



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



Potencijal oporavka akvatičnih vrsta makrofita *Lemna minor* Linnaeus (Lemnaceae, 1753) i *Myriophyllum aquaticum* (Velloso) Verdcourt (Haloragaceae, c. 1880), od toksičnog stresa nakon izlaganja odabranim herbicidima i njihovim smešama

- doktorska disertacija -

Mentor: Prof. dr Ivana Teodorović

Kandidat: Varja Knežević

Novi Sad, 2017.

*U spomen na moju majku, Veru V.*

## **Zahvalnica**

*Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji su rađena u Laboratoriji za ekotoksikologiju na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i predstavljaju deo istraživanja sprovedenih za potrebe projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom "Uticaj vodenog matriksa i fizičko-hemijskih osobina relevantnih organskih ksenobiotika na ekotoksičnost i ponašanje u odabranim procesima prečišćavanja voda", br. 172028, pod rukovodstvom prof. dr Ivane Ivančev Tumbas.*

*Srdačno se zahvaljujem:*

*prof. dr Ivani Teodorović, mojoj mentorki, na poverenju i prilici da budem deo istraživačkog tima Laboratorije za ekotoksikologiju, a potom i na pomoći oko planiranja i izvođenja eksperimentalnog dela disertacije, kao i savetima i podršci tokom pisanja;*

*prof. dr Milanu Boriševu, na uloženom trudu i velikoj ekspeditivnosti prilikom ocene ove disertacije, kao i na pomoći, pogotovo tokom prvih godina mog istraživačkog rada;*

*doc. dr Aleksandri Tubić i doc. dr Dragani Šunjka, na uloženom trudu i velikoj ekspeditivnosti prilikom ocene ove disertacije, kao i na prijatnoj saradnji tokom eksperimentalnog dela disertacije i rezultatima hemijskih analiza;*

*prof. dr Ivani Ivančev Tumbas, na angažovanju na projektu u okviru koga su proistekli rezultati ove disertacije;*

*dr Tanji Tomić, na zajedničkom radu i mnogobrojnim zabavnim momentima tokom istog;*

*Studentima osnovnih i master studija Danku Saviću, Jasni Pavlović, Marini Rodić, Mići Čučku, Mirjani Kezunović, Patriciji Marjan, Peri Gajiću, Ruži Bunčić i Vukašinu Kartaloviću, na pomoći u eksperimentalnom radu;*

*doc. dr Jeleni Molnar Jazić, dr Aniti Leovac Maćerak, doc. dr Đurđi Kerkez, na saradnji tokom brojnih aktivnosti na projektu i rezultatima hemijskih analiza;*

*Kolegama sa Prirodno-matematičkog fakulteta Saletu Janoševu, Dejanu Čačiću, Miši Bokorovu, Sanji Muzikravić, Sandi Savić, Marici Jović, doc. dr Tamari Jurca, dr Mladenu Horvatoviću, prof. dr Sonji Kaišarević, Minji Bogunović, Miri Birčanin, zatim prof. dr Dragici Brkić, sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i prof. dr Sanji Lazić, sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na pomoći/podršci kojom su doprineli izradi ove disertacije;*

*Dini Tenji, Ljilji Janjušević, Milivoju Petrušiću, Kristini Tešanović, Eli Bošković, Dragani Čučak, Branki Glišić, Jeleni Hrubik, dr Svetlani Fa, Bojani Mičić, na dragim momentima šale i odmora;*

*Jeleni D., Džuli, Dajani Kovač, Šandoru Šipošu, i ponovo dr Tanji Tomić, na drugarstvu;*

*Žejkiju, Sorinu, Ranki, Slavki, Vuku, Jeleni K., Stefanu, Ari, Paku, Simi, Berti, Oziju, na ljubavi, radosti i podršci koju mi pružaju.*

*Varja*

<b>1. Uvod</b>	1
<b>2. Pregled literature</b>	3
2.1. Pesticidi	3
2.1.1. Herbicidi	3
2.1.1.1. Fotosintetički inhibitori	4
2.1.1.1.1. Atrazin	5
2.1.1.1.2. Izoproturon	6
2.1.1.2. Trifluralin	7
2.1.1.3. Sintetički auksini	8
2.1.1.3.1. 2,4 D	9
2.1.1.3.2. Dikamba	9
2.2. Ekološka procena rizika od hemikalija	11
2.2.1. Ekološka procena rizika od pesticida	12
2.2.2. Akvatične makrofite u ekološkoj proceni rizika	15
2.2.2.1. Osnovne karakteristike vrste <i>Lemna minor</i>	16
2.2.2.2. Osnovne karakteristike vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i>	17
2.3. Toksičnost smeša	19
2.3.1. Procena ukupne toksičnosti smeše	20
2.3.2. Procena efekata smeša na osnovu saznanja o delovanju pojedinačnih supstanci	21
2.3.2.1. Model adicije koncentracija	21
2.3.2.2. Model nezavisnog dejstva	21
2.4. Oporavak od hemijskog stresa	24
2.4.1. Oporavak ne-ciljnih organizama u ekološkoj proceni rizika	25
2.5. Uticaj prirodne organske materije na toksičnost supstanci	27
<b>3. Ciljevi</b>	30
<b>4. Materijal i metode</b>	32
4.1. Uzgoj laboratorijskih kultura	32
4.2. Testovi na akvatičnim makrofitama	33
4.2.1.1. Test inhibicije rasta na vrsti <i>Lemna minor</i>	34
4.2.1.2. Test inhibicije rasta na vrsti <i>Myriophyllum aquaticum</i>	36
4.2.2. Test tretmani u testovima sa pojedinačnim supstancama i smešama	40
4.2.3. Statistička obrada rezultata	43
4.2.4. Test supstance	44
4.2.5. Analitičke metode za određivanje koncentracija test supstanci i rastvorenog organskog ugljenika	45
4.2.5.1. Određivanje koncentracija atrazina, izoproturona, trifluralina, 2,4 D i dikambe	45
4.2.5.2. Određivanje koncentracija test supstanci u rastvorima smeša, u testovima uticaja huminskih materija	46
4.2.5.3. Određivanje koncentracije rastvorenog organskog ugljenika	48
<b>5. Rezultati i diskusija</b>	50
5.1. Kriterijumi za validnost testova na akvatičnim makrofitama	50

5.2. Osetljivost i potencijal oporavka vrste <i>Lemna minor</i> od toksičnog delovanja pojedinačnih herbicida i njihovih smeša	51
5.2.1. Testovi sa pojedinačnim odabranim herbicidima	51
5.2.2. Testovi sa smešama odabranih herbicida	63
5.2.2.1. Procena efekata smeša na osnovu saznanja o delovanju pojedinačnih herbicida atrazina, izoproturona i trifluralina	70
5.3. Osetljivost i potencijal oporavka akvatičnih vrsta makrofita od toksičnog delovanja odabranih smeša herbicida, u testovima uticaja huminskih materija	82
5.3.1. Uticaj huminskih materija na toksičnost i potencijal oporavka vrste <i>Lemna minor</i> od toksičnog delovanja herbicida atrazina, 2,4D i njihovih smeša	82
5.3.1.1. Uticaj huminskih materija na parametre rasta vrste <i>Lemna minor</i>	82
5.3.1.2. Potencijal oporavka vrste <i>Lemna minor</i> od toksičnog delovanja atrazina i 2,4 D, kao i njihovih smeša, u prisustvu i odlustvu huminskih materija	84
5.3.1.2.1. Procena efekata smeša na osnovu saznanja o delovanju pojedinačnih herbicida atrazina i 2,4 D, u prisustvu i odsustvu huminskih materija	89
5.3.2. Uticaj huminskih materija na toksičnost i potencijal oporavka vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i> od toksičnog delovanja herbicida izoproturona i dikambe i njihovih smeša	95
5.3.2.1. Uticaj huminskih materija na parametre rasta vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i>	95
5.3.2.2. Potencijal oporavka vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i> od toksičnog delovanja izoproturona i dikambe, u prisustvu i odlustvu huminskih materija	97
5.3.2.3. Potencijal oporavka vrste <i>Myriophyllum aquaticum</i> od toksičnog delovanja smeša izoproturona i dikambe, u prisustvu i odlustvu huminskih materija	103
5.3.2.3.1. Procena efekata smeša na osnovu saznanja o delovanju pojedinačnih herbicida izoproturona i dikambe, u prisustvu i odsustvu huminskih materija	111
<b>6. Zaključak</b>	116
<b>7. Literatura</b>	118
<b>8. Prilog</b>	133

## Lista

ACS	Američko hemijsko društvo (engl. <i>American Chemical Society</i> )
AF	faktor za ekstrapolaciju (engl. <i>assessment factor</i> )
AMEG	savetodavna grupa za akvatične makrofite u ekotoksikologiji (engl. <i>Advisory Group in Aquatic Macrophyte Ecotoxicology</i> )
CA	model adicije koncentracija (engl. <i>concentration addition</i> )
DOC	rastvoreni organski ugljenik (engl. <i>dissolved organic carbon</i> )
EC <sub>50</sub>	srednja efektivna koncentracija
EFSA	Evropska uprava za bezbednost hrane (engl. <i>European Food Safety Authority</i> )
EDA	efektom-usmerene analize (engl. <i>effect-directed analysis</i> )
EINECS	Evropski inventar postojećih komercijalnih supstanci (engl. <i>European Inventory of Commercial Chemical Substances</i> )
EQS	standardi kvaliteta (engl. <i>environmental quality standard</i> )
ERA	ekološka procena rizika (engl. <i>ecological risk assessment</i> )
ERO	(engl. <i>ecological recovery option</i> )
ETO	(engl. <i>ecological threshold option</i> )
GC/MS	gasna hromatografija sa masenom spektroskopijom (engl. <i>gas chromatography mass spectrometry</i> )
GC/μECD	gasna hromatografija sa detektorom sa zahvatom elektrona (engl. <i>gas chromatography with electron capture detector</i> )
HM	huminke materije
HPLC/DAD	tečna hromatografija pod visokim pritiskom i detektorom sa nizom dioda (engl. <i>high-performance liquid chromatography with diode-array detection</i> )
HQ	koeficijent hazarda (engl. <i>hazard quotient</i> )
IA	model nezavisnog dejstva (engl. <i>independent model</i> )
IC	inhibitorna koncentracija
IC <sub>50</sub>	srednja inhibitorna koncentracija
K <sub>d</sub>	koeficijent distribucije
K <sub>oc</sub>	koeficijent raspodele sediment/voda
K <sub>ow</sub>	podeoni koeficijent n oktanol/voda
LOEC	najniža koncentracija test supstance koji izaziva statistički značajan efekat (engl. <i>lowest observed effect concentration</i> )
MDR model	(engl. <i>model deviation ratio</i> )
NOEC	najviša koncentracija test supstance koji ne izaziva statistički značajan efekat (engl. <i>no observed effect concentration</i> )
PEC	očekivana koncentracija u životnoj sredini (engl. <i>predicted environmental concentration</i> )
PNEC	predviđena koncentracija bez efekta (engl. <i>predicted no effect concentration</i> )
POM	prirodna organska materija
PS II	fotosistem II

RAC	regulatorno prihvatljiva koncentracija (engl. <i>regulatory acceptable concentration</i> )
RGR	relativna stopa rasta (engl. <i>relative growth rate</i> )
SETAC	Udruženje za ekotoksikologiju i hemiju životne sredine (engl. <i>Society for Environmental Toxicology and Chemistry</i> )
SSD distribucija	distribucija vrsta po osetljivosti (engl. <i>species sensitivity distribution</i> )
TIE metoda	(engl. <i>toxicity identification and evaluation</i> )
TK/TD modeli	toksiko-kinetički/toksiko-dinamički modeli
TOC	ukupan organski ugljenik (engl. <i>total organic carbon</i> )
TU	toksična jedinica (engl. <i>toxic unit</i> )
US EPA	Američka Agencija za zaštitu životne sredine (engl. <i>United States Environmental Protection Agency</i> )
2,4 D	2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina
WET	ukupna toksičnost otpadnih voda (engl. <i>whole effluent toxicity</i> )
WEA	ukupna procena otpadnih voda (engl. <i>whole effluent assessment</i> )
WFD	Okvirna Direktiva EU za vode (engl. <i>Water Framework Directive</i> )
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i> )

## 1. Uvod

Iako je još od doba začetka ekotoksikologije, kao zasebne naučne discipline, sredinom sedamdesetih godina prošlog veka, problem zagađenja akvatične sredine postavljen kao jedan od naučnih imperativa, on je i danas aktuelan. Akvatični ekosistemi su izloženi simultanom delovanju velikog broja potencijalno toksičnih supstanci u vremenski i prostorno promenljivim uslovima u životnoj sredini, stoga, procena toksičnosti na prirodne populacije, zajednice i ekosisteme u celini jeste od velikog značaja za regulatorna tela, kao i stručnu i naučnu zajednicu.

Prema najnovijim podacima Evropskog inventara postojećih komercijalnih supstanci (*engl.* the European Inventory of Commercial Chemical Substances, EINECS) broj supstanci u komercijalnoj upotrebi je iznad 100000. Sličan broj komercijalnih supstanci je u upotrebi i na području Sjedinjenih Američkih Država (SAD) (*Guillen i sar. 2012*). Supstance u komercijalnoj upotrebi predstavljaju samo deo, i to neznatan, od ukupnog broja registrovanih supstanci. Primera radi, svakog sata u registar Američkog hemijskog društva (ACS) se unese oko 70 novih supstanci (*Backhaus – cit. <http://www.miljodirektoratet.no>*).

Veliki broj supstanci koje su prisutne u životnoj sredini spadaju u grupu tzv. regulisanih supstanci, odnosno supstanci čija proizvodnja, stavljanje u promet, kao i upotreba je zakonski kontrolisana. Regulisane supstance se međusobno razlikuju po hemijskoj strukturi, osobinama, nameni i dr., zbog čega se dele na više podgrupa (pesticidi, biocidi, farmaceutski proizvodi,...). Pesticidi predstavljaju jednu od najznačajnijih podgrupa na osnovu broja supstanci, godišnje potrošnje, ali i potencijalno toksičnog dejstva. Na području Evropske Unije (EU) su regulisani Uredbom 1107/2009 (*EC 2009*), a u Republici Srbiji (RS), kao državi sa statusom kandidata za članstvo u EU, Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja (*Sl. glasnik RS, 41/09*), i pratećim propisima. Pre stavljanja u promet pesticidi podležu detaljnim ispitivanjima, uključujući i ispitivanja njihove potencijalne ekotoksičnosti. Iako se kriterijumi za stavljanje u promet konstantno pooštavaju, brojna istraživanja ukazuju na njihov štetan efekat na čoveka, ne-ciljne organizme i prirodne ekosisteme. Zbog svega navedenog čine se veliki naponi da bi se izvršila pravilna procena odnosa između koristi koje pesticidi donose, sa jedne, i mogućih, neželjenih posledica njihove upotrebe na životnu sredinu ali i zdravlje ljudi, sa druge strane (*Brkić i sar. 2009*).

U poređenju sa većinom drugih zagađujućih supstanci, pesticidi predstavljaju specifične supstance jer se ciljano sintetišu i unose u životnu sredinu, a zarad poboljšanja poljoprivredne proizvodnje suzbijanjem različitih štetnih bioloških agenasa, zatim zdravstvene bezbednosti hrane i sprečavanja širenja vektorski prenosivih bolesti. Najčešće se primenjuje veliki broj različitih pesticida na određenom poljoprivrednom području, tokom jedne poljoprivredne sezone. Deo primenjenih količina pesticida sa tretiranih poljoprivrednih površina dospeva u okolne ekosisteme, uključujući i akvatične, tako da se pesticidi neretko detektuju, najčešće kao smeše, u akvatičnim ekosistemima u poljoprivrednim, ali i urbanim oblastima (*Knauert 2008; Knauert i sar. 2008; Teodorović i Kaišarević 2015*).

Važeći propisi u oblasti regulisanih supstanci se i dalje dominantno oslanjaju na procenu rizika od pojedinačnih supstanci (*Backhaus i Faust 2012; Kienzler i sar. 2014; Kienzler i sar. 2016*), a jedini izuzetak je preventivna procena rizika ciljano sintetisanih smeša



poznatog sastava, kao što su npr. pesticidi (sredstava za zaštitu bilja i biocidi), farmaceutski i kozmetički proizvodi i dr., kod kojih se prilikom procene rizika pored pojedinačnih supstanci mogu uzeti u obzir i gotovi odnosno formulisani proizvodi (*Kienzler i sar. 2014*). Kada je reč o pesticidima, u cilju izbegavanja dodatnih testova, autorizacija formulacija se ipak, kad god je moguće, vrši samo na osnovu dostupnih podataka za jednu ili više aktivnih supstanci koje ulaze u sastav formulisanog proizvoda (*Altenburger i sar. 2013a*).

Sve češće se ističe neophodnost sagledavanja ne samo potencijalnih razlika u toksikološkoj osetljivosti jedinki/populacija, već i razlika u efikasnosti njihovog oporavka (*De Lange i sar. 2009*). Podaci o potencijalu oporavka eksponiranih organizama, nakon izloženosti pesticidima, se obično dobijaju tek sprovođenjem istraživanja na višim nivoima procene rizika, u tzv. mikro- i mezo-kosmos veštačkim ekosistemima (*EFSA PPR Panel 2013*). Razlog tome proizilazi iz činjenice da se, prema postojećoj regulativi, potencijal oporavka eksponiranih jedinki/populacija ne ispituje standardnim laboratorijskim testovima. Pojedinim istraživanjima je dokazano da se oporavak eksponiranih jedinki/populacija može pratiti i u laboratorijskim testovima toksičnosti, koji se koriste na nižim nivoima procene rizika, i na taj način se može povećati ekološka relevantnost laboratorijski testova (*Brain i sar. 2012; Teodorović i sar. 2012; Boxall i sar. 2013*).

## 2. Pregled literature

### 2.1. Pesticidi

Savremena poljoprivredna proizvodnja se ne može zamisliti bez intenzivne primene pesticida, hemijskih i bioloških sredstava za zaštitu bilja (*Brkić i sar. 2009; Knauer 2016*). Pesticidi doprinose povećanju biljne proizvodnje suzbijanjem štetnih bioloških agenasa kao što su npr. neželjene biljne vrste (korovi), insekti, glodari, uzročnici biljnih bolesti i dr. (*Teodorović i Kaišarević 2015*). Poznato je da pesticidi pored delovanja na štetne organizme za čiju kontrolu su sintetisani i uneti u životnu sredinu, mogu štetno delovati i na ne-ciljne organizme (*Brkić i sar. 2011*). Pesticidi ne ispoljavaju svoje dejstvo samo na mestu primene, nego se, u zavisnosti od načina primene, ali i njihovih fizičko-hemijskih osobina, kao i različitih faktora u životnoj sredini mogu transportovati u udaljenije ekosisteme gde takođe mogu ispoljiti toksično dejstvo (*Teodorović i Kaišarević 2015*).

Pesticidi su, uglavnom, grupisani na osnovu delovanja na ciljne organizme, i dele se na herbicide, insekticide, fungicide, bakteriocide, rodenticide, nematocide i dr. (*Teodorović i Kaišarević 2015*). Na području EU fungicidi zajedno sa bakteriocidima predstavljaju jednu od najčešće korišćenih grupa pesticida sa učešćem od oko 42% u ukupnoj potrošnji, dok je upotreba herbicida nešto manja i iznosi 35%. Insekticidi i akaricidi čine 5% ukupne potrošnje, regulatori rasta biljaka 3%, moluscidi 1%, a potrošnja ostalih sredstava za zaštitu bilja iznosi 13% (*Eurostat 2016*). Poljoprivredno zemljište u EU je zastupljeno na 40% teritorije tj. na preko 174 miliona hektara (ha) (*Stehle i Schulz 2015*). Godišnja potrošnja pesticida, na tom području, iznosi oko 360 000 tona (t) (*Eurostat 2016*). U RS poljoprivredno zemljište obuhvata 65% teritorije, što je iznad 5 miliona ha (*Agencija za zaštitu životne sredine 2005; <http://www.arhiva.srbija.gov.rs>*), stoga, godišnja potrošnja pesticida na teritoriji RS je znatno manja u poređenju sa primenom pesticida u EU, i procenjuje na oko 3000 t (*Teodorović i Kaišarević 2015*).

#### 2.1.1. Herbicidi

Herbicidi predstavljaju grupu različitih jedinjenja koja se namenski unose u životnu sredinu sa ciljem sprečavanja ili ograničavanja neželjenih biljnih vrsta, odnosno korova na poljoprivrednim kulturama, šumskom zemljištu, u baštama, travnjacima, jezerima i barama (*Teodorović i Kaišarević 2015*).

Herbicidi predstavljaju uglavnom polarne supstance koje karakteriše velika rastvorljivosti u vodi i nizak apsorpcioni koeficijent, što ih čini podložnim za prenos van tretiranih područja (*Knauert 2008, Knauert i sar. 2008; Teodorović i Kaišarević 2015*). Spiranjem sa obradivog zemljišta, herbicidi dospevaju do akvatičnih ekosistema i time ih ozbiljno narušavaju, a posebno su ugrožene zajednice akvatičnih makrofita (*Cedergreen i sar. 2005*).

Herbicidi u površinskim vodama su uglavnom prisustni sezonski, tokom kraćeg vremenskog perioda (*Styczen i sar. 2003 – cit. Cedregreen i sar. 2005*), a njihove koncentracije se, najčešće, kreću u vrednostima od 1 do 10 µg/l (*Cedergreen i sar. 2005*). Maksimum vrednosti u površinskim vodama herbicidi beleže tokom prolećnih i letnjih meseci

što se povezuje sa njihovom intenzivnijom primenom, u poljoprivredi, u navedenom periodu (*Teodorović i Kaišarević 2015*).

Često jedan herbicid može pripadati različitim grupama na osnovu mehanizma toksičnog delovanja jer se njegov toksični efekat može ispoljiti na više mesta. Ipak, herbicide, delimo, po primarnom mehanizmu delovanja, na nekoliko grupa: fotosintetički inhibitori, inhibitori biosinteze pigmenata, inhibitori biosinteze lipida, inhibitori biosinteze aminokiselina, inhibitori deobe ćelija i inhibitori aktivnosti auksina, odnosno sintetički auksini (*Teodorović i Kaišarević 2015*).

Prilikom formulisanja preparata se mogu koristiti isključivo odobrene aktivne supstance. Proces odobravanja nove aktivne supstance traje oko 2,5 – 3,5 godine. Trenutno na listi odobrenih aktivnih supstanci sa herbicidnim svojstvima, na području EU, a samim tim i na području RS, se nalaze 124 supstance (<http://www.ec.europa.eu>). Neretko, nakon detaljne reevaluacija rizika određene aktivne supstance mogu biti zamenjene/zabranjene, što znači da preparati na bazi tih aktivnih supstanci ne mogu dalje biti registrabilni u EU, a time ni u RS (*Faust i sar. 2014; Teodorović i Kaišarević 2015*). Međutim, upotreba preparata na bazi ovih aktivnih supstanci se ne isključuje u ostalim krajevima sveta, izvan područja EU, odnosno RS (*Teodorović i Kaišarević 2015*). Prema podacima iz 2015. godine, 77 odobrenih aktivnih supstanci se nalazi na tzv. Listi kandidata za zamenu, od kojih iznad 40% predstavljaju aktivne supstance sa herbicidnim dejstvom (<http://www.ec.europa.eu>). Na ovaj način EU teži da, u narednom periodu, pronađe alternativno rešenje za sve aktivne supstance koje ispunjavaju uslov za zamenu, što može obuhvatiti odobravanje novih aktivnih supstanci za koje se dokaže da su manje štetne, ali i upotrebu tzv. nehemijskih metoda kontrole.

U nastavku teksta je dat kratak opis herbicida korišćenih u istraživanju.

### 2.1.1.1.                    inhibitori

Fotosintetički inhibitori predstavljaju grupu herbicida koji ispoljavaju svoje delovanje na proces fotosinteze na različite načine npr. preko inhibicije elektronskog transporta, razdvajanja elektronskog transporta od transporta protona, inhibicije sinteze fotosintetičkih pigmenata, inhibicije sinteze adenzin trifosfata (ATP), inhibicije metabolizma ugljenika i dr. (*Janjić 1996*). Najveći broj herbicida iz ove grupe deluje na fotosistem II (PS II) procesa fotosinteze (*Janjić 1996*), a tipični predstavnici među njima su aktivne supstance atrazin, simazin (iz grupe triazina), izoproturon, diuron, linuron (iz grupe fenilurea pesticida) (*Teodorović i Kaišarević 2015*).

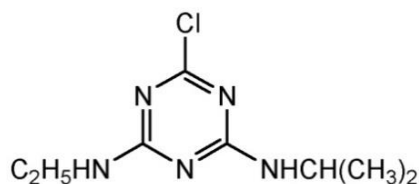
Biljke atrazin apsorbuju preko korena i listova, a akumuliraju ga u vršnim delovima biljke (*Bažulić Štimac i sar. 2006*). Triazinski herbicidi, uključujući i atrazin, se vezuju za D<sub>1</sub> protein u hloroplastima u PS II čime uslovljavaju promene proteina i sprečavanje prijema elektrona što ima za posledicu remećenje elektron transportnog lanca (*Janjić 1996; Giddings i sar. 2005*). Na taj način herbicid sprečava usvajanje CO<sub>2</sub> i sintezu ATP, nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) i energetske bogatih ugljenih hidrata, neophodnih za rast i razvoj biljke (*Giddings i sar. 2005*). Dolazi do oksidacije i razgradnje hlorofila što se manifestuje pojavom hloroze koja se prvo javlja na rubovima listova, a zatim se širi zahvatajući celu biljku izazivajući nekrozu tkiva i, na kraju, odumiranje biljke (*Jevrić 2009*).

## 2. Pregled literature

Biljke izoproturon usvajaju većinski preko korena odakle se on transportuje ksilemom u listove gde ispoljava svoje toksično dejstvo (*Geissbuler i sar. 1975, Hock i sar. 1995 – cit. Glaßgen i sar. 1999*). Mehanizam toksičnog dejstva herbicida iz grupe fenilurea gde spada i izoproturon je sličan mehanizmu dejstva atrazina (*Tunić 2015*).

### 2.1.1.1.1. Atrazin

Atrazin pripada grupi triazinskih herbicida. Njegova molekulska formula je  $C_8H_{14}ClN_5$ , a strukturna formula je prikazana na slici 2.1.



**Slika 2.1.** Strukturna formula atrazina

Atrazin se koristi za suzbijanje širokolisnih, jednogodišnjih korova i različitih vrsta trava u zasadima kukuruza, sirka, šećerne trske, soje, pšenice, u voćnjacima i vinogradima, kao i na nepoljoprivrednom zemljištu (*Reed 1982 – cit. Eisler 1989; Solomon i sar. 1996*).

Atrazin se primenjuje folijarno, međutim, određene količine ovog herbicida dospevaju do okolnog obradovog zemljišta. Zbog relativno dobre rastvorljivosti u vodi (33 mg/l), relativno niske vrednosti koeficijenta distribucije,  $K_d$ , (0,2-12,6), i koeficijenta raspodele sediment/voda,  $K_{oc}$ , (40,0-394,0) spiranjem sa zemljišta atrazin može dospeti i do površinskih i podzemnih voda (*Giddings i sar. 2005*). Isparavanje iz zemljišta i površinskih voda je zanemarljivo zbog niske vrednosti napona pare,  $2,9 \times 10^{-7}$  Hg na 25°C, i niske Henrijeve konstante,  $2,5 \times 10^{-9}$  atm m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> (*Solomon i sar. 1996*). Faktor biokoncentracije atrazina je nizak, (BCF = 0,3-2,0) (*Okland i sar. 2005*), vrednosti podeonog koeficijenta n oktanol/voda su niske ( $K_{ow} = 2,7$ ), stoga, biomagnifikacija atrazina kroz lanac ishrane je zanemarljiva (*Giddings i sar. 2005*).

Vreme poluživota atrazina u akvatičnoj sredini iznosi 3-90 dana, u zavisnosti od različitih faktora u životnoj sredini npr. pH, temperature, sadržaja organske materije i dr. (*Eisler 1986; Solomon i sar. 1996; Okland i sar. 2005*). U manje aerobnim uslovima (npr. podzemne vode) degradacija se usporava i atrazin može biti prisutan i nekoliko godina (*Okland i sar. 2005; Bažulić Štimac i sar. 2006*).

Mikrobiološka ili bio-degradacija je najzastupljeniji, stoga i najvažniji vid razgradnje atrazina (*Eisler 1986*). Međutim, triazinski prsten se odlikuje otpornošću na mikrobiološku degradaciju i time se zadržava u proizvodima degradacije čineći ih biološki aktivnim (*Howard 1991 – cit. Solomon i sar. 1996*). Najčešći proizvod degradacije je hidroksiatrazin (*Eisler 1989*), a ostali su dietilatrazin, deizopropilatrazin, deetilhidroksiatrazin i dr. (*Eisler 1989, Solomon i sar. 1996*). Iako pojedini proizvodi degradacije imaju određena toksična svojstva, većina njih se smatra manje štetnim od polaznog jedinjenja – atrazina (*Eisler 1989*). Hemijska degradacija se ostvaruje hidrolizom ugljenikovog atoma na položaju 2, N-

## 2. Pregled literature

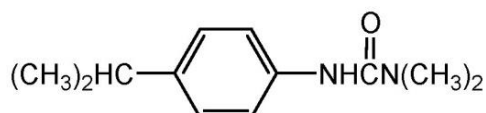
dealkilacijom ugljenikovog atoma na poziciji 4 i razdvajanjem triazinskog prstena (*Kneusli i sar. 1969 – cit. Solomon i sar. 1996*).

Atrazin i njegovi proizvodi degradacije su bili detektovani u površinskim i podzemnim vodama širom Evrope koje su često bile namenjene vodosnabdevanju, u koncentracijama koje su prevazile maksimalno dozvoljene u pijaćim vodama, prema Direktivi EU o pijaćim vodama (Direktiva 80/778/EEC; *EC 2008a*). S' tim u vezi, EU je zabranila 2003. godine upotrebu atrazina jer se dozvoljeni limit od 0,1 µg/l u pijaćoj vodi pokazao kao neodrživ (*Okland i sar. 2005*). Atrazin se ne nalazi u prometu na području RS, i njegova upotreba je zabranjena. Ovaj herbicid se nalazi na tzv. Listi zabranjenih supstanci, tj. Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci za koje postoji odluka o neodobravanju na nivou EU, a koje nisu u prometu u RS (deo B2.2) (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>).

Povlačenje atrazina iz primene je uslovalo smanjenje koncentracija ovog herbicida u površinskim vodama na području EU (*Nodler i sar. 2013*) i RS (*Lazić i sar. 2013*). Prema podacima monitoringa slivnog područja reke Dunav iz 2013. godine, koji je obuhvatio i ispitivanja na teritoriji RS, maksimalna koncentracija atrazina je iznosila 0,07 µg/l, što je ispod standarda kvaliteta životne sredine – EQS vrednosti (engl. *environmental quality standard*, EQS) za ovaj herbicid (*ICPDR 2015*). Koncentracije atrazina, u području široke primene ovog herbicida (Severna Amerika, Kina i druge zemlje sveta) su i dalje visoke zbog njegove intenzivne upotrebe (*Jablanowski i sar. 2013; Teodorović i Kaišarević 2015*).

### 2.1.1.1.2. Izoproturon

Izoproturon pripada grupi fenilurea herbicida. Njegova molekulska formula je C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O, a strukturna formula je prikazana na slici 2.2.



**Slika 2.2.** Strukturna formula izoproturona

Izoproturon se koristi za suzbijanje uskolisnih i širokolisnih korova u usevima različitih žitarica, kao što su npr. kukuruz, ječam, pšenica, raž (*Merlin i sar. 2002*), kao i u poljima pamuka (*Sørensen i sar. 2003*).

Vreme poluživota izoproturona u zemljištu varira od 6 do 30 dana (*Walker i sar. 2001; Galichet i sar. 2002*), u zavisnosti od različitih faktora u životnoj sredini, npr. sadržaja organske materije, pH, temperature, sadržaja vlage i tipa zemljišta, mikrobiološke zajednice (*Walker i sar. 2001*). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) vreme poluživota izoproturona u površinskim vodama iznosi 30 dana (*WHO 2003*), dok u podzemnim vodama vreme poluživota je znatno duže i može iznositi i preko godinu dana (*Sørensen i Aamand 2001; Alletto i sar. 2006*).

Bio-degradacija predstavlja najznačajniji oblik degradacije izoproturona (*Cox i sar. 1996, Mudd i sar. 1983 – cit. Sørensen i Aamand 2001*). Sa druge strane, foto- i hemijska degradacija predstavljaju zanemarljiv vid razgradnje izoproturona (*Sørensen i sar. 2003*).

## 2. Pregled literature

Najčešći proizvod degradacije izoproturona je 3-(4-izopropil fenil)1-metil urea (MDIPU) (Johnson i sar. 2000 – cit. Sørensen i sar. 2003; Alletto i sar. 2006). Pojedine studije su ukazale da degradacioni proizvodi izoproturona imaju veća toksična svojstva u odnosu na polazno jedinjenje (Galichet i sar. 2002).

Izoproturon ima relativno visoku rastvorljivost u vodi i nisku tendenciju da se sorbuje u zemljištu, zbog čega se smatra mobilnim herbicidom (Sørensen i sar. 2003). Koeficijent distribucije ( $K_d$ ) varira od 1,5 do 101,0  $\text{kg}^{-1}$  (Alletto i sar. 2006). Izoproturon ima nisku vrednost podeonog koeficijenta n oktanol/voda ( $K_{ow} = 2,5$ , na pH 7 i 20°C), te je njegov akumulativni potencijal zanemarljiv (Tunić 2015).

Izoproturon je osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka bio jedan od najčešće primenjivanih herbicida u Evropi zbog čega je bio detektovan u uzorcima površinskih i podzemnih voda, često i pri koncentraciji iznad 1  $\mu\text{g/l}$  (Manhec 1998 – cit. Merlin i sar. 2002). Tokom kraćeg vremenskog perioda, neposredno nakon primene, maksimalna koncentracija ovog herbicida je iznosila i do 10  $\mu\text{g/l}$  (Kirby i Sheahan 1994 – cit. Merlin i sar. 2002). U poslednje vreme primena ovog herbicida je smanjena, najviše zbog upotrebe savremenijih herbicida sa novijim mehanizmom toksičnog delovanja.

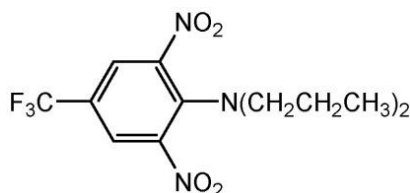
Prema podacima nedavnog monitoringa slivnog područja reke Dunav, uključujući i nekoliko lokaliteta na području RS, maksimalna koncentracija izoproturona je iznosila 0,09  $\mu\text{g/l}$  (ICPDR 2015).

Upotreba izoproturona na području RS je dozvoljena, ovaj herbicid se nalazi na tzv. Listi odobrenih supstanci tj. Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci koje su odobrene u skladu sa važećim propisima EU (deo A1.1) (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>).

Iako se izoproturon od januara 2015. godine nalazi na tzv. Listi kandidata za zamenu, zajedno sa još 76 aktivnih supstanci, preparati koji sadrže izoproturon, kao aktivnu supstancu, su i dalje na tržištu na području EU (<http://www.ec.europa.eu>).

### 2.1.1.2. Trifluralin

Trifluralin je herbicid iz grupe dinitroanilina. Njegova molekulska formula je  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ , a strukturna formula je prikazana na slici 2.3.



**Slika 2.3.** Strukturna formula trifluralina

Trifluralin se koristi za suzbijanje korova u zasadima različitih poljoprivrednih kultura kao što su npr. pasulj, kupus, kelj, banija, karfiol, paprika, patlidžan, divlja šargarepa (Fernandes i sar. 2013), u voćnjacima (Hegedus i sar. 2000) i poljima pamuka (OSPAR Commission 2005). U fazi klijanja biljka usvaja trifluralin u predelu hipokotila (Ribas i sar.

## 2. Pregled literature

---

1996 – cit. *Fernandes i sar. 2007*), dok u fazi nicanja preko korena koji je u razvitku (*Tunić 2015*). Toksično delovanje trifluralina se ispoljava inhibicijom ćelijske mitoze (*Fernandes i sar. 2013*) sprečavajući razdvajanje hromozoma što izaziva depolimerizaciju mikrotubula i sprečavanje formiranja deobnog vretena (*Fernandes i sar. 2007*). To dalje onemogućava hromozome da pređu u ekvatorijalnu ravan i njihovu deobu, dok depolimerizacija mikrotubula dovodi do zadebljanja vrhova korena i finalno inhibicije rasta korena biljaka (*Tunić 2015*). Trifluralin se ne smatra mobilnim u biljkama (*Hartzler i sar. 1990 – cit. Jovanović Radovanov i Elezović 2003*), tako da su simptomi na listovima sekundaran odgovor prouzrokovan narušavanjem korenovog sistema (*Parka i Soper 1977 – cit. Jovanović Radovanov i Elezović 2003*).

Trifluralin spada u relativno perzistentne herbicide (*Jovanović Radovanov i Elezović 2003; Fernandes i sar. 2013*), ima visok afinitet prema vezivanju za zemljište (*Fernandes i sar. 2013*). Poluživot trifluralina u zemljištu varira od 3 do 18 nedelja, u zavisnosti od tipa zemljišta i područja, kao i drugih faktora u životnoj sredini (*Calderon i sar. 1999 – cit. Fernandes i sar. 2013*).

Glavni putevi degradacije trifluralina su bio- i foto-degradacija, procenjeno vreme poluživota ove supstance u akvatičnoj sredini iznosi 1,1 h (*OSPAR Commission 2005*). Niska vrednost Henrijeve konstante ( $1,03 \times 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) ukazuje na to da trifluralin ima potencijal da isparava iz zemljišnih i akvatičnih ekosistema (*Tunić 2015*). Degradacija trifluralina u vazduhu je brza, a vrednost poluživota iznosi  $> 5,3$  h (*OSPAR Commission 2005*). Trifluralin ima visok bioakumulacioni potencijal, a vrednost podeonog koeficijenta n oktanol/voda je visok ( $\log K_{ow} = 5,34$ ). Prema podacima Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA) trifluralin predstavlja perzistentu bioakumulativnu toksičnu supstancu (*Dimou i sar. 2004*).

Prema podacima iz 2005. godine trifluralin je bio prisutan u vodenim ekosistemima na području EU u koncentracijama od 0,002 do 0,7  $\mu\text{g/l}$  (*OSPAR Commission 2005*).

Odlukom Evropske komisije, trifluralin je 2007. godine isključen sa Liste odobrenih aktivnih supstanci na području EU, te je njegova upotreba i distribucija zabranjena (<http://www.ec.europa.eu>). Trifluralin se, takođe, ne nalazi u prometu na području RS i njegova upotreba je zabranjena. Navedeni herbicid se nalazi na Listi zabranjenih supstanci, tj. Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci za koje postoji odluka o neodobravanju na nivou EU, a koje su u prometu u RS (deo B2.1) (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>).

### 2.1.1.3.

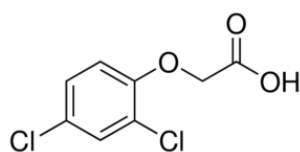
Auksini su grupa biljnih hormona koji regulišu ćelijsku deobu i izduživanje, različite procese u razviću uključujući diferencijaciju tkiva, inicijaciju listova, filotaksiju, starenje, apikalnu dominaciju i rast korena (*Grossman 2010*). Sintetički auksini predstavljaju zajednički naziv za grupu hemijskih jedinjenja koja se koristi u poljoprivredi u svojstvu herbicida ili regulatora rasta. Sintetički auksini su jedinjenja koja „imitiraju” dejstvo prirodnog biljnog auksina, indol-3-sirćetne kiseline (*Woodward i Bartel 2005*). Sintetički auksini, pri nižim koncentracijama, stimulišu veći broj procesa u rastu i razviću biljke, dok pri povišenim koncentracijama izazivaju abnormalno povećanje propustljivosti ćelijskog zida, sintezu

## 2. Pregled literature

proteina i proizvodnju etilena uzrokujući time nekontrolisanu ćelijsku deobu što može dovesti i do uginuća biljke. Sintetički hormoni su stabilniji u tkivu biljke od prirodnih hormona, samim tim imaju jači intenzitet delovanja (*Grossmann 2010*). Prema hemijskoj strukturi sintetički auksini se mogu svrstati u pet grupa: derivati fenoksisirćetne kiseline (2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina tj. 2,4 D), derivati benzoeeve kiseline (dikamba), derivati piridin karboksilne kiseline, aromatični karboksimetil derivati, derivati hinolin karboksilne kiseline (*Rodić 2013*).

### 2.1.1.3.1. 2,4-

Molekulska formula 2,4-dihlorofenoksisirćetne kiseline (2,4 D) je  $C_8H_6Cl_2O_3$ , a strukturna formula je prikazana na slici 2.4.



**Slika 2.4.** Strukturna formula 2,4-dihlorofenoksisirćetne kiseline (2,4 D)

2,4 D se koristi za suzbijanje širokolisnih korova u usevima ratarskih kultura (kukuruz, sirak, pšenica, šećerna repa, soja, pirinač), i voćnjacima (citrusno voće) (*US EPA 2005*).

Bio-degradacija predstavlja glavni vid razgradnje 2,4 D u zemljištu. Poluživot 2,4 D je relativno kratak i iznosi 6,2 dana, zahvaljujući aktivnosti mikrobiološke zajednice. Vreme degradacije u akvatičnim ekosistemima je nešto duže i iznosi 15 dana, dok je 2,4 D relativno perzistentan u anaerobnoj vodenoj sredini npr. podzemnim vodama, gde poluživot varira od 41 do 333 dana. Foto-degradacija predstavlja značajan vid razgradnje ovog herbicida u vodenoj sredini (*US EPA 2005*).

2,4 D se smatra mobilnim herbicidom jer je dobro rastvorljiv u vodi i ima mali afinitet ka vezivanju za zemljište i sediment (*Walters 1999; US EPA 2005*).

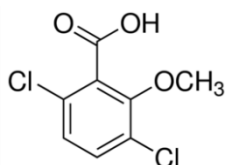
Prema nedavnim podacima monitoringa slivnog područja reke Dunav maksimalna koncentracija 2,4 D u Dunavu, duž čitavog toka, je iznosila 0,02  $\mu\text{g/l}$ , što predstavlja deset puta manju vrednost u odnosu na merene koncentracije tokom 2007. godine (*ICPDR 2015*).

Upotreba 2,4 D na području EU je dozvoljena. 2,4 D, kao odobrena aktivna supstanca u upotrebi u sredstvima za zaštitu bilja na području RS, se nalazi na Listi odobrenih supstanci tj. Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci koje su odobrene u skladu sa važećim propisima EU (deo A1.1) (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>).

### 2.1.1.3.2. Dikamba

Molekulska formula 3,6-dihloro 2-metoksibenzoeeve kiselne (dikamba) je  $C_8H_6Cl_2O_3$ , a strukturna formula je prikazana na slici 2.5.





**Slika 2.5.** Strukturna formula 3,6-dihloro 2-metoksibenzoeve kiseline (dikamba)

Dikamba se koristi za suzbijanje širokolisnih korova u usevima kukuruza, ječma, raži, ovsa, šećerne trske, soje, pšenice.

Dikamba lako formira soli zbog čega se u vodenim rastvorima koriste različiti tipovi soli sa dikambom, kao što su npr. dimetil amin (DMA) so, natrijum so, izopropil amin (IPA) so, diglikol amin (DGA) so i kalijum so (*US EPA 2006*).

Bio-degradacija predstavlja glavni vid razgradnje dikambe u zemljištu (*Zarn i Boobis 2011*), poluživot ovog herbicida varira u rasponu od 4 do 555 dana. Intenzitet degradacije se povećava sa povećanjem temperature i vlažnosti zemljišta (*Caux i sar. 1993*). Glavni proizvodi degradacije su 3,6-dihlorosalicilna kiselina (3,6-DCSA) i 2,5-dihidroksi-3,6-dihlorosalicilna kiselina (*Zarn i Boobis 2011*). Poluživot dikambe u vodenoj sredini je manji od 7 dana, međutim, pojedini proizvodi degradacije su bili detektovani šest meseci nakon primene herbicida (*Caux i sar. 1993*).

Koeficijent distribucije ( $K_d$ ) od 0,8 ukazuje na mali afinitet ovog herbicida ka vezivanju za zamljište, odnosno na njegovu veliku mobilnost u zemljištu, što predstavlja rizik od prodora u podzemne vode (*Caux i sar. 1993*).

Upotreba dikambe na području EU i RS je dozvoljena. Dikamba se nalazi na Listi odobrenih supstanci tj. Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci koje su odobrene u skladu sa važećim propisima EU (deo A1.1) (<http://www.uzb.minpolj.gov.rs>).

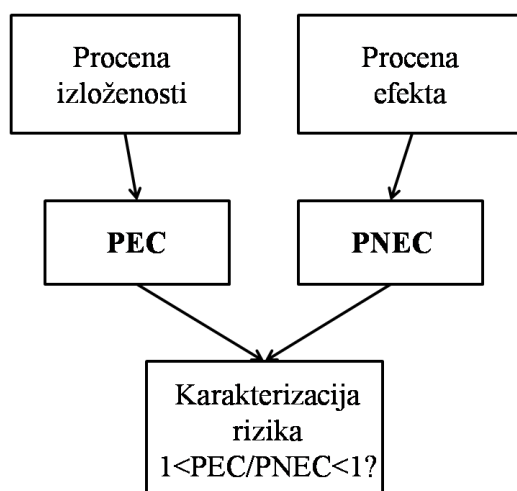
### 2.2. od hemikalija

Ekološka procena rizika podrazumeva procenu potencijalnog uticaja različitih antropogenih supstanci u životnoj sredini, uključujući i pesticide, sa ciljem prevencije neprihvatljivog rizika na prirodne populacije, zajednice i ekosisteme u celini (*SETAC 1997*). Sastoji se iz dva dela, procene izloženosti i procene efekta (slika 2.6). Procena izloženosti se sprovodi sa ciljem određivanja očekivanih koncentracija supstanci u životnoj sredini (engl. *predicted environmental concentration*, PEC). To se najpre može postići merenjem koncentracija supstanci od interesa u različitim matriksima iz životne sredine. Iako ovaj način jeste najoptimalniji jer se njime odražava stvarno stanje supstanci u prirodi, postoje i jasni nedostaci zbog kojih baziranje procene izloženosti isključivo na merenim koncentracijama ima određena ograničenja. Naime, monitoring programi su neretko vremenski i prostorno ograničeni pa informacije koje dobijamo merenjem predstavljaju često *a posteriori* informacije koje nam govore o zagađenju koje se već desilo ne ostavljajući prostora za primenu preventivnih mera (*Vaj 2011*). Drugi način obuhvata primenu matematičkih modela za predviđanje očekivanih koncentracija različitih supstanci na osnovu znanja o sudbini i ponašanju određenih supstanci u životnoj sredini, a koje je uslovljeno njihovim fizičko-hemijskim osobinama, kao i informacijama o količini, vremenu i frekvenciji primene supstanci (za pesticide) ili ukupnoj emisiji (za ostale regulisane supstance) (*Brock i sar. 2011*).

Procena efekta se dobija ekstrapolacijom rezultata dobijenih ekotoksikološkim testovima. Struktura ekotoksikoloških testova je stepenasta, idući od manje složenih testova koji obuhvataju laboratorijske testove ka kompleksnijim testovima sa većim stepenom ekosistemskog realiteta – npr. mikro-, i mezo-kosmos veštačkim ekosistemima. (*Brock i sar. 2011; Stehle i Schulz 2015*). Procena efekta omogućava određivanje tzv. koncentracije ispitivane supstance bez efekta (engl. *predicted no effect concentration*, PNEC), koja se izvodi iz rezultata najosetljivijeg od serije ekotoksikoloških testova uz primenu odgovarajućeg faktora za ekstrapolaciju – AF (engl. *assessment factor*, AF).

Rizik se izračunava preko tzv. koeficijenta hazarda (engl. *Hazard Quotient*, HQ), koji predstavlja odnos procenjenog nivoa ekspozicije (PEC) i potencijalnog efekta na biološke sisteme (PNEC) (slika 2.6). Ukoliko je HQ manji od 1, smatra se da je ekološki rizik prihvatljiv, i obrnuto, ukoliko je HQ viši od 1, smatra se da rizik nije prihvatljiv, odnosno da postoji realan rizik za biološke sisteme.

$$HQ = PEC / PNEC \quad (2.1)$$



**Slika 2.6.** PEC/PNEC koncept u okviru ekološke procene rizika (ERA). Napomena: PEC (očekivana koncentracija supstance u životnoj sredini), PNEC (koncentracija supstance bez efekta). Modifikovano iz *EC 2012*

### 2.2.1.

Proizvodnja sredstava za zaštitu bilja, njihovo stavljanje u promet kao i upotreba su zakonski regulisani. Na području EU, krovni dokument u upravljanju rizikom od pesticida je Uredba 1107/2009 (*EC 2009*), dok se zasebnim propisima detaljnije definišu procedure pri registraciji novih aktivnih supstanci (*EC 2013a*) i sredstava za zaštitu bilja (*EC 2013b*). U RS pesticidi su regulisani Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja (*Sl. glasnik RS, 41/09*), kao i pratećim propisima.

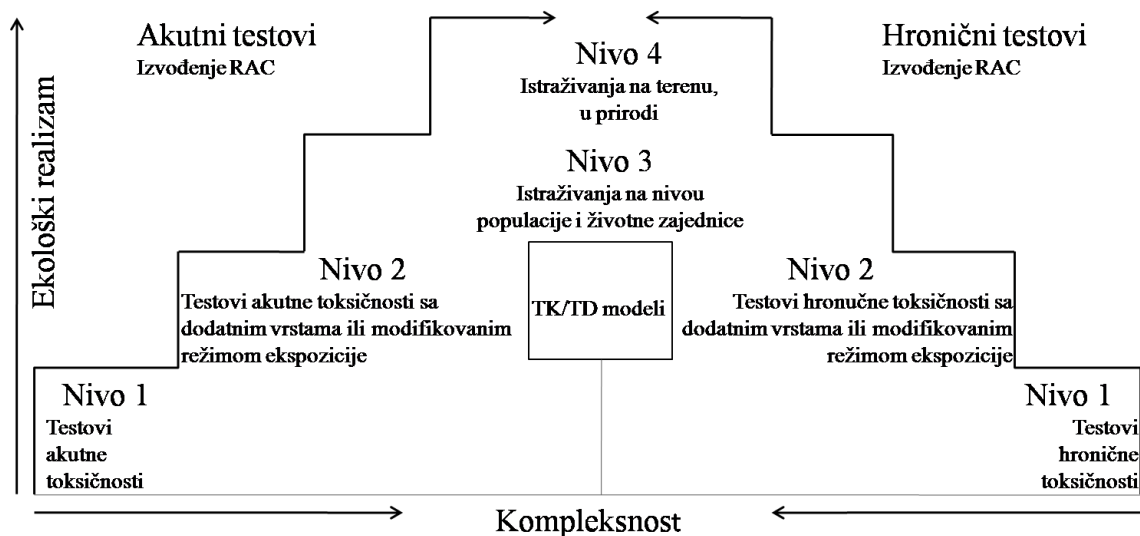
EU je ustanovila dvojni sistem za regulaciju pesticida koji podrazumeva davanje odobrenja za stavljanje u promet aktivnih supstanci na nivou Unije, dok države članice zasebno daju odobrenja za stavljanje u promet proizvoda za zaštitu bilja na bazi odobrenih aktivnih supstanci. Pesticidi, pre stavljanja u promet, podležu detaljnim ispitivanjima fizičko-hemijskih, ekotoksikoloških i toksikoloških svojstava u okviru kompleksne procedure preventivne ERA. Preventivna ERA, kako i u nazivu stoji, predstavlja preventivnu meru zaštite životne sredine. Procena (eko)toksičnosti se u najvećem broju slučajeva zasniva na podacima o aktivnoj supstanci (*EC 2013a*), dok se podaci o (eko)toksikološkim svojstvima sredstva za zaštitu bilja najčešće ne traže, izuzev u slučaju kada se toksičnost ne može predvideti na osnovu informacija o konstituentima ili u slučajevima kada je zbog tipa formulacije u kojima se aktivna supstanca pojavljuje najrealniji način izlaganja ne-ciljnih vrsta pesticidima upravo formulisani proizvod (*EC 2013a, 2013b*). Isti princip se primenjuje u slučaju sredstva za zaštitu bilja sa dve ili više aktivnih supstanci, odnosno procena rizika se najčešće oslanja na saznanja o svojstvima aktivnih supstanci (*EFSA PPR Panel 2013*). Međutim, poznato je da aktivne supstance u smešama mogu da zajedno izazovu drugačiji biološki efekat u odnosu na njihova pojedinačna dejstva. Dodatno, prisustvo npr. pomoćnih supstanci može usloviti veću toksičnost sredstva za zaštitu bilja u odnosu na procenjenu toksičnost na osnovu aktivne supstance (*Kienzler i sar. 2014; Teodorović i Kaišarević 2015*).

