

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C. & Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *The Royal Society*, 364 (1526), 1985-1998. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>

Baudrimont, M., Andres, S., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. & Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(11), 2472–2477. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620181113>

Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Galafassi, S., Volta, P. & Bettinetti, R., 2020., Microplastic contamination in freshwater environments: A review, focusing on interactions with sediments and benthic organisms. *Environments*, 7(4), 30. DOI: <https://doi.org/10.3390/environments7040030>

Berg, C.O., 1950. Biology of certain Chironomidae reared from *Potamogeton*. *Ecological Monographs*, 20, 83-101.

Bergmann, M., Mützel, S., Primpke, S., Tekman, M.B., Trachsel, J. & Gerds, G., 2019. White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic. *Science Advances*, 5(8). DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1157>

Bervoets, L., De Bruyn, L., Van Ginneken, L. & Blust, R., 2003. Accumulation of ¹³⁷Cs by larvae of the midge *Chironomus riparius* from sediment: Effect of potassium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(7), 1589-1596. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620220723>

Besseling, E., Wang, B., Lürling, M. & Koelmans, A.A., 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology*, 48(20), 12336–12343. DOI: <https://doi.org/10.1021/es503001d>

Biginagwa, F., Mayoma, B., Shashoua, Y., Syberg, K., & Khan, F., 2016. First evidence of microplastics in the African Great Lakes: Recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia. *Journal of Great Lakes Research*, 42(1), 1146–1149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2015.10.012>

Blaise, C., Sergy, G., Wells, P.G., Bermingham, N. & Van Coillie, R., 1988. Biological testing – development, application and trends in Canadian environmental protection laboratories. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 3, 385-406. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780203747193-1>

Boerger, C.M., Lattin, G.L., Moore, S.L. & Moore, C.J., 2010. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 60 (12), 2275-2278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007>

Bole, J., 1969. Ključi za določevanje živali. IV. Mehkužci – Mollusca. Inštitut za biologijo Univerze v Ljubljani. Društvo biologov Slovenije. Ljubljana. 115.

Bouchet P., 1991. Extinction and preservation of species in the tropical world. What future for Mollusks? *American Malacologists* 20, 20-24.

Brahney, J., Hallerud, M., Heim, E., Hahnenberger, M. & Sukumaran, S., 2020. Plastic rain in protected areas of the United States. *Science*, 368, 1257–1260.

Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Cacador, I. & Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>

Brinkhurst, R.O. & Cook, D.G., 1974. Aquatic earthworms (Annelida: Oligochaeta). In: Hart, C.W., Fuller, S.L. (Eds.), *Pollution Ecology of Freshwater Invertebrates*. Academic Press, New York, 143–156.

Brock, E.M., 1960. Mutualism between the midge *Cricotopus* and the alga *Nostoc*. *Ecology*, 41, 474-483.

Browne, M.A., Galloway, T. & Thompson, R., 2007. Microplastic - an emerging contaminant of potential concern? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, 559-566. DOI: <https://doi.org/10.1002/ieam.5630030412>

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M. & Thompson, R.C., 2008. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026-5031. DOI: <https://doi.org/10.1021/es800249a>

Browne, M.A., Niven, S.J., Galloway, T.S., Rowland, S.J. & Thompson, R.C., 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23, 2388–2392. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.012>

BSC, 2009. Strategic Action Plan for the Environmental Protection and Rehabilitation of the Black Sea. URL: http://www.blacksea-commission.org/_bssap2009.asp

Bucci, K., Tulio, M., & Rochman, C.M., 2020. What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. *Ecological Applications*, 30(2), e02044. DOI: <https://doi.org/10.1002/eap.2044>

Bugoni, L. & Krause, L., 2001. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 42(12), 1330–1334. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(01)00147-3)

Buikema, A. L. Jr., Niederlehner, B.R. & Cairns, J.Jr., 1982. Biological monitoring. Part IV. Toxicity Testing. *Water Research*, 16, 239-262.

Burdett, A., Fencil, J. & Turner, T., 2015. Evaluation of freshwater invertebrate sampling methods in a shallow aridland river (Rio Grande, New Mexico). *Aquatic Biology*, 23, 139–146. DOI: <https://doi.org/10.3354/ab00616>

Burns, E.E. & Boxall, A.B., 2018. Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(11), 2776–2796. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4268>

Butler, G.C. ed., 1978. *Principles of ecotoxicology*. Chichester, United Kingdom: Wiley.

Byrne, R.A. & McMahon, R.F., 1994. Behavioral and physiological responses to emersion in freshwater bivalves. *American Zoologist*, 34(2), 194-204. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/34.2.194>

Cadmus, P., Pomeranz, J. P. F. & Kraus, J. M., 2016. Low-cost floating emergence net and bottle trap: comparison of two designs. *Journal of Freshwater Ecology*, 31(4), 653-658. DOI: <https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1217944>

Calabrese, E.J., 1991. Multiple Chemical Interactions. *Chelsea, MI: Lewis*.

Calle-Martínez, D. & Casas, J.J., 2009. Chironomid species, stream classification, and water-quality assessment: the case of 2 Iberian Mediterranean mountain regions. *Journal of North American Benthological Society*, 25, 465-476. DOI: [https://doi.org/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)

Carpenter, E.J. & Smith, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso sea surface. *Science*, 175(4027), 1240-1241. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.175.4027.1240>

Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P. & Peck, B.B., 1972. Polystyrene spherules in coastal water. *Science*, 178(4062), 749-750. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.178.4062.749>

Castañeda, R.A., Avlijas, S., Anouk Simard, M. & Ricciardi, A., 2014. Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71(12), 1767-1771. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0281>

Castro, G.B., Bernegossi, A.C., Pinheiro, F.R., Felipe, M.C. & Corbi, J.J., 2020. Effects of Polyethylene Microplastics on Freshwater Oligochaeta *Allonais inaequalis* (Stephenson, 1911) Under Conventional and Stressful Exposures. *Water Air, & Soil Pollution*, 231, 475. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04845-y>

Cataldo, D., Colombo, J.C., Boltovskoy, D., Bilos, C. & Landoni, P., 2001. Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environmental Pollution*, 112(3), 379-389. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(00\)00145-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(00)00145-7)

Catarino, A.I., Thompson, R., Sanderson, W. & Henry, T.B., 2017. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 947-951. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3608>

Chang, M., 2015. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 330-333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.074>

Cid, A., Picado, A., Correia, J.B., Chaves, R., Silva, H., Caldeira, J., de Matos, A.P.A. & Diniz, M.S., 2015. Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Journal of Hazardous Materials*, 284, 27-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.055>

Coe J.M. & Rogers D.B. (eds) 1997. Marine debris: sources, impacts, and solutions. *New York, NY: Springer-Verlag.*

Coffman, W.P. & Ferrington Jr, L.C., 1996. Chapter 26: Chironomidae. An Introduction to the Aquatic Insects of North America (3rd Edition). *Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, IA.* 635-754.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S. & Montone, R.C., 2010. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plastics ingested by seabirds. *Marine Pollution Bulletin*, 60(4), 630-634. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.01.018>

Cole, G.A., 1953. Notes on the vertical distribution of organisms in the profundal sediments of Douglas Lake, Michigan. *The American Midland Naturalist*, 49(1), 252-256. DOI: <https://doi.org/10.2307/2422292>

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. & Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J. & Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47, 6646–6655. DOI: <https://doi.org/10.1021/es400663f>

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C. & Galloway, T.S., 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, 4, 4528. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep04528>

Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C. & Galloway, T.S., 2015. The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental Science & Technology*, 49(2), 1130-1137. DOI: <https://doi.org/10.1021/es504525u>

Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C. & Galloway, T.S., 2016. Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environmental Science & Technology*, 50(6), 3239–3246. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05905>

Colton, J.B., Burns, B.R. & Knapp, F.D., 1974. Plastic particles in surface waters of the northwestern Atlantic. *Science*, 185(4150), 491–497. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.185.4150.491>

Corcoran, P.L., Norris, T., Ceccanese, T., Walzak, M.J., Helm, P.A. & Marvin, C.H., 2015. Hidden plastics of Lake Ontario, Canada and their potential preservation in the sediment record. *Environmental Pollution*, 204, 17–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.04.009>

Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Gary, S.F. & Narayanaswamy, B.E., 2017. Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods*, 9(9), 1437–1445. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ay02343f>

Crossland, N.O., 1982. Aquatic toxicology of cypermetrin. II. Fate and biological effects in pond experiments. *Aquatic Toxicology*, 2, 205-222.

Crossland, N.O. & Bennett, D., 1989. Outdoor ponds: their use to evaluate the hazard of organic chemicals in aquatic environments. *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*. Boudoum, A. & Ribeyre, F. (eds). Boca Raton, FL: *CRC Press*, 273-296.

Csányi, B., 2002. Joint Danube Survey: Investigation of the Tisza River and its tributaries. Final Report of the ICPDR/VITUKI, Budapest.

Czeczuga, B., Bobiatynska-Ksok, E. & Niedzwiecki, E. 1968. On the determination of age structure of the larvae of Tendipedidae. *Zoologica Poloniae*, 18(3), 317-328.

Czekanowski, J., 1909. Zur differential Diagnose der Neandertalgruppe. *Korrespondenzblatt der deutschen. Gesellschaft für Anthropologie. Ethnologie und Urgeschichte*, 40, 44–47.

Čanak Atlagić, J., Marić, A., Tubić, B., Andjus, S., Đuknić, J., Marković, V., Paunović, M. & Simonović, P., 2021. What's on the Menu for the Resident Brown Trout in a Rich Limestone Stream? *Water*, 13, 2492. DOI: <https://doi.org/10.3390/w13182492>

Čerba, D., Mihaljević, Z. & Vidaković, J., 2010. Colonisation of temporary macrophyte substratum by midges (Chironomidae: Diptera). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 46(3), 181–190. DOI: <https://doi.org/10.1051/limn/2010015>

DAISIE, 2009. European Invasive Alien Species Gateway. *Research Institute for Nature and Forest (INBO)*. DOI: <https://doi.org/10.15468/ybwd3x>

Danks, H. V. & Oliver, D R. 1972. Diel periodicities of emergence of some high arctic Chironomidae (Diptera). *The Canadian Entomologist*, 104, 903-916.

Darby, R.E., 1962. Midges associated with California rice fields, with special reference to their ecology. *Hilgardia*, 32(1), 1-206. DOI: <https://doi.org/10.3733/hilg.v32n01p001>

de Sá, L.C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T.L. & Futter, M.N., 2018. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of the Total Environment*, 645, 1029–1039. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>

Dehaut, A., Cassone, A.L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G. & Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215, 223–233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>

Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3), 297–302.

Doherty, F.G., 1990. The Asiatic clam, *Corbicula spp.*, as a biological monitor in freshwater environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 15, 143-181. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00398912>

dos Santos, K.C. & Martinez, C.B.R., 2014. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*.

Ecotoxicology and Environmental Safety. 100, 7-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.014>

Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N. & Tassin, B., 2015. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environmental Chemistry*, 12(5), 592–599. DOI: <https://doi.org/10.1071/EN14167>

Dris, R., Gasperi, J. & Tassin, B., 2018. Sources and Fate of Microplastics in Urban Areas: A Focus on Paris Megacity. In: Wagner M., Lambert S. (eds) *Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry*, 58. Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_4

Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H., Ogi, H., Yamashita, R. & Date, T., 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: Variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, 50(10), 1103-1114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.030>

Epler, J., 2001. Identification Manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. A guide to the taxonomy of the midges of the southeastern United States, including Florida. Special Publication SJ2001-SP13. *North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Raleigh, NC, and St. Johns River Water Management District, Palatka, FL*. 526 .

Equipe Cousteau, 1993. Concentration of chemical pollutants in sediments and mussels along the Danube. In: *The Danube... for whom and for what?* Equipe Cousteau's Final Report, Paris, 104–126.

