



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Јелена Томовић

**ЕКОЛОГИЈА, БИОДИВЕРЗИТЕТ И КОНЗЕРВАЦИЈА
СЛАТКОВОДНИХ ШКОЉКИ ФАМИЛИЈЕ UNIONIDAE У СРБИЈИ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015.

I Аутор	
Име и презиме: Јелена Томовић	
Датум и место рођења: 02.06.1978. године, Косовска Митровица	
Садашње запослење: истраживач сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитет у Београду	
II Докторска дисертација	
Наслов: Екологија, биодиверзитет и конзервације слатководних шкољки фамилије Unionidae у Србији	
Број страница: 157	
Број слика: 52 табеле, 53 слике	
Број библиографских података: 243	
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет	
Научна област (УДК): Општа екологија, Биоекологија, Хидробиологија, Биогеографија (574). Природа. Изучавање и чување природе. Заштита природе и живог света (502/504)	
Ментор: Проф. др Владица Симић, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет	
III Оцена и одбрана	
Датум пријаве теме: 17.10.2013. године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	
- Др Владица Симић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине; - Др Момир Пауновић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитет у Београду, ужа научна област: Биологија (Хидроекологија); - др Јасна Лајтнер, доцент на Биолошком одсеку Природословно-математичког факултета Свеучилишта у Загребу, ужа научна област Малакологија – биологија и екологија слатководних мекушаца.	
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:	
Др Владица Симић, редовни професор, ментор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине Др Момир Пауновић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитет у Београду, ужа научна област: Биологија (Хидроекологија); др Јасна Лајтнер, доцент на Биолошком одсеку Природословно-математичког факултета Свеучилишта у Загребу, ужа научна област Малакологија – биологија и екологија слатководних мекушаца	
Датум одбране докторске дисертације:	

Мојим родитељима и сестри

Захвалница

Истраживања обављена у циљу израде ове докторске дисертације реализована су у оквиру пројеката „Биосенсинг технологије и глобални систем за континуирана истраживања и интегрисано управљање екосистемима“ ИИИ 43002 и „Мерење и моделирање физичких, хемијских, биолошких и морфодинамичких параметара река и водних акумулација“ ТР 37009 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Податаке и материјал коришћене у овом раду уступили су и колега *Борис Новаковић* из Републичког хидрометеоролошког завода, односно Агенције за заштиту животне средине и колеге са Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

Велику захвалност дугујем ментору *др Владици Симићу*, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на великом поверењу које ми је указао, идејама приликом избора теме, на помоћи и подршци у свим фазама израде докторске дисертације.

Др Момиру Пауновићу, вишем научном сараднику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, веома сам захвална на великој помоћи у свим фазама израде докторске дисертације, изузетном залагању, безрезервној подршци и указаном поверењу од самог почетка.

Др Јасни Лајтнер, доценту на Биолошком одсеку Природословно-математичког факултета Свеучилишта у Загребу, изузетно сам захвална што је прихватила да буде део Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације. Захваљујем се на свим сугестијама, предлозима и корекцијама које су знатно помогле и унапредиле изглед овог рада.

Посебну захвалност дугујем *др Ани Петровић*, асистенту на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, на подршци, разумевању и несебичној помоћи током реализације ове докторске дисертације.

Захваљујем се и *др Види Јојић*, научном сараднику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, на великом стрпљењу и несебичној помоћи при тумачењу резултата геометријске морфометрије.

Захвалност дугујем и *др Зорану Гачићу*, научном саветнику Института за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду, на великом интересовању за мој рад, драгоценим саветима и помоћи у разумевању статистичких анализа.

Професорки *др Бранки Вуковић Гачић*, шефу Катедре за микробиологију и *др Стоимиру Коларевићу*, асистенту на Биолошком факултету Универзитета у Београду, захваљујем се на лепој и успешној сарадњи и подршци током реализације рада.

Музејском саветнику *др Биљани Митровић* и кустосу *Марку Раковићу* из Природњачког музеја у Београду, захвална сам на великој помоћи приликом рада са музејском збирком.

Драгим колегама са Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу *Александри, Симони, Невени, Наташи, Милени* и *Марку* велико хвала на разумевању и подршци.

Посебно сам захвалана колегиницама и колегама са Одељења за хидроекологију и заштиту вода ИБИСС, *Бојани, Весни, Маји, Наташи, Јелени, Маргарети, Јелени, Николи* и *Стефану*, на лепој сарадњи, веселој атмосфери и великој подршци. Колеги *Вањи* и колегиници *Марији*, неизмерно се захваљујем на драгоценој помоћи коју су ми пружили када је било најпотребније, на великом подстицају и разумевању. Дивним колегиницама и пријатељицама *Катарини, Ани* и *Божичи*, изузетно сам захвална на помоћи и подршци током свих година заједничког рада, као и током израде дисертације. Без вас би рад на овом докторату био сасвим сигурно много тежи.

На крају, захвалност дугујем мојој породици на стрпљењу, подршци и, пре свега, великој љубави коју ми пружају.

Јелена Томовић

Екологија, биодиверзитет и конзервација слатководних шкољки фамилије Unionidae у Србији

Резиме:

Слатководне шкољке из фамилије Unionidae, представљају једну од најзначајнијих и широко распрострањених компонената водених екосистема копнених вода. Еколошка улога ове таксономске групе у воденим екосистемима је од великог значаја, с обзиром да представља битан елемент структуре и функције бентосних заједница. Разноврсност и распрострањење унионида, до сада, није адекватно проучено у Србији, како у погледу броја врста, тако и у односу на опште познавање распрострањења појединих врста и фактора који утичу на појаву таксона и густину популација.

Циљеви овог истраживања били су: преглед укупног броја врста у Србији; анализа структуре и динамике популација унионида; дефинисање односа врста и најзначајнијих параметара окружења; анализа морфолошке варијабилности различитих популација, применом метода геометријске и традиционалне морфометрије и као крајњи циљ, процена ризика од изумирања акватичних врста на националном нивоу и предлог стратегије конзервације.

Материјал коришћен за анализу прикупљен је при реализације више националних и међународних пројеката у периоду 2001.-2013. година. Осим савремених истраживања, анализом су обухваћени и историјски подаци, добијене на основу прегледа доступне збирке Анте Тадића, Природњачког музеја у Београду, из периода 1953.-1972.

Свеобухватном анализом материјала, на простору Србије је утврђено присуство 7 врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae, сврстаних у четири рода. Највећи диверзитет и бројност популације забележени су у доњим токовима великих равничарских река (зони потамона). У раду је дат детаљан преглед састава заједница истраживаних сливова, са приказом таксономских и еколошких карактеристика појединачних врста.

Поредећи историјске податке о налазима врста и савремена истраживања, уочене су промене у величини ареала и популационој динамици појединих таксона. Значајно смањење ареала, односно потпуно повлачење са простора где је некада налажена, утврђено је за врсту *A. sugna*, а као њени рефугијуми могу се означити лентички екосистеми какве су акумулације, језера и барско мочварна подручја у Србији.

На основу историјских података утврђено је да је врста *U. crassus* некада била широко распрострањена и једна од најприсутнијих врста на целом подручју Србије до средине 70-их година прошлог века. Након тог периода, истраживањима извршеним у последњих неколико декада, уочен је пад бројности популације ове врсте и само спорадични налази на ограниченом простору. Најновија истраживања указују на позитиван популациони тренд ове врсте, при чему се нарочито издваја слив Саве.

Испитивање односа присутних врста према физичко-хемијским карактеристикама воде на анализираним локалитетима, показало је да су најважнији

физичко-хемијски параметри: концентрација калцијума, укупна тврдоћа воде, ВРК, НРК, концентрација нитрата и амонијум јона. Резултати канонијске кореспондентне анализе указују на очекивано већу осетљивост врсте *U. crassus* на ВРК5, НРК, концентрацију нитрата и амонијум јона, односно већу толеранцију врсте *A. anatina* на поменуте факторе.

Као најзначајнији параметри утицаја на заједницу слатководних шкољки, из групе тешких метала, издвајају се концентрације бакра, олова и кадмијума у води. Резултати канонијске кореспондентне анализе указују на повећану осетљивост врсте *U. crassus* на ове факторе, док је већа толеранција утврђена за *A. anatina*.

Применом метода геометријске морфометрије, анализирана је варијабилност величине и облика левог капка љуштуре различитих популација савремених узорака шкољки и анализа јединки које су припадале музејским узорцима. Геометријско морфометријском анализом рецентних узорака потврђено је постојање статистички значајних међупопулационих разлика у варијабилности величине и облика морфолошких структура. Анализом варијабилности морфолошких структура узорака из музејске збирке, применом метода геометријске морфометрије, није потврђено постојање значајних разлика у варијабилности величине и облика различитих подврста, изузев у случају *U. tumidus*.

Анализом варијабилности љуштуре на основу девет дужинских карактера, применом традиционалног морфометријског приступа, утврђено је постојање међупопулационих разлика и сличан тренд одступања као и при геометријско морфометријској анализи.

Применом модификованог модела ESHIPPO-PD, утврђен је ризик од изумирања и приоритет конзервације на локалном нивоу за анализиране врсте. За *U. crassus*, *P. complanata* и *A. cygnea* одређен је први степен приоритета заштите, односно висок ниво ризика од изумирања на националном нивоу. Умерени ризика од изумирања (II степен приоритета конзервације) оцењен је за врсте *U. pictorum* и *A. anatina*, док се за *U. tumidus* уочава да је ризик од изумирања мањи (III степен приоритета заштите). Анализом елемената модела (ES+HIPPO+PD), издвајају се фактори који највише утичу на угроженост датих врста и на тај начин омогућавају дефинисање адекватних мере конзервације на националном нивоу.

Ecology, biodiversity and conservation of freshwater mussels family Unionidae in Serbia

Summary:

Freshwater mussels from the family Unionidae, represent one of the most significant and widespread components of inland water ecosystems. Ecological role of this taxonomic group within water ecosystems is of great significance being an important structural and functional element of benthic communities. The diversity and distribution of Unionidae have not been researched adequately so far in Serbia, neither the species richness, nor general distribution of individual species and factors affecting the emergence of the taxon and populations density.

The aims of this research were: review of total number of species in Serbia; analysis of structure and dynamics of Unionidae populations; definition of relations between species and most significant environment parameters; morphological variability analysis of different populations applying the method of geometric and traditional morphometrics and, as the final aim, risk evaluation regarding aquatic species extinction on national level and a conservation strategy recommendation.

Material used for analysis was collected during the realization of several national and international projects during the period 2001-2013. Besides contemporary researches, the analysis also includes historical data obtained from available collection of Ante Tadić from the Natural History Museum in Belgrade, period 1953-1972.