## 2. Pregled literature

Donedavno važeći Vodič na kom je bila bazirana procena rizika u akvatičnim ekosistemima, SANCO vodič (*SANCO 2002*), je povučen. Zamenili su ga EFSA vodič za stepenastu procenu rizika od pesticida za akvatične ekosisteme u neposrednoj blizini obradivih površina (*EFSA PPR Panel 2013*, stupio na snagu 01. januara 2015. godine), kojim su obuhvaćene vrste vodenog stuba i Mišljenje PPR Panela (*EFSA PPR Panel 2015*), usvojeno 24. juna 2015. godine, kojim su obuhvaćene zajednice dna. U toku je i izrada Mišljenja za primenu toksiko-kinetičkih/toksiko-dinamičkih (TK/TD) modela kao i jednostavnog modelovanja na nivou lanca ishrane u regulatornoj ERA od pesticida za akvatične organizme (*Teodorović I, personalna komunikacija*).

EFSA šema stepenaste strukture testova na akvatičnim organizmima koji nastanjuju vodeni stup je prikazana na slici 2.7 (*EFSA PPR Panel 2013*). U slučajevima kada postoji neprihvatljivi rizik na nižem nivou procene (nivo 1), prelazi se na naredni nivo procesa ERA (nivo 2-4). PNEC vrednost se zamenjuje regulatorno prihvatljivom koncentracijom ispitivane supstance – RAC (engl. *regulatory acceptable concentrations*, RAC). Prema Vodiču (*EFSA PPR Panel 2013*), određivanje RAC vrednosti na prva dva nivoa procene rizika se bazira na laboratorijskim testovima toksičnosti uz primenu odgovarajućih AF, s' tim što se na 1. nivou koriste isključivo standardne vrste, dok se na 2. nivou mogu koristiti dodatne vrste, zatim testovi sa modifikovanim režimom ekspozicije, različite ne-eksperimentalne tehnike kao što su npr. geomean – srednja vrednost iz različitih testova (engl. *geometric mean*, geomean) i SSD – modelovanje distribucije osetljivosti različitih vrsta (engl. *species sensitivity distribution*, SSD), kao i TK/TD modeli. Geomean tehnika se preporučuje ako je iz dostupne literature upotrebljivo manje od 8 podataka/vrsta po supstanci, dok je za 8 i više podataka preporučljiv SSD model. Na 3. nivou procene rizika ispitivanja se izvode na nivou populacije i životne zajednice, sa ciljem da se proceni potencijalni uticaj pesticida u relativno kontrolisanim uslovima koji su približni uslovima koji vladaju u prirodnim ekosistemima. Upotreba veštačkih ekosistema, na ovom nivou, omogućava pored procene potencijalne toksičnosti, određivanje i drugih faktora kao što je npr. oporavak populacija odnosno životnih zajednica. Na poslednjem, 4. nivou procene rizika se izvode eksperimenti na većoj prostorno-vremenskoj skali, u prirodnim ekosistemima. Iako se u prirodnim uslovima ekosistemski značaj testova povećava, zbog nedostataka standardizacije i kontrole uslova pod kojima se ovaj tip testova izvodi njihova upotreba je često ograničena. Primenjeni AF na višim nivoima procene su znatno niži u odnosu na one koji se primenjuju na nižim nivoima, i postavljaju se od slučaja do slučaja.

Kada su u pitanju svi tipovi pesticida izuzev onih sa herbicidnim svojstvima, jedini obavezni test na primarnim producentima jeste test na algama iz razdela *Chlorophyta* (predložena je vrsta *Raphidocelis subcapitata*). U slučaju herbicida i regulatora rasta biljaka, pored ovog testa, obavezni su i testovi na algama iz nekog drugog razdela, npr. vrsta *Navicula pelliculosa* iz razdela *Bacillariophyta*, kao i na akvatičnoj vrsti makrofita iz roda *Lemna*. U slučaju da vrste roda *Lemna* i alge nisu osetljive na ispitivani herbicid (procenjene IC<sub>50</sub> vrednosti za ispitivani herbicid su iznad 1 mg/l ili ako je herbicid auksin simulator) potrebno je uraditi dodatni test na ukorenjenoj vrsti akvatične makrofite, iz roda *Myriophyllum* ili *Glyceria* (*EFSA PPR Panel 2013*).



**Slika 2.7.** EFSA šema stepenaste strukture testova na akvatičnim organizmima koji nastanjuju vodeni stup  
Modifikovano po *EFSA PPR Panel 2013*.

Generalno smeše jesu obuhvaćenje nizom regulatornih dokumenata. Na primer, u članu 29. Uredbe 1107/2009 se navodi da *"bilo koji vid interakcije između jedne ili više aktivnih supstanci, protektanata, ko-formulanata, kao i drugih pomoćnih supstanci u gotovom proizvodu"* treba uzeti u obzir prilikom evaluacije i odobravanja istog (EC 2009). Osim toga, prema Uredbi Komisije 284/2013 (EC 2013b) ukoliko postoje saznanja *"o potencijalnim kumulativnim i sinergističkim efektima"* gotove formulacije, i ti podaci se moraju razmotriti prilikom registracije, a najoptimalniji način podrazumeva ispitivanje toksičnosti gotovog proizvoda. Međutim, trenutno ne postoji jasan okvir na koji način se može oceniti toksičnost realnih smeša iz životne sredine, gde se istovremeno nalazi veliki broj pesticida koji sadrže različite aktivne supstance.

Kako je prethodno naglašeno stavljanje u promet sredstava za zaštitu bilja na području EU je regulisano Uredbom 1107/2009 (EC 2009), dok se pomenuti EFSA Vodič (EFSA PPR 2013) koristi za određivanje regulatorno prihvatljivih koncentracija pesticida kojima mogu biti izloženi hidrobionti u akvatičnim ekosistema u neposrednoj blizini obradivih površina. Sa druge strane WFD, preko Direktive 2008/105/EC (EC 2008b), reguliše uspostavljanje standarda kvaliteta, odnosno graničnih vrednosti (maksimalne godišnje, MAC-EQS i prosečne godišnje, AA-EQS) za prioritetne i prioritetne hazardne supstance u površinskim vodama, sedimentu i bioti, za različite grupe zagađujućih supstanci, uključujući i izvestan broj pesticida.

Izvođenje EQS za prioritetne i prioritetne hazardne supstance, kao i specifične polutante koji su definisani na nivou sliva je detaljno objašnjeno u radnoj verziji Vodiča za postavljanje EQS (EC 2011b). Direktiva 2008/105/EC ne uzima u obzir potencijalni efekat smeša. EQS se može, u određenim slučajevima, izračunati za smeše poznatog sastava pod uslovom da sve supstance u smeši imaju sličan mehanizam toksičnog dejstva. Tada se EQS ne određuje za svaku pojedinačnu supstancu u smeši, već za čitavu grupu jedinjenja kao što su npr. dioksini, furani, polihlorovani bifenili (EC 2011b). Ovakav pristup se, trenutno, ne može

## 2. Pregled literature

---

primeniti i u slučaju pesticida, iako je ranije istaknuta neophodnost razmatranja određenih tipova pesticida kao što su npr. triazinski herbicidi i organofosfatni insekticidi, kao potencijalnih kandidata za određivanje standarda kvaliteta na nivou grupe (Lepper 2005).

S' obzirom na to da toksičnost smeša nije u dovoljnoj meri uključena ni u preventivnu (registracija aktivnih supstanci/sredstava za zaštitu bilja) ni u retrospektivnu ERA (istražni monitoring akvatičnih ekosistema) jasna je potreba za dodatnim ispitivanjima, i to ne samo iz istraživačkog interesa već i u funkciji zaštite životne sredine i potencijalnih promena u zakonskim zahtevima u oblasti.

### 2.2.2.

Ekološka procena rizika od pesticida u akvatičnim ekosistemima na području EU se oslanja na rezultate ekotoksikoloških testova izvedenim na reprezentativnim predstavnicima hidrobionata iz različitih trofičkih nivoa uključujući primarne producente, beskičmenjake i ribe (EC 2009). Obavezan korak pri registraciji pesticida predstavljaju testovi inhibicije rasta na zelenim algama (OECD 2011). Ukoliko je u pitanju pesticid sa herbicidnim dejstvom neophodno je sprovesti i test inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* OECD 221 (OECD 2006), i eventualno test na dodatnim vrstama akvatičnih makrofitama.

*L. minor* je, kao standardni test organizam, našla široku primenu u ekotoksikologiji zbog jednostavnog laboratorijskog uzgoja (Bengtsson i Triet 1994; Moody i Miller 2005), široke rasprostranjenosti i značajne uloge ove vrste unutar ekosistema, zatim kratkog generacijskog vremena (Drost i sar. 2007) i vegetativnog razmnožavanja čime je njena genetička varijabilnost smanjena (za pregled videti Moody i Miller 2005).

Iako je *L. minor* pokazala visoku osetljivost na veliki broj potencijalno toksičnih supstanci, pojedina istraživanja su potvrdila da su vrste iz roda *Lemna* generano neosetljive na supstance sa specifičnim mehanizmom toksičnog delovanja kao što su npr. herbicidi koji spadaju u grupu sintetičkih auksina. Dodatno, postoji razlika u načinu izloženosti između različitih vrsta akvatičnih makrofita. *L. minor* je flotantna vrsta što znači da je izložena toksičnim supstancama samo donjom površinom, dok su submerzne vrste izložene celom svojom površinom. I na kraju, *L. minor* je neukorenjena vrsta, te se ne može koristiti u proceni toksičnosti sedimenta (Maltby i sar. 2010). Zbog svega navedenog, primena i uloga akvatičnih makrofita u proceni rizika od hemikalija je morala biti revidirana uz dopunu postojeće regulative na području EU. Zbog toga članovi savetodavne grupe za akvatične makrofite (engl. *Advisory Group in Aquatic Macrophyte Ecotoxicology*, AMEG) u okviru Udruženja za ekotoksikologiju i hemiju životne sredine (engl. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, SETAC) su inicirali internacionalni test kalibracije metode na vrstama iz roda *Myriophyllum*. Na osnovu radne verzije OECD protokola iz 2011. godine (OECD Ring test protokol 2011) proverena je osetljivost predložene metode i vrsta (*M. aquaticum* i *M. spicatum*) na herbicide sa različitim mehanizmom toksičnog dejstva. Nakon obrade rezultata internacionalnog testa kalibracije je proizašao standardni protokol sa vrstom *M. spicatum* (OECD 2014), koji je namenjen za primenu na višim nivoima procene rizika od sredstava za zaštitu bilja.

Uredbom EU No 283/2013 (EC 2013a) vrste iz roda *Myriophyllum* (*M. aquaticum* i *M. spicatum*), kao dikotiledone vrste, kao i monokotiledona vrsta *Glyceria maxima* su

## 2. Pregled literature

predložene kao dopunske vrste akvatičnih makrofita u ekološkoj proceni od herbicida u akvatičnim ekosistemima.

U nastavku teksta je dat kratak opis korišćenih akvatičnih vrsta makrofita u istraživanju.

### **2.2.2.1. Osnovne karakteristike vrste *Lemna minor***

*Lemna minor* L. 1753, (narodni naziv sočivica) (slika 2.8.), je sitna monokotiledona flotantra, neukorenjena akvatična makrofita iz porodice Lemnaceae. Vrsta *L. minor* ima specifičnu morfologiju, naime, telo biljke nije diferencirano na stablo i list, već se ceo listoliki zeleni deo biljke može smatrati telom biljke (Blečić 1976). Često obrazuje kolonije koje se sastoje od nekoliko malih ovalnih jedinki prečnika 2-4 mm, koje se ponekad preklapaju (Hillman i Culley 1978).



**Slika 2.8.** *Lemna minor* u prirodnom staništu  
(<http://www.naturespot.org.uk>)

*L. minor* naseljava sporotekuće i/ili stajace vodotoke, bogate nutrijentima u tropskim i umerenim regionima (Mkandawire i Dudel 2005a, 2005b – cit. Mkandawire i Dudel 2007). Smatra se kosmopolitskom vrstom. Ubraja se u eurivalentne vrste jer toleriše širok spektar ekoloških uslova (Hillman i Culley 1978), npr. optimalna temperatura za rast i razvoj iznosi od 20 do 28°C, ali biljka se može naći i u vodama sa temperaturnim opsegom od 6 do 33°C. Dodatno, nalazi se u životnoj sredini pri širokom opsegu pH vrednosti od 3,5 do 10 (Radić Brkanac i sar. 2010), ali optimalan rast, ove biljne vrste, se registruje pri pH od 5,5 do 7,5 (Mkandawire i Dudel 2005a, 2005b – cit. Mkandawire i Dudel 2007).

Iako vrsta *L. minor* spada u flotantra tip akvatičnih makrofita (Stevanović i Janković 2001) za koje je karakterističan dobro razvijen korenov sistem, vrsta *L. minor* ima vrlo tanke korenčiće (Blečić 1976).

Vrsta *L. minor* pripada cvetnicama, međutim, razmnožava se uglavnom vegetativno (Landalt 1980, 1986 – cit. Mkandawire i Dudel 2007).

### 2.2.2.2. Osnovne karakteristike vrste *Myriophyllum aquaticum*

*Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. c. 1880. (slika 2.9.) je dikotiledona, emerzna, ukorenjena akvatična makrofita iz porodice Haloragaceae. Predstavlja nativnu vrstu na području reke Amazon u Južnoj Americi (ISO 2013).



**Slika 2.9.** *Myriophyllum aquaticum* u prirodnom staništu  
(<http://www.freenatureimages.eu>)

Najvećim delom je submerzna, dok vršni deo biljke viri iznad površine vodenog ogledala. Emerzni izdanci se izdižu i do 0,2-0,5 m (Cilliers 1999), dok dužina cele biljke može iznositi nekoliko metara (Cilliers 1999; Hussner i Loch 2005). Pojava bočnih tzv. adventivnih korenova iz nodusa je česta (Henderson 1995 – cit. Cilliers 1999). Stablo je izdeljeno na članke ili noduse sa internodijama, a listovi su perasto deljeni (Tunić 2015). Prisutna je hemofilija odnosno pojava morfološki različitih listova kod iste biljke (Stevanović i Janković 2001). Submerzni listovi su tamniji i slabijeg mehaničkog tkiva, dok su emerzni svetlije zelene boje, čvršći i sa listićima u obliku pera (Winn 1999, Tremolieres 2004 – cit. Wersal i Madsen 2007).

*M. aquaticum* je eurivalentna vrsta i ima sposobnosti adaptacije na različite tipove staništa (Tunić 2015). Najintenzivnija produkcija se beleži u eutrofnim ekosistemima, ali je primećena i adaptacija na niži sadržaj nutrijenata (James i sar. 2006, Geng i sar. 2007 – cit. Hussner 2009). *M. aquaticum* preferira staništa sa dubinom vode do 1 m, ali, naseljava i staništa sa izrazitim varijacijama u vodostaju (Moreira i sar. 1999). Brzina vodotoka predstavlja limitirajući faktor u rasprostranjenju (Moreira i sar. 1999) što su potvrdili i Hussner i Losch (2005), tako da *M. aquaticum* ima nisku abudancu pri brzini vode  $\geq 0,8$  m/s.

U tropskim i subtropskim krajevima se primećuje rast tokom cele godine, dok u umerenim krajevima rast ima sezonski karakter (Cilliers 1999; Hill i Julien 2003). Izvan nativnog područja se primećuje odsustvo muških jedinki što uslovljava isključivo vegetativno razmnožavanje (Henderson 2001 – cit. Hill i Julien 2003).

Vrsta *M. aquaticum* je veoma zastupljena u akvaristici, mimo tropskih i subtropskih regiona (Barreto i sar. 2000). Prisustvo van nativnog područja je prvo zabeleženo na teritoriji Severne Amerike (Les i Mehroff 1999 – cit. Hussner i Losch 2005), a nakon toga i u ostalim krajevima sveta uključujući mnoge evropske zemlje npr. Portugal (Bernez i sar. 2006), Francuska (Chimits 1978 – cit. Barreto i sar. 2000), Španija, Austrija, Velika Britanija, Nemačka i Holandija (Hussner i Losch 2005; Hussner 2009). Međutim, prema saznanjima



## 2. Pregled literature

---

Anačkov i sar. (2013) prisustvo ove vrste, na teritoriji RS, nije zabeleženo. Sposobnost invazivnog širenja *M. aquaticum* predstavlja pretnju autohtonim zajednicama akvatičnih makrofita (Hussner 2009). Može doći npr. do izmena u lancu ishrane u stajaćim i sporotekućim vodama sprečavanjem rasta algi i nativnih akvatičnih makrofita (Tunić 2015). Dodatno, guste populacije *M. aquaticum* mogu dovesti do narušavanja fizičkih i hemijskih svojstava stajaćih i sporotekućih voda, kao i zakrčavanja vodotokova (Cilliers 1999).

### 2.3.

Okvirnom direktivom Evropske unije o vodama (engl. *Water Framework Directive*, WFD; *EC 2000*), koja je stupila na snagu 2000. godine, je uspostavljen pravni okvir u oblasti zaštite i upravljanja vodama na području EU. Navedenom Direktivom je decenijama primenjivan koncept procene kvaliteta vode zamenjene procenom ekološkog i hemijskog statusa akvatičnih ekosistema, sa ciljem njihove zaštite, ali i unapređenja postojećeg kvaliteta. Ekološki status/potencijal, kao mera ekološkog integriteta ekosistema, se određuje na osnovu opštih fizičko-hemijskih parametara kvaliteta vode, bioloških i hidro-morfoloških elementa kvaliteta, dok je hemijski status uslovljen koncentracijom prioriternih supstanci u vodi (alternativno sedimentu i bioti) za koje su propisani standardi kvaliteta životne sredine. Operativni monitoring koji se sprovedi prema zahtevima WFD se najčešće ograničava na merenje prioriternih supstanci, specifičnih polutanata definisanih na nivou slivnih područja i supstanci sa dodatne liste, tzv. „Watch List“ supstanci kandidata za proširenje liste prioriternih supstanci (*EC 2000, 2013c*). Sa druge strane, razvojem analitičkih metoda i njihovom primenom u savremenim istraživanjima se u svakom uzorku vode iz životne sredine detektuje veliki broj supstanci, čak i nekoliko stotina njih (*Brack i sar. 2015; Altenburger i sar. 2015*), uključujući i veliki broj pesticida, njihovih metabolita i degradacionih proizvoda (*Backhaus i Faust 2012; ICPDR 2015*). To znači da su akvatični organizmi u prirodnim staništima izloženi simultanom delovanju velikog broja supstanci (*Altenburger i sar. 2013b*). Ipak, samo mali broj supstanci inače prisutnih i detektovanih u životnoj sredini predstavlja nosioce toksičnosti ili ključne toksične polutante koji su odgovorni za negativan biološki efekat kod eksponiranih organizama (*Vaj 2011*). Zbog svega navedenog, lista prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci se, periodično, dopunjuje novim supstancama za koje se retrospektivnom ekološkom procenom rizika (engl. *ecological risk assessment*, ERA) pokaže da pojedinačno ili u smeši predstavljaju značajan rizik po životnu sredinu, ali i zdravlje ljudi. Trenutno važeća lista sadrži i veći broj pesticida, među kojima je i određen broj herbicida čija upotreba je i dalje dozvoljena na nivou EU (<http://www.ec.europa.eu>).

Iako se procena toksičnosti smeša različitih supstanci na prirodne populacije, zajednice i ekosistemski integritet nalazi u istraživačkom fokusu već više od 15 godina, ova tema i danas predstavlja jedan od izazova sa kojima se suočava primenjena ekotoksikologija (*Altenburger i sar. 2013b; Carvalho i sar. 2014*). Primera radi, kad uzimemo u obzir broj supstanci u komercijalnoj upotrebi dobijamo preko  $5,00 \times 10^9$  potencijalnih kombinacija dvo-komponentnih, odnosno,  $1,67 \times 10^{14}$  tro-komponentnih smeša. Nije moguće ispitati toksičnosti svih potencijalnih kombinacija (*Panizzi i sar. 2017*), zbog čega se pribegava predviđanju toksičnosti smeša na osnovu razvijenih matematičkih modela (*Lokke 2010*). U ekotoksikološkim istraživanjima su najčešće zastupljeni model adicije koncentracija i model nezavisnog dejstva. Teorijski gledano model adicije koncentracija se primenjuje u slučaju da supstance u smeši imaju isti mehanizam toksičnog dejstva, dok se model nezavisnog dejstva primenjuje kada supstance imaju različit mehanizam (*Junghans i sar. 2003; Arrhenius i sar. 2004; Backhaus i sar. 2004a*). Ipak, u regulativnim okvirima model adicije koncentracija je jedinstveno prihvaćen model za predviđanje toksičnosti smeša (*EFSA PPR Panel 2013*).

Nameće se pitanje da li se efekat smeša može sa sigurnošću predvideti na osnovu saznanja o delovanju pojedinačnih supstanci. Niz istraživanja je sprovedeno sa ciljem

utvrđivanja da li su postojeći modeli u dovoljnoj meri pouzdani, npr. Faust i sar. (2001), Backhaus i sar. (2004a), Arrhenius i sar. (2004) i dr. Najčešće se beleži dobro poklapanje između empirijski utvrđene i predviđene toksičnosti smeša, međutim, veliki broj postojećih istraživanja je sproveden sa dvo-komponentnim smešama, dok su podaci o toksičnosti više-komponentnih smeša redi. Dodatno, istraživanja sa više-komponentnim smešama se gotovo isključivo sastoje od supstanci sa potpuno istim ili sasvim različitim mehanizmom toksičnog dejstva, što ne oslikava realnu situaciju u prirodi.

Nijedan od modela ne uzima u obzir potencijalne interakcije između pojedinačnih supstanci u smeši (Cedergreen i Streibig 2005; Kortenkamp i sar. 2009). Ponašanje pojedinačnih supstanci u smeši ne mora biti u saglasnosti sa onim što je predviđeno na osnovu podataka o njihovoj pojedinačnoj toksičnosti (Kortnekamp i sar. 2009; Teodorović i Kaišarević 2015). U određenim situacijama može doći do potcenjivanja rizika, a posebna pažnja se posvećuje ispitivanju da li se ono može dogoditi kod smeša u kojima su supstance prisutne u niskim, sub-letalnim i sub-hroničnim koncentracijama (Kortenkamp i sar. 2009; Carvalho i sar. 2014). Primera radi, prema Cedergreen (2014) sinergizam je zabeležen u 7% slučajeva od ukupno 194 ispitane dvo-komponentne smeše pesticida. Učestalost sinergizma kod više-komponentnih smeša se ne može sa sigurnošću odrediti iz razloga što nedostaju empirijski podaci o toksičnosti takvih tipova smeša (Backhaus 2015), što ukazuje na neophodnost daljih istraživanja u oblasti.

Postoje dva osnovna pristupa u ispitivanju toksičnosti smeša. Prvi pristup se bazira na konceptu ispitivanja ukupne toksičnosti smeše (engl. *whole mixture approach*), a drugi na ispitivanju toksičnosti pojedinačnih supstanci koje čine smešu (engl. *component mixture approach*) (EC 2011a; Kortenkamp i sar. 2009).

### 2.3.1. Procena ukupne toksičnosti smeše

Metod ispitivanja ukupne toksičnosti smeše se primenjuje prilikom ispitivanja toksičnosti kompleksnih smeša iz životne sredine kao što su npr. uzorci površinskih i podzemnih voda, sedimenta, otpadnih voda, zemljišta, vazduha (Kortenkamp i sar. 2009), ili kao što je već rečeno ranije u tekstu, smeša poznatog sastava koje su namenski unete u životnu sredinu (npr. sredstva za zaštitu bilja) (EC 2011a).

Ovakav tip ispitivanja je našao praktičnu primenu u nekoliko naučnih i regulatornih metoda. Prva od njih jeste efektom-usmerena analiza (engl. *effect-directed analysis*, EDA), koja podrazumeva frakcionisanje uzoraka iz životne sredine, biološke i hemijske analize frakcija (Brack 2003). Druge dve metode su razvijene od strane US EPA. TIE metoda (engl. *toxicity identification and evaluation*, TIE), isto kao i kod EDA, se bazira na frakcionisanju, a zatim identifikaciji i evaluaciji toksičnih supstanci u različitim matriksima iz životne sredine (US EPA 1991, 1993). Sa druge strane, WET metoda se koristi prilikom testiranja uzoraka otpadne vode (engl. *whole effluent toxicity* (WET) testing,) (US EPA 2000a). Pandam WET metodi, na području Evrope, jeste WEA (engl. *whole effluent assessment*, WEA) (OSPAR Commission 2007).

### 2.3.2. Procena efekata sme a na osnovu saznanja o delovanju pojedina nih supstanci

U cilju predviđanja toksičnosti smeša, na osnovu informacija o efektu pojedinačnih supstanci koje ulaze u sastav smeše, razvijani su različiti matematički modeli od koji su dva modela našla najširu primenu. Ovi modeli su označeni kao model adicije koncentracija i model nezavisnog dejstva. Načelni stav jeste da u slučaju kada supstance u smeši imaju sličan mehanizam toksičnog dejstva model adicije koncentracija se smatra odgovarajućim u proceni njihove toksičnosti, dok ukoliko se supstance razlikuju prema mehanizmu toksičnog dejstva model nezavisnog dejstva se preporučuje (*Faust i sar. 2001; Altenburger i sar. 2003; Arrhenius i sar. 2004*).

U nastavku teksta je dat kratak opis oba modela.

#### 2.3.2.1. Model adicije koncentracija

Model adicije koncentracija (engl. *concentration addition*, CA) se često nalazi u literaturi i pod nazivom model aditivnog dejstva.

CA model su prvi put upotreбили Loewe i Muischnek 1926. godine, i to za dvo-komponentne smeše. Berenbaum je 1985. godine formulisao model za više-komponentne smeše, u obliku koji se i danas koristi (*Junghaus i sar. 2003*).

CA model se može matematički izraziti sledećom jednačinom:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1 \quad (2.2)$$

gde  $c_i$  predstavlja koncentraciju  $i$ -te supstance u  $n$ -komponentnoj smeši koja dovodi do  $x\%$  efekta, a najčešće se koristi  $EC_{50}$ . Frakcija  $c_i/ECx_i$  se označava i kao toksična jedinica (TU) (*Sprague 1970 – cit. Junghaus i sar. 2003*). Svaka frakcija  $c_i/ECx_i$  predstavlja relativnu toksičnost supstance na osnovu njene koncentracije u smeši i relativne potentnosti. Ukoliko je suma toksičnih jedinica jednaka 1, supstance u smeši se ponašaju aditivno.

Prema CA modelu svaka pojedinačna supstanca u smeši doprinosi ukupnoj toksičnosti na osnovu svoje relativne potentnosti i koncentracije, što znači da pojedinačne supstance koje su prisutne čak i u koncentracijama koje pojedinačno ne uslovljavaju efekat mogu uticati na toksičnost smeše, ukoliko se u smeši nađe dovoljno veliki broj takvih supstanci (*Kortenkamp i sar. 2009*). Na osnovu CA modela, supstance se posmatraju kao uzajamni rastvarači i razlikuju se samo u potentnosti. Hipotetički, moguće je da jedna supstanca bude zamenjena delom ili u potpunosti drugom a da time ne dođe do promene toksičnosti celokupne smeše (*Kortenkamp i sar. 2009*).

#### 2.3.2.2. Model nezavisnog dejstva

Model nezavisnog dejstva (engl. *independent model*, IA) se primenjuje u situacijama kada supstance u smeši primarno deluju na različita molekulska ciljna mesta i zajedno dovode do negativnog efekta nizom reakcija unutar organizma. Model se primenjuje pod pretpostavkom

## 2. Pregled literature

---

da su efekti pojedinačnih supstanci u smeši međusobno nezavisni (*Kortenkamp i sar. 2009; Kienzler i sar. 2014*). Hipotetički, ne postoji značajan efekat smeše u slučaju da su sve supstance u smeši prisutne u koncentracijama koje pojedinačno ne uslovljavaju efekat (*EC 2011a*). Ipak, pojedini eksperimentalni podaci upućuju na pojavu sinergizma i to ne samo kod smeša u kojima su pojedinačne supstance prisutne pri koncentracijama koje pojedinačno ne uslovljavaju efekat, a imaju sličan mehanizam toksičnog dejstva, već i kod onih supstanci sa različitim mehanizmom (*Coors i Frische 2011*).

IA model je prvi put upotrebio Bliss 1939. godine, i to za dvo-komponentne smeše (*Junghaus 2004*). Backhaus i sar. (2000) i Faust i sar. (2003) su, za potrebe predviđanja toksičnosti više-komponentnih smeša, preformulisali model (*Junghaus 2004*), koji se može izraziti sledećom jednačinom:

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_{mix})) \quad (2.3)$$

$$c_{mix} = c_1 + \dots + c_n \quad (2.4)$$

gde  $c_i$  predstavlja koncentraciju  $i$ -te supstance u smeši,  $E(c_{mix})$  ukupni efekat smeše, a  $n$  ukupan broj supstanci u smeši pri ukupnoj koncentraciji  $c_{mix}$ .

Različite studije su potvrdile da se  $EC_{50}$  vrednosti, predviđene na osnovu CA modela, obično ne razlikuju više od faktora 5 u odnosu na vrednosti koje su predviđene pomoću IA modela (*Backhaus i sar. 2004a; Kortenkamp i sar. 2009*). Predviđene  $EC_x$  vrednosti na osnovu CA modela su najčešće niže u odnosu na vrednosti koje su predviđene drugim modelom (*Kortenkamp i sar. 2009*), zbog čega se CA smatra protektivnijim (*Kortenkamp i sar. 2009; Kienzler i sar. 2014*). Zbog svega navedenog, u regulativnim okvirima CA model je jedinstveno prihvaćen za predviđanje toksičnosti smeša, nezavisno od mehanizma toksičnog dejstva supstanci u smeši (*EFSA PPR Panel 2013*). Dodatno, IA model nije dovoljno teorijski utemeljen, što limitira njegovu upotrebu.

Primena oba modela podrazumeva detaljno poznavanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava ispitivane smeše. Za većinu supstanci koje se javljaju u životnoj sredini ne postoje detaljne informacije o mehanizmu toksičnog dejstva koje bi omogućile da ih klasifikujemo u grupe sa sličnim ili različitim dejstvom, što limitira upotrebu modela (*Boobies i sar. 2011*).

Kako je i naglašeno ranije u tekstu, ponašanje pojedinačnih supstanci u smeši ne mora biti u saglasnosti sa onim što je predviđeno na osnovu podataka o njihovoj pojedinačnoj toksičnosti (*Kortnekamp i sar. 2009; Teodorović i Kaišarević 2015*). Primena oba modela u potpunosti zanemaruje javljanje potencijalnih interakcija između supstanci u smeši, koje mogu u značajnoj meri prouzrokovati promene u osobinama njenih konstituenata (*Cedergreen 2014; Teodorović i Kaišarević 2015*). Interakcije se mogu javiti na toksiko-kinetičkom i toksiko-dinamičkom nivou (*Boobies i sar. 2011; EC 2011a; Kienzler i sar. 2014*). Interakcije na toksiko-kinetičkom nivou se mogu odraziti na procese usvajanja, distribucije, transformacije i eliminacije supstanci, dok one na toksiko-dinamičkom nivou mogu obuhvatiti promene na ciljnom mestu dejstva.

## 2. Pregled literature

Uzajamno dejstvo između dve ili više supstanci može usloviti jači (sinergizam) ili slabiji (antagonizam) efekat ispitivane smeše u odnosu na efekat predviđen na osnovu dva prethodno navedena modela (*EC 2011a; Kienzler i sar. 2014; Buha i Matović 2015*). Sinergizam označava zajedničko delovanje supstanci na način da je efekat smeše veći nego što se procenjuje za aditivnost na bazi toksičnosti pojedinačnih supstanci. Sa druge strane, antagonizam predstavlja zajedničko delovanje supstanci kod kojeg je efekat smeše manji nego što se procenjuje za aditivnost na bazi toksičnosti pojedinačnih supstanci u smeši (*Buha i Matović 2015*).

Razvijane su različite metode za proveru odstupanja od aditivnosti, u cilju detekcije i karakterizacije potencijalnih interakcija između supstanci u smeši (*Buha i Matović 2015*). Belden i sar. (2007) su predložili tzv. MDR model (engl. *model deviation ratio*, MDR) koji predstavlja odnos efektivne koncentracije predviđene na osnovu CA modela i empirijski utvrđene efektivne koncentracije u tretmanu smeša, odnosno  $EC_{xCA} / EC_x$ . Smatra se da su empirijski utvrđena toksičnost smeša i toksičnost predviđena na osnovu CA modela u saglasnosti ukoliko se MDR vrednost kreće u opsegu od 0,5 do 2 (*Belden i sar. 2007*). Na osnovu EFSA kategorizacije toksičnost smeše se smatra većom od aditivne u slučaju da MDR iznosi iznad 5, dok se toksičnost smeše smatra manjom od aditivne kada MDR iznosi ispod 0,2 (*EFSA PPR Panel 2013*).

### 2.4. Oporavak od hemijskog stresa

Prisustvo određenog stresora u životnoj sredini ne mora nužno da znači i potencijalnu pretnju za organizme jer samo biodostupne supstance mogu ispoljiti toksično dejstvo. Sa druge strane, čitav niz ekoloških obeležja (engl. *traits*) eksponirane vrste, odnosno populacije može uticati na izloženost i usvajanje potencijalnih stresora, zatim njihovu biotransformaciju i na kraju izlučivanje stresora iz organizma. Osetljivost organizama ne predstavlja dovoljan kriterijum za procenu toksičnog efekta jer se biološke vrste međusobno ne razlikuju samo po osetljivosti već i po mogućnosti oporavka (*De Lange i sar. 2009*).

Ekološki oporavak populacije može biti unutrašnji i spoljašnji. Unutrašnji oporavak zavisi ne samo od sposobnosti pojedinačnih jedinki da prežive (*EFSA Scientific Committee 2016*) već i da se reprodukuju (*Kattwinkel i sar. 2015*), dok spoljašnji zavisi od sposobnosti imigracije pojedinačnih jedinki iz okolnih područja aktivnom ili pasivnom disperzijom, i može se ispitati samo kod mobilnih vrsta (*Kattwinkel i sar. 2015*). Međutim, kod oba tipa, stepen oporavka vrste zavisi od mnogih faktora kao što su npr. životni stadijum u kome je organizam izložen toksičnom stresu, broj generacija na godišnjem nivou, sposobnosti jedinki da aktivno migriraju iz jednog područja u drugo i dr. (*EFSA Scientific Committee 2016*).

Najveći broj dostupnih podataka o potencijalu oporavka hidrobionata nakon izloženosti pesticidima se odnosi na beskičmenjake (npr. *Liess i Beketov 2011; Rico i Van der Brink 2015; Kattwinkel i sar. 2015*).

Za potrebe procene rizika od pesticida, odnosno konkretno herbicida, se vrše ispitivanja oporavka zajednica akvatičnih makrofita na višim nivoima procesa ERA, u veštačkim ekosistemima, međutim, takvi podaci su često poverljivi i nisu dostupni široj naučnoj zajednici (*Kattwinkel i sar. 2015*). Zajednice akvatičnih makrofita su slabije proučavane u odnosu na druge hidrobionte (*Kattwinkel i sar. 2015*). Postoji određen broj dostupnih publikacija o oporavku laboratorijskih biljnih kultura nakon izloženosti pojedinačnim herbicidima, kao na primer *Brain i sar. (2012)*, *Boxall i sar. (2013)*, *Prosser i sar. (2013)* i dr., dok je broj onih koje se tiču oporavka nakon izloženosti smešama herbicida daleko manji (*Knauert i sar. 2009; Knauer i Hommen 2012*).

Kao što je već rečeno prethodno u poglavlju, standardni laboratorijski testovi se koriste na nižim nivoima procesa procene rizika sa ciljem procene toksičnog efekta odabranih pojedinačnih supstanci/smeša (*Boxall i sar. 2002*). Iako je tip ekspozicije, u standardnim testovima toksičnosti, kontinuiran i vremenski definisan protokolom smatra se da takva postavka testova ne odražava uvek uslove koje postoje u životnoj sredini (*Campbell i sar. 1998*). Iz tog razloga, pored tipičnih laboratorijskih testova neretko se izvode i tzv. testovi sa modifikovanim režimom ekspozicije. Ovaj tip testova često podrazumeva diskontinuiranu - pulsnu izloženost test organizama potencijalnim stresorima što omogućava praćenje potencijala oporavka između dva ili više perioda ekspozicije (*Boxall i sar. 2002; Ashauer i sar. 2006; Brain i sar. 2012; Boxall i sar. 2013*).

U poslednjih dvadesetak godina je aktuelna upotreba TK/TD modela za matematičko modelovanje i predviđanje toksičnih efekata (*Aschauer 2010, Jager 2015*). Iako je većina TK/TD modela korišćena najčešće za predviđanje bioloških efekata na beskičmenjacima (*Jager 2015*), u poslednje vreme je upotreba ovog modela proširena i na druge organizme uključujući i akvatične makrofite (*Schmitt i sar. 2013; Hommen i sar. 2016; Heine i sar.*

2016). Pored predviđanja toksičnih efekata, modelovanje može poslužiti kao koristan alat i za procenu oporavka (*Kattwinkel i sar. 2015*). Međutim, iako danas različiti modeli nalaze svoju primenu u ekotoksikološkim studijama, njihova upotreba u ERA je tek u začetku (*Kienzler i sar. 2014*).

### 2.4.1. Oporavak ne-

Veliki broj autora je naglasio neophodnost povećanja stepena ekološkog realiteta u standardnoj ekotoksikološkoj praksi na kojoj trenutno počiva procena rizika od zagađujućih supstanci u životnoj sredini (npr. *Chapman 2002; Vigni i sar. 2006; Van den Brink 2008; Kattwinkel i sar. 2015*), što se može postići integracijom toksikološke osetljivosti i potencijala oporavka ne-ciljnih organizama u ERA (*EFSA Scientific Committee 2016*).

Prema postojećoj regulativi studije oporavka se ne pominju eksplicitno i nisu obavezne u ERA. Međutim, one se moraju uzeti u obzir u slučaju da se očekuje, odnosno primeti efekat sredstava za zaštitu bilja na ekosistem i/ili ne-ciljne organizme (*EFSA Scientific Committee 2016*). U tim situacijama oporavak jedinki/populacija/zajednica se prati u mikro- i mezo-kosmos veštačkim ekosistemima, na višim nivoima procene rizika (*EFSA PPR Panel 2013*).

Kada se procena efekata za izvođenje RAC vrednosti vrši isključivo na osnovu podataka o toksikološkoj osetljivosti (engl. *ecological threshold option*, ETO), dozvoljeni su jedino „zanemarljivi toksični efekti“ zbog čega se oporavak eksponiranih organizama i ne prati. Sa druge strane, određeni efekti na nivou populacije su dozvoljeni samo pod uslovom da dođe do oporavka u tačno definisanom vremenskom periodu. U tim situacijama za izvođenje RAC se koriste i podaci o potencijalu oporavka populacija (engl. *ecological recovery option*, ERO). U slučaju akvatičnih makrofita, „manji toksični efekti“ su dozvoljeni ukoliko se populacija oporavi u okviru nekoliko nedelja, dok su „srednji toksični efekti“ dozvoljeni ukoliko dođe do oporavka tokom nekoliko meseci. Takozvani „značajni toksični efekti“ nisu poželjni čak ni u slučaju da je oporavak nakon ekpozicije moguć (*EFSA PPR 2013; EFSA Scientific Committee 2016*).

Proces procene rizika je odvojen od procesa upravljanja rizikom, tako da procenitelji rizika ne mogu dati konačnu odluku da li će se određena mera primeniti. Donošenje upravljačkih odluka, uključujući i primenu npr. ETO/ERO opcija, spada u nadležnost upravljača rizika. Upravljači rizika se oslanjaju na naučne informacije dobijene ekološkom procenom rizika (*EFSA PPR Panel 2013*), ali uzimajući u obzir i druge aspekte životne sredine kao što su npr. socijalni, pravni, politički i ekonomski (*US EPA 1996*). Na nivou EU upravljač rizikom je Evropska Komisija, a na nacionalnim nivoima kompetentni organi koji daju odobrenja za stavljanje sredstva za zaštitu bilja u promet.

Razlog zašto se oporavak ne prati u standardnim ekotoksikološkim laboratorijskim testovima koji se obično koriste u ERA sredstava za zaštitu bilja proizilazi iz činjenice da trenutno ne postoje regulatorni zahtevi koji bi uslovlili uvrštavanje studija oporavka test organizma/populacija nakon izlaganja toksičnim supstancama u postojeće protokole (*Teodorović i sar. 2012; Brain i sar. 2012*). Nasuprot tome, u toksikološkim testovima na sisarima u cilju procene efekata na ljudsko zdravlje, oporavak organizama na individualnom nivou je regulatorno prihvaćen i stoga intergisan u standardne laboratorijske protokole npr.



## 2. Pregled literature

---

OECD 408, 407 (*OECD 1998, 2008*). S` tim u vezi, procena rizika po zdravlje ljudi podrazumeva integralno i oporavak test organizama, najčešće glodara, nakon dejstva zagađujućih supstanci.

Iako je proces ERA uslovljen regulativom, gde je definisano da se ekološki oporavak prati samo na višim nivoima procene rizika, oporavak se može pratiti na svim nivoima biološke organizacije tj. od pojedinačnih jedinki do ekosistema (*EFSA Scientific Committee 2016*). S` tim u vezi, korisne informacije koje mogu poslužiti kao preliminarna ocena efikasnosti oporavka ne-ciljnih organizama u životnoj sredini od toksičnog dejstva pojedinačnih supstanci/smeša, se mogu dobiti već na osnovu laboratorijskih istraživanja na individualnom i populacionom nivou (*Teodorović i sar. 2012*).

### 2.5. Uticaj prirodne organske materije

Istraživanja pokazuju da efekat zagađujućih supstanci na živi svet u akvatičnim ekosistemima zavisi od fizičko-hemijskih osobina supstanci, zatim njihovih koncentracija u životnoj sredini, ali i od velikog broja biotičkih i abiotičkih faktora sredine. Zbog toga je u okviru različitih naučnih istraživanja ispitivan uticaj različitih faktora kao što su prirodna organska materija (POM), tvrdoća, temperatura, pH na dejstvo zagađujućih supstanci na pojedinačne jedinke, populacije i akvatične ekosisteme u celini (*Lydy i sar. 1990; De Schamphelaere i Janssen 2004; Mager i sar. 2011*).

POM se može definisati kao smeša sačinjena od organske materije koja nastaje u prirodi različitim biološkim (mikrobiološkim) procesima. Abiotičkim procesima dolazi do dalje degradacije i transformacije organske materije nastale mikrobiološkim putem, čime nastaju različiti degradacioni i transformacioni proizvodi (*Ortego i Benson 1992*). Najveći procentualni udeo u POM imaju huminske materije, i to 60-80% (*Boggs i sar. 1985 – cit. Benson i Long 1991*), dok ostatak čine ugljeni hidrati, proteini, masne kiseline, fenoli, steroli, ugljovodonici, urea, porfirini i ostala organska jedinjenja (*Gjesing 1998 – cit. Molnar 2011*).

Huminske materije, iz razloga što variraju u sastavu i strukturi, molekularnoj težini, broju i poziciji funkcionalnih grupa u zavisnosti od svog porekla i starosti organskog materijala, nemaju dovoljno definisanu strukturu (*De Paolis i Kukkonen 1997*), te se ne mogu klasifikovati kao bilo koja druga klasa hemijskih jedinjenja. Stoga, podela huminskih materija se vrši na osnovu njihove rastvorljivosti i molarne mase (*Benson i Long 1991*), i one se dele na fulvo kiseline, huminske kiseline i humin. Fulvo kiseline se rastvaraju u vodi pri bilo kom pH, huminske kiseline se rastvaraju u vodi samo pri višim pH vrednostima (obično iznad 8), dok se humini ne mogu rastvoriti i nalaze se isključivo u sedimentu i zemljištu. U poređenju sa huminskim kiselinama, fulvo kiseline su manji molekuli, odlikuju se većom rastvorljivošću (*Ortego i Benson 1992*) i imaju manja aromatična svojstva (*Vik i Eikebrokk 1989 – cit. Ivančev Tumbas 2014*). Fizičke i hemijske osobine humina su mnogo manje poznate, verovatno zbog njegove nerastvorljivosti, jer je time ograničen broj instrumentalnih metoda koje se mogu koristiti za njegovo izučavanje (*Tričković 2009*).

Direktno određivanje koncentracija huminskih materija u vodi je otežano zbog navedene heterogenosti i kompleksnosti huminskih materija, kao i nemogućnosti definisanja njihove strukture. Međutim, za tu svrhu se primenjuju indirektni parametri tj. ukupni organski ugljenik (eng. *total organic carbon*, TOC) i rastvoreni organski ugljenik, odnosno DOC (engl. *dissolved organic carbon*, DOC) (*Molnar 2011*). Uobičajen sadržaj DOC u površinskim vodama iznosi od 1 do 15 mg/l (*Smith i sar. 2015*). Prema podacima iz 2012. godine Kerkez i sar. (2012), sadržaj DOC u reci Dunav je iznosio 2,66 mg/l. Slične vrednosti su prikazane u radu Leovac i sar. (2015), gde autori navode da je srednja godišnja koncentracija DOC u površinskim vodama 2,90 mg/l. U skandinavskim zemljama se beleže i nešto više vrednosti (iznad 20 mg/l) (*Oikari i sar. 1992*).

Uticaj POM na biodostupnost, usvajanje i toksičnost metala je intenzivno proučavan tokom poslednjih decenija (*Aiken i sar. 2011*). Poznato je da huminske i fulvo kiseline sadrže različite funkcionalne grupe aromatičnih struktura (*Meems i sar. 2004*), kao što su npr. fenolne i karboksilne grupe (*Molnar 2011*), koje im omogućavaju da grade kompleksne forme sa rastvorenim jonima metala. Različite forme metala se često razlikuju po svojoj

## 2. Pregled literature

---

biodostupnosti (*EC 2011b*), međutim, smatra se da su metali formiranjem kompleksa sa raspoloživom organskom materijom nedostupni za usvajanje od strane organizama, (*Merrington i Peters 2012*), čime se posredno smanjuje njihova toksičnost u akvatičnim ekosistemima. Primera radi, o umanjenoj toksičnosti metala u prisustvu POM govore podaci Benson i Long (*1991*), Oikari i sar. (*1992*), Ravichandran (*2004*), Aiken i sar. (*2011*).

Brojnost dokumentovanih podataka o uticaju faktora sredine na toksičnost metala su uslovlila njihovo uvrštavanje u regulatorna dokumenta. Vrednosti EQS za prioritete supstance u vodi prema WFD se i dalje postavljaju uglavnom uniformno, odnosno, uticaj različitih biotičkih i abiotičkih varijabli u prirodnim akvatičnim ekosistemima se po pravilu ne uzima u obzir (*EC 2011b*). Međutim, na nivou EU je načinjen izuzetak, u slučaju kadmijuma EQS se postavljaju za 5 različitih klasa tvrdoće vode. Sa druge strane, države članice, u slučaju prekoračenja EQS za kadmijum, olovo, živu i nikel, mogu da uzmu u obzir kao olakšavajući faktor različite fizičko-hemijske parametre kvaliteta vode za koje je utvrđeno da mogu da utiču na biodostupnost metala, a kao što su npr. tvrdoća, pH, sadržaj DOC (*EC 2008b*).

Podaci o ponašanju zagađujućih organskih supstanci u prisustvu POM su i dalje oskudni. Na osnovu raspoloživih podataka POM mogu modulirati toksičnost tako što smanjuju (*Benson i Long 1991; Lee i sar. 1993; Lorenz i sar. 1996; Meems i sar. 2004*) ili povećaju toksičnost organskih supstanci (*Benson i Long 1991; Oikari i sar. 1992; Lee i sar. 1993; Lorenz i sar., 1996*), a ima i podataka da prisustvo POM ne utiče na toksičnost odabranih organskih supstanci (*Lee i sar. 1993; Meems i sar. 2004*). Benson i Long (*1991*) su ispitali toksičnost određenih organofosfornih i karbamatnih insekticida u prisustvu i odsustvu huminskih materija i našli da je organska materija uticala na povećanje toksičnosti karbarila i metil parationa, međutim, ista grupa autora je ukazala na smanjenje toksičnosti drugih insekticida – hlorporifosa, karbofurana i azinofos metila. Prema Oikari i sar. (*1992*) toksičnost lindana je povećana u prisustvu POM. Kada je reč o herbicidima, broj dostupnih podataka u literaturi je znatno manji. Lorenz i sar. (*1996*) su zabeležili oprečne podatke o toksičnosti triazinskog herbicida, terbutilazina, u prisustvu i odsustvu POM, u zavisnosti od posmatranog parametra u testu. Očigledno je da ne postoji jedinstven obrazac ponašanja organskih supstanci u prisustvu POM. Vid interakcija u najvećoj meri zavisi od tipa i koncentracije huminskih materija kao i osobina organskih supstanci (*Chen i sar. 2008*) sa jedne strane, odnosno načina usvajanja organskih supstanci u zavisnosti od biologije odabranih test organizama sa druge strane.

Najveći broj ekotoksikoloških podataka je dobijen standardnim laboratorijskim testovima, gde se ispitivanje toksičnosti rastvorljivih pojedinačnih supstanci/smeša izvodi u standardnom sintetičkom medijumu, tačno definisanog i poznatog sastava. Međutim, sintetički medijum je bogat neorganskim materijama, a takvi ekperimentalni uslovi nisu ekološki relevantni iz razloga što se na taj način zanemaruje činjenica da se u prirodnim površinskim i podzemnim vodama nalazi POM u vidu rastvorenih organskih materija i suspendovanih čestica. Jasna je potreba da se određivanje toksičnosti vrši u uslovima što približnijim realnim uslovima u životnoj sredini. Sadržaj i tip POM je promenljiv u zavisnosti od mnogobrojnih faktora sredine, što onemogućuje da se standardni testovi izvode u organskom matriksu. Pitanje koje

## 2. Pregled literature

---

se nameće jeste da li standardni testovi toksičnosti potcenjuju ili precenjuju stvaran rizik od ispitivanih supstanci.

.

### 3. Ciljevi

Istraživanja u okviru ove disertacije predstavljaju deo istraživanja sprovedenih za potrebe nacionalnog projekta “Uticaj vodenog matriksa i fizičko-hemijskih osobina relevantnih organskih ksenobiotika na ekotoksičnost i ponašanje u odabranim procesima prečišćavanja voda”, rukovodilac prof. dr Ivana Ivančev Tumbas, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, br. 172028.

Ciljevi ove disertacije su bili:

Ispitivanje i poređenje efekata pojedinačnih herbicida – atrazina, izoproturona i trifluralina – sa efektima njihovih smeša u standardnom testu inhibicije rasta, OECD 221, (*OECD 2006*) na vrsti *Lemna minor* L. 1753 (Lemnaceae).

Odabrane su smeše sa sličnim (dvo-komponentna smeša atrazina/izoproturona) i različitim (dvo-komponentna smeša atrazina/trifluralina i izoproturona/trifluralina, kao i tro-komponentna smeša) mehanizmom toksičnog dejstva, gde atrazin i izoproturon pripadaju grupi fotosintetičkih inhibitora delujući na fotosistem II (PS II), a trifluralin pripada grupi dinitroanilina i kroz inhibiciju ćelijske mitoze iskazuje toksično dejstvo;

Određivanje potencijala oporavka vrste *L. minor* nakon izloženosti navedenim pojedinačnim herbicidima/smešama. Standardni laboratorijski testovi se koriste na nižim nivoima procesa procene rizika (ERA) sa ciljem procene toksičnog efekta odabranih pojedinačnih supstanci/smeša u životnoj sredini, oslanjajući se isključivo na podatke o toksikološkoj osetljivosti. Prema postojećoj regulativi oporavak jedinki/populacija se na ovom nivou ERA ne prati. Sa ciljem dobijanja uvida u eventualno potcenjivanje rizika uslovljeno izostavljanjem informacija o oporavku, u ovoj disertaciji je izvršena modifikacija laboratorijskog protokola. Oporavak vrste *L. minor* je praćen tokom dodatnih pet, odnosno sedam dana nakon sedmodnevne ekspozicije;

Ispitivanje uticaja prirodne organske materije (POM), koja je u testovima na akvatičnim makrofitama simulirana preko huminskih materija (HM) u realnim koncentracijama u površinskim vodama, na toksičnost odabranih pojedinačnih herbicida/smeša. Testovi su izvođeni sa ciljem sagledavanja potencijalnih razlika u toksičnosti izabranih pojedinačnih herbicida/njihovih smeša, uslovljenu prisustvom HM, čime bi se dobio odgovor na pitanje da li standardni testovi toksičnosti potcenjuju ili precenjuju stvaran rizik od pesticida.