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H. & Amato, S., 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2), 177–182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.007>

European Commission, 2013. GREEN PAPER: On a European Strategy on Plastic Waste in the Environment.

European Commission, 2014, COM/2014/0397. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2008/98/EC on waste, 94/62/EC on packaging and packaging waste, 1999/31/EC on the landfill of waste, 2000/53/EC on end-of-life vehicles, 2006/66/EC on batteries and accumulators and waste batteries and accumulators, and 2012/19/EU on waste electrical and electronic equipment. URL: <http://eur-lex.europa.eu>

European Commission, 2015. Closing the loop: Commission adopts ambitious new Circular Economy Package to boost competitiveness, create jobs and generate sustainable growth. Press release, Brussels, 2 December 2015, IP/15/6203. URL: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-15-6203_en.htm

European Commission, 2018. Closing the loop: Plastic Waste: a European strategy to protect the planet, defend our citizens and empower our industries. Press release, Brussels, 16 January 2015, IP/18/5. URL: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-18-5_en.htm

European Union, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Water Framework Directive (WFD). URL: <http://eur-lex.europa.eu>

European Union, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. URL: <http://eurlex.europa.eu>

Everaert, G., Van Cauwenberghe, L., De Rijcke, M., Koelmans, A.A., Mees, J., Vandegehuchte, M. & Janssen, C.R., 2018. Risk assessment of microplastics in the ocean: Modelling approach and first conclusions. *Environmental Pollution*, 242, 1930–1938. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.069>

Faure, F., Demars, C., Wieser, O., Kunz, M. & de Alencastro, L.F., 2015. Plastic pollution in Swiss surface waters: Nature and concentrations, interaction with pollutants. *Environmental Chemistry*, 12(5), 582–591. DOI: <https://doi.org/10.1071/EN14218>

Fendall, L.S. & Sewell, M.A., 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1225-1228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>

Ferreira, T. & Rasband, W., 2012. ImageJ User Guide. URL: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>

Ferrington, L.C., 2008. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 447-455. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9130-1>.

Finney, D.J., 1978. *Statistical Methods in Biological Assay*. Third edition, London: Griffin.

Foekema, E.M., De Gruijter, C., Mergia, M.T., van Franeker, J.A., Murk, A.J. & Koelmans, A.A., 2013. Plastic in north sea fish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8818–8824. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es400931b>

Foley, C.J., Feiner, Z.S., Malinich, T.D., & Höök, T.O., 2018. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*, 631–632, 550–559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.046>

Food and Agricultural Organization (FAO), 2013. Edible insects. Future prospects for food and feed security. Food and agriculture organization of the United Nations. Rome. URL: <http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf>

Foote, B., 1987. Chironomidae (Chironomoidea). In Stehr, F., (ed.) *Immature Insects*, Vol. 2. Dubuque, Iowa, USA: Kendall/Hunt Publishing Company, 762-764.

Ford, J.B., 1962. The vertical distribution of larval Chironomidae in the mud of a stream. *Hydrobiologia*, 19, 262-272. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00040383>

Fowler, C.W., 1987. Marine debris and northern fur seals: A case study. *Marine Pollution Bulletin*, 18(6), 326–335. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(87\)80020-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(87)80020-6)

Frouz, J., Lobinske, R. J., & Ali, A., 2009. Intraspecific competition of *Glyptotendipes paripes* (Diptera: Chironomidae) larvae under laboratory conditions. *Aquatic Ecology*, 43(2), 487–500. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10452-008-9178-7>

Fueser, H., Mueller, M.-T., Weiss, L., Höss, S. & Traunspurger, W., 2019. Ingestion of microplastics by nematodes depends on feeding strategy and buccal cavity size. *Environmental Pollution*, 255(2), 113227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113227>

Fueser, H., Mueller, M.-T. & Traunspurger, W., 2020. Ingestion of microplastics by meiobenthic communities in small-scale microcosm experiments. *Science of the Total Environment*, 746, 141276. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141276>

Gallo, M.A. & Doull, J., 1991. Chapter 1. History and scope of toxicology. Toxicology. The basic Science of Poisons, 4th ed., Amdur, M.O., Doull, J. & Klaassen (eds), 3-11. *New York: Pergamon*.

Galloway, T.S., Cole, M. & Lewis, C., 2017. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution*, 1, 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>

Gavrilović, Lj. & Dukić, D., 2002. Reke Srbije. *Zavod za udzbenike i nastavna sredstva*, Beograd, ISBN 86-17-06873-6.

Giddings, J.M., Franco, P.J., Bartell, S.M., Cushman, R.M., Herbes, S.E., Hook, L.A., Newbold, J.D., Southworth, G.R. & Stewart, A.J., 1985. Effects of Contaminants on Aquatic Ecosystems: Experiments with Microcosms and Outdoor Ponds. *ORNL Environmental Sciences Division*, 2381.

Giddings, J.M., Biever, R.C., Helm, R.L., Howich, G.L. & deNoyelles, F.J., 1993. The fate and effects of Guthion (azinphos methyl) in mesocosms. *Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment*. Graney, R.L., Kennedy, J.H. & Lewis, J.H. Rodgers (eds), *Boca Raton, FL: Lewis*, 469-496.

Graf, W., Csányi, B., Leitner, P., Paunović, M., Chiriac, G., Stubauer, I., Ofenböck, T. & Wagner, F., 2008. Macroinvertebrate. In: Liška, I., Wagner, F., J. Slobodnik, *Joint Danube*

Survey 2 - Final Scientific Report, ICPDR - International Commission for The Protection of The Danube River, Vienna, 41-47. URL:

[http://www.danubesurvey.org/jds2/files/ICPDR Technical Report for web low corrected.pdf](http://www.danubesurvey.org/jds2/files/ICPDR_Technical_Report_for_web_low_corrected.pdf)

Graney, R.L., Kennedy, J.H. & Rodgers, J.H., 1994. Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment. First edition. *CRC Press*, Boca Raton, 1-736. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003070016>

Gray, J.S., 1989. Effects of environmental stress on species rich assemblages. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2), 19–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1989.tb02003.x>

GESAMP, 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Kershaw, P. J., (ed.) (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). *Report Study GESAMP No. 90-96*. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3803.7925>

Geyer, R., Jambeck, J.R. & Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 1700782. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>

González-Pleiter, M., Velázquez, D., Edo, C., Carretero, O., Gago, J., Barón-Sola, Á., Hernández, L.E., Yousef, I., Quesada, A., Leganés, F., Rosal, R. & Fernández-Piñas, F., 2020. Fibers spreading worldwide: Microplastics and other anthropogenic litter in an Arctic freshwater lake. *Science of the Total Environment*, 722, 137904. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137904>

Gregory, M.R., 2009. Environmental implications of plastic debris in marine setting - entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364(1526), 2013-2025. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0265>

Güven, O., Gökdağ, K., Jovanović, B. & Kıdeys, A.E., 2017. Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in

the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution*, 223, 286-294. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.025>

Hahladakis, J.N., Velis, C.A., Weber, R., Iacovidou, E. & Purnell, P., 2018. An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>

Hamilton, A.L., 1965. An analysis of a freshwater benthic community with special reference to the Chironomidae. PhD thesis, Univ. British Columbia, Vancouver

Hansen, P.-D., 2003. Biomarkers. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, 6, 203-220. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80136-4](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80136-4)

Haward, M., 2020. Science-based solutions to plastic pollution. *One Earth*, 2(1), 5–7 ISSN 2590-3322. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.01.004>

Henriques-Oliveira, A.L., Nessimian, J.L. & Dorville, L.F.M., 2003. Feeding habits of Chironomid larvae (Insecta: Diptera) from a stream in the Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 63(2), 269-281. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842003000200012>

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C. & Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>

Hilsenhoff, W.L., 1966. The biology of *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) in Lake Winnebago, Wisconsin. *Annals of the Entomological Society of America*, 59(3), 465-473. DOI: <https://doi.org/10.1093/aesa/59.3.465>

Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Kwan, C., Moore, C., Gray, H., Laursen, D., Zettler, E.R., Farrington, J.W., Reddy, C.M., Peacock, E.E. & Ward, M.W., 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1683–1692. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.004>

Hitchcock, J.N., 2020. Storm events as key moments of microplastic contamination in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 734, 139436. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139436>

Hodkinson, I.D. & Williams, K.A., 1980. Tube formation and distribution of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae) in a eutrophic woodland pond. In *Chironomidae Ecology, Systematics Cytology and Physiology*, ed. D. A. Murray, *Oxford: Pergamon*, 354, 331 - 337. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-025889-8.50051-9>

Hoellein, T.J. & Rochman, C.M., 2021. The “plastic cycle”: a watershed-scale model of plastic pools and fluxes. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 19(3), 176-183. DOI: <https://doi.org/10.1002/fee.2294>

Hohenblum, P., Liebmann, B. & Liedermann, M., 2015. Plastic and Microplastic in the environment. The Environment Agency Austria, Vienna.

Holker, F., Vanni, M.J., Kuiper, J.J., Meile, C., Grossart, H.P., Stief, P., Adrian, R., Lorke, A., Dellwig, O., Brand, A., Hupfer, M., Mooij, W.M., Nützmann, G. & Lewandowski, J., 2015. Tube-dwelling invertebrates: tiny ecosystem engineers have large effects in lake ecosystems. *Ecological Monographs*, 85(3), 333-351. DOI: <https://doi.org/10.1890/14-1160.1>

Horton, A.A., Jürgens, M.D., Lahive, E., van Bodegom, P.M. & Vijver, M.G., 2018. The influence of exposure and physiology on microplastic ingestion by the freshwater fish *Rutilus rutilus* (roach) in the River Thames, UK. *Environmental Pollution*, 236, 188–194. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.044>

Hrabě S. 1981. Vodní máloštětinatci (Oligochaeta) Československa Acta Universitatis Carolinae, *Biologica*, 167.

Huang, Y., Li, W., Gao, J., Wang, F., Yang, W., Han, L., Lin, D., Min, B., Zhi, Y., Grieger, K. & Yao J. 2021. Effect of microplastics on ecosystem functioning: Microbial nitrogen removal mediated by benthic invertebrates. *Science of The Total Environment*, 754, 142133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142133>

Hurley, R.R., Woodward, J.C. & Rothwell, J.J., 2017. Ingestion of microplastics by freshwater tubifex worms. *Environmental Science & Technology*, 51(21), 12844–12851. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03567>

Hurley, R., Woodward, J. & Rothwell, J.J., 2018. Microplastic contamination of river beds significantly reduced by catchment-wide flooding. *Nature Geoscience*. 11, 251-257. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0080-1>

Hurley, J., Hardege, J., Wollenberg Valero, K. C. & Morley, S., 2021. In situ microplastics ingestion by Antarctic marine benthic invertebrates. EGU General Assembly 2021, online, 19–30 Apr 2021, EGU21-10252, DOI: <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu21-10252>

Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R. & Laforsch, C., 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology*, 23(19), 867– 868. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.001>

Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R. & Boudou, A., 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere*, 35(12), 2817-2836. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00342-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00342-1)

Jaccard, P., 1901. Distribution de la flore alpine dans le Bassin des Drouces et dans quelques regions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37(140), 241–272.

Jambeck, J.R., Andrady, A., Geyer, R., Narayan, R., Perryman, M., Siegler, T., Wilcox, C. & Lavender Law, K., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347, 768-771.

Jamieson, A.J., Brooks, L.S.R., Reid, W.D.K., Piertney, S.B., Narayanaswamy, B.E. & Linley, T.D., 2019. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. *Royal Society Open Science*, 6, 180667. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.180667>

Janković M., 1971. Anzahl der Generationen der Art *Chironomus plumosus* in den Karpfenteichen Serbiens. *Limnologica*, 8, 203-210.

