

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

53. konferencija o aktuelnim temama korišćenja i zaštite voda

VODA 2024

The 53rd Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society

WATER 2024

Conference Proceedings



Palić, 27. – 29. maj 2024.



www.sdzv.org.rs

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY



INŽENJERSKA KOMORA SRBIJE

II

IZDAVAČ (*PUBLISHER*):

Srpsko društvo za zaštitu voda, Kneza Miloša 9/1, Beograd, Srbija,
Tel/Faks: (011) 32 31 630

PROGRAMSKI ODBOR (*PROGRAMME COMMITTEE*):

Prof. dr Branislav ĐORĐEVIĆ, dipl.inž.građ, Beograd
Prof. dr Božo DALMACIJA, dipl.hem, Novi Sad
Dr Momir PAUNOVIĆ, naučni savetnik, dipl.biol, Beograd
Dr. Bela CSÁNYI, dipl.biol, Budimpešta-Mađarska
Prof. dr Peter KALINKOV, dipl.inž.građ, Sofija-Bugarska
Prof. dr Valentina SLAVEVSKA STAMENKOVIĆ, dipl.biol, Skoplje-R.Makedonija
Prof. Dr. Goran SEKULIĆ, dipl.inž.građ, Podgorica-Crna Gora
Prof. dr Violeta CIBULIĆ, dipl.hem, Beograd
Prof. dr Slavka STANKOVIĆ, dipl.inž.tehnol, Beograd

UREDNIK (*EDITOR*): Dr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl. građ.inž.

RECENZENTI (*Reviewers*):

Dr Zorana NAUNOVIĆ, dipl.inž.tehnol, Univerzitet u Beogradu – Građevinski fakultet
Dr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl. građ.inž, Univerzitet u Beogradu – Građevinski fakultet
Dr Aleksandar JOKSIMOVIĆ, dipl.biol, Univerzitet Crne Gore, Kotor-Crna Gora
Dr Božica VASILJEVIĆ, dipl.biol, Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Dr Maja RAKOVIĆ, dipl.biol, Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Svi radovi u ovom zborniku radova su recenzirani. Stavovi izneti u ovoj publikaciji ne odražavaju nužno i stavove izdavača, urednika ili programskog odbora.

TIRAŽ (*CIRCULATION*): 150 primeraka

ŠTAMPA: "Akademska izdanja", Zemun, 2024

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

502.51(082)
556.11(082)
628.3(082)
628.1(082)

ГОДИШЊА конференција о актуелним проблемима коришћења и заштите вода (53 ; 2024 ; Палић)

Voda 2024 : zbornik radova 53. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda = Water 2024 : conference proceedings 53rd Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society, Palić, 27-29. maj 2024. / [urednik, editor Aleksandar Đukić]. - Beograd : Srpsko društvo za zaštitu voda, 2024 (Zemun : Akademska izdanja). - X, 372 str. : ilustr. ; 24 cm

Tiraž 150. - Str. IX: Predgovor / Aleksandar Đukić. - Bibliografija uz svaki rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-82674-01-6

a) Воде -- Зборници б) Отпадне воде -- Зборници в) Снабдевање водом -- Зборници

COBISS.SR-ID 145168649

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

ZBORNIK RADOVA

**53. GODIŠNJE KONFERENCIJE O AKTUELNIM TEMAMA
KORIŠĆENJA I ZAŠTITE VODA**

VODA 2024

*53RD ANNUAL CONFERENCE OF THE
SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY
"WATER 2024"
CONFERENCE PROCEEDINGS*

Palić, 27. – 29. maj 2024.

ORGANIZATOR KONFERENCIJE (*CONFERENCE ORGANISERS*):

Srpsko društvo za zaštitu voda (Beograd),

uz podršku

Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije i
Inženjerske komore Srbije

ORGANIZACIONI ODBOR KONFERENCIJE (*ORGANIZING COMMITTEE*):

PREDSEDNIK: Dr Momir PAUNOVIĆ, dipl.biol, Beograd

SEKRETAR: Suzana VASIĆ, Beograd

ČLANOVI:

Dr Branko MILJANOVIĆ, dipl.biol, Novi Sad

Dr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl.grad.inž, Beograd

Slavica ŽIVKOVIĆ, Beograd

Dr Maja RAKOVIĆ, dipl. biol, Beograd

ODRŽAVANJE KONFERENCIJE SU POMOGLI (*SPONSORED BY*):

- Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije
- Inženjerska komora Srbije

Slika na koricama: jezero Palić (fotografija A.Đukić)