Za izvođenje testova uticaja HM na dejstvo odabranih pojedinačnih supstanci/smeša su odabrane: vrsta *L. minor* i dodatna vrsta *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. c. 1880. (Haloragaceae) (*OECD Ring test protokol 2011*). U testu sa *L. minor* je ispitana osetljivost i potencijal oporavka vrste nakon izloženosti atrazinu, 2,4 D, i njihovim dvo-komponentnim smešama, dok u testu sa *M. aquaticum* je ispitana toksičnost izoproturona, dikambe i njihovih dvo-komponentnih smeša, zbog čega je izvršena modifikacija oba protokola;

### 3. Ciljevi

---

Utvrđivanje stepena odstupanja između empirijski utvrđene toksičnosti smeša herbicida sličnog i različitog mehanizma toksičnog dejstva, sa teorijski očekivanim vrednostima na osnovu modela adicije koncentracija, odnosno CA modela u testovima na obe vrste akvatičnih makrofita;

Ispitivanje da li se postojeći CA model može koristiti i za procenu toksičnog dejstva smeša uzimajući u obzir podatke o toksičnosti pojedinačnih susptanci, koje ulaze u sastav smeše, koji se baziraju na saznanjima o osetljivosti, ali i potencijalu oporavka eksponiranih vrsta akvatičnih makrofita.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Uzgoj laboratorijskih kultura

Laboratorijska kultura vrste *Lemna minor* Laboratorije za ekotoksikologiju (UNS, PMF LECOTOX) potiče iz prirodne populacije Specijalnog rezervata prirode „Koviljsko-petrovaradinski rit“, RS. Pre početka upotrebe biljne kulture u testovima je zadovoljen period adaptacije na rast u odgovarajućem hranljivom rastvoru u standardnim laboratorijskim uslovima, u predviđenom periodu od 2 meseca. Laboratorijska kultura *L. minor* (slika 4.1.) je gajena u tamnim posudama u hranljivom rastvoru *Steinberg* (ISO 2013), čiji je sastav prikazan u tabeli 4.1. Uslovi pri gajenju laboratorijske kulture i pri izvođenju testova su bili identični: konstantna temperatura od  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  i konstantno osvetljenje intenziteta  $85\text{-}135 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



**Slika 4.1.** Laboratorijska kultura vrste *Lemna minor*

**Tabela 4.1.** Sastav hranljivog rastvora *Steinberg* prema ISO 16191 (ISO 2013)

Makro-elementi		g/l
Stok rastvor 1	$\text{KNO}_3$	17,50
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,50
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,63
Stok rastvor 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,00
Stok rastvor 3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14,75
Mikro-elementi		mg/l
Stok rastvor 4	$\text{H}_3\text{BO}_3$	120,00
Stok rastvor 5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	180,00
Stok rastvor 6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44,00
Stok rastvor 7	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180,00
Stok rastvor 8	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	760,00
	EDTA dinatrijum hidrat	1500,00

Periodično, a obavezno neposredno pre izvođenja testova sa pojedinačnim herbicidima i smešama, osetljivost laboratorijske kulture je proveravana testovima sa referentnom supstancom (3,5 dihlorfenol - 3,5 DCP). Biljna kultura je pokazala zadovoljavajuću

#### 4. Materijal i metode

osetljivost,  $IC_{50}$  za 3,5 DCP su bile u okviru standardom propisanih vrednosti, a u opsegu od 1,94 do 3,22 mg/l (Prilog, tabela 8.1.).

Laboratorijska kultura vrste *Myriophyllum aquaticum* Laboratorije za ekotoksikologiju (UNS, PMF LECOTOX) je oformljena od biljnog materijala koji je ustupljen od strane Bavarske agencije za zaštitu životne sredine iz Nemačke 2009. godine. Biljke koje su korišćene u testovima su uzgajane u veštačkom sedimentu pripremljenom prema ISO 16191 standardnom protokolu (*ISO 2013*, sastav prikazan u tabeli 4.2.) u tamnim plastičnim posudama zapremine 500 ml (slika 4.2.). Biljke su redovno zalivane razblaženim *Steinberg* hranjivim rastvorom (1:1 v/v, *Steinberg* hranjivi rastvor:destilovana voda). Biljke su gajene u konstantnim uslovima – intenzitet svetlosti  $60-70 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura  $24\pm 0,5^\circ\text{C}$ .



**Slika 4.2.** Laboratorijska kultura vrste *Myriophyllum aquaticum*

**Tabela 4.2.** Sastav standardnog veštačkog sedimenta prema OECD Ring test protokol (2011); OECD (2014)

Sastojak sedimenta	Procentualni udeo sastojka (%)
Treset ( <i>Sphagnum</i> sp.)	5
Kaolin	20
Kvarcni pesak	74
CaCO <sub>3</sub>	1

#### 4.2. Testovi

Testovi inhibicije rasta na akvatičnim makrofitama su izvedeni na vrstama: (i) *L. minor* na osnovu standardnog protokola OECD 221 (*OECD 2006*); (ii) *M. aquaticum* na osnovu radne verzije OECD protokola (*OECD Ring test protokol 2011*). Navedenim protokolima, na obe vrste, je definisan period ekspozicije u trajanju od sedam dana. U cilju određivanja efikasnosti oporavka biljnih vrsta nakon izloženosti odabranim pojedinačnim herbicidima/njihovim smešama navedeni protokoli su modifikovani. Naime, oporavak je praćen tokom dodatnih pet odnosno sedam dana testa, u zavisnosti od test tretmana. Pojednosti vezane za izvođenje testova, na obe vrste akvatičnih makrofita, su prikazane u tekstu koji sledi.



### 4.2.1.1. Test inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor*

Testovi inhibicije rasta na vrsti *L. minor* izvedeni na osnovu OECD 221 (OECD 2006) protokola su postavljani u semi-statičkim uslovima (slika 4.3.). *Steinberg* hranjivi rastvor je korišćen kao kontrolni tretman i diluent za pravljenje serije razblaženja. Hranljivi rastvor u kontrolnim tretmanima i rastvori odgovarajućih koncentracija test supstanci su menjani nakon 48 ili 72 h tj. trećeg i petog dana testa odnosno DAT 3 i DAT 5 (skraćenica DAT se odnosi na dan nakon tretmana). Semi-statičkim uslovima su obezbeđene relativno stabilne koncentracije test supstanci i nutrijenata, a redovnom promenom rastvora, u kontrolnim i test tretmanima, je onemogućen razvoj algi. Nakon sedmodnevnog perioda ekspozicije, u cilju praćenja efikasnosti oporavka, biljke su premeštene u *Steinberg* hranjivi rastvor. Period oporavka je trajao tokom dodatnih pet dana u testovima sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom, kao pojedinačnim supstancama, odnosno sedam dana u testovima sa 2,4 D i dikambom, kao pojedinačnim supstancama, kao i u testovima sa smešama. Hranjivi rastvor je tokom perioda oporavka menjan nakon 48 ili 72 h tj. desetog i dvanaestog dana testa odnosno DAT 10 i DAT 12. Celokupan period trajanja testova sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom kao pojedinačnim supstancama je iznosio dvanaest dana, dok su testovi sa 2,4 D i dikambom kao pojedinačnim supstancama, kao i testovi sa smešama trajali četrnaest.



**Slika 4.3.** Test inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor*

Po 3 kolonije sa po 2 do 4 jedinke su postavljane u svaku posudu (sa ukupnim brojem jedinki od 9 do 12 po posudi). Na početku svakog testa (DAT 0) u svaku posudu je postavljan jednak broj jedinki. Posude su bile zapremine 250 ml i sadržale su 150 ml hranjivog rastvora ili test rastvora. Sažetak uslova modifikovanog testa inhibicije rasta na vrsti *L. minor* je prikazan u tabeli 4.3.

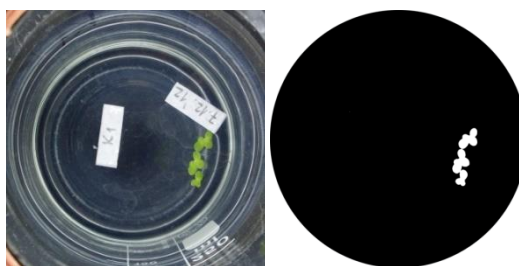
#### 4. Materijal i metode

**Tabela 4.3.** Sažetak uslova modifikovanog testa inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* prema OECD (2006)

Biljna vrsta	<i>Lemna minor</i>
Trajanje testa	12 dana (atrazin, izoproturon i trifluralin) 14 dana (2,4 D, dikamba, svi tretmani sa smešama)
Period ekspozicije	7 dana
Period oporavka	5 dana (atrazin, izoproturon i trifluralin) 7 dana (2,4 D, dikamba, svi tretmani sa smešama)
<i>Lemna</i> inokulum	3 kolonije po test posudi; npr. 11 jedinki (3+4+4)
Hranjivi rastvor u kontroli/diluent	<i>Steinberg</i>
Osvetljenje	kontinualno; intenzitet 85-135 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
Temperatura	24 $\pm$ 2°C
Mereni parametri	broj jedinki – BJ, sveža masa – MSv i biljna površina – BP
Biološki odgovor	Inhibicija rasta populacije (%) na osnovu relativne stope rasta (RGR) i prinosa (Y)

Napomena: modifikacija testa obuhvata uvođenje perioda oporavka nakon perioda ekspozicije

Prema standardnom protokolu (OECD 2006), primarni parametar za utvrđivanje inhibicije rasta je broj jedinki, a dodatni parametri su sveža masa i biljna površina. Navedeni parametri su određivani nultog (DAT 0), trećeg (DAT 3), petog (DAT 5), sedmog (DAT 7), desetog (DAT 10), dvanaestog (DAT 12) i četrnaestog dana (DAT 14) testa. Površina biljnog materijala je određena uz pomoć fotografija koje su nastale upotrebom digitalnog fotoaparata koji je bio smeštan u improvizovanu komoru na uvek istom rastojanju od test posuda. Digitalnom obradom fotografija (u programu Adobe Photoshop, verzija cs.3) je određen procentualni odnos biljne površine i ukupne površine (100%) vodenog ogledala u pikselima. Zatim je na osnovu poznate površine test posude u  $\text{cm}^2$  proporcijom izračunata ukupna biljna površina u svim test posudama u  $\text{cm}^2$  (slika 4.4.).



**Slika 4.4.** Vrsta *Lemna minor* na početku testa (DAT 0), pre i nakon obrade fotografije u cilju određivanja biljne površine

Vrednosti relativne stope rasta (RGR), prinosa (Y), kao i inhibicije rasta na osnovu RGR i Y su izračunate za sve korišćene parametre u testu.

#### 4. Materijal i metode

Tokom celokupnog perioda trajanja testa su praćeni osnovni fizičko-hemijski parametri: pH vrednost (pH metar Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW) 340i, Austrija) i intenzitet osvetljenja (digitalni lux metar LX 101OB, Sinometer Instruments, Kina). Temperatura rastvora je merena svakodnevno, a pH rastvora nultog, sedmog i četrnaestog dana testa. Intenzitet osvetljenja je varirao od 85-135  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a temperatura rastvora je iznosila  $24\pm 2^\circ\text{C}$ , što je u okviru preporučenih vrednosti. Nasumičan raspored posuda je bio neophodan kako bi se minimalizovao uticaj razlika u osvetljenosti i temperaturi. Posude su bile prekrivene providnim staklenim pločama kako bi se umanjilo isparavanje i sprečila eventualna kontaminacija.

Kriterijum za validnost testa je definisan standardnim protokolom i odnosi se na dupliranje broja novih jedinki, u kontrolnom tretmanu, za manje od 2,5 dana (d) odnosno 60 sati (h), što odgovara sedmostrukom uvećanju za period ekspozicije od sedam dana. Vreme dupliranja broja novih jedinki se može izračunati na osnovu sledeće formule:

$$T(d) = \frac{\ln 2}{RGR} \quad (4.1)$$

gde su:

- $T(d)$ : vreme dupliranja,
- $RGR$ : relativna stopa rasta.

Kriterijum za validnost testa inhibicije rasta na vrsti *L. minor* propisan standardnim protokolom OECD 221 (OECD 2006) nalaže da vreme dupliranja (engl. *time doubling*, t.d.) glavnog parametra tj. broja jedinki (BJ) u kontroli bude  $\leq 2,5$  d (60 h), odnosno da vrednost  $RGR$  za ovaj parametar bude iznad  $0,275 \text{ d}^{-1}$ . Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 8.2. (a), u Prilogu, uviđa se da je rast biljaka u kontroli zadovoljavajući sa vrednostima  $RGR_{0-7}$  BJ i  $RGR_{0-14}$  BJ od  $0,296 \text{ d}^{-1}$  i  $0,299 \text{ d}^{-1}$ . Utvrđeno vreme dupliranja, za preostala dva parametra (sveža masa – MSV, biljna površina – BP) takođe iznosi  $< 2,5$  dana.

U Prilogu (tabela 8.2. (a)) su prikazane prosečne vrednosti parametara rasta biljaka u kontroli u svim testovima sa pojedinačnim supstancama i smešama na vrsti *L. minor*. Parametri u testovima inhibicije rasta su imali relativno niske vrednosti koeficijenta varijacije (CV, %). Zabeležena je niska varijabilnost  $RGR$ , za 0-7 i 0-14 period testa, svih korišćenih parametara u testu ( $< 30\%$ ), izuzev u slučaju  $RGR_{0-14}$  za parametar biljna površina (CV =  $168,72\%$ ). Varijabilnost vrednosti Y je viša od varijabilnosti  $RGR$ . Razlike u prosečnoj varijabilnosti parametra su relativno male, sa rasponom  $16,54-20,25\%$  za  $RGR_{0-7}$  odnosno  $36,97-78,36\%$  za  $Y_{0-7}$ .

##### 4.2.1.2. Test inhibicije rasta na vrsti *Myriophyllum aquaticum*

Testovi inhibicije rasta na vrsti *M. aquaticum* su izvedeni na osnovu radne verzije protokola OECD iz 2011. godine (OECD Ring test protocol 2011) (slika 4.5.). Period adaptacije, definisan protokolom, u trajanju od tri dana (od DAT -3 do DAT 0) je prethodio testu. Značaj perioda adaptacije se ogleda u podsticanju rasta korena, adaptacije biljne kulture na *Smart&Barco* hranjivi rastvor, kao i na dvo-komponentni test sistem voda-sediment.



**Slika 4.5.** Test inhibicije rasta na vrsti *Myriophyllum aquaticum* u test sistemu voda-sediment

Testovi na vrsti *M. aquaticum* su izvođeni u statičnim uslovima, odnosno tokom sedam dana perioda ekspozicije nije vršena promena rastvora. Efikasnost oporavka, nakon perioda ekspozicije, je praćena tokom dodatnih sedam dana testa (tzv. period oporavka). Sedmog dana testa sve posude sa biljkama su premeštene u hranjivi rastvor *Smart&Barco*, koji nije menjan tokom perioda oporavka.

Standardni veštački sediment (sastav prikazan u tabeli 4.2.) je pripreman najmanje dva dana pre postavljanja testa, radi obezbeđivanja potpunog vlaženja treseta i stabilizacije pH vrednosti. *Smart&Barco* hranjivi rastvor je korišćen kao kontrolni tretman i diluent za seriju razblaženja (sastav prikazan u tabeli 4.4.). *Smart&Barco* hranjivi rastvor se karakteriše manjim sadržajem nutrijenata u odnosu na *Steinberg* hranjivi rastvor jer ne sadrži fosfate i azot. Njegovom upotrebom se sprećava prekomerni razvoj neželjenih algi. Hranjivi rastvor je pripreman najmanje jedan dan pre upotrebe, a pH vrednost se po potrebi podešavala na 7,5 do 8,0.

**Tabela 4.4.** Sastav hranjivog rastvora *Smart&Barco* (*OECD Ring test protokol 2011*)

Sastojak rastvora	mg/l
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	91,7
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	69,0
NaHCO <sub>3</sub>	58,4
KHCO <sub>3</sub>	15,4

Sažetak uslova modifikovanog testa inhibicije rasta vrste *M. aquaticum* je prikazan u tabeli 4.5.

#### 4. Materijal i metode

**Tabela 4.5.** Sažetak uslova modifikovanog testa inhibicije rasta na vrsti *Myriophyllum aquaticum* prema OECD Ring test protocol (2011)

Biljna vrsta	<i>Myriophyllum aquaticum</i>
Period adaptacije	3 dana
Trajanje testa	14 dana
Period	7 dana
ekspozicije	7 dana
Period oporavka	
Početna dužina izdanaka	6 ( $\pm 1$ ) cm
Osvetljenje	16:8h; 120-160 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
Temperatura	22 $\pm 2^\circ\text{C}$
Sediment	Standardni veštački sediment
Hranljivi rastvor u kontroli/diluent	<i>Smart&amp;Barco</i>
<i>Myriophyllum</i> inokulum	u periodu DAT -3 do DAT 0: 5 izdanka po test posudi u periodu DAT 0 do DAT 7: 3 izdanka po test posudi dužina izdanka iznad sedimenta – DS, ukupna dužina izdanka – DU, sveža masa – MSv, suva masa – MSu i sveža masa korena – MK
Mereni parametri	
Biološki odgovor	Inhibicija rasta jedinki (%) na osnovu relativne stope rasta (RGR) i prinosa (Y)

Napomena: modifikacija testa obuhvata uvođenje perioda oporavka nakon perioda ekspozicije

Na početku perioda adaptacije (DAT -3) u svaku posudu je odmereno po 800 g standardnog veštačkog sedimenta, a zatim postavljeno po pet zdravih vršnih izdanaka, bez cvetova, dužine  $6\pm 1$  cm. Masa svakog pojedinačnog izdanka je izmerena, a razlike u masi nisu smele biti veće od 30%. Na posudama je obeleženo pet mesta za pet biljaka, što je omogućilo praćenje individualnog rasta svake jedinke. Izdanci su sađeni na način da oko 3 cm dužine biljke bude iznad sedimenta, ali je kod svakog izdanka izmerena dužina iznad sedimenta. Plastične posude sa biljnim materijalom su smeštane u staklene čase od 2 l i prelivane sa 1,8 l *Smart&Barco* hranjivog rastvora. Nakon perioda adaptacije (DAT 0), dve od pet biljaka iz svake posude su uklonjene. Tri biljke koje su ostavljene su bile najslabije po izgledu, dužini i masi da bi se obezbedila uniformnost biljnog materijala na početku testa. DAT 0 se posmatrao kao početak testa odnosno početak perioda ekspozicije.

Hranjivi rastvor *Smart&Barco* je korišćen i kao kontrola i diluent za pravljenje serije razblaženja ispitivanih pojedinačnih supstanci/smeša. Nultog dana testa hranjivi rastvor koji je stajao u posudama sa biljkama tokom perioda adaptacije je odstranjen, nakon čega su u odgovarajuće posude sipane odgovarajuće koncentracije rastvora pojedinačnih supstanci/smeša, odnosno svež *Smart&Barco* hranjivi rastvor u kontroli.

Primarni parametar za utvrđivanje inhibicije rasta je dužina izdanka iznad sedimenta koji predstavlja jedini nedestruktivni parametar, a dodatni parametri su: ukupna dužina izdanka, sveža i suva masa i sveža masa korena. Dodatni parametri su destruktivni jer je za

#### 4. Materijal i metode

---

njihovo merenje neophodno uklanjanje biljaka iz sedimenta. Zbog toga je protokolom predviđeno pet tzv. „dodatnih posuda”. Nultog dana testa (DAT 0) biljkama iz „dodatnih posuda” je izmerena ukupna dužina, sveža i suva masa u cilju dobijanja srednjih vrednosti za navedene parametare na početku testa.

Svaki tretman je postavljan u šest ponavljanja (posuda) iz razloga što je polovina ponavljanja unutar svakog tretmana korišćena za merenje destruktivnih parametara sedmog dana testa (DAT 7), dok je druga polovina korišćena za merenje ovih parametara četrnaestog dana, odnosno na kraju testa (DAT 14). Dužine izdanka iznad sedimenta je merena nultog (DAT 0), trećeg (DAT 3), sedmog (DAT 7), desetog (DAT 10) i četrnaestog (DAT 14) dana na istim obeleženim biljkama. Stoga, RGR i prinos (Y), na osnovu dužine izdanka iznad sedimenta, su izračunati poređenjem srednjih vrednosti za ovaj parametar na istim biljkama, dok su RGR i Y, na osnovu ukupne dužine, sveže i suve mase i sveže mase korena, izračunate poređenjem srednjih vrednosti za navedene parametare za DAT 0, DAT 7 i DAT 14 na različitim biljkama. Vizualna opažanja kao npr. pojava hloroze i sl. su beležena tokom DAT 0, DAT 7 i DAT 14. Sedmog (DAT 7) odnosno poslednjeg dana testa (DAT 14) tj. nakon merenja parametra dužina izdanka iznad sedimenta, biljni materijal je izvađen iz posuda i izmerene su ukupna dužina izdanka, sveža masa izdanka i sveža masa korena. Nakon toga biljke su sušene na 60°C tokom 2,5 h, i izmerena je njihova suva masa.

Tokom celokupnog perioda trajanja testa, su praćeni osnovni fizičko-hemijski parametri. Temperatura rastvora je merena svakodnevno, pH rastvora (pH metar WTW 340i, Austrija) i zasićenje kiseonikom (WTW 3205, Austrija) nultog, sedmog i četrnaestog dana testa, a elektroprovodljivost (WTW 3210 SET 1, Austrija) na početku testa. Intenzitet svetlosti (digitalni lux metar LX 101OB, Sinometer Instruments, Kina) je iznosio 140±20  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , u fotoperiodu 16 h osvetljenosti i 8 h mraka. Temperatura u rastvoru je održavana na 22±2°C. Nasumičan raspored posuda je bio neophodan kako bi se minimalizovao uticaj razlika u osvetljenosti i temperaturi. Posude su bile prekrivene providnim staklenim pločama kako bi se umanjilo isparavanje i sprečila eventualna kontaminacija.

Kriterijumi za validnost testa radnom verzijom protokola u vreme izvođenja testova nisu bili definisani. Ipak, bile su propisane vrednosti i opseg variranja temperature, zasićenja kiseonikom i pH. Merene vrednosti navedenih fizičko-hemijskih parametara rastvora su bile u okviru preporučenih i nisu se značajno menjale tokom celokupnog perioda trajanja testa (period ekspozicije i period oporavka). Dodatno, radnom verzijom protokola je propisano granično variranje vrednosti parametra sveža masa (30%) početnog biljnog materijala, pre perioda adaptacije, odnosno DAT -3. U svim izvedenim testovima na vrsti *M. aquaticum* variranje vrednosti sveže mase početnog biljnog materijala je bilo ispod 30%.

U Prilogu (tabela 8.2. (b)) su prikazane prosečne vrednosti parametara rasta vrste *M. aquaticum* u kontroli u testovima sa pojedinačnim supstancama (izoproturon i dikamba) i dvo-komponentnim smešama ovih herbicida. Srednja vrednost za glavni parametar – dužina izdanka iznad sedimenta RGR DS je iznosila 0,086±0,02 u period 0-7 d i 0,061±0,02 u periodu 0-14 d. Zabeležena je niska varijabilnost, vrednosti koeficijenta varijacije (CV) su bile ispod 30%. Međutim, kod drugih parametara rasta – sveža i suva masa, ukupna dužina izdanka varijabilnost vrednosti RGR je znatno viša, u rasponu 28,58-70,96%.

##### 4.2.2. Test tretmani

Prvi set testova je obuhvatio ispitivanje osetljivosti i efikasnost oporavka vrste *L. minor* nakon izloženosti pojedinačnim herbicidima: atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba. Serije koncentracija pojedinačnih supstanci su bile sledeće: (i) atrazin – 80, 160, 320, 640 i 1280 µg/l; (ii) izoproturon – 10, 32, 100, 320 i 1000 µg/l; (iii) trifluralin – 10, 32, 100, 320 i 1000 µg/l; (iv) 2,4 D – 100, 1000 i 10000 µg/l; (v) dikamba – 1000, 5000, 10000 µg/l. Testovi sa pojedinačnim supstancama su postavljani sa po 6 ponavljanja u kontroli i po 3 ponavljanja u svakom test tretmanu.

Na osnovu sprovedenih testova sa pojedinačnim supstancama su izračunate inhibitorne koncentracije iskazane na osnovu RGR za primarni parametar – broj jedinki. IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> i IC<sub>50</sub> su korišćene kao nominalne koncentracije pojedinačnih supstanci u testovima smeša. U slučaju 2,4 D, određene su samo IC<sub>10</sub> i IC<sub>25</sub>, jer je IC<sub>50</sub> prevazilazila vrednost najviše primenjene test koncentracije (10 mg/l).

Drugi set testova je obuhvatio ispitivanje osetljivosti i efikasnosti oporavka vrste *L. minor* nakon izloženosti dvo-komponentnim i tro-komponentnim smešama herbicida. U testovima su korišćene sledeće smeše: (i) atrazin+izoproturon; (ii) atrazin+trifluralin, (iii) izoproturon+trifluralin; (iv) atrazin+izoproturon+trifluralin. Testovi su izvedeni u tri tipa smeša: (i) L (engl. *low*); (ii) M (engl. *medium*); (iii) H (engl. *high*). U L tipu smeša koncentracije pojedinačnih herbicida su bliske IC<sub>10</sub> – tzv. „bezbednim“ koncentracijama (relativno bliske mogućim koncentracijama u životnoj sredini). U M i H tipu smeša koncentracije pojedinačnih herbicida su bile bliske IC<sub>25</sub> odnosno IC<sub>50</sub> koncentracijama (tabela 4.6.). Testovi sa dvo- i tro-komponentnim smešama su postavljeni sa po 3 ponavljanja u kontroli i svakom test tretmanu.

**Tabela 4.6.** Koncentracije pojedinačnih supstanci (µg/l) u dvo- i tro-komponentnim smešama sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom u testu inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor*. Tipovi smeša: L, M i H (objašnjeno ranije u tekstu)

Herbicidi (µg/l)	L	M	H
Atrazin	60,9	122,8	215,0
Izoproturon	8,0	128,9	219,7
Trifluralin	142,2	265,2	715,2

Treći set testova je obuhvatio ispitivanje uticaja huminskih materija (HM) na osetljivost i efikasnost oporavka vrste *L. minor* od toksičnog delovanja dvo-komponentnih smeša atrazina i 2,4 D. Testovi su takođe izvedeni u 3 tipa smeša: L, M i H. Koncentracije atrazina u L, M i H tipu dvo-komponentne smeše su bile predstavljene redom vrednostima IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, dok je koncentracija 2,4 D, u svim tipovima smeše imala uniformnu vrednost – IC<sub>10</sub> (tabela 4.7.). Koncentracija huminske kiseline je bila uniformna i iznosila je 2 mgC/l, što je blisko koncentracijama prirodne organske materije u vodi reke Dunav. Testovi sa smešama atrazina i 2,4 D, bez prisustva HM, nisu izvedeni istovremeno, zbog čega se, u daljem tekstu, K odnosi na kontrolni tretman za L i H tip smeše, a K(M) na kontrolni tretman za M tip smeše.

#### 4. Materijal i metode

**Tabela 4.7.** Koncentracije pojedinačnih supstanci ( $\mu\text{g/l}$ ) u L, M i H tipovima dvo-komponentne smeše atrazina i 2,4 D u testu inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* u prisustvu/odsustvu huminskih materija

Herbicidi ( $\mu\text{g/l}$ )	L	M	H
Atrazin	60,9	122,8	215,0
2,4 D	2000,0	2000,0	2000,0

\*koncentracija huminske kiseline (2 mgC/l)

U cilju određivanja  $IC_{50}$  vrednosti za navedene pojedinačne herbicide u prisustvu HM, za 0-7 i 0-14 period testa, kao nominalne koncentracije su korišćene njihove  $IC_x$  vrednosti, iskazane na osnovu RGR za primarni parametar – broj jedinki (L, M, H tip tretmana za atrazin, L i M tip tretmana za 2,4 D, tabela 4.8.).

Postavkom testova je obuhvaćeno po 3 ponavljanja u kontroli, tretmanu sa huminskom kiselinom tzv. kontrola sa HM ( $K_{HM}$ ) i svakom test tretmanu.

**Tabela 4.8.** Koncentracije atrazina i 2,4 D ( $\mu\text{g/l}$ ) u testovima inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* sa pojedinačnim supstancama u prisustvu huminskih materija

Herbicidi ( $\mu\text{g/l}$ )	Atrazin+HM			2,4 D+HM	
	L	M	H	L	M
	60,9	122,8	215,0	2004,4	7837,0

\*koncentracija huminske kiseline (2 mgC/l)

Četvrti set testova je obuhvatio ispitivanje uticaja HM na osetljivost i efikasnost oporavka vrste *M. aquaticum* od toksičnog delovanja pojedinačnih supstanci (izoproturon i dikamba) i njihovih dvo-komponentnih smeša.

$IC_x$  vrednosti su izračunate na osnovu ranije izvedenih testova toksičnosti na vrsti *M. aquaticum* sa pojedinačnim supstancama izoproturon i dikamba (prikazani u *Tunić i sar. 2015*).  $IC_x$  vrednosti, iskazane na osnovu RGR za primarni parametar – dužina izdanka iznad sedimenta, su korišćene kao nominalne koncentracije pojedinačnih supstanci u L, M, H tipu tretmana (pojedinačne supstance/dvo-komponentna smeša). To znači da su koncentracije izabranih herbicida u tretmanima pojedinačnih supstanci i dvo-komponentnih smeša predstavljene redom vrednostima  $IC_{10}$ ,  $IC_{25}$  i  $IC_{50}$ . Koncentracija huminske kiseline je bila uniformna i iznosila je 2 mgC/l (tabela 4.9.). Testovi su postavljeni u po 6 ponavljanja u kontroli, tretmanu sa huminskom kiselinom i svakom test tretmanu. Polovina je korišćena za merenje destruktivnih parametara sedmog dana testa (DAT 7), dok je druga polovina korišćena za merenje ovih parametara četrnaestog dana, odnosno na kraju testa (DAT 14).



#### 4. Materijal i metode

**Tabela 4.9.** Koncentracije pojedinačnih supstanci ( $\mu\text{g/l}$ ) u L, M i H tipovima dvo-komponente smeše izoproturona i dikambe u testu inhibicije rasta na vrsti *Myriophyllum aquaticum* u prisustvu/odsustvu huminskih materija

Herbicidi ( $\mu\text{g/l}$ )	L	M	H
Izoproturon	36,0	98,7	547,0
Dikamba	83,4	747,0	2240,0

\*koncentracija huminske kiseline (2 mgC/l)

#### I relativne stope rasta i vrednosti inhibicije rasta biljaka

Relativna stopa rasta je izračunata na osnovu sledeće jednačine:

$$RGR_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t} \quad (4.2)$$

gde su:

- $RGR$ : relativna stopa rasta;
- $N_i$ : posmatrani parametar na početku testa;
- $N_j$ : posmatrani parametar na kraju testa;
- $t$ : vreme trajanja testa.

Vrednost inhibicije rasta, na osnovu vrednosti relativne stope rasta, je izračunata na osnovu sledeće jednačine:

$$I_r(\%) = \frac{(RGR_c - RGR_t)}{RGR_c} * 100 \quad (4.3)$$

gde su:

- $I_r(\%)$ : inhibicija rasta (izražena u %);
- $RGR_c$ : srednja vrednost relativne stope rasta u kontrolnom tretmanu;
- $RGR_t$ : srednja vrednost relativne stope rasta u test tretmanu.

Vrednosti inhibicije rasta, na osnovu vrednosti prinosa (engl. *yield*), je izračunata na osnovu sledeće jednačine:

$$I_y(\%) = \frac{(Y_c - Y_t)}{Y_c} * 100 \quad (4.4)$$

gde su:

- $I_y(\%)$ : inhibicija rasta (izražena u %);
- $Y_c$ : vrednost posmatranog parametra na kraju testa minus vrednost merenog parametra na početku testa u kontrolnom tretmanu;
- $Y_t$ : vrednost posmatranog parametra na kraju testa minus vrednost merenog parametra na početku testa u test tretmanu.

U cilju predviđanja toksičnosti smeša herbicida je korišćen model aditivnog dejstva ili model adicije koncentracija (CA).

CA model se može matematički izraziti sledećom jednačinom:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ICx_i} = 1 \quad (4.5)$$

gde su:

- $ICx_i$ : koncentracija  $i$ -te pojedinačne supstance koja dovodi do  $x\%$  efekta;
- $n$ : broj supstanci u smeši;
- $c_i$ : koncentracija pojedinačne supstance  $i$  u smeši ( $i=1, \dots, n$ ).

Razlike u vrednostima empirijski utvrđene toksičnosti smeša u odnosu na predviđenu toksičnost na osnovu CA modela je izračunata pomoću modela odstupanja (engl. *model deviation ratio*, MDR) (Belden i sar. 2007).

MDR model se može matematički izraziti sledećom jednačinom:

$$MDR = \frac{ICx_{CA}}{ICx} \quad (4.6)$$

gde su:

- $ICx_{CA}$ : inhibitorna koncentracija, predviđena na osnovu CA modela, u tretmanu smeše;
- $ICx$ : empirijski utvrđena inhibitorna koncentracija u tretmanu smeše.

Smatra se da su, na osnovu EFSA kategorizacije (EFSA PPR Panel 2013), empirijski utvrđena toksičnost smeša i toksičnost predviđena na osnovu CA modela u saglasnosti ukoliko se vrednost MDR kreće u opsegu od 0,2 do 5. U slučaju da MDR iznosi iznad 5 toksičnost smeše se smatra većom od aditivne, odnosno u slučaju da MDR iznosi ispod 0,2 toksičnost smeše se smatra manjom od aditivne.

Toksičnost smeša, predviđena na osnovu CA modela, je iskazana na osnovu RGR za glavni parametar u testu (broj jedinki u *Lemma* testu, odnosno dužina izdanka iznad sedimenta u *Myriophyllum* testu) kao i na osnovu jedinog zajedničkog parametra u oba testa tj. sveže mase.

#### 4.2.3.

Vrednosti inhibicije rasta izračunate na osnovu RGR/Y su izračunate prema formulama prikazanim ranije u tekstu.

NOEC i LOEC vrednosti su izračunate: (i) Dunnett-ovim testom koji uključuje analizu varijanse (jednosmerna ANOVA); (ii) t-testom sa Bonferoni-jevim adaptacijama u slučaju nejednog broja ponavljanja (Statistica, verzija 8.0). Statistička značajnost je dodeljena uniformno za nivo značajnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4. Materijal i metode

---

Razlike u vrednostima posmatranog parametra između samo dva tretmana su određene t-testom sa dve nezavisne grupe. Razlike u vrednosti posmatranog parametra unutar tretmana, uključujući i kontrolni, tokom različitih vremenskih intervala tokom celokupnog perioda trajanja testa su određene jednosmernom ANOVA metodom i Fischer-ovim testom, kao post-testom. U svim navedenim metodama je korišćen paket Statistica, verzija 8.0, a statistička značajnost je dodeljena uniformno za nivo značajnosti  $p \leq 0,05$ .

IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> i IC<sub>50</sub> vrednosti za pojedinačne supstance su izračunate metodom linearne interpolacije korišćenjem softverskog paketa TesTox, verzija 1.0. (*TesTox 2003*).

U slučaju kada najviša primenjena test koncentracija ne uslovljava inhibiciju rasta biljaka  $\geq 50\%$ , metod linearne interpolacije ne omogućava izračunavanje IC<sub>50</sub> vrednosti za pojedinačne supstance. Iz tog razloga, za potrebe određivanja vrednosti inhibicije rasta na osnovu CA modela, IC<sub>50</sub> vrednosti za svaku pojedinačnu supstancu u prisustvu/odsustvu HM, je izračunata korišćenjem logaritamskog modela (Statistica, verzija 8.0).

Kao osnov za izračunavanje IC<sub>50</sub> vrednosti za test tretmane smeša su korišćene empirijski utvrđene vrednosti inhibicije rasta za L, M i H tip smeša. IC<sub>50</sub> vrednosti su određene, za period ekspozicije i za celokupan period trajanja testa (period ekspozicije i period oporavka zajedno), logaritamskim modelom koristeći softverski paket Statistica, verzija 8.0. Dodatno, logaritamskom metodom su određene i IC<sub>50</sub> vrednosti predviđene na osnovu CA modela za test tretmane smeša.

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

#### 4.2.4. Test supstance

Atrazin (CAS 1912-24-9), supstanca tehničke čistoće (čistoća 98%), od proizvođača Oxon SpA, Italija je dobijena na poklon od Galenika Fitofarmacija, Beograd, Srbija.

Izoproturon (CAS 34123-59-6), supstanca tehničke čistoće (čistoća 97%), od proizvođača Gharda chemicals Limited, Mumbai, Indija je dobijena na poklon od Bayer CropScience Aktiengesellschaft, Nemačka.

Trifluralin (CAS 1582-09-8) je dobijen na poklon od proizvođača BASF, Nemačka. Od osnovnog rastvora koncentracije 480 g/l (40% (v/v) trifluralina, 25% (v/v) nafte i 25% (v/v) naftalena) je pripremljen rastvor niže koncentracije i dalje pravljena serija razblaženja uz upotrebu odgovarajućeg rastvora.

2,4 dihlorofenoksi sirćetna kiselina (2,4 D) (CAS No 94-75-7), supstanca tehničke čistoće (čistoća 96%), od proizvođača Changzhou Wintafone Chemical Co. Ltd., Kina je dobijena na poklon od Galenika Fitofarmacija, Beograd, Srbija.

Dikamba (CAS 1918-00-9), supstanca tehničke čistoće (čistoća 98%), od proizvođača Honbor Industrial Co. Ltd., Kina je dobijena na poklon od Agromarket d.o.o. Kragujevac, Srbija.

Huminska kiselina (CAS 1415-93-6) od proizvođača Fluka je korišćena za pripremu koncentrovanog rastvora koji je dalje razblaživan u odgovarajućem hranjivom rastvoru (*Steinberg* i *Smart&Barco*) do postizanja željene koncentracije organskog ugljenika od 2 mg C/l. Rastvor huminske kiseline je pripremljen u Laboratorijama Katedre za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu (UNS).

##### 4.2.5. organskog ugljenika

##### i rastvorenog

##### 4.2.5.1. atrazina, izoproturona, trifluralina, 2,4 D i dikambe

Koncentracije atrazina, izoproturona i trifluralina su određene u Laboratorijama Katedre za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta UNS. Koncentracije 2,4 D i dikambe su određene u Laboratoriji za biološka istraživanja i pesticide na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine Poljoprivrednog fakulteta UNS. Dalje u tekstu je dat sažeti opis metoda sa rezultatima.

Koncentracija atrazina je određena primenom gasne hromatografije (GC) sa masenom detekcijom (MS) prema standardnom US EPA protokolu 508.1 (*US EPA 1995*) na instrumentu Agilent Technologies GC 7890A/5975CMSD. Radni uslovi su bili sledeći: *split mode* odnos 50:1 – temperatura kolone 250°C; protok gasa u koloni 1 ml/min; zapremina injektiranja 1 µl; početna temperatura 70°C, nakon čega je rasla do krajnje temperature 280°C, brzinom od 20°C/min., koja je održavana tokom 1 min. Koncentracije ovog herbicida su određivane u rastvorima u seriji razblaženja od 1 do 100 µg/l. Pre-koncentracija vodenih uzoraka je određena primenom hromatografije na čvrstoj fazi uz pomoć Superclean ENVI-18 ketridža. Efikasnost ekstrakcije za koncentraciju 3 µg/l je iznosila 116% (RSD, relativna standardna devijacija = 5,4%,  $n = 5$ ), dok za 90 µg/l 102% (RSD = 2,9%,  $n = 3$ ). Koncentracije ovog herbicida u uzorcima nominalnih koncentracija 1, 90 i 100 µg/ su iznosile redom 0,8, 103 i 96 µg/l.

Koncentracija izoproturona je određena primenom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) i detektorom sa nizom dioda (DAD), nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi primenom C-18 kertridža, sa metanolom, prema standardnom US EPA protokolu 532 (*US EPA 2000b*) na instrumentu Agilent Technologies 1100 Series. Radni uslovi su bili sledeći: temperatura kolone 35°C; protok 1,5 ml/min; zapremina injektiranja 20 µl; mobilne faze: 25 mM fosfatni pufer i acetonitril. Početni udeo metanola od 40% je ostao konstantan tokom analize koja je trajala 5 minuta. MDL vrednost (granica detekcije metode) za izoproturon u vodi je iznosila 1,97 µg/l, a PQL vrednost (granica kvantifikacije metode) 9,86 µg/l (dobijene na osnovu 5 merenja koncentracije od 10 µg/l). Efikasnost ekstrakcije za koncentraciju 10µg/l je iznosila 100±2% (RSD = 2,2%), dok za 150 µg/l 96±5% (RSD = 5,5%). Koncentracije ovog herbicida u uzorcima nominalnih koncentracija 10, 100 i 1000 µg/l u *Steinberg* hranjivom rastvoru na početku testa (DAT 0) su iznosile redom 13,3, 108,5 i 1036,0 µg/l. Rastvori koncentracije 1000 µg/l su razblaženi 2 puta (250 ml uzorka je pomešano sa 250 ml *Steinberg* hranjivog rastvora). Efikasnost ekstrakcije u *Steinberg* hranjivom rastvoru za koncentraciju 150 µg/l je iznosila 108±3% (RSD = 3%).

Koncentracija trifluralina je određena nakon tečno-tečne ekstrakcije (aliquote od 1 ml tečne faze su ekstrahovane sa 1 ml heksana primenom gasne hromatografije sa detektorom sa zahvatom elektrona (engl. *electron capture detector*, µECD) primenom DB-XLB kolone (J&W Scientific) na osnovu standardne kalibracione metode korišćenjem pentahloronitrobenzena kao internog standarda prema modifikovanoj metodi C1.054 iz Leovac Maćerak (2016). Radni uslovi su bili sledeći: *split mode* odnos 50:1 – temperature inleta

#### 4. Materijal i metode

---

250°C; protok gasa u koloni 2 ml/min; početna temperatura 70°C (održavana tokom 1 min), nakon čega je rasla do 270°C, brzinom od 20°C/min. Efikasnost ekstrakcije u rastvorima u seriji koncentracija 0,5, 1, 50 i 100 µg/l se kretala u opsegu od 99-118% sa preciznošću 5-16%.

Koncentracija 2,4 D je određena primenom tečne hromatografije prema standardnom protokolu (*CIPAC 1985*) korišćenjem instrumenta Agilent 1100. Uzorak je rastvoren u standardu i koncentracija 2,4 D je određena na koloni sa reverznom fazom, korišćenjem 4-bromfenola kao internog standarda. Kolona: Hypersil ODS (2,0 × 250 m × 5 µm); Detektor: DAD 280 nm. Radni uslovi su bili sledeći: brzina toka mobilne faze 0,9 ml/min; temperatura: sobna; zapremina injekta: 10 µl; mobilna faza: acetonitril:voda (0,3 M NaOH i pH podešen na 2,95 pomoću fosforne kiseline); 2,4 D kalibracioni rastvori – u mobilnoj fazi.

Koncentracija dikambe je određena primenom tečne hromatografije pod visokim pritiskom na koloni sa reverznom fazom korišćenjem UV detektora uz eksternu standardizaciju prema metodi Šunjka i sar. (2013). Radni uslovi su bili sledeći: temperatura kolone: 40°C; brzina protoka 1,5 ml/min; talasna dužina detektora 280 nm; zapremina injektovanja 10 µl; a vreme zadržavanja za dikambu je bilo oko 12,2 minuta. Merenje koncentracije dikambe je vršeno u *Steinberg* i *Smart&Barco* hranjivom rastvoru. Rezultati analize dikambe u *Steinberg* rastvorima na početku testa (DAT 0) za nominalne koncentracije od 0,01, 0,044 i 0,44 mg/l su iznosile redom 0,008, 0,039 i 0,394 mg/l. Nakon sedamodnevne faze ekpozicije (DAT 7), koncentracije dikambe su ponovo izmerene i iznosile su 0,007, 0,033 i 0,368 mg/l. Rezultati analize dikambe u *Smart&Barco* hranjivom rastvoru na početku testa (DAT 0) za nominalne koncentracije 0,01, 0,0439 i 0,439 mg/l su iznosile redom 0,009, 0,041 i 0,439 mg/l. Nakon sedmodnevne faze ekpozicije (DAT 7), koncentracije dikambe su ponovo izmerene i iznosile su 0,008, 0,036 i 0,398.

Rezultati merenja za atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikambu su pokazali da svi navedeni herbicidi, rastvoreni kao pojedinačne supstance u *Steinberg* i/ili *Smart&Barco* hranjivom rastvoru, su stabilni tokom 7 dana ekpozicije, odnosno da merene vrednosti navedenih herbicida nisu značajno odstupale od nominalnih, te su proračuni rađeni na osnovu nominalnih koncentracija.

Određivanje koncentracija test supstanci u rastvorima dvo- i tro-komponentnih smeša sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom nije vršeno u testu inhibicije rasta sa vrstom *L. minor*.

#### 4.2.5 uticaja huminskih materija

#### testovima

Koncentracije pojedinačnih test supstanci u rastvorima smeša, u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM), su određene u Laboratoriji za biološka istraživanja i pesticide na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine Poljoprivrednog fakulteta UNS. Merenje koncentracija atrazina i 2,4 D je vršeno u *Steinberg* rastvoru, koji se koristio kao diluent u testovima na vrsti *L. minor*, dok je merenje koncentracija izoproturona i dikambe je vršeno u *Smart&Barco* rastvoru, koji se koristio kao diluent u testovima na vrsti *M. aquaticum*. Dalje u tekstu je dat detaljan opis metoda sa rezultatima.

#### 4. Materijal i metode

Koncentracija atrazina i 2,4 D je određena nakon tečno-tečne ekstrakcije (analizirani herbicidi su prvo ekstrahovani iz prethodno zakišenjenog medijuma (0,1 N HCl) koristeći dihlormetan). Nakon ekstrakcije rastvarač je uparen pod vakumom, rastvoren u 1 ml acetonitrila i ultrazvučno homogenizovan. Ekstrakt je zatim profiltriran kroz 0,45 µm PTFE filter, nakon čega je analiziran. Koncentracija navedenih herbicida je određena primenom HPLC DAD sa binarnom pumpom (1100 Series, Agilent Technologies). Korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm × 4,6 mm × 1,8 µm) kolona. Radni uslovi su bili sledeći: odnos mobilne faze acetonitril/voda 30:70, v/v; brzina protoka 0,9 ml/min; temperatura kolone 25°C; injektovana zapremina 10 µl, a talasna dužina 230 nm.

Koncentracija atrazina i 2,4 D, u testu sa *L. minor*, su određene u L i H tipu smeše, u odsustvu (tabela 4.10.), odnosno prisustvu (tabela 4.11.) HM. Određivanje koncentracija herbicida je vršeno na početku testa tj. nultog i trećeg dana.

**Tabela 4.10.** Merene koncentracije atrazina i 2,4 D (µg/l) u *Steinberg* rastvoru u odsustvu HM, u testu sa *Lemna minor*

Dani	L		H	
	Atrazin	2,4 D	Atrazin	2,4 D
0	60,9	1960,0	198,0	1861,0
3	59,2	1920,0	192,0	1865,0

**Tabela 4.11.** Merene koncentracije atrazina i 2,4 D (µg/l) u *Steinberg* rastvoru u prisustvu huminskih materija (HM), u testu sa *Lemna minor*

Dani	L+HM		H+HM	
	Atrazin	2,4 D	Atrazin	2,4 D
0	58,2	1930,0	189,0	1890,0
3	56,3	1860,0	176,0	1820,0

\*koncentracija huminske kiseline (2 mgC/l)

Koncentracija izoproturona i dikambe je određena nakon tečno-tečne ekstrakcije koristeći dihlormetan (2 × 50 ml). Nakon ekstrakcije rastvarač je uparen pod vakumom, rastvoren u 2 ml acetonitrila i ultrazvučno homogenizovan. Ekstrakt je nakon toga profiltriran kroz 0,45 µm PTFE filter, nakon čega je analiziran. Koncentracija navedenih herbicida je određena primenom HPLC DAD (1100 Series, Agilent Technologies) uz korišćenje Zorbax Eclipse XDB-C18 kolone (50 mm × 4,6 mm × 1,8 µm). Najbolje razdvajanje analiziranih jedinjenja postignuto je primenom mobilne faze acetonitril/voda (0,1% HCOOH) 40:60, v/v, u izokraskom režimu, pri protoku od 0,9 ml/min, temperaturi kolone 40°C, injektovanjem 1 µl. Snimanje spektara izvedeno je pri talasnoj dužini od 280 nm.

Koncentracija izoproturona i dikambe, u testu sa *M. aquaticum* su određivane u L i H tipu smeše, u prisustvu (tabela 4.12.) / odsustvu (tabela 4.13.) HM. Određivanje koncentracija

#### 4. Materijal i metode

pomenutih herbicida je vršeno na početku testa tj. nultog dana, zatim trećeg dana i na kraju testa, odnosno sedmog dana.

**Tabela 4.12.** Merene koncentracije izoproturona i dikambe ( $\mu\text{g/l}$ ) u *Smart&Barco* rastvoru u odsustvu huminskih materija (HM), u testu sa *Myriophyllum aquaticum*

Dani	L		H	
	Izoproturon	Dikamba	Izoproturon	Dikamba
	( $\mu\text{g/l}$ )			
0	33,4	69,0	479,1	2160,0
3	36,3	74,0	471,0	2110,0
7	30,9	79,0	482,0	2090,0

**Tabela 4.13.** Merene koncentracije izoproturona i dikambe ( $\mu\text{g/l}$ ) u *Smart&Barco* rastvoru u prisustvu huminskih materija (HM), u testu sa *Myriophyllum aquaticum*

Dani	L+HM		H+HM	
	Izoproturon	Dikamba	Izoproturon	Dikamba
	( $\mu\text{g/l}$ )			
0	30,2	72,0	452,5	2210,0
3	32,4	89,0	462,9	2160,0
7	29,5	81,0	472,1	2320,0

\*koncentracija huminske kiseline (2 mgC/l)

Na osnovu prikazanih rezultata merenja (tabele 4.10.-4.14.) i njihovim poređenjem sa nominalnim koncentracijama (tabele 4.7. i 4.9.), potvrđuje se da su svi navedeni herbicidi (atrazin/2,4 D u testovima sa *L. minor*; izoproturon/dikamba u testovima sa *M. aquaticum*), nezavisno od prisustva HM, stabilni u rastvorima smeša, odnosno da merene vrednosti navedenih herbicida nisu značajno odstupale od nominalnih, te su proračuni rađeni na osnovu nominalnih koncentracija.

#### 4.2.5.3. O koncentracije rastvorenog organskog ugljenika

Koncentracije huminskih kiselina su određene u Laboratorijama Katedre za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta UNS.

Rastvor huminske kiseline je pripremljen tako što je komercijalna huminska kiselina rastvarana u ultra čistoj dejonizovanoj vodi (ASTM tip I, dobijena pomoću sistema za prečišćavanje LABCONCO, WaterPro/RO/PS Station) pri pH 10. Sadržaj rastvorenog organskog ugljenika (DOC) je određivan nakon što je rastvor sa huminskom kiselinom ostavljen na mešalici tokom 24 h, a potom i profiltriran kroz 0,45  $\mu\text{m}$  membranski filter. Sadržaj DOC je određivan na aparatu Elementar Liqui TOCII, a metoda je podrazumevala oksidaciju uzorka na 850°C (SRPS ISO 2007).

#### 4. Materijal i metode

Određivanje sadržaja DOC je izvršeno u tretmanu kontrola sa huminskim materijama (HM) –  $K_{HM}$ , kao i u L i H tipu smeše sa atrazinom i 2,4 D u testu sa *L. minor*, i to na početku testa (nulti dan) i trećeg dana testa. Odnos krajnje i početne koncentracije ( $C/C_0$ ) je iznosio 0,60 ( $K_{HM}$ ), 0,97 (L+HM) i 0,75 (H+HM).

U testu sa *M. aquaticum*, sadržaj DOC je određen u tretmanu kontrola sa huminskim materijama (HM) –  $K_{HM}$ , kao i u L i H tipu smeše sa izoproturonom i dikambom, i to na početku (nulti dan), zatim trećeg i poslednjeg dana testa (sedmi dan).  $C/C_0$ , gde su korišćene merene koncentracije za nulti i treći dan, je iznosio 0,59 ( $K_{HM}$ ), 0,81(L+HM), 0,77 (H+HM). U slučaju kada su korišćene merene koncentracije za nulti i sedmi dan,  $C/C_0$  je iznosio 0,63 ( $K_{HM}$ ), 0,77 (L+HM), 0,75 (H+HM).



## 5. Rezultati i diskusija

U okviru ovog poglavlja su prikazani rezultati o oporavku dve vrste akvatičnih makrofita – *L. minor* i *M. aquaticum*, od toksičnog stresa nakon izloženosti pojedinačnim herbicidima i njihovim smešama. U prvom delu su prikazani rezultati koji se odnose na oporavak vrste *L. minor* od toksičnog delovanja pojedinačnih herbicida (atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba) i dvo- i tro-komponentnih smeša sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom. U drugom delu je prikazan uticaj huminskih materija (HM) na potencijal oporavaka vrste *L. minor* od toksičnog delovanja pojedinačnih herbicida (atrazin i 2,4 D) i njihovih dvo-komponentnih smeša, odnosno, vrste *M. aquaticum* od toksičnog delovanja pojedinačnih herbicida (izoproturon i dikamba) i njihovih dvo-komponentnih smeša.