A thorough material analysis in the region of Serbia led to the determination of presence of 7 fresh water mussels species from family Unionidae, classified into 3 genera. The highest diversity and population abundance were recorded in lower parts large lowland rivers (potamon zone). The detailed overview of communities composition found in the investigated river basins with a review of taxonomic and ecological traits of individual species was presented.

The comparison of historical data and contemporary investigations shows there are changes in habitat size and population dynamics of individual taxons. Significant reduction in the habitat size, i.e. complete retreat from the area where it used to be found earlier was determined for the species *A. cygnea* and lentic ecosystems can be marked as their refugium, such as accumulations, lakes, marsh and swamp regions in Serbia.

Based on historical data, it was determined that *U. crassus* species used to be widespread and one of the most represented species in whole region of Serbia until mid-1970's. After that period, in the investigations carried out during last several decades, the decrease in the number of this population was observed, as well as only sporadic findings in a limited area. The latest investigations indicate to a positive population trend of this species, especially in the Sava river basin.

The investigation of relations among present species based on physical and chemical characteristics of water in analyzed localities has shown that the most important physical and chemical parameters are as follows: Calcium concentration, total water hardness, BPK5, HPK, nitrate concentration and ammonium ion concentration.

The results of canonical correspondence analysis indicate to an expectedly higher sensitivity of species *U. crassus* to BPK, HPK, nitrates and ammonium ion concentration, i.e. greater tolerance of species *A. anatina* to the above listed factors.

The parameters with the most significant influence on freshwater mussels community among the group of heavy metals are the concentrations of copper, lead and cadmium in water. The results of canonical correspondence analysis indicate to an increased sensitivity of species *U. crassus* to these factors, while a greater tolerance of species *A. anatina* to these factors was recorded.

Using geometric morphometrics method, the size and shape variability of shell left valva of different contemporary shell populations samples were analyzed, as well as the specimens belonging to museum samples. Geometric morphometrics analysis of recent samples confirms the existence of statistically significant intrapopulation differences in size and shape variability of morphological structures. Morphological structures variability analysis of museum samples, applying the geometric morphometrics method, does not confirm the existence of significant differences within variability of size and shape of various varieties, except in the case of *U. tumidus*.

Using shell variability analysis based on nine linear characters, applying the traditional morphometric approach, the existence of intrapopulation differences was determined, as well as a similar trend of deviations like in geometric morphometrics analysis.

Applying the modified model ESHIPPO-PD, the risk of extinction and the priority of conservation on a local level were determined for the analyzed species. The first level of protection priority was determined for *U. crassus*, *P. comlanata* and *A. cygnea*, i.e. high extinction risk at local level. A moderate risk (the second level of conservation priority) was estimated for species *U. pictorum* and *A. anatina*, while the extinction risk is lower for *U. tumidus* (the third level of protection priority). The analysis of element included in model ES+HIPPO+PD, singles out the factor of greatest influence on endangeredness of given species and therefor enables the definition of adequate conservation measures at national level.

САДРЖАЈ

1. Увод.....	1
1.1. Фамилија Unionidae.....	2
1.2. Биодиверзитет и распрострањење	6
1.3. Традиционална и геометријска морфометрија	9
1.4. Преглед литературних података	11
1.4.1. Историјат истраживања на глобалном нивоу	11
1.4.2. Преглед истраживања у Србији.....	12
2. Циљеви истраживања	14
3. Материјал и методе	16
3.1. Подручје истраживања.....	17
3.2. Анализирани материјал.....	20
3.3. Методе прикупљања узорака и обрада.....	20
3.3.1. Анализа квантитативних и квалитативних особина заједнице	21
3.5. Морфометријска анализа	25
3.5.1. Линеарна морфометријска анализа	26
3.5.2. Геометријска морфометријска анализа.....	28
3.6. Статистичка обрада података	30
3.6.1. Статистичке анализе и геометријска морфометрија	30
3.6.2. Остале статистичке анализе	32
4. Резултати.....	33
4.1.1. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Дунава	34
4.1.2. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Саве.....	40
4.1.3. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Тисе.....	44
4.1.4. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Велике Мораве	46
4.1.5. Преглед заједнице слатководних шкољки у акумулацијама Гружа и Ћелије	49
4.2. Таксономске и еколошке карактеристике, као и дистрибуција врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae у Србији.....	50
4.2.1. <i>Unio pictorum</i> (Linnaeus, 1758).....	50
4.2.3. <i>Unio crassus</i> Philipsson, 1788	52
4.2.4. <i>Anodonta anatina</i> (Linnaeus, 1758)	54
4.2.5. <i>Anodonta cygnea</i> (Linnaeus, 1758)	55

4.2.6. <i>Pseudanodonta complanata</i> (Rossmässler, 1835)	56
4.2.7. <i>Sinanodonta woodiana</i> (Lea, 1834)	58
4.3. Фаунистичка анализа	61
4.3.1. Анализа утицаја физичко-хемијских параметара воде на испитивану заједницу шкољки	62
4.3.2. Анализа утицаја тешких метала на испитивану заједницу	64
слатководних шкољки.....	64
4.4. Преглед слатководних шкољки према историјским подацима – ревизија музејске збирке.....	66
4.5. Морфометријске анализе	70
4.5.1. Морфометријске анализе рецентних популација	70
4.5.1.1. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација врсте <i>U. tumidus</i>	70
4.5.1.2. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација врсте <i>U. pictorum</i>	75
4.5.1.3. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација врсте <i>U. crassus</i>	79
4.5.1.4. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација рода <i>Unio</i>	83
4.5.2. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација	86
4.5.2.1. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација врсте <i>U. tumidus</i>	86
4.5.2.2. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација <i>U. pictorum</i> ...	87
4.5.2.3. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација <i>U. crassus</i>	89
4.5.2.4. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација <i>S. woodiana</i> ..	90
4.5.2.5. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација <i>A. anatina</i>	92
4.5.3. Морфометријска анализа примерака врста из музејске збирке	93
4.5.3.1. Геометријско морфометријска анализа јединки врсте <i>U. tumidus</i> из музејске збирке	93
4.5.3.2. Геометријско морфометријска анализа јединки врсте <i>U. pictorum</i> из музејске збирке	96
4.5.3.3. Геометријско морфометријска анализа јединки врсте <i>U. crassus</i> из музејске збирке	97
4.5.4. Линеарна морфометријска анализа јединки из музејске збирке	98
4.5.4.1. Линеарна морфометријска анализа музејских примерака <i>U. tumidus</i>	98

4.5.4.2. Линеарна морфометријска јединки врсте <i>U. pictorum</i> из музејске збирке	99
4.5.4.3. Линеарна морфометријска анализа јединки врсте <i>U. crassus</i> из музејске збирке	101
4.6. Процена приоритета конзервације угрожених врста из фамилије Unionidae на локалном нивоу на основу модела ESHIPPO.....	103
5. Дискусија	105
6. Закључци	121
7. Литература	125
8. Прилози	146

Листа табела

Табела 1. Протокол ESHIPPO модела са параметрима за процену еколошке специјализације (ES) и утицаја HIPPO фактора, преузето и прилагођено према Simić и сар., 2007	23
Табела 2. Елементи коришћени у анализи популационе динамике (PD)	24
Табела 3. Бодовна скала за одређивање степена ризика од изумирања и приоритета заштите угрожених врста слатководних шкољки према модификованом моделу ESHIPPO-PD	25
Табела 4. Дужински параметри коришћене за линеарну морфометријску анализу.	27
Табела 5. Преглед анализираних популација савремених узорака.	27
Табела 6. Преглед анализираних јединки из музејске збирке.	28
Табела 7. Тачке позициониране на левом капку љуштуре.....	30
Табела 8. Списак забележених врста шкољки из фамилије Unionidae у Србији	34
Табела 9. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједници Дунава у различитим фазама истраживања и у укупном узорку	39
Табела 10. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједници Саве и Колубаре у различитим фазама истраживања и у укупном узорку.....	43
Табела 11. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједници реке Тисе у различитим фазама истраживања и у укупном узорку.....	45
Табела 12. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједницама Велике Мораве и Западне Мораве	48
Табела 14. Заступљеност врста у односу на карактеристике макро- и микростаништа .	60
Табела 15. Градијент утицаја физичко-хемијских параметара на заједницу слатководних шкољки као резултат селекције претходне селекције	64
Табела 16. Градијент утицаја тешких метала на заједницу слатководних шкољки као резултат селекције (forward selection)	65
Табела 17. Списак забележених таксона на подручју Србије, према историјским подацима из периода 1953.–1972. усаглашени према валидној таксономији.....	67
Табела 18. Приказ присутних/отсутних врста и учесталости појављивања врста у периоду 1953–1972.....	70
Табела 19. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	71
Табела 20. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободе, P – статистичка значајност).....	72
Табела 21. Прокрустовете дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између	

анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.	73
Табела 22. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	75
Табела 23. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободе, P – статистичка значајност).	76
Табела 24. Прокрустове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.	77
Табела 25. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	79
Табела 26. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободе, P – статистичка значајност).	79
Табела 27. Прокрустове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.	81
Табела 28. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	83
Табела 29. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободе, P – статистичка значајност).	83
Табела 30. Прокрустове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.	85
Табела 31. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	87
Табела 32. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	88
Табела 33. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	90
Табела 34. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	91
Табела 35. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	92

Табела 36. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	93
Табела 37. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободe, P – статистичка значајност).	93
Табела 38. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	97
Табела 39. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободe, P – статистичка значајност).	97
Табела 40. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).	98
Табела 41. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободe, P – статистичка значајност).	98
Табела 42. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	99
Табела 43. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	100
Табела 44. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.	102
Табела 45. Степен еколошке специјализације (ES) и утицај HIPPO фактора у процени приоритета конзервације врста	103
Табела 46. Утицај елемената популационе динамике (PD) у процени приоритета конзервације врста	104
Табела 47. Листа присутних врста на подручју Србије, према литературним подацима	107
Прилог 1. Табела 1. Локалитети узорковања у оквиру истраживаних водотокова, у периоду 2001-2013. година.....	147
Прилог 1. Табела 2. Локалитети на којима је прикупљен материјал за музејску збирку у периоду 19.....	149
Прилог 1. Табела 3. Преглед заједнице слатководних шкољки фамилије Unionidae на истраживаним локалитетима.	150
Прилог 1. Табела 4. Приказ заједнице унионида и одабраних физичко-хемијских параметара на истраживаним локалитетима	152
Прилог 1. Табела 5. Приказ заједнице унионида и одабраних елемената из групе тешких метала на истраживаним локалитетима	155