PROCENA EKOLOŠKOG POTENCIJALA MARKOVAČKOG JEZERA – NOVI PRISTUP U BIOMONITORINGU

Miloš Ćirić*, Clarisse Lemonnier**, Benjamin Alric***,
Biljana Dojčinović*, Jelena Avdalović*, Srđan Miletić*,
Vladimir Petrović****, Željka Milovanović****,
Danijela Vidaković*****, Aleksandra Marković*,
Frédéric Rimet**, Andreas Ballot*****

- * *Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Centar za hemiju, Njegoševa 12, Beograd, Srbija (ORCID: 0000-0002-6835-3385; email: ciric@ihm.bg.ac.rs, ORCID: 0000-0003-1479-8060; ORCID: 0000-0001-9917-7997; ORCID: 0000-0002-7263-2686; ORCID: 0000-0003-2718-173X)*
- ** *UMR CARTELE, INRAE, Savoie-Mont Blanc University, Thonon-les-Bains cedex, France (ORCID: 0000-0001-7665-6872)*
- *** *UMR CARTELE, INRAE, Savoie-Mont Blanc University, Thonon-les-Bains cedex, France; Pôle R&D ECLA Ecosystèmes Lacustres, France (ORCID: 0000-0003-2774-0546)*
- **** *Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Centar za ekologiju i tehnoeconomiku, Njegoševa 12, Beograd, Srbija (ORCID: 0000-0003-0745-4008 i ORCID: 0000-0002-1998-5239)*
- ***** *Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Centar za hemiju i inženjering životne sredine, Centar za hemiju, Njegoševa 12, Beograd, Srbija (ORCID: 0000-0002-8696-7743)*
- ***** *Norwegian Institute for Water Research – NIVA, Oslo, Norway (ORCID: 0000-0002-4088-0677)*

REZIME

Napredak u molekularnoj biologiji doveo je do snažnog razvoja molekularnih metoda u biomonitoringu. Metabarkoding je procedura zasnovana na upotrebi DNK molekula koja može da dopuni ili čak potpuno zameni klasičan biomonitoring u skorijoj budućnosti. Sproveli smo istraživanje fitoplanktonske zajednice, važnog biološkog parametra kvaliteta, u Markovačkom jezeru sa ciljem da uporedimo tradicionalni i molekularni pristup u biomonitoringu. Ukupno smo pronašli 105 sekvenci algi i cijanobakterija, ali usled nepotpunosti baze, lista taksona dobijena metabarkodingom je nepotpuna. Iako se rezultati metabarkodinga trenutno ne mogu koristiti za procenu ekološkog statusa u Republici Srbiji, primena molekularnog pristupa u biomonitoringu je obećavajuća.

KLJUČNE REČI: metabarkoding, fitoplankton, ekološki potencijal, biomonitoring, Markovačko jezero

ECOLOGICAL POTENTIAL ASSESSMENT OF MARKOVAČKO LAKE – A NEW APPROACH IN BIOMONITORING

ABSTRACT

The advancement in molecular biology resulted in development of molecular methods in biomonitoring. Metabarcoding is a DNA based procedure that can supplement or even replace classical biomonitoring in the near future. We conducted a study of phytoplankton, an important biological quality element, in Markovačko lake aiming to compare morphological and metabarcoding approach in biomonitoring. In total, 105 sequences were obtained, but due to the incompleteness of the reference library the metabarcoding taxonomic list was not comprehensive. Although, the metabarcoding results can not be currently used for ecological status assessment in the Republic of Serbia, its application in biomonitoring is promising.

KEY WORDS: metabarcoding, phytoplankton, ecological potential, biomonitoring, Markovačko lake

UVOD

Evropska okvirna direktiva o vodama (EU WFD), kao krovni dokument za zaštitu voda u Evropi, ima za cilj postizanje dobrog ekološkog statusa, ekološkog potencijala i hemijskog statusa površinskih i podzemnih voda, uključujući i zaštićena područja (European Commission, 2000). Republika Srbija, iako nije članica Evropske Unije (EU), od 2012. godine sprovodi monitoring vodnih tela uzimajući u obzir preporuke, mere i procedure navedene u EU WFD (Ćirić i sar., 2018).