IC<sub>50</sub> vrednost za referentnu supstancu, 3,5-DCP, (Prilog, tabela 8.1.), na osnovu svih korišćenih parametara u testu sa *L. minor* (broj jedinki, BJ, sveža masa, MSv, i biljna površina, BP), a uzimajući u obzir vrednosti korišćenih parametara iskazane na osnovu relativne stope rasta (RGR) i prinosa (Y), se kretala u opsegu od 1940 do 3220 µg/l. To znači da je zabeležena zadovoljavajuća osetljivost biljne kulture, jer su IC<sub>50</sub> vrednosti, za 3,5-DCP, bile u skladu sa predloženim opsegom iz OECD 221 standardnog protokola (*Sims i sar. 1999; OECD 2006*). Dodatno, kriterijum za validnost testa je zadovoljen jer je utvrđeno vreme dupliranja u kontrolnom tretmanu, izvedenom na osnovu svih testova sa pojedinačnim supstancama (atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba) i smešama na vrsti *L. minor* < 2,5 dana (Prilog, tabela 8.2 (a)). Iz svega navedenog, predstavljeni rezultati u ovoj disertaciji na vrsti *L. minor* su pouzdani i test se može smatrati validnim.

Kriterijumi za validnost testa sa *M. aquaticum* radnom verzijom protokola u vreme izvođenja testova nisu bili definisani (*OECD Ring test protokol 2011*). Za potrebe analize rezultata internacionalnog testa kalibracije metode na vrstama iz roda *Myriophyllum* su predloženi preliminarni kriterijumi (vreme dupliranja, na osnovu sveže mase (MSv), < 9,9 dana i koeficijent varijacije (CV), na osnovu prinosa (Y) za MSv, < 35%) (*Ratte i Ratte 2014*). Prvi kriterijum za validnost testa, vreme dupliranja, u testovima rađenim za potrebe ove disertacije je zadovoljen jer je ono u kontrolnom tretmanu < 9,9 dana, dok su prosečne vrednosti CV na osnovu Y MSv nešto iznad propisane vrednosti (Prilog, tabela 8.2 (b)).

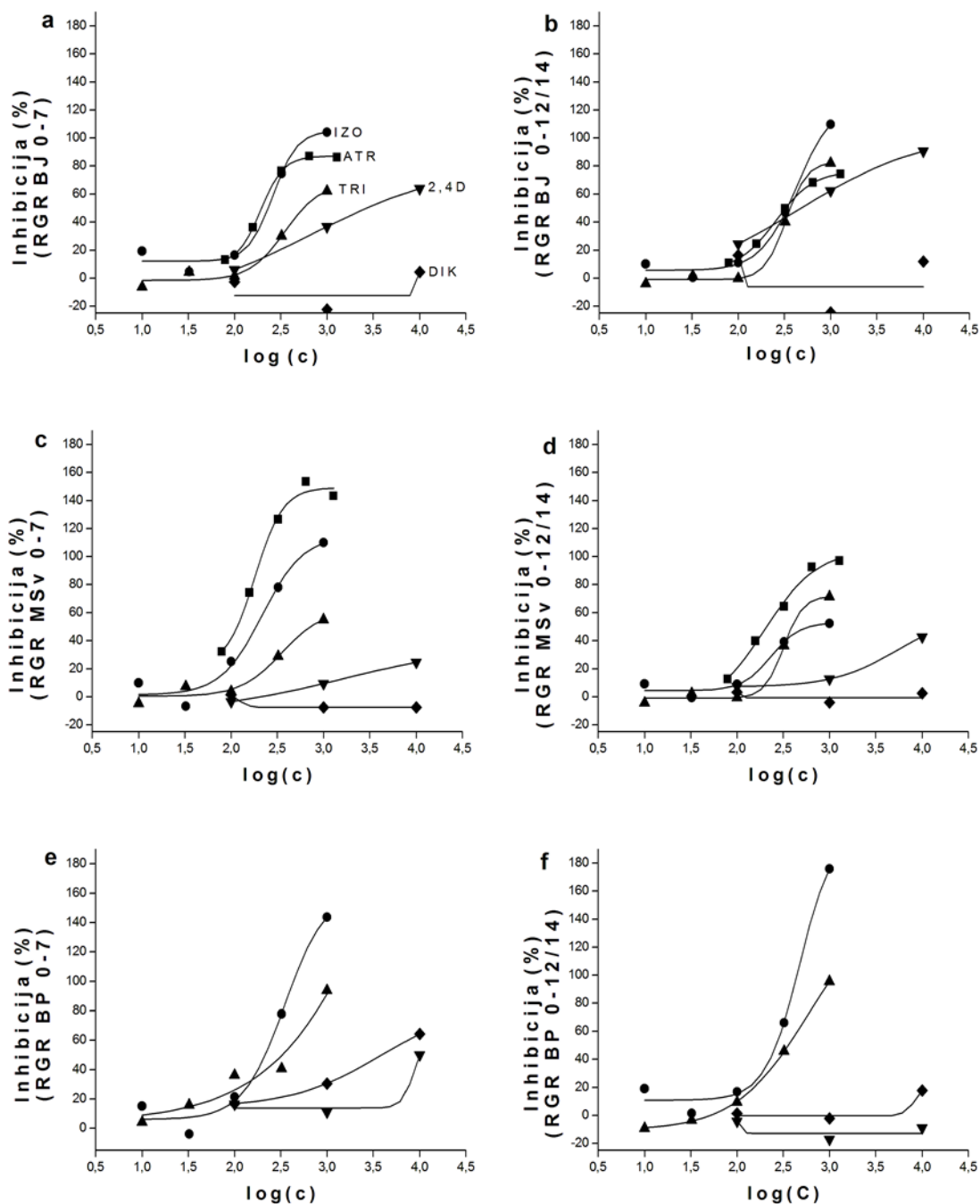
## 5.2 Osetljivost i potencijal oporavka *Lemna minor* od toksi herbicida i

### 5.2.1

U okviru ovog potpoglavlja su predstavljene rezultati testova inhibicije rasta na vrsti *L. minor* sa pojedinačnim supstancama – atrazin, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba.

Na slici 5.1. su prikazane krive dozne zavisnosti vrste *L. minor* u testovima inhibicije rasta sa pojedinačnim supstancama. Vrednosti inhibicije rasta, u odnosu na kontrolu, su iskazane na osnovu relativne stope rasta (RGR) za sva tri korišćena parametra u testovima: broj jedinki (BJ), sveža masa (MSv) i biljna površina (BP). Vrednosti RGR kao i inhibicije rasta su izračunate za period testa 0-7 i 0-12 u testovima sa atrazinom, izoproturonom i triflurlinom, odnosno 0-7 i 0-14 u testovima sa 2,4 D i dikambom. U svim testovima, osim sa dikambom, navedeni parametri pokazuju pravilnu monotono rastuću krivu dozne zavisnosti.

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.1.** Krive dozne zavisnosti inhibicije rasta (%), u odnosu na kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta za parametre: a i b – broj jedinki (RGR BJ), c i d – sveža masa (RGR MSv), e i f – biljna površina (RGR BP); za period testa 0-7 d (a, c i e) i 0-12 d za atrazin (ATR), izoproturon (IZO), trifuralin (TRI), odnosno 0-14 d za 2,4 D i dikambu (DIK) (b, d i f). Vrednosti koncentracija su log transformisane. Dozna zavisnost je prikazana sigmoidnim krivama

U tabeli 5.1. prikazane  $IC_{50}$  vrednosti za sve parametre u testovima inhibicije rasta na vrsti *L. minor* su izračunate na osnovu relativne stope rasta i prinosa. Najniže  $IC_{50}$  vrednosti,

za period ekpozicije, su uočene u testovima sa atrazinom i izoproturonom,  $IC_{50}$  0-7 vrednosti za parametar BJ su iznosile redom 214,94 i 226,54  $\mu\text{g/l}$ . Trifluralin se pokazao kao manje toksičan od atrazina i izoproturona,  $IC_{50}$  0-7 za parametar broj jedinki je iznosila 714,61  $\mu\text{g/l}$ . Najslabiji efekat je uočen u testovima sa auksin simulatorima (2,4 D i dikamba). Vrednosti  $IC_{50}$  0-7 za auksin simulatore prelaze najvišu primenjenu test koncentraciju ( $IC_{50}$  0-7 > 10 000  $\mu\text{g/l}$ ) za sve parametre osim za BJ i BP na osnovu Y, za 2,4 D, (9815,57 i 7226,33  $\mu\text{g/l}$ ).

Relevantne vrednosti iz testova sa pojedinačnim supstancama na vrsti *L. minor* (parametri rasta, izraženi na osnovu relativne stope rasta i prinosa, inhibicija rasta za period testa 0-7 i 0-12/14, NOEC i LOEC vrednost, CV%, standardna devijacija) se nalaze u prilogu (tabela 8.3. (a-f), 8.4. (a-f)).

Fotosintetički inhibitori, među koje spadaju atrazin i izoproturon, predstavljaju jedne od najčešće proučavanih herbicida, i zbog toga je dostupan veliki broj literaturnih podataka o njihovoj toksičnosti na akvatične makrofite. U slučaju atrazina, dobijene  $IC_{50}$  vrednosti, u testu sa *L. minor*, su u skladu sa vrednostima iz testova na vrstama iz roda *Lemna* koje su predstavljene u okviru drugih istraživanja (*Fairchild i sar. 1997; Fairchild i sar. 1998*), ali i na drugim vrstama akvatičnih makrofita. Prema Ebke i sar. (2013)  $IC_{50}$  vrednost za najosetljiviji parametar, na osnovu sedmodnevnog testa na vrsti *M. aquaticum* u voda-sediment sistemu, je iznosila 142,20  $\mu\text{g/l}$ .

Iako rezultati prikazani u ovoj disertaciji upućuju na podjednaku toksičnost atrazina i izoproturona, prema Nitschke i sar. (1999) procenjena  $EC_{50}$  vrednost za izoproturon, u sedmodnevnom testu sa *L. minor*, je bila niža od 100  $\mu\text{g/l}$ . Prema Ratte i Ratte (2014), a na osnovu rezultata internacionalnog testa kalibracije metode na različitim vrstama iz roda *Myriophyllum*,  $EC_{50}$  vrednost za izoproturon je bila u rasponu 37,0-860,0  $\mu\text{g/l}$ .

Podaci o toksičnosti trifluralina na akvatične makrofite u odnosu na prethodno pomenute herbicide – atrazin i izoproturon su oskudniji. Ipak, na osnovu prikazanih rezultata u ovoj disertaciji, kao i dostupnih podataka iz literature potvrđuje se manja toksičnost ovog herbicida. Odgovor različitih vrsta akvatičnih makrofita na toksično dejstvo trifluralina je sličan. Primera radi,  $EC_{50}$  vrednosti nakon dvonedeljne izloženosti, u testu sa *M. aquaticum*, je bila u rasponu od 323,0 do 418,0  $\mu\text{g/l}$  (*Turgut i Fomin 2002*).

Rezultati u ovoj disertaciji u testovima na vrsti *L. minor* sa auksin simulatorima, 2,4 D i dikambom, gde su  $IC_{50}$  vrednosti za korišćene parametre iskazane na osnovu RGR i Y bile iznad 10000  $\mu\text{g/l}$ , su u skladu sa literaturnim podacima o neosetljivosti vrsta iz roda *Lemna* na auksin simulatore (*Maltby i sar. 2010*). U slučaju 2,4 D, a na osnovu testova na različitim vrstama iz roda *Lemna*,  $EC_{50}$  vrednosti su iznosile od 500 do >6000  $\mu\text{g/l}$  (za pregled videti Belgers i sar. (2007)). U literaturi su dostupni podaci o toksičnosti dikambe na drugu vrstu iz roda *Lemna* –  $IC_{50}$  u sedmodnevnom testu sa *L. aequinoctialis* je iznosila 16580  $\mu\text{g/l}$  (*Michel i sar. 2004*).

Kada su u pitanju submerzne, ukorenjene vrste akvatičnih makrofita, vrednosti  $IC_{50}$  za 2,4 D, na osnovu sedmodnevnog testa na *M. aquaticum*, su bile niže, i to u rasponu od 157,8 do 2000  $\mu\text{g/l}$  (*Ebke i sar. 2013*). U slučaju dikambe, prema Turgut i Fomin (2002)  $EC_{50}$  vrednosti, u testu sa *M. aquaticum*, za ovaj herbicid nakon dvonedeljne izloženosti su bile oko 100  $\mu\text{g/l}$ , u zavisnosti od korišćenog parametra u testu.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio da se ispita da li modifikacijom standardnog protokola na vrsti *L. minor* i praćenjem potencijala oporavka navedene biljne kulture, možemo dobiti dodatne i ekološki relevantne informacije o efektima pojedinačnih herbicida na ne-ciljne akvatične makrofite. Sa tim ciljem, nakon standardnog, sedmodnevnog perioda ekspozicije, oporavak biljne kulture je praćen tokom dodatnih pet, odnosno sedam dana.

U slučaju atrazina i izoproturona, na osnovu vrednosti  $IC_{50}$ , toksičnost herbicida se smanjuje u periodu oporavka. Na primer, kumulativne  $IC_{50}$  vrednosti za parametar BJ su iznosile 325,19  $\mu\text{g/l}$  (atrazin) i 357,63  $\mu\text{g/l}$  (izoproturon). Suprotno tome, kod trifluralina i 2,4 D toksičnost herbicida se povećava u periodu oporavka. Za trifluralin, kumulativna  $IC_{50}$  vrednost, na osnovu primarnog parametra, je iznosila 464,94  $\mu\text{g/l}$ , dok, na osnovu najosetljivijeg parametra u testu, 194,0  $\mu\text{g/l}$ . U slučaju 2,4 D, kumulativne  $IC_{50}$  vrednosti su iznosile 9515,63  $\mu\text{g/l}$  (primarni parametar) i 614,07  $\mu\text{g/l}$  (najosetljiviji parametar). Za razliku od 2,4 D, drugi sintetički auksin (dikamba) je ispoljio najslabije toksično dejstvo, čak ni kumulativne  $IC_{50}$  vrednosti nije bilo moguće izračunati iz razloga što su prevazilazile navise primenjene koncentracije ( $IC_{50} 0-14 > 10000 \mu\text{g/l}$ ) (tabela 5.1.).

## 5. Rezultati i diskusija

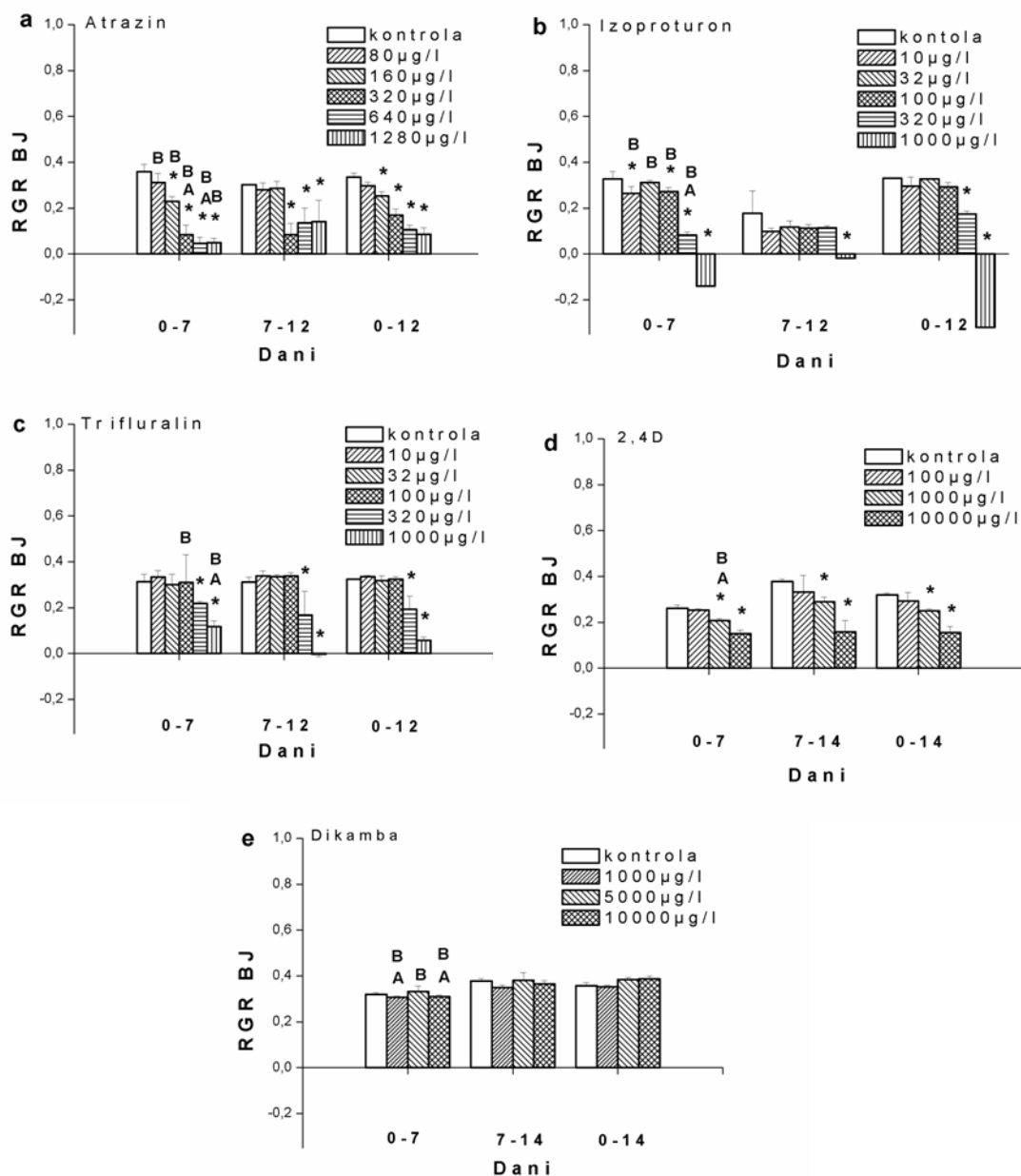
**Tabela 5.1.** Srednje inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) u testovima inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* (\* iz Teodorović i sar. (2012); \*\* ponovo izračunato na osnovu vrednosti iz Tunić i sar. (2015); # iz Knežević i sar. (2016))

Period ekspozicije (0-7)							
Supstanca	RGR BJ	RGR MS <sub>v</sub>	RGR BP	Y BJ	Y MS <sub>v</sub>	Y BP	Opseg IC <sub>50</sub> (µg/l)
Atrazin	214,94* (195-235)	113,73* (102-125)	188,75* (162-210)	125,23* (78-147)	61,02* (53-80)	105,08* (69-134)	61,02-250,0
Izoproturon	226,54** (214-248)	202,7** (191-214)	211,18** (195-226)	146,33** (113-182)	76,88** (33-121)	139,97** (79-205)	76,88-226,84
Trifluralin	714,61** (632-837)	845,28** (753-928)	513,24** (99-759)	282,82** (243-307)	245,01** (199-274)	388,97** (10-663)	245,01-845,28
2,4 D	> 10000**	> 10000**	> 10000**	9815,57** (7932-9889)	> 10000**	7226,33** (4875-8935)	7226,33-> 10000
Dikamba	> 10000**	> 10000**	> 10000**	> 10000**	> 10000**	> 10000**	> 10000
Kumulativno - period ekspozicije+period oporavka (0-12)							
Supstanca	RGR BJ	RGR MS <sub>v</sub>	RGR BP	Y BJ	Y MS <sub>v</sub>	Y BP	Opseg IC <sub>50</sub> (µg/l)
Atrazin	325,19# (293-406)	236,84 (190-277)	/	121,58 (89-150)	98,24 (77-119)	/	98,24-325,19
Izoproturon	357,63# (328-387)	> 1000	247,77 (236-261)	156,0 (115-205)	120,20 (74-173)	107,81 (72-175)	107,81- > 1000
Trifluralin	464,94# (281-600)	563,38 (311-664)	347,81 (267-485)	219,12 (190-243)	213,83 (184-235)	194,72 (177-209)	194,72-563,38
Kumulativno – period ekspozicije + period oporavka (0-14)							
Supstanca	RGR BJ	RGR MS <sub>v</sub>	RGR BP	Y BJ	Y MS <sub>v</sub>	Y BP	Opseg IC <sub>50</sub> (µg/l)
2,4 D	9515,63 (8189-9797)	> 10000	7939,47 (6563-9604)	703,73 (82-823)	1768,29 (98-2876)	614,07 (74-812)	614,07- > 10000
Dikamba	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000

Napomena: RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, BJ – broj jedinki, MS<sub>v</sub> – sveža masa, BP – biljna površina. IC<sub>50</sub> vrednosti sa intervalima poverenja su izračunate metodom linearne interpolacije

Na slici 5.2. su prikazane vrednosti RGR na osnovu glavnog parametra BJ u svim testovima inhibicije rasta na vrsti *L. minor* sa pojedinačnim supstancama, dok su vrednosti RGR na osnovu dodatnog parametra MSv prikazane na slici 5.3. Vrednosti RGR za oba parametra, su izračunate za period ekspozicije (0-7), period oporavka (7-12 za atrazin, izoproturon i trifluralin; 7-14 za 2,4 D i dikambu), kao i kumulativno (0-12 za atrazin, izoproturon i trifluralin; 0-14 za 2,4 D i dikambu). Vrednosti LOEC za period ekspozicije od 0 do 7 dana testa, za parametar BJ, u testovima sa atrazinom, izoproturonom, trifluralinom i 2,4 D iznose redom: 160, 10, 320, 1000 µg/l, dok za parametar sveža masa: 80, 100, 320 i 10 000 µg/l. Vrednosti LOEC za celokupni period trajanja testa (0-12 za atrazin, izoproturon i trifluralin; 0-14 za 2,4 D) za oba posmatrana parametra iznose redom: 160, 320, 320 i 1000 µg/l. U slučaju herbicida dikamba LOEC vrednost se ne može odrediti na osnovu primenjene serije koncentracija, već NOEC vrednost za period ekspozicije i kumulativno (period ekspozicije+period oporavka), na osnovu oba parametra, iznosi 10000 µg/l. U testovima sa auksin simulatorima (2,4 D i dikamba) i trifluralinom je zabeležena blaga stimulacija rasta biljaka (hormezis efekat) u niskim koncentracijama herbicida, ali efekat nije bio statistički značajan.

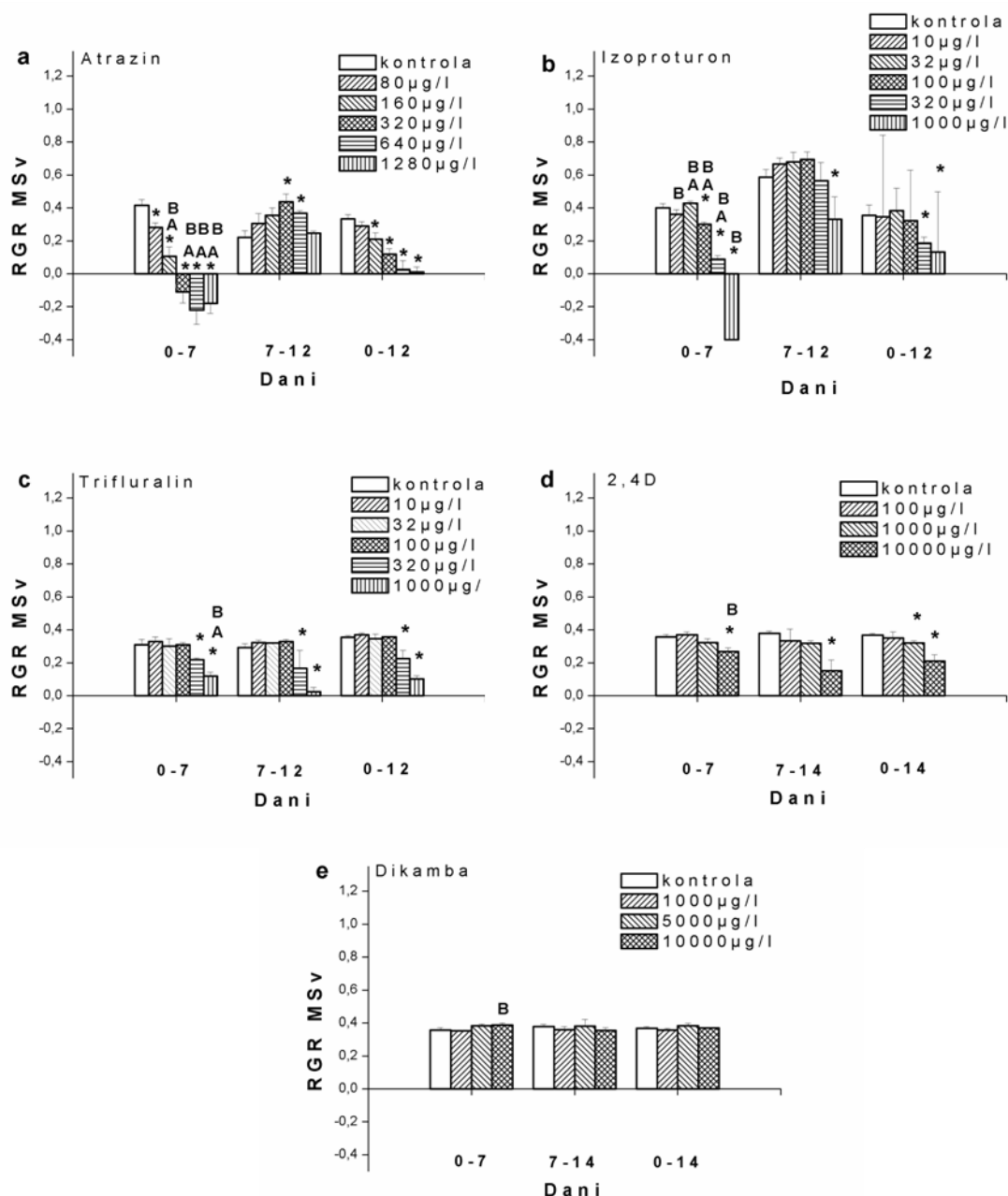
## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.2.** Testovi inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa (a) atrazinom, (b) izoproturonom, (c) trifluralinom, (d) 2,4 D i (e) dikambom. Relativna stopa rasta (RGR), na osnovu broja jedinki (BJ), tokom 0-7, 7-12 i 0-12 dana testa sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom odnosno 0-7, 7-14 i 0-14 dana testa sa 2,4 D i dikamba. Prikazane se srednje vrednosti RGR sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama unutar istog tretmana tokom različitih vremenskih intervala tokom testa: A - 0-7 vs. 7-12/14 dana, B - 0-7 vs. 0-12/14 dana (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ )



## 5. Rezultati i diskusija



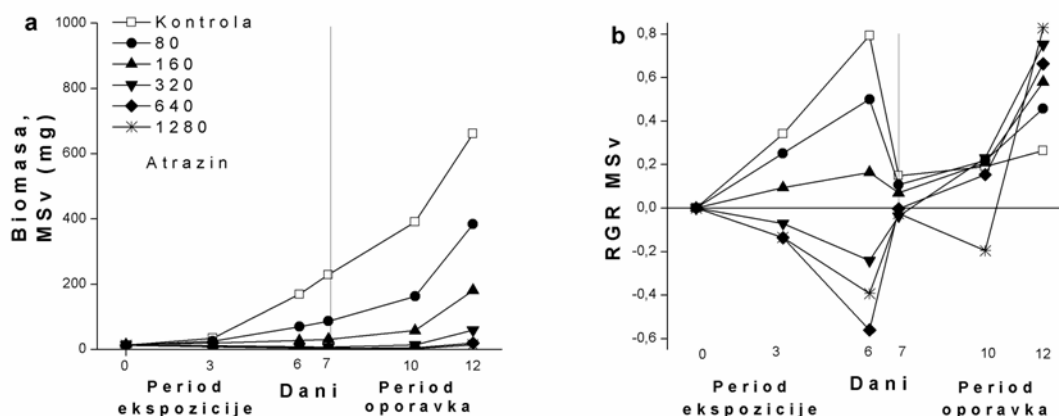
**Slika 5.3.** Testovi inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa (a) atrazinom, (b) izoproturonom, (c) trifluralinom, (d) 2,4 D i (e) dikambom. Relativna stopa rasta (RGR), na osnovu sveže mase (MSv), tokom 0-7, 7-12 i 0-12 dana testa sa atrazinom, izoproturonon i trifluralinom odnosno 0-7, 7-14 i 0-14 dana testa sa 2,4 D i dikamba. Prikazane se srednje vrednosti RGR sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama unutar istog tretmana tokom različitih vremenskih intervala tokom perioda trajanja testa: A - 0-7 vs. 7-12/14 dana, B - 0-7 vs. 0-12/14 dana (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ )

## 5. Rezultati i diskusija

U testu sa *L. minor* su moguća periodična merenja svih parametara što je omogućilo da se vrednosti inhibicije rasta iskažu u nekoliko različitih intervala. Time se dobio dublji uvid u obrasce rasta i oporavka ove biljne kulture (slika 5.4.-5.8.). IC<sub>50</sub> vrednosti za pojedinačne herbicide, tokom perioda oporavka i poslednjeg intervala u okviru perioda oporavka, su predstavljene u tabeli 5.2.

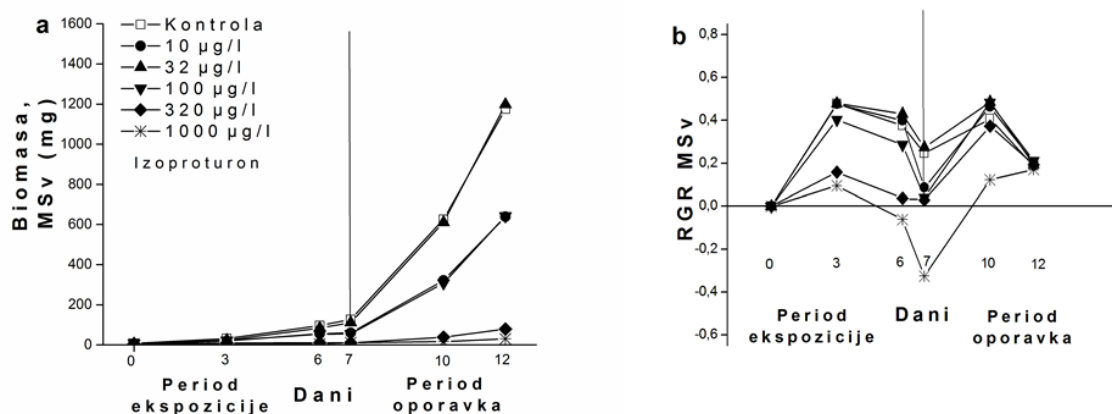
Dinamika rasta vrste *L. minor* tokom celokupnog perioda trajanja testa od 12 odnosno 14 dana (period ekspozicije+period oporavka), iskazana preko (a) biomase i (b) RGR, na osnovu MSv, u kontroli i u tretmanima pojedinačnih supstanci su prikazane za atrazin (slika 5.4 (a, b)), izoproturon (slika 5.5 (a, b)), trifluralin (slika 5.6 (a, b)), 2,4 D (slika 5.7 (a, b)) i dikambu (slika 5.8 (a, b)). Kod tretmana sa najvišim primenjenim koncentracijama atrazina (640 i 1280 µg/l), izoproturona (320 i 1000 µg/l) i trifluralina (320 i 1000 µg/l) povećanje finalne biomase u odnosu na početnu je zanemarljivo malo.

U tretmanima sa atrazinom i izoproturonom, se uočava trend povećanja vrednosti RGR, iako su vrednosti RGR, za oba herbicide, pri najvišoj primenjenoj koncentraciji beležile negativne vrednosti tokom perioda ekspozicije. U testu sa trifluralinom, tokom perioda oporavka nije došlo do povećanja vrednosti RGR kod najviše primenjene koncentracije. U tretmanima sa 2,4 D dolazi do smanjenja vrednosti biomase tokom perioda oporavka, posebno u tretmanu sa najvišom primenjenom koncentracijom. U testu sa dikambom se uočava trend povećanja vrednosti biomase tokom celokupnog perioda testa.

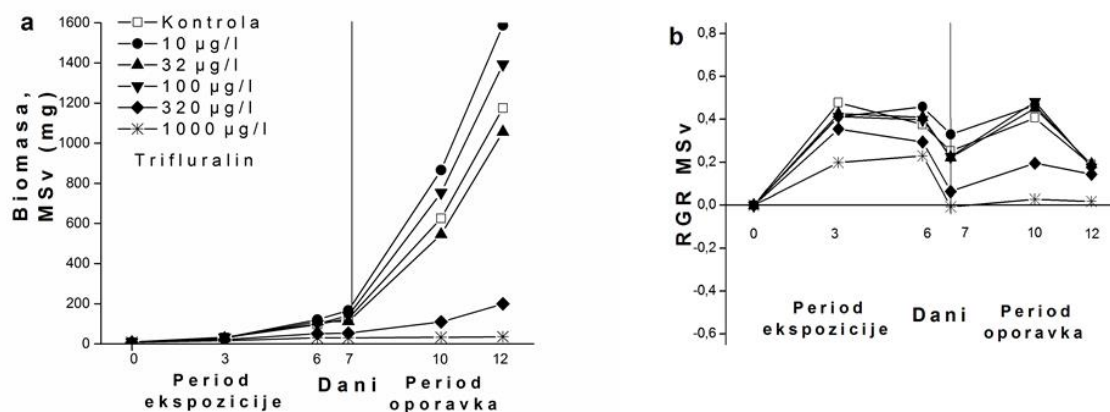


**Slika 5.4.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testu sa atrazinom, na osnovu (a) biomase - sveža masa (mg), (b) relativne stope rasta. MSv – sveža masa, RGR – relativna stopa rasta (adaptirano iz Teodorović i sar. (2012))

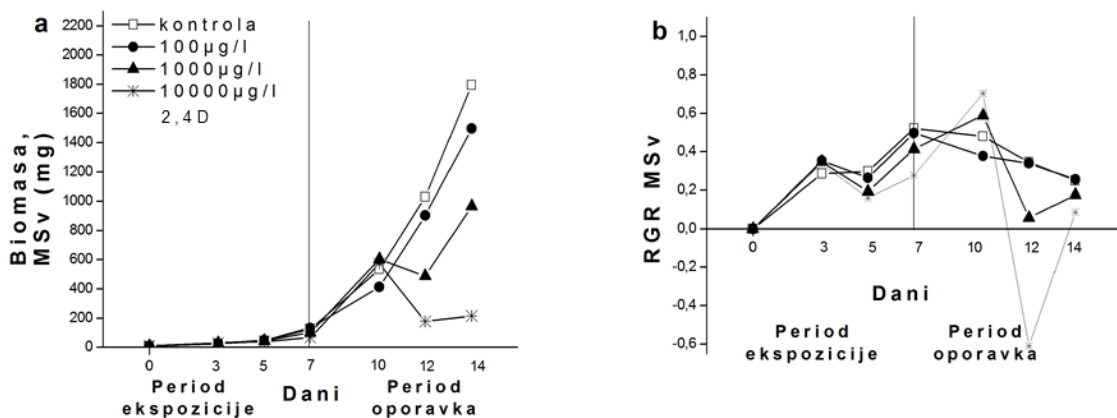
## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.5.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testu sa izoproturonom, na osnovu (a) biomase - sveža masa (mg), (b) relativne stope rasta. MSv – sveža masa, RGR – relativna stopa rasta

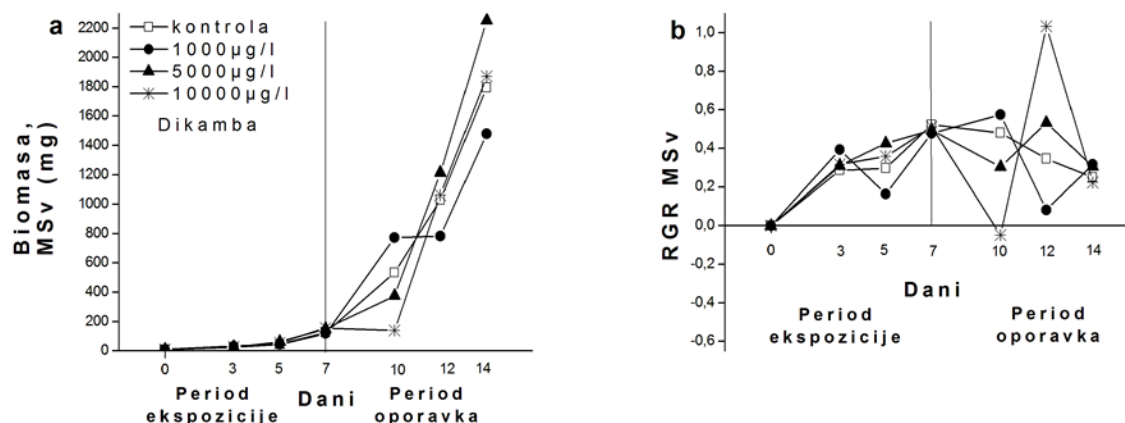


**Slika 5.6.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testu sa trifluralinom, na osnovu (a) biomase - sveža masa (mg), (b) relativne stope rasta. MSv – sveža masa, RGR – relativna stopa rasta



**Slika 5.7.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testu sa 2,4 D, na osnovu (a) biomase - sveža masa (mg), (b) relativne stope rasta. MSv – sveža masa, RGR – relativna stopa rasta

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.8.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testu sa dikambom, na osnovu (a) biomase - sveža masa (mg), (b) relativne stope rasta. MSv – sveža masa, RGR – relativna stopa rasta

**Tabela 5.2.** Srednje inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$ ) u testovima inhibicije rasta sa pojedinačnim herbicidima na vrsti *Lemna minor*, iskazane za period oporavka (7-12, atrazin, izoproturon, trifluralin; 7-14, 2,4 D) i poslednji interval u okviru perioda oporavka (10-12, atrazin, izoproturon i trifluralin; 12-14, 2,4 D). \* iz Knežević i sar. (2016)

Supstanca	$IC_{50}$ , RGR BJ ( $\mu\text{g/l}$ )	
	10-12	7-12
Atrazin	> 1280,0*	1110,7* (788,7-1256,7)
Izoproturon	654,2* (586,5-660,0)	456,6* (8,1-647,8)
Trifluralin	539,0* (276,3-695,3)	330,6* (231,8-562,5)
Supstanca	12-14	7-14
2,4 D	9277,0 (7948,5-9894,1)	7980,0 (6468,2-9122,0)

Napomena: RGR – relativna stopa rasta, BJ – broj jedinki.

$IC_{50}$  vrednosti, sa intervalima poverenja, su izračunate metodom linearne interpolacije

U laboratorijskim testovima na vrsti *L. minor*, poređenjem RGR u test tretmanu sa RGR u kontroli tokom perioda oporavka i poslednjeg intervala u okviru perioda oporavka se može utvrditi da li određeni herbicid ima fitostatičko ili fitotoksično dejstvo.

Uočen je efikasan oporavak biljne kulture nakon izloženosti atrazinu,  $IC_{50}$  vrednosti za period oporavka i poslednji interval u okviru perioda oporavka su iznosile > 1 mg/l. Brain i sar. (2012) navode da je period oporavka od sedam dana dovoljan da se vrsta *L. gibba* oporavi nakon četrnaest dana izloženosti koncentracijama atrazina i do 160  $\mu\text{g/l}$ . Oporavak drugih akvatičnih makrofita, kao što su npr. vrste iz rodova *Myriophyllum*, *Potamogeton* je moguć, i

to ne samo nakon kratkoročne (3 i 7 dana) već i višenedeljne izloženosti atrazinu (*Kemp i sar. 1985; Knežević 2010; Teodorović i sar. 2012*).

U testu sa izoproturonom, jasan je trend povećanja vrednosti RGR tokom perioda oporavka, čak i u tretmanu sa najvišom primenjenom koncentracijom (1000 µg/l), gde su vrednosti RGR bile negative tokom perioda ekspozicije. Ovakvi rezultati upućuju na efikasan oporavak biljne kulture nakon izloženosti izoproturonu, što je u saglasnosti sa drugim literaturnim navodima (*Knauert i sar. 2009; Boxall i sar. 2013*).

Generalno, različitim istraživanjima na akvatičnim makrofitama je zabeleženo reverzibilno dejstvo fotosintetičkih inhibitora (*Cedergreen i sar. 2005; Knauer i Hommen 2012*), što je potvrđeno i rezultatima iz ove disertacije. Zbog svega navedenog, može se smatrati da atrazin i izoproturon ispoljavaju fitostatično dejstvo. To znači da prisustvo ovih herbicida inhibira rast eksponiranih jedinki/populacija sve do momenta dok ne dođe do uklanjanja herbicida iz sistema, što se u laboratorijskim uslovima postiže prebacivanjem biljaka u čist hranjivi rastvor, nakon čega započinje proces oporavaka.

U testu sa *L. minor*, toksično dejstvo trifluralina je znatno izraženije u periodu oporavka, što upućuje na njegovo odloženo, odnosno fitotoksično dejstvo. Podaci o toksičnosti trifluralina su malobrojni u odnosu na raspoložive podatke o drugim herbicidima, o čemu je i bilo reči u prethodnom delu teksta. Takođe, podaci o oporavku akvatičnih makrofita nakon izloženosti ovom herbicidu i ne postoje, čime je onemogućeno dalje poređenje.

Neosetljivost vrsta iz roda *Lemna*, tokom perioda ekspozicije, na dejstvo sintetičkih auksina gde spadaju 2,4 D i dikamba je potvrđena na osnovu prikazanih rezultata (tabela 5.1, slika 5.2 (d i e) i 5.3 (d i e)). Kada se uzmu u obzir rezultati o toksičnosti 2,4 D tokom perioda oporavka uočava se odloženo dejstvo ovog herbicida na *L. minor*. Kumulativna LOEC vrednost za parametar biljna površina (BP), na osnovu prinosa, je iznosila 100 µg/l (Prilog, tabela 8.4 (f)), što je blisko mogućim koncentracijama ovog herbicida u životnoj sredini (*Turgut 2007*).

U standardnim ekotoksikološkim testovima, potencijal oporavka eksponiranih jedinki/populacija se ne ispituje (*EFSA PPR Panel 2013*). U ovoj disertaciji, modifikacijom standardnih testova je omogućeno praćenje oporavka biljnih kultura nakon izloženosti odabranim herbicidima. Zabeleženo odloženo dejstvo trifluralina i 2,4 D je ukazalo na značaj praćenja potencijala oporavka u laboratorijskim testovima, u cilju povećanja njihove ekološke relevantnosti. Oslanjajanje isključivo na rezultate iz standardnih ekotoksikoloških testova može dovesti do potcenjivanja efekata herbicida kada su u pitanju akvatične makrofite, što je ovde i zabeleženo u slučaju ova dva herbicida.

### 5.2.2. odabranih herbicida

Sledeći cilj ove disertacije je bio da se ispita potencijal oporavka vrste *L. minor* nakon izloženosti dvo- i tro-komponentnim smešama odabranih herbicida. U tabeli 5.3. su prikazane vrednosti inhibicije rasta vrste *L. minor*, na osnovu relativne stope rasta i prinosa za sve korišćene parametre, i to za period ekspozicije (0-7) i kumulativno (period ekspozicije+period oporavka; 0-14), nakon izloženosti dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina. Testovi su izvedeni u tri tipa smeša. U L tipu smeša koncentracije pojedinačnih herbicida su bile bliske  $IC_{10}$  koncentracijama koje su relativno bliske mogućim koncentracijama u životnoj sredini, dok u M i H tipu smeša koncentracije pojedinačnih herbicida su bile bliske  $IC_{25}$ , odnosno  $IC_{50}$  koncentracijama.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.3. se uočava slična osetljivost različitih parametara. Kumulativne vrednosti inhibicije rasta u testu sa svim tipovima (L, M i H) smeše atrazina i izoproturona, izračunate za period testa 0-14, su niže u odnosu na vrednosti inhibicije rasta za period ekspozicije.

Nasuprot smešama fotosintetičkih inhibitora u koje spadaju atrazin i izoproturon u testu sa dvo-komponentnim smešama sa trifluralinom (atrazin+trifluralin i izoproturon+trifluralin), i to u svim tipovima smeša, kumulativne vrednosti inhibicije rasta su veće u odnosu na one tokom perioda ekspozicije.

U slučaju tro-komponentne smeše, vrednosti inhibicije, čak i u L tipu smeše u kome su koncentracije sve tri test supstance približne njihovim pojedinačnim tzv. „bezbednim” – ili  $IC_{10}$  koncentracijama, premašuju 50% tokom perioda ekspozicije. Kumulativne vrednosti inhibicije rasta, za sve tipove tro-komponentne smeše, se neznatno razlikuju u odnosu na period ekspozicije, što znači da u periodu oporavka nije došlo do smanjenja toksičnosti herbicida.

**Tabela 5.3.** Test inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina. Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta (RGR) i prinosa (Y) za parametre: broj jedniki (BJ), sveža masa (MSv) i biljna površina (BP) za period testa 0-7 i 0-14 dana; dopunjeno iz Knežević i sar. (2016)

Tretman	Atrazin izoproturon vs. kontrola		Atrazin+ trifluralin vs. kontrola		Izoproturon+ trifluralin vs. kontrola		Atrazin+ izoproturon+ trifluralin vs. kontrola	
	0-7	0-14	0-7	0-14	0-7	0-14	0-7	0-14
	RGR BJ							
L	14,38	10,94	52,00	57,50	49,17	55,48	53,52	49,93
M	43,16	29,27	57,34	74,22	60,99	73,34	70,63	68,93
H	62,72	47,01	61,60	79,50	62,42	84,64	82,87	77,64
RGR MSv								
L	25,61	10,78	55,34	66,27	40,07	51,47	54,48	53,01
M	64,56	31,65	69,93	74,07	66,20	77,97	99,89	77,45
H	83,55	44,70	74,80	80,20	66,96	81,61	101,20	79,39
RGR BP								
L	27,61	16,28	62,68	77,70	55,51	64,99	56,85	64,56
M	57,08	29,72	68,30	83,36	73,74	86,57	81,54	83,34
H	71,78	44,61	77,05	88,06	73,12	92,10	86,62	85,90
Y BJ								
L	29,09	35,75	73,71	94,77	72,27	92,29	79,38	89,29
M	67,27	65,91	78,35	96,08	81,82	97,73	87,11	94,69
H	82,73	81,75	81,44	96,95	82,73	98,58	93,30	96,34
Y MSv								
L	53,35	44,21	76,85	93,12	68,85	92,01	79,89	86,63
M	82,00	76,81	84,85	95,65	87,91	98,34	99,96	96,53
H	94,65	87,69	89,20	97,00	87,94	98,69	100,41	97,04
Y BP								
L	47,53	47,23	79,05	95,81	78,27	95,16	78,23	90,94
M	80,11	73,98	83,98	97,51	90,16	98,98	91,95	97,53
H	88,56	86,29	89,23	98,29	90,37	99,51	94,99	98,14

Napomena: L, M i H tip smeše – objašnjeno u poglavlju Materijal i metode

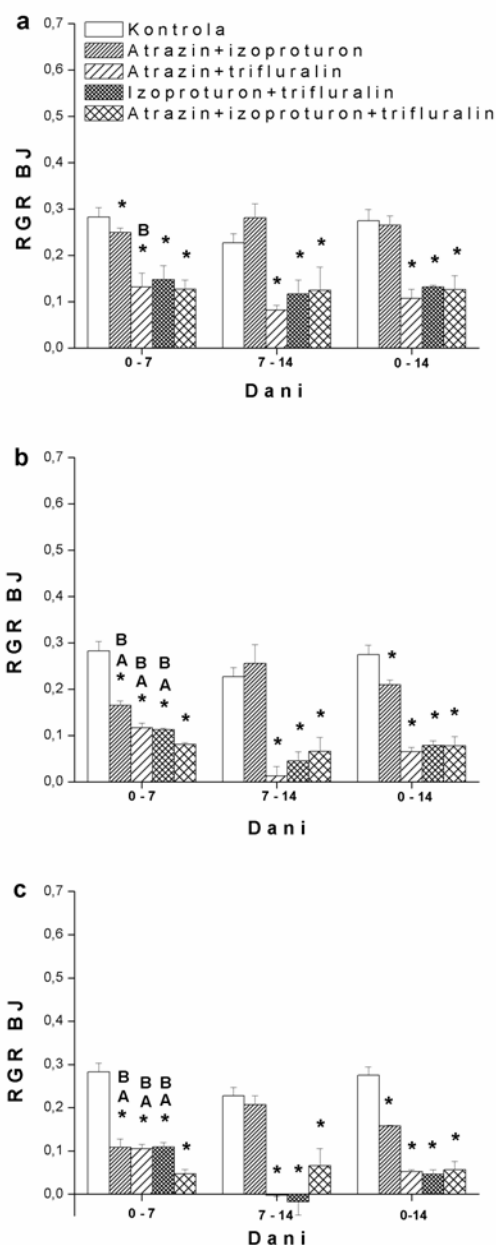
Na slikama 5.9. i 5.10. su prikazane RGR vrste *Lemna minor* na osnovu BJ i MSv u testovima inhibicije rasta sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina. Vrednosti RGR su prikazane za različite vremenske intervale tokom perioda trajanja testa: 0-7, 7-14 i 0-14 d.

Statistički značajno niže RGR su zabeležene tokom perioda ekspozicije u svim tipovima smeša (L, M i H) u odnosu na kontrolu.

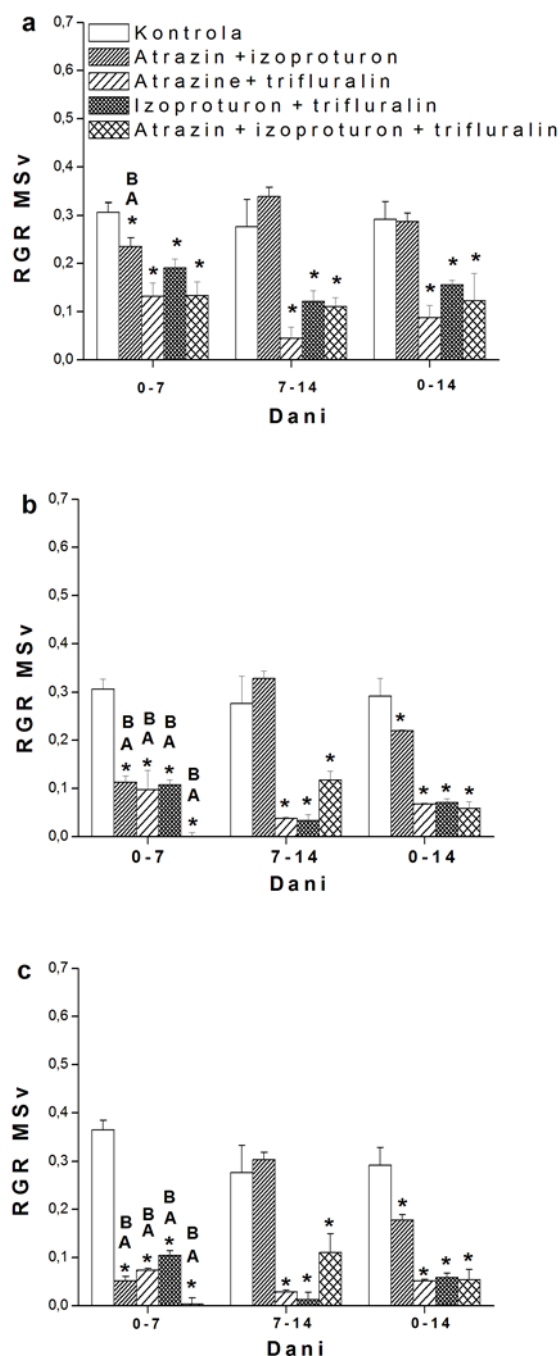
## 5. Rezultati i diskusija

Kumulativne vrednosti RGR, na osnovu oba parametra, se ne razlikuju statistički značajno jedino u L tipu dvo-komponentne smeše atrazina i izoproturona u odnosu na kontrolu. Dodatno, nije zabeležena statistički značajna razlika u vrednostima RGR za oba parametra, tokom perioda oporavka, između ni jednog tipa dvo-komponentne smeše atrazina i izoproturona i kontrole. Sa druge strane, činjenica da i dalje postoji statistički značajna razlika u vrednostima RGR između kontrole i svih tipova (L, M i H) dvo-komponentnih smeša sa trifluralinom i tro-komponentne smeše govori da se toksičnost navedenih smeša ni tokom perioda oporavka nije smanjila.





