

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Датум: 28.03.2018. године

Предмет: **Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације
дипл. инж. Марије Стевановић**

Одлуком Наставно-научног већа факултета бр. 33/6-7.3. од 27.03.2018. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације кандидата Марије Стевановић, дипломираног инжењера, под насловом: „Утицај активне супстанце и формулисаних препарата кломазона на акватичне организме“. Комисија у саставу: др Драгица Бркић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду; др Славица Гашић, научни саветник Института за пестициде и заштиту животне средине, Београд; др Ивана Теодоровић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду; др Весна Полексић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Божић Рашковић, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, на основу прегледа докторске дисертације подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Марије Стевановић написана је у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, на 184 стране текста, укључујући 14 оригиналних фотографија, 33 графика, 26 табела у тексту, 10 у прилогу, као и 304 литературна извора. Пре основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља: 1. Увод (стр. 1-3), 2. Преглед литературе (стр. 4-41), 3. Циљеви истраживања (стр. 42, 43), 4. Материјал и методе (стр. 44-68), 5. Резултати (стр. 69-125), 6. Дискусија (стр. 126-146), 7. Закључак (стр. 147-149) и 8. Литература (стр. 150-184). На крају текста дисертације налазе се Прилози, Биографија, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу. Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља, а пре Увода дата је Листа акронима.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводном делу је указано на значај пестицида у повећању продуктивности биљне производње, али и на значај законске регулативе у одобравању

активних супстанци и формулисаних производа - средстава за заштиту биља. Имајући у виду да се за пестициде примењује превентивни приступ процене ризика, активне супстанце пролазе веома детаљна испитивања физичко-хемијских, токсиколошких, екотоксиколошких и других својстава док се, кад су формулисани производи у питању, њихова својства често изједначавају са својствима активне супстанце која улази у њихов састав. У даљем тексту дата су основна својства кломазона, хербицида који се налази у примени код нас и у свету, и побројани су стандардни тестови рађени приликом превентивне процене ризика при стављању ове супстанце у промет на нивоу Европске уније. Наглашено је да је кломазон детектован у водама у близини третираних подручја и да је веома значајно да се изврши процена ризика за организме који живе у води. Указано је на чињеницу да се *in vitro* тестови не налазе у ревидираном водичу за степенасто организовану процену ризика од пестицида за водене екосистеме у близини обрадивих површина, мада ови тестови (самостално или у комбинацији са другим методама) дају драгоцене податке у осветљавању потенцијалних места деловања на ћелијском нивоу. Дат је затим осврт на различите формулације кломазона, на разлику у њиховим токсиколошким и екотоксиколошким својствима, и на чињеницу да до сада нису рађена упоредна испитивања токсичних својстава кломазона и различито формулисаних препарата за акватичне организме.

Преглед литературе. Ово поглавље је подељено на четири потпоглавља, са више подналова, у којима су наведени релевантни литературни подаци из области истраживања дисертације. У првом потпоглављу, *Хербициди, судбина и доспевање у воде*, дат је осврт на значај хербицида у биљној производњи, њихову судбину у животној средини и доспевање у воде. У другом потпоглављу, *Процена ризика за акватичне организме*, поред дефиниције процене ризика, наведене су и објашњене четири целине које је чине, дат је преглед водича за процену ризика за акватичне организме који се користи у земљама Европске уније, као и преглед одговарајуће законске регулативе везане за ову област. У трећем потпоглављу, *Кломазон*, дата су општа својства, судбина и понашање кломазона у животној средини и детекција његових остатака у водама. Затим су описане формулације кломазона које се налазе у промету и њихова основна својства. Наведена су до сада објављена испитивања о токсичности кломазона за акватичне организме, а затим дате особине тест организама коришћених у изради дисертације.

Циљеви истраживања. У овом поглављу наведени су, у осам тачака, циљеви истраживања.