U većini evropskih zemalja, uključujući i Republiku Srbiju, trenutno se za procenu ekološkog statusa koriste indeksi zasnovani na tradicionalnom, morfološko-taksonomskom pristupu. Ovaj postupak uključuje sakupljanje organizama na njihovom staništu i transport do laboratorije gde se njihova identifikacija i brojanje sprovode koristeći specijalizovane mikroskope (Rimet i sar., 2018). Međutim, obrada uzoraka na tradicionalan način ima nekoliko nedostataka od kojih su najvažniji: 1) dugotrajna obrada uzoraka i 2) sve izraženiji nedostatak stručnjaka taksonoma za pojedine grupe organizama (Rimet i sar., 2018). Kako bi prevazišli ove izazove, naučnici su počeli da razvijaju nove metode zasnovane na molekularno genetičkim analizama sa ciljem da u početku dopune, a kasnije i potpuno zamene klasične tehnike biomonitoringa (Hering i sar., 2018). Metabarkoding je metoda koja najviše obećava i zasnovana je na sledećim koracima: 1) izolacija sredinske DNK (npr. DNK molekula sakupljenih iz vode), 2) umnožavanje fragmenata gena koji je karakterističan za ciljnu biološku zajednicu PCR metodom (npr. rbcL marker za silikatne alge), 3) sekvenciranje umnoženih fragmenata i 4) bioinformatička analiza čiji je krajnji rezultat lista sekvenci povezanih sa naučnim imenima taksona u referentnim bibliotekama gena (Pawlowski i sar., 2018).

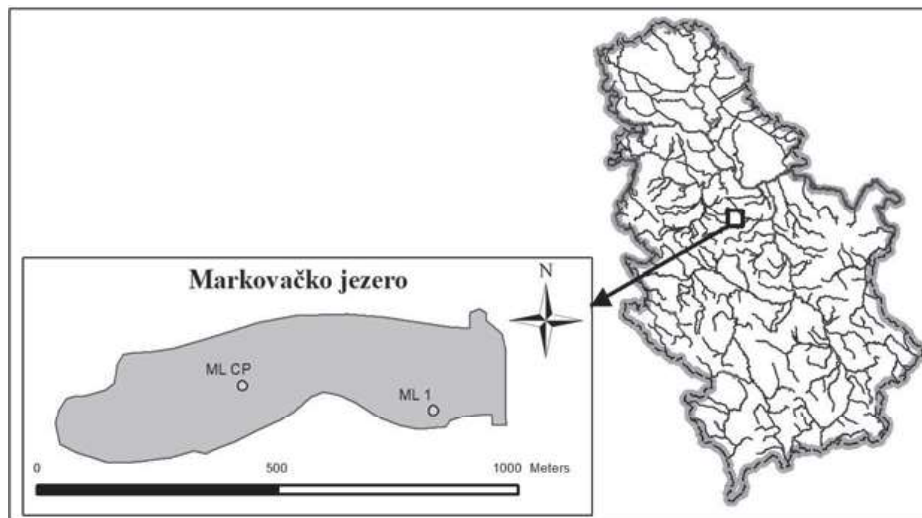
Fitoplankton predstavlja važan biološki element kvaliteta površinskih voda i obavezan parametar koji se koristi u biomonitoringu i proceni ekološkog statusa/potencijala jezera (Canino et al., 2021). U nekim državama su razvijeni specijalizovani indeksi bazirani na fitoplanktonu, dok se u drugim primenjuju jednostavniji pristupi. Na primer, u Mađarskoj se koristi Hungarian lake phytoplankton index tj. HLPI indeks (Borics et al., 2018). S druge strane, u Republici Srbiji se za određivanje klase ekološkog statusa/potencijala koristi procentualni udeo euglenoidnih algi i cijanobakterija u ukupnoj biomasi fitoplanktona (Sl. glasnik, 2011).

BIOLAWEB projekat koji je počeo 01. oktobra 2022. godine ima za cilj unapređenje biomonitoringa zasnovanog na DNK metodama kroz zajedničko istraživanje Univerziteta u Beogradu, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju sa vodećim partnerskim institutima - Francuskim nacionalnim institutom za poljoprivredu, hranu i životnu sredinu (French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment - INRAE) i Norveškim institutom za istraživanje vode (Norwegian Institute for Water Research - NIVA). Istraživanja uključuju razvoj molekularno genetičkih metoda u analizi fitoplanktona, fitobentosa i makrofitske vegetacije.

U ovom radu su prikazani prvi rezultati metabarkodiranja fitoplanktonske zajednice jednog jezera u Republici Srbiji koji su proizašli iz BIOLAWEB projekta.

MATERIJAL I METODE

Uzorci fitoplanktona i vode za hemijsku analizu sakupljeni su u avgustu 2023. godine sa dva mesta u Markovačkom jezeru (selo Markovac, Srbija) [ML1-N44°23'20.14"E20°39'31.54"; MLCP-N44°23'23.14" E20°39'16.75"] (Slika 1).



Slika 1. Pozicija Markovačkog jezera u Srbiji (desno) i izgled obale (levo); tačke označavaju mesta uzorkovanja
Figure 1. Position of Markovačko lake in Serbia (right) with coastal line (left); dots indicate sampling sites.