Листа слика

Слика 1. Морфолошке карактеристике унионида (преузето и прилагођено према, Moorkens и Killeen, 2009)	4
Слика 2. Животни циклус унионида (преузето и прилагођено према Reis, 2006).....	5
Слика 3. Ларвени ступањ у развићу шкољки – глохидија (фотографија, М.С. Barnhart) а) изглед глохидија, б) глохидије причвршћене на шкргама риба, в) инкапсулирана глохидија.	6
Слика 4. Диверзитет слатководних шкољки (Bivalvia: Unionoida), преузето и прилагођено према Reis (2010)	8
Слика 5. Приказ локалитета узорковања у оквиру истраживаних водотокова.....	19
Слика 6. Приказ дужинских параметара љуштуре коришћених при линеарној морфометријској анализи.	26
Слика 7. Приказ распореда дводимензионалних тачака позиционираних на левом капку љуштуре.	29
Слика 8. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2001. години	36
Слика 9. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2007. години.	37
Слика 10. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у периоду 2009-2012. година.	38
Слика 11. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2013. години.	39
Слика 12. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку Дунава.....	40
Слика 13. Преглед заједнице у Сави са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у периоду 2001-2010. године.	41
Слика 14. Преглед заједнице у Сави са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2011. години.	41
Слика 15. Преглед заједнице у Сави са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2012. години.	42
Слика 16. Преглед заједнице у Колубари са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима.	43
Слика 17. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку у Сави	44
Слика 18. Преглед заједнице реке Тисе са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима.	45
Слика 19. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку у Тиси	46
Слика 20. Преглед заједница Велике Мораве и Западне Мораве са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима.	48

Слика 21. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку у Великој Морави.....	48
Слика 22. Преглед заједница истраживаних акумулација Гружа и Ћелије са приказом абунданце врста.....	49
Слика 23. Примерак врсте <i>Unio pictorum</i>	50
Слика 24. Примерак врсте <i>Unio tumidus</i>	51
Слика 25. Примерак врсте <i>Unio crassus</i>	52
Слика 26. Примерак врсте <i>Anodonta anatina</i>	54
Слика 27. Примерак врсте <i>Anodonta cygnea</i>	55
Слика 28. Примерак врсте <i>Pseudanodonta complanata</i>	56
Слика 29. Примерак врсте <i>Sinanodonta woodiana</i>	58
Слика 30. Приказ резултата коресподентне анализе (СА) за заједницу слатководних шкољки у простору прве две коресподентне осе. Кодирани су узорци са различитих водотокова (1- Дунав; 2 - Тиса; 3 - Велика Морава; 4 - Западна Морава; 5 - Сава; 6 - Колубара).	61
Слика 31. Приказ резултата канонијске коресподентне анализе (ССА) за заједницу унионидних шкољки и одабраних срединских параметара у простору прве две канонијске коресподентне осе. Вектори су графички приказ значајности параметара: ВРК-5, НРК из КМnО4, концентрације калцијума, нитрата, амонијум јона, раствореног кисеоника и укупна тврдоће. Узорци са различитих водотокова су кодирани (1 - Дунав; 2 - Тиса; 3 - Велика Морава; 4 - Сава).	63
Слика 32. Приказ резултата Канонијско коресподентне анализе (ССА) за заједницу слатководних шкољки и одабраних срединских параметара из групе тешких метала у простору прве две канонијске коресподентне осе. Вектори су графички приказ значајности параметара: бакар, олово, кадмијум.	65
Слика 33. Анализа главних компоненти (РСА) варијабли облика левог капка љуштуре популација врсте <i>U. tumidus</i> . Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.....	71
Слика 34. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између популација врсте <i>U. tumidus</i>	73
Слика 35. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине (ln CS) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних популација.	74
Слика 36. Анализа главних компоненти (РСА) варијабли облика левог капка љуштуре <i>U. pictorum</i> . Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.	75
Слика 37. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између популација врсте <i>U. pictorum</i> са Дунава, Саве и Тисе.	77
Слика 38. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине (ln CS) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних популација.	78

Слика 39. Анализа главних компоненти (PCA) варијабли облика левог капка љуштуре <i>U. crassus</i> . Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.	80
Слика 40. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између популација врсте <i>U. crassus</i>	81
Слика 41. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине (ln CS) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних популација.	82
Слика 42. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између врста <i>U. tumidus</i> , <i>U. pictorum</i> и <i>U. crassus</i>	84
Слика 43. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине (ln CS) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних врста.	85
Слика 44. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте <i>U. tumidus</i> . Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (TUt – популација са Тисе; SUt – популација са Саве; DUt – популација са Дунава).	86
Слика 45. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте <i>U. pictorum</i> . Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (SUp – популација са Саве; TUp – популација са Тисе; DUp – популација са Дунава).	88
Слика 46. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте <i>U. crassus</i> . Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (SMUc – популација са локалитета Сремска Митровица; ĆUc – популација са локалитета Ћуприја; MMUc – популација са локалитета Марковачки Мост).	89
Слика 47. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте <i>S. woodiana</i> . Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (SSw – популација са Саве; VMSw – популација са Велике Мораве; DSw – популација са Дунава).	91
Слика 48. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре популација врсте <i>A. anatina</i> . Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (DAa – популација са Дунава; SAa – популација са Саве).	92
Слика 49. Анализа главних компоненти (PCA) варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте <i>U. tumidus</i> . Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.	94
Слика 50. Дискриминантна анализа варијабилности облика љуштуре две групе јединки музејских примерака врсте <i>U. tumidus</i>	95
Слика 51. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине (ln CS) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних група.	96
Слика 52. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте <i>U. tumidus</i> . Групе анализираних јединки су	

кодиране (<i>U</i> _ts – <i>U. tumidus tumidus</i> и <i>U</i> _tt – <i>U. tumidus solidus</i>). Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора.	99
Слика 53. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте <i>U. pictorum</i> . Групе анализираних јединки су кодиране (<i>U. pictorum</i> f. <i>longirostris</i> – <i>Up</i> _L, <i>U. pictorum</i> f. <i>balatonicus</i> – <i>Up</i> _fB и <i>U. pictorum</i> f. <i>platyrhyncus</i> – <i>Up</i> _fP). Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан првом и другом осом.	100
Слика 53а. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте <i>U. crassus</i> . Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан првом и другом осом.	101

1. Увод

Слатководне шкољке представљају једну од најзначајнијих и широко распрострањених група водених организама копнених вода, нарочито у великим равничарским рекама (Csanyi, 2002; Raunović и сар., 2007а, 2008; Graf и сар., 2008) и различитим типовима стајаћих вода.

Еколошка улога представника ове таксономске групе у воденим екосистемима је кључна, с обзиром да представљају битан структурни елемент бентосних заједница, а због особине да врше филтрирање воде, битно доприносе самопречишћавању и одржавању функционалности воденог екосистема у целини (Ostrovsky и сар., 1993; Ogilvie и Mitchell, 1995; Vanderploeg и сар., 1995; Welker и Walz, 1998; Soto и Mena, 1999).

Према Оквирној директиви о водама ЕУ (WFD, 2000), улога ове групе организама као биолошких елемената квалитета, веома је значајна у процени еколошког статуса водних тела, а такође се могу ефикасно користити и као значајни типолошки показатељи различитих типова вода.

Иако представљају широко распрострањене организме и значајне конституенте заједница у слатководним екосистемима, још увек је недовољно познато који све фактори утичу на распрострањење и абунданцу унионида у великим равничарским рекама, као и о значају ових организама у функционисању речних екосистема (Strayer и сар., 1994).

1.1. Фамилија Unionidae

Слатководне шкољке из фамилије Unionidae (Bivalvia: Palaeoheterodonta: Unionoida), припадају разноврсном филуму Mollusca (лат. *mollis*=мекан), који обухвата и: пужеве (Gastropoda), главоношце (Cephalopoda), хитоне (Polyplacophora), као и неке мање и не тако сродне групе, које нису шире познате (Scaphopoda, Aplacophora, Monoplacophora). Представљају стару прекамбријумску групу, која се појавила у тријасу (пре око 200 милиона година) и достигла велики диверзитет до краја креде (пре 65 милиона година), прешавши дуг временски период самосталног развоја и специјације.

Поткласа Palaeoheterodonta обухвата, поред слатководних шкољки из реда Unionoida, према еволутивној сродности и једну маринску сестринску групу Neotrigonia

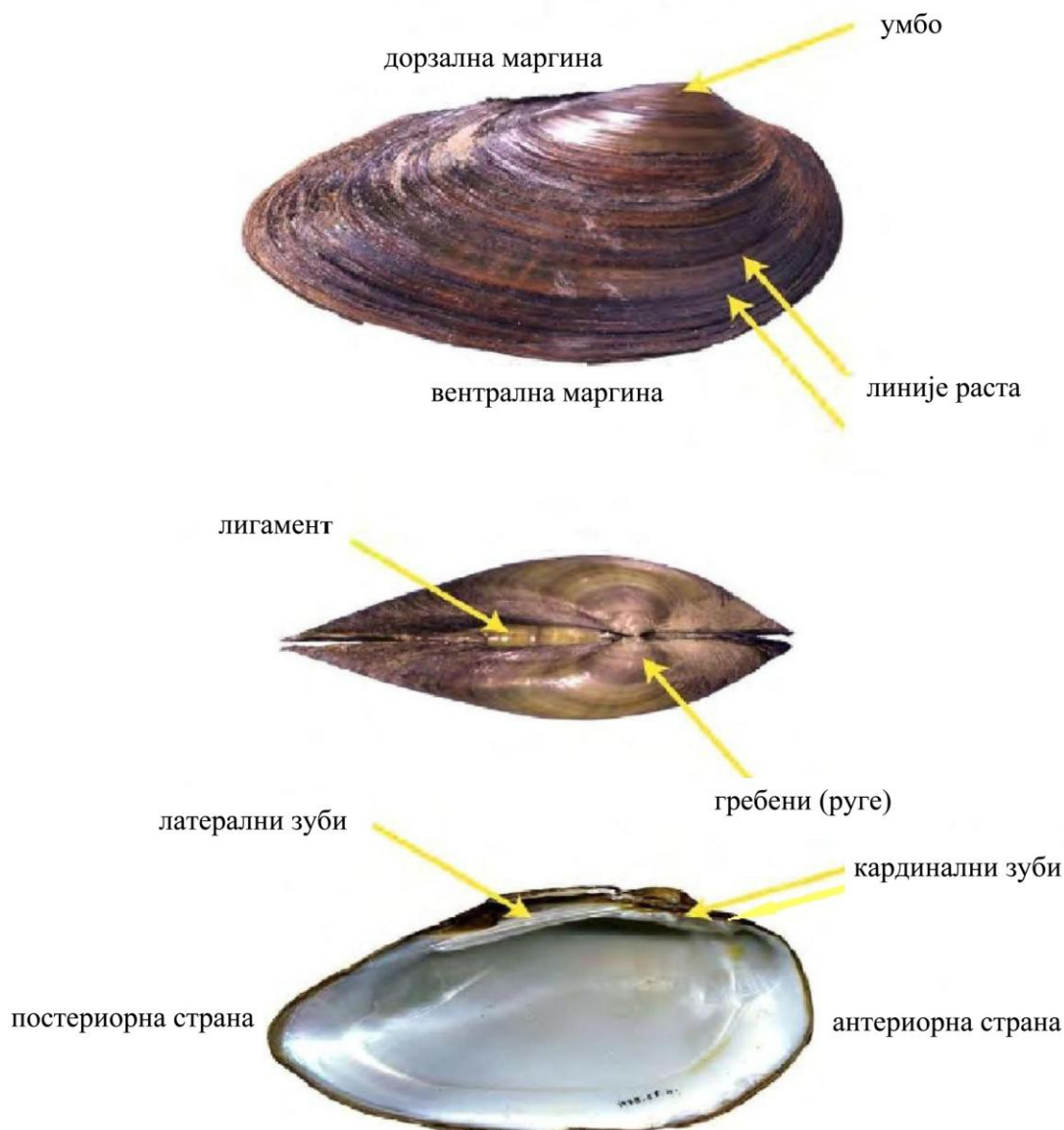
(ред: Trigonioidea), коју још називају и *живи фосил*, представљену са само шест врста у области Аустралије (Graf и сар., 2006). Насупрот томе, Unionidae (униониде) су широко распрострањене у копненим водама свих континената, изузев Антарктика и представљају најразноврснију фамилију у оквиру реда.