Материјал и методе. Ово поглавље садржи шест потпоглавља са више подналова. У првом потпоглављу, *Испитивана техничка супстанца и препарати*, дате су информације о кломазону и две формулације коришћене у изради дисертације (концентрат за емулзију - ЕЦ и суспензија капсула - ЦС), чистоћи активне супстанце и произвођачима и активне и препарата. У другом потпоглављу, *Припрема раствора и квантитативно одређивање кломазона*, описан је поступак припреме серије концентрација техничке супстанце и препарата коришћених у испитивањима и метода којом је одређиван садржај кломазона у техничкој супстанци, препаратима, концентратима и радним растворима. У трећем потпоглављу, *Експерименти са акватичним организмима*, са више подналова, описане су методе рађене *in vivo* са

следећим врстама: *Lemna minor*, *Myriophyllum aquaticum*, *Daphnia magna* и ембрионима врста *Danio rerio* и *Xenopus laevis*. У четвртом потпоглављу, ***In vitro* есеји процене цитотоксичних ефеката за хелијску линију RTgill-W1 (*Oncorhynchus mykiss*)**, приказана је метода за *in vitro* тест са наведеном хелијском линијом. У петом потпоглављу, ***Процена ризика за акватичне организме***, дат је опис метода коришћених у процени ризика за акватичне организме, а у шестом, ***Статистичка анализа***, наведене су методе коришћене у статистичкој обради добијених резултата.

Резултати. Резултати истраживања су подељени у шест целина и приказани јасно и прегледно са графиконима, сликама, табелама и текстуалним тумачењима.

У првом потпоглављу, ***Испитивање утицаја техничке супстанце кломазон и два комерцијална препарата на акватичне макрофите***, приказани су резултати добијени са врстама *L. minor* и *M. aquaticum*, а затим је извршено поређење осетљивости ове две врсте према препаратима и активној супстанци. У испитивањима са врстом *L. minor* препарат Рампа® ЕЦ испољио је статистички значајно већу, а препарат Гат Ценит 36 ЦС значајно мању токсичност у односу на техничку супстанцу. Кломазон и препарат Гат Ценит 36 ЦС испољили су исти степен токсичности према врсти *M. aquaticum*, док је препарат Рампа® ЕЦ био мање токсичан, а врста *M. aquaticum* била је статистички значајно осетљивија у односу на врсту *L. minor*. У другом потпоглављу, ***Испитивање акутне токсичности техничке супстанце и комерцијалних препарата кломазона за врсту Daphnia magna***, приказани резултати су показали да је најтоксичније деловао препарат Рампа® ЕЦ, мање токсично технички кломазон, док средња ефективна концентрација (EC₅₀) за препарат Гат Ценит 36 ЦС износи више од 100 mg/l, што значи да није деловао токсично на јединке ове врсте. У трећем потпоглављу, ***Испитивање акутне токсичности техничке супстанце и комерцијалних препарата кломазона за ембрионе Danio rerio***, резултати су показали да је за кломазон регистровано статистички значајно смањење учесталости и потпуно изостајање спонтаних контракција репа, кашњење у развоју, повећање смртности, појава успореног срчаног ритма, као и појава низа различитих тератогених ефеката (краниофацијалне деформације, деформације кичме и врха репа, неиспуњеност мехура, перикардијални и жуманчани едеми). Препарат Рампа® ЕЦ изазвао је статистички значајно већу смртност ембриона, већу редукцију срчаног ритма, а интензитет ефеката за остале праћене параметре био је израженији у односу на активну супстанцу. Са друге стране, препарат Гат Ценит 36 ЦС је, у поређењу са кломазоном, испољио мањи степен токсичности, није утицао на развој ембриона, мање је утицао на учесталост контракција репа и срчани ритам, а интензитет малформација је углавном био нижи, у поређењу са активном супстанцом. У четвртом потпоглављу приказани су резултати ***Испитивања тератогених ефеката техничке супстанце и комерцијалних препарата кломазона за ембрионе Xenopus laevis (FETAX)***. Код ембриона, излаганих активној супстанци, регистрована је статистички значајно повећана смртност, смањење активности и реакције на агитацију, као и појаве малформација (едеми, деформације, пликови). Средња ефективна концентрација, израчуната на основу свих малформација ембриона, износила је 41.0 mg/l, а тератогени индекс (ТИ) 1.9. Статистички значајно већу токсичност и смртност ембриона, у односу на активну супстанцу, изазвао је препарат Рампа® ЕЦ. Средња ефективна концентрација за све малформације износила је 31.0