Johnson, P.D., Kennedy, J.H., Morris, R.G. & Hambleton, F.E., 1993. Fate and effects of Cyfluthrin (pyrethroid insecticide) in pond mesocosms and concrete microcosms. *Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment*. Graney, R.L., Kennedy, J.H. & Lewis, J.H. Rodgers (eds). *Boca Raton, FL: Lewis*, 337-372.

Johnson, P.D. & McMahon, R.F., 1998. Effects of temperature and chronic hypoxia on survivorship of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(7), 1564-1572. DOI: <https://doi.org/10.1139/f98-030>

Jovanović, S. & Đonlagić, J., 2004. Hemija makromolekula. *Tehnološko-metalurški fakultet*. ISBN 8674011810, 9788674011812, 307.

Jovanović, B., Milošević, D., Stojković Piperac, M. & Savić, A., 2016. In situ effects of titanium dioxide nanoparticles on community structure of freshwater benthic macroinvertebrates. *Environmental Pollution*, 213, 278–282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.024>

Jovanović, B., 2017. Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 510–515. DOI: <https://doi.org/10.1002/ieam.1913>

Jovanović-Marić, J., Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Sunjog, K., Kostić-Vuković, J., Deutschmann, B., Hollert, H., Tenji, D., Paunović M. & Vuković-Gačić, B., 2020. Selection of assay, organism, and approach in biomonitoring significantly affects the evaluation of genotoxic potential in aquatic environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 33903–33915. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09597-0>

Kalčíková, G., Alič, B., Skalar, T., Bundschuh, M. & Žgajnar Gotvajn, A., 2017. Wastewater treatment plant effluents as source of cosmetic polyethylene microbeads to freshwater. *Chemosphere*, 188, 25-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.131>

Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Romano, N., Ho, Y.B. & Salamatinia, B., 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of The Total Environment*, 578, 485–494. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.213>

Karlsson, T.M., Vethaak, A.D., Almroth, B.C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M. & Leslie, H.A., 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.081>

Katare, Y., Singh, P., Sankhla, M.S., Singhal, M., Jadhav, E.B., Parihar, K., Nikalje, B.T., Trpathi, A. & Bhardwaj, L., 2022. Microplastics in Aquatic Environments: Sources, Ecotoxicity, Detection & Remediation. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(3), 3407-3428. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.34073428>

Keresztes, S., Tatár, E., Czégény, Z., Zárny, G. & Mihucz, V.G., 2013. Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water. *Science of The Total Environment*, 458-460, 451-458. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.056>

Klein, S., Dimzon, I.K., Eubeler, J. & Knepper, T.P., 2018. Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment. In: Wagner M., Lambert S. (eds) Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 58. *Springer, Cham*. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_3

Klein, S., Worch, E. & Knepper, T.P., 2015. Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the Rhine-Main area in Germany. *Environmental Science & Technology*, 49(10), 6070–6076. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00492>

Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, 353-357. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>

Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K. & Shi, H., 2018. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion.

Science of The Total Environment, 610-611, 635–640. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.053>

Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A. & Foekema, E.M., 2013. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: A model analysis. *Environmental Science & Technology*, 47(14), 7812–7820. DOI: <https://doi.org/10.1021/es401169n>

Koelmans, A.A., Besseling, E. & Foekema, E.M., 2014. Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental Pollution*, 187, 49-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.013>

Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J. & Vuković-Gačić, B., 2015. Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Science of the Total Environment*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.061>

Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Atanacković, A., Marković, A., Gačić, Z., Paunović, M. & Vuković-Gačić, B., 2015. Effects of 5-Fluorouracil, Etoposide and CdCl₂ in Aquatic Oligochaeta *Limnodrilus udekemianus* Claparede (Tubificidae) Measured by Comet Assay. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 242. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2511-6>

Kureck, A., 1979. Two circadian eclosion times in *Chironomus thummi* (Diptera), alternately selected with different temperatures. *Oecologia*, 40, 311-323.

Latini, G., Verrotti, A. & De Felice, C., 2004. DI-2-Ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: A review. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 4(1), 37-40. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568008043340017>

Lászlóffy, W., 1967. Die Hydrographie der Donau. In: Liepold, R. (ed). *Limnologie der Donau*, E. Schweizerbart'sche, Verlagbuchhandlung, Stuttgart, 16–57.

Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M. & Schludermann, E., 2014. The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter

outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environmental Pollution*, 188, 177–181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.006>

Lechthaler, S., Waldschläger, K., Stauch, G. & Schüttrumpf, H., 2020. The way of microplastic through the environment. *Environments* 7(10), 73. DOI: <https://doi.org/10.3390/environments7100073>

Lee, H. & Kim, Y., 2018. Treatment characteristics of microplastics at biological sewage treatment facilities in Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.050>

Lelhik, J., 1968. Positive Phototaxis der Chironomiden-Larvulae als regulierender Faktor ihrer Verteilung in stehenden Gewässern. *Annales Zoologici Fennici*, 5, 84-87.

Leuven, R.S.E.W., Brock, T.C.M. & van Druten, H.A.M., 1985. Effects of preservation on dry- and ash-free dry weight biomass of some common aquatic macroinvertebrates. *Hydrobiologia* 127(2), 151–159. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00004193>

Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H. & Rotchell, J.M., 2018. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental Pollution*, 241, 35–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.038>

Li, L., Geng, S., Wu, C., Song, K., Sun, F., Visvanathan, C., Xie, F. & Wang, Q., 2019. Microplastics contamination in different trophic state lakes along the middle and lower reaches of Yangtze River Basin. *Environmental Pollution*, 254, 112951. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.119>

Liebmann, B., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Reiberger, T. & Schwabl, P., 2018. Assessment of microplastic concentrations in human stool: Preliminary results of a prospective study. *United European Gastroenterology Journal*, 6(1), A127.

Lin, C.T., Chiu, M.C. & Kuo, M.H., 2021. Effects of anthropogenic activities on microplastics in deposit-feeders (Diptera: Chironomidae) in an urban river of Taiwan. *Scientific Reports*, 11, 400. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79881-z>

Liepolt, R., 1967. Limnologie der Donau. *Schweizerbart'sche Verl*, Stuttgart, 591.

Linevich, A.A., 1971. The Chironomidae of Lake Baikal. *Limnologica* (Berlin) 8: 51–52.

Literáthy, P., Koller-Kreiml, V. & Liška, I. (eds) 2002. Final report of the Joined Danube Survey. Technical Report of the International Commission for the Protection of the Danube River (ICPDR), Vienna. 262

Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K. & Slobodník, J., 2015. Joint Danube Survey 3: A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. International Commission for the Protection of the Danube River and European Commission, Vienna.

Lopes, C., Péry, A.R.R., Chaumot, A. & Charles, S., 2005. Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling*, 188(1), 30-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.05.004>

Lusher, A.L., McHugh, M. & Thompson, R.C., 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67, 94–99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028>

Lusher, A., O'Donnell, C., Officer, R. & O'Connor, I., 2016. Microplastic interactions with North Atlantic mesopelagic fish. *ICES Journal of Marine Science*, 73(4), 1214–1225. DOI: <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv241>

Lusher, A., Hollman, P. & Mendoza-Hill, J., 2017. Microplastics in Fisheries and Aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

Ma, H., Pu, S., Liu, S., Bai, Y., Mandal, S. & Xing, B., 2020. Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences. *Environmental Pollution*, 261, 114089. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114089>

Macan, T.T. & Cooper, D.R., 1994. A Key to the British Fresh- and Brackishwater Gastropods with Notes on their Ecology. 4th ed. Scientific Publication 13. *Freshwater Biological Association*, Ambleside, UK.

Mackey, A.P., 1977. Growth and development of larval Chironomidae. *Oikos*, 28, 270-275.

Mackie, G.L. & Claudi, R., 2010. Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Systems. *CRC Press*, Florida, 550. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781439804414>

Mani, T., Hauk, A., Walter, U. & Burkhardt-Holm, P., 2015. Microplastics profile along the Rhine River. *Scientific Reports*, 5, 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep17988>

Marinković, N., Karadžić, B., Slavevska Stamenković, V., Pešić, V., Nikolić, V., Paunović, M. & Raković, M., 2020. Chorological and Ecological Differentiation of the Commonest Leech Species from the Suborder Erpobdelliformes (Arhynchobdellida, Hirudinea) on the Balkan Peninsula. *Water*, 12(2), 356. DOI: <https://doi.org/10.3390/w12020356>

Martinovic-Vitanovic, V., Raković, M., Popovic, N. & Kalafatić, V., 2013. Qualitative study of Mollusca communities in the Serbian Danube stretch (river km 1260–863.4). *Biologia*, 68(1), 112-130. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0137-3>

Marturano, V., Cerruti, P. & Ambrogi, V., 2017. Polymer additives. *Physical Sciences Reviews*, 2(6), 20160130. DOI: <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0130>

Marziali, L., Armanini, D.G., Cazzola, M., Erba, S., Toppi, E., Buffagni A. & Rossaro, B., 2010. Responses of Chironomid larvae (insecta, Diptera) to ecological quality in Mediterranean river mesohabitats (South Italy). *River Research and Applications* 26(8), 1036–1051. DOI: <https://doi.org/10.1002/rra.1303>

Mascarenhas, R., Santos, R. & Zeppelini, D., 2004. Plastic debris ingestion by sea turtle in Paraíba, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 49(4), 354–355. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-476620151053265270>

Masse, L., Kennedy, K. & Chou, S., 2001. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology*, 77, 145-155. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00146-2)

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C. & Kaminuma, T., 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment.

Environmental Science & Technology, 35(2), 318-324. DOI: <https://doi.org/10.1021/es0010498>

Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, I., Mouchel, O., Soudant, P., Robbens, J., Huvet, A. & Zambonino-Infante, J., 2015. Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine Environmental Research*, 112, 78-85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.009>

McCafferty, W., 1983. Aquatic Entomology: The Fishermen's and Ecologists' Illustrated Guide to Insect and Their Relatives. Boston, Massachusetts, USA: *Jones and Bartlett Publishers, Inc.*

McCarty, L.S. & Mackay, D., 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environmental Science & Technology*, 27, 1719-1728.

McCormick, A., Hoellein, T., Mason, S.A., Schluep, J. & Kelly, J.J., 2014. Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environmental Science & Technology* 48, 11863-11871, DOI: <https://doi.org/10.1021/es503610r>

McMahon, R.F., 1999. Invasive characteristics of the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. In Claudi, R. & Leach J.H. (eds) Nonindigenous Freshwater Organisms: Vectors, Biology and Impacts, *Lewis Publishers, CRC Press, London*, 315–343.

McMahon, R.F. & Bogan, A.E., 2001. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. In: Mollusca: Bivalvia (2nd edition). Thorp, J.H. & Covich, A.P. (eds). *Academic Press*, San Diego. 331-429.

McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59, 1235–1244. DOI: <https://doi.org/10.1139/f02-105>

McLachlan, A.J. & Cantrell, M.A., 1976. Sediment development and its influence on the distribution and tube structure of *Chironomus plumosus* L. (Chironomidae, Diptera) in a new impoundment. *Freshwater Biology*, 6, 437-443. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1976.tb01632.x>

McLachlan, A., 1985. The relationship between habitat predictability and wing length in midges (Chironomidae). *Oikos*, 44, 391-97. DOI: <https://doi.org/10.2307/3565779>

Medeiros, A.S., Milošević, D., Francis, D.R., Maddison, E., Woodroffe, S., Long, A., Walker, I.R., Hamerlik, L., Quinlan, R., Langdon, P., Brodersen, K.P. & Axford, Y., 2020. Arctic chironomids of the northwest North Atlantic reflect environmental and biogeographic gradients. *Journal of Biogeography*, 48(3), 511–525. DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.14015>

Merritt, R.W. & Cummins, K.W., 1996. An introduction to the aquatic insects of North America, 3rd edition. *Kendall/Hunt*, Dubuque, Iowa, USA.