Ред Unionoidea чини шест фамилија, сврстаних у две суперфамилије: Unionoidea (Unionidae, Margaritiferidae) и Etherioidea (Hyriidae, Etheriidae, Mycetopodidae, Iridinidae). Ларвени ступањ, ласцидија карактеристичан је за суперфамилију Etherioidea, док је ларва глохидија, део циклуса развића суперфамилије Unionoidea. Због различитих типова ларви код ове две суперфамилије, постојале су спекулације да је порекло групе полифилетско. Међутим, паразитски начин развића ларве који је заједнички за све представнике ове групе и новији биохемијски подаци, указују на монофилетско порекло, али и рану дивергенцију између Unionoidea и Etherioidea (Bauer, 2001). Линије еволутивног развоја различитих група у оквиру суперфамилије, још увек су предмет истраживања, што се нарочито односи на фамилију Hyriidae (Graf и Cummings, 2006; Strayer, 2008).

Шкољке одликује бочно спљоштено тело, прекривено плаштом са леђне стране, кога чине два плаштана набора. Сваки од плаштаних набора лучи по један капак љуштуре, који леже симетрично, са једне и друге стране тела. Двокапка љуштурса је заједничка карактеристика представника ове групе, одакле почиње и име ове класе (лат. *bi*=два; *valvulae*=капак). На пресеку љуштуре разликују се три слоја: спољашњи (периостракум), изграђен од органске материје конхиолина; испод њега је дебљи, призматични слој, изграђен претежно од калцијум карбоната; са унутрашње стране се налази седефасти слој, кога још називају и бисерни слој. Капци љуштуре су међусобно спојени еластичном везом – **лигаментом** и **бравом** – низом зубаца и улегнућа на једном и њему одговарајућим низом на другом капку. Врх љуштуре је означен као *умбо*. Према положају умба одређују се леви и десни капак код шкољки, предња и задња страна, као и дорзална и вентрална страна (слика 1) (Clifford, 1991). Код шкољки није развијен главени регион, тако да је њихово тело грађено само од два телесна региона: трупа, односно утробне кесе и стопала. Секирасто мишићно стопало налази се са доње стране тела и служи за укопавање у песак или муљ или за пузање.

Ивице плашта на задњем крају тела формирају два сифона: улазни (инхалатни) и други излазни (ексхалатни). Кроз ове сифоне вода са хранљивим честицама (фитопланктон и детритус) улази, односно излази из плаштане дупље. Са обе стране

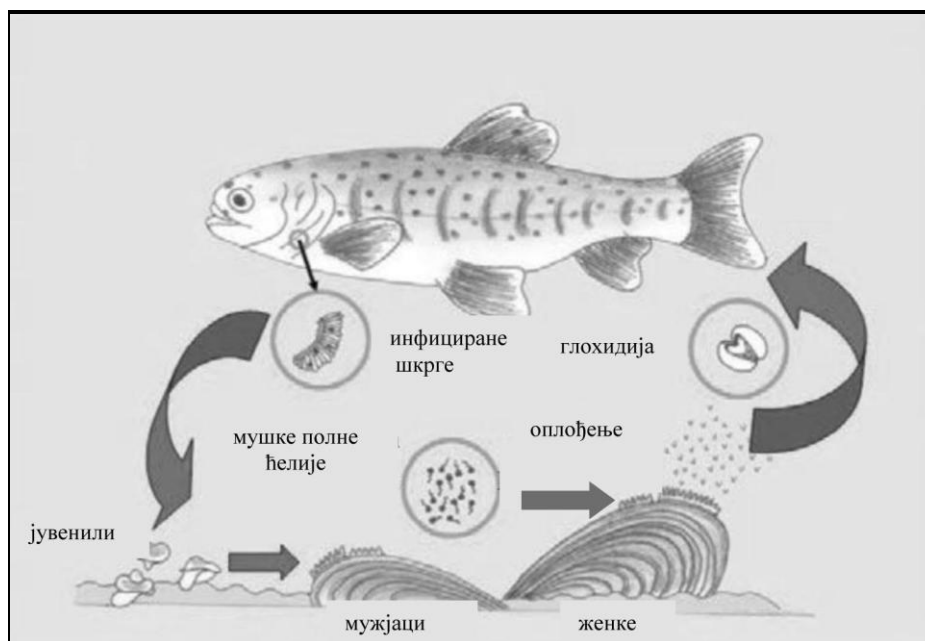
тела имају по једну шкргу са великим бројем филамената. Највећи број врста шкољки одликује се цилијатним филтрационим типом исхране. Радом цилија шкржног епитела обезбеђује се непрекидан проток воде са довољном количином кисеоника преко шкрга и обезбеђује усмеравање честица хране ка усном отвору.



Слика 1. Морфолошке карактеристике унионида, преузето и прилагођено према, Moorkens и Killeen, 2009.

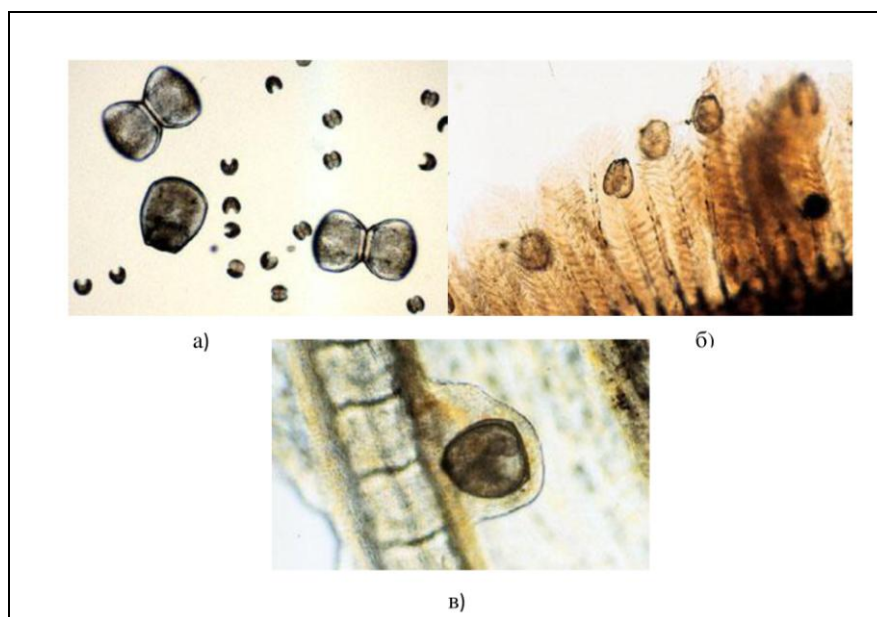
Слатководне шкољке фамилије Unionidae одликује јединствена репродуктивна стратегија (слика 2). Промене у температури воде иницирају продукцију мушких и женских полних ћелија (Watters, 1995). Преко ексалатног сифона мушке полне ћелије доспевају у воду, а преко инхалатног сифона, женке усвајају воду заједно са полним ћелијама, смештајући их у пределу шкрга. Оплођење женских полних ћелија се дешава

у одређеном региону на шкргама које се назива *марсупија* (Watters, 1995). Из оплођене јајне ћелије развија се ларва – глохидија (слика 3.).



Слика 2. Животни циклус унионида, преузето и прилагођено према Reis, 2006.

Глохидије, такође поседују по два капка, али изгледом ипак не подсећају на одрасле шкољке. Одликује их рудиментирано стопало и двокапа троугласта љуштура снабдевена кукицама и зубићима, који служе да би се закачила за домаћина. Тело глохидије, снабдевено је дугачким лепљивим кончићем који лебди у води. Након одвајања од шкољке, ларве слатководних шкољки једно време слободно пливају у води, а онда се закаче за шкрге, кожу или пераја риба и почињу паразитски део животног циклуса. Причвршћивање се дешава у тренутку када кончић додирне површину рибе, при чему се капци затварају и кукицама закаче за њену кожу. На месту контакта, око ларве се формира епидермална чаура (слика 3), у којој започиње преображај из ларве у младу шкољку. Однос између глохидија и домаћина (рибе) је облигатан и омогућава успешно развиће унионида. Само оне глохидије које се настане на рибама развијају се до адултног облика, а све остале угину. Када се преображај заврши, епидермална чаура пуца и млада шкољка напушта домаћина, пада на дно и постаје независни, слободноживећи организам.



Слика 3. Ларвени ступањ у развићу шкољки – глохидија (фотографија, М.С. Barnhart) а) изглед глохидија, б) глохидије причвршћене на шкргама риба, в) инкапсулирана глохидија.