mg/l, a TI 1.2. И у овом случају најмање токсичан био је препарат Гат Ценит 36 ЦС, са EC₅₀ од 111.1 mg/l, док TI за овај препарат није било могуће израчунати, због ниске стопе смртности. Резултати приказани у петом потпоглављу, **Испитивање цитотоксичних својстава техничке супстанце и комерцијалних препарата кломазона**, показују да су активна супстанца и препарат Рампа® ЕЦ деловали цитотоксично, а са повећањем концентрација вијабилност ћелија се смањивала. Препарат Рампа® ЕЦ испољио је статистички значајно већи степен цитотоксичности од кломазона, док Гат Ценит 36 ЦС није деловао цитотоксично, ни у највишим испитиваним концентрацијама. Резултати приказани у шестом потпоглављу, **Процена ризика за акватичне организме од примене кломазона**, на основу TER вредности, показују да, на првом нивоу процене, ризик од примене активне супстанце није прихватљив за једну алгу (*N. pelliculosa*) и једну макрофиту (*M. aquaticum*), док је ризик од примене препарата прихватљив за све испитиване организме. На другом нивоу процене, ризик за *M. aquaticum* је био прихватљив, док је примена кломазона за алгу *N. pelliculosa* и даље представљала неприхватљив ризик. Тек на трећем нивоу процене ризик за ову врсту је био прихватљив. И процена ризика на основу RAC вредности показала је да је ризик од примене кломазона за *N. pelliculosa* на прва два нивоа процене неприхватљив, док је на трећем нивоу ризик био прихватљив за све испитиване врсте. У другом нивоу степенате процене ризика резултати дистрибуције осетљивости врста (SSD) потврдили су да су најосетљивије врсте *N. pelliculosa* и *M. aquaticum*.

Дискусија. Дискусија је подељена на три потпоглавља, са више подналова. У првом, **Нестандардни тестови рађени са кломазоном и њихов допринос у процени ефеката**, дискутовани су резултати добијени са врстама *M. aquaticum*, *D. rerio*, *X. laevis* и ћелијском линијом RTgill-W1 и поређени са релевантним подацима других аутора. Средња инхибиторна концентрација раста врсте *M. aquaticum*, у испитивањима са кломазоном, била је 50 пута нижа у односу на врсту *L. minor*, што потврђује увођење ове врсте у процену ризика од хербицида. Ови резултати по први пут указују да, у случају кломазона, флотантне монокотиледоне врсте рода *Lemna* нису довољно предиктивне и протективне за све акватичне макрофите, односно да је само испитивањима на врстама из овог рода потцењен ризик за остале акватичне макрофите. Код ембриона врсте *D. rerio* утврђене су деформације које указују на тератогени потенцијал кломазона, што до сада није документовано. Из добијених резултата изведена је претпоставка о могућем начину деловања кломазона. Наиме, кломазон највероватније инхибира реакцију између пирувата и глицералдехид-3-фосфата (G3P) делујући на ензим деоксиулоза-5-фосфат синтазу (DXP), а и пируват и G3P су укључени у више метаболичких путева, од којих су најважнији Кребсов и циклус пентозо-фосфата. Нарушавање метаболизма пирувата ремети кључне метаболичке процесе у ћелији, успоравајући или потпуно прекидајући развој у ембрионалној фази, што је у испитивањима у оквиру дисертације и регистровано. Такође, утврђено је да кломазон највероватније делује и неуротоксично, јер регистровани ефекти (успорен рад срца, успорене контракције репа, недостатак или неиспуњеност мехура) управо указују на овакво деловање. Све ово указује да кломазон поред смртности изазива и низ развојних и морфолошких поремећаја који значајно утичу на опстанак популације. При