Temperatura vode i providnost su mereni "in situ", dok su uzorci vode sakupljeni za analizu sledećih parametara: pH, rastvoreni kiseonik, provodljivost, karbonati, bikarbonati, hloridi, sulfati, amonijak, nitriti, nitrati, ukupan azot, fosfati, ukupan fosfor, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i hlorofil *a*.

pH vrednost je izmerena na pH-metru INOLAB pH 730, WTW. Specifična provodljivost ($\mu S/cm$) uzoraka urađena je prema standardnoj metodi (U.S. EPA, 1982) pomoću konduktometra LF 191, WTW. Sadržaj rastvorenog kiseonika ($mg\ O_2/L$) u uzorcima površinske vode urađen je po Winkler-ovoj metodi (APHA, 2015b). Koncentracija ortofosfata i ukupnog fosfora u uzorcima vode uređena je na UV-Vis spektrofotometru, Lambda 25/35/45, Perkin Elmer, na talasnoj dužini od 880 nm po metodi ISO 6878 (2004). Koncentracije karbonata i bikarbonata (HCO_3^- , CO_3^{2-} , mg/L) su izmerene po metodi (APHA, 2015a) na osnovu stehiometrijskih odnosa p- i m-alkaliteta. Koncentracije katjona (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) su izmerene po metodi U.S. EPA (2001) pomoću analitičke tehnike induktivno kuplovana plazma sa optičkom emisijom spektrometrijom (ICP-OES) na instrumentu model: iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, United Kingdom). Kalibracija je urađena pomoću sertifikovanog multielementarnog standardnog rastvora: Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®, 1000 $\mu g/ml$ (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany). Kvantifikacija je urađena na sledećim talasnim dužinama: Ca II 315.887 nm, Mg I 285.213 nm, Na I 818.326 nm i K I 769.896 nm. Kontrola kvaliteta (*QA, Quality Control*) analitičkog procesa je obezbeđena korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala (*CRM, certified reference material*): EPA Method 200.7 LPC Solution (ULTRA Scientific, USA). Izmerene koncentracije su pokazale prinos standarda (*recovery*) u opsegu od 99–101%. Koncentracije hlorida, sulfata, nitrita, nitrata i amonijum-jona (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) su izmerene po metodi U.S. EPA (1997a) korišćenjem jenskog hromatografskog sistema DIONEX ICS 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Ukupan azot je određivan prema metodi ISO 11905-1 (1997). Određivanje hlorofila *a* je izvedeno na UV-Vis spektrofotometru model Evolution™ 220 (Thermo Scientific, USA), na talasnim dužinama 750, 665 i 664 nm prema U.S. EPA (1997b).

Za kvalitativnu (mikroskopsku) analizu algi i cijanobakterija, uzorci su sakupljeni pomoću fitoplanktonske mrežice, sa promerom okaca od 20 μm . Za kvantitativnu (mikroskopsku) analizu, organizmi fitoplanktonske zajednice sakupljeni su pomoću plastičnog creva uzimanjem integralnog uzorka vodenog stuba u eufotičnoj zoni (određenoj kao $2 \times$ providnost vode merene Secchi diskom) i fiksirani Lugolovim rastvorom. Alge i cijanobakterije su identifikovane korišćenjem svetlosnog mikroskopa Leica DM750 (Leica Microsystems) i objektiva HI PLAN 40/0.65 na uveličanju $400\times$. Planktonski organizmi su brojani u komorici (Hydro-Bios, Kiel, Germany) nakon sedimentacije od 24 h pomoću invertnog mikroskopa INVE 500T (COLO Lab Experts, Slovenija) prema metodi Utermöhl (1958). Biomasa pojedinačnih taksona je dobijena množenjem abundance tog taksona (obično broja ćelija) i zapremine ćelije koja je preračunata koristeći geometrijske aproksimacije oblika individualnih ćelija (Hillebrand i sar., 1999).