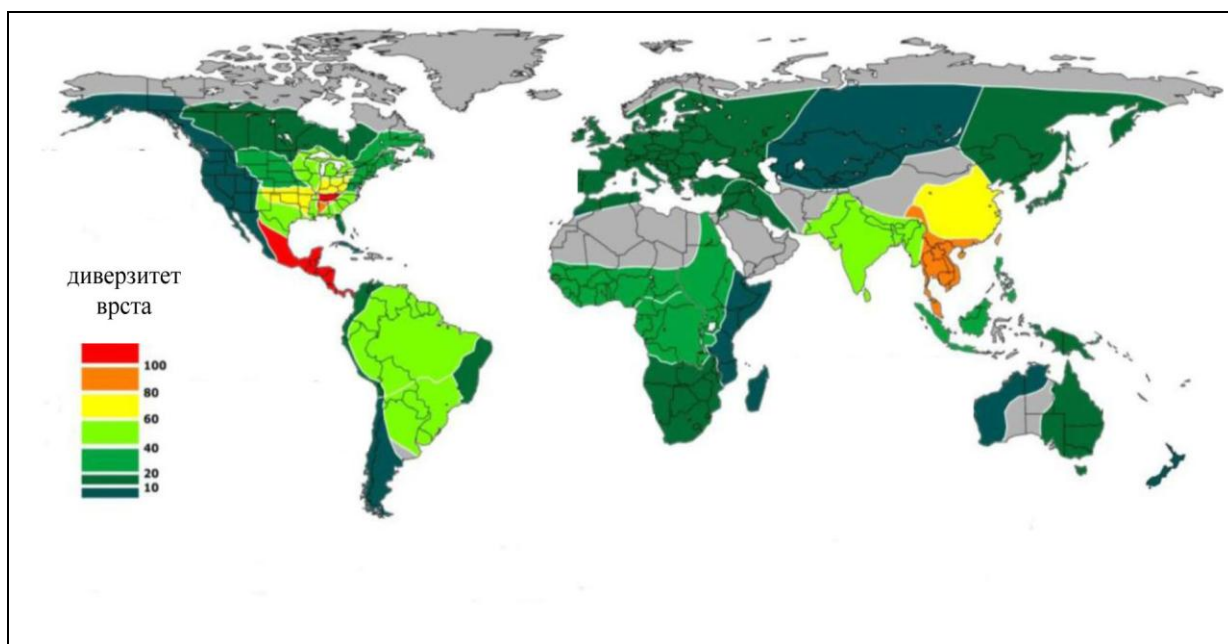
1.2. Биодиверзитет и распрострањење

Филум слатководних мекушаца је, према тренутним сазнањима, друга најразноврснија група животиња, одмах иза *Arthropoda*. *Unionoidea* представља једну од најразноврснијих суперфамилија у оквиру класе *Bivalvia*, са око 800 (Bogan, 2008; Bogan и Roe, 2008; Huber, 2010) до 900 (Graf и Cummings, 2006, 2007) описаних врста, сврстаних у око 180 родова. Највеће разноврсност са 674 описане врсте и широко распрострањење у Северној Америци, Европи, Африци и Азији, бележи се за фамилију *Unionidae* (Graf и Cummings, 2007). Са знатно мањим диверзитетом у истим областима, од свега 12 описаних врста, присутна је фамилија *Margaritiferidae*, која се означава и као предачка фамилија слатководних шкољки фамилије *Unionidae* (Bogan, 2008).

Укупан број забележених врста у различитим зоогеографским областима знатно варира и још увек је предмет истраживања (слика 4.). Највећи диверзитет бележи се у југоисточном делу Северне Америке и у Југоисточној Азији (Graf и Cummings, 2007; Bogan, 2008). Област Северне Америке (Неарктик), је подручје највећег диверзитета слатководних шкољки фамилије *Unionidae*, са 297 забележених врста (Graf и Cummings, 2007; Bogan, 2008). Значајан диверзитет са 120 описаних врста унионида,

карактеристичан је за простор југоисточне Азије и суседна континентална острва (Оријентална зоогеографска област). Нешто мањи диверзитет од 85 врста унионида, одликује Неотропску област, потом следи Етиопска област са 32 врсте и на крају Аустралијска зоогеографска област, са свега једном присутном врстом унионида (Bogan, 2008). На простору Европе и Азије (Палеактичка област), утврђено је присуство 86 врста (Bogan, 2008). Узимајући у обзир простор који обухвата ова зоогеографска област, очекивано је да ће се диверзитет између регија ове области разликовати. Највећи диверзитет карактерише источни део области и протеже се од басена реке Амур на северу, до јужне Кине, укључујући и басен реке Јангце, док се у области Западне Европе, Русије, јужног Кавказа и Сибира, бележи мања разноврсност (Wu, 1998). Резултати досадашњих истраживања на подручју Европе указују на постојање 14 врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae (Cuttelod и сар., 2011, Lopes-Lima и сар., 2015), груписаних у оквиру две потфамилије – Unioninae и Gonideinae (Lopes-Lima и сар., 2015). Врсте *Potomida littoralis* (Cuvier 1798) и *Microcondylaea bonellii* (A. Ferussac 1827) припадају потфамилији Gonideinae, док су у оквиру потфамилије Unioninae груписане врсте: *Unio tumidus* Retzius, 1788, *Unio tumidiformis* Castro 1885, *Unio pictorum* (Linnaeus 1758), *Unio crassus* Philipsson, 1788, *Unio mancus* Lamarck 1819, *Unio delphinus* Spengler 1793, *Unio tumidiformis* Castro 1885, *Unio elongatulus* Pfeiffer, 1825, *Unio ravoisieri* Deshayes 1848, *Unio gibbus* Spengler, 1793, *Anodonta cygnea* (Linnaeus 1758) и *Anodonta anatina* (Linnaeus 1758) (Lopes-Lima и сар., 2015).

Због многих таксономских проблема, који су и данас присутни, а настали су још у XIX веку са експанзијом описа врста, укупан број врста у Европи дуго је био предмет истраживања. Интезивнија истраживања у последњих неколико година, развитак и примена молекуларних техника, омогућили су утврђивање филогенетских односа врста и разрешење великог броја насталих синонима.



Слика 4. Диверзитет слатководних шкољки (Bivalvia: Unionoida), преузето и прилагођено према Reis, 2010.

У последњих неколико деценија бележи се знатно смањење бројности популација и специјског диверзитета слатководних шкољки (Neves, 1997). Према тренутним сазнањима, ови организми представљају једну од најугроженијих група бескичмењака на свету (Bogan, 1993; Araujo и Ramos, 2000; Young и сар., 2001; Lydeard и сар., 2004; Strayer и сар., 2004; Strayer, 2008). Према проценама Међународне уније за очување природе и природних ресурса (IUCN), чак 261 врста унионда налази се на Црвеној листи у категорији ишчезлих, угрожених или врста под ризиком (IUCN, 2008; Szumowski и сар., 2012).

Суперфамилија Unionoidea, означава се чак и као најугроженија група животиња на Америчком континенту, са 72% врста које припадају некој од категорија угрожености (Williams и сар., 1993; Neves и сар., 1997). На простору Северне Америке, чак 37 аутохтоних врста се сматра ишчезлим (Strayer, 2008).

Многе научне студије, нарочито последњих деценија, бавиле су се изучавањем фактора који утичу на смањење бројности популација слатководних шкољки и диверзитета врста. Као главни разлози за смањење популације истакнути су: еутрофикација, редукција и измена карактеристика станишта (услед хидро-морфолошких промена), повећање концентрације токсичних супстанци (у води и супстрату), смањење броја нативних врста риба, утицај инвазивних врста, прекомерно

изловљавање (Bauer, 1988; Bogan, 1993; Neves, 1999; Araujo и Ramos, 2000; Young и сар., 2001; Lydeard и сар., 2004; Reis, 2006; Strayer, 2006).

Повећање свеукупног сазнања о могућим факторима који одређују просторну дистрибуцију популација слатководних шкољки је од изузетног значаја у конзервационој биологији, са циљем детектовања популација и одређених типова станишта, који су под ризиком, као и дефинисања приоритетних мера/активности, у циљу очувања врста од националног и међународног значаја и унапређење нарушених биотопа.

1.3. Традиционална и геометријска морфометрија

Морфометрија представља посебну морфолошку дисциплину, која се бави мерењем, анализом и квантификацијом морфолошке варијабилности (Ivanović и Kalezić, 2009). Према дефиницији коју је дао Rohlf (1990a), морфометрија представља „истраживање проблема величине и облика морфолошких целина употребом статистичких метода, превасходно различитих мултиваријантних процедура, на основу података добијених мерењима“.

Постоје два основна приступа у оквиру морфометрије: традиционална и геометријска морфометрија. Методе анализа величине и облика у оквиру традиционалне (линеарне) морфометрије, заснивају на подацима који се добијају мерењима морфометријских варијабли (дужина, ширина, висина итд.) и мерењем растојања између јасно дефинисаних тачака одређене морфолошке целине, тј. линеарних растојања (Oxnard, 1978). Даља анализа података добијених мерењем, врши се помоћу различитих статистичких уни- и мултиваријантних процедура.

Методе геометријске морфометрије пружају могућност истраживања математичког облика морфолошких целина преко њихове геометрије, полазећи од распореда или конфигурација специфичних тачака у две, или три равни простора (Rohlf, 2000; Adams и сар., 2004). Специфичне тачке су јасно дефинисане анатомске тачке (енгл. *landmarks*), које је могуће са великом прецизношћу и поновљивошћу одредити код свих јединки у анализираном узорку. Геометријска морфометрија, за разлику од традиционалне, омогућава раздвајања варијабилности у величини од варијабилности у облику морфолошких целина, које се даље могу независно анализирати применом уни- и мултиваријантних статистичких метода, као и директно

графичко представљања варијабилности облика морфолошке целине (Jojić, 2010). У геометријској морфометрији, облик морфолошке целине одређују геометријске информације, након искључивања ефеката његове величине, положаја и оријентације у простору (Kendall, 1977).

Најчешће примењивана процедура у геометријској морфометрији, која за циљ има издвајање варијабли облика морфолошке целине, јесте генерализована Прокрустова анализа (енгл. *General Procrustes Analysis* – GPA) (Rohlf и Slice, 1990; Dryden и Mardia, 1998; Rohlf, 1999), односно Прокрустова суперимпозиција (поравнавање). Прокрустовом суперимпозицијом (поравнавањем), односно скалирањем, транслацијом и ротацијом конфигурација специфичних тачака, елиминишу се разлике условљене величином, положајем и оријентацијом, а задржавају се само информације које су директно везане за разлике у облику (Jojić, 2010). Након Прокрустова суперимпозиције, координате специфичних тачака (Прокрустова координате), носе информације о облику анализирани морфолошке целине и представљају полазне податке за даље анализе варијабилности облика.

Величина центроида (енгл. *centroid size* – CS), се употребљава као геометријска мера величине неког објекта описаног конфигурацијом специфичних тачака и представља меру дисперзије специфичних тачака од средишта (центроида) дате конфигурације (Bookstein, 1991).