томе, у испитивањима са најнижом концентрацијом, која је на нивоу концентрација детектованих у животној средини, кломазон је изазвао појаву око 30% деформисаних јединки. Такође, изазвао је развојне промене и код врсте *X. laevis*, што је први налаз тератогеног потенцијала кломазона за водоземце, регистрован у оквиру ове дисертације. И овде је могуће место деловања нарушавање метаболизма пирувата, а могуће је и неуротоксично деловање - ремећење активности ензима АСнЕ. И испитивања са ћелијском линијом потврдила су претпоставку о деловању кломазона на метаболизам пирувата. Дискутовани су и поређени резултати других аутора, који су испитивали погодност увођења овог *in vitro* теста као замену за *in vivo* тестове на рибама. Наведено је да *in vitro* тестови, кад су пестициди у питању, нису довољно конзервативни и да се као такви не могу користити као замена за *in vivo* тестове, што резултати испитивања у оквиру ове дисертације и потврђују.

У другом потпоглављу, **Компаративна токсичност активне супстанце и препарата на бази кломазона**, детаљно је анализирана и дискутована токсичност различито формулисаних препарата и кломазона на испитиване организме. Препарати формулисани у облику концентрата за емулзије садрже органске раствараче и емулгаторе који утичу на повећање токсичности јер, поред тога што су токсични сами по себи, олакшавају усвајање активне супстанце повећавајући њену мобилност у воденој фази. Са друге стране, код препарата формулисаних тако да имају контролисано отпуштање активне супстанце, која се налази у микрокапсулама одвојена од спољашње средине, ово отпуштање се контролише подешавањем величине капсула, али и дебљине и порозности зида капсуле. У готово свим испитивањима препарат Рампа® ЕЦ био је токсичнији за испитиване врсте од препарата Гат Ценит 36 ЦС, осим за врсту *M. aquaticum* за коју је препарат Гат Ценит 36 ЦС испољио већи степен фитотоксичности. Указано је на чињеницу да је ефикасност обе формулације слична, али да се њихово деловање на организме акватичне средине значајно разликује.

У трећем потпоглављу, **Еколошка процена ризика**, објашњен је процес степенасто организоване процене ризика од пестицида за водене екосистеме у близини обрадивих површина и дискутовани су обавезни тестови за процену ризика за акватичне организме. Значајно је да су у оквиру ове дисертације рађена и испитивања на неким врстама предложеним за додатна испитивања. Указано је на чињеницу да је поузданост предвиђања РЕС вредности уз помоћ FOCUS софтвера под ревизијом због сумње у ниво заштите природних екосистема у реалним условима. Уколико се анализира доња граница добијене хазардне концентрације за 5% врста примарних продуцентата, израчуната SSD моделовањем, види се да се ова концентрација налази на самом прагу штетног деловања.

Закључак. Ово поглавље садржи правилно изведене закључке који у потпуности произилазе из добијених резултата. Врста *M. aquaticum* се показала као значајно осетљивија на деловање кломазона, у односу на врсту *L. minor*, што потврђује чињеницу да монокотиледоне флотантне врсте нису репрезентативне за све акватичне макрофите и иде у прилог увођења укореењених макрофита у процену ризика од хербицида. И за ембрионе *D. rerio* и *X. laevis* препарат Рампа® ЕЦ био је више, а препарат Гат Ценит 36 ЦС мање токсичан, у односу на активну супстанцу. По први пут