Uzorci vode (200 mL) za molekularnu analizu fitoplanktona filtrirani su na terenu pomoću 0,45 µm filtera (Sterivex, Millipore) prema protokolu razvijenom od strane instituta INRAE (The French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment, link protokola: https://www.youtube.com/watch?v=x_t0-063Qno). DNK je izolovana iz uzoraka pomoću NucleoSpin soil kit-a (Macherey-Nagel) prema uputstvima proizvođača. Kao marker za procenu diverziteta odabran je fragment gena za 23s rRNK, koji je umnožen korišćenjem para prajmera opisanih od strane Canino i sar. 2023 (ECLA23S_F1 (5'-ACAGWAAGACCCTATGAAGCTT-3') ECLA23S_R1 (5'-CCTGTTATCCCTAGAGTAACTT-3')). Pre PCR amplifikacije, DNK je kvantifikovana pomoću NanoDrop spektrofotometra (NanoDrop ONE, Thermo Scientific). Za umnožavanje DNK PCR metodom korišćeno je 25 µL ukupne reakcione smeše: po 5 µL prajmera (*forward* i *reverse*, 1 µM), 12.5 µL KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche Molecular Systems, Inc) i 2.5 µL DNK uzorka (konc. 5 ng/µL). Temperaturni profil reakcije sastojao se iz početne denaturacije matrice i aktivacije HotStart DNK Polimeraze na 95°C u trajanju od 3 min, 30 ciklusa sačinjenih od denaturacije na 95°C u trajanju od 30s, praćene hibridizacijom prajmera na 58°C i elongacijom na 72°C, takođe u trajanju po 30s, i završne elongacije na 72°C u trajanju od 5 minuta. Umnoženi DNK fragmenti poslani su na sekvenciranje pri PGTB platformi (Plateforme de Génomique et Transcriptomique, Bordeaux, France) pomoću MiSeq tehnologije (Illumina, SY-410-1003) uz korišćenje v3 kita sa reagensima. Očekivan prosečan broj očitanih sekvenci po uzorku iznosio je 50 000. Podaci dobijeni sekvenciranjem su obrađeni bioinformatičkim postupkom opisanim u radu Nicolosi Gelis i sar. (2024), a za povezivanje sekvenci sa odgovarajućim taksonima korišćena je Phytool aplikacija (Canino i sar., 2021).

REZULTATI I DISKUSIJA

FIZIČKO-HEMIJSKI PARAMETRI

Rezultati merenja fizičkih i hemijskih parametara za ispitivane uzorke voda Markovačkog jezera (tačke ML-1 i ML-CP) su dati u Tabeli 1. U tabeli su date pojedinačne vrednosti za svaki uzorak, kao i srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Izmerene vrednosti se odnose na letnju sezonu, za uzorke koji su uzeti za analizu dana 22.08.2023.

pH vrednosti u uzorcima vode iz Markovačkog jezera ukazuju na blago alkalnu vodu. Provodljivost vode odražava nivo jona rastvorenih u vodi, a visoka vrednost može ukazivati na prisustvo soli ili drugih rastvorenih materija. Provodljivost vode u Markovačkom jezeru je bila 252 µS/cm u trenutku uzorkovanja, što predstavlja vodu sa srednjom koncentracijom rastvorenih soli u površinskim vodama. Rastvoren kiseonik je od vitalnog značaja za život organizama u vodi, jer većina vodenih organizama zahteva određeni nivo kiseonika za disanje. U uzorcima vode sa Markovačkog jezera vrednosti rastvorenog kiseonika su bile 7,96 i 7,89 mg O₂/L. Ovi parametri su bitni kao deo monitoringa kvaliteta vode radi zaštite ekosistema i ljudskog zdravlja.

Tabela 1. Rezultati merenja fizičkih i hemiskih parametara za uzorke vode Markovačko jezero (tačke ML-1 i ML-CP), datum uzorkovanja 22.08.2023.

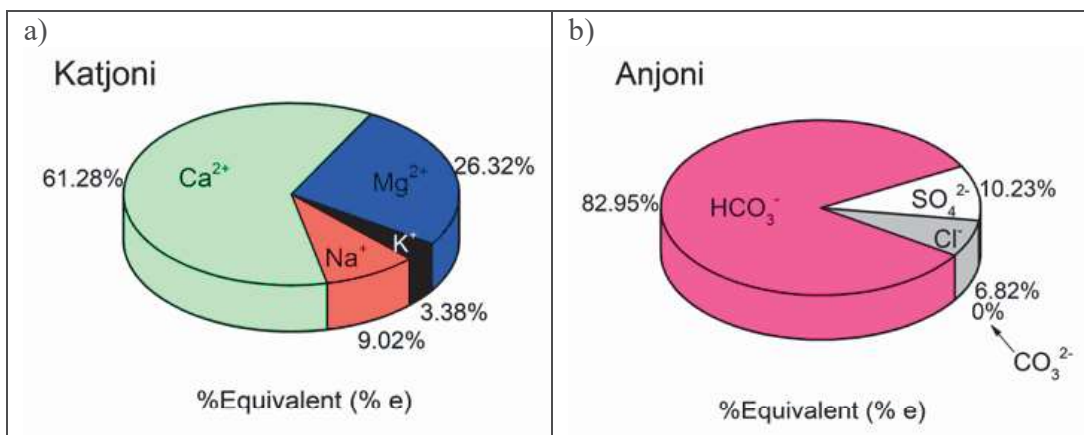
Table 1. Results of measurement of physical and chemical parameters for water samples of Lake Markovačko (points ML-1 and ML-CP), sampling date 08/22/2023.