Графички модел који омогућава визуелизацију промена облика је идеално танка, бесконачна метална плоча (енгл. *Thin Plate Spline* – TPS). Полазна основа оваквог модела је да су две конфигурације специфичних тачака које се пореде, постављене на идеално танкој бесконачној металној плочи, која ће се деформисати (истезати или скраћивати), како би се одговарајуће специфичне тачке ове две конфигурације поклопиле.

Морфометријске анализе налазе примену у различитим гранама биологије и доприносе разрешењу многих таксономских, еволутивних и еколошких недоумица. Љуштуре слатководних шкољки, нарочито Unionidae, показују висок степен интраспецијске морфолошке варијабилности, што је у прошлости доводило до појаве великог броја синонима (Küster, 1848; Lea, 1870; Locard, 1890). Одређени таксономски проблеми везано за ову групу организама и данас су присутни.

Испитивање морфолошке варијабилности слатководних шкољки, применом различитих метода морфометрије, анализирано је у оквиру радова неколико аутора

(Aldridge, 1999; Kraszewski, 2006, Rufino и сар., 2006; Costa и сар., 2008; Morais и сар., 2014). Коришћење различитих морфометријских анализа у новијим истраживањима допринело је утврђивању разлика између морфолошки сличних врста (Rufino и сар., 2006; Costa и сар., 2008), фосилних и савремених таксона (Aguirre и сар., 2006), али и разумевању интраспецијских разлика у морфолошким структурама врста (Rufino и сар., 2012).

1.4. Преглед литературних података

1.4.1. Историјат истраживања на глобалном нивоу

Први познати записи о унионидама датирају још из XVI века (Gesner, 1553; Magnus, 1555). Почетак класификације Unionida почиње са Linnaeus-овим делом „*Systema Naturae*“ (Linnaeus, 1758), у којем је неколико унионидних шкољки сврстано у јединствени род *Mya*, заједно са још неким маринским врстама. Убрзо након тога, према новој класификационој шеми, аутори сврставају ову групу слатководних шкољки у нови род (Retzius, 1788; Lamarck, 1799). Први научни рад о мекушцима, узимајући у обзир и терестричне и слатководне врсте, објављен је у Северној Америци (Say, 1817), након чега су уследили бројни дескриптивни радови (Lamarck, 1819; Rafinesque, 1820, 1831). Једна од водећих личности у области проучавања слатководних шкољки тога времена био је Isaac Lea. Његов рад представља први свеобухватни глобални преглед унионида (Lea 1836, 1838, 1852, 1870), који је касније унапредио и надоградио Simpson (Simpson, 1900, 1914). Велики напредак у таксономији дешава се са радовима Ortmann-а (Ortmann, 1912, 1919, 1921, 1923a,b, 1924), који описује анатомске особине слатководних шкољки, као и радовима Parodiz-а и Bonetto-а (Parodiz и Bonetto, 1963), који су допринели прецизнијој класификацији фамилија, на основу особина ларвеног стадијума. Радови на таксономији су настављени објављивањем великог броја публикација, али је тек након објављивања монографије под називом „*Superfamilia Unionacea*“ (Haas, 1969), добијен још један свеобухватни преглед класификације унионида на светском нивоу. Значајан допринос у раду на класификацији ове групе даје и Starobogatov (1970).

Таксономија слатководних шкољки се до 70-их година прошлог века заснивала, углавном, на морфолошким, анатомским и физиолошким особинама. Након тога, појављују се истраживања у којима се покушавају разјаснити први филогенетски

односи међу унионидама, користећи сазнања о репродуктивним и морфолошким особинама (Heard и Guckert, 1970).

У XIX веку број врста описаних у Европи, кретао се и до неколико стотина, али су истраживања спроведена почетком XX века, показала да је број врста знатно мањи, и да многа имена врста нису била валидна.

Развиће молекуларних метода крајем XX века, и све већа примена молекуларних маркера, допринела је бољем познавању таксономије, систематике и филогеније слатководних шкољки (Lopez-Lima и сар., 2014). Подаци добијени молекуларним техникама су од кључне важности за утврђивање еволутивних односа између врста, као и за детектовање одређених криптичних врста, с обзиром на њихову веома велику фенотипску пластичност, што у највећој мери доприноси погрешној идентификацији (Lydeard и сар., 1996; Lydeard и сар., 2000; Baker и сар., 2003; Machordom и сар., 2003; Huff и сар., 2004; Campbell и сар., 2005; Graf и Cummings, 2006; Lopez Lima и сар., 2014).

Са циљем разјашњења таксономских недоумица и еволутивних односа између врста, потребно је спровести даља истраживања која би омогућавала коришћење различитих података, укључујући морфолошке и анатомске карактеристике врста, особине животног циклуса, ларвени стадијум, као и генетички диверзитет (Graf и Cummings, 2006).

1.4.2. Преглед истраживања у Србији

Почетак истраживања унионидних шкољки на територији Србије датира још из XIX века. Први забележени подаци о налазима и описима шкољки из фамилије Unionidae на територији Србије представио је Лазар Докић у свом раду под називом „Шкољке у Србији“ (Dokić, 1882). Према записима Анте Тадића (Tadić, 1960), велики допринос у прикупљању материјала за збирку Лазара Докића имао је и Јосиф Панчић, прикупљајући материјал из разних крајева Србије. Сав материјал уступљен је на даљу анализу француском малакологу Henri-ју Drouët-у, који се нарочито бавио изучавањем европских унионида, и међу анализираним врстама са простора Србије, пронашао је и неке, за науку тог времена, нове врсте. Резултате својих истраживања објавио је у монографији „Unionidae de Serbie“, а нешто касније и у допуњеном издању

монографије, са јединственим прегледом систематике врста са простора Србије (Drouët, 1882, 1884).

Почетком XX века, велики значај познавању малакофауне Србије дао је и Петар Павловић, мада су се његова истраживања превасходно односила на фауну Gastropoda (Pavlović, 1907, 1909, 1911, 1912). Рад на слатководним шкољкама на овим просторима, био је део истраживања Станковића (Stanković, 1933), Мршића (Mršić, 1933), Фијана (Fijan, 1950) и Матонићкина (Matoničkin, 1953).

Изузетан допринос у истраживању и прикупљању Unionidae из различитих делова Србије дао је Анте Тадић, објавивши више стручних радова о овој групи (Tadić, 1952, 1953, 1956, 1957a,b,c, 1960, 1971, 1979). Осим публикованих чланака, у депоу Природњачког музеја у Београду, налази се и велика збирка узорака слатководних шкољки из тог периода.

Након Тадићевих истраживања, подаци о слатководним шкољкама из фамилије Unionidae су углавном објављени у студијама о целокупној заједници макробескичмењака (Živić и сар., 2001a; Paunović и сар., 2005, 2007a, 2007b, 2008; Simić и Simić, 2004; Csányi и Paunović, 2006, Martinović-Vitanović и сар., 2013; Tomović и сар., 2010, 2014, Raković и сар., 2013; Marković и сар., 2014), или у оквиру радова који се односе на квалитет животне средине (Marković и сар., 1999; Paunović и сар., 1999; Simić и Simić, 1999; Marković и сар., 2012.).

Истраживања слатководних шкољки Подунавља и Србије, интензивира се последњих неколико година и резултира већим бројем публикација из ове области (Paunović и сар., 2006, Tomović и сар., 2012, 2013a, 2013b).

2. Циљеви истраживања

Анализа заједница слатководних шкољки из фамилије Unionidae на подручју Србије, узимајући у обзир новија истраживања, као и доступан материјал из музејске збирке, реализована је са следећим циљевима:

- попис врста према новијим истраживањима, као и ревизија историјских података на основу прегледа збирке Анте Тадића, Природњачког музеја у Београду;
- приказ распрострањења врста на подручју Србије;
- квалитативна и квантитативна анализа заједница у воденим екосистемима у Србији;
- анализа односа заједнице слатководних шкољки и абиотичких параметара окружења који најзначајније утичу на распрострањење врста и односе унутар заједница;
- разматрање еколошких особина врста;
- анализа варијабилности облика и/или величине љуштуре изабраних популација, методама геометријске и линеарне морфометрије у циљу идентификације промена морфолошких структура односно морфолошких варијабли у различитим водотоковима;
- примена метода геометријске морфометрије у анализи морфолошке варијабилности различитих врста, уз разматрање односа на специјском, као и уочавање интраспецијских (интерпопулационих) односа;
- процена ризика изумирања аутохтоних врста на националном нивоу према ESHIPPO моделу (Simić и сар. 2007) и
- предлог стратегије конзервације врста и одређивање приоритета заштите на националном нивоу.

3. Материјал и методе

3.1. Подручје истраживања

У складу са претходним сазнањима о распрострањењу слатководних шкољки Балкана, наша истраживања су превасходно била усмерена на станишта великих равничарских река сливног подручја које превазилази 4.000 km² у Србији (Дунав, Сава, Тиса, Велика и Западна Морава). Прикупљање узорака извршено је и на реци Колубари (сливно подручје између 500 и 4.000 km²), као и на акумулацијама Гружа и Ћелије (слика 5).

Према општим карактеристикама територија Србије се може поделити на два региона: Панонски басен (северно од Дунава) и брдско-планински регион (јужно од Дунава). Слив реке Саве, низводни део слива Дрине, као и део слива Колубаре, представљају прелазно подручје. У погледу општих природних карактеристика, брдско-планинско подручје је разноврсније што погодује распрострањењу флоре и фауне, укључујући и водене организме, у односу на област северно од Дунава која је релативно хомогенија.

Дунав представља једну од највећих и најзначајнијих европских река, са укупном површином слива од 817.000 km² и дужине тока од 2.857 km. Део тока кроз Србију од 588 km, обухвата средњи и део доњег тока Дунава. Већи део тока кроз Србију припада Панонском басену (358 km). Дунав улази на територију Србије на 1433,0 gkm, а напушта је на 845,0 gkm. На деоници реке кроз нашу земљу најзначајније притоке Дунава су: Тиса, Сава са својим притокама (Дрином, Колубаром и Босутом) и Велика Морава.

Тиса је најдужа лева притока Дунава, укупне површине слива 157.186 km² и дужине тока од 966 km. Настаје у Украјини, у западним Карпатима, спајањем Црне Тисе и Беле Тисе. Протиче кроз Украјину, Словачку, Румунију, Мађарску и Србију где се улива у Дунав, близу Старог Сланкамена (1215 gkm). На територији Србије је свега 5% сливног подручја, са 164 km тока, који има карактеристике типичне равничарске реке (доња Тиса).