Merritt, R.W., Cummins, K.W., Berg, M.B., Novak, J.A., Higgins, M.J., Wessel, K.J. & Lessard, J.L., 2002. Development and application of a macroinvertebrate functional-group approach in the bioassessment of remnant river oxbows in southwest Florida. *Journal of the North American Benthological Society*, 21(2), 290–310.

Milošević, D., Simić, V., Stojković, M., Čerba, D., Mančev, D., Petrović, A. & Paunović, M., 2013. Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: Toward the use of non-biting midges in bioassessment programs. *Aquatic Ecology*, 47, 37–55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10452-012-9423-y>

Milošević, D., Mančev, D., Čerba, D., Stojković, M., Popović, N., Atanacković, A., Đuknić, J., Simić, V. & Paunović, M., 2018. The potential of chironomid larvae-based metrics in the bioassessment of non-wadeable rivers. *Science of the Total Environment*, 616–617, 472–479. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10452-012-9423-y>

Milošević, D., Milosavljević, A., Predić, B., Medeiros, A.S., Savić-Zdravković, D., Stojković Piperac, M., Kostić, T., Spasić, F. & Leese, F., 2020. Application of deep learning in aquatic bioassessment: Towards automated identification of non-biting midges. *Science of The Total Environment*, 711, 135160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135160>

Moller Pillot H. De larven der Nederlandse Chironomiae (Diptera). 1A: Inleiding, Tanypodinae en Chironomini. *St E I S Nederland, Leiden* (German) 1984a.

Moller Pillot, H. De larven der Nederlandse Chironomiae (Diptera). 1B: Orthocladiinae sensu lato. *St E I S Nederland, Leiden* (German) 1984b.

Moore, C.J., Moore, S.L., Leecaster, M.K. & Weisberg, S.B., 2001. A comparison of plastic ad plankton in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 42 (12), 1297-1300. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00114-X)

Moore, C.J., Lattin, G.L. & Zellers, A.F., 2011. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 11(1), 65-73. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=388340132008>

Morad, M.R., Khalili, A., Roskosch, A. & Lewandowski, J., 2010. Quantification of pumping rate of *Chironomus plumosus* larvae in natural burrows. *Aquatic Ecology*, 44(1), 141-153. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10452-009-9259-2>

Moret-Ferguson, S., Law, K.L., Proskurowski, G., Murphy, E.K., Peacock, E.E. & Reddy, C.M., 2010. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 60(10), 1873-1878. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.020>

Morritt, D., Stefanoudis, P.V., Pearce, D., Crimmen, A. & Clark, P.F., 2014. Plastic in the Thames: a river runs through it. *Marine Pollution Bulletin*, 78(1-2), 196–200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.035>

Mozley, S.C., 1979. Neglected characters in larval morphology as tools in taxonomy and phylogeny of Chironomidae (Diptera). *Entomologica Scandinavica Supplement*, 10, 27-36.

Mundie, J.H., 1956. The biology of flies associated with water supply. *Journal of the Institution of Public Health Engineers*, 55, 178-193.

Murphy, J., 2001. Additives for Plastics Handbook. Second edition. *Elsevier Science Ltd*, The Boulevard, Langford Lane, Kindlington, Oxford OX5 1GB, UK.

Naji, A., Nuri, M. & Vethaak, A.D., 2018. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environmental Pollution*, 235, 113–120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.046>

Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J. & Thompson, R.C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin* 99(1-2), 178-185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.029>

Nelms, S.E., Galloway, T.S., Godley, B.J., Jarvis, D.S. & Lindeque, P.K., 2018. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution*, 238, 999–1007.

Nilsson, A., 1997. Aquatic Insects of North Europe: A Taxonomic Handbook, Vol 2. *Apollo Books*, Steenstrup, Denmark.

Nolte, U., 1993. Egg masses of Chironomidae (Diptera): a review, including new observations and a preliminary key. *Scandinavian Entomology Limited*. 4, 35-75.

Nuelle, M.-T., Dekiff, J.H., Remy, D. & Fries, E., 2014. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*, 184, 161–169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.027>

Odum, E.P., 1984. The mesocosm. *BioScience*, 34, 558-562.

OECD, 2004a. The 2004 OECD List of High Production Volume Chemicals, *OECD Publishing*, Paris. URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/33883530.pdf>

OECD, 2004b. Decision of the Council C(2001)107/Final Concerning the Control of Transboundary Movements of Wastes Destined for Recovery Operations, as Amended by C(2004)20. *OECD Publishing*, Paris. URL: [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=C\(2004\)20&docLanguage=En](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=C(2004)20&docLanguage=En)

OECD, 2004c. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. *OECD Publishing*, Paris. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>

OECD, 2004d. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. *OECD Publishing*, Paris. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070288-en>

Oehlmann, J.R., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W. & Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364(1526), 2047–2062. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0242>

Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M.Z., Quang Dung, L., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H.K., Weets, S., McClurg, T., Burres, E., Smith, W., Van Velkenburg, M., Selby-Lang, J., Lang, R.C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N. & Thompson, R.C., 2009. International Pellet Watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal water.1. Initial phase on PCB, DDT and HCHs. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1437–1446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.014>

Ogilvie, S.C. & Mitchell, S.F., 1995. A model of mussel filtration in a shallow New Zealand lake, with reference to eutrophication control. *Archiv fur Hydrobiologie*, 133, 471-482.

Olafsson, J.S., 1992. A comparative study on mouthpart morphology of certain larvae of Chironomina (Diptera: Chironomidae) with reference to the larval feeding habits. *Journal of Zoology*, London, 228, 183-204.

Oliveira, P., Barboza, L.G.A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C. & Guilhermino, L., 2018. Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 155-163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062>

Oliver, D.R., 1971. Life history of the Chironomidae. *Annual Review of Entomology*, 16: 211-230.

Ostrovsky, I., Gophen, M. & Kalikhman, I., 1993. Distribution, growth, production, and ecological significance of the clam *Unio terminalis* in Lake Kinneret, Israel. *Hydrobiologia*, 271, 49-63.

Palmén, E. 1955. Diel periodicity of pupal emergence in natural populations of some chironomids (Diptera). Suom. Eliiin-ja Kasvitiet. *Seuran Vanamon Julk*, 17, 1-30.

Park, K. & Kwak, I.-S., 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere*, 74(1), 89-95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.041>

Park, K. & Kwak, I.-S., 2010. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere*, 79(9), 934-941. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.002>

Paunović, M., Jakovcev-Todorović, D., Simić, V., Nenadić, D., Stojanović, B. & Cakić, P., 2007a. Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429–925). *Biologia*, 62(2), 214-221. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0032-5>

Paunović, M., Csányi, B., Knežević, S., Simić, V., Nenadić, D., Jakovcev-Todorović, D., Stojanović, B. & Cakić, P., 2007b. Distribution of Asian clams *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) and *C. fluminalis* (Müller, 1774) in Serbia. *Aquatic Invasions* 2. 99-106. DOI: <https://doi.org/10.3391/ai.2007.2.2.3>

Paunović, M., Borković, S., Pavlović, S., Saičić, Z. & Cakić, P., 2008. Results of the 2006 Sava survey – aquatic macroinvertebrates. *Archives of Biological Sciences*, 60, 265-270.

Paunović, M., Tubić, B., Kračun, M., Marković, V., Simić, V., Zorić, K. & Atanacković, A., 2012. Ecoregions Delineation for the Territory of Serbia. *Water Research and Management*, 2(1), 65-74. URL: <https://www.wrmjournal.com/index.php/wrm/article/view/29>

Paunović, M., Csányi, B., Simonović, P. & Zorić K., 2015. Invasive Alien Species in the Danube. In: Liska I. (eds) *The Danube River Basin. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 39. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-28137-6_376

Pedersen, A.F., Gopalakrishnan, K., Boegehold, A.G., Peraino, N.J., Westrick, J.A. & Kashian, D.R., 2020. Microplastic ingestion by quagga mussels, *Dreissena bugensis*, and its effects on physiological processes. *Environmental Pollution*, 260, 113964. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113964>

Petersen, J.E., Kennedy, V.S., Dennison, W.C. & Kemp, W.M. (eds.), 2009. Enclosed Experimental Ecosystems and Scale: Tools for Understanding and Managing Coastal Ecosystems. *Springer Science & Business Media*, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-76767-3>

Pfleger, V., 1999 A field guide in colour to Molluscs. Blitz Editions. Leicester. UK. 216.

Pfleger, V., 2000. A field guide in colour to Molluscs. *Silverdale Books*, Prague, Czech, 216.

Phelps, H.L., 1994. The Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) invasion and system-level ecological change in the Potomac River Estuary near Washington, D.C. *Estuaries*, 17, 614-621.

Pinder, L. C. V. , Reiss, F. 1983. The larvae of Chironominae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region Keys and diagnoses. *Entomol. Scand. Suppl.* 19: 293—435.

Pinder, L., 1986. Biology of freshwater chironomidae. *Annual Review of Entomology*, 31, 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.31.010186.000245>

PlasticsEurope, 2008. Compelling facts about plastics. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2008. URL: <http://www.plasticseurope.org/Documents/Document/20100225141556Brochure>

PlasticsEurope, 2017. Plastics—The Facts 2017. PlasticsEurope, Brussels, Belgium. URL: https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf

PlasticsEurope, 2018. Plastics—The facts 2018: An analysis of European plastics production, demand and waste data. Brussels, Belgium. URL: https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_webpdf

PlasticsEurope, 2019. Plastics—The facts 2019: An analysis of European plastics production, demand and waste data. Brussels, Belgium. URL:

https://www.plasticseurope.org/application/files/1115/7236/4388/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019pdf

Plastics Europe, 2020. Plastics — the facts 2020. An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Plastics Europe, 2021. Plastics — the facts 2021. An analysis of European plastics production, demand and waste data. URL: <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>

Popović, N., Jovanović, V., Raković, M., Kalafatić, V. & Martinović-Vitanović, V., 2013. Bottom Fauna Qualitative Study of the Danube River in Belgrade Region. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65(4), 505-516.

Popović, N., Raković, M., Đuknić, J., Csányi, B., Szekeres, J., Borza, P., Slobodnik, J., Liška, I., Milošević, Đ., Kolarević, S., Simić, V., Tubić, B. & Paunović, M., 2020. The relationship between river basin specific (RBS) pollutants and macroinvertebrate communities. *Journal of Limnology*, 79(1). <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2019.1915>

Pratt, J.R., Bowers, N.J. & Cairns, J.Jr., 1990. Effect of sediment on estimates of diquat toxicity in laboratory microcosms. *Water Research*, 24, 51-57.

Prokić, M.D., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Gavrić, J.P., Petrović, T.G., Despotović, S.G. & Faggio, C., 2021. Studying microplastics: lessons from evaluated literature on animal model organisms and experimental approaches, *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125476>

Raković, M., Popovic, N., Kalafatic, V. & Martinovic-Vitanovic, V., 2013. Spreading of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in the Danube River (Serbia). *Acta zoologica bulgarica*, 65(3), 349-357.

Raković, M., 2015. Diverzitet mekušaca Dunava (1260 - 863,5 rkm) i taksonomska analiza rodova *Planorbarius*, *Radix*, *Physella* i *Ferrissia* (Pulmonata: Basommatophora). Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 166.