је утврђено да кломазон делује ембриотоксично и тератогено на ембрионе *D. rerio* и *X. laevis*, а да се активна супстанца и две формулације разликују у испољавању ових ефеката. Кломазон формулисан у облику концентрата за емулзије испољио је већу токсичност од саме активне супстанце, што је последица токсичности растварача и емулгатора, као и чињенице да они, повећавајући мобилност активне супстанце у води, повећавају и њено усвајање. Поред смртности, опстанак популације која је изложена деловању кломазона може значајно угрозити низ поремећаја, развојних и морфолошких, који се не могу открити применом стандардних метода, што иде у прилог увођења ове врсте тестова у процену ризика од пестицида. Резултати добијени у испитивањима на *D. rerio* указују да је могући механизам деловања кломазона ремећење метаболизма пирувата, што доводи до продужења или прекида ембрионалног развоја, и представља први налаз у расветљавању овог процеса. У испитивањима *in vitro* на ћелијској линији RTgill-W1 закључено је да, на ћелијском нивоу, кломазон делује на нарушавање метаболичке активности, односно ремети активност ензима из групе диафораза, а ова испитивања су погодан допунски метод за утврђивање токсичног потенцијала кломазона за рибе. Међутим, када су пестициди у питању, ови тестови се не могу користити као замена за *in vivo* испитивања због тога што нису довољно конзервативни. Увидом у резултате свих испитивања закључено је да различите формулације исте активне супстанце могу да имају веома различиту токсичност за нециљне врсте, што потврђује чињеницу да процена ризика која се заснива само на активној супстанци није довољно поуздана и превентивна и да ризик може бити и потцењен и прецењен, у зависности од типа формулације. Ове разлике у токсичности формулација указују на значај избора формулације у заштити биља, али и у заштити нециљних врста и животне средине.

Литература. На правилан начин цитирана су 304 литературна извора, која су актуелна и у потпуности одговарају тематици која је проучавана у дисертацији.

Прилози. У укупно 11 приказаних прилога налазе се додатни подаци од значаја за боље разумевање ове дисертације представљени у 10 табела, као и подаци везани за израчунавање PEC вредности применом FOCUS програма и SSD моделовање.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дипл. инж. Марије Стевановић, под насловом: „Утицај активне супстанце и формулисаних препарата кломазона на акватичне организме“, представља оригиналан научни рад, који је у сагласности са одобреним планом за израду дисертације. Добијени резултати представљају значајан допринос науци, али и струци, имајући у виду токсичност активне супстанце и различитих формулација на нециљне организме и процену ризика од њихове примене. По први пут код нас и у свету добијени су резултати који показују да, када је кломазон у питању, примена само флотантних врста рода *Lemna* није довољно предиктивна и протективна за све акватичне макрофите, односно да је ризик од његове примене за остале акватичне макрофите потцењен, ако се испитивања раде само са врстама рода *Lemna*, што је до скоро био случај. Добијени резултати у потпуности иду у прилог увођења укореењених врста рода *Myriophyllum* у процену ризика. По први пут је утврђено да кломазон има

ембриотоксични и тератогени потенцијал за ембрионе *D. rerio* и *X. laevis*, при чему се активна супстанца и формулације разликују у испољавању ефеката. Дисертација даје значајан допринос расветљавању вероватног механизма деловања кломазона који обухвата ремећење метаболизма пирувата, што последично доводи до ремећења ембрионалног развоја. Утврђено је да *in vitro* методе пружају драгоцене информације за расветљавање ефеката ксенобиотика, да се могу користити у екстраполацији резултата и предвиђању ефеката за људе и друге **ВРСТЕ** од интереса, али да се, када су пестициди у питању, не могу користити као замена за испитивања *in vivo*, због недовољне конзервативности. Указано је на различиту токсичност два типа формулација, на бази исте активне супстанце за акватичне организме, чиме је потврђен значај правилног избора формулације у заштити биља, нециљних организама и животне средине.

Имајући све наведено у виду, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. инж. Марије Стевановић, под насловом: „Утицај активне супстанце и формулисаних препарата кломазона на акватичне организме“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да усвоји позитивну оцену ове докторске дисертације и тиме омогући кандидату да је пред истом Комисијом јавно брани.

Прилог:

Објављен рад дипл. инж. Марије Стевановић, у научном часопису на SCI листи:

Stevanovic, M., Gasic, S., Pipal, M., Blahova, L., Brkic, D., Neskovic, N., Hilscherova, K. (2017): Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 188, 54-63.