**Slika 5.9.** Testovi inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina: (a) L, (b) M, (c) H tip smeše (objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Relativna stopa rasta (RGR), na osnovu broja jedinki (BJ), tokom 0-7, 7-14 i 0-14 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti RGR sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovima su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama RGR unutar tretmana tokom različitih vremenskih intervala tokom testa: A - 0-7 vs. 7-14 d, B - 0-7 vs. 0-14 d (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ )

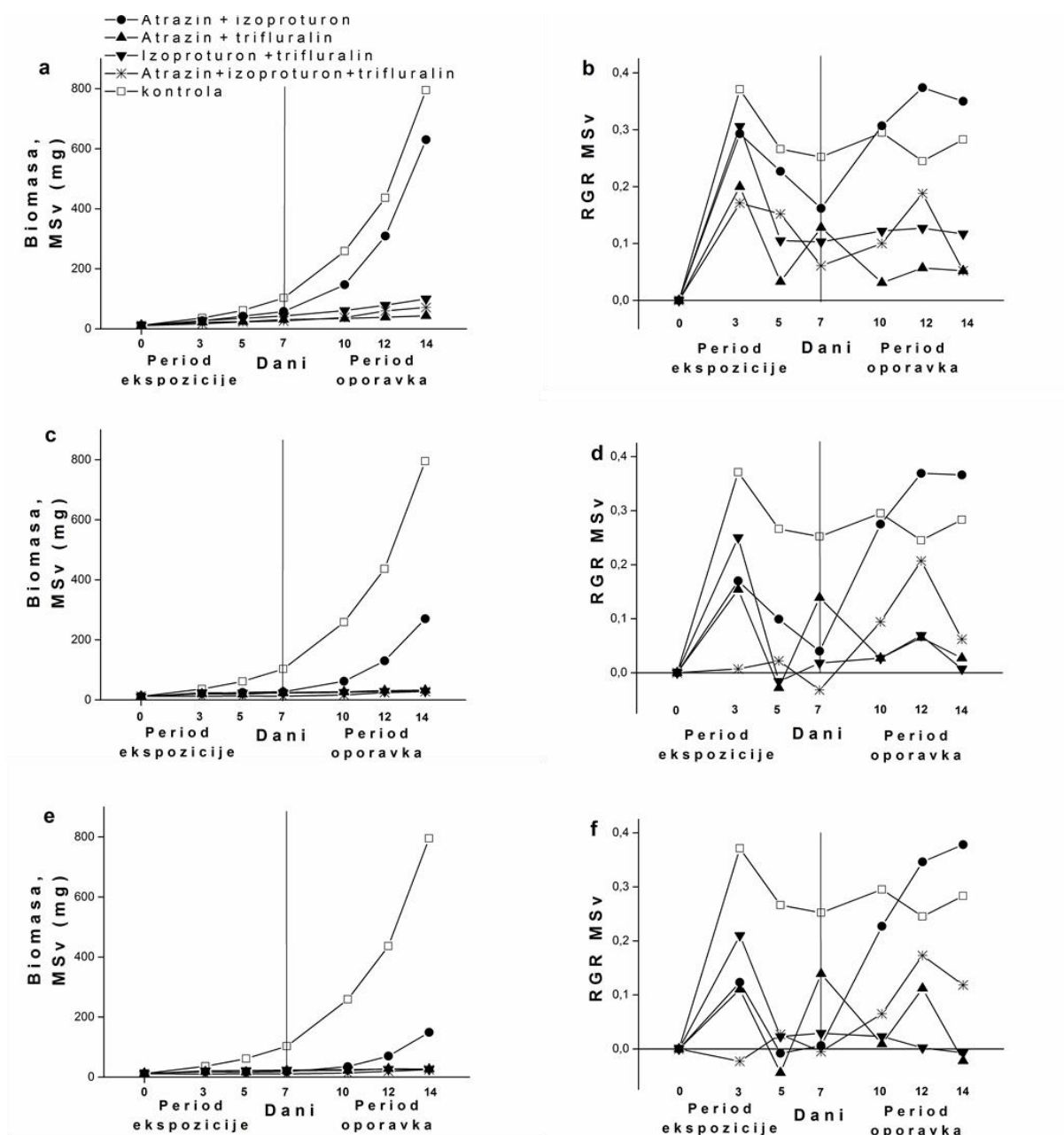


**Slika 5.10.** Testovi inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina: (a) L, (b) M, (c) H tip smeše (objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Relativna stopa rasta (RGR), na osnovu sveže mase (MSv), tokom 0-7, 7-14 i 0-14 dana testa. Prikazane su srednje vrednosti RGR sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovima su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama RGR unutar tretmana tokom različitih vremenskih intervala tokom testa: A - 0-7 vs. 7-14 d, B - 0-7 vs. 0-14 d (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ )

Dinamika rasta vrste *L. minor* tokom celokupnog perioda trajanja testa od 14 dana (period ekspozicije+period oporavka), iskazana preko biomase i RGR MSv, u testovima sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina je prikazana na slici 5.11. Povećanje finalne biomase u odnosu na početnu se beleži u svim tipovima dvo- i tro-komponentnih smeša (Slika 5.11, a, c i e). Krive rasta vrste *L. minor* u svim tipovima dvo-komponentne smeše atrazina i izoproturona slede oblik krive rasta biljaka u kontoli (Slika 5.11 a, c i e). Dodatno, primećuje se povećanje biomase tokom perioda oporavka u odnosu na vrednosti tokom perioda ekspozicije. Odgovor *L. minor* na delovanje dvo-komponentne smeše fotosintetičkih inhibitora je sličan onom zabeleženom u testu sa atrazinom i izoproturonom kao pojedinačnim test supstancama.

Sa druge strane, u H tipovima dvo-komponentnih smeša trifluralina sa fotosintetičkim inhibitorima dolazi do smanjenja vrednosti biomase tokom poslednjeg intervala unutar perioda oporavka, čak se na kraju perioda oporavka uočavaju negativne vrednosti RGR (Slika 5.11 f).

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.11.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testovima sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina: L – a, b, M – c, d, H tip smeše – e, f. RGR – relativna stopa rasta, MSv – sveža masa

Tokom poslednjeg intervala u okviru perioda oporavka, ni u jednom od tipova smeše (L, M i H) atrazina i izoproturona nije zabeležena statistički značajna razlika u relativnoj stopi rasta u odnosu na kontrolu (tabela 5.4.), čime se potvrđuje efikasan oporavak biljne kulture, nezavisno od primenjenih koncentracija herbicida. Knauer i Hommen (2012) su ispitivali oporavak zajednice akvatičnih makrofita koju su činile vrste *M. spicatum*, *P. lucens*, *Elodea canadensis* nakon izloženosti tro-komponentnoj smeši fotosintetičkih inhibitora u mezo-kosmos sistemu. Koncentracije atrazina, izoproturona i diurona u smeši su iznosile redom 23,3, 14 i 5  $\mu\text{g/l}$ . Navedena grupa autora je navela da je zajednici akvatičnih makrofita bilo

## 5. Rezultati i diskusija

potrebno od 12 do 26 dana da se oporavi nakon petonedeljne izloženosti, u zavisnosti od posmatranog parametra u testu (funkcionalni – fotosintetska efikasnost biljaka vs. strukturni parametri – abudanca i struktura biljne zajednice) (Knauer i Hommen 2012). U nekoliko istraživanja je potvrđeno da se fitoplanktonske zajednice oporavljaju od toksičnog dejstva smeša herbicida u kraćem vremenskom periodu u poređenju sa zajednicama akvatičnih makrofita (Brock i sar. 2000). Rezultati Knauert i sar. (2009) navode suprotno, naime, autori ističu da je period neophodan za oporavak slatkvodne fitoplantonske zajednice nakon petonedeljne izloženosti smeši fotosintetičkih inhibitora iz istraživanja Knauer i Hommen (2012) znatno duži i iznosi preko pet meseci.

U slučaju smeša sa trifluralinom, oporavak je zabeležen jedino u L tipovima smeša, gde se vrednosti RGR nisu statistički značajno razlikovale od kontrole tokom poslednjeg intervala u okviru perioda oporavka (tabela 5.4.). U svim drugim tipovima smeša sa trifluralinom (M i H), tokom poslednjeg intervala u okviru perioda oporavka vrednosti inhibicije su bile čak iznad 50%. Iz svega navedenog nameće se zaključak da oporavak biljne kulture nakon izloženosti dvo- i tro-komponentnim smešama sa trifluralinom zavisi od primenjene koncentracije herbicida. Na osnovu naših saznanja, ne postoje literaturni navodi o potencijalu oporavka akvatičnih vrsta makrofita nakon izloženosti smešama u kojima supstance imaju različite mehanizme delovanja.

**Tabela 5.4.** Test inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina. Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta (RGR) za broj jedinki (BJ), za period testa: 7-14 (period oporavka) i 12-14 (poslednji interval u okviru perioda oporavka); iz Knežević i sar. (2016)

Tretman	Atrazin+ izoproturon vs. kontrola		Atrazin+ trifluralin vs. kontrola		Izoproturon+ trifluralin vs. kontrola		Atrazin+ izoproturon+ trifluralin vs. kontrola	
	RGR BJ							
	7-14	12-14	7-14	12-14	7-14	12-14	7-14	12-14
L	7,6	-42,6	64,1*	9,1	61,5*	29,2	45,6*	-7,0
M	16,0	-8,1	94,4*	97,8*	85,1*	50,0*	71,0*	67,9*
H	32,0*	41,1	100,9*	107,7*	105,9*	112,3*	71,4*	63,9*

Napomena: \* - tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ )

### 5.2.2.1. atrazina, izoproturona i trifluralina

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio da se proceni efekat dvo- i tro-komponentnih smeša atrazina, izoproturona i trifluralina pomoću modela adicije koncentracija (CA), a na osnovu informacija o pojedinačnom toksičnom dejstvu izabranih herbicida.

## 5. Rezultati i diskusija

U tabeli 5.5. su prikazane  $IC_{50}$  vrednosti pojedinačnih supstanci (atrazin, izoproturon i trifluralin), izračunate na osnovu relativne stope rasta za broj jedinki i svežu masu, a koje su korišćene za predviđanje efekata smeša primenom CA modela u testovima na *L. minor*.  $IC_{50}$  vrednosti su iskazane za 0-7 i 0-14 period testa.

**Tabela 5.5.**  $IC_{50}$  vrednosti ( $\mu\text{g/l}$ ), korišćene za predviđanje efekta smeša atrazina, izoproturona i trifluralina na vrstu *Lemna minor* modelom adicije koncentracija (CA).  $IC_{50}$  vrednosti su određene logaritamskim modelom

Test inhibicije rasta na vrsti <i>Lemna minor</i>				
Parametar		$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/l}$ )		
		Atrazin	Izoproturon	Trifluralin
RGR BJ	0-7	226,90	134,94	929,96
	0-14	382,50	195,81	417,01
RGR MSv	0-7	92,39	131,77	1346,27
	0-14	229,47	588,08	596,54

U tabeli 5.6. su prikazane predviđene pomoću CA modela vrednosti inhibicije rasta vrste *L. minor* u testovima sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina. Vrednosti inhibicije rasta na osnovu glavnog parametra, odnosno BJ, tokom perioda ekspozicije za L, M i H tipove smeše atrazina i izoproturona iznose redom – 16,39, 74,82 i 128,78%. Vrednosti inhibicije rasta, na osnovu istog parametra, tokom perioda ekspozicije za L, M i H tipove dvo-komponentnih smeša trifluralina i fotosintetičkih inhibitora iznose redom – 21,07, 41,32 i 85,83% (atrazin+trifluralin) i 10,61, 62,02 i 119,85% (izoproturon i trifluralin). Predviđene vrednosti inhibicije rasta na osnovu BJ u periodu ekspozicije tro-komponentnom smešom, iznose 24,04, 89,08 i 167,24% u L, M i H tipovima smeše.

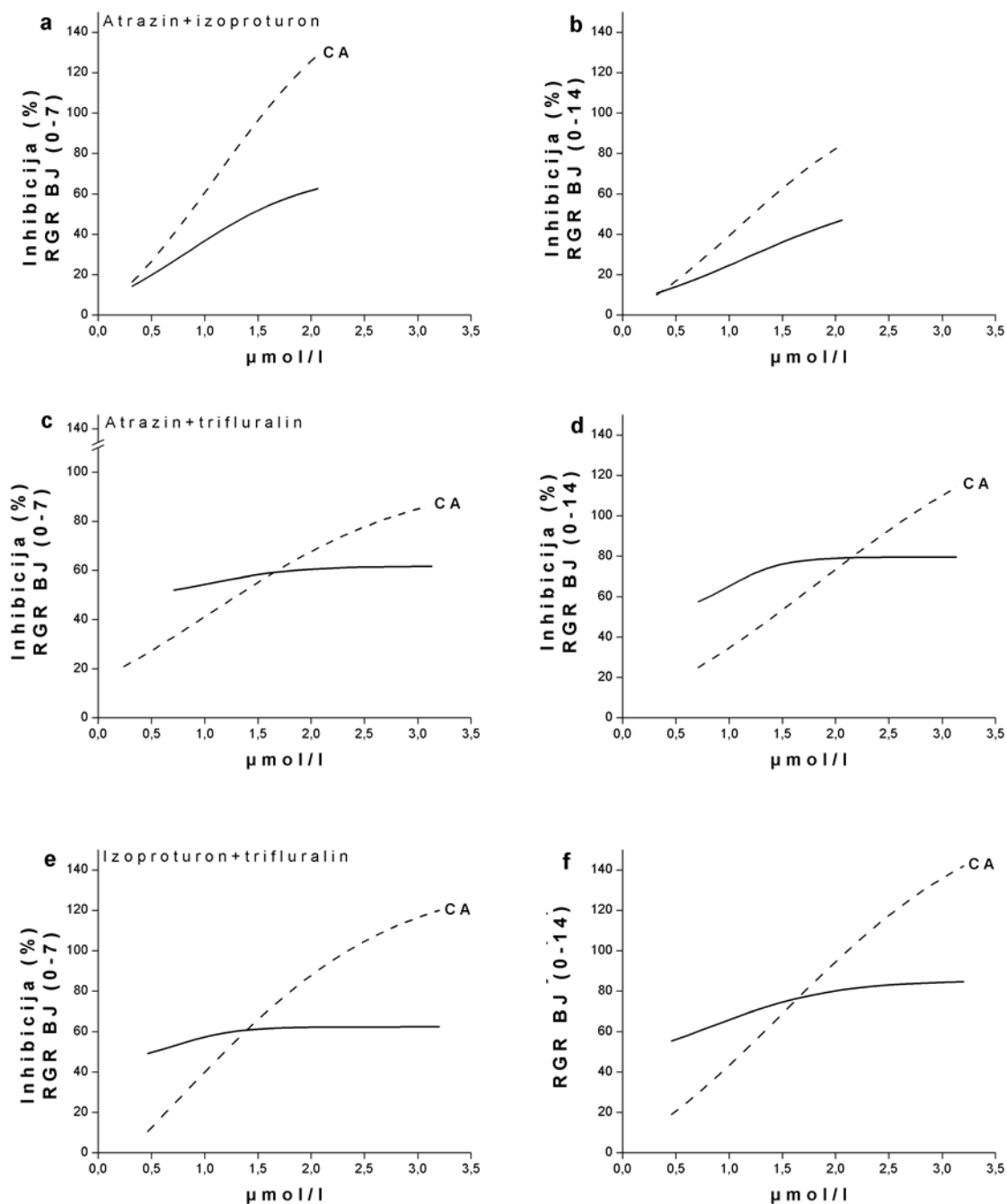
**Tabela. 5.6.** Vrednosti inhibicije rasta (%) predviđene na osnovu modela adicije koncentracija (CA). Vrednosti inhibicije rasta vrste *Lemna minor* nakon izloženosti dvo- i tro-komponentnim smešama sa atrazinom, izoproturonom i trifluralinom su određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametre broj jedinki (BJ) i sveža masa (MSv), za period testa 0-7 i 0-14

Tretman	Atrazin+ izoproturon vs. kontrola		Atrazin+ trifluralin vs. kontrola		Izoproturon+ trifluralin vs. kontrola		Atrazin+ izoproturon+ trifluralin vs. kontrola	
	0-7	0-14	0-7	0-14	0-7	0-14	0-7	0-14
RGR BJ								
L	16,39	10,01	21,07	25,02	10,61	19,09	24,04	27,06
M	74,82	48,97	41,32	47,85	62,02	64,71	89,08	80,76
H	128,78	84,20	85,83	113,86	119,86	141,85	167,24	169,96
RGR MSv								
L	36,02	13,96	38,26	25,20	8,32	12,60	41,30	25,88
M	115,37	37,72	76,31	48,99	58,76	33,19	125,22	59,94
H	119,72	65,53	142,92	106,79	109,93	78,63	226,28	125,47

Predviđene i empirijski utvrđene krive dozne zavisnosti parametara rasta vrste *L. minor* u testovima sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina su prikazane na slikama 5.12, 5.13 za parametar broj jedinki, odnosno 5.14 i 5.15 za parametar sveža masa. Predviđene i empirijski utvrđene  $IC_{50}$  vrednosti u testovima inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* sa dvo- i tro-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina su prikazane u tabeli 5.7. Odstupanja od aditivnosti izračunata pomoću modela odstupanja (MDR) su prikazana u tabeli 5.7.

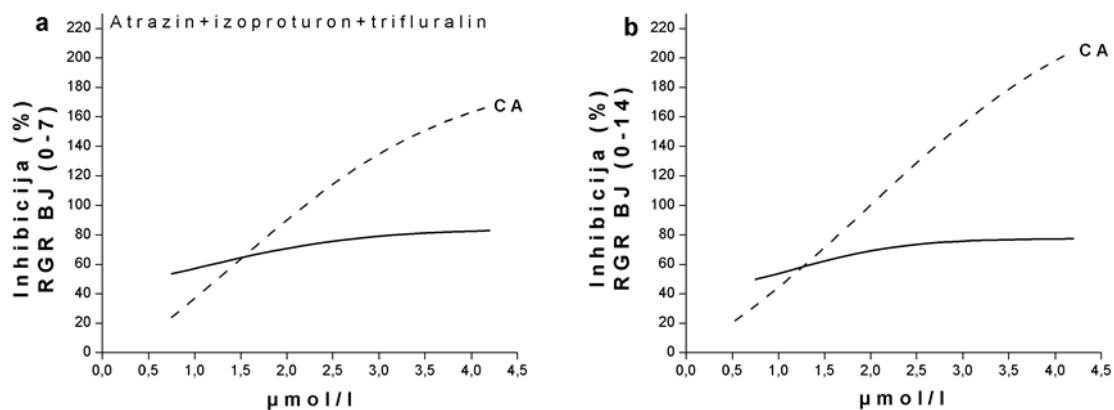
U slučaju dvo-komponentne smeše atrazina i izoproturona MDR, na osnovu relativne stope rasta za parametar broj jedinki, iznosi 0,45 (0-7, period ekpozicije) i 0,34 (0-14; period ekpozicije+period oporavka), dok u slučaju tro-komponentne smeše (atrazin, izoproturon i trifluralin) 1,80 (0-7, period ekpozicije) i 1,22 (0-14; period ekpozicije+period oporavka). Kada su u pitanju dvo-komponentne smeše trifluralina u kombinaciji sa fotosintetičkim inhibitorom, MDR, za oba perioda testa (0-7 i 0-14) iznosi iznad 2.

## 5. Rezultati i diskusija



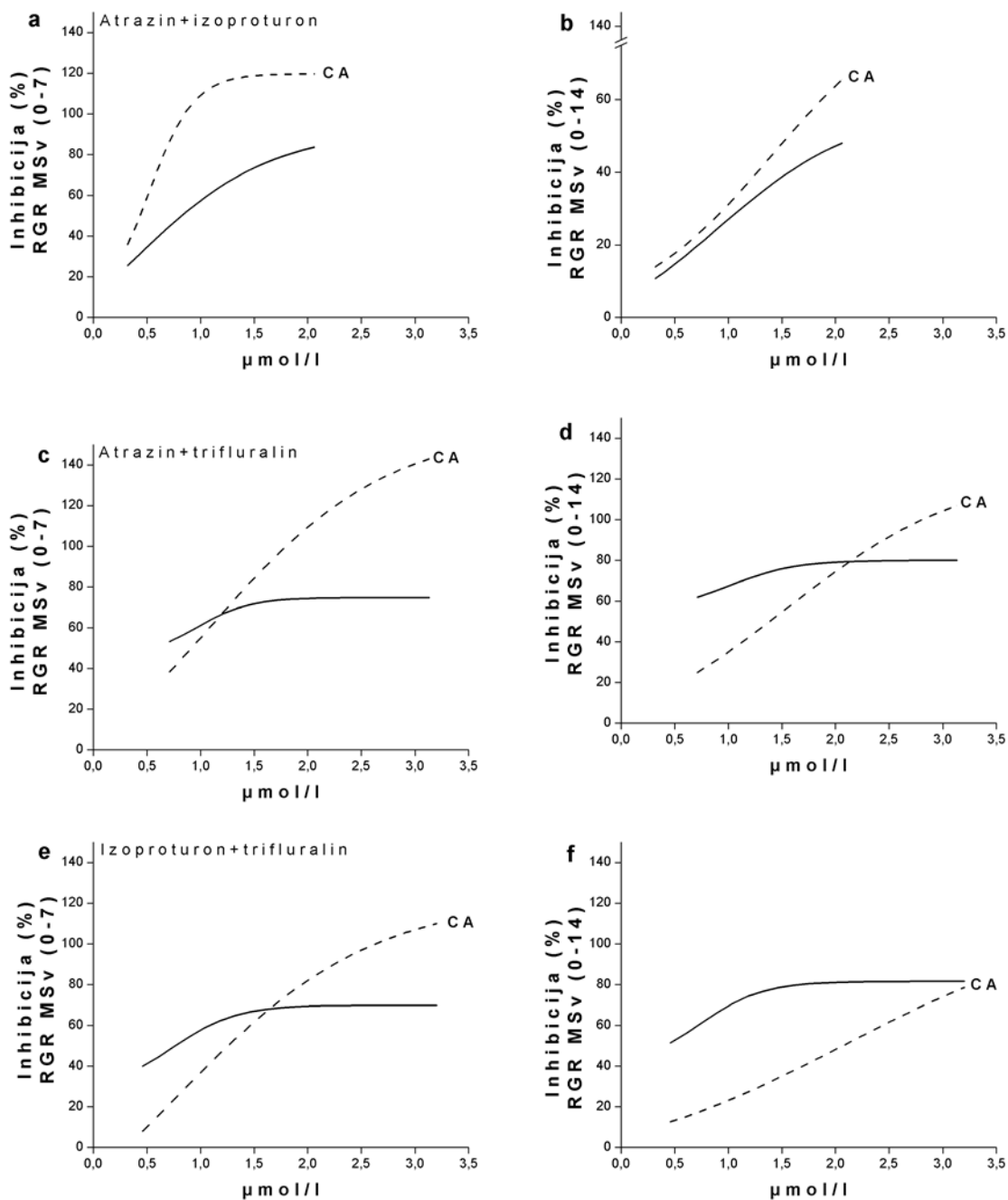
**Slika 5.12.** Predviđena i empirijski utvrđena inhibicija rasta vrste *Lemna minor* u testovima sa dvo-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina: a, b - atrazin + izoproturon, c, d - atrazin + trifluralin, e, f - izoproturon + trifluralin. Inhibicija rasta je određena na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar broj jedinki (BJ) za period testa 0-7 d (a, c i e) i 0-14 (b, d i f). Dozna zavisnost je prikazana sigmoidalnim krivama: empirijski utvrđena toksičnost puna linija, toksičnost na osnovu CA modela isprekidana linija. Modifikovano prema Knežević i sar. (2016)





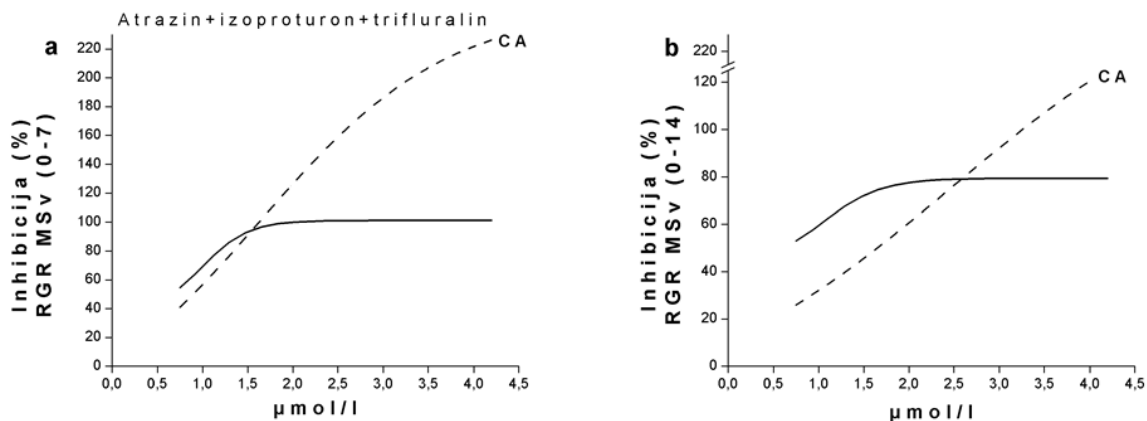
**Slika 5.13.** Predviđena i empirijski utvrđena inhibicija rasta vrste *Lemna minor* u testu sa trokomponentnom smešom atrazina, izoproturona i trifluralina: Inhibicija rasta je određena na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar broj jedinki (BJ) za period testa 0-7 d (a) i 0-14 d (b). Dozna zavisnost je prikazana sigmoidalnim krivama: empirijski utvrđena toksičnost puna linija, toksičnost na osnovu CA modela isprekidana linija. Modifikovano prema Knežević i sar. (2016)

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.14.** Predviđena i empirijski utvrđena inhibicija rasta vrste *Lemna minor* u testovima sa dvo-komponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina: a, b - atrazin + izoproturon, c, d - atrazin + trifluralin, e, f - izoproturon + trifluralin. Inhibicija rasta je određena na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar sveža masa (MSv) za period testa 0-7 d (a, c i e) i 0-14 (b, d i f). Dozna zavisnost je prikazana sigmoidalnim krivama: empirijski utvrđena toksičnost puna linija, toksičnost na osnovu CA modela isprekidana linija

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.15.** Predviđena i empirijski utvrđena inhibicija rasta vrste *Lemna minor* u testu sa trokomponentnom smešom atrazina, izoproturona i trifluralina: Inhibicija rasta je određena na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar sveža masa (MSv) za period testa 0-7 d (a) i 0-14 d (b). Dozna zavisnost je prikazana sigmoidalnim krivama: empirijski utvrđena toksičnost puna linija, toksičnost na osnovu CA modela isprekidana linija

## 5. Rezultati i diskusija

**Tabela 5.7.** Predviđene (CA model) i empirijski utvrđene vrednosti inhibicije rasta vrste *Lemna minor* ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/l}$ ), u testovima sa dvo- i trokomponentnim smešama atrazina, izoproturona i trifluralina. Inhibicija rasta je izračunata na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametre broj jedinki (BJ) i sveža masa (MS<sub>v</sub>) logaritamskim modelom. \* Modifikovano prema Knežević i sar. (2016)

Tretman	Atrazin + izoproturon			Atrazin + trifluralin			Izoproturon + Trifluralin			Atrazin + izoproturon + trifluralin		
	$IC_{50CA}$	$IC_{50}$	MDR	$IC_{50CA}$	$IC_{50}$	MDR	$IC_{50CA}$	$IC_{50}$	MDR	$IC_{50CA}$	$IC_{50}$	MDR
	0-7											
RGR BJ	131,30	289,20	0,45*	424,35	136,46	3,11*	300,51	136,74	2,20*	301,22	167,43	1,80*
RGR MS <sub>v</sub>	78,28	152,23	0,51	249,40	108,70	2,29	324,02	259,49	1,25	352,76	142,63	2,47
	0-14											
RGR BJ	208,06	603,90	0,34*	340,60	97,24	3,50*	261,19	101,57	2,57*	238,00	195,09	1,22*
RGR MS <sub>v</sub>	297,35	628,10	0,47	346,09	31,00	>5	483,48	112,59	4,29	151,72	141,61	1,07

Napomena:  $IC_{50CA}$  – inhibitorna koncentracija za 50% populacije, izračunata na osnovu CA modela,  $IC_{50}$  – empirijski utvrđena inhibitorna koncentracija za 50% populacije

Ispitivanja toksičnosti smeša u čiji sastav ulaze supstance sa različitim mehanizmom delovanja su uglavnom vršena pre više od deset godina, i obuhvatala su testove na slatkovodnim algama (npr. *Faust i sar. 2003; Backhaus i sar. 2004b*). Tadašnjim istraživanjima je dokazano da se toksičnost smeša u kojima supstance nemaju isti mehanizam delovanja može uspešno predvideti ne samo pomoću modela nezavisnog dejstva (IA), već i pomoću CA modela. CA model se u regulativnim okvirima smatra adekvatnim modelom za predviđanje toksičnosti smeša, nezavisno od mehanizma delovanja supstanci (*EFSA PPR Panel 2013*), što je podupreto činjenicom da je ovaj model protektivniji u većini slučajeva od IA modela (*Cedergreen i sar. 2007; Kortenkamp i sar. 2009; EFSA PPR Panel 2013*). S' tim u vezi, u ovoj disertaciji, za procenu toksičnosti dvo- i tro-komponentnih smeša, gde supstance imaju različit mehanizam delovanja, je korišćen CA model na osnovu saznanja o delovanju pojedinačnih herbicida.

CA model je u upotrebi već nekoliko decenija unazad (*Junghaus i sar. 2003*), dok je MDR model kojim se utvrđuje stepen odstupanja između empirijski utvrđene toksičnosti smeše i one predviđene na osnovu određenog modela (npr. CA), predložen relativno skoro (*Belden i sar. 2007*). Prema Belden i sar. (2007) toksičnost smeše se smatra većom od aditivne u slučaju da je MDR vrednost iznad 2, što ukazuje na sinergizam. Sa druge strane, toksičnost smeše se smatra manjom od aditivne kada je MDR vrednost ispod 0,5. Prema EFSA PPR Panel (2013) kategorizacija smeša je takođe izvršena pomoću MDR modela. Smatra se da su empirijski utvrđena toksičnost ispitivane smeša i toksičnost predviđena na osnovu CA modela u saglasnosti čak iako se MDR vrednost kreće u opsegu od 0,2 do 5.

Na osnovu prikazanih rezultata za period ekspozicije (slika 5.14 (a). i tabela 5.7.), potvrđuje se aditivno dejstvo dvo-komponentne smeše sa fotosintetičkim inhibitorima – atrazinom i izoproturonom, odnosno empirijski utvrđena toksičnost za navedenu smešu herbicida je u saglasnosti sa predviđenom toksičnošću na osnovu CA modela. Efekat tro-komponentne smeše, u kojoj se pored atrazina i izoproturona nalazi i trifluralin je takođe aditivan. U prilog pouzdane i precizne primene CA modela za predviđenje toksičnog dejstva fotosintetičkih inhibitora na osnovu saznanja o njihovom pojedinačnom toksičnom dejstvu idu i brojna ranija istraživanja koja su rađena na pojedinačnim vrstama i zajednicama fitoplanktona (*Faust i sar. 2001; Backhaus i sar. 2004a; Arrhenius i sar. 2004; Knauert i sar. 2008*).

Prema EFSA kategorizaciji, efekat ispitivanih smeša u ovoj disertaciji, nezavisno od mehanizma njihovog delovanja, se može okarakterisati kao aditivan, čime opasnost od pojave sinergizma ne postoji. Nasuprot tome, prema kategorizaciji iz Belden i sar. (2007), CA model u slučaju dvo-komponentnih smeša sa trifluralinom (atrazin+trifluralin i izoproturon+trifluralin) potcenjuje dejstvo navedenih smeša (tabela 5.7.). Naime, prikazani rezultati upućuju na pojavu sinergističkih interakcija između supstanci, čime se dovodi u pitanje da li je regulatorno prihvatljiv metod za procenu toksičnosti smeša dovoljno protektivan.

Na osnovu dostupnih podataka iz literature, čime je obuhvaćeno ukupno 303 istraživanja sa smešama aktivnih supstanci koje pripadaju različitim vrstama pesticida, Belden i sar. (2007) su ispitivali stepen usaglašenosti između toksičnosti predviđene na osnovu postojećih modela, uključujući i CA model, sa empirijski utvrđenom toksičnošću. Od ukupnog broja eksperimenata, u 17% atrazin je bio jedna od supstanci u smeši, dok u 20%

korišćeni podaci su iz testova na vrsti iz roda *Lemna*. Belden i sar (2007) su ukazali na visok stepen podudaranja, čak 88%, između empirijski utvrđene toksičnosti i predviđene na osnovu CA modela, nezavisno od mehanizma delovanja supstanci u smeši. Na slične rezultate upućuje i istraživanje Deneer (2000) gde je u više od 90% slučajeva zabeležena dobra usaglašenost između empirijski utvrđene i predviđene toksičnosti za 202 različite smeše sa pesticidima. Kada su u pitanju primarni producenati, korišćeni su samo rezultati iz testova na algama, dok podaci iz testova na akvatičnim makrofitama nisu uvršteni u analizu. U slučaju smeša sa herbicidnim svojstvima  $\frac{3}{4}$  korišćenih podataka za analizu je poticalo iz algalnih testova, dok je ostatak podataka dobijen iz testova na ribama, rakovima i insektima. Autor nije naveo stepen usaglašenosti između empirijske i predviđene toksičnosti za ispitivane herbicide, ali na osnovu prikazanih rezultata iz testova na algama, a koji su se većinski koristili za procenu toksičnosti herbicida, odstupanje od CA modela je zabeleženo u svega >5% slučajeva.

Coors i Frische (2011) su ispitivali stepen podudaranja između empirijski utvrđene toksičnosti i one predviđene modelom, ali kod komercijalnih smeša pesticida – sredstava za zaštitu bilja. Od ukupno 127 sredstava za zaštitu bilja, autori navode visok stepen podudaranja u svega 53,6% slučajeva. Konkretno kada su u pitanju smeše pesticida sa herbicidnim dejstvom, u testovima sa vrstama iz roda *Lemna*, beleži se sličan stepen podudaranja (57,1%). Odstupanje od CA modela, izraženo u tako visokom stepenu, se može obrazložiti činjenicom da su predviđanja toksičnosti sredstava za zaštitu bilja vršena samo na osnovu podataka o toksičnosti aktivnih supstanci, time zanemarujući uticaj različitih pomoćnih supstanci iz razloga što takvi podaci često i ne postoje.

Sredstva za zaštitu bilja najčešće sadrže jednu aktivnu supstancu u kombinaciji sa različitim pomoćnim supstancama kao što su npr. protektanti koji smanjuju fitotoksičan efekat sredstva, suprotno njima sinergisti koji povećavaju fitotoksičnost sredstva, zatim adutanti koji poboljšavaju efikasnost, kao i različiti koformulanti (EC 2009). Kao razlog zašto je empirijska toksičnost sredstava za zaštitu bilja bila veća od predviđene Coors i Frische (2011) su istakli mogućnost da je neka od pomoćnih supstanci bila toksičnija od aktivne supstance ili da je prisustvo određene pomoćne supstance povećalo toksičnost aktivne supstance. Sredstva za zaštitu bilja mogu sadržati i više od jedne aktivne supstance. U tim slučajevima, pored potencijalnih interakcija između jedne/više aktivnih supstanci i pomoćnih supstanci može doći do uzajamnog delovanja i između samih aktivnih supstanci.

Coors i Frischers (2011), navode veću saglasnost između empirijske i predviđene toksičnosti sredstava za zaštitu bilja sa herbicidnim dejstvom u testovima na vrstama iz roda *Lemna* u poređenju sa testovima na algama, ali i to da su odstupanja od aditivnosti, nezavisno od test organizma, većim delom zabeležena kod sredstava u kojima su supstance imale različit mehanizam delovanja, a ne kod sredstava u kojima su supstance imale isti mehanizam delovanja što je bilo očekivano.

Sledeći cilj ove disertacije je bio i da se ispita da li se postojeći CA model može koristiti i za procenu toksičnog efekta dvo- i tro-komponentnih smeša uzimajući u obzir integralno i podatke o oporavku eksponiranih populacija. Poređenjem izračunatih MDR vrednosti za period od 0. do 14. dana testa sa vrednostima izračunatim samo za period ekspozicije (0-7) uočava se generalno sličan obrazac. U slučaju dvo-komponentnih smeša sa trifluralinom

(atrazin/trifluralin,  $MDR_{0-14} RGR BJ = 3,50$ ; izoproturon/trifluralin,  $MDR_{0-14} RGR BJ = 2,57$ ) empirijski utvrđen efekat je veći od aditivnog, što opet ukazuje na pojavu sinergizma. Pojava sinergizma jeste predmet od interesa godinama unazad, i to ne samo u naučnom već i regulatornom smislu (*Carvalho i sar. 2014; Cedergreen 2014*). CA model se koristi u regulatornim okvirima za predviđanje efekata smeša na osnovu dostupnih informacija o efektu pojedinačnih supstanci koje ulaze u sastav smeše od interesa, stoga zabrinjava činjenica da u određenim kombinacijama empirijski utvrđena toksičnost smeše može biti značajno veća u odnosu na predviđenu. U radu *Cedergreen (2014)*, autorka navodi da je zastupljenost sinergizma kod dvo-komponentnih smeša pesticida ispod 10%, ali naglašava i neophodnost identifikacije grupa supstanci koje u kombinaciji uslovljavaju sinergističke interakcije. Iako pojava sinergizma nije česta, jasna je potreba uzimanja u obzir takvih informacija prilikom procene rizika.

Jedan od daljih istraživačkih prioriteta predstavlja i identifikacija mehanizama koji su odgovorni za pojavu sinergističkih efekata u smešama (*Cedergreen 2014*). U slučaju pesticida, to je još i moguće jer su u pitanju smeše sa tačno definisanim sastavom i poznatim mehanizmom delovanja supstanci u smeši. Znatno veći izazov predstavljaju smeše nepoznatog sastava kao što su npr. komunalne i industrijske otpadne vode, kod kojih se često ne zna koje supstance su nosioci toksičnosti, a i činjenice da za većinu supstanci mehanizam toksičnog dejstva nije poznat.

Uzimajući u obzir kumulativnu MDR vrednost (0-14), izračunatu za tro-komponentnu smešu, toksičnost predviđena modelom je bila u saglasnosti sa empirijskom. Kada je u pitanju dvo-komponentna smeša fotosintetičkih inhibitora izračunata kumulativna MDR vrednost, na osnovu RGR BJ, od 0,34 je ukazala na antagonizam. Pojava antagonizma nije od značaja u procesu procene rizika iz razloga što je, u tom slučaju, empirijska toksičnost smeše manja od predviđene (*Panizzi i sar. 2017*).

Rezultatima prikazanim u okviru ove disertacije je dokazano da u specifičnim kombinacijama herbicida može doći do sinergističkih interakcija supstanci, čak i u L tipu smeša, gde su koncentracije pojedinačnih supstanci bile bliske svojim  $IC_{10}$  vrednostima. Empirijski utvrđen efekat L tipa dvo- i tro-komponentnih smeša u čiji sastav ulazi trifluralin je bio iznad 50%, što možda ukazuje da bi statistički značajan efekat smeša mogao biti zabeležen i pri nižim koncentracijama pojedinačnih supstanci od  $IC_{10}$ , odnosno stvarnim koncentracijama tih herbicida u životnoj sredini. Efekat smeša u kojima su supstance prisutne u vrednostima svojih tzv. bezbednih koncentracija nije dovoljno proučavan i stoga se ne beleži često u dostupnoj literaturi (*Kortenkamp i sar. 2009; Cedergreen 2014*), zbog čega je jasna potreba daljih istraživanja toksičnosti smeša u uslovima što približijim realnim uslovima u životnoj sredini.

Razvojem analitičkih metoda i njihovom primenom u savremenim istraživanjima se u svakom uzorku vode iz životne sredine detektuje veliki broj supstanci (*Brack i sar. 2015; Altenburger i sar. 2015*). Prema rezultatima većeg broja monitoring programa u Evropi, pesticidi, a među njima ponajviše herbicidi, njihovi transformacioni i degradacioni proizvodi, predstavljaju najčešću grupu detektovanih zagađujućih supstanci u akvatičnim ekosistemima (*Busch i sar. 2016; Schreiner i sar. 2016; Panizzi i sar. 2017*). Ipak, samo neznatan deo supstanci prisutnih i detektovanih u životnoj sredini jeste odgovoran za biološku aktivnost

## 5. Rezultati i diskusija

kod eksponiranih organizama (*Kortenkamp i Faust 2010; Vaj 2011*), i identifikacija takvih supstanci predstavlja jedan od naglašenih prioriteta u i istraživačkom i regulatornom smislu (*EC 2012; Panizzi i sar. 2017*).



### 5.3. Osetljivost i

### ih materija

Sledeći cilj ove disertacije je bio da se ispita da li prirodna organska materija (POM), koja je u testovima simulirana preko huminskih materija (HM), ima uticaj na ispoljavanje toksičnog dejstva pojedinačnih herbicida i njihovih smeša u testovima na obe vrste akvatičnih makrofita.

#### 5.3.1. Uticaj huminskih materija delovanja herbicida atrazina, 2,4 D

*Lemna minor*

##### 5.3.1.1. Uticaj huminskih materija na parametre rasta vrste *Lemna minor*

Vrednosti parametara rasta vrste *L. minor* u svim testovima (pojedinačne supstance/smeše) u prisustvu huminskih materija su prikazane u tabeli 5.8., što je urađeno zbog testiranja rasta biljaka u prisustvu huminskih materija. Parametri u testovima inhibicije rasta su imali relativno niske vrednosti koeficijenta varijacije (CV, %). Razlike u prosečnoj varijabilnosti svih korišćenih parametara u testu su bile vrlo male, za oba perioda testa (0-7 i 0-14). Na primer, varijabilnost relativne stope rasta tokom perioda ekspozicije je bila u rasponu od 8,95-21,82%, odnosno za prinos 15,54-18,77%.

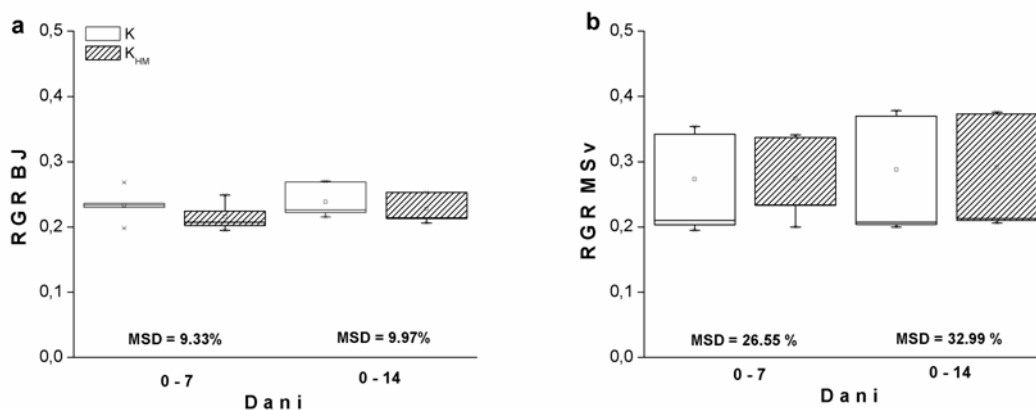
Relativne stope rasta, na osnovu sveže mase, iznose  $0,280 \text{ d}^{-1}$  (0-7) i  $0,290 \text{ d}^{-1}$  (0-14), što odgovara vremenu dupliranja  $< 2,5$  dana, čime je kriterijum za validnost testa zadovoljen. Ipak, na osnovu preostala dva parametra (broja jedinki i biljne površine) vrednosti relativne stope rasta za 0-7 i 0-14 imaju vrednost  $> 0,275 \text{ d}^{-1}$ . Vreme dupliranja za broj jedinki na osnovu relativne stope rasta iznosi 3,15 (0-7) i 3,01 (0-14) dana, dok za biljnu površinu, izvedenu takođe na osnovu relativne stope rasta 3,47 (0-7) i 3,30 (0-14) dana.

## 5. Rezultati i diskusija

**Tabela 5.8.** Varijabilnost parametara rasta vrste *Lemna minor* u tretmanima sa huminskim materijama (HM), 2 mgC/l. Prikazani su: N – broj ponavljanja, srednja vrednost, SD – standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost parametra, CV (%) – koeficijent varijacije i T.d. – vreme dupliranja

Parametar	N	Sred. vred.	SD	Medijana	Min.	Max.	CV (%)	T.d. (dani)
BJ DAT 0	6	10,50	0,55	10,50	10,00	11,00	5,22	
BJ DAT 7	6	47,67	5,65	47,50	41,00	57,00	11,84	
BR DAT 14	6	265,00	91,30	225,00	178,00	381,00	34,45	
RGR BJ 0-7	6	0,22	0,02	0,21	0,19	0,25	8,95	3,15
RGR BJ 0-14	6	0,23	0,02	0,22	0,21	0,25	9,18	3,01
Y BJ 0-7	6	37,17	5,78	37,00	31,00	47,00	15,54	
Y BJ 0-14	6	254,50	90,89	214,50	168,00	370,00	35,72	
MSv (mg) DAT 0	6	6,22	3,25	4,60	3,00	11,30	52,34	
MSv (mg) DAT 7	6	46,42	7,76	47,55	37,40	57,80	16,72	
MSv (mg) DAT 14	6	518,00	365,49	512,00	164,5	891,10	70,56	
RGR MSv 0-7	6	0,28	0,06	0,27	0,20	0,34	21,82	2,48
RGR MSv 0-14	6	0,29	0,09	0,29	0,21	0,38	30,69	2,39
Y MSv 0-7	6	39,25	7,34	40,75	28,50	46,50	18,71	
Y MSv 0-14		510,75	368,35	504,55	155,10	886,50	72,12	
BP (cm <sup>2</sup> ) DAT 0	6	0,59	0,06	0,60	0,50	0,68	10,58	
BP (cm <sup>2</sup> ) DAT 7	6	2,47	0,37	2,28	2,16	3,03	15,06	
BP (cm <sup>2</sup> ) DAT 14	6	10,54	2,03	9,59	8,64	13,67	19,26	
RGR BP 0-7	6	0,20	0,02	0,20	0,18	0,24	10,10	3,47
RGR BP 0-14	6	0,21	0,01	0,21	0,19	0,22	4,91	3,30
Y BP 0-7	6	1,88	0,35	1,67	1,61	2,35	18,77	
Y BP 0-14	6	9,94	1,99	9,07	8,04	13,03	19,99	

Na slici 5.16. su prikazane vrednosti RGR na osnovu BJ i MSv u kontroli i tretmanu sa HM. Vrednosti RGR, za oba parametra, u tretmanu sa HM predstavljaju vrednosti iz testova sa pojedinačnim supstancama i smešama, u prisustvu HM (tabela 5.6.), dok u kontroli, predstavljaju vrednosti za navedeni tretman samo iz testova sa HM. Nije zabeležena statistički značajna razlika između kontrole i tretmana sa HM ni za jedan od ispitivanih parametara što znači da nije bilo negativnog uticaja na rast biljaka u prisustvu HM u odnosu na kontrolu, tako da su rezultati pojedinačnih supstanci/smeša u prisustvu HM poređeni sa tretmanom sa HM. Minimalne statistički značajne razlike izražene kao procenat umanjjenja u odnosu na kontrolu (MSD, %), za parametar broj jedinki na osnovu relativne stope rasta, su bile niske i iznosile 9,33% (0-7) i 9,97% (0-14), što je ukazalo na visoku statističku snagu testa.



**Slika 5.16.** Uticaj huminskih materija (HM) na parametre rasta vrste *Lemna minor*. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti relativne stope rasta (RGR) na osnovu broja jedinki (BJ) i sveže mase (MSv) za 0-7 i 0-14 period testa. K – kontrola; K<sub>HM</sub> – dodatna kontrola sa HM, MSD – maksimalna statistički značajna razlika

### 5.3.1.2. Potencijal oporavka vrste *Lemna minor* od toksikološkog delovanja atrazina i 2,4 D, kao i njihovih a, u prisustvu i odsustvu huminskih materija

U tabeli 5.9. su prikazane vrednosti inhibicije rasta vrste *L. minor* u testu sa dvo-komponentnom smešom atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM. Inhibicija rasta je izračunata na osnovu RGR i Y za sve parametre rasta, i to za period ekspozicije (0-7 d) i kumulativno (period ekspozicije+period oporavka; 0-14 d). Vrednosti inhibicije rasta, za oba perioda testa, na osnovu primarnog parametra, BJ, su bile više u tretmanima smeša atrazina i 2,4 D u prisustvu HM u odnosu na vrednosti dobijene u odsustvu HM. To znači da HM utiče na herbicide u smeši na način da povećava njihovu toksičnost. Za period ekspozicije, za L, M i H tip smeše u odsustvu HM vrednosti inhibicije rasta iznose redom 32,85, 30,22 i 52,72%, odnosno u prisustvu HM 45,09, 52,19 i 75,54%. Kumulativne vrednosti, na osnovu istog parametra, u navedenim tretmanima smeša u prisustvu/odsustvu HM, su neznatno niže u odnosu na inhibitorne koncentracije tokom perioda ekspozicije. To ukazuje da u periodu oporavka nije došlo do značajnijeg smanjenja toksičnosti, nezavisno od prisustva HM.

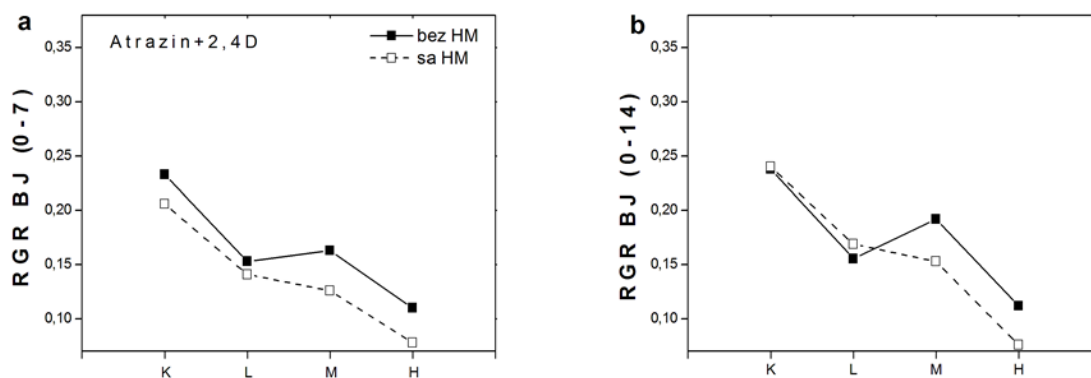
## 5. Rezultati i diskusija

**Tabela 5.9.** Inhibicija rasta vrste *Lemna minor* u testovima sa smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta i prinosa za parametre: broj jedniki, sveža masa i biljna površina za period testa 0-7 i 0-14

Tretman	Atrazin + 2,4D vs. K		Atrazin + 2,4D + HM vs. K <sub>HM</sub>	
	0-7	0-14	0-7	0-14
Inhibicija rasta (%)				
RGR BJ				
L	32,85	29,51	45,09	36,26
M	30,22	24,79	52,19	42,57
H	52,72	49,47	75,54	74,80
RGR MS <sub>v</sub>				
L	24,33	25,64	28,0	59,17
M	11,92	40,66	7,56	61,06
H	53,72	42,80	54,94	79,56
RGR BP				
L	45,03	35,88	26,97	42,40
M	44,0	37,15	47,73	41,79
H	61,63	46,32	69,0	59,20
Y BJ				
L	51,22	62,06	47,66	66,46
M	49,29	61,85	56,07	73,44
H	71,54	70,45	77,57	93,33
Y MS <sub>v</sub>				
L	37,78	55,0	47,66	66,46
M	26,56	86,23	56,07	73,44
H	68,02	72,92	77,57	93,33
Y BP				
L	64,37	68,55	40,02	75,04
M	59,61	68,77	63,09	72,99
H	76,63	76,47	74,82	84,40

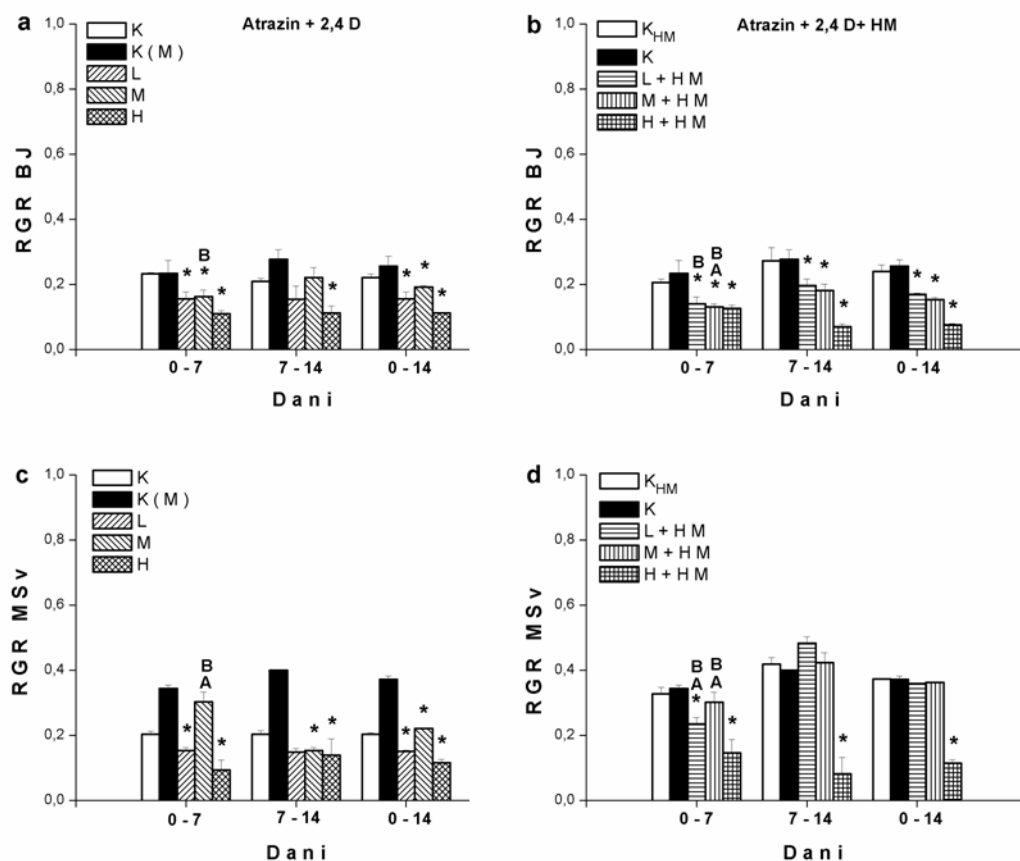
K – kontrola; K<sub>HM</sub> – dodatna kontrola sa HM; RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, BJ – broj jedinki, MS<sub>v</sub> – sveža masa, BP – biljna površina

Na slici 5.17 (a, b) su prikazane prosečne vrednosti RGR za glavni parametar BJ za 0-7 i 0-14 period testa nakon izloženosti vrste *L. minor* smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM. Povećanje toksičnosti, u prisustvu HM, nije bilo statistički značajno. Naime, analizom varijanse (t test, za nezavisne grupe) nije zabeležena statistički značajna razlika u vrednostima RGR na osnovu BJ za određeni test tretman u prisustvu u odnosu na isti tretman smeše u odsustvu HM.