Raković, M., Petrović, A., Popović, N., Đuknić, J., Naunović, Z. & Paunović, M., 2016. Haplotype variation in the *Physa acuta* group (Basommatophora): genetic diversity and

distribution in Serbia. *Mediterranean Marine Science*, 17(1), 292-301. DOI: <https://doi.org/10.12681/mms.1453>

Raković, M., Paunović, M., Tomović, J., Popović, N., Csányi, B., Jovanović, M., Glöer, P. & Pešić, V., 2020. Do Molluscs Assemblages Reflect River Typology: A Case Study of Montenegro. In: Pešić, V., Paunović, M. & Kostianoy, A. (eds). *The Rivers of Montenegro. The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, DOI: https://doi.org/10.1007/698_2020_487

Raković, M., Stanković, J., Milošević, D., Tomović, J., Popović, N., Atanacković, A. & Paunović, M., 2021. JDS4 – Prisustvo čestica mikroplastike u tkivu slatkovodne školjke - *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) u Dunavu. Voda 2021: 50. godišnja konferencija o aktuelnim temama korišćenja i zaštite voda, Zlatibor, Zbornik radova. *Srpsko društvo za zaštitu voda*, Beograd, 109-116. URL: <http://radar.ibiss.bg.ac.rs/handle/123456789/4733>

Raković, M., Tomović, J., Popović, Pešić, V., Dmitrović, D., Stamenković, V.S., Hinić, J., Stefanovska, N., Lajtner, J. & Paunović, M., 2022. Gastropods in Small Water Bodies of the Western Balkans—Endangerments and Threats. In Pešić, V., Milošević, D. & Miliša, M., (eds). *Small Water Bodies of the Western Balkans*. Cham: Springer, 227–249. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-86478-1_11

Rand, G.M. ed., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. Second edition 2000, CRC press.

Rand, G.M. & Petrocelli, S.R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Washington: Hemisphere Publishing. ISBN 0-89116-382-4.

Redondo-Hasselerharm, P.E., Falahudin, D., Peeters, E.T.H.M. & Koelmans, A.A., 2018. Microplastic effect thresholds for freshwater benthic macroinvertebrates. *Environmental Science & Technology*, 52(4), 2278–2286. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05367>

Redondo-Hasselerharm, P.E., Gort, G., Peeters, E.T.H.M. & Koelmans, A.A., 2020. Nano- and microplastics affect the composition of freshwater benthic communities in the long term. *Science Advances*, 6(5). DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay4054>

Rezania, S., Park, J., Din, M.F.M., Taib, S.M., Talaiekhosani, A., Yadav, K.K. & Kamy, H., 2018. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 191–208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.022>

Rios, L.M., Moore, C. & Jones, P.R., 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin*, 54(8), 1230-1237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.03.022>

Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T. & Teh, S.J., 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, 3, 3263. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep03263>

Rochman, C.M., 2015. The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. In Bergmann, M., Gutow, L. & Klages, M., (eds). *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham, Switzerland, 117–140.

Rochman, C.M., Parnis, J.M., Browne, M.A., Serrato, S., Reiner, E.J., Robson, M., Young, T., Diamond, M.L. & Teh, S.J., 2017. Direct and indirect effects of different types of microplastics on freshwater prey (*Corbicula fluminea*) and their predator (*Acipenser transmontanus*). *PLoS ONE*, 12(11), e0187664. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187664>

Rochman, C.M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., Athey, S., Huntington, A., McIlwraith, H., Munno, K., De Frond, H., Kolomijeca, A., Erdle, L., Grbic, J., Bayoumi, M., Borrelle, S.B., Wu, T., Santoro, S., Werbowski, L.M., Zhu, X., Giles, R.K., Hamilton, B.M., Thaysen, C., Kaura, A., Klasios, N., Ead, L., Kim, J., Sherlock, C., Ho, A. & Hung, C., 2019. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 703–711. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4371>

Rodrigues, J.P., Duarte, A.C., Santos-Echeandía, J. & Rocha-Santos, T., 2019. Significance of interactions between microplastics and POPs in the marine environment: a critical overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 252–260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.038>

Rosenberg, D.M. & Resh, V.H., 1993. Introduction to Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. In: Rosenberg, D.M. and Resh, V.H., Eds., Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. *Springer*, Chapman/Hall, New York, 1-9.

Russev, B., 1998. Das Makrozoobenthos der Donau – Dynamik der Veränderungen durch antropogenen Einflub. In: Kusel-Fetzman, E., Naidenow, W, & Russev, B. (eds) Plankton und Benthos der Donau. *Ergebnisse der Donau-Forschung*, Band 4, 257–364.

Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A. & Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 1999-2012. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0207>

Sánchez-Bayo, F. & Goka, K., 2012. Evaluation of suitable endpoints for assessing the impacts of toxicants at the community level. *Ecotoxicology*, 21, 667–680.

Sandberg, O.A., 1969. A quantitative study of chironomid distribution and emergence in Lake Erken. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 25, 119-201.

Santos-Echeandía, J., Rivera-Hernández, J.R., Rodrigues, J.P. & Moltó, V., 2020. Interaction of mercury with beached plastics with special attention to zonation, degradation status and polymer type. *Marine Chemistry*, 222, 103788. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103788>

Scherer, C., Brennholt, N., Reifferscheid, G. & Wagner, M., 2017. Feeding type and development drive the ingestion of microplastics by freshwater invertebrates. *Scientific Reports*, 7, 17006. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17191-7>

Scherer, C., Weber, A., Lambert, S. & Wagner, M., 2018. Interactions of microplastics with freshwater biota. In Wagner, M. & Lambert, S., eds, Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol 58. *Springer*, Cham, Switzerland.

Scherer, C., Wolf, R., Völker, J., Stock, F., Brennholt, N., Reifferscheid, G. & Wagner, M., 2020. Toxicity of microplastics and natural particles in the freshwater dipteran *Chironomus riparius*: Same same but different? *Science of The Total Environment*, 711, 134604. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134604>

Schmid, P., 1993. A Key to the Larval Chironomidae and their instars from Austrian Danube Region Streams and Rivers: Part 1. Diamesinae, Prodiamesinae and Orthocladinae. *Federal Institute for Water Quality of the Ministry of Agriculture and Forestry, Wien*.

Schmidt, K.F., 2001. Ecology – a true-blue vision for the Danube. *Science* 294(5546), 1444–1447. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.294.5546.1444>

Schmidt-Kloiber, A. & Hering, D., 2015. An online tool that unifies, standardises and codifies more than 20,000 European freshwater organisms and their ecological preferences. *Ecological Indicators*, 53, 271–282. URL: www.freshwaterecology.info

Setyorini, L., Michler-Kozma, D., Sures, B. & Gabel, F., 2020. Transfer and effects of PET microfibers in *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment*, 757, 143735. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143735>

Shannon, C.E. & Waever, W., 1949. The Mathematical Theory of Communication. *Urbana, Ill, University of Illinois Press*, 117.

Sheehan, P.J., Miller, D.R., Butler, G.C. & Bourdeau, P., 1984. Effects of Pollutants at the Ecosystem Level. *SCOPE 22*. Chichester: Wiley.

Shen, M., Ye, S., Zeng, G., Zhang, Y., Xing, L., Tang, W., Wen, X. & Liu, S., 2020. Can microplastics pose a threat to ocean carbon sequestration? *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110712. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110712>

Silva, C.J.M., Patricio Silva, A.L., Gravato, C. & Pestana, J.L.T., 2019. Ingestion of small-sized and irregularly shaped polyethylene microplastics affect *Chironomus riparius* life-history traits. *Science of The Total Environment*, 672, 862–868. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.017>

Silva, C.J., Silva, A.L.P., Campos, D., Soares, A.M., Pestana, J.L. & Gravato, C., 2020. *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) exposed to polyethylene microplastics: Biochemical, physiological and reproductive responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111375. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111375>

Silva, C.J.M., Beleza, S., Campos, D., Soares, A.M.V.M., Patrício Silva, A.L., Pestana, J.L.T. & Gravato, C., 2021. Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae, *Chironomus riparius*. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125401>

Simić, S. & Simić, V., 2009. Ekologija kopnenih voda. *Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu i Kragujevcu*.

Simonović, P., Paunović, M., Atanacković, A., Vasiljević, B., Simić, S., Petrović, A. & Simić, V., 2010. Chapter 17 Water quality and assessment of the chemical and ecological status of the Danube River and its tributaries after records from the JDS2 Survey pp.295-310 In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.

Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.

Sommerwerk, N., Schneider-Jajoby, M., Baumgartner, C., Ostojic, M., Paunovic, M., Bloesch, J., Siber, R. & Tockner, K., 2009. The Danube River Basin. In: Tockner, K., Robinson, C.T. & Uehlinger, U. (Eds.), Rivers of Europe. *Elsevier Ltd.*, London, UK, 59-113.

Sørensen, T., 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on danish commons. *Biologiske Skrifter*. 5, 1–34.

Sorensen, R.M. & Jovanović, B., 2021. From nanoplastic to microplastic: A bibliometric analysis on the presence of plastic particles in the environment. *Marine Pollution Bulletin*, 163, 111926. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111926>

Soto, D. & Mena, G., 1999. Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture*, 171, 65-81.

Sousa, R., Antunes, C. & Guilhermino, L., 2007. Species composition and monthly variation of the Molluscan fauna in the freshwater subtidal area of the River Minho estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 75, 90–100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.02.020>.

Sousa, R., Antunes, C. & Guilhermino, L., 2008a. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: An overview. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 44, 85–94. DOI: <https://doi.org/10.1051/limn:2008017>

Sousa, R., Rufino, M., Gaspar, M., Antunes, C. & Guilhermino, L., 2008b. Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18, 98–110. DOI: <https://doi.org/10.1002/aqc.838>

Spellerberg, I.F., 1991. *Monitoring Ecological Change*. New York: Cambridge University Press.

Stanković, J., Milošević, Dj., Savić-Zdraković, D., Yalçın, G., Yildiz, D., Beklioglu, M. & Jovanović, B., 2020. Exposure to a microplastic mixture is altering the life traits and is causing deformities in the non-biting midge *Chironomus riparius* Meigen (1804). *Environmental Pollution*, 262, 114248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114248>

Statzner, B., Dolédec, S. & Hugueny, B., 2004. Biological trait composition of European stream invertebrate communities: assessing the effects of various trait filter types. *Ecography*, 27, 470–488. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2004.03836.x>

Su, L., Xue, Y., Li, L., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D. & Shi, H., 2016. Microplastics in Taihu lake, China. *Environmental Pollution*, 216, 711–719. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.036>

Su, L., Cai, H., Kolandhasamy, P., Wu, C., Rochman, C.M. & Shi, H., 2018. Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems. *Environmental Pollution*, 234, 347–355. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.075>

Sugg, P., Edwards, J.S. & Baust, J., 1983. Phenology and life history of *Belgica Antarctica*, an Antarctic midge (Diptera: Chironomidae). *Ecological Entomology*, 8, 105–113.

Sun, X., Chen, B., Xia, B., Li, Q., Zhu, L., Zhao, X., Gao, Y. & Qu, K., 2020. Impact of mariculture-derived microplastics on bacterial biofilm formation and their potential threat to mariculture: A case in situ study on the Sungo Bay, China. *Environmental Pollution*, 262, 114336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114336>

Sundt, P., Schulze, P.-E. & Syversen, F., 2014. Sources of Microplastic- Pollution to the Marine Environment (MEPEX). URL: www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M321/M321.pdf

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P. & Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 113, 2430–2435. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>

Tang, J., Wu, Z., Wan, L., Cai, W., Chen, S., Wang, X., Luo, J., Zhou, Z., Zhao, J. & Lin, S., 2021. Differential enrichment and physiological impacts of ingested microplastics in scleractinian corals *in situ*. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124205>

Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S. & Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 41(22), 7759-7764. DOI: <https://doi.org/10.1021/es071737s>

Thiele, C.J., Hudson, M.D. & Russell, A.E., 2019. Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 384–393. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.003>

Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D. & Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 304(5672), 838. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1094559>

Tibbetts, J., Krause, S., Lynch, I. & Sambrook Smith, G.H., 2018. Abundance, distribution, and drivers of microplastic contamination in urban river environments. *Water*, 10(11), 1597. DOI: <https://doi.org/10.3390/w10111597>

Timm, T., 2009. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. *Lauterbornia*, 66, 1–235.