Parametar	Skraćenica	Jedinica	Vrednost		Srednja vrednost ± SD*
			ML-1	ML-CP	
T vode	T	°C	27,0	29,0	28,0 ± 1,4
Providnost	TRANS	m	0,90	0,88	0,89 ± 0,01
pH	pH	(-)	7,930	8,148	8,039 ± 0,154
El. provodljivost	COND	µS/cm	252	252	252 ± 0
Kiseonik (rastvoreni)	DO	mg/L	7,96	7,89	7,93 ± 0,05
Kalijum	K ⁺	mg/L	3,56	3,47	3,52 ± 0,06
Natrijum	Na ⁺	mg/L	5,63	5,34	5,49 ± 0,21
Kalcijum	Ca ²⁺	mg/L	32,97	32,52	32,75 ± 0,32
Magnezijum	Mg ²⁺	mg/L	8,75	8,36	8,56 ± 0,28
Karbonati	CO ₃ ²⁻	mg/L	0	0	0
Bikarbonati	HCO ₃ ⁻	mg/L	176,9	179,4	178,2 ± 1,8
Amonijum-jon	NH ₄ ⁺	mg/L	<0,01	<0,01	<0,01
Nitriti	NO ₂ ⁻	mg/L	<0,01	0,01	0,01 ± 0,01
Nitrati	NO ₃ ⁻	mg/L	0,24	0,22	0,23 ± 0,01
Azot (ukupan)	TN	N mg/L	1,0	0,7	0,9 ± 0,2
<i>o</i> -Fosfati	P-PO ₄ ³⁻	P mg/L	<0,01	<0,01	<0,01
Fosfor (ukupan)	TP	P mg/L	<0,01	<0,01	<0,01
Hloridi	Cl ⁻	mg/L	8,6	8,5	8,6 ± 0,1
Sulfati	SO ₄ ²⁻	mg/L	17,16	17,79	17,48 ± 0,45
Hlorofil a	Chl <i>a</i>	µg/L	5,81	7,48	6,65 ± 1,18

*SD-standardna devijacija

Na osnovu izmerenih srednjih vrednosti za koncentracije neorganskih katjona i anjona (Tabela 1) u uzorcima voda, izračunata je zastupljenost svakog od njih (Slika 1). Koncentracije su izražene u % Equivalent (% e) i predstavljaju procenete ekvivalentnog zbira ukupnih katjona ili anjona.

Kalcijum je dominantan katjon u vodi Markovačkog jezera. Njegov procenat ekvivalentnog zbira ukupnih katjona dostigao je 61,3%. Sadržaj magnezijumovih jona je okvirno duplo niži u odnosu na kalcijum (26,3%). Koncentracija natrijuma je oko 10%, a kalijuma 3,4%. Bikarbonat je dominantan anjon u ispitivanoj jezerskoj vodi. Njegova koncentracija je čak skoro 83 % e. Koncentracija sulfata iznosi 10,2 % e, a koncentracija hlorida iznosi 6,8 % e. Na izmerenoj pH vrednosti vode (pH<8,3), karbonati ne mogu biti prisutni, što je eksperimentalno i potvrđeno. Može se zaključiti da ispitivana voda Markovačkog jezera, pripada klasi kalcijum-bikarbonatnih voda, prema dominantnoj zastupljenosti katjona i anjona.



Slika 1. Zastupljenosti neorganskih a) katjona i b) anjona u vodi Markovačkog jezera, izraženo u % Equivalent (% e)
 Figure 1. Concentrations of inorganic a) cations and b) anions in the water of Lake Markovac, expressed in % Equivalent (% e)

Određivanje koncentracije hlorofila *a* daje informaciju o kvantitetu i potencijalnoj fotosintetskoj aktivnosti fitoplanktona. Takođe, ovaj podatak u površinskim vodama ukazuju na njihov stepen trofičnosti. Dakle, na osnovu dobijene srednje vrednosti koncentracije hlorofila *a* možemo zaključiti da je Markovačko jezero u trenutku ispitivanja (avgust 2023. godine) imalo mezotrofan status (OECD, 1982).