**Slika 5.17.** Srednje vrednosti relativne stope rasta (RGR) vrste *Lemna minor*, na osnovu broja jednici (BJ), za periode 0-7 d (a) i 0-14 d (b) testa sa smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM)

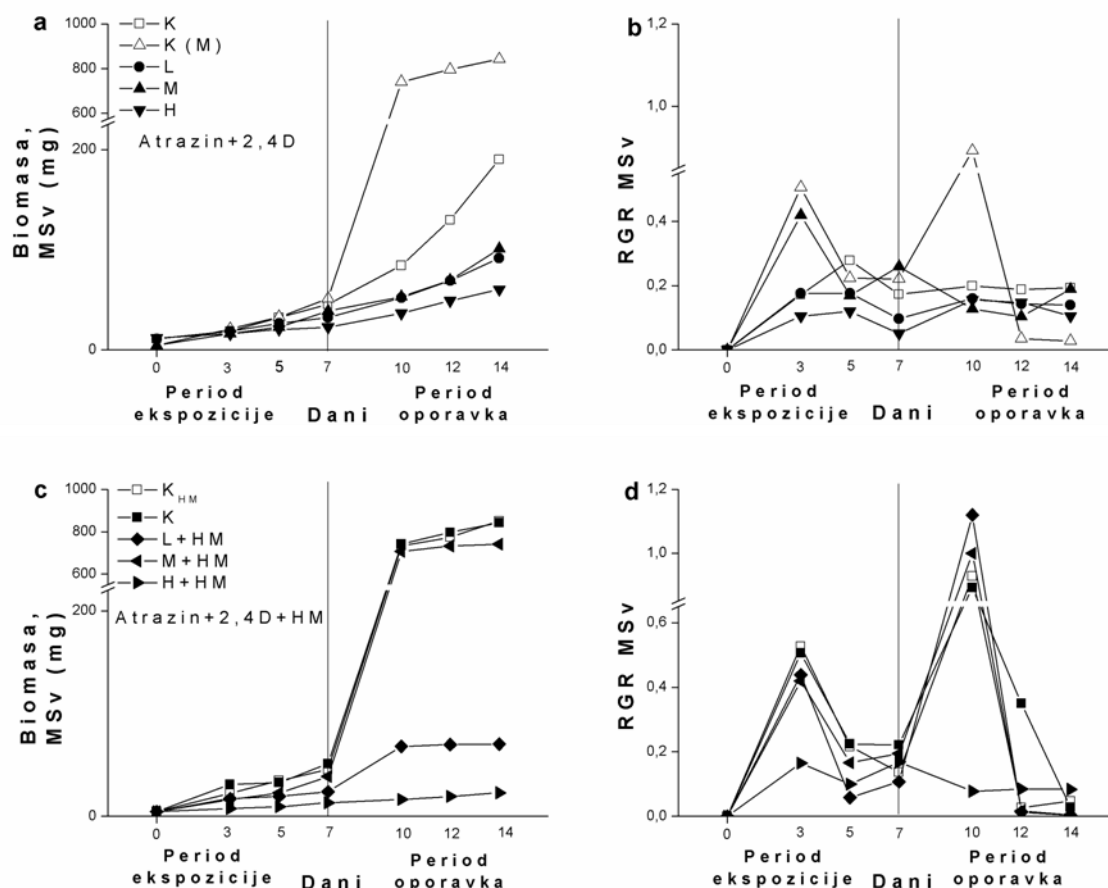
Na slici 5.18. su prikazane RGR na osnovu BJ (a, b) i MSv (c, d) vrste *Lemna minor* u testovima sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM. Vrednosti RGR su prikazane za različite vremenske intervale tokom perioda trajanja testa: 0-7 d, 7-14 d i 0-14 d. Statistički značajne razlike u visini RGR za 0-7 i 0-14 period testa, na osnovu BJ, su zabeležene tokom perioda ekspozicije između svih tipova smeše atrazina i 2,4 D, nezavisno od prisustva odnosno odsustva HM, i odgovarajuće kontrole. Do statistički značajne razlike u vrednostima posmatranih parametara u odnosu na kontrolu, u periodu oporavka, je došlo u H tipu dvo-komponentne smeše u odsustvu HM. U istom periodu posmatranja, statistički značajne razlike u vrednostima posmatranih parametara u odnosu na dodatnu kontrolu sa HM su zabeležene u svim tipovima dvo-komponentne smeše (L, M i H) u prisustvu HM. Ovakvi rezultati ukazuju na oporavak jedino nakon izloženosti L i M tipu smeše bez prisustva HM, dok u prisustvu HM nije zabeležen efektivan oporavak, nezavisno od primenjenih koncentracija herbicida u smeši.



**Slika 5.18.** Testovi inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Prikazane su srednje vrednosti relativne stope rasta (RGR), na osnovu broja jedinki (BJ) i sveže mase (MSV), tokom 0-7 d, 7-14 d i 0-14 d perioda testa, sa standardnom devijacijom. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovima su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama tokom različitih vremenskih intervala tokom testa: A - 0-7 vs. 7-14 d, B - 0-7 vs. 0-14 d (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ ). K – kontrola, K (M) – kontrola za M tretman, K<sub>HM</sub> – dodatna kontrola sa HM, L, M i H tip smeše – objašnjeno u poglavlju Materijal i metode

Dinamika rasta vrste *L. minor* tokom celokupnog perioda trajanja testa od 14 dana (period ekspozicije+period oporavka), iskazana preko biomase i RGR, na osnovu MSV, tokom testa sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM je prikazana na slici 5.19 (a-d). Krive rasta vrste *L. minor* u kontroli sa HM slede oblik kriva rasta biljaka u kontroli (slika 5.19 (c)). Povećanje finalne biomase u odnosu na početnu se beleži u svim tipovima dvo-komponentne smeše bez obzira na prisustvo odnosno odsustvo HM. Dodatno, veći porast biomase se beleži u L i H tipovima dvo-komponentne smeše bez prisustva HM u odnosu na one u kojima je HM prisutna, što nije slučaj i sa M tipom.

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.19.** Dinamika rasta vrste *Lemna minor* u testovima sa smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). RGR – relativna stopa rasta, MSv – sveža masa, K – kontrola, K(M) – kontrola za M tip smeše, K<sub>HM</sub> – kontrola sa HM, L, M i H tip smeše – objašnjeno u poglavlju Materijal i metode

Statistički značajna razlika tokom perioda oporavka ali i tokom poslednjeg intervala unutar perioda oporavka, nije zabeležena jedino u L i M tipu smeše bez prisustva HM (tabela 5.10.), što upućuje na efikasan oporavak biljne kulture nakon izloženosti tim tipovima smeše. Sa druge strane, činjenica da nije došlo do oporavka biljne kulture nakon izloženosti dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu HM, čak ni u L tipu smeše, ukazuje na negativan uticaj HM na toksičnost odabranih smeša.

**Tabela 5.10.** Test inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa u testovima smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta za parametar broj jedinki, za poslednji interval u okviru perioda oporavka, odnosno 12-14 d

Tretman	Inhibicija rasta (%)	
	RGR BJ <sub>12-14</sub>	
	Atrazin+2,4 D vs. K	Atrazin+2,4 D + HM vs. K <sub>HM</sub>
L	21,72	34,77*
M	26,64*	36,27*
H	44,96*	67,93*

Napomena: \* - tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). L, M i H tip smeše – objašnjeno u poglavlju Materijal i metode

### 5.3.1.2.1.

#### atrazina i 2,4 D, u prisustvu i odsustvu huminskih materija

Uticaj HM na toksičnost atrazina i 2,4 D, kao pojedinačnih supstanci, ispitan je dodatnim testovima na vrsti *L. minor*. Vrednosti inhibicije rasta u odnosu na K<sub>HM</sub>, na osnovu parametra BJ i MS<sub>v</sub>, za 0-7 d i 0-14 d period testa su prikazane u tabeli 5.11. Vrednosti inhibicije rasta, izračunate na osnovu RGR BJ za period ekspozicije, za L, M i H tip tretmana sa atrazinom u prisustvu HM iznose redom 18,08, 27,26 i 65,38%, dok za L i M tip tretmana sa 2,4 D u prisustvu HM 32,15 i 52,50%. Kumulativne vrednosti inhibicije, za 0-14 d period testa, za navedene tipove tretmana sa atrazinom na osnovu RGR BJ, su bile nešto niže i iznosile su 17,84, 25,22 i 44,19%. U slučaju 2,4 D, kumulativne vrednosti inhibicije rasta na osnovu istog parametra su veoma slične vrednostima nakon perioda ekspozicije.

**Tabela 5.11.** Test inhibicije rasta vrste *Lemna minor* sa atrazinom i 2,4 D, kao pojedinačnim supstancama, u prisustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na kontrolu sa HM (K<sub>HM</sub>), izračunate na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametre broj jedinki (BJ) i sveža masa (MS<sub>v</sub>), za period testa 0-7 d i 0-14 d

Tretman	Inhibicija rasta (%) vs. K <sub>HM</sub>			
	RGR BJ		RGR MS <sub>v</sub>	
	0-7	0-14	0-7	0-14
L Atrazin + HM	18,08	17,84	3,7	10,72
M Atrazin + HM	27,26	25,22	16,45	42,81
H Atrazin + HM	65,38	44,19	37,24	46,96
L 2,4 D + HM	32,15	35,02	22,57	23,30
M 2,4 D + HM	52,5	50,72	64,17	44,15



## 5. Rezultati i diskusija

Vrednosti inhibicije rasta vrste *L. minor* prikazane u tabeli 5.11. su korišćene za izračunavanje  $IC_{50}$  vrednosti za atrazin i 2,4 D u prisustvu HM (tabela 5.12.) logaritamskim modelom, a koje su korišćene za predviđanje efekta smeša atrazina i 2,4 D CA modelom u prisustvu/odsustvu HM (tabela 5.13.) (objašnjeno detaljnije u poglavlju Materijal i metode).

U prisustvu HM,  $IC_{50}$  vrednosti za oba herbicida, na osnovu RGR BJ<sub>0-7</sub>, su po pravilu niže u odnosu na vrednosti dobijene testom bez prisustva HM. Kumulativne  $IC_{50}$  vrednosti za atrazin su više od vrednosti nakon perioda ekspozicije, bez obzira na prisustvo HM, što znači da se toksičnost ovog herbicida smanjuje u periodu oporavka. U testu sa 2,4 D bez HM, toksičnost herbicida se povećala u periodu oporavka, jer su kumulativne  $IC_{50}$  vrednosti bile niže od  $IC_{50}$  vrednosti nakon perioda ekspozicije, dok je u prisustvu HM obrnuto (tabela 5.12.).

**Tabela 5.12.**  $IC_{50}$  vrednosti ( $\mu\text{g/l}$ ) za atrazin i 2,4 D u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM) određene logaritamskim modelom

Tretman	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/l}$ )			
	RGR BJ		RGR MSv	
	0-7	0-14	0-7	0-14
Atrazin	226,90	382,50	92,39	229,47
2,4 D	26987,90	11393,80	67841,71	43088,98
Atrazin + HM	166,52	322,50	106,50	204,69
2,4 D + HM	7433,57	7804,73	4925,46	11489,50

Napomena: RGR – relativna stopa rasta, BJ – broj jedinki, MSv – sveža masa

U tabeli 5.13. su prikazane predviđene vrednosti inhibicije rasta vrste *L. minor* u testovima sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM. Vrednosti inhibicije rasta tokom perioda ekspozicije u odsustvu HM su niže od vrednosti u prisustvu HM. Kumulativne vrednosti inhibicije rasta, nezavisno od prisustva HM su imale niže vrednosti od predviđene inhibicije nakon perioda ekspozicije, što je ukazalo na povećanje toksičnosti smeše tokom perioda oporavka.

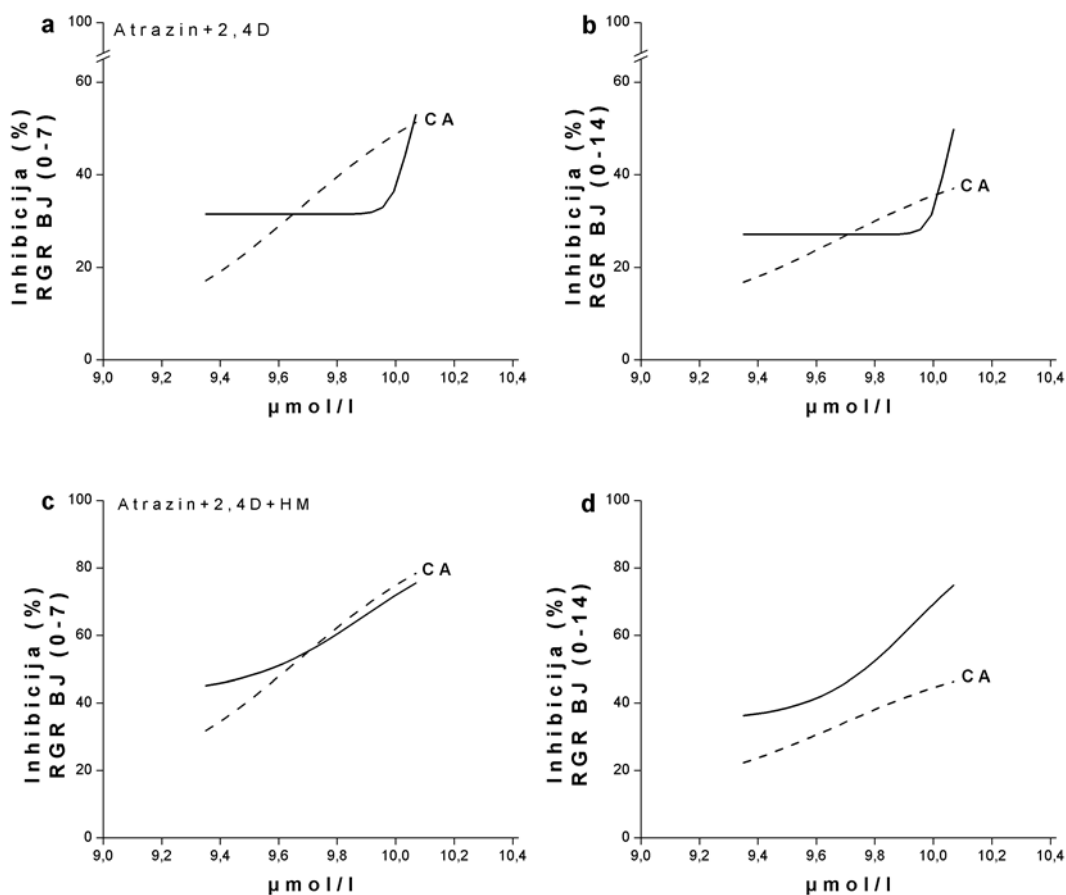
**Tabela 5.13.** Vrednosti inhibicije rasta (%) predviđene na osnovu CA modela. Vrednosti inhibicije rasta su određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametre broj jedinki (BJ) i sveža masa (MSv)

Tretman	Atrazin + 2,4 D vs. kontrola (K)		Atrazin + 2,4D + HM vs. kontrola sa HM (K <sub>HM</sub> )	
	0-7	0-14	0-7	0-14
	Inhibicija rasta (%)			
RGR BJ				
L	17,12	16,75	31,76	22,28
M	30,54	24,71	50,04	31,72
H	51,32	37,04	78,35	46,34
RGR MSv				
L	33,08	15,59	48,92	23,59
M	66,03	28,85	77,50	38,46
H	117,07	49,40	121,78	61,50

Predviđene i empirijski utvrđene krive dozne zavisnosti u testovima inhibicije rasta vrste *L. minor* sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM su prikazane na slikama 5.20. (broj jedniki) i 5.21. (sveža masa) za 0-7 i 0-14 d period testa.

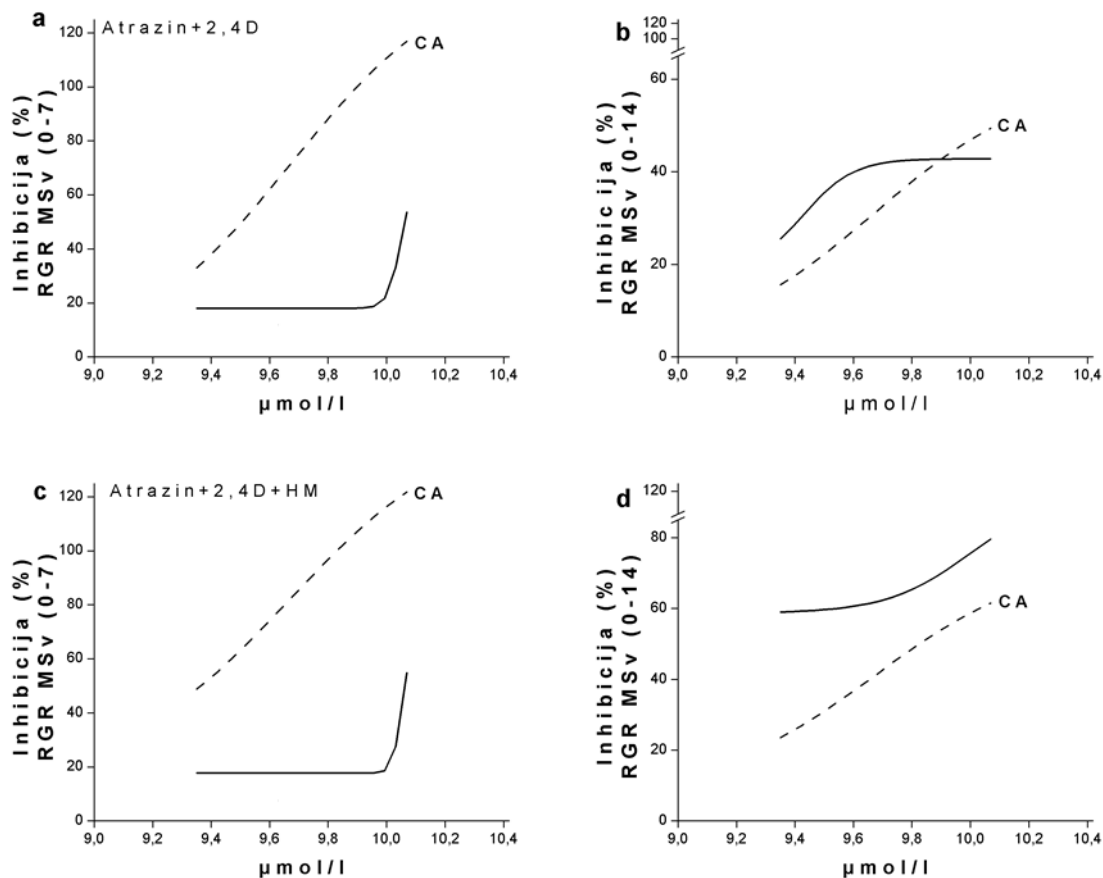
Predviđene i empirijski utvrđene IC<sub>50</sub> vrednosti, u testu inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM su prikazane u tabeli 5.14. Predviđena toksičnost ne odstupa od empirijski utvrđene, odnosno MDR vrednosti su kod svih tipova smeše, bez obzira na prisustvo HM, u opsegu 0,5-2,0.

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.20.** Predviđene i empirijski utvrđene krive dozne zavisnosti u testovima inhibicije rasta vrste *L. minor* sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM. Vrednosti empirijski utvrđene inhibicije rasta i inhibicije izračunate na osnovu modela adicije koncentracija (CA) određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar broj jedinki (BJ) za period testa 0-7 d (a i c) i 0-14 d (b i d). Dozna zavisnost je prikazana sigmoidalnim krivama: empirijski utvrđena toksičnost - puna linija, CA predviđena toksičnost – isprekidana linija.

## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.21.** Predviđene i empirijski utvrđene krive dozne zavisnosti u testovima inhibicije rasta vrste *L. minor* sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM Vrednosti empirijski utvrđene inhibicije rasta i inhibicije rasta izračunate na osnovu modela adicije koncentracija (CA) određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar sveža masa (MSv) za period testa 0-7 d (a i c) i 0-14 d (b i d). Dozna zavisnost je prikazana sigmoidalnim krivama: empirijski utvrđena toksičnost - puna linija, CA predviđena toksičnost - isprekidana linija

**Tabela 5.14.** Predviđene i empirijski utvrđene  $IC_{50}$  vrednosti, u testu inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor* sa dvo-komponentnim smešama atrazina i 2,4 D u prisustvu/odsustvu HM

Tretman	Atrazin + 2,4 D vs. K			Atrazin + 2,4 D + HM vs. $K_{HM}$		
	$IC_{50 CA}$	$IC_{50}$	MDR	$IC_{50 CA}$	$IC_{50}$	MDR
	0-7					
RGR BJ	2214,67	2221,05	0,997	2125,16	2098,85	1,013
RGR MS <sub>v</sub>	2096,11	2233,68	0,938	2068,01	2237,68	0,924
	0-14					
RGR BJ	2325,91	2249,51	1,045	2245,41	2131,64	1,053
RGR MS <sub>v</sub>	2223,76	2277,87	0,976	2172,62	2018,60	1,054

Napomena:  $IC_{50 CA}$  – inhibitorna koncentracija izračunata CA modelom,  $IC_{50}$  – inhibitorna koncentracija izračunata logaritamskim modelom, K – kontrola,  $K_{HM}$  - dodatna kontrola sa HM, RGR – relativna stopa rasta, BJ – broj jedinki, MS<sub>v</sub> – sveža masa

**5.3.2. Uticaj huminskih materija na potencijal oporavka vrste *Myriophyllum aquaticum* delovanja herbicida izoproturona i dikambe i njihovih**

**5.3.2.1. Uticaj huminskih materija na parametre rasta vrste *Myriophyllum aquaticum***

Vrednosti parametara rasta biljaka u kontroli sa huminskim materijama ( $K_{HM}$ ) u testovima sa izoproturonom i dikambom, kao pojedinačnim supstancama i njihovim smešama u prisustvu HM na vrsti *M. aquaticum* su prikazane u tabeli 5.15., sa ciljem testiranja rasta biljaka u prisustvu huminskih materija. Srednja vrednost relativne stope rasta za glavni parametar – dužina izdanka iznad sedimenta, RGR DS, je iznosila  $0,093 \pm 0,022$  u periodu 0-7 d i  $0,065 \pm 0,018$  u periodu 0-14 d. Koeficijent varijacije (CV), na osnovu RGR DS, je relativno nizak – ispod 30%. Varijabilnost ostalih parametara rasta (sveža i suva masa, ukupna dužina izdanka) je viša, a CV je u rasponu od 25,55 do 51,15%.

## 5. Rezultati i diskusija

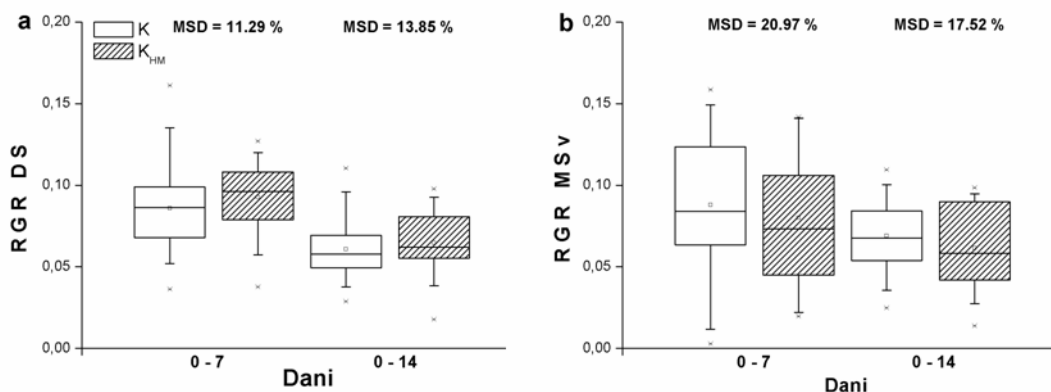
**Tabela 5.15.** Varijabilnost parametara rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* u tretmanima dupla kontrola u testovima sa pojedinačnim susptancama (izoproturon i dikamba) i njihovim dvo-komponentnim smešama u prisustvu huminskih materija (HM). Prikazani su: N – broj ponavljanja unutar tretmana, srednja vrednost, SD – standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost parametra, CV (%) – koeficijent varijacije unutar tretmana i T.d. – vreme dupliranja

Parametar	N	Sred. vred.	SD	Medijana	Min.	Max.	CV (%)	T.d. (dani)
DS (cm) DAT 0	27	5,80	1,04	5,40	4,40	8,50	17,90	
DS (cm) DAT 7	27	11,05	1,75	10,85	8,90	14,00	15,84	
DS (cm) DAT 14	27	14,61	3,79	12,80	8,60	21,00	25,94	
RGR DS 0-7	27	0,093	0,022	0,09	0,038	0,127	23,59	7,45
RGR DS 0-14	27	0,065	0,018	0,06	0,018	0,098	27,41	10,66
Y (cm) DS 0-7	27	5,25	1,46	4,70	2,11	7,80	27,80	
Y (cm) DS 0-14	27	8,81	3,47	7,40	1,90	14,40	39,38	
MSv (mg) DAT 0	27	410,00	110,00	410,00	230,00	680,00	27,29	
MSv (mg) DAT 7	27	740,00	160,00	720,00	490,00	1090,00	22,01	
MSv (mg) DAT 14	27	1070,00	300,00	1050,00	550,00	1650,00	28,06	
RGR MSv 0-7	27	0,080	0,039	0,07	0,020	0,142	48,42	8,66
RGR MSv 0-14	27	0,061	0,025	0,06	0,014	0,099	40,18	11,36
Y MSv (mg) 0-7	27	330,00	180,00	300,00	60,00	670,00	56,37	
Y MSv (mg) 0-14	27	660,00	330,00	620,00	100,00	1280,00	50,89	
MSu (mg) DAT 0	27	70,00	40,00	50,00	30,00	190,00	55,75	
MSu (mg) DAT 7	27	300,00	200,00	120,00	40,00	620,00	80,15	
MSu (mg) DAT 14	27	900,00	140,00	90,00	50,00	920,00	20,27	
RGR MSu 0-7	27	0,168	0,086	0,19	-0,027	0,290	51,15	4,13
RGR MSu 0-14	27	0,089	0,039	0,08	0,023	0,187	43,89	7,79
Y MSu (mg) 0-7	27	70,00	60,00	80,00	-30,00	260,00	81,30	
Y MSu (mg) 0-14	27	150,00	140,00	90,00	0,00	620,00	92,65	
DU (cm) DAT 0	27	8,99	0,92	8,80	7,80	11,90	10,26	
DU (cm) DAT	27	13,59	2,74	13,35	9,20	18,00	20,16	
DU (cm) DAT 14	27	17,97	3,38	18,00	11,10	22,70	18,81	
RGR DU 0-7	27	0,056	0,030	0,06	0,007	0,096	49,24	12,38
RGR DU 0-14	27	0,047	0,010	0,05	0,017	0,063	25,55	14,75
Y DU (cm) 0-7	27	4,35	2,89	4,55	-2,42	8,580	66,18	
Y DU (cm) 0-14	27	8,83	3,16	8,65	2,35	13,28	35,37	
MK (mg) DAT 7	27	10,00	10,00	10,00	4,00	30,00	48,87	
MK (mg) DAT 14	27	80,00	11,00	40,00	-80,00	400,00	134,26	

Na slici 5.22. su prikazane srednje vrednosti RGR na osnovu DS (a) i MSv (b) u kontroli (K) i kontroli sa huminskim materijama (K<sub>HM</sub>) u izvedenim testovima inhibicije rasta na vrsti *M. aquaticum*. Nisu zabeležene statistički značajne razlike u vrednostima RGR, za dužinu iznad sedimenta (DS) i svežu masu (MSv), u kontroli i tretmanu sa HM, stoga, kao i u

## 5. Rezultati i diskusija

testu sa *L. minor* rezultati pojedinačnih supstanci/smeša u prisustvu HM su poređeni sa tretmanom sa HM. Vrednosti MSD (%), za oba parametra u testu, ispod 25% su ukazale na visoku statističku snagu ovog testa.



**Slika 5.22.** Uticaj huminskih materija (HM) na osnovne parametre rasta vrste *Myriophyllum aquaticum*. Prikazane su srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, maksimalne i minimalne vrednosti relativne stope rasta (RGR) na osnovu dužine izdanka iznad sedimenta (BJ) (a) i sveže mase (MSv) (b) za 0-7 i 0-14 period testa. K – kontrola, K<sub>HM</sub> –kontrola sa HM, MSD – maksimalna statistički značajna razlika

### 5.3.2.2. Potencijal oporavka vrste *Myriophyllum aquaticum* delovanja izoproturona i dikambe, u prisustvu i odlustvu huminskih materija

Rezultati ranije sprovedenih (Tunić i sar. 2015) testova toksičnosti izoproturona i dikambe na vrsti *M. aquaticum* (Tabela 5.16.) su korišćeni kao polazna osnova za procenu uticaja HM na toksičnost i potencijal oporavka vrste *M. aquaticum*. U radu Tunić i sar. (2015) nije praćen oporavak pa su testovi sa izoproturonom i dikambom ponovljeni, sa napomenom da je, u ponovljenim testovima, oporavak praćen isključivo sa ciljem dobijanja kumulativnih IC<sub>50</sub> vrednosti, za navedene herbicide u prisustvu/odsustvu huminskih materija, koje su se, naknadno, koristile za predviđanje toksičnosti na osnovu modela adicije koncentracija (CA). Odabrana serija koncentracija za izoproturon i dikambu je prikazana u tabeli 4.9. u poglavlju Materijal i metode.



## 5. Rezultati i diskusija

**Tabela 5.16.** Srednje inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) izoproturona i dikambe u testovima inhibicije rasta na vrsti *Myriophyllum aquaticum* (iz Tunić i sar. (2015))

Supstanca	IC <sub>50 0-7</sub> (μg/l)									
	RGR DS	RGR MSv	RGR DU	RGR MSu	Y DS	Y MSv	Y DU	Y MSu	MK	Opseg IC <sub>50</sub> (μg/l)
Izoproturon	547,0 (260-740)	> 1000	> 1000	800,0 (180-980)	380,0 (260-610)	450,0 (230-890)	726,0	260,0 (160-690)	/	260, 0- > 1000,0
Dikamba	2240,0 (1680-3000)	3140,0 (2210-3170)	2055,0	2370,0 (970-2890)	1290,0 (850-1750)	2290,0 (1670-5560)	1440,0	1990,0 (800-2910)	520,0 (30-800)	520,0-3140,0

RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, DS – dužina izdanka iznad sedimenta, MSv – sveža masa, MSu – suva masa, MK – sveža masa korena

U tabeli 5.17. su prikazane vrednosti inhibicije rasta vrste *M. aquaticum*, na osnovu RGR i Y za dužinu izdanka iznad sedimenta, svežu i suhu masu, ukupnu dužinu izdanka, kao i vrednosti sveže mase korena, u testovima sa izoproturonom u prisustvu/odsustvu HM. Prikazane vrednosti inhibicije rasta, za nabrojane parametre, su iskazane za 0-7 i 0-14 d period testa. Relativna osetljivost različitih parametara se međusobno razlikuje. U testu sa izoproturonom bez prisustva HM, dužina izdanka iznad sedimenta se pokazala kao najmanje osetljiv parametar. Na osnovu RGR tokom celog testa, u svim tipovima tretmana (L, M i H) je došlo do stimulacije rasta. Suva masa je najosetljiviji parametar u testu sa vrednošću inhibicije rasta tokom perioda ekspozicije, od -82,26, 45,28 i 106,46% u L, M i H tipovima tretmana sa izoproturonom. Ipak, kumulativne inhibicije rasta za sve tipove tretmana (L, M i H) tokom celokupnog perioda trajanja testa, za navedeni parametar, beleže niže vrednosti. U prisustvu HM, vrednosti inhibicije rasta na osnovu RGR za glavni parametar su iznosile 4,76, 9,98 i 60,14% tokom perioda ekspozicije, odnosno -5,53, 12,76 i 44,98% za celokupan period trajanja testa.

**Tabela 5.17.** Test inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* sa izoproturonom u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta i prinosa za parametre: dužina izdanka iznad sedimenta, sveža masa, suva masa, ukupna dužina izdanka i sveža masa korena za period testa 0-7 i 0-14

Tretman	Izoproturon vs. K		Izoproturon + HM vs. K <sub>HM</sub>	
	0-7	0-14	0-7	0-14
	Inhibicija rasta (%)			
RGR DS				
L	-9,85	-10,50	4,76	-5,53
M	-17,11	-22,73	9,98	12,76
H	-5,72	-11,04	60,14*	44,98
RGR MS <sub>v</sub>				
L	-17,18	-3,52	-12,91	4,63
M	-10,39	-11,49	14,17	28,71
H	47,61*	5,09	60,22*	50,91*
RGR MS <sub>u</sub>				
L	-82,26*	9,98	24,08*	-2,37
M	45,28	-41,42	24,80*	21,76
H	106,46*	-7,51	53,99*	35,52*
RGR DU				
L	5,78	0,65	-23,28	-2,59
M	-1,29	-16,30	-13,21	-1,90
H	26,63	-16,77	33,66	29,32*
Y DS				
L	-14,19	-8,82	0,58	-11,69
M	-35,93	-28,90*	21,70	26,25
H	-7,06	-13,68	68,99*	55,17*
Y MS <sub>v</sub>				
L	-25,13	-5,06	-16,41	-1,91
M	-14,28	-17,93	21,47	32,94
H	45,43*	7,86	56,99*	73,25*
Y MS <sub>u</sub>				
L	-116,44*	71,88*	41,32*	19,23
M	47,28	51,29*	42,74*	49,89*
H	100,53*	65,31*	73,90*	62,55*
Y DU				
L	6,98	0,31	-29,60	-2,98
M	-1,07	-21,48	-15,92	-2,13
H	30,64	-21,89	38,31	36,81*
MK				

## 5. Rezultati i diskusija

---

L	-35,74	-79,94	-26,78	-4,43
M	-20,25	-18,55	-61,11	-3,46
H	54,04*	11,16	71,67*	12,65

K – kontrola; K<sub>HM</sub> – dodatna kontrola sa HM; RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, DS – dužina izdanka iznad sedimenta, MS<sub>v</sub> – sveža masa, MS<sub>u</sub> – suva masa, DU – ukupna dužina izdanka, MK – sveža masa korena. Napomena: \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u vrednosti RGR/Y/MK u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama u slučaju nejednakog ponavljanja u odgovarajućoj kontroli i tretmanima,  $p \leq 0,05$ )

Vrednosti inhibicije rasta vrste *M. aquaticum*, na osnovu RGR i Y za dužinu izdanka iznad sedimenta, svežu i suhu masu, ukupnu dužinu izdanka, kao i vrednosti sveže mase korena, u testu sa dikambom u prisustvu/odsustvu HM su prikazane u tabeli 5.18. Relativna osetljivost različitih parametara se međusobno razlikuje. Vrednosti inhibicije rasta na osnovu RGR za glavni parametar (DS) tokom perioda ekspozicije za L, M i H tipove tretmana bez prisustva HM iznose 14,38, 21,86 i 21,80%, odnosno u istim tipovima tretmana ali sa prisustvom HM 9,68, 31,42 i 54,35%. Vrednosti inhibicije rasta, za isti parametar, tokom celokupnog perioda trajanja testa za tretmane sa dikambom bez HM iznose -8,76, 15,44 i 41,97% tj. za tretmane sa dikambom+HM 10,55, 15,71 i 60,61%. Nešto više vrednosti inhibicije rasta se primećuju i na osnovu drugih parametara u tretmanima u kojima je HM prisutna u odnosu na iste tretmane ali bez prisustva HM.

**Tabela 5.18.** Test inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* sa dikambom u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta i prinosa za parametre: dužina izdanka iznad sedimenta, sveža masa, suva masa, ukupna dužina izdanka i sveža masa korena za period testa 0-7 i 0-14

Tretman	Dikamba		Dikamba + HM	
	vs. K		vs. K <sub>HM</sub>	
	0-7	0-14	0-7	0-14
Inhibicija rasta (%)				
RGR DS				
L	14,38	-8,76	9,68	10,55
M	21,86	15,44	31,42*	15,71
H	21,80	41,97*	54,35*	60,61*
RGR MS <sub>v</sub>				
L	21,02	4,13	23,61	-42,64*
M	24,85	26,15*	12,28	-6,11
H	49,26*	57,94*	59,01*	68,58*
RGR MS <sub>u</sub>				
L	31,45	3,03	10,15	1,22
M	-13,08	7,79	32,58*	26,66
H	20,82	34,94*	66,97*	73,66*
RGR DU				
L	10,95	1,84	4,72	28,21
M	20,46	25,51*	13,79	32,21*
H	29,13	46,22*	21,70	42,18*
Y DS				
L	20,39	-6,55	9,93	14,25
M	37,65*	26,60*	37,37*	23,77
H	20,0	54,13*	65,13*	72,51*
Y MS <sub>v</sub>				
L	32,14	5,75	22,12	-67,13*
M	29,73	36,79*	12,01	-5,62
H	55,97*	69,22*	56,11*	73,15*
Y MS <sub>u</sub>				
L	109,33	28,23	0,25	27,16
M	27,88	39,04	39,76	57,04*
H	57,32	73,20*	76,93	95,76*
Y DU				
L	33,19	25,57	8,21	33,90*
M	57,59	56,77	19,04	39,35*
H	52,64	72,0*	29,48	49,21*
MK				

## 5. Rezultati i diskusija

L	17,23	-11,15	19,08	94,18*
M	24,55	0,44	48,99*	94,65*
H	14,31	37,37*	45,60*	95,33*

K – kontrola;  $K_{HM}$  – dodatna kontrola sa HM; RGR – relativna stopa rasta, Y - prinos DS – dužina izdanka iznad sedimenta, MS<sub>v</sub> – sveža masa, MS<sub>u</sub> – suva masa, DU – ukupna dužina izdanka, MK – sveža masa korena. Napomena: \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u vrednosti RGR/Y/MK u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama u slučaju nejednakog ponavljanja u odgovarajućoj kontroli i tretmanima,  $p \leq 0,05$ )

### 5.3.2.3. Potencijal oporavka vrste *Myriophyllum aquaticum* delovanja a izoproturona i dikambe, u prisustvu i odlustvu huminskih materija

Vrednosti inhibicije rasta vrste *M. aquaticum*, na osnovu RGR i Y za dužinu izdanka iznad sedimenta, svežu i suhu masu, ukupnu dužinu izdanka, kao i vrednosti sveže mase korena, u testu sa smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu HM su prikazane u tabeli 5.19. Na osnovu prikazanih vrednosti inhibicije rasta uočava se sličan obrazac odgovora svih parametara rasta, ali se njihova relativna osetljivost međusobno razlikuje. Vrednosti inhibicije rasta, na osnovu RGR DS, tokom perioda ekspozicije za L, M i H tipove smeša bez prisustva HM iznose -3,91, 31,26 i 53,93%, odnosno u istim tipovima smeša ali u prisustvu HM 26,90, 37,32 i 73,32%. Vrednosti inhibicije rasta, za isti parametar, tokom celokupnog perioda trajanja testa za tipove smeše bez HM iznose 5,28, 26,96 i 48,69% tj. za tipove smeše sa HM 30,10, 43,27 i 71,89%. Inhibicije rasta izračunate na osnovu RGR MS<sub>v</sub>, za period ekspozicije, za L, M i H tip smeše u odsustvu HM iznosi redom 17,92, 30,75 i 69,89%, odnosno u prisustvu HM 28,23, 31,30 i 63,62%. Kumulativne vrednosti inhibicije rasta, na osnovu RGR za isti parametar, za L, M i H tip smeše iznosi -0,40, 28,70 i 48,69% (bez prisustva HM) i 21,70, 35,15 i 70,54% (uz prisustvo HM).

**Tabela 5.19.** Test inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* sa smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%), u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunate na osnovu relativne stope rasta i prinosa za parametre: dužina izdanka iznad sedimenta, sveža masa, suva masa, ukupna dužina izdanka i sveža masa korena za 0-7 i 0-14 period testa

Tretman	Izoproturon + dikamba vs. K		Izoproturon + dikamba + HM vs. K <sub>HM</sub>	
	0-7	0-14	0-7	0-14
	Inhibicija rasta (%)			
RGR DS				
L	-3,91	5,28	26,90*	30,10*
M	31,26*	26,96*	37,32*	43,27*
H	53,93*	48,69*	73,32*	71,89*
RGR MS <sub>v</sub>				
L	17,92	-0,40	28,23	21,70*
M	30,75	28,70*	31,30*	35,15*
H	69,89*	48,69*	63,62*	70,54*
RGR MS <sub>u</sub>				
L	52,69	-4,22	71,61*	-30,25
M	61,79	30,32	75,34*	-28,54
H	111,13*	47,77*	86,52*	7,25
RGR DU				
L	4,48	-4,22	12,97	38,50*
M	18,78*	13,99	11,89	37,46*
H	72,25*	39,90*	61,32*	65,52*
Y DS				
L	-6,70	-23,48	46,04*	46,34*
M	34,98*	12,47*	44,01*	54,57*
H	60,45*	45,49*	78,45*	80,62*
Y MS <sub>v</sub>				
L	25,94	-0,40	36,01*	35,92*
M	40,10*	28,70*	38,24*	52,88*
H	73,90*	42,90*	71,60*	83,09*
Y MS <sub>u</sub>				
L	63,62	-1,39	67,99*	-33,70
M	66,71	38,01	89,10*	-32,80
H	99,69	53,51*	86,34*	32,09
Y DU				
L	6,92	-48,16	36,46	64,47*
M	24,84*	-11,04	28,20	61,66*
H	78,49*	28,92*	87,33	85,20*
MK				

## 5. Rezultati i diskusija

---

L	1,59	1,27	-1,4	-19,57
M	36,68*	13,82	11,98	29,07
H	89,15*	43,02*	77,80*	83,30*

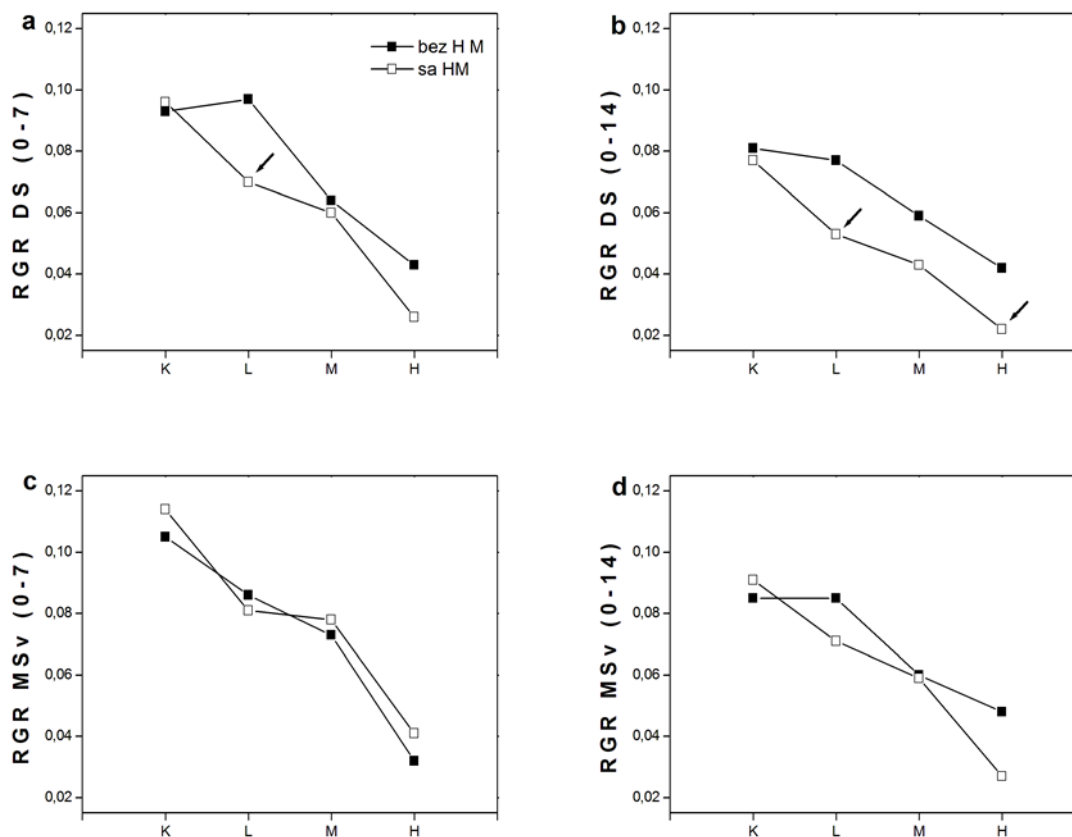
---

K – kontrola; K<sub>HM</sub> – dodatna kontrola sa HM; RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, DS – dužina izdanka iznad sedimenta, MS<sub>v</sub> – sveža masa, MS<sub>u</sub> – suva masa, DU – ukupna dužina izdanka, MK – sveža masa korena. Napomena: \* tretmani kod kojih je došlo do statistički značajne razlike u vrednosti RGR/Y/MK u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA i t-test sa Bonferonijevim adaptacijama u slučaju nejednakog ponavljanja u odgovarajućoj kontroli i tretmanima,  $p \leq 0,05$ )



## 5. Rezultati i diskusija

Vrednosti RGR DS u L tipu smeše bez HM tokom perioda ekspozicije i u L i H tipovima smeše bez HM tokom celokupnog perioda trajanja testa statistički značajno se razlikuju od vrednosti u istim tipovima smeše sa prisustvom HM, dok na osnovu RGR vrednosti za parametar MSv nema statistički značajne razlike između tipova smeše sa i bez HM (slika 5.23.).



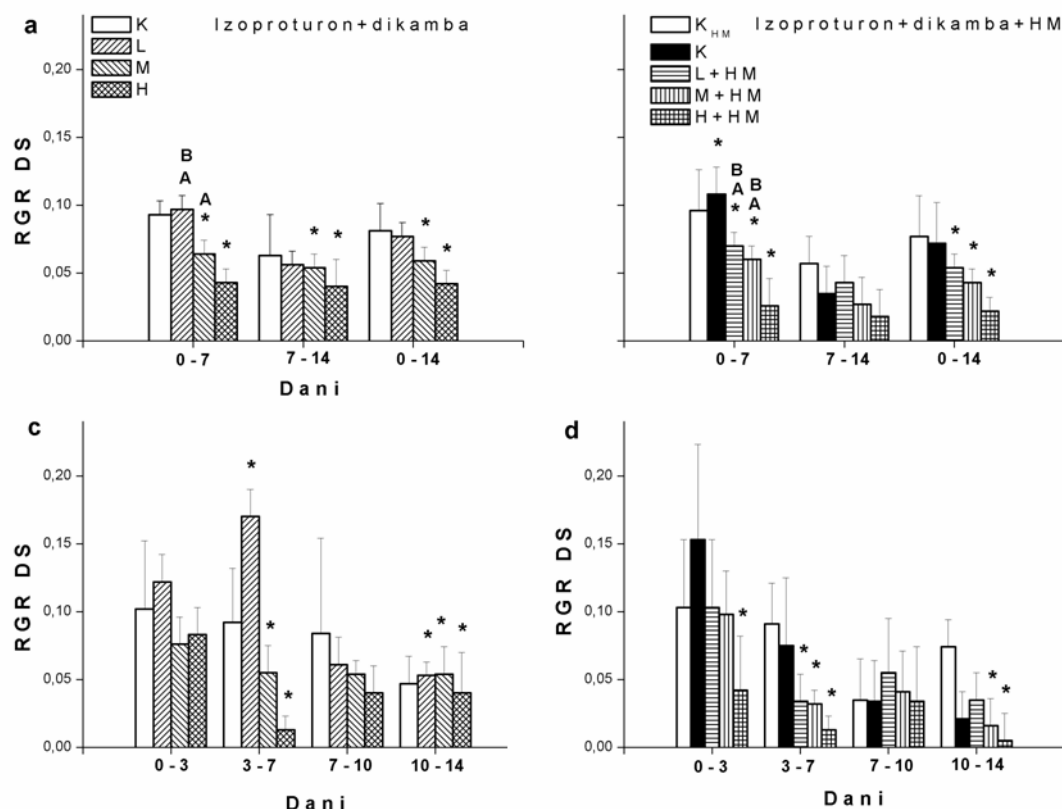
**Slika 5.23.** Srednje vrednosti relativne stopa rasta (RGR), na osnovu dužine izdanka iznad sedimenta (DS) (a i b) i sveže mase (MSv) (c i d), za 0-7 d (a i c) i 0-14 d (b i d) perioda testa inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* sa dvo-komponentnim smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Strelicama su obeleženi tipovi smeše sa HM u kojima je došlo do statistički značajne razlike u vrednostima posmatranog parametra u odnosu na isti tip smeše bez prisustva HM (dvo-faktorska ANOVA, post-hoc Unequal N HSD test,  $p \leq 0,05$ )

Glavni parametar predložen standardom – dužina izdanka iznad sedimenta (DS) je meren pet puta ukupno tokom testa na vrsti *M. aquaticum* odnosno tri puta tokom perioda ekspozicije (DAT 0, DAT 3 i DAT 7) i dva puta tokom perioda oporavka (DAT 10 i DAT 14), što je omogućilo da se vrednosti RGR za navedeni parametar iskažu u nekoliko različitih intervala: 0-3 d, 3-7 d, 7-10 d, 10-14 d, kao i 0-7 d, 7-14 d, i na kraju 0-14 d.

Do statistički značajne razlike u vrednostima RGR DS u odnosu na kontrolu, tokom 0-7 d i 0-14 d perioda testa, je došlo u M i H tipu smeše bez prisustva HM (slika 5.24 (a)). U

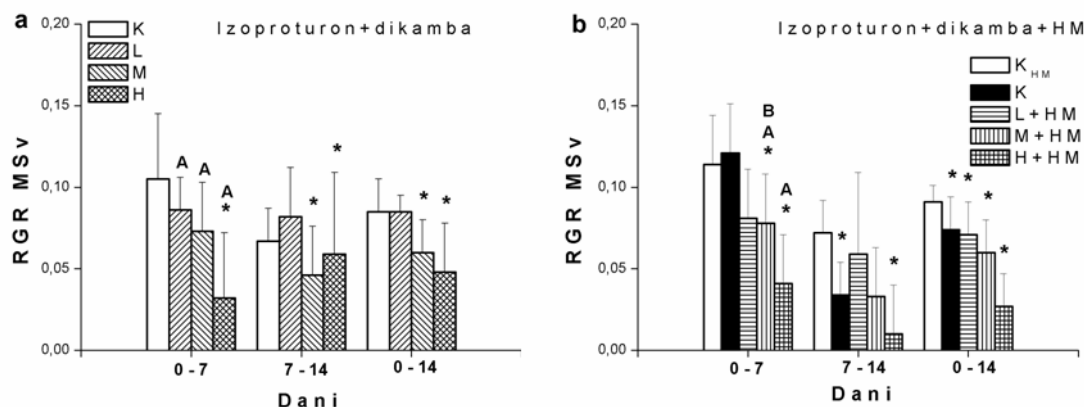
prisustvu HM, statistički značajan pad vrednosti u odnosu na odgovarajuću dodatnu kontrolu sa HM ( $K_{HM}$ ), se beleži u svim tipovima smeše tokom oba perioda testa (slika 5.24 (b)).