Tischler, W., 1949. Grundzüge der terrestrischen Tierökologie. *Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig*, Germany.

Tokeshi, M., 1995. 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, 225-268.

Tomas, J. & Guitart, R., 2002. Marine debris ingestion in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the Western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 44(3), 211–216. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00236-3)

Tomović, J., Zorić, K., Kračun, M., Marković, V., Vasiljević, B., Simić, V. & Paunović, M., 2012. Freshwater mussels of the Velika Morava River. *Water Research and Management*, 2(4), 51–55. URL: <https://wrmjournal.com/index.php/wrm/article/view/46>

Tourinho, P.D., Ivar do Sul, J.A. & Fillmann, G., 2010. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? *Marine pollution bulletin*, 60(3), 396-401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.10.013>

Truhaut, R., 1975. Ecotoxicology— A New Branch of Toxicology: A General Survey of its Aims Methods, and Prospects. In *Ecological Toxicology Research* (pp. 3-23). Springer, Boston, MA. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-8945-7_1

Tubić, B., Simić, V., Zorić, K., Gačić, Z., Atanacković, A., Csányi, B. & Paunović, M., 2013. Stream section types of the Danube River in Serbia according to the distribution of macroinvertebrates. *Biologia*, 68(2), 294—302. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0152-z>

Tubić, B., Popović, N., Raković, M., Petrović, A., Simić, V. & Paunović, M., 2017. Comparison of the effectiveness of kick and sweep hand net and Surber net sampling techniques used for collecting aquatic macroinvertebrate samples. *Archives of Biological Sciences*, 69(2), 233-238.

Turner, A., 2016. Heavy metals, metalloids and other hazardous elements in marine plastic litter. *Marine Pollution Bulletin*, 111(1-2), 136-142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.020>

Undeland, I., Kelleher, S. D., & Hultin, H.O., 2002. Recovery of Functional Proteins from Herring (*Clupea harengus*) Light Muscle by an Acid or Alkaline Solubilization Process.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(25), 7371–7379. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf020199u>

UNEP, 2013. Guidance on the global monitoring plan for persistent organic pollutants: Global monitoring plan for persistent organic pollutants as amended after the fourth meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention UNEP/POPS/COP.6/INF/31/Add.1

UNEP, 2015. Guidance for a Global Monitoring Programme for Persistent Organic Pollutants IInd Edition, Secretariat of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Geneva, Switzerland UNEP/POPS/COP.7/INF/39

Vallenduuk, H.J., 2017. Chironomini larvae of western European lowlands (Diptera: Chironomidae): Keys with notes to the species with a redescription of *Glyptotendipes (Caulochironomus) nagorskayae* and a first description of *Glyptotendipes (Caulochironomus) kaluginae* new species. Erik Mauch Verlag.

Vallenduuk, H.J. & Moller Pillot, H., 2007. Chironomidae Larvae of the Netherlands and Adjacent Lowlands: General Ecology and Tanypodinae. *KNNV, Zeist*, The Netherlands.

Van Cauwenberghe, L. & Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010>

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbins, J. & Janssen, C.R., 2015. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, 111, 5-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007>

van Wezel, A., Caris, I. & Kools, S., 2015. Release of primary microplastics from consumer products to wastewater in The Netherlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1627-1631. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3316>

Vanderploeg, H.A., Liebig, J.R. & Nalepa T.F., 1995. From picoplankton to microplankton: temperature-driven filtration by the unionid bivalve *Lampsilis radiata siliquoides* in Lake St. Clair. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 63–74.

Vendel, A.L., Bessa, F., Alves, V.E.N., Amorim, A.L.A., Patrício, J. & Palma, A.R.T., 2017. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1-2), 448-455. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.081>

Vepsäläinen, K., 1986. Chironomid Wing Length: A Measure of Habitat Duration and Predictability? *Oikos*, 46(2), 269-71. DOI: <https://doi.org/10.2307/3565480>

Villarrubia-Gómez, P., Cornell, S.E. & Fabres, J., 2018. Marine plastic pollution as a planetary boundary threat—The drifting piece in the sustainability puzzle. *Marine Policy* 96, 231–220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.11.035>

von Moos, N., Burkhardt-Holm, P. & Köhler, A., 2012. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327-11335. DOI: <https://doi.org/10.1021/es302332w>

Wagner, M. & Lambert, S., (eds.) 2018. Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants? *Springer International Publishing*, NY, NY, USA. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5>

Waldschläger, K., Lechthaler, S., Stauch, G. & Schüttrumpf, H., 2020. The way of microplastic through the environment – application of the source-pathway-receptor model (review). *Science of The Total Environment*, 713, 136584. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136584>

Walkley, A. & Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29–38.

Wallace, J.B., Webster, J.R. & Woodall, W.R., 1977. The role of filter feeders in flowing waters. *Archiv für Hydrobiologie*, 79, 506-532.

Wallace, J.B., Eggert, S.L., Mayer, J.L. & Webster, J.R., 1999. Effects of resource limitation on a detrital-based ecosystem. *Ecological Monographs*, 69(4), 409-442.

Walshe, B.M., 1951. The feeding habits of certain chironomid larvae (subfamily Tendipedinae). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 121: 63-79.

Wartinbee, D.C., 1979. Diel emergence patterns of lotic Chironomidae. *Freshwater Biology*, 9, 147-156.

Weber, C.E., Deutsch, W.G., Bayne, D.R. & Seesock, W.C., 1992. Ecosystem-level testing of a synthetic pyrethroid insecticide in aquatic mesocosms. *Environmental Pollution*, 11, 87-105.

Watts, A.J.R., Lewis, C., Goodhead, R.M., Beckett, S.J., Moger, J., Tyler, C.R. & Galloway, T.S., 2014. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science & Technology*, 48, 8823–8830. DOI: <https://doi.org/10.1021/es501090e>

Weber, A., von Randow, M., Voigt, A.-L., von der Au, M., Fischer, E., Meermann, B. & Wagner M. 2021. Ingestion and toxicity of microplastics in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: No microplastic-induced effects alone or in combination with copper. *Chemosphere* 263(2), 128040. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128040>

Welker, M. & Walz, N., 1998. Can mussels control the plankton in rivers? – a planktological approach applying a Lagrangian sampling strategy. *Limnology and Oceanography*, 43, 753–762.

Whittaker, R.H., 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21, 213-251.

Wilson, R., 1992. Monitoring organic enrichment of rivers using chironomid pupal exuvial assemblages. *Aquatic Ecology*. 26(2), 521-525.

Windsor, F.M., Durance, I., Horton, A.A., Thompson, R.C., Tyler, C.R. & Ormerod, S.J.A., 2019. A catchment-scale perspective of plastic pollution. *Global Change Biology*, 25(4), 1207-1221. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.14572>

Woodall, L.C., Sanches-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L.J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy, B.E. & Thompson, R.C., 2014. The deep sea

is amajor sink for microplastic debris. *Royal Society Open Science*, 1(4), 140317. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.140317>

World Economic Forum, 2018. The New Plastics Economy — Rethinking the future of plastics. *Ellen MacArthur Foundation and McKinsey & Company*. URL: <http://www.ellenmacarthurfoundation.org/publications>

Wright, S.L., Thompson, R.C. & Galloway, T.S., 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental Pollution* 178, 483-492. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>

Xia, W., Rao, Q., Deng, X., Chen, J. & Xie, P., 2020. Rainfall is a significant environmental factor of microplastic pollution in inland waters. *Science of the Total Environment*, 732, 139065. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139065>

Xu, Q., Deng, T., LeBlanc, G.A. & An, L., 2020. An effective method for evaluation of microplastic contaminant in gastropod from Taihu Lake, China. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 22878–22887. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08747-8>

Zbyszewski, M. & Corcoran, P.L., 2011. Distribution and Degradation of Fresh Water Plastic Particles Along the Beaches of Lake Huron, Canada. *Water, Air, & Soil Pollution*, 220, 365–372. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-011-0760-6>

Zhadin, V.I., 1952. Freshwater molluscs of Soviet Union. Guide Series of Fauna Soviet Union, Russian, Zool. Instit. Akad. Nauk SSSR / ZI AN SSSR. MoskvaLeningrad. Academy of Sciences of the U.S.S.R. 46: 368.

Zhang, K., Gong, W., Lv, J., Xiong, X. & Wu, C., 2015. Accumulation of floating microplastics behind the Three Gorges Dam. *Environmental Pollution*, 204, 117-123. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.04.023>

Zettler, E.R., Mincer, T.J. & Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology* 47(13), 7137-7146. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es401288x>

Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P.A. & Leusch, F.D.L., 2018. Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth

and emergence of sediment-dwelling invertebrates. *Environmental Pollution*, 236, 425–431.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.094>

Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P.A. & Leusch, F.D.L., 2019. Effects of polyethylene microplastics on the acute toxicity of a synthetic pyrethroid to midge larvae (*Chironomus tepperi*) in synthetic and river water. *Science of The Total Environment*, 671, 971–975. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.425>

Zorić, K., Szekeres, J., Csányi, B., Kolarević, S., Marković, V. & Paunović, M., 2014. Distribution of the Non-native Bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in the Danube River. *Acta Zoologica Bulgarica*, 67(2), 241-247.

Zorić, K., Atanacković, A., Tomović, J., Vasiljević, B., Tubić, B. & Paunović, M., 2020. Diversity of Alien Macroinvertebrate Species in Serbian Waters. *Water*, 12(12), 3521. DOI: <https://doi.org/10.3390/w12123521>

8. PRILOZI

SPISAK SLIKA

- Slika 1.** Prikaz osnovnih parametara mikroplastike koji je definišu. Na osnovu definisanih parametara (hemijsko poreklo, aditivi, primarni i sekundarni način nastanka, veličina, morfologija, obojenost i toksini) vrši se kategorizacija čestica mikroplastike u istraživanjima. Tri tačke na kraju svake kolone označavaju da liste nisu potpune. PP - polipropilen; LDPE - polietilen niske gustine; HDPE - polietilen visoke gustine; PVC - polivinilhlorid; PU - poliuretan; PET - polietilen tereftalat; PS - polistiren; ABS - akrilonitril butadien stiren; PMMA - polimetil metakrilat; POM - polioksimetilen; PBT - polibutilen tereftalat; PC - polikarbonat; PA - poliamida; SAN - stiren-akrilonitril; PEEK - polietar etar ketona; PSU - poliarilsulfona; PAH – policiklični aromatični ugljovodonik; PCB - polihlorovani bifenil; DDT - dihlorodifeniltrikloretan; PBDE - polibromovani difenil etri. Modifikovano prema Rochman i sar., 2019. (<https://doi.org/10.1002/etc.4371>)._____3
- Slika 2.** Šema prerade nafte u polimere. Modifikovano prema Jovanović i Đonlagić (2004).____4
- Slika 3.** Prikaz adicione i kondenzacione polimerizacije na primeru a) polietilena; b) poliamida i c) poliestra._____5
- Slika 4.** Distribucija različitih polimernih produkata u akvatičnom ekosistemu na osnovu njihove specifične težine. Modifikovano prema GESAMP, 2015. (<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3803.7925>)._____7
- Slika 5.** Konceptualni model ciklusa zagađenja plastikom i interakcije između biogeohemije, trofičkog transfera i ljudskog zdravlja i izloženost. Strelice i prikazi nisu u razmeri, već samo u opisne svrhe. Modifikovano prema Bank i Hanson, 2019. (<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02942>)._____10
- Slika 6.** Najčešće vrste polimera i njihova primena u industriji pakovanja. Oznake u prvom redu predstavljaju standardne reciklažne kodove. Koloritne oznake za upotrebu plastike: zelena boja - bezbedna upotreba; žuta boja – upotreba uz oprez; crvena boja – izbegavati._____11
- Slika 7.** Pregled svetske produkcije plastike prema dostupnim podacima od 1950. do 2020. godine._____12