ANALIZA FITOPLANKTONA

U Markovačkom jezeru zabeleženo je ukupno 38 različitih taksona iz 7 razdeli algi (Chlorophyta, Euglenophyta, Bacillariophyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Xanthophyta i Dinophyta) uključujući cijanobakterije (Cyanobacteria) koristeći klasičan morfološki (mikroskopski) pristup. Najveći broj taksona (18) zabeležen je u grupi zelenih algi. S druge strane, metabarkoding analizom zabeleženo je ukupno 105 sekvenci iz sledećih grupa (Cyanobacteria, Chlorophyta, Bacillariophyta, Chrysophyta, Cryptophyta, Euglenophyta i Rhodophyta). Najveći broj različitih sekvenci zabeležen je među cijanobakterijama (28) i zelenim algama (21), s tim da je manji broj sekvenci povezan sa odgovarajućim imenom taksona u Phytool bazi podataka. Na primer, u uzorku sakupljenom na mestu ML1, zabeleženo je 28 različitih sekvenci cijanobakterija, od kojih se samo 19 podudara sa sledećim rodovima u bazi: *Cyanobium*, *Microcystis* i *Pseudanabaena*. Iako je metabarkoding analizom zabeležen manji broj taksona u Markovačkom jezeru u odnosu na morfološku analizu, stepen podudaranja je visok, naročito na nivou roda.

Rezultati kvantitativne analize fitoplanktona po Utermöhl-u (1958) pokazuju da cijanobakterije dominiraju u zajednici po broju ćelija na oba mesta uzorkovanja, ispred zelenih i silikatnih algi (Tabela 2).

Tabela 2. Procentualni udeo razdela u ukupnoj abundanci (br. ćelija/mL) na dva mesta uzorkovanja (ML1 i MLCP) u Markovačkom jezeru
 Table 2. Percentage of divisions in total abundance (cells/mL) on two sampling sites (ML1 i MLCP) in Markovačko lake

Razdeo	ML1	MLCP
Cyanobacteria	98,0	94,2
Bacillariophyta	0,6	1,4
Chrysophyta	0,1	0,1
Chlorophyta	1,0	3,1
Euglenophyta	0,3	0,6
Cryptophyta	0,0	0,6
Xanthophyta	0,0	0,0
Dinophyta	0,0	0,0
Ukupno	100,0	100,0

Ako se pogledaju rezultati metabarkoding analize, cijanobakterije takođe dominiraju po broju očitanih sekvenci (eng. reed), dok su na drugom mestu silikatne alge (Tabela 3).

Tabela 3. Procentualni udeo sekvenci (broj očitavanja, eng. reeds) po razdelima na dva mesta uzorkovanja (ML1 i MLCP) u Markovačkom jezeru
 Table 3. Percentage of sequences per divisions in total reeds on two sampling sites (ML1 i MLCP) in Markovačko lake

Razdeo	ML1	MLCP
Cyanobacteria	42,3	52,6
Bacillariophyta	25,5	25,9
Chrysophyta	7,7	6,0
Chlorophyta	7,6	7,2
Euglenophyta	7,4	0,8
Cryptophyta	5,8	1,9
Rhodophyta	0,2	0,1
Ukupno	96,3	99,9

Procena ekološkog potencijala akumulacija tj. značajno izmenjenih vodnih tela zasnovana je na procentualnom udelu cijanobakterija u ukupnoj biomasi fitoplanktona, ukupnoj abundanci izraženoj u broju ćelija po mL i vrednosti hlorofila a. Klasična kvantitativna analiza fitoplanktona Markovačkog jezera pokazala je da procentualni udeo cijanobakterija ne prelazi 20% (Tabela 4), da je abundanca fitoplanktona ispod 15000 ćel/mL i da hlorofil a ne prelazi 50 µg/L (Tabela 1). Tako, rezultati analize fitoplanktona ukazuju da Markovačko jezero pripada III klasi ekološkog potencijala. S druge strane, iako se rezultati metabarkoding analize donekle podudaraju sa podacima o abundanci dobijenim morfološkom analizom, oni se ne mogu direktno primeniti na definisane parametre ocene ekološkog potencijala. Ipak, novi pravci razvoja metabarkodinga uključuju istraživanje gena koji se pojavlju u genomima algi i cijanobakterija sa samo jednom kopijom i ukoliko ova istraživanja uspeju mogu predstavljati prekretnicu u biomonitoringu.