Statistički značajne razlike u visini RGR posmatranog parametra tokom prvog perioda posmatranja (0-3), odnosno do trećeg dana ekspozicije, su zabeležene jedino između odgovarajuće kontrole i H tipu smeše u prisustvu HM. Međutim, tokom poslednjeg intervala u okviru perioda ekspozicije (3-7) do statistički značajno niže vrednosti RGR DS, u odnosu na odgovarajuću kontrolu je došlo u M i H tipovima smeše bez prisustva HM i svim tipovima smeše sa prisustvom HM. Sa druge strane, tokom istog intervala posmatranja, statistički više vrednosti RGR DS u odnosu na kontrolu su izmerene u L tipu smeše bez prisustva HM. Već tokom prvog intervala perioda oporavka (7-10) vrednosti RGR DS u kontroli i test tretmanima se međusobno ne razlikuju, bez obzira na prisustvo HM. Dodatno, tokom poslednjeg intervala posmatranja tj. od 10 do 14 dana testa statistički značajno više vrednosti posmatranog parametra, u odnosu na kontrolu, su primećene u L i M tipu smeše bez prisustva HM. Ipak, statistički značajno niže vrednosti posmatranog parametra, tokom poslednjeg intervala posmatranja unutar testa, su zabeležene u H tipu smeše bez prisustva HM i M i H tipovima smeše sa prisustvom HM (slika 5.24.)



**Slika 5.24.** Testovi inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* sa dvo-komponentnim smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Prikazane su srednje vrednosti relativne stope rasta (RGR) sa standardnom devijacijom, na osnovu dužine izdanka iznad sedimenta (DS), tokom 0-7, 7-14 i 0-14 d (a, b) i 0-3, 3-7, 7-10 i 10-14 dana testa (c, d). Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama unutar tretmana tokom različitih vremenskih intervala tokom testa: A - 0-7 vs. 7-14 d, B - 0-7 vs. 0-14 d (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ )

Na slici 5.25 su prikazane relativne stope rasta vrste *M. aquaticum* na osnovu sveže mase u testovima sa dvo-komponentnim smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti RGR su prikazane za različite vremenske intervale tokom perioda trajanja testa: 0-7 d, 7-14 d i 0-14 d. Tokom perioda ekspozicije, statistički značajno smanjenje vrednosti RGR u kontroli i test tretmanima smeša je zabeleženo u H tipu smeše, bez HM, i M i H tipovima smeše, sa HM. Na osnovu iskazanih rezultata samo za period oporavka, statistički značajna razlika je zabeležena u M i H tipovima smeše, bez prisustva HM, odnosno samo u H tipu smeše, sa prisustvom HM.



**Slika 5.25.** Testovi inhibicije rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* sa dvo-komponentnim smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Prikazane su srednje vrednosti relativne stope rasta (RGR) sa standardnom devijacijom, na osnovu sveže mase (MSv), tokom 0-7, 7-14 i 0-14 dana testa. Zvezdicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jednosmerna ANOVA, post-hoc Dunnett-ov test,  $p \leq 0,05$ ). Slovicama su označeni tretmani sa statistički značajnim promenama tokom različitih vremenskih intervala tokom testa: A - 0-7 vs. 7-14, B - 0-7 vs. 0-14 (jednosmerna ANOVA, post-hoc Fischer-ov test,  $p \leq 0,05$ )

Zastupljenost podataka o uticaju prirodne organske materije (POM) na toksičnost organskih supstanci je manja u slobodnoj literaturi u odnosu na podatke o uticaju POM na toksičnost drugih zagađujućih supstanci kao što su npr. metali. Ipak, većinski se smatra da POM utiče na organske zagađujuće supstance tako što smanjuju njihovu toksičnost, dok tek u 25% slučajeva se beleži porast toksičnosti usled prisustva POM, i to najčešće pri nižim koncentracijama POM (Heitzer i sar. 1998).

Toksičnost atrazina i 2,4 D, kao pojedinačnih supstanci, u testu sa *L. minor* je veća u prisustvu HM. Slično tome, u prisustvu HM je zabeležena i veća toksičnost njihove smeše. Međutim, povećanje toksičnosti u tretmanu smeša u prisustvu HM nije bilo statistički značajno. Efikasan oporavak biljne kulture je zabeležen usled izloženosti L i M tipovima smeše bez prisustva HM, dok nakon izloženosti smešama u prisustvu HM nije došlo do oporavka ni u jednom od tipova smeše, što ukazuje na negativan uticaj HM.

U testu sa *M. aquaticum*, u slučaju dikambe, kao pojedinačne supstance, je zabeležena nešto viša toksičnost u prisustvu HM. Sa druge strane, u slučaju izoproturona, kao pojedinačne supstance, efekat HM je takav da smanjuje toksičnost ovog herbicida. Slično je zabeleženo i u slučaju smeše izoproturona i dikambe u testu na *M. aquaticum*, međutim, navedeno smanjenje toksičnosti nije bilo statistički značajno. Oporavak biljne kulture je zavisio od koncentracija test supstanci u smešama. Na osnovu prikazanih rezultata samo za period oporavka, oporavak je zabeležen kod L i M tipova smeše sa HM, i samo kod L tipa smeše bez HM.

Prema Nikilla i sar. (2001) biodostupnost atrazina je ispitivana u standardnom sintetičkom medijumu i u različitim uzorcima vode gde je sadržaj HM bio od 0,04 do 21,4 mg/l. U testovima na *Daphnia magna* i perifitonskoj zajednici autori nisu zabeležili bilo kakav uticaj HM na toksiko-kinetičke procese usvajanja i apsorpcije ovog herbicida, a

samim tim posledično ni na toksičnost. U testu na *Ceriodaphnia cf. dubia*, gde je kao diluent korišćen uzorak rečne vode sa ukupnim sadržajem organskog ugljenika (TOC) u rasponu 6-8 mg/l, Phyu i sar. (2013) su naveli smanjenje toksičnosti atrazina, ali i permetrina, koji pripada grupi insekticida. Međutim, smanjenje toksičnosti nije bilo statistički značajno u poređenju sa zabeleženom toksičnošću pesticida u standardnom sintetičkom medijumu. U literaturi ne postoje podaci koje ukazuju na ponašanje ostalih herbicida (izoproturon, dikamba i 2,4 D) u prisustvu HM u ekotoksikološkim testovima, što je onemogućilo poređenje dobijenih rezultata sa drugim podacima iz literature.

Smanjenje toksičnosti pojedinih organskih pesticida se objašnjava smanjenjem biodostupnosti tog pesticida formiranjem kompleksa sa HM, dok, za sada, ne postoji tačan mehanizam kojim se objašnjava povećano toksično dejstvo pesticida uslovljeno prisustvom HM (Heitzer i sar. 1998). Huminske materije zbog svoje polidisperzione prirode, prisustva različitih reaktivnih funkcionalnih grupa, hidrofilnih i hidrofobnih mesta u njihovoj molekularnoj strukturi mogu stupati u različite vidove interakcija sa organskim pesticidima (Senesi 1992). Sorpcija je možda i najzastupljeniji vid njihove međusobne interakcije. Jačina veze između HM i pesticida može da varira od slabih, delimično reverzibilnih gde se pesticid lako desorbuje, do jakih, ireverzibilnih veza (Senesi i Chen 1989; Senesi 1992). Sorpcija zavisi od brojnih karakteristika pesticida i HM, kao što su npr. veličina i oblik molekula, molekularna struktura, rastvorljivost, polarnost, polarizabilnost (Senesi 1992). Različitim katalitičkim reakcijama hidrolize i dealkilacije, kao i foto-degradacijom (ili fotolizom) mogu nastati proizvodi degradacije HM koji često imaju drugačija svojstva, uključujući i toksikološka, u odnosu na polazna jedinjenja. Neretko dolazi do interakcija između nastalih proizvoda degradacije i organskih pesticida (Senesi 1992). Potencijalno objašnjenje za uticaj HM na povećanje toksičnosti pojedinačnih supstanci/smeša, zabeležen u pojedinim testovima na vrstama *L. minor* i *M. aquaticum*, u ovoj disertaciji, se može naći u formiranju degradabilnih proizvoda koji mogu biti toksičniji od HM, kao polaznog jedinjenja i interakcijama takvih proizvoda degradacije sa herbicidima. Degradabilni proizvodi u laboratorijskim uslovima mogu nastati reakcijama fotolize usled višednevnog osvetljenja, koje je u testu sa *L. minor* konstantno, a u testu sa *M. aquaticum* periodično.

Eksperimentalna postavka testova na akvatičnim makrofitama, u ovoj disertaciji, ne omogućava detaljnu analizu mehanizama kojima bi se objasnio uticaj HM na ispoljavanje toksičnog delovanja izabranih pojedinačnih herbicida i njihovih smeša.

Testovi su izvođeni sa ciljem sagledavanje potencijalnih razlika u toksičnosti izabranih pojedinačnih herbicida/njihovih smeša, uslovljenu prisustvom HM, čime se dobio odgovor na pitanje da li standardni testovi toksičnosti potcenjuju ili precenjuju stvaran rizik od pesticida. U standardnim testovima toksičnosti, rastvori koji se koriste kao diluenti za pravljenje serija razblaženja su protokolima definisani i sadrže mikro- i makro-elemente neophodne za optimalan rast i razvoj biljne kulture. Da bi se ispitaio uticaj POM, koja je u testovima simulirana u vidu HM, u standardni rastvor je dodata HM pri koncentraciji inače prisutnoj u životnoj sredini. Poređenjem RGR, na osnovu različitih parametara, određenog test tretmana u prisustvu u odnosu na isti tretman u odsustvu HM dobijeni su rezultati koji su pokazali da iako određene razlike u toksičnosti između ispitivanih test tretmana u prisustvu i odsustvu HM postoje, one nisu bile statistički značajne.

Ispitivanja, u okviru ove disertacije, su sprovedena sa komercijalnom huminskom kiselinom, što ima svojih prednosti jer izolacija huminskih materija iz životne sredine i kasnije njena upotreba u testovima je metodološki zahtevna. Sa druge strane, u komercijalnim rastvorima HM čini skoro 100% rastvorenog organskog ugljenika (DOC), dok je njen sadržaj u uzorcima vode iz životne sredine manji i kreće se u rasponu od 50 do 75% (Heitzer i sar. 1998), tako da treba biti posebno obazriv prilikom tumačenja rezultata dobijenih iz testova sa komercijalnom HM i ekstrapolacije takvih rezultata na realne ekosisteme.

### 5.3.2.3.1.

#### herbicida izoproturona i dikambe, u prisustvu i odsustvu huminskih materija

Vrednosti inhibicije rasta vrste *M. aquaticum*, prikazane u tabelama 5.17. (izoproturon) i 5.18. (dikamba) su korišćene za izračunavanje  $IC_{50}$  vrednosti za oba herbicida u prisustvu/odsustvu HM (Tabela 5.20), logaritamskom metodom (za detalje pogledati poglavlje Materijal i metode). Izračunate  $IC_{50}$  vrednosti su korišćene za predviđanje (CA model), efekta smeša izoproturona i dikambe, u prisustvu/odsustvu HM (tabela 5.21).

Vrednosti  $IC_{50}$  ni za jednu pojedinačnu supstancu u odsustvu HM nije bilo moguće izračunati na osnovu glavnog parametra – RGR DS, jer su u oba perioda testa, 0-7 d i 0-14 d, prevazilazile naviše primenjene koncentracije. Iz tog razloga su  $IC_{50}$  vrednosti određene na osnovu drugog parametra u testu – sveže mase i one iznose 202,48  $\mu\text{g/l}$  (izoproturon) i 5740,15  $\mu\text{g/l}$  (dikamba). Kumulativne vrednosti  $IC_{50}$  u slučaju izoproturona su više, dok u slučaju dikambe niže u odnosu na vrednosti koje su izračunate za period ekspozicije.

U prisustvu HM,  $IC_{50}$  vrednosti za obe pojedinačne supstance su određene na osnovu RGR za oba parametra (DS i MSv), za 0-7 d i 0-14 d period testa. U tretmanu izoproturon+HM  $IC_{50}$  0-7 vrednosti su bile 404,29  $\mu\text{g/l}$  (RGR DS) i 374,08  $\mu\text{g/l}$  (RGR MSv), a za tretman dikamba+HM 2088,62  $\mu\text{g/l}$  (RGR DS) i 4513,33  $\mu\text{g/l}$  (RGR MSv). Kumulativne vrednosti  $IC_{50}$  u slučaju tretmana sa izoproturonom+HM su više u odnosu na vrednosti koje su izračunate za period ekspozicije ( $IC_{50 \text{ RGR DS}} = 720,62 \mu\text{g/l}$ ,  $IC_{50 \text{ RGR MSv}} = 468,22 \mu\text{g/l}$ ). U tretmanu dikamba+HM zabeležene su više kumulativne vrednosti  $IC_{50}$  na osnovu RGR DS ( $IC_{50} = 2486,49 \mu\text{g/l}$ ), odnosno niže kumulativne vrednosti na osnovu RGR MSv ( $IC_{50} = 2069,38 \mu\text{g/l}$ ) u poređenju sa vrednostima koju su iskazane samo za period ekspozicije.

**Tabela 5.20.** IC<sub>50</sub> vrednosti (µg/l) za izoproturon i dikambu u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM) određene logaritamskim modelom

Tretman	IC <sub>50</sub> (µg/l)			
	RGR DS		RGR MS <sub>v</sub>	
	0-7	0-14	0-7	0-14
Izoproturon	/	/	202,48	257858,33
Dikamba	/	/	5740,15	1966,22
Izoproturon + HM	404,29	720,62	374,08	468,22
Dikamba + HM	2088,62	2486,49	4513,55	2069,38

Prikazane IC<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih supstanci (izoproturon i dikamba), na osnovu oba parametra, u tabeli 5.20. su korišćene za predviđanje efekata smeša primenom modela adicije koncentracija (CA) u testovima na *M. aquaticum*. IC<sub>50</sub> vrednosti su iskazane za 0-7 i 0-14 period testa.

U tabeli 5.21. su prikazane CA predviđene vrednosti inhibicije rasta vrste *M. aquaticum* u testovima sa dvo-komponentnim smešama izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu HM. U prisustvu HM, IC<sub>50</sub> vrednosti, na osnovu RGR DS, su iznosile 6,45, 30,09 i 121,27% za 0-7 d period testa, a 4,18, 21,87 i 89,11% za 0-14 d period testa.

CA predviđene vrednosti inhibicije rasta na osnovu dodatnog parametra MS<sub>v</sub>, tokom perioda ekspozicije za L, M i H tipove smeše u odsustvu HM iznose redom 9,62, 30,88 i 154,59%, dok za iste tretmane u prisustvu HM iznose redom 5,74, 21,47 i 97,93%. U odsustvu HM kumulativne vrednosti inhibicije rasta, na osnovu RGR MS<sub>v</sub>, iznose redom 2,13 (L), 19,02 (M) i 57,07% (H tip smeše), dok u slučaju smeša sa prisustvom HM njihove vrednosti iznose redom 5,86 (L), 28,59 (M) i 112,54% (H tip smeše).

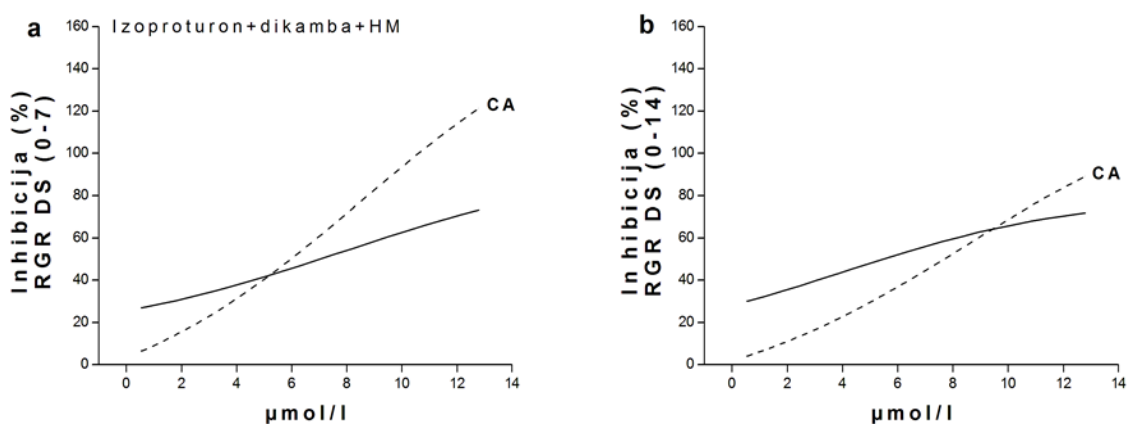
**Tabela 5.21.** Predviđen efekat dvo-komponentnih smeša izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta (%) vrste *Myriophyllum aquaticum* su predviđene na osnovu modela adicije koncentracija (CA) na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametre dužina iznad sedimenta (DS) i sveža masa (MS<sub>v</sub>), za period testa 0-7 i 0-14

Tretman	Izoproturon + dikamba		Izoproturon + dikamba + HM	
	vs. kontrola		vs. kontrola sa HM (K <sub>HM</sub> )	
	0-7	0-14	0-7	0-14
RGR BJ				
L	/	/	6,45	4,18
M	/	/	30,09	21,87
H	/	/	121,27	89,11
RGR MS <sub>v</sub>				
L	9,62	2,13	5,74	5,86
M	30,88	19,02	21,47	28,59
H	154,59	57,07	97,93	112,54

## 5. Rezultati i diskusija

U slučaju dvo-komponentnih smeša sa izoproturonom i dikambom u prisustvu HM, predviđene (CA model) i empirijski utvrđene krive dozne zavisnosti vrste *M. aquaticum* su prikazane na osnovu oba parametra (RGR DS i RGR MSv) (slike 5.26. (a, b) i 5.27. (c, d)). Krive dozne zavisnosti navedene biljne kulture u testovima inhibicije rasta sa dvo-komponentnim smeša izoproturona i dikambe, ali bez prisustva HM, su prikazane jedino za parameter sveža masa (slika 5.27. (a, b)).

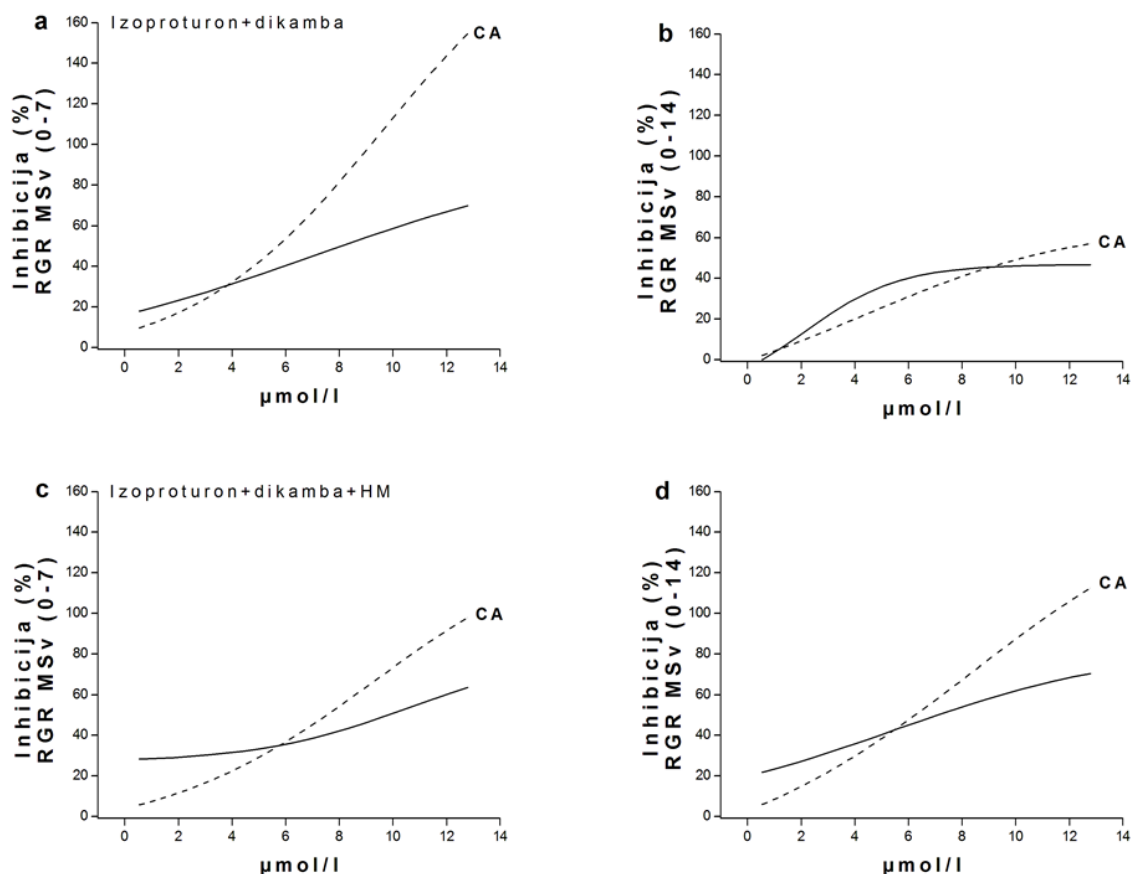
Predviđene i empirijski utvrđene  $IC_{50}$  vrednosti, za dvo-komponentne smeše izoproturona i dikambe u prisustvu/odsustvu HM su prikazane u tabeli 5.22. Odstupanja od aditivnosti izračunata pomoću modela odstupanja (tzv. MDR). Empirijski utvrđena toksičnost, na osnovu MSv, je u saglasnosti sa CA predviđenom toksičnošću jer se MDR vrednosti za sve tretmane, bez obzira na prisustvo HM, nalaze u opsegu 0,5-2,0.



**Slika 5.26.** Predviđen vs. empirijski utvrđen efekat dvo-komponentnih smeša izoproturona i dikambe u prisustvu huminskih materija (HM). Inhibicije rasta određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar dužina iznad sedimenta (DS) za period testa 0-7 d (a) i 0-14 d (b); empirijski utvrđena toksičnost – puna linija, toksičnost na osnovu CA modela – isprekidana linija



## 5. Rezultati i diskusija



**Slika 5.27.** Predviđen vs. empirijski utvrđen efekat dvo-komponentne smeše izoproturona i dikambe u prisustvu (c, d) / odsustvu (a, b) huminskih materija (HM). Vrednosti inhibicije rasta određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametar sveža masa (MSv) za period testa 0-7 d (a, c) i 0-14 d (b, d); empirijski utvrđena toksičnost – puna linija, toksičnost na osnovu CA modela – isprekidana linija

**Tabela 5.22.** Predviđen vs. empirijski utvrđen efekat dvo-komponentnih smeša izoproturona i dikambe u prisustvu huminskih materija (HM).  $IC_{50}$  vrednosti ( $\mu\text{g/l}$ ), određene na osnovu relativne stope rasta (RGR) za parametre dužina izdanka iznad sedimenta (DS) i sveža masa (MSv).  $IC_{50}$  vrednosti su određene logaritamskim modelom

Tretman	Izoproturon + dikamba vs. K			Izoproturon + dikamba + HM vs. $K_{HM}$		
Parametar	$IC_{50 CA}$	$IC_{50}$	MDR	$IC_{50 CA}$	$IC_{50}$	MDR
0-7						
RGR DS	/	/	/	479,94	885,33	0,54
RGR MSv	460,33	1287,62	0,36	889,13	1565,16	0,57
0-14						
RGR DS	/	/	/	1039,12	742,72	1,40
RGR MSv	2777,37	3146,38	0,88	676,46	1096,10	0,62

## 5. Rezultati i diskusija

Efekat smeše atrazina i 2,4 D se, nezavisno od prisustva HM, može okarakterisati kao aditivan iako u njen sastav ulaze supstance različite po mehanizmu delovanja. Potvrđen je visok stepen usaglašenosti između empirijske i predviđene toksičnosti jer su MDR vrednosti bile u opsegu od 0,5 do 2. Ponovo, kao i slučaju sa dvo-komponentnom smešom sa atrazinom i 2,4 D u testu sa *L. minor* tako i u testu sa *M. aquaticum*, smeša sa izoproturonom i dikambom je pokazala aditivni efekat, nezavisno od prisustva HM u smeši.

## 6

Rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da je modifikacijom laboratorijskog protokola, gde se oporavak akvatičnih makrofita pratio tokom dodatnih pet/sedam dana testa nakon sedmodnevne ekspozicije, moguće dobiti ekološki značajne relevantne podatke o odloženom toksičnom dejstvu pojedinačnih supstanci/smeša.

Na osnovu prikazanih rezultata iz testova na akvatičnim makrofitama je pokazano da se periodičnim merenjem RGR, za različite parametre, može ustanoviti i) momenat maksimalnog negativnog efekta ispitivane supstance/smeše, ii) početak pozitivne faze oporavka, momenta kada iz prethodnog stanja gde je zabeležen maksimalni negativni efekat kreće proces oporavka do stanja gde ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

U testu sa atrazinom i izoproturonom, kao pojedinačnim supstancama, je uočen efikasan oporavak vrste *L. minor*, nezavisno od primenjene koncentracije. Sa druge strane, u slučaju trifluralina i 2,4 D u periodu oporavka je zabeleženo odloženo toksično dejstvo. Na primeru trifluralina i 2,4 D se pokazalo da standardni testovi toksičnosti, zanemarujući podatke o potencijalu oporavka, mogu potceniti realan rizik od pesticida. U slučaju drugog sintetičkog auksina, dikambe, pri izabranoj seriji koncentracija nije zabeleženo toksično dejstvo na vrstu *L. minor*.

Odgovor vrste *L. minor* na dejstvo dvo-komponentne smeše atrazina i izoproturona je sličan onom zabeleženom u testu sa navedenim herbicidima, kao pojedinačnim supstancama. Zabeležen je efikasan oporavak biljne kulture, nezavisno od primenjene koncentracije herbicida u smeši. Sa druge strane, oporavak vrste *L. minor* nakon izloženosti dvo- i tro-komponentnim smešama sa trifluralinom zavisi od primenjene koncentracije herbicida u smeši i zabeležen je jedino u tipu smeša gde su koncentracije pojedinačnih herbicida bile relativno bliske mogućim koncentracijama herbicida u životnoj sredini. To znači da je efekat odabranih smeša u kojima su supstance bile prisutne u vrednostima svojih tzv. bezbednih koncentracija, nezavisno od mehanizma delovanja, reverzibilan, što je ukazalo na neophodnost ispitivanja toksičnosti smeša u uslovima što približnijim uslovima u životnoj sredini.

Povećanje toksičnosti pojedinačnih supstanci/smeša uslovljeno prisustvom prirodne organske materije, koja je u testovima na akvatičnim makrofitama simulirana preko huminskih materija, je primećeno u slučaju atrazina, 2,4 D i njihove dvo-komponentne smeše, u testu na vrsti *L. minor*, odnosno dikambe u testu sa *M. aquaticum*. Suprotan efekat huminskih materija je primećen u testu sa *M. aquaticum* u slučaju izoproturona i dvo-komponentne smeše izoproturona i dikambe, jer je zabeležena niža toksičnost u prisustvu huminskih materija. Iako određene razlike u toksičnosti između ispitivanih test tretmana u prisustvu i odsustvu huminskih materija postoje, one nisu bile statistički značajne. Oporavak akvatičnih makrofita od efekta dvo-komponentnih smeša, u prisustvu/odsustvu huminskih materija, zavisi od primenjene koncentracije herbicida u smeši. Izuzetak čini dvo-komponentna smeša atrazina i 2,4 D, u testu sa *L. minor*, gde nije

došlo do oporavka biljne kulture ni u jednom od tipova smeše u prisustvu huminskih materija.

Generalno, uočena je dobra saglasnost između empirijske i predviđene toksičnosti, na osnovu modela adicije koncentracija (CA), nezavisno od mehanizma toksičnog dejstva supstanci prisutnih u smeši ili prisustva odnosno odsustva huminskih materija. Određeno odstupanje od aditivnosti je zabeleženo jedino u testu sa *L. minor* u slučaju dvo-komponentnih smeša sa trifluralinom (atrazin+trifluralin i izoproturon+trifluralin), gde se ispostavilo da CA model u određenoj meri potcenjuje dejstvo navedenih smeša, što upućuje na pojavu sinergističkih interakcija između supstanci.

CA model je, po prvi put, korišćen za procenu toksičnog efekta smeša uzimajući u obzir integralno i podatke o oporavku eksponiranih populacija u testu sa *L. minor*, odnosno jedinki, u testu sa *M. aquaticum*. Rezultati, prikazani u ovoj disertaciji, su pokazali da se CA model može alternativno koristiti za procenu toksičnosti odabranih smeša, na osnovu integralnih saznanja o osetljivosti i potencijalu oporavka eksponiranih jedinki/populacija, pod uslovom da su dostupni takvi podaci za pojedinačne susptance koje ulaze u sastav smeše. Da bi se sa sigurnošću prihvatila ova predložena primena CA modela potrebna su dodatna istraživanja sa različitim smešama pesticida i režimima ekspozicije (npr. kontinuirana vs. diskontinuirana, kratkotrajna vs. dugotrajna ekspozicija).

## 7. Literatura

- Agencija za zaštitu životne sredine (2005) Izveštaj o stanju životne sredine u Republici Srbiji 2003. i 2004. Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine, Republika Srbija.
- Aiken GR, Hsu-Kim H, Ryan JN (2011) Influence of Dissolved Organic Matter on the Environmental Fate of Metals, Nanoparticles, and Colloids. *Environ Sci Technol* 45:3196-3201
- Alletto L, Coquet Y, Benoit P, Bergheand V (2006) Effects of temperature and water content on degradation of isoproturon in three soil profiles. *Chemosphere* 64:1053-1061
- Altenburger R, Ait-Aissac S, Antczak P, Backhaus T, Barceló D, Seiler TB, Brion F, Busch W, Chipman K, López de Alda M, de Aragão Umbuzeiro G, Escher BI, Falciani F, Faust M, Focks A, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Jäger F, Jahnke A, Kortenkamp A, Krauss M, Lemkine GF, Munthe J, Neumann S, Schymanski E, Scrimshaw M, Segner H, Slobodnik J, Smedes F, Subramaniam K, Teodorovic I, Tindall AJ, Tollefsen KE, Walz KH, Williams TD, Van den Brink PJ, van Gils J, Vrana B, Zhangy X, Brack W (2015) Future water quality monitoring – Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Sci Total Environ* 512-513:540-551
- Altenburger R, Arrhenius Å, Backhaus T, Coors A, Faust M, Zitzkat D (2013a) Ecotoxicological combined effects from chemical mixtures Part 1: Relevance and adequate consideration in environmental risk assessment of plant protection products and biocides. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt) Wörlitzer Platz 1 06844 Dessau-Roßlau Germany, ISSN 1862-4804
- Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M (2013b) Simplifying complexity: mixture toxicity assessment in the last 20 years. *Environ Toxicol Chem* 32(8):1685-1687
- Altenburger R, Nendza M, Schuurmann G (2003) Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environ Toxicol Chem* 22(8):1900-1915
- Anačkov TG, Rat MM, Radak DB, Igić SR, Vukov MD, Rućando MM, Krstivojević MM, Radulović BS, Cvijanović LjD, Milić MD, Panjković IB, Szabados LK, Perić DR, Kiš MA, Stojšić RV, Boža PP (2013) Alien invasive neophytes of the Southeastern part of the Pannonian Plain. *Cent Eur J Biol* 8(10):1032-1047  
<http://www.archiva.srbija.gov.rs>. Pristupljeno 20.04.2017. preko linka: <http://www.arhiva.srbija.gov.rs/cms/view.php?id=1024>
- Arrhenius Å, Gronvall F, Scholze M, Backhaus T, Blanck H (2004) Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic toxicology* 68:351-367
- Ashauer R (2010) Toxicokinetic–toxicodynamic modelling in an individual based context–Consequences of parameter variability. *Ecological Modelling* 221:1325-1328
- Ashauer R, Boxall A, Brown C (2006) Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environ Toxicol Chem* 25(7):1899-1912

## 7. Literatura

---

- Backhaus T Mixture toxicity assessment in Europe: state of the art and the challenges ahead. Pristupljeno 05.04.2017. preko linka: <http://www.miljodirektoratet.no/Global/bilder/nyhetsbilder/Thomas%20Backhaus%200-%20mixtures%20presentation%20Oslo%20for%20dissemination.pdf>
- Backhaus T (2015) An additional assessment factor (MAF) – A suitable approach for improving the regulatory risk assessment of chemical mixtures? Swedish Chemicals Agency, Stockholm, Sweden. ISSN 0284-1185
- Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000) Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 19:2348-2356
- Backhaus T, Faust M, Scholze M, Gramatica P, Vighi M, Grimme LH (2004a) Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ Toxicol Chem* 23(2):258-264
- Backhaus T, Arrhenius A, Blanck H (2004b) Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environ Sci Technol* 38(23):6363-6370
- Backhaus T, Faust M (2012) Predictive Environmental Risk Assessment of Chemical Mixtures: A Conceptual Framework. *Environ Sci Technol* 46:2564-2573
- Barreto R, Charudattan R, Pomella A, Hanada R (2000) Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi. *Crop Prot* 19:697-703
- Bažulić Štimac Ž, Ranogajec A, Krivohlavek A, Mandić I, Šmit Z, Puntarić D (2006) Atrazin u okolišu – zdravstveni rizik. *Hrvatski časopis za javno zdravlje* 2(8)
- Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ (2007) How Well Can We Predict the Toxicity of Pesticide Mixtures to Aquatic Life?. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(3):364-372
- Belgers JDM, Van Lieverloo RJ, Van der Pas LJT, Van der Brink PJ (2007) Effects of the herbicide 2,4 D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* 86:260-268
- Bengtsson BE, Triet T (1994) Tapioca-starch Wastewater Toxicity Characterized by Microtox and Duckweed Tests. *Ambio* 23(8):473-477
- Benson WH, Long SF (1991) Evaluation of Humic-Pesticide Interactions on the Acute Toxicity of Selected Organophosphate and Carbamate Insecticides. *Ecotox Environ Safe* 21:301-307
- Bernež I, Aguiar F, Violle C, Ferreira T (2006) Invasive river plants from Portuguese floodplains: What can species attributes tell us? *Hydrobiologia* 570:3-9
- Blečić V (1976) Fam. *Lemnaceae*. U: *Flora Savezne Republike Srbije*, VII tom, str. 482-484. Josifović M (Urednik). *Srpska akademija nauka i umetnosti, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka*, Beograd
- Boobis A, Budinsky R, Collie S, Crofton K, Embry M, Felter S, Hertzberg R, Kopp D, Mihlan G, Mumtaz M, Price P, Solomon K, Teuschler L, Yang R, Zaleski R (2011) Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical mixtures for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1-14

## 7. Literatura

---

- Boxall ABA, Brown CD, Barrett KL (2002) Review – Higher-tier laboratory methods for assessing the aquatic toxicity of pesticides. *Pest Manag Sci* 58:637-648
- Boxall ABA, Fogg LA, Ashauer R, Bowles T, Sinclair CJ, Colyer A, Brain RA (2013) Effects of repeated pulsed herbicide exposures on the growth of aquatic macrophytes. *Environ Toxicol Chem* 32(1):193-200
- Brack W (2003) Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal Bioanal Chem* 377:399-407
- Brack W, Altenburger R, Schüürmann G, Krauss K, López Herráez D, van Gils J, Slobodnik J, Munthe J, Manfred Gawlik B, van Wezel A, Schriks M, Hollender J, Tollefsen KE, Mekenyan O, Dimitrov S, Bunke D, Cousins I, Posthuma L, van den Brink PJ, de Alda ML, Barceló D, Faust M, Kortenkamp A, Scrimshaw M, Ignatova S, Engelen G, Massmann G, Lemkine G, Teodorovic I, Walz KH, Dulio V, Jonker MTO, Jäger F, Chipman K, Falciani F, Liska I, Rooke D, Zhang X, Hollert H, Vrana B, Hilscherova K, Kramer K, Neumann S, Hammerbacher R, Backhaus T, Mack J, Segner H, Escher B, de Aragão Umbuzeiro G (2015) The SOLUTIONS project: Challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Sci Total Environ* 503-504:22-31
- Brain RA, Hosmer AJ, Desjardins D, Kendall TZ, Krueger H, Wall SB (2012) Recovery of duckweed from time-varying exposure to atrazine. *Environ Toxicol Chem* 31(5):1121-1128
- Brock TCM, Lahr J, Van der Brink PJ (2000) Ecological risk of pesticides in freshwater ecosystems Part 1: Herbicides. Wageningen, Alterra, Green World Research. Alterra Report 088. 124 pp
- Brock TCM, Arts GHP, ten Hulscher TEM, de Jong FMW, Luttik R, Roex EWM, Smit CE van Vliet PJM (2011) Aquatic effect assessment for plant protection products; Dutch proposal that addresses the requirements of the Plant Protection Product Regulation and Water Framework Directive. Wageningen, Alterra, Alterra Report 2235:1-140. ISSN: 1566-7197
- Brkić D, Gašić S, Nešković N (2009) Akutna toksičnost herbicida GAL-57. *Pestic fitomed* 24(3):221-226
- Brkić D, Szakonyne Pasics I, Gašić S, Karan V, Radivojević Lj, Nešković N (2011) Hematološki efekti herbicida Avalon® (bentazon + dikamba) za pacova. *Pestic fitomed* 26(4):401-407
- Busch W, Schmidt S, Kuhne R, Schulze T, Krauss M, Altenburger R (2016) Micropollutants in European Rivers: A Mode of Action Survey to Support the Development of Effect-Based Tools for Water Monitoring. *Environ Toxicol Chem* 35(8):1887-1899
- Buha A, Matović A (2015) Osnovni principi izučavanja toksikologije smeša. *Arh.farm* 65:304-315
- Campbell PJ, Arnold DJS, Brock TCM, Grandy NJ, Heger W, Heimbach F, Maund SJ, Streloke M (1998) Higher-tier aquatic risk assessment for pesticides. Guidance document from the SETAC-Europe/OECD/EC workshop. 19-22 April 1998. Lacanau Océan, France

## 7. Literatura

---

- Carvalho RN, Arukwe A, Ait-Aissa S et al (2014) Mixtures of Chemical Pollutants at European Legislation Safety Concentrations: How Safe Are They?. *Toxicol Sci* 141(1):218-233
- Caux PY, Kent RA, Tache M, Grande C, Fam GT, MacDonald DD (1993) Environmental fate and effects of dicamba: a Canadian perspective. *Rev Environ Contam Toxicol* 133:1-58
- Cedergreen N (2014) Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* 9(5): e96580, doi:10.1371/journal.pone.0096580
- Cedergreen N, Abbaspoor M, Sørensen H, Streibig JC (2007) Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotox Environ Safe* 67:323-332
- Cedergreen N, Andersen L, Olesen CF, Spliid HH, Streibig JC (2005) Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on *Kow* or mode of action?. *Aquat Toxicol* 71(3):261-271
- Cedergreen N, Streibig JC (2005) Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments?. *Environ Toxicol Chem* 24 (7):1676-1683
- Chapman PM (2002) Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull* 44:7-15
- Chen S, Ke R, Zha J, Wang Z, Khan SU (2008) Influence of Humic Acid on Bioavailability and Toxicity of Benzo[k]fluoranthene to Japanese Medaka. *Environ Sci Technol* 42:9431-9436
- Cilliers CJ (1999) *Lysathia* n.sp. (Coleoptera: *Chrysomelidae*), a host-specific beetle for the control of the aquatic weed *Myriophyllum aquaticum* (*Haloragaceae*) in South Africa. *Hydrobiologia* 415:271-276
- CIPAC (1985) (Collaborative international pesticides analytical council) Handbook 1C (2,4 D). 2062 pp.
- Coors A, Frische T (2011) Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures. *Environ Sci Eur* 23:22
- Deneer JW (2000) Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science* 56:516-520
- De Lange HJ, Lahr J, Van der Pol JJC, Wessels Y, Faber JH (2009) Ecological vulnerability in wildlife: an expert judgment and multicriteria analysis tool using ecological traits to assess relative impact of pollutants. *Environ Toxicol Chem* 28:2233-2240
- De Paolis F, Kukkonen J (1997) Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: Influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* 34(8):1693-1704
- De Schamphelaere KAC, Janssen CR (2004) Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23(5):1115-1122
- Dimou AD, Sakkas VA, Albanis TA (2004) Trifluralin photolysis in natural waters and under the presence of isolated organic matter and nitrate ions: kinetics and photoproduct analysis. *J Photoch Photobio A* 163:473-480



## 7. Literatura

---

- Drost W, Matzke M, Backhaus T (2007) Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere* 67:36-43
- Ebke KP, Felten C, Dören L (2013) Impact of heterophylly on the sensitivity of *Myriophyllum aquaticum* biotests. *Environ Sci Euro* 25(1):1-9
- Eisler R (1989) Atrazine Hazards to Fish, Wildlife and Invertebrates: A Synoptic Review. US Fish&Wildlife Publications Paper 314
- <http://www.ec.europa.eu>. Pristupljeno 15.02.2017. preko linka: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances_en)
- EC (European Commission) (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 OJ L 327/1-72
- EC (European Commission) (2008a) Directive 80/778/EEC. Synthesis report on the quality of drinking water in the member states of the European Union in the period 1999-2001
- EC (European Commission) (2008b) Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union L 348/84
- EC (European Commission) (2009) Regulation No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Off J Eur Union L 309:1-50
- EC (European Commission) (2011a) Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Scientific Committee on Consumer Safety, Emerging and Newly Identified Health Risks, Health and Environmental Risks. DG Health & Consumers, Directorate D: Health Systems and Products, Unit D3:Risk Assessment, Brussels. 50 str. ISBN 978-92-79-30700-3
- EC (European Commission) (2011b) Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance Document No. 27 Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards. 204 pp. doi:10.2779/43816
- EC (European Commission) (2012) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Preliminary report on Addressing the New Challenges for Risk Assessment 1-154
- EC (European Commission) (2013a) Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with the Regulation(EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning theplacing of plant protection products on the market. Off J Eur Union L 93/1:1-84

## 7. Literatura

---

- EC (European Commission) (2013b) Commission Regulation (EU) No 284/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with the Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. *Off J Eur Union L 93/85*:1-68
- EC (European Commission) (2013c) Directive 2013/39/EC of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 as regards priority substances in the field of water policy *OJ L 226/1*
- EFSA PPR Panel (European Food Safety Authority Panel on Plant Protection Products and their Residues) (2013) Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal 11(7)*:3290, 268 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3290
- EFSA PPR Panel (European Food Safety Authority Panel on Plant Protection Products and their Residues) (2015) Scientific Opinion on the effect assessment for pesticides on sediment organisms in edge-of-field surface water. *EFSA Journal 13(7)*:4176, 145pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4176
- EFSA Scientific Committee (European Food Safety Authority Scientific Committee) (2016) Recovery in environmental risk assessments at EFSA. *EFSA Journal 14(2)*:4313, 85 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4313
- Eurostat (2016) Agriculture, forestry and fishery statistics, 2015 edition. Publications Office of the European Union. Batiment Joseph Bech 5, rue Alphonse Weicher, L-2721 Luxembourg, Luxembourg, 206 pp. ISBN 978-92-79-57816-8
- Fairchild JF, Ruessler DS, Haverland PS, Carlson AR (1997) Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. *Arch Environ Contam Toxicol 32*:353-357
- Fairchild JF, Ruessler DS, Haverland PS, Carlson AR (1998) Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and , metoachlor. *Environ Toxicol and Chem 17(9)*:1830-1834
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH (2001) Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat Toxicol 56*:13-32
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Grimme LH (2003) Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat Toxicol 63*:43-63
- Faust M, Vogs C, Rotter S, Wöltjen J, Höllrigl Rosta A, Backhaus T, Altenburger R (2014) Comparative assessment of plant protection products: how many cases will regulatory authorities have to answer?. *Environmental Sciences Europe 26*:11
- Fernandes TCC, Pizano MA, Marin Morales MA (2013) Characterization, Modes of Action and Effects of Trifluralin: A Review. Published in: *Agricultural and Biological Science. Herbicides – Current Research and Case Studies in Use*. Price AJ, Kelton JA (Urednici). ISBN 987-953-51-1112-2

## 7. Literatura

---

- Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic Biochem and Phys* 88:252-259
- <http://www.freenatureimages.eu>. Pristupljeno 11.10.2016. preko linka: [http://www.freenatureimages.eu/plants/Flora%20J-N/Myriophyllum%20aquaticum,%20Parrots%20Feather/index.html#Myriophyllum\\_aquaticum](http://www.freenatureimages.eu/plants/Flora%20J-N/Myriophyllum%20aquaticum,%20Parrots%20Feather/index.html#Myriophyllum_aquaticum) 8, Parelvederkruid, Saxifraga-Peter Meininger.JPG
- Galichet F, Mailhot G, Bonnemoy F, Bohatier J, Bolte M (2002) Iron(III) photo-induced degradation of isoproturon: correlation between degradation and toxicity. *Pest Manag Sci* 58:707-712
- Giddings, JM, Anderson, TA, Hall LW, Hosmer AJ, Kendall RJ, Richards RP, Solomon KR, Williams, WM (2005) Atrazine in North American Surface Waters: A Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Florida, United States of America. 432 pp. ISBN 1-880611-78-3
- Glaßgen W, Komoba D, Bohnenkamper A, Haas M, Hertkorn H, May R, Szymczak W, Sandermann H (1999) Metabolism of the Herbicide Isoproturon in Wheat and Soybean Cell Suspension Cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63:97-113
- Grossmann K (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag Sci* 66(2):113-120
- Guillen D, Ginebreda A, Farre M, Darbra RM, Petrovic M, Gros M, Barcelo D (2012) Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling, and regulatory perspective. *Science of the Total Environment* 440:236-252
- Hegedus G, Belai I, Szekacs A (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Analytic Chemica Acta* 421:121-131
- Heine S, Schild F, Schmitt W, Krebber R, Gorlitz G, Preus TG (2016) A toxicokinetic and toxicodynamic modelling approach using *Myriophyllum spicatum* to predict effects caused by short-term exposure to a sulfonylurea. *Environ Toxicol Chem* 35(2):376-384
- Heitzer M, Hoss S, Traunspurger W, Steinberg C (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 37(7):1335-1362
- Hill MP, Julien MH (2003) The transfer of appropriate technology; key to the successful biological control of five aquatic weeds in Africa. Published in: Cullen JM, Briese DT, Kriticos DJ, Lonsdale WM, Morin L, Scott JK. Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds. 27 April-2 May 2003. Canberra, Australia
- Hillman WS, Culley DD (1978) The use of duckweed: The rapid growth, nutritional value, and high biomass productivity of these floating plants suggest their use in water treatment, as feed crops, and in energy-efficient farming. *Amer Sci.* 66(4):442-451
- Hommen U, Schmitt W, Heine S, Brock TC, Duquesne S, Manson P, Meregalli G, Ochoa-Acuna H, van Vilet P, Arts G (2016) How TK-TD and population models for

## 7. Literatura

---

- aquatic macrophytes could support the risk assessment for plant protection products. *Integrated Environmental Assessment and Management* 12(1):82-95
- Hussner A (2009) Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. *Weed Res* 49:506-515
- Hussner A, Losch R (2005) Alien aquatic plants in a thermally abnormal river and their assembly to neophyte-dominated macrophyte stands (River Erft, Northrhine-Westphalia). *Limnologica* 35:18-30
- ICPDR (International Commission for the Protection of the Danube River) (2015) Liška I, Wagner F, Sengl F, Deutch K, Slobodnik J (Urednici). Joint Danube Survey 3.A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. Final Scientific Report. Vienna ICPDR. 369 str. ISBN 978-3-200-03795-3
- ISO (International Organisation for Standardisation) (2013) Water quality: Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*. Test No. 16191. Geneva, Switzerland
- Ivančev Tumbas I (2014) The fate and importance of organics in drinking water treatment: a review. *Environ Sci Pollut Res* 21:11794-11810
- Jablanowski ND, Schaffer A, Burauel P (2011) Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environ Sci Pollut Res Int* 18(2):328-331
- Jager T (2015) Making Sense of Chemical Stress: Applications of Dynamic Energy Budget Theory in Ecotoxicology and Stress Ecology. Version 1.2. De Bilt, The Netherlands
- Janjić V (1996) Triazinski herbicidi. Institut za istraživanja u poljoprivredi, Beograd, Srbija. ID 46331148. 1-475
- Jevrić L (2009) Ispitivanje korelacije između hemijske strukture, fizičko-hemijskih i retencionih parametara u hromatografiji na obrnutim fazama nosivih sintetičkih derivata s-triazina. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad
- Jovanović Radanov K, Elezović I (2003) Fitotoksično delovanje trifluralina na hibride kukuruza (*Zea mays* L.) i njegova perzistentnost. *Pesticidi* 18:77-98
- Junghaus M (2004) Studies on combination effects of environmentally relevant toxicants: Validation of prognostic concepts for assessing the algal toxicity of realistic aquatic pesticide mixtures. Doctoral thesis. Institute for Cell Biology, Biochemistry, and Biotechnology, University of Bremen, Bremen
- Junghaus M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2003) Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Manag Sci* 59:1101-1110
- Kattwinkel M, Liess M, Arena M, Bopp S, Streissl F, Rombke J (2015) Recovery of aquatic and terrestrial populations in the context of European pesticide risk assessment. *Environ Rev* 23:382-394
- Kemp WM, Boynton WR, Cunningham JJ, Stevenson JC, Jones TW, Means JC (1985) Effects of Atrazine and Linuron on Photosynthesis and Growth of the Macrophytes, *Potamogeton perfoliatus* L. and *Myriophyllum spicatum* L. in an Estuarine Environment. *Mar Environ Res* 16:255-280

## 7. Literatura

---

- Kerkez Đ, Leovac A, Molnar J, Kragulj M, Tubić A, Tričković J, Dalmacija B, Ivančević-Tumbas I (2012) Poređenje merenja odabranih organskih polutanata u uslovima sintetičkog i prirodnog vodenog matriksa. 41. Konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda. Divčibare, 05-07.07.2012. str.105-110
- Kienzler A, Berggren E, Bessems J, Bopp S, van der Linden S, Worth A (2014) Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. JRC Science and Policy Reports. Luxembourg: Publications Office of the European Union, ISBN 978-92-79-38479-0
- Kienzler A, Bopp SK, van der Linden S, Berggren E, Worth A (2016) Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul Toxicol Pharm* 80:321-334
- Knauer K (2016). Pesticides in surface waters: a comparison with regulatory acceptable concentrations (RACs) determined in the authorization process and consideration for regulation. *Environ Sci Eur* 28:13
- Knauer K, Hommen U (2012) Sensitivity, variability, and recovery of functional and structural endpoints of an aquatic community exposed to herbicides. *Ecotoxicol Environ Saf* 78:178-183
- Knauert S (2008) Toxicity of pesticides and their mixture to primary producers. Doktorarbeit. Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel.
- Knauert S, Escher B, Singer H, Hollender J, Knauer K (2008) Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater studied in outdoor mesocosms. *Environ Sci Technol* 42(17):6424-6430
- Knauert S, Dawo U, Hollender J, Hommen U, Kauer K (2009) Effects of photosystem II Inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environ Toxicol and Chem* 28(4):836-845
- Knežević V (2010) Toksičnost atrazina na akvatične makrofite. Master rad, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad
- Knežević V, Tunić T, Gajić P, Marjan P, Savić D, Tenji D, Teodorović I (2016) Getting More Ecologically Relevant Information from Laboratory Tests: Recovery of Lemna minor After Exposure to Herbicides and Their Mixtures. *Arch Environ Contam Toxicol* 71:572-588
- Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M (2009) State of the art report on mixture toxicity. Final report, study Contract number 070307/2007/485103/ETU/D.1. European Commission, Brussels, Belgium, 391 pp
- Kortenkamp A, Faust M (2010) Combined exposures to antiandrogenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. *Int J Androl* 33:463-474
- Lazić SD, Šunjka DB, Pucarević MM, Grahovac NL, Vuković SM, Indić DV, Jakšić SP (2013) Monitoring atrazina i njegovih metabolita u podzemnim vodama Republike Srbije. *Hem Ind* 67(3):513-523
- Lee SK, Freitag D, Steinberg C, Kettrup A, Kim YH (1993) Effects of dissolved humic materials on acute toxicity of some organics chemicals to aquatic organisms. *Wat Res* 27(2): 199-204