- Slika 8.** Pojednostavljena šema koja ilustruje potencijalni uticaj izloženosti mikroplastici od najnižeg do najvišeg nivoa biološke organizacije. Modifikovano prema Galloway i sar., 2017. (<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>)._____15
- Slika 9.** Postavka *ex-situ* eksperimenta. Prikaz akvarijuma sa eksperimentalnom postavkom seta ponovaka (levo). Prikaz jednog ponovka na primeru hironomida sa prostornom distribucijom svakog stadijuma životnog ciklusa (desno)._____17
- Slika 10.** Građa larvi hironomida. Rimskim brojevima od I-X naznačeni su abdominalni segmenti; cl- kandže; PA – torakalne parapodije (lažne nožice); Th- toraks; TL- lateralne tubule; TV- ventralne tubule; Pc- procerci; AS- analne sete; PP- abdominalne parapodije; TA- analne tubule. Modifikovano prema Kiknadze i sar. (1991)._____27
- Slika 11.** Glavena čaura larve hironomida sa osnovnim strukturama i izdvojenim prikazom mentuma i mandibule vrste *C. riparius*. (URL: <https://aipa.myspecies.info/es/file/40>)._____28
- Slika 12.** Prikaz adulta (a) mužjaka i (b) ženke, sa zasebno izdvojenom strukturom krila (c).___29
- Slika 13.** Životni ciklus familije Chironomidae. Modifikovano prema Lopes i sar., 2005. (<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.05.004>)._____30
- Slika 14.** Prikaz životnog ciklusa azijske školjke, modifikovano prema Sousa i sar., 2008a. (<https://doi.org/10.1051/limn:2008017>)._____34
- Slika 15.** Akvarijum za uzgajanje populacije hironomida._____44
- Slika 16.** Postavka eksperimenta u laboratorijskim uslovima- laboratorijska mikrokozma._____46
- Slika 17.** Prirodna eksperimentalna bara._____49
- Slika 18.** Sušenje larvi hironomida._____50
- Slika 19.** Ilustracija pojedinačne mikrokozme. Braon bojom predstavljen je sloj sterilizovanog peska, dok je tamnosivom bojom predstavljen sloj sterilizovanog mulja._____52
- Slika 20.** Položaj kontrolnih i eksperimentalnih mikrokozmi za tretman u eksperimentalnoj bari. Šrafirano područje predstavlja obrasli deo bare; plava isprekidana linija definiše deo bare bez vegetacije._____53

- Slika 21.** Veštačko eksperimentalno jezero sa postavljenom mezokozmom. _____ 57
- Slika 22.** Mezokozma u veštačkom jezeru (levo), sačinjena od pojedinačnih postrojenja, tj. ponovaka (desno). _____ 58
- Slika 23.** Područje istraživanja. Ljubičaste tačke označavaju lokalitete duž Dunava i njegovih pritoka. _____ 63
- Slika 24.** Vreme razvića larvi *Chironomus riparius* izloženih mikroplastici. _____ 72
- Slika 25.** CVA koja pokazuje CV 1 u odnosu na CV 2 sa elipsama jednake veličine. Specifični digitalizovani orijentiri od 1 do 13 opisuju konture krila; svetlo roze linije predstavljaju početni oblik krila; plave linije predstavljaju varijacije oblika krila u datom kvadrantu u morfoprostoru. _____ 74
- Slika 26.** CVA analiza koja pokazuje varijacije u obliku i veličini mandibula nakon izlaganja larvi *C. riparius* mešavini mikroplastike, posmatrano pomoću linijskih grafika sa 18 digitalizovanih orijentira. Deformiteti su predstavljeni plavim linijama; svetloružičaste linije predstavljaju početni oblik mandibula. _____ 76
- Slika 27.** CVA analiza varijacije mentuma definisana sa 29 specifičnih orijentira koji opisuju njegov oblik i veličinu (svetlo ružičaste linije žičanih grafikona predstavljaju prosečan oblik mentuma u svim tretmanima; plave linije predstavljaju rezultat deformacije primeraka u datom delu morfoprostora). _____ 77
- Slika 28.** Prikaz neparametrijskih višedimenzionalnih dijagrama skaliranja. Na grafikonu se može videti obrazac distribucije lokacija za uzorkovanje u smislu strukture zajednice, predstavljene (A) brojnošću taksona i (B) biomasom. _____ 79
- Slika 29.** Kanonska analiza varijanse (CVA) oblika krila kod mužjaka *C. riparius*. Dijagrami duž obe ose ilustruju promene oblika krila od uobičajenog osnovnog oblika (plave linije) do oblika karakterističnog za dati kvadrant u morfoprostoru (crvene linije). Digitalizovani orijentiri (brojevi 1–13, tačke na konturama krila) opisuju konturu krila. Elipse predstavljaju 90 % intervala poverenja za svaki tretman. _____ 83
- Slika 30.** Fotografije izolovanih čestica mikroplastike po kategorijama: a) fibril; b) tvrda plastika; c) najlon; d) guma; e) neodređeno. _____ 85

Slika 31. Glavne kategorije čestica mikroplastike sa procentualnim udelom u celokupnom uzorku. _____ 86

Slika 32. Grafički prikaz ukupnog broja čestica mikroplastike po lokalitetima. _____ 89

Slika 33. Rezultati mikroFTIR analize (crvena linija) u poređenju sa podacima iz baze podataka o hemijskim supstancama (plava/ljubičasta linija), praćene slikama čestica: a) Polikarbonat - JDS4-3_4; b) Polietilen tereftalat (PET) - JDS4-35_2; c) Polipropilen-polietilen kopolimer-JDS4-17_2; ljubičasta linija; g) Najlon (poliamid) - JDS4-29_3; e) Celofan - JDS4-3_1. _____ 90

SPISAK TABELA

- Tabela 1.** Distribucija i karakterizacija čestica mikroplastike koje su korišćene u svakom eksperimentalnom sloju. PE- polietilen; PP- polipropilen; G-PE- fluorescentni zeleni polietilen; R-PE- fluorescentni crveni polietilen; PS- polistiren; PET- polietilen tereftalat; PVC- polivinil hlorid; PA- poliamid. _____ 43
- Tabela 2.** Polimeri korišćeni u eksperimentu sa mikrokozma i karakterizacija na uzorcima od po 100 nasumično odabranih čestica svakog polimera. PE- polietilen; PVC- polivinil hlorid; PA- poliamid. _____ 43
- Tabela 3.** Specifikacije, distribucija i procentualni udeo čestica mikroplastike koje su korišćene u svakom eksperimentalnom sloju. PE- polietilen; PP- polipropilen; G-PE- fluorescentni zeleni polietilen; R-PE- fluorescentni crveni polietilen; PS- polistiren; PET- polietilen tereftalat; PVC- polivinil hlorid; PA- poliamid. _____ 45
- Tabela 4.** Fizičko-hemijske karakteristike vodenog medijuma bioeseja. _____ 47
- Tabela 5.** Procentualni odnos polimera u sedimentu i njihove specifikacije. PE- polietilen; PVC- polivinil-hloid; PA- poliamid. _____ 51
- Tabela 6.** Karakterizacija funkcionalnih grupa ishrane i izvora hrane. Modifikovano prema Merrit i Cummins, 1996. _____ 54
- Tabela 7.** Lista lokaliteta koji su korišćeni za analizu podataka u okviru JDS4 ekspedicije. ____ 64
- Tabela 8.** Prosečne vrednosti mokre telesne mase (BM) i dužine tela (BL) larvi četvrtog stupnja u kontroli i tretmanima: LC- niska koncentracija mešavine mikroplastike, HC- visoka koncentracija mešavine mikroplastke. _____ 71
- Tabela 9.** Standardni životni parametri (parametri životnog ciklusa): Stopa preživljavanja (ER) - % izletelih jedinki na kraju eksperimenta; stopa mortaliteta (M) - % uginulih jedinki na kraju eksperimenta; vreme razvića (DT) – broj dana od početka eksperimenta (larve prvog stupnja) do izletanja (adulti); stopa razvića (DR) - prosečan % izletelih jedinki po danu. _____ 72

Tabela 10. Razlike u strukturi zajednice bentosnih makrobeskičmenjaka izloženih mikroplastici. _____ 80

Tabela 11. Kompozicija funkcionalnih grupa ishrane (FFG) detektovanih vrsta u eksperimentu. Dominantnost (D) i učestalost (C) svakog predstavnika makrobeskičmenjaka u kontroli i tretmanu. EC – eukonstantna; C – konstantna; AC – povremena; AD – slučajna; E– eudominantna; D– dominantna; S – subdominantna; R – recedentna; SR – subrecedentna; scr- strugači; c-g – kolektori, c-f – filtratorni kolektori, prd – predatori. _____ 81

Tabela 12. CVA analiza oblika desnih krila adulta mužjaka *C. riparius* iz različitih tretmana mikroplastike. Podaci iznad dijagonale = Mahalanobisove distance između grupe; podaci ispod dijagonale = p-vrednosti dobijene testom permutacije (n = 10000 permutacije) Mahalanobisovih distanci. _____ 84

Tabela 13. Procentualni udeo i dužina čestica svih potkategorija mikroplastike u uzorcima. ___ 87

Tabela 14. Kategorizacija izolovanih čestica mikroplastike iz uzoraka sa (a) Dunava i (b) njegovih pritoka. _____ 88

Tabela 15. Broj jedinki *C. fluminea* po uzorku, broj analiziranih čestica pomoću mikroFTIR spektroskopije i detektovani tipovi polimera. _____ 92

IZVOD

U ovom doktoratu analiziran je uticaj najčešćih tipova polimera mikroplastike na različite nivoe biološke i ekološke organizacije bentosnih makrobeskičmenjaka u slatkovodnim ekosistemima.

Sprovedeni su multiparametarski biološki testovi, na osnovu OECD protokola broj 218 i 219, na model vrstu *Chironomus riparius* (Meigen, 1804). Analiziran je uticaj mešavine čestica mikroplastike (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) na niz standardnih biomarkera (mortalitet, preživljavanje, vreme i stopa razvića i izletanja). Korišćenjem metode geometrijske morfometrije analiziran je uticaj na morfološke structure larvi (mentumi i mandibule), kao i adulta (krila). OECD testovi primenjeni su u *ex-situ* uslovima sredine, ali i na populacije iste vrste u *in-situ* mezokozmama u jezerskom ekosistemu. Dokazan je negativan uticaj polimera mikroplastike na vreme razvića larvi i na odlaganje izletanja adulta. Izlaganje jedinki česticama mikroplastike rezultovalo je promenom morfoloških struktura larvi i adulta.

Sprovedena je analiza stepena uticaja mešavine polimera mikroplastike (PE, PA i PVC) na strukturu zajednice makrobeskičmenjaka barskog ekosistema, gde je uočeno 16 % razlike u diverzitetu između kontrole i tretmana.

Po prvi put, izvršena je analiza prisustva čestica mikroplastike u slivu Dunava, korišćenjem odabranih vrsta iz zajednice makrobeskičmenjaka. Analiza hemijskog sastava izolovanih čestica mikroplastike iz tkiva model vrste *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) je prva analiza u slivu Dunava na 2040 rečnih kilometara. Mikro-FTIR spektroskopskom analizom potvrđeno je prisustvo čestica mikroplastik u tkivu azijskih školjki, sa dominantnim prisustvom polietilena tereftalata.