Сава настаје спајањем Саве Долинке и Саве Бохињке код Радовљице у Словенији, и представља један од најзначајнијих сливова у региону (сливно подручје површине 95.419 km²). Највећа је притока Дунава (по дужини и водности). Доњи део тока реке (површине слива око 15.147 km² и дужине тока од 206 km) протиче кроз

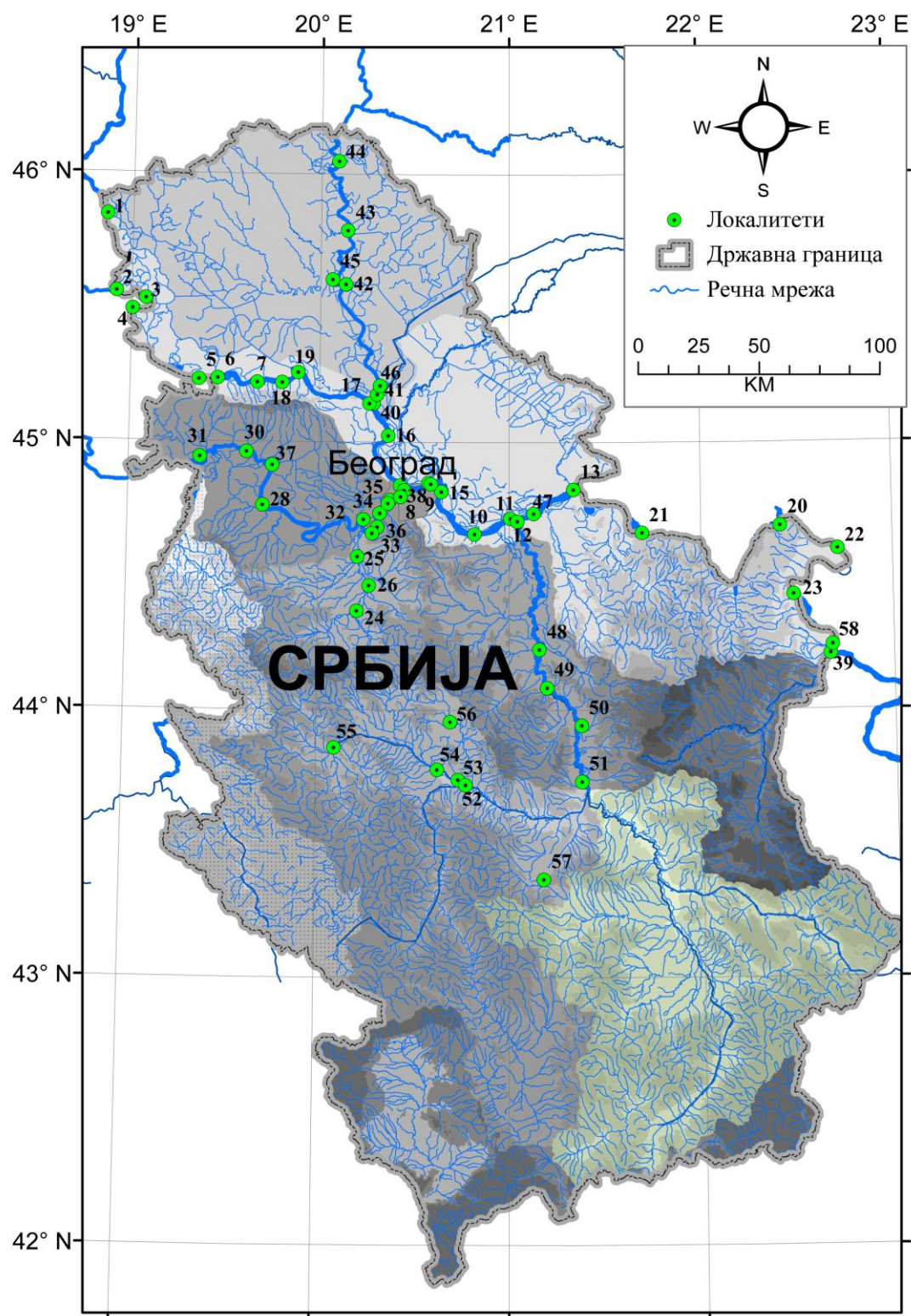
Србију и има карактеристике типичног равничарског водотока. Највеће притоке реке Саве у Србији су Дрина и Колубара.

Слив реке Колубаре припада подсливу Саве, односно сливу Дунава. Налази се на прелазу између две карактеристичне целине за територију Србије: брдско-планинске области и Панонског басена. Обухвата крајње јужни део Панонске низије, део Савске потолине и северне обронке Шумадијског побрђа. Са укупном површином слива од око 3.640 km^2 и дужином тока од 123 km , представља једну од најзначајнијих река у централној Србији. Најзначајније притоке су Градац, Тамнава, Љиг и Пештан.

Велика Морава настаје спајањем Западне Мораве и Јужне Мораве код Сталаћа. Улива се у Дунав на простору између Смедерева и Костолца, и представља највећу домаћу реку. Пре почетка регулационих радова била је дугачка око 245 километара, а данас, због регулације речног корита и мелиорационих радова њена дужина износи око 185 километара. Велика Морава, са саставницама Западном и Јужном Моравом, чини један од највећих речних система на Балкану (површине слива 37.444 km^2). Поред Србије, којој припада око 85% слива, део слива Мораве припада Црној Гори (горњи део слива Ибра) и Бугарској (горњи део слива Нишаве). Неке од значајних притока Велике Мораве су: Јасеница, Раваница, Ресава и Лепеница.

Гружанско језеро је вештачко језеро формирано на реци Грузи код Кнића. Гружанско језеро има запремину од $64,5$ милиона m^3 . Обим језера је око 42 km , а ширина је од 300 до 2.800 m . Дужине је око 10 km , површине око 900 ha . Потапањем је формирано више ртова и увала, чиме је створена добро разуђена обала.

Акумулација Ћелије је настала преграђивањем реке Расине у близини Крушевца, и првенствено је формирана као део система за заштиту акумулације „Ђердап“ од засипа наноса ерозионог порекла. Површина акумулације износи $3,5 \text{ km}^2 - 5 \text{ km}^2$, док површина слива износи 598 km^2 . Просечна дубина је око 12 метара, док је максимална дубина језера 45 метара.



Слика 5. Приказ локалитета узорковања у оквиру истраживаних водотокова.

3.2. Анализирани материјал

Резултати истраживања приказани у овом раду заснивају се на узорцима који су прикупљени, током периода 2001.-2013. година, у оквиру Одељења за хидроекологију и заштиту вода, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (ИБИСС), као део теренских истраживања више националних пројеката. Материјал коришћен за анализу прикупљен је и при реализације следећих међународних пројеката: Заједничко испитивање Дунава (Joint Danube Survey – JDS) 2001. године, Заједничко испитивање Дунава 2 (Joint Danube Survey 3 – JDS 2) 2007., и Заједничко испитивање Дунава 3 (Joint Danube Survey 3 – JDS 3) 2013. године – истраживања организована од стране Међународне комисије за заштиту реке Дунав (ICPDR), као и при реализацији пројекта билатералне сарадње са Хрватском (Процена нивоа Биоконтаминације великих река Хрватске и Србије), током 2011. и 2012. године. Осим савремених истраживања, резултати су обухватили и историјске податке добијене на основу прегледа доступне збирке Анте Тадића, Природњачког музеја у Београду.

Подаци о коришћеним параметрима средине, за локалитете на истраживаним водотоковима, преузети су из Годишњих извештај о квалитету вода Републичког хидрометеоролошког завода (РХМЗ), односно Агенције за заштиту животне средине (Хидролошки годишњак – квалитет вода, 2001-2013). Анализа параметара средине, извршена је према важећим стандардима (Хидролошки годишњак – квалитет вода, 2013).

3.3. Методе прикупљања узорака и обрада

Током теренских истраживања, у периоду од 2001. до 2013. године, прикупљено је 86 узорака, са 57 локалитета (Прилог 1, табеле 1, 3) и укупно идентификовано 2.367 јединки слатководних шкољки из фамилије Unionidae (слика 5). Прикупљање узорака извршено је применом различитих техника, прилагођеним еколошким одликама популације и карактеристикама станишта, коришћењем ручне бентосне мрежа, промера оцаца 500µm, бентолошке дреце, као и роњењем. Узорковање је извршено са свих типова микростаништа – мултихабитатни приступ (AQEM Consortium, 2002).

Прикупљање материјала бентосном ручном мрежом, применом *kick and sweep* технике узорковања (подизања материјала са подлоге покретима ногу и његовим

сакупљањем у мрежу која је оријентисана у правцу воденог тока), извршено је у приобалним деловима река. са свих доступних станишта у дефинисаном временском интервалу (семиквантитативно узорковање).

За процену густина популације, односно броја јединки по јединици насељеног простора, извршено је сакупљање квантитативних узорака, при чему се процена абунданце вршила у односу на захватну површину рама мреже за узорковање (25x25cm). Квантитативни узорци су сакупљани и роњењем при чему се процена абунданце вршила коришћењем металног рама дефинисане површине (0.25 m²).

Прикупљање узорака на акумулацијама извршено је коришћењем бентолошке дреце, с обзиром да стандардна процедура узорковања ручном мрежом није била адекватна за овај тип екосистема. За потребе анализе узет је по један профил.

Поред прикупљања биолошког материјала, на терену су прикупљани и подаци који дефинишу карактеристике станишта једног водотока: географске координате, надморска висина (m), тип супстрата, проток, удаљеност од обале, дубина, као и подаци о видљивом антропогеном утицају на станиште.

Обрада прикупљених узорака у највећем броју случајева извршена је на терену, након чега је највећи број јединки враћен у природно станиште. Идентификација прикупљених узорака вршена је употребом следеће литературе: Pflieger (1998), Glöer и Meier-Brook (2003); Beran (2009).

Номенклатура и класификација у овом раду приказане су у складу са Фауном Европе (Fauna Europea - FE, verzija 2.6.2) (de Jong 2013).

3.3.1. Анализа квантитативних и квалитативних особина заједнице

При анализи слатководних шкољки на истраживаном подручју, разматрано је неколико параметара заједнице:

- разноврсност – изражена преко броја забележених таксона у узорку;
- абунданца – изражена преко броја индивидуа по квадратном метру (инд/m²), или преко релативне абунданце (број таксона у узорку и/или процентуална заступљеност таксона);
- оцена доминантности таксона и

- оцена константности таксона, на основу учесталости налаза, извршена је према скали: $F_1=0-0.19$ – веома ретки; $F_1=0.20-0.39$ – ретки; $F_1=0.40-0.59$ – умерено чести; $F_1=0.60-0.79$ – константни и $F_1=0.80-1$ – еуконстантни таксони.

3.4. Процена ризика изумирања и приоритета конзервације угрожених врста слатководних шкољки фамилије *Unionidae* на националном и локалном нивоу помоћу модификованог модела ESHIPPO-PD

Процена ризика изумирања и одређивање приоритета конзервације на националном и локалном нивоу извршени су применом модификованог модела ESHIPPO, који је прилагођен посебно за групу унионидних шкољки. Поред основних елемената модела (*еколошка специјализација врсте* – ES и *угрожавајући фактори диверзитета* – HIPPO) које су представили Симић и сарадници (2007), анализом су обухваћени и параметре *популационе динамике* (PD).