## 7. Literatura

---

- Leovac Maćerak AS (2016) Adsorpciono ponašanje odabranih organskih ksenobiotika na sorbentima relevantnim za tretman voda. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad
- Leovac A, Vasyukova E, Ivančev Tumbas I, Wolfgang U, Kragulj M, Tričković J, Kerkez Đ, Dalmacija B (2015) Sorption of atrazine, alachlor and trifluralin from water onto different geosorbents. RSC Adv 8:8122
- Lepper P (2005) Manual on the Methodological Framework to Derive Environmental Quality Standards for Priority Substances in accordance with Article 16 of the Water Framework Directive (2000/60/EC). Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology Schmallenberg, Germany. 51 p.
- Liess M, Beketov M (2011) Traits and stress: keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. Ecotoxicology 20:1328-1340
- Lokke H (2010) Novel methods for integrated risk assessment of cumulative stressors — Results from the NoMiracle project. Sci Total Environ 408:3719-3724
- Lorenz R, Bruggemann R, Steinberg CEW, Spieser OH (1996) Humic material changes effects of terbutylazine on behavior of zebrafish (*Brachidanio rerio*). Chemosphere 33(11): 2145-2158
- Lydy MJ, Lohner TW, Fischer SW (1990) Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. Aquatic toxicology 17(1):27-44
- Mager EM, Brix KV, Gerdes RM, Ryan AC, Grosell M (2011) Effects on water chemistry on the chronic toxicity of lead to the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Ecotox Environ Safe 74(3):238-243
- Maltby L, Arnold D, Arts G, Davis J, Heimbach F, Pickl C, Poulsen (2010) Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola, Florida, United States of America. 135 str.
- Merrington G, Peters A (2012) The importance of dissolved organic carbon in the assessment of environmental quality standard compliance for copper and zinc. Water Framework Directive-United Kingdom Technical Advisory Group (WFD-UKTAG). ISBN: 978-1-906934-29-3
- Merlin G, Vuillod M, Lissolo T, Clement B (2002) Fate and bioaccumulation of isoproturon in outdoor aquatic microcosms. Environ Toxicol Chem 21(6):1236-1242
- Meems N, Steinberg CEW, Wiegand C (2004) Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna*) by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin. Sci Total Environ 123-136
- Michel A, Johnson RD, Duke SO, Scheffler BE (2004) Dose-Response Relationships Between Herbicides with Different Modes of Action and Growth of *Lemna paucicostata*: An Improved Ecotoxicological Method. Environ Toxicol and Chem 23(4):1074-1079
- Mkandawire M, Dudel EG (2007) Are *Lemna* spp. Effective Phytoremediation Agent? Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability 66(4):442-451. Global Science Books

## 7. Literatura

---

- Moody M, Miller J (2005) *Lemna minor* growth inhibition test. Blaise C, Ferard JF (Urednici). Small-scale Freshwater Toxicity Investigations 1:271-298
- Molanar J (2011) Efekti odabranih unapređenih procesa oksidacije i koagulacije na sadržaj prirodno organskih materija u vodi. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad
- Moreira I, Monteiro A, Ferreira T (1999) Biology and control of Parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*) in Portugal. Ecol Env Cont 5(3):171-179
- <http://www.naturespot.org.uk>. Pristupljeno 25.12.2016. preko linka: <http://www.naturespot.org.uk/species/common-duckweed>
- Nikkila A, Paulson M, Almgren K, Blanck H, Kukkonen JVK (2001) Atrazine uptake, elimination, and bioconcentration by periphyton communities and *Daphnia magna*: effects of dissolved organic carbon. Environ Toxicol Chem 20(5):1003-1011
- Nitschke L, Wilk A, Schosler W, Metzner G, Lind G (1999) Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. Chemosphere 39(13):2313-2323
- Nodler K, Licha T, Voutsas D (2013) Twenty years later--atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. Mar Pollut Bull 70:112-118
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1998) Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 408: Repeated Dose 90 Day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris, France
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2006) Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. Paris, France
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2008) Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris, France
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2011) Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test. Paris, France
- OECD Ring test protokol (Organization for Economic Cooperation and Development) (2011) Ring test protocol. Standardized method for investigating test substance impact on rooted aquatic macrophytes. OECD Guideline. Paris, France
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2014) Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 239: Water-Sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test. Paris, France
- Oikari A, Kukkonen J, Virtanen V (1992) Acute toxicity of chemicals to *Daphnia magna* in humic waters. Sci Total Environ 367-377
- Okland TE, Wilhelmsen E, Solevag O (2005) A study of the priority substances of the Water Framework Directive. Norwegian Pollution Control Authority (SFT). 106 str. ISBN 82-7655-276-5
- Ortego LS, Benson WH (1992) Effects of dissolved humic material on the toxicity of selected pyrethroid insecticides. Environ Toxicol Chem 11:261-265

## 7. Literatura

---

- OSPAR Commission (2005) OSPAR background document on trifluralin. ISBN 1-904426-37-9
- OSPAR Commission (2007) Practical Guidance Document on Whole Effluent Assessment. Marijke Ferdinandy M, Unden A, Mendonca E, Maue G, Gartiser S, Casey D, Leverett D, Moxon R, de Vries G, Witter H, Hoebeke L, Roex E, Comber M, Mr. Whale G, van Wijk D. ISBN 978-1-905859-55-9
- Panizzi S, Suciú NA, Trevisan M (2017) Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Sci Total Environ* 580:136-146
- Prosser RS, Brain RA, Hosmer AJ, Solomon KR, Hanson ML (2013) Assessing sensitivity and recovery of field-collected periphyton acutely exposed to atrazine using PSII inhibition under laboratory conditions. *Ecotoxicology* 22:1367-1383
- Phyu YL, Palmer CG, Warner MSTJ, Dows R, Mueller S, Chapman J, Hose GC, Lim RP (2013) Assessing the Chronic Toxicity of Atrazine, Permethrin, and Chlorothalonil to the Cladoceran *Ceriodaphnia* cf. *dubia* in Laboratory and Natural River Water. *Arch Environ Contam Toxicol* 64(3):419-426
- Radić Brkanac S, Stipaničev D, Širac S, Glavaš K, Pevalek Kozlina B (2010) Biomonitoring Of Surface Waters Using Duckweed (*Lemna minor* L.). BALWOIS 2010, Ohrid, Republic of Macedonia, 25-29 May 2010
- Ratte M, Ratte H (2014) *Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* growth in a water-sediment system, OECD Environment, Health and Safety Publications (RHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris, France
- Ravichandran M (2004) Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. *Chemosphere* 55(3): 319-331
- Rico A, Van den Brink PJ (2015) Evaluating Aquatic Invertebrate Vulnerability to insecticides based on intrinsic sensitivity, biological traits, and toxic mode of action. *Environ Toxicol Chem* 34(8):1907-1917
- Rodić M (2013) Sintetički auzini: novi dokazi o ekološkom riziku za akvatične makrofite. Završni rad. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad
- SANCO (Santé des Consommateurs) (2002) Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/3268/2001 rev. 4 (final). Brussels, Belgium
- Schmitt W, Bruns E, Dollinger M, Sowig P (2013) Mechanistic TK/TD-model simulating the effect of growth inhibitors on *Lemna* populations. *Ecological Modelling* 255:1-10
- Schreiner VC, Szöcs E, Bhowmik AK, Vijver MG, Schäfer RB (2016) Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. *Sci Total Environ* 573:680-689
- Senesi N (1992) Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci Total Environ* 123/124:63-76
- Senesi N, Chen Y (1989) Interactions of toxic chemicals with humic substances. In *Toxic Organic Chemicals in Porous Media*. Gerstl Z, Chen Y, Mingelgrin U, Yaron B (ed.). T Springer-Verlag, Berlin, Germany



## 7. Literatura

---

- SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) (1997) Technical issue paper: Ecological risk assessment. Pensacola, FL, USA: SETAC. 4 p
- Sims I, Whitehouse P, Lacey R (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Rong-testing of draft OECD Test Quidelines. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc. Environment Agency
- Sl. glasnik RS, 41/09 (Službeni glasnik Republike Srbije) (2009) Zakon o sredstvima za zaštitu bilja
- Smith KS, Balistrieri LS, Todd AS (2015) Using biotic ligand models to predict metal toxicity in mineralized systems. *Applied Geochemistry* 57:55-72
- Solomon, KR, Baker, DB, Richards, RP, Dixon, KR, Klaine, SJ, La Point, TW, Kendall, RJ, Weisskopf, CP, Giddings, JM, Giesy, JP (1996) Ecological Risk Assessment Of Atrazine In North American SurfaceWaters. *EnvironToxicol Chem* 15(1):31-76
- Sørensen SR, Aamand J (2001) Biodegradation of the Phenylurea Herbicide Isoproturon and its Metabolites in Agricultural Soils. *Biodegradation* 12:69-72
- Sørensen SR, Bending GD, Jacobsen CS, Walker A, Aamand J (2003) Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol Ecol* 45:1-11
- SRPS ISO (2007) Kvalitet vode - Smernice za određivanje ukupnog organskog ugljenika (TOC) i rastvorenog organskog ugljenika (DOC). Test br. 8245. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd, Srbija
- Stehle S, Schulz R (2015) Pesticide authorization in the EU-environment unprotected?. *Environ Sci Pollut Res* 22:19632-19647
- Stevanović B, Janković M (2001) Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka. Štamparija NNK International. 263-281
- Teodorović I, Kaišarević S (2015) Ekotoksikologija. Univerzitet U Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju. Štamparija Stojkov, Novi Sad. 401 str. ISBN 978-86-7031-145-9
- Teodorović I, Knežević V, Tunić T, Čučak M, Nikolić Lečić J, Leovac A, Ivančev Tumbas I (2012) *Myriophyllum aquaticum* versus *Lemna minor*: sensitivity and recovery potential after exposure to atrazine. *Environ Toxicol Chem* 31(2):417-426
- TesTox (2003) University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Novi Sad, Serbia
- Tričković J (2009) Primena sorpcionih parametara odabranih hidrofobnih organskih polutanata na organskoj materiji sedimenta za procenu njihove dostupnosti u sistemu sediment-voda. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad
- Tunić T (2015) Razvoj testova inhibicije rasta vrsta roda *Myriophyllum* L. 1754 (Saxifragales, Haloragaceae) za potrebe ekološke procene rizika od herbicida i kontrole kvaliteta sedimenta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad
- Tunić T, Knežević V, Kerkez Đ, Tubić A, Šunjka D, Lazić S, Brkić D, Teodorović I (2015) Some arguments in favour of a *Myriophyllum aquaticum* growth inhibition test in a water-sediment system as an additional test in risk assessment of herbicides. *Environ Toxicol Chem* 34(9):2104-2115

## 7. Literatura

---

- Turgut C (2007) The impact of pesticides toward parrotfeather when applied at the predicted environmental concentration. *Chemosphere* 66 469-473
- Turgut C, Fomin A (2002) Sensitivity of the Rooted Macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdocout to seventeen Pesticides Determined on the Basis of EC<sub>50</sub>. *Bull Environ Contam Toxicol* 69:601-608
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1991) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures. Second Edition. EPA/600/6-91/003
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1993) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase II. Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. EPA600/R-92/080
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1995) Determination of chlorinated pesticides, herbicides, and organohalides by liquid-solid extraction and electron capture gas chromatography, revision 2.0. Method 508.1. Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1996) Proposed Guidelines for Ecological Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EPA/630/R-95/002B
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2000a) Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136). EPA 821-B-00-00
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2000b) Determination of phenylurea compounds in drinking water by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection. Revision 1.0. Method 532. Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2005) Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Reregistration Eligibility Decision for 2,4 D. EPA 738-R-05-002
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2006) Reregistration Eligibility Decision for Dicamba and Associated Salts. EPA-B-0065
- <http://www.uzb.minpolj.gov.rs>. Lista zabranjenih supstanci. Pristupljeno 10.01.2017. preko linka:[http://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/251\\_Lista%20zabranjenih%20supstanci.doc](http://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/251_Lista%20zabranjenih%20supstanci.doc)
- <http://www.uzb.minpolj.gov.rs>. Lista odobrenih supstanci. Pristupljeno 15.02.2017. preko linka:[http://www.uzb.minpolj.gov.rs/index.php?option=com\\_content&view=article&id=250%3A2012-07-13-16-41-29&lang=en](http://www.uzb.minpolj.gov.rs/index.php?option=com_content&view=article&id=250%3A2012-07-13-16-41-29&lang=en)
- Vaj C (2011) Ecotoxicological effects on structure and function of aquatic and terrestrial ecosystems. Dottorato di ricerca in scienze ambientali. Università degli studi di Milano-Bicocca, Facoltà di scienze matematiche, Fisiche e Naturali, Milano
- Van den Brink PJ (2008) Ecological risk assessment: from book-keeping to chemical stress ecology. *Environ Sci Technol* 42:8999-9004

## 7. Literatura

---

- Vighi M, Finizio A, Villa S (2006) The evolution of the environmental quality concept: from the US EPA Red Book to the European Water Framework Directive. *Environ Sci Pollut R*13: 9-14
- Walker A, Jurado Exposito M, Bending GD, Smith VJR (2001) Spatial variability in the degradation rate of isoproturon in soil. *Environ Pollut* 111:407-415
- Walters J (1999) Environmental fate of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Monitoring and Pest Management*. Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA 95814-3510
- Wersal RM, Madsen JD (2007) Comparison of Imazapyr and Imazamox for Control of Parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.). *J Aquat Plant Manage* 45:132-136
- WHO (World Health Organization) (2003) Isoproturon in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, Switzerland
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*95(5):707-735
- Zarn J, Boobis A (2011) Pesticide residues in food - 2010: Toxicological evaluations/Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, Rome, Italy, 21-30 September 2010. ISBN 987-92-4-166526-1
- Šunjka D, Lazić S, Grahovac N, Jakšić S (2013) Solid-phase extraction of dicamba herbicide from water. Proceedings of the 15<sup>th</sup> DKMT Euroregion Conference on Environment and Health with satellite event LACREMED Conference Sustainable agricultural production: restoration of agricultural soil quality by remediation, 16-17.05.2013., University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

## 8. Prilog

### 8.1. Prilog 1

Tabela 8.1. Srednje inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$ ) 3,5-dihlorfenola (3,5-DCP) u testovima inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor*. Napomena: preuzeto iz Tunić i sar. (2015)

$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/l}$ )						Opseg $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/l}$ )
RGR BJ	RGR MSv	RGR BP	Y BJ	Y MSv	Y BP	
3222,0	2160,0	2910,0	2250,0	1940,0	2210,0	1940,0-3220,0

## 8.2. Prilog 2

Tabela 8.2. Varijabilnost parametara rasta akvatičnih vrsta makrofita u kontrolnim tretmanima u svim testovima sa pojedinačnim supstancama i smešama. Prikazani su: N – broj ponavljanja unutar tretmana, srednja vrednost, SD – standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost parametra, CV (%) – koeficijent varijacije unutar tretmana i T.d. – vreme dupliranja

Tabela 8.2 (a). Varijabilnost parametara rasta vrste *Lemna minor* u kontrolnim tretmanima u svim testovima sa pojedinačnim supstancama (atrazine, izoproturon, trifluralin, 2,4 D i dikamba) i smešama

Parametar	N	Sred. vred.	SD	Medijana	Min.	Max.	CV (%)	T.d. (dani)
BJ DAT 0	36	10,75	0,93	11,00	9,00	12,00	8,72	
BJ DAT 7	36	89,44	28,82	85,00	44,00	151,00	32,22	
BR DAT 14	36	691,33	328,47	599,50	202,00	1174,00	47,51	
RGR BJ 0-7	36	0,296	0,05	0,29	0,20	0,40	16,54	2,34
RGR BJ 0-14	36	0,299	0,04	0,31	0,21	0,35	14,02	2,32
Y BJ 0-7	36	78,69	28,88	75,00	33,00	142,00	36,97	
Y BJ 0-14	36	669,69	314,28	590,50	192,00	1162,00	46,97	
MSv (mg) DAT 0	36	9,53	3,07	9,85	4,600	15,70	32,17	
MSv (mg) DAT 7	36	126,61	66,82	122,50	43,20	347,90	52,78	
MSv (mg) DAT 14	36	988,61	529,18	871,80	180,10	2180,60	53,53	
RGR MSv 0-7	36	0,359	0,065	0,362	0,195	0,451	18,04	1,93
RGR MSv 0-14	36	0,350	0,097	0,348	0,200	0,628	27,65	1,98
Y MSv 0-7	36	118,50	65,32	113,40	32,20	332,20	55,12	
Y MSv 0-14	36	963,74	526,02	862,15	169,10	2170,70	54,58	
BP (cm <sup>2</sup> ) DAT 0	36	0,55	0,09	0,55	0,37	0,71	17,19	
BP (cm <sup>2</sup> ) DAT 7	36	4,35	3,01	3,76	2,44	18,89	69,26	
BP (cm <sup>2</sup> ) DAT 14	36	40,29	23,66	44,78	8,47	76,04	58,72	
RGR BP 0-7	36	0,281	0,06	0,298	0,196	0,477	20,25	2,47
RGR BP 0-14	36	0,755	1,27	0,312	0,189	4,166	168,72	0,91
Y BP 0-7	36	3,80	2,98	3,13	1,82	18,22	78,36	
Y BP 0-14	36	39,74	23,69	44,20	7,87	75,61	59,61	

Napomena: RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, BJ – broj jedinki, MSv – sveža masa, BP – biljna površina

## 8. Prilog

Tabela 8.2 (b). Varijabilnost parametara rasta vrste *Myriophyllum aquaticum* u kontrolnim tretmanima u testovima sa pojedinačnim supstancama (izoproturon i dikamba) i njihovim smešama

Parametar	N	Sred. vred.	SD	Medijana	Min.	Max.	CV (%)	T.d. (dani)
DS (cm) DAT 0	9	5,80	0,76	5,80	4,20	7,90	13,05	
DS (cm) DAT 7	9	10,73	2,12	10,45	7,10	15,80	19,73	
DS (cm) DAT 14	9	14,18	3,98	13,20	8,10	25,70	28,08	
RGR DS 0-7	9	0,086	0,02	0,09	0,036	0,161	29,06	8,06
RGR DS 0-14	9	0,061	0,02	0,06	0,029	0,110	28,05	11,36
Y (cm) DS 0-7	9	4,88	1,90	4,60	1,40	10,00	38,97	
Y (cm) DS 0-14	9	8,22	3,69	7,10	3,10	19,50	44,85	
MSv (mg) DAT 0	9	390,00	110,00	340,00	190,00	680,00	29,40	
MSv (mg) DAT 7	9	900,00	120,00	660,00	440,00	1900,00	84,58	
MSv (mg) DAT 14	9	940,00	250,00	920,00	90,00	1520,00	26,33	
RGR MSv 0-7	9	0,087	0,04	0,80	0,003	0,159	42,25	7,97
RGR MSv 0-14	9	0,069	0,02	0,07	0,024	0,109	28,58	10,05
Y MSv (mg) 0-7	9	320,00	180,00	290,00	10,00	760,00	56,24	
Y MSv (mg) 0-14	9	580,00	260,00	560,00	280,00	1200,00	44,93	
MSu (mg) DAT 0	9	30,00	20,00	30,00	10,00	80,00	46,37	
MSu (mg) DAT 7	9	40,00	240,00	50,00	30,00	1250,00	79,62	
MSu (mg) DAT 14	9	800,00	130,00	60,00	30,00	930,00	35,00	
RGR MSu 0-7	9	0,086	0,06	0,09	-0,01	0,241	67,39	8,06
RGR MSu 0-14	9	0,069	0,05	0,06	0,001	0,182	70,96	10,05
Y MSu (mg) 0-7	9	30,00	30,00	20,00	-2,00	170,00	99,70	
Y MSu (mg) 0-14	9	110,00	140,00	50,00	0,00	620,00	126,64	
DU (cm) DAT 0	9	9,02	0,92	8,90	7,50	11,90	10,23	
DU (cm) DAT 7	9	13,88	3,31	13,50	8,70	24,00	23,86	
DU (cm) DAT 14	9	16,92	4,90	15,20	8,20	30,40	28,95	
RGR DU 0-7	9	0,060	0,03	0,06	-0,001	0,13	47,24	11,55
RGR DU 0-14	9	0,040	0,02	0,04	0,006	0,082	37,52	17,33
Y DU (cm) 0-7	9	4,75	3,22	4,51	-2,42	14,30	67,77	
Y DU (cm) 0-14	9	7,71	4,51	6,00	-0,55	20,70	58,54	
MK (mg) DAT 7	9	20,00	20,00	10,00	1,00	80,00	82,24	
MK (mg) DAT 14	9	50,00	60,00	20,00	4,00	350,00	121,08	

Napomena: RGR – relativna stopa rasta, Y – prinos, BJ – broj jedinki, MSv – sveža masa, BP – biljna površina

## 8.3. Prilog 3

Tabela 8.3. Varijabilnost parametara: (a) RGR BJ (0-7), (b) RGR BJ 0-14, (c) RGR MSv 0-7, (d) RGR MSv 0-14, (e) RGR BJ 0-7, (f) RGR BP 0-14 u testovima inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor*. Prikazani su: N – broj ponavljanja unutar tretmana, srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV (%) – koeficijent varijacije unutar tretmana

Tabela 8.3 (a). Relativna stopa rasta (RGR) na osnovu broja jedinki (BJ) za period testa 0-7

RGR BJ 0-7							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	0,359	0,032	9,00			
80 µg/l atrazin	3	0,312	0,039	12,63	13,12		
160	3	0,229	0,021	9,10	36,26*	80	160
320	3	0,085	0,040	46,96	76,33*		
640	3	0,047	0,026	56,19	86,92*		
1280	3	0,050	0,019	37,66	86,16*		
Kontrola	6	0,327	0,032	9,75			
10 µg/l izoproturon	3	0,264	0,031	11,69	19,28*		
32	3	0,311	0,010	3,16	4,68	/	10
100	3	0,273	0,017	6,29	16,42*		
320	3	0,082	0,015	17,98	74,74*		
1000	3	-0,014	0,000	0,00	104,17*		
Kontrola	6	0,314	0,032	10,14			
10 µg/l trifluralin	3	0,334	0,028	8,41	-6,22		
32	3	0,301	0,045	14,94	4,30	100	320
100	3	0,310	0,122	3,97	1,46		
320	3	0,219	0,009	4,14	30,27*		
1000	3	0,118	0,024	20,06	62,43*		
Kontrola	6	0,261	0,014	5,45			
100 µg/l 2,4 D	3	0,254	0,004	1,51	6,09		
1000	3	0,208	0,009	4,26	36,81*	100	1000
10000	3	0,151	0,015	9,92	64,06*		
Kontrola	6	0,261	0,014	5,45			
1000 µg/l dikamba	3	0,264	0,012	4,60	-2,61		
5000	3	0,285	0,022	7,84	-22,32	10000	>10000
10000	3	0,256	0,002	0,85	4,35		

Napomena: RGR – relativna stopa rasta, BJ – broj jedinki, MSv – sveža masa, BP – biljna površina

Tabela 8.3 (b). Relativna stopa rasta (RGR) na osnovu broja jedinki (BJ) za period testa 0-12 odnosno 0-14

RGR BJ							
0-12							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	0,335	0,017	5,15			
80 µg/l atrazin	3	0,298	0,015	5,07	10,91		
160	3	0,253	0,019	7,41	24,48*	80	160
320	3	0,169	0,028	16,51	49,70*		
640	3	0,106	0,020	18,40	68,35*		
1280	3	0,086	0,029	33,50	74,30*		
Kontrola	6	0,330	0,004	1,09			
10 µg/l izoproturon	3	0,296	0,040	12,32	10,15		
32	3	0,328	0,003	0,87	0,59	100	320
100	3	0,293	0,019	6,45	11,22		
320	3	0,175	0,012	6,64	47,10*		
1000	3	-0,032	0,000	0,00	109,79*		
Kontrola	6	0,324	0,004	1,11			
10 µg/l trifluralin	3	0,336	0,005	1,46	-3,85		
32	3	0,318	0,020	6,14	1,85	100	320
100	3	0,324	0,011	3,43	-0,19		
320	3	0,194	0,056	28,78	40,20*		
1000	3	0,058	0,014	23,40	82,09*		
0-14							
Kontrola	6	0,319	0,008	2,61			
100 µg/l 2,4 D	3	0,293	0,038	12,84	24,48		
1000	3	0,250	0,008	3,01	62,52*	100	1000
10000	3	0,155	0,027	17,33	90,58*		
Kontrola	6	0,319	0,008	2,61			
1000 µg/l dikamba	3	0,307	0,005	1,72	16,38		
5000	3	0,333	0,023	6,77	-24,38	10000	>10000
10000	3	0,310	0,007	2,12	11,94		



Tabela 8.3 (c). Relativna stopa rasta (RGR) na osnovu sveže mase (MSv) za period testa 0-7

RGR MSv 0-7							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	0,415	0,034	8,28			
80 µg/l atrazin	3	0,281	0,029	10,33	32,30*		
160	3	0,107	0,056	52,37	74,29*	/	80
320	3	-0,110	0,067	60,59	126,57*		
640	3	-0,220	0,088	39,75	153,58*		
1280	3	-0,180	0,060	33,54	143,25*		
Kontrola	6	0,401	0,026	6,45			
10 µg/l izoproturon	3	0,361	0,028	7,73	9,98		
32	3	0,428	0,013	3,07	-6,73	32	100
100	3	0,300	0,013	4,24	25,19*		
320	3	0,088	0,022	25,55	78,06*		
1000	3	-0,040	0,003	8,39	109,98*		
Kontrola	6	0,310	0,032	10,14			
10 µg/l trifluralin	3	0,330	0,028	8,41	-4,66		
32	3	0,301	0,045	14,94	7,35	100	320
100	3	0,310	0,012	3,97	3,80		
320	3	0,219	0,010	4,14	29,05*		
1000	3	0,118	0,024	20,06	55,16*		
Kontrola	6	0,358	0,015	4,25			
100 µg/l 2,4 D	3	0,369	0,019	5,08	-3,44	1000	10000
1000	3	0,323	0,024	7,46	9,51		
10000	3	0,269	0,021	7,99	24,67*		
Kontrola	6	0,357	0,015	4,25			
1000 µg/l dikamba	3	0,352	0,006	1,61	1,33	10000	>10000
5000	3	0,384	0,010	2,68	-7,60		
10000	3	0,387	0,013	3,43	-7,55		

## 8. Prilog

Tabela 8.3 (d). Relativna stopa rasta (RGR) na osnovu sveže mase (MSv) za period testa 0-12 odnosno 0-14

RGR MSv							
0-12							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	0,334	0,026	7,70			
80 µg/l atrazin	3	0,291	0,025	8,67	12,68		
160	3	0,210	0,038	18,01	39,99*	80	160
320	3	0,118	0,034	28,70	64,63*		
640	3	0,025	0,054	219,06	92,56*		
1280	3	0,011	0,031	294,16	96,85*		
Kontrola	6	0,355	0,063	0,91			
10 µg/l izoproturon	3	0,347	0,495	7,89	2,26		
32	3	0,384	0,134	1,93	-8,15	100	320
100	3	0,323	0,306	4,87	8,96		
320	3	0,185	0,375	8,94	47,87*		
1000	3	0,132	0,366	10,55	62,96*		
Kontrola	6	0,355	0,010	2,91			
10 µg/l trifluralin	3	0,371	0,010	2,73	-4,45		
32	3	0,346	0,029	8,32	2,49	100	320
100	3	0,357	0,005	1,38	0,52		
320	3	0,226	0,048	21,02	36,42*		
1000	3	0,102	0,020	19,55	71,42*		
0-14							
Kontrola	6	0,368	0,011	2,96			
100 µg/l 2,4 D	3	0,351	0,037	10,53	7,36	1000	10000
1000	3	0,321	0,012	3,71	12,71*		
10000	3	0,210	0,039	18,47	42,85*		
Kontrola	6	0,368	0,011	2,96			
1000 µg/l dikamba	3	0,356	0,012	3,35	3,15	10000	>10000
5000	3	0,382	0,017	4,44	-3,92		
10000	3	0,369	0,004	1,12	2,46		

Tabela 8.3 (e). Relativna stopa rasta (RGR) na osnovu biljne površine (BP) za period testa 0-7

RGR BP 0-7							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	0,306	0,031	10,22			
10 µg/l izoproturon	3	0,259	0,041	15,66	15,14		
32	3	0,317	0,017	5,51	-3,70	100	320
100	3	0,239	0,012	5,16	21,69		
320	3	0,068	0,005	7,35	77,80*		
1000	3	-0,134	0,126	94,49	143,78*		
Kontrola	6	0,310	0,091	29,40			
10 µg/l trifluralin	3	0,325	0,025	7,69	-4,76		
32	3	0,287	0,041	14,34	7,5	100	320
100	3	0,221	0,119	54,03	28,74		
320	3	0,207	0,021	10,15	33,35*		
1000	3	0,034	0,116	345,75	89,15*		
Kontrola	6	0,297	0,024	7,96			
100 µg/l 2,4 D	3	0,273	0,050	18,46	8,14		
1000	3	0,290	0,004	1,43	2,41	1000	10000
10000	3	0,169	0,042	24,88	43,29*		
Kontrola	6	0,297	0,024	7,96			
1000 µg/l dikamba	3	0,309	0,001	0,14	-4,09		
5000	3	0,347	0,028	8,16	-17,00*	10000	>10000
10000	3	0,323	0,014	4,32	-8,75		

Tabela 8.3 (f). Relativna stopa rasta (RGR) na osnovu biljne površine (BP) za period testa 0-12 odnosno 0-14

RGR BP							
0-12							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	4,046	0,170	4,21			
10 µg/l izoproturon	3	3,271	0,464	14,17	19,15*		
32	3	3,984	0,093	2,33	1,52	/	10
100	3	3,364	0,323	9,61	16,87		
320	3	1,367	0,048	3,48	66,21*		
1000	3	-3,075	0,451	14,66	179,00*		
Kontrola	6	0,310	0,009	2,86			
10 µg/l trifluralin	3	0,338	0,003	0,82	-9,17		
32	3	0,320	0,005	1,60	-3,32	100	320
100	3	0,280	0,054	19,09	9,58		
320	3	0,168	0,048	28,78	45,80*		
1000	3	0,014	0,051	370,52	95,57*		
0-14							
Kontrola	6	0,360	0,007	1,87			
100 µg/l 2,4 D	3	0,329	0,045	13,59	8,47	100	1000
1000	3	0,278	0,017	6,22	22,87*		
10000	3	0,151	0,037	24,49	58,11*		
Kontrola	6	0,360	0,007	1,87			
1000 µg/l dikamba	3	0,355	0,005	1,41	1,41	10000	>10000
5000	3	0,367	0,016	4,23	-2,06		
10000	3	0,347	0,019	5,49	17,91		

## 8.4. Prilog 4

Tabela 8.4. Varijabilnost parametara: (a) Y BJ (0-7), (b) Y BJ 0-14, (c) Y MSv 0-7, (d) RGR MSv 0-14, (e) RGR BJ 0-7, (f) RGR BP 0-14 u testovima inhibicije rasta na vrsti *Lemna minor*. Prikazani su: N – broj ponavljanja unutar tretmana, srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV (%) – koeficijent varijacije unutar tretmana i MSD (%) – minimalna statistički značajna razlika izražena kao procenat umanjena u odnosu na kontrolu. Napomena: Y – prinos, BJ – broj jedinki, MSv – sveža masa, BP – biljna površina

Tabela 8.4 (a). Prinos (Y) na osnovu broja jedinki (BJ) za period testa 0-7

		Y BJ					
		0-7					
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	104,17	25,701	24,67			
80 µg/l atrazin	3	73,00	19,453	26,65	29,92*		
160	3	36,00	2,127	19,80	65,44*	/	80
320	3	7,83	4,622	59,01	92,48*		
640	3	3,67	2,160	58,92	96,48*		
1280	3	3,67	1,722	44,93	96,32*		
Kontrola	6	99,33	23,298	23,38			
10 µg/l izoproturon	3	59,67	16,452	24,54	39,93*		
32	3	86,33	6,809	7,88	13,09	/	10
100	3	63,67	8,736	13,72	35,91*		
320	3	8,67	2,07	24,02	91,28*		
1000	3	-1,00	0,00	0,00	101,00*		
Kontrola	6	98,33	23,226	23,62			
10 µg/l trifluralin	3	113,67	24,712	22,62	-15,59		
32	3	89,67	31,660	35,31	8,81	100	320
100	3	93,00	9,000	9,68	5,42		
320	3	43,67	3,512	8,04	55,59*		
1000	3	15,67	4,726	30,16	84,07*		
Kontrola	6	57,50	6,656	11,58			
100 µg/l 2,4 D	3	54,00	1,723	3,21	6,09		
1000	3	36,33	2,887	7,95	36,81*	100	1000
10000	3	20,67	3,215	15,55	64,06*		
Kontrola	6	57,50	6,656	11,58			
1000 µg/l dikamba	3	59,00	6,083	10,31	-2,61		
5000	3	70,33	13,051	18,56	-22,32	10000	>10000
10000	3	55,00	1,000	1,82	4,35		

Tabela 8.4 (b). Prinos (Y) na osnovu broja jedinki (BJ) za period testa 0-12 odnosno 0-14

		Y BJ					
		0-12					
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	501,00	100,729	20,21			
80 µg/l atrazin	6	318,67	58,538	18,37	36,39*		
160	6	182,50	45,364	24,86	65,57*	/	80
320	6	62,33	25,193	40,42	87,56*		
640	6	23,83	7,223	30,30	95,24*		
1280	6	17,50	8,430	48,18	96,51*		
Kontrola	6	1104,33	56,191	5,09			
10 µg/l izoproturon	3	746,33	356,061	47,71	32,42		
32	3	1074,00	43,311	4,03	2,75	32	100
100	3	668,33	176,652	26,43	39,48*		
320	3	116,67	19,661	16,85	89,44*		
1000	3	-6,33	4,044	63,81	100,57*		
Kontrola	6	1103,33	56,190	5,09			
10 µg/l trifluralin	3	1317,00	89,815	6,82	-19,97		
32	3	1039,00	292,976	28,20	5,83	100	320
100	3	1120,67	168,047	15,00	-1,57		
320	3	203,00	135,180	66,59	81,60*		
1000	3	15,33	5,033	32,83	98,61*		
		0-14					
Kontrola	6	951,67	113,701	11,95			
100 µg/l 2,4D	3	718,67	360,545	50,17	24,48	100	1000
1000	3	356,67	37,807	10,60	62,52*		
10000	3	89,67	40,377	45,03	90,58*		
Kontrola	6	951,67	113,702	11,95			
1000 µg/l dikamba	3	796,33	58,311	7,32	16,32	10000	>10000
5000	3	1183,67	337,602	28,52	-24,38		
10000	3	838,00	79,507	9,49	11,94		

Tabela 8.4 (c). Prinos (Y) na osnovu sveže mase (MSv) za period testa 0-7

Y MSv (mg)							
0-7							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	216,40	79,506	36,74			
80 µg/l atrazin	3	74,52	26,659	35,77	65,57*		
160	3	16,00	9,796	61,28	92,61*	/	80
320	3	-6,73	3,491	51,85	103,11*		
640	3	-9,32	2,226	24,28	104,31*		
1280	3	-9,25	2,612	28,24	104,28*		
Kontrola	6	118,77	36,19	5,09			
10 µg/l izoproturon	3	55,80	6,06	47,71	53,02*		
32	3	105,47	3,305	4,03	11,20	/	10
100	3	48,43	6,649	26,43	59,22*		
320	3	4,7	9,656	16,85	96,04*		
1000	3	6,83	4,039	63,81	94,25*		
Kontrola	6	130,46	31,367	24,04			
10 µg/l trifluralin	3	158,43	31,805	20,07	-21,44		
32	3	104,00	50,020	48,10	20,28	100	320
100	3	132,00	29,013	21,98	-1,18		
320	3	45,90	3,081	6,71	64,82*		
1000	3	21,43	4,120	19,22	83,57*		
Kontrola	6	170,00	26,21	4,74			
100 µg/l 2,4D	3	128,81	31,12	4,65	-6,08	100	1000
1000	3	92,40	17,25	1,50	20,16*		
10000	3	58,80	3,45	2,46	49,22*		
Kontrola	6	170,00	26,21	4,77			
1000 µg/l dikamba	3	108,60	29,14	11,60	6,16	10000	>10000
5000	3	142,00	40,00	0,95	-22,70*		
10000	3	145,30	53,12	9,62	-22,52*		

## 8. Prilog

Tabela 8.4 (d). Prinos (Y) na osnovu sveže mase (MSv) za period testa 0-12 odnosno 0-14

Y MSv (mg)							
0-12							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	649,08	147,319	22,70			
80 µg/l atrazin	3	371,38	52,348	14,10	42,78*		
160	3	165,95	43,000	25,91	74,43*	/	80
320	3	45,47	24,241	53,32	93,00*		
640	3	7,12	9,990	140,37	98,90*		
1280	3	0,73	9,057	1235,06	99,89*		
Kontrola	6	1166,33	78,810	6,76			
10 µg/l izoproturon	3	634,13	271,000	42,74	45,63*		
32	3	1192,43	154,475	12,96	-2,24	/	10
100	3	634,173	216,443	34,10	45,58*		
320	3	73,13	30,475	41,67	93,73*		
1000	3	32,70	13,648	41,76	97,20*		
Kontrola	6	1166,33	78,810	6,76			
10 µg/l trifluralin	3	1578,20	208,736	13,23	-35,31		
32	3	1048,60	474,908	45,29	10,09	100	320
100	3	1383,27	140,652	10,17	-18,60		
320	3	192,00	116,322	60,58	83,54*		
1000	3	27,27	9,135	33,50	97,66*		
0-14							
Kontrola	6	1784,90	205,000	11,50			
100 µg/l 2,4D	3	1487,50	764,000	51,41	16,66	100	1000
1000	3	956,11	90,000	9,21	46,40*		
10000	3	204,02	10,400	50,82	88,54*		
Kontrola	6	1784,90	205,000	11,50			
1000 µg/l dikamba	3	1470,50	188,00	12,70	17,61	10000	>10000
5000	3	2242,02	631,00	28,15	-25,65		
10000	3	1859,05	154,000	8,28	-4,20		



Tabela 8.4 (e). Prinos (Y) na osnovu biljne površine (BP) za period testa 0-7

Y BP (cm <sup>2</sup> )							
0-7							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	3,97	1,250	31,55			
10 µg/l izoproturon	3	2,20	2,201	38,16	44,51		
32	3	3,69	0,364	9,98	6,90	1000	>1000
100	3	2,36	0,566	24,05	40,38		
320	3	0,27	0,041	15,36	93,32		
1000	3	-0,23	58,442	174,37	105,70		
Kontrola	6	6,54	5,910	90,34			
10 µg/l trifluralin	3	5,37	1,387	25,80	17,84		
32	3	3,62	1,723	47,58	44,64	1000	>1000
100	3	3,63	1,394	38,43	44,56		
320	3	3,67	3,476	94,72	43,91		
1000	3	0,04	0,988	2240,92	99,33		
Kontrola	6	3,03	0,614	20,31			
100 µg/l 2,4D	3	2,59	1,109	42,86	14,43	1000	10000
1000	3	2,83	0,099	3,50	6,49		
10000	3	0,98	0,404	41,27	67,61*		
Kontrola	6	3,02	0,614	20,31			
1000 µg/l dikamba	3	3,06	0,383	12,53	-1,10	10000	>10000
5000	3	4,33	0,944	21,83	-43,00*		
10000	3	3,72	0,242	6,50	-23,13		

Tabela 8.4 (f). Prinos (Y) na osnovu biljne površine (BP) za period testa 0-12 odnosno 0-14

Y BP (cm <sup>2</sup> )							
0-12							
Tretman	N	Srednja vrednost	sd	CV (%)	Inh. (%)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
Kontrola	6	54,62	9,177	16,80			
10 µg/l izoproturon	3	26,02	10,515	40,42	52,37*		
32	3	50,47	4,631	9,18	7,61	/	10
100	3	28,19	10,156	36,03	48,39*		
320	3	3,26	0,194	5,93	94,03*		
1000	3	-0,40	0,023	-5,85	100,73*		
Kontrola	6	53,12	7,967	15,00			
10 µg/l trifluralin	3	68,14	3,107	4,56	-28,28*		
32	3	46,06	6,514	14,14	13,28	100	320
100	3	52,00	7,917	15,22	2,10		
320	3	5,52	3,270	59,27	89,61*		
1000	3	-0,012	0,860	2464,83	100,02*		
0-14							
Kontrola	6	65,56	7,740	11,81			
100 µg/l 2,4D	3	48,64	30,297	62,28	28,82	/	100
1000	3	20,88	5,345	25,61	68,16*		
10000	3	3,35	1,924	57,75	94,90*		
Kontrola	6	65,56	7,740	11,81			
1000 µg/l dikamba	3	56,67	7,498	13,24	13,57	10000	>10000
5000	3	70,99	14,956	21,08	-8,27		
10000	3	56,00	11,053	19,74	14,59		

## Biografija

Varja Knežević je rođena 1985. godine u gradu Beogradu, gde je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. 2004. godine je upisala osnovne studije iz ekologije i zaštite životne sredine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. 2009. godine je odbranila diplomski, a godinu dana kasnije, 2010. godine, master rad, oba pod mentorstvom prof. dr Ivane Teodorović. Tokom master studija je



postala deo tima Laboratorije za ekotoksikologiju na matičnom Fakultetu, prvo kao istraživač pripravnik, a kasnije kao istraživač saradnik, u kom zvanju je i danas. Nakon završetka master studija upisuje doktorske studije iz ekoloških nauka, takođe na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, i nastavlja svoj istraživački rad iz oblasti akvatične toksikologije. Od 2011. godine je zaposlena na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom “Uticaj vodenog matriksa i fizičko-hemijskih osobina relevantnih organskih ksenobiotika na ekotoksičnost i ponašanje u odabranim procesima prečišćavanja voda”, pod rukovodstvom prof. dr Ivane Ivančev Tumbas. Autor je i koautor tri rada objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja, sa SCI liste, kao i 14 prezentacija na međunarodnim kongresima.

Bila je angažovana u držanju praktične nastave na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, i to u periodu od 2010. do 2013. godine iz predmeta Ekotoksikologija studentima 4. godine na obrazovnom profilu dipl. ekolog i zaštita životne sredine, a od 2010. do 2012. godine iz predmeta Morfologija i sistematika beskičmenjaka i Zoologija beskičmenjaka studentima 1. godine obrazovnog profila dipl. biolog, odnosno dipl. ekolog i zaštita životne sredine.

Od 2010. godine je član Udruženja za ekotoksikologiju i hemiju životne sredine (engl. *Society for Environmental Toxicology and Chemistry*, SETAC), a u periodu od 2011. do 2015. godine član studentskog saveta Evrope navedenog Udruženja (engl. *Student Advisory Council Europe*, SAC Europe). U februaru 2017. godine postaje član Stručnog saveta za sredstva za zaštitu bilja, u okviru Uprave za zaštitu bilja Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Varja Knežević
Mentor MN	dr Ivana Teodorović, redovni profesor
Naslov rada: NR	„Potencijal oporavka akvatičnih vrsta makrofita <i>Lemna minor</i> Linnaeus (Lemnaceae, 1753) i <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Velloso) Verdcourt (Haloragaceae, c. 1880), od toksičnog stresa nakon izlaganja odabranim herbicidima i njihovim smešama“
Jezik publikacije: JP	srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2017
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja (8), strana (147), broj lit. citata (203), tabela (35), slika (41), grafika (-), priloga (4)

Naučna oblast: NO	Ekološke nauke
Naučna disciplina: ND	Zaštita životne sredine
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Smeše herbicida, prirodna organska materija, biljke, oporavak
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>Akvatični ekosistemi su izloženi simultanom delovanju velikog broja potencijalno toksičnih supstanci u vremenski i prostorno promenljivim uslovima u životnoj sredini. U ovoj disertaciji je poređen efekat pojedinačnih herbicida – atrazina, izoproturona i trifluralina – sa efektima njihovih smeša u testu sa <i>Lemna minor</i>. Odabrane su smeše sa sličnim (dvo-komponentna smeša atrazina/izoproturona) i različitim (dvo-komponentna smeša atrazina/trifluralina i izoproturona/trifluralina, kao i tro-komponentna smeša) mehanizmom toksičnog dejstva. Kako se sve češće ističe neophodnost sagledavanja ne samo potencijalnih razlika u toksikološkoj osetljivosti jedinki/populacija, već i razlika u efikasnosti njihovog oporavka, u ovoj disertaciji, je određen potencijal oporavka vrste <i>L. minor</i> nakon izloženosti navedenim pojedinačnim herbicidima/smešama. Ispitano je da li prirodna organska materija (POM), koja je u testovima na akvatičnim makrofitama simulirana preko huminskih materija (HM) u realnim koncentracijama u površinskim vodama, modulira toksičnost atrazina i 2,4 D, i njihove dvo-komponentne smeše, u testu sa <i>L. minor</i>, odnosno izoproturona, dikambe i njihove dvo-komponentne smeše, u testu sa <i>Myriophyllum aquaticum</i>. Utvrđen je stepen odstupanja između empirijske toksičnosti svih navedenih smeša herbicida, sa teorijski očekivanim vrednostima na osnovu modela adicije koncentracija (CA), u testovima na obe vrste akvatičnih makrofita. Ispitano je da li se postojeći CA model može koristiti i za procenu toksičnog dejstva smeša uzimajući u obzir integralno i podatke o oporavku eksponiranih vrsta akvatičnih makrofita. Rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da modifikacijom laboratorijskog protokola gde se oporavak akvatičnih makrofita pratio tokom dodatnih pet/sedam dana testa nakon sedmodnevne ekspozicije se mogu dobiti ekološki relevantni podaci o odloženom toksičnom dejstvu pojedinačnih supstanci/smeša. U testu sa atrazinom i izoproturonom, kao pojedinačnim supstancama, je uočen efikasan oporavak vrste <i>L. minor</i>. Sa druge strane, u slučaju trifluralina i 2,4 D u periodu oporavka je zabeleženo odloženo toksično dejstvo. Na primeru trifluralina i 2,4 D se pokazalo da standardni</p>

testovi toksičnosti, zanemarujući podatke o potencijalu oporavka, mogu potceniti realan rizik od pesticida. U slučaju drugog sintetičkog auksina, dikambe, pri izabranoj seriji koncentracija nije zabeleženo toksično dejstvo na vrstu *L. minor*. Odgovor vrste *L. minor* na dejstvo dvo-komponentne smeše atrazina i izoproturona je sličan onom zabeleženom u testu sa navedenim herbicidima, kao pojedinačnim supstancama. Zabeležen je efikasan oporavak biljne kulture, nezavisno od primenjene koncentracije herbicida u smeši. Sa druge strane, oporavak vrste *L. minor* nakon izloženosti dvo- i tro-komponentnim smešma sa trifluralinom zavisi od primenjene koncentracije herbicida u smeši i zabeležen je jedino u tipu smeša gde su koncentracije pojedinačnih herbicida bliske relativno bliske mogućim koncentracijama herbicida u životnoj sredini. Povećanje toksičnosti pojedinačnih supstanci/smeša uslovljeno prisustvom HM je primećena u slučaju atrazina, 2,4 D i njihove dvo-komponentne smeše, u testu na vrsti *L. minor*, odnosno dikambe u testu sa *M. aquaticum*. Suprotan efekat HM je primećen u testu sa *M. aquaticum* u slučaju izoproturona i dvo-komponentne smeše izoproturona i dikambe, jer je zabeležena niža toksičnost u prisustvu HM. Iako određene razlike u toksičnosti između ispitivanih test tretmana u prisustvu i odsustvu HM postoje, one nisu bile statistički značajne. Oporavak akvatičnih makrofita od efekta dvo-komponentnih smeša, u prisustvu/odsustvu HM, zavisi od primenjene koncentracije herbicida u smeši. Izuzetak čini dvo-komponentna smeša atrazina i 2,4 D, u testu sa *L. minor*, gde nije došlo do oporavka biljne kulture ni u jednom od tipova smeša u prisustvu HM. Generalno, uočena je dobra saglasnost između empirijske i predviđene toksičnosti, na osnovu CA modela, nezavisno od mehanizma toksičnog dejstva supstanci prisutnih u smeši ili prisustva odnosno odsustva HM. Odstupanje od aditivnosti je zabeleženo jedino u testu sa *L. minor* u slučaju dvo-komponentnih smeša sa trifluralinom (atrazin+trifluralin i izoproturon+trifluralin), gde se ispostavilo da CA model u određenoj meri potcenjuje dejstvo navedenih smeša, što upućuje na pojavu sinergističkih interakcija između supstanci. Pokazano je i da se CA model može alternativno koristiti za procenu toksičnosti odabranih smeša, na osnovu integralnih saznanja o osetljivosti i potencijalu oporavka eksponiranih jedinki/populacija, pod uslovom da su dostupni takvi podaci za pojedinačne susptance koje ulaze u sastav smeše.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	26.05.2016.
Datum odbrane: DO	

Članovi komisije:  
KO

predsednik: dr Milan Borišev, vanredni profesor, uža naučna oblast Fiziologija biljaka, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

član: dr Aleksandra Tubić, docent, uža naučna oblast Zaštita životne sredine, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

član: dr Dragana Šunjka, docent, uža naučna oblast Fitofarmacija, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

član/mentor: dr Ivana Teodorović, redovni profesor, uža naučna oblast Zaštita životne sredine, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES

WORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph type
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Varja Knežević
Mentor: MN	Dr. Ivana Teodorović, Full Professor
Title: TI	„Recovery potential of aquatic macrophyte species <i>Lemna minor</i> Linnaeus (Lemnaceae, 1753) and <i>Myriophyllum aquaticum</i> (Velloso) Verdcourt (Haloragaceae, c. 1880), from toxic stress after exposure to individual herbicides and their mixtures“
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Physical description: PD	chapters (8), pages (147), references (203), tables (35), figures (41), graphs (-), supplemental data (4)



Scientific field: SF	Ecology
Scientific discipline: SD	Environmental sciences
Subject, Key words: SKW	Herbicide mixtures, natural organic matter, plants, recovery
Holding data: HD Note	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	No
<p>Abstract:</p> <p>Aquatic ecosystems are exposed to a simultaneous effect of a large number of potentially toxic substances in a temporally and spatially variable conditions in the environment. In this doctoral thesis, the effect of the individual herbicides atrazine, isoproturon, and trifluralin was compared with the effect of their mixtures, in the test with <i>Lemna minor</i>. Mixtures with a similar (binary mixture of atrazine/isoproturon) and dissimilar (binary mixtures with atrazine/trifluralin, isoproturon/trifluralin, and ternary mixture) mode of action were selected. There is a clear need to take into account not only the differences in toxicological sensitivity of the exposed individuals/populations, but also the differences in their recovery efficiency. Therefore, in this thesis, <i>L. minor</i> recovery potential was assessed after the exposure to the individual herbicides/mixtures. It was tested whether a natural organic matter (NOM), which was, in these tests, simulated through the humic matter (HM) used in real concentrations in surface waters, modulated the toxicity of atrazine, 2,4 D, and their binary mixture, in tests with <i>L. minor</i>, and isoproturon, dicamba and their binary mixture, in tests with <i>Myriophyllum aquaticum</i>. The deviation between the empirical toxicity of the herbicidal mixtures and the predicted toxicity based on the concentration addition (CA) model was determined. It was also examined whether the current CA model can be used to predict mixture toxic effects by taking into account the information about the plant recovery potential as well. The results showed that by modifying laboratory protocols, where the recovery of aquatic macrophytes was followed for additional five/seven days after the seven day exposure, environmentally relevant data on delayed toxic effects of the individual substances/mixtures can be obtained. In the tests with atrazine and isoproturon as individual substances, the efficient recovery of <i>L. minor</i> was observed. On the other hand, in the case of trifluralin and 2,4 D, delayed toxic effects were recorded during the recovery period. In the test with trifluralin and 2,4 D, it was shown that standard toxicity tests may underestimate the real risk of pesticides by not considering data on recovery. In the case of another synthetic auxin, dicamba, toxic effect on <i>L. minor</i> was not reported in the selected concentration series. The response of <i>L. minor</i> after the exposure to</p>	

binary mixtures of atrazine and isoproturon was similar to the one recorded in the tests with these herbicides as the individual substances. Efficient plant recovery was recorded, regardless of the applied herbicide concentration in the mixture. On the other hand, the recovery of *L. minor* after exposure to binary and ternary mixtures with trifluralin depended on the applied herbicide concentration in the mixture, and was recorded only in the type of mixtures where the concentrations of the individual herbicides were close to the possible concentration of these herbicides in the environment. The toxicity increase of the individual substances/mixtures, influenced by the presence of HM was observed in the case of atrazine, 2,4 D, and their binary mixture, in the test with *L. minor*, that is, dicamba, in the test with *M. aquaticum*. In the test with *M. aquaticum*, the opposite effect was observed in the case of isoproturon and binary mixture of isoproturon and dicamba, due to lower toxicity being recorded in the presence of HM. Even though some differences in toxicity between the test treatments in the presence and absence of HM were recorded, the differences were not statistically significant. The recovery of macrophytes after the exposure to the binary mixtures, in the presence/absence of HM, depended on the applied herbicide concentration in the mixture. The exception was noticed in the test with *L. minor* in the binary mixture with atrazine and 2,4 D, where no recovery was recorded in any type of the mixture in the presence of HM. Generally, there was a good agreement between the empirical toxicity and the predicted one based on the CA model, regardless of the mode of action of the toxic substances present in the mixture, or presence/absence of HM. The deviation from additivity was recorded only in the test with *L. minor* in the case of the binary mixture with trifluralin (atrazine/trifluralin and isoproturon/trifluralin), which meant that the CA model underestimated the mixture effect to a certain extent, suggesting that synergistic interaction between the substances might have appeared. It was also shown that the CA model may alternatively be used for the assessment of toxicity of the selected mixture, based on the integrated knowledge of both sensitivity and recovery potential of the exposed species/populations, providing that such information about individual substances in the mixture exists.

Accepted on Scientific Board on: AS	26.05.2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Dr. Milan Borišev, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad;</p> <p>Member: Dr. Aleksandra Tubić, Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad;</p> <p>Member: Dr. Dragana Šunjka, Assistant</p>

	<p>Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad;</p>
--	---

	<p>Member/Mentor: Dr. Ivana Teodorović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.</p>
--	--