SUMMARY

In this doctoral dissertation, the influence of the most common types of microplastic polymers on different levels of biological and ecological organization of benthic macroinvertebrates in freshwater ecosystems is analyzed.

Multiparametric bioassays were conducted, based on OECD protocols Nos. 218 and 219, on the model species *Chironomus riparius* (Meigen, 1804). The influence of the mixture of microplastic particles (PET, PS, PVC, PA, PE, PP) on a series of standard biomarkers (mortality, survival, time and rate of development and emergence) was analyzed. Using the method of geometric morphometry, the influence on the morphological structures of larvae (mentums and mandibles), as well as adults (wings) was analyzed. OECD tests have been applied in *ex-situ* environmental conditions, but also on populations of the same species in *in-situ* mesocosms in the lake ecosystem. The negative influence of microplastic polymers on the time of larval development and on the delay of adult hatching has been proven. Exposure of individuals to microplastic particles resulted in changes in the morphological structures of larvae and adults.

An analysis of the degree of influence of the mixture of microplastic polymers (PE, PA and PVC) on the structure of the macroinvertebrate community of the pristine pond ecosystem was performed, where 16 % of the difference in diversity between control and treatment was observed.

For the first time, an analysis of the presence of microplastic particles in the Danube basin was performed, using selected species from the macroinvertebrate community. The analysis of the chemical composition of isolated microplastic particles from the tissue model of the species *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) is the first analysis in the Danube basin at 2040 riverine kilometers. Micro-FTIR spectroscopic analysis confirmed the presence of microplastic particles in the tissue of Asian clams, with a dominant presence of polyethylene terephthalate.

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena B. Stanković je rođena 25. juna 1992. godine u Pirotu. Osnovnu školu, a potom prirodno-matematički smer gimnazije završila je u Pirotu. Osnovne akademske studije biologije upisala je 2011. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodnomatemičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Zvanje biolog stiče 2014. i iste godine upisuje master akademske, smer Ekologija i zaštita prirode. Zvanje master ekolog stiče 2016. Sa prosečnom ocenom 9,63. Doktorske akademske studije upisuje 2016. godine na istom fakultetu. 2017. godine izabrana je u zvanje istraživač-pripravnik. Ispite predviđene planom I programom doktorskih akademskih studija položila je sa prosečnom ocenom 10.

Od 2017. godine angažovana je u izvođenju praktične nastave u okviru dva predmeta na master akademskim studijama, Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta. Kao student doktorskih studija, 2017. godine bila je vođa konzervacionog projekta „Uticaj pastrmskih ribnjaka na kvalitet vode izvorišne zone i sastav zajednice makrobescičmenjaka“ podržanog od strane fondacije iz Velike Britanije - The Rufford Foundation. Ujedno, bila je član tima još dva konzervaciona projekta, finansiranih od strane iste fondacije.

Učesnik je nekoliko međunarodnih projekata: 2018. godine H2020-INFRAIA projekat broj 731065 „AQUACOSM“, Ankara, Turska; 2019. godine je postala član nacionalnog tima za monitoring Dunava u okviru projekta „Zajedničko istraživanje Dunava 4“ (JDS 4), Međunarodne komisije za očuvanje Dunava (ICPDR). Učesnik je međunarodnih simpozijuma i kongresa. Član je Entomološkog društva Srbije, američkog udruženja limnologa i okeanologa (ASLO) i evropskog udruženja toksikologa (SETAC).

BIBLIOGRAFIJA

Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)

Yıldız D., Yalçın G., Jovanović B., Boukal D.S., Vebrová L., Riha D., **Stanković J.**, Savić-Zdravković D., Metin M., Naz Akyürek Y., Balkanlı D., Filiz N., Milošević D., Feuchtmayr H., Richardson J.A., Beklioğlu M. (2022): Effects of a microplastic mixture differ across trophic levels and taxa in a freshwater food web: In situ mesocosm experiment. *Science of The Total Environment*, 836, 155407, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155407>

Stanković J., Milošević Dj., Savić-Zdravković D., Yalçın G., Yıldız D., Beklioğlu M., Jovanović B. (2020): Exposure to a microplastic mixture is altering the life traits and is causing deformities in the non-biting midge *Chironomus riparius* Meigen (1804). *Environmental Pollution*, 262, 114248, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114248>

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

Stanković J., Milošević Dj., Jovanović B, Savić-Zdravković D., Petrović A., Raković M., Stanković N., Stojković Piperac M. (2021): In Situ Effects of a Microplastic Mixture on the Community Structure of Benthic Macroinvertebrates in a Freshwater Pond. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(4), 888-895. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5119>

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

Stojanović J., Milošević Dj., Vitrović J., Savić-Zdravković D., Stanković N., **Stanković J.**, Vasiljević P. (2021): Histopathology of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to metal oxide nanoparticles. *Archives of Biological Sciences*, 73(3), 319-329. DOI: <https://doi.org/10.2298/ABS210515025S>

Radovi u domaćim naučnim časopisima (M51)

Stanković J., Raković M., Paunović M., Atanacković A., Tomović J., Milošević Dj. (2021): Isolation of microplastics from freshwater macroinvertebrates in the Danube River. *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology*, 23(2), 21-27. DOI: <https://doi.org/10.22190/FUMB211101006S>

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

Stanković J., Stojković Piperac M., Jovanović B., Savić-Zdravković D., Raković M., Petrović A., Milošević Dj. (2020): Microcosm approach: In situ effects of microplastic mixture on community structure of freshwater benthic macroinvertebrates. IX International Symposium of Ecologists of Montenegro-Virtual Conference; 11/2020

Jovanović B., **Stanković J.,** Milošević Dj., Savić-Zdravković D., Savić A., Yalçın G., Çetinbağ D., Öztürk D., Vebrová L., Boukal D., Richardson J., Feuchtmayr H., Beklioglu M. (2019): Comparative indoor and outdoor study of microplastic effects on non-biting midges (Diptera: Chironomidae). Aquatic Sciences Meeting (ASLO 2019). San Juan; Puerto Rico; 02/2019

Beklioglu M., Yalçın G., Çetinbağ D., Jovanovic B., Öztürk D., Vebrová L., Boukal D., Milošević Dj., Savić D., **Stanković J.,** Feuchtmayr H. (2019): In-situ mesocosms experiment for investigating impacts of microplastics on littoral food web. Aquatic Sciences Meeting (ASLO 2019). San Juan; Puerto Rico; 02/2019

Stanković J., Jovanović B., Savić-Zdravković D., Savić A., Milošević Dj.: Influence of mixture of microplastic particles (MP) on non-biting midges of *Chironomus riparius* in laboratory setup. 11th Symposium for European Freshwater Sciences, Zagreb, Croatia; 07/2019

Çetinbağ D., Yalçın G., Jovanovic B., Öztürk D., Vebrová L., Boukal D., Milošević Dj., Savić D., **Stanković J.,** Richardson J., Feuchtmayr H., Beklioglu M. (2019): First in-situ mesocosms experiment for investigating impacts of microplastics on littoral food web. 11th Symposium for European Freshwater Sciences, Zagreb, Croatia; 07/2019

Savić-Zdravković D., Milošević Dj., **Stanković J.**, Đurđević A., Duran H., Uluer E., Matić S., Stanić S., Vidmar J., Marković K., Ščančar J., Đikić D., Miliša M., Jovanović B. (2019): Evaluation of Cerium-oxide (CeO₂) nanoparticle toxicity to freshwater midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) - potential biomarkers. 11th Symposium for European Freshwater Sciences, Zagreb, Croatia; 07/2019

Stanković J.: Effects of fish farming on water quality in mountain springs and community structure of aquatic biota. International Rufford Small Grants Conference (2018; Silver Lake) Explore and protect the natural beauty of Balkans, Silver Lake, Serbia; 09/2018

Savić-Zdravković D., Jovanović B., Đurđević A., **Stanković J.**, Milošević Dj. (2018): Toxicity of TiO₂ nanoparticles to freshwater chironomids - pointing out the relevant endpoints. 28th annual Meeting of the Society of Environmental toxicology and Chemistry - Europe (SETAC Europe), Rome, Italia; 05/2018

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (**M63**)

Raković M., **Stanković J.**, Milošević Dj., Tomović J., Popović N., Atanacković A., Paunović M. (2021): JDS4 – Prisustvo čestica mikroplastike u tkivu slatkovodne školjke - *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) u Dunavu. U: Đukić, A. urednik. „Voda 2021“. Zbornik radova 50. godišnje konferencije o aktuelnim temama korišćenja i zaštite voda „Voda 2021“; Septembar 22-24; Zlatibor, Srbija. Beograd (Srbija): Srpsko društvo za zaštitu voda, 109-116.

Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (**M64**)

Stanković J., Jovanović B., Savić-Zdravković D., Savić A., Milošević Dj. (2019): Uticaj mikroplastike na životni ciklus i deformitete vrste *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) u laboratorijskim uslovima. XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Srbija. 39-40.

Savić-Zdravković D., Jovanović B., Đurđević A., **Stanković J.**, Nikolić S., Manić N., Lazarević Z., Janković M., Nikolić V., Milošević Dj, Ilić M. (2019): Vrste iz roda

- Chironomus* (Diptera: Chironomidae) kao bioindikator prisustva nanočestica u vodenim ekosistemima. XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Srbija, 10-11.
- Savić-Zdravković D., Milošević Dj., **Stanković J.**, Đurđević A., Duran H., Uluer E., Matić S., Stanić S., Jovanović B. (2019): Evaluation of cerium-oxide (CeO₂) nanoparticle toxicity to freshwater midge *Chironomus riparius* (Diptera, chironomidae) – potential biomarkers for biomonitoring. 13th Symposium of the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara Planina, Serbia
- Stamenković O., Milošević Dj., Đurđević A., **Stanković J.**, Savić Zdravković D., Stojković Piperac M. (2018): Uticaj blizine reke na sastav zajednice makrozoobentosa Batušinačkih bara. Knjiga sažetaka. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija. Živić, M., Petković, B. (Ur.). Srpsko biološko društvo, Beograd, 94.
- Savić-Zdravković D., Lazarević Z., Đurđević A., **Stanković J.**, Milošević Dj. (2018): The influence of substrate type on mentum deformity variability of *Chironomus tentans* Fabricius, 1805 in toxicity tests. Knjiga sažetaka. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija. Živić, M., Petković, B. (Ur.). Srpsko biološko društvo, Beograd, 87.

IZJAVE AUTORA

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**МИКРОПЛАСТИКА У СЛАТКОВОДНИМ ЕКОСИСТЕМИМА: *IN-SITU*
И *EX-SITU* ИСТРАЖИВАЊА НА ОДАБРАНИМ МОДЕЛ ОРГАНИЗМИМА
МАКРОБЕСКИЧМЕЊАКА**

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 21.05.2022.

Потпис аутора дисертације:



Јелена Б. Станковић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације:

**МИКРОПЛАСТИКА У СЛАТКОВОДНИМ ЕКОСИСТЕМИМА: *IN-SITU*
И *EX-SITU* ИСТРАЖИВАЊА НА ОДАБРАНИМ МОДЕЛ ОРГАНИЗМИМА
МАКРОБЕСКИЧМЕЊАКА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 31.05.2022.

Потпис аутора дисертације:

Станковић Јелена

Јелена Б. Станковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

МИКРОПЛАСТИКА У СЛАТКОВОДНИМ ЕКОСИСТЕМИМА: *IN-SITU* И *EX-SITU* ИСТРАЖИВАЊА НА ОДАБРАНИМ МОДЕЛ ОРГАНИЗМИМА МАКРОБЕСКИЧМЕЊАКА

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

У Нишу, 31.05.2022.

Потпис аутора дисертације:



Јелена Б. Станковић