Tabela 3.4 Procentualni udeo razdela u ukupnoj biomasi (mg/L) na dva mesta uzorkovanja (ML1 i MLCP) u Markovačkom jezeru
 Table 4. The percentage share of the division in the total biomass (mg/L) at the two sampling sites (ML1 and MLCP) in Lake Markovac

Razdeo	ML1	MLCP
Cyanobacteria	19,4	2,0
Bacillariophyta	0,6	49,1
Chrysophyta	2,0	0,2
Chlorophyta	40,0	30,2
Euglenophyta	37,8	14,8
Cryptophyta	0,2	3,7
Xanthophyta	0,0	0,0
Dinophyta	0,0	0,0
Ukupno	100,0	100,0

ZAKLJUČAK

Metabarkoding analiza fitoplanktona Markovačkog jezera pokazala je manji broj taksona u odnosu na klasičnu mikroskopsku analizu usled nekompletnosti baze sekvenci. Ipak, postoji zadovoljavajući nivo preklapanja inventarnih lista dobijenih pomoću ove dve metode. Da bi se metabarkoding podaci mogli koristiti u biomonitoringu jezera i akumulacija, potrebno je prilagoditi parametre ocene ekološkog statusa/potencijala novim indeksima baziranim na DNK pristupu.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansirala Evropska Unija kroz Horizon Europe program istraživanja i inovacija (BIOLAWEB twinning projekat, broj opšteg ugovora 101079234). Istraživanje je podržalo Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (451-03-66/2024-03/200026).



**Finansira
Evropska Unija**

LITERATURA:

- APHA 2015a. "2320 B. Titration Method." Washington D.C.
 APHA 2015b. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-. No: 4500-O C. Winkler Method, Azide Modification." Washington D.C
 Borics, G., Wolfram, G., Chiriac, G., Belkinova, D., Donabaum, K. and Poikane, S. (2018) Intercalibration of the national classifications of ecological status for Eastern Continental lakes: Biological quality Element: Phytoplankton, Publications Office of the European Union, JRC Technical Reports

- Canino, A., Bouchez, A., Laplace-Treyture, C., Domaizon, I. and Rimet, F., Phytool, a ShinyApp to homogenize taxonomy of freshwater microalgae from DNA barcodes and microscopic observations, *Metabarcoding and Metagenomics* 5 (2021), 199–205
- Canino, A., Lemonier, C., Alric, B., Bouchez, A., Domaizon, I., Laplace-Treyture, C. and Rimet, F., Which barcode to decipher freshwater microalgal assemblages? Tests on mock communities, *Int. J. Lim.* 59 (2023)
- Ćirić, M., Nikolić, N., Krizmanić, J., Gavrilović, B., Pantelić, A., Petrović, M. V., Diatom diversity and ecological status of the Lasovačka and Lenovačka streams near Zaječar: consideration of WFD implementation in Serbia, *Archives of Biological Sciences* 70 (2018) 691–698
- European Commission (2000) European Commission, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy, *Official Journal of the European Union L* 327/1, 1–72
- Hering, D., Borja, A., Jones, J.I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., and Bruce, K. et al., Implementation Options for DNA-Based Identification into Ecological Status Assessment under the European Water Framework Directive, *Water Research* 138 (2018), 192–205
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U. and Zohary, T., Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae, *Journal of Phycology* 35 (2) (1999), 403–24
- ISO 6878 (2004) Determination of total phosphorus (TP): Ammonium molybdate spectrometric method, European Committee for Standardization, Brussels
- ISO 11905-1 (1997) Water quality - Determination of nitrogen - Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate
- Nicolosi Gelis, M. M., Canino, A., Bouchez, A., Domaizon, I., Laplace-Treyture, C., Rimet, F. and Alric, B., Assessing the relevance of DNA metabarcoding compared to morphological identification for lake phytoplankton monitoring, *Science of the Total Environment* 914 (2024)
- OECD (1982) Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control, Organisation de Coopération et de Développement Economiques, 134 pp, Paris
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéoz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A. et al., The Future of Biotic Indices in the Ecogenomic Era: Integrating (e)DNA Metabarcoding in Biological Assessment of Aquatic Ecosystems, *Science of the Total Environment* 637–638 (2018) 1295–1310
- Rimet, F., Vasselon, V., A.-Keszte, B. and Bouchez, A., Do We Similarly Assess Diversity with Microscopy and High-Throughput Sequencing? Case of Microalgae in Lakes, *Organisms Diversity and Evolution* 18 (2018) 51–62
- Sl. glasnik (2011) “Pravilnik o Parametrima Ekološkog i Hemijskog Statusa Površinskih Voda i Parametrima Hemijskog i Kvantitativnog Statusa Podzemnih Voda.” *Sl. Glasnik RS*, Broj 74/2011
- U.S. EPA (1982) Method 120.1: Methods for Chemical Analysis Of Water and Wastes, EPA-600/4-79-020. Cincinnati, OH
- U.S. EPA. (1997a) Method 300.1: Determination of Inorganic Anions in Drinking Water by Ion Chromatography. Revision 1.0. Cincinnati, OH
- U.S. EPA (1997b) Method 446.0: In Vitro Determination of Chlorophylls a, b, c + c and Pheopigments in Marine And Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-15/005
- U.S. EPA. (2001) Method 200.7: Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, Revision 5.0. Cincinnati, OH