Оцена еколошке специјализације извршена је у односу на: станиште, исхрану, репродуктивну стратегију, ниво ендемизма. Процена угрожавајућих (HIPPO) фактора диверзитета оцењена је на основу утицаја: **H** - измена/промена станишта (енгл. *habitat alteration*), **I** - инвазивних врста (енгл. *invasive species*), **P** - загађења (енгл. *pollution*), **P** - раста хумане популације (енгл. *population growth*), **O** - прекомерне експлоатације (енгл. *over-exploitation*) (Brennan и Withgott, 2005). Параметри *популационе динамике* (енгл. PD) обухватили су анализу: заузетости потенцијалног ареала, кретање популације и абунданцу и дистрибуцију на станишту.

Анализирани елементи основног модела (ESHIPPO) и квантификација појединачних параметара приказани су у табели 1, док су критеријуми коришћени у анализи популационе динамика, као и њихова квантификација представљени у табели 2.

Параметри еколошке специјализације (ES), угрожавајући фактори диверзитета – HIPPO и популациона динамика (PD) класификовани су коришћењем тростепене бодовне скале. Висине збира вредности параметара (ES + HIPPO + PD) одређује степен угрожености, ниво ризика изумирања и приоритет конзервације унионида на истраживаном подручју (табела 3).

Табела 1. Протокол ESHIPPO модела са параметрима за процену еколошке специјализације (ES) и утицаја HIPPO фактора, преузето и прилагођено према Simić и сар., 2007.

Елементи ES	ознака	Индикатор ознака*	Бодови ES	Елементи HIPPO	Проценат акватичних станишта на којима се манифестују фактори					
Станиште (Habitat)	H	h1, h2, h3, h4, h5	1- (h)(d)(rs): ниско специјализован, толерантан, еуривалент (еуритоп) за све или > 3 индик.	Промене станишта ¹ Деструкција, фрагментација и изолација	%	број бодова	%	број бодова	%	број бодова
Хидроморфолошке промене (Hydromorphological alteration)	ha	ha1, ha2, ha3	h. (d): d1. (rs):rs1.1, rs2.1, rs3.1, rs3.2, rs4.3, rs5.1, rs6.1, (lc): lc1.1, lc1.3, lc2.1, lc3.1, lc3.4, lc4.1, lc4.4, lc6.2, (bs): bs1.1, (re): re1.	слободни проток мали успор изражен успор						
Исхрана (Diet)	D	d1, d2, d3	3-(h)(d)(rs): умерено специјализован, осетљив. Стеновалент (умерен), за 1-3 индик. h. (d): d2. (rs): rs1.1, rs2.2, rs3.3; rs4.2; rs5.2; rs6.2; rs7.2; lc1.2, lc2.2, lc3.2, lc3.5, lc4.2, lc4.5.	Инвазивне врсте и/или неадекватно порибљавање						
Репродуктивни систем (Reproduction strategy)	rs	rs1, rs2, rs3, rs4, rs5, rs6	(bs).bs1.2; (re): re2.	Загађење ³	>50	5	20- 49,9	3	<20	1
Животни циклус (Life cycle)	lc	lc1, lc2, lc3, lc4	Стеновалент (стенотоп) за све или > 3 индик. h. (d): d3). (rs): rs1.3, rs2.3, rs4.1, rs5.3, rs6.3. (lc): lc1.3, lc2.3, lc3.3, lc3.6, lc4.3, lc4.6, lc6.1, bs1.3.	Раст хумане популације ⁴						
Ниво ендемизма и изолација популација / статус угрожености IUCN (Range endemic)	re	re1, re2,	(re): re3.	Прекомерна експлоатација ⁵						

***(h):** h1) дистрибуција по екорегинима (Illies 1967); h2) надморска висина: < 200, 200-500, 500-800, 800-1500 и > 1500; h 2.1) тип екосистема и еколошка зона: текуће воде: еукренон, хипокренон, епиритрон, метаритрон, хипоритрон, епипотамон, метапотамон, хипопотамон; стајаће воде: литорал, сублиторал, профундал, баре, мочваре, ефемерне воде и друго. h3) морфометријски параметри водених екосистема: дубина (m), карактер дна (%), h4) физички и хемијски параметри: температура (⁰C), брзина воде, електропроводљивост, кисеоник (mg/l, %), pH, тврдоћа воде (dH), BPK₅ (mg/l). h5) квалитет воде. Посебне прилагођености или осетљивост на одређене хемијске, токсичне или радиоактивне материје. Навести карактеристике: трофичност – олиготрофне, мезотрофне, еутрофне, дистрофне. Сапробност: ксеносапробне, олигосапробне, бетамезосапробне, алфамезосапробне и полисапробне. **(ha):** ha1) Хидроморфолошке промене

d): d1) еурифаг-омниватор, d2) еурифаг-хербивор, карниватор, специфичан тип исхране, специфичне морфометријске адаптације за исхрану, d3) стенофаг, специфичне прилагођености за исхрану или монофаг. **(rs):** rs1) репродукција- асехсуална, паразитска; није специфичан тип репродукције (ововивипарни, изолована јаја, цементирана изолована јаја, полагају јаја на вегетацију, или неки супстрат (rs1.1), специфичан тип репродукције (rs1.2), строго специфичан тип репродукције (rs1.3). rs2) време репродукције и фреквентност: rs2.1) флексибилне или мултиволтине rs 2.2) триволтине, биволтине, rs2.3) семиволтине или униволтине rs3) трајање периода емергенције и/ (године): дуг >3 месеца (rs3.1), 1 -3 месеца, (rs3.2), кратак < 1 месеца, (rs3.3). rs4) појава у великом броју (rs 4.1), да, ретко (rs 4.2), да, сваке године (rs4.3). rs5) акватичне фазе: адулт (rs5.1), ларва-нимфа-пупа (rs5.2), јаје (rs5.3). rs6). Стадијум трајања ларве /циклус развића ларве >2 године/целе године (rs 6.1), 1-2 године/2-3 (rs 6.2), < 1 година/један циклус (rs6.3).

re): re1) није ендем и није угрожен re2) ендем за један екорегин, рањив re3) стеноендем за релативно мале или веома мале територије (један екосистем, један биотоп), и изоловане популације угрожене и критично угрожене. **lc):** lc1) животни циклус (година) <1 (lc1.1), ≈1(lc1.2), >1(lc1.3).) покретљивост /тип кретања – веома покретне /пливање) (lc2.1), умерено покретни/пливање (lc2.2), семисеселни-сесилни (lc2.3). lc3) социјални живот: солитари (lc3.1), формирају периодичне агрегације (lc3.2), живе у заједници (lc3.3), ван територије (lc3.4), понекад територијалне (lc3.5), трајно територијалне (lc3.6). lc4) брига о потомству: не постоји (lc4.1), чувају јаја, ларве (lc4.2), брига о јувенилима (lc4.3), нема сексуалног диморфизма (lc4.4), сексуални диморфизам током репродукције (lc4.5) присутан сексуални диморфизам (lc4.6)

¹промене воденог станишта: регулација и рекултивација, вађење шљунка, прекомерна употреба воде. Укључујући промене у већини природног станишта.

²инвазивне врсте (%) или % природне популације снабдеване неадекватним јувенилима (генетички не компатибилних) у последњих 10-20 година ³загађење:

сапробност, еутрофикација, токсично, радиоактивно загађење, ацидификација или мешовито загађење

⁴густина хумане популације преко 150 ст/км² статистичка процена годишњег улова комерцијалних врста већа од реалне производње у последњих 10 година и /или производња мања од реалне и смањена у односу на потенцијалну производњу и / или смањење укупне биомасе.

Табела 2. Елементи коришћени у анализи популационе динамике (PD)

Заузетост потенцијалног ареала		бодови
	<5	5
	5-40%	3
	>40	1
Кретање (динамика) популације		
Абунданца	опада	5
	стагнира	3
	растућа	1
Заузетост потенцијалног ареала	опада	5
	стагнира	3
	растућа	1
Абунданца и дистрибуција на станишту		
није значајна	врста малобројна (1-2 индивидуе) на појединачним локацијама, или мала бројност (1-2 индивидуе) на неколико локација (2-3 микростаништа у оквиру сектора)	5
ограничена	умерена бројност (3-5 индивидуа) на неколико локација (2-3 микростаништа у оквиру сектора)	3
умерена до висока	најмање бројна на умереном броју локација (више од пет индивидуа на више од 3 микростаништа у оквиру испитиваног сектора)	1

На основу укупног броја бодова фактора (ES+HIPPO+PD), издвајају се врсте које имају приоритет заштите на националном нивоу. Степен приоритета заштите се одређује на скали од 3 до 0. Први степен приоритета указује да врста има приоритет у заштити и да је потребно одмах предузети адекватне мере заштите на националном нивоу. Врсте за које је одређен степен приоритета 2, морају бити део сукцесивног истраживања, како би се предузеле мере заштите, уколико је то потребно. Малу вероватноћу изумирања на националном нивоу карактерише степен приоритета заштите 3. Вредност степена приоритета заштите 0, означава да је изумирање врсте у њеном природном станишту у току, и да је један од могућих начина њеног очувања, примена *ex-situ* заштите.

Табела 3. Бодовна скала за одређивање степена ризика од изумирања и приоритета заштите угрожених врста слатководних шкољки према модификованом моделу ESHIPPO-PD.

Број бодова				
Еколошка специјализација (ES)	<25	26-35	36-45	46-50
Ниво еколошке специјализације	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Утицај HIPPO фактора	<36	36-45	46-55	65-70
Ниво утицаја фактора	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Популациона динамика (PD)	<10	11-14	15-20	>20
Ниво утицаја популационе динамике	мали	умерен	истакнут	веома истакнут
Укупан број бодова (ESHIPPO + PD)	<70	61-85	86-90	>90
Критичан ниво ризика од изумирања	мали	умерен	истакнут критичан ниво	изумирање у току
	3	2	1	0

3.5. Морфометријска анализа

У циљу извршења морфолошких анализа, изван број јединки прикупљених на терену транспортован је у лабораторију, где су до извршења фотографисања и мерења, чуване у контролисаним акваријумским условима.

За потребе морфометријске анализе, извршено је фотографисање љуштура шкољки са размерником, дигиталним фотоапаратом (Nikon COOLPIX3100), уз употребу одговарајућег статива. За анализу морфолошке варијабилности љуштуре методама геометријске и традиционалне (линеарне) морфометрије коришћен је леви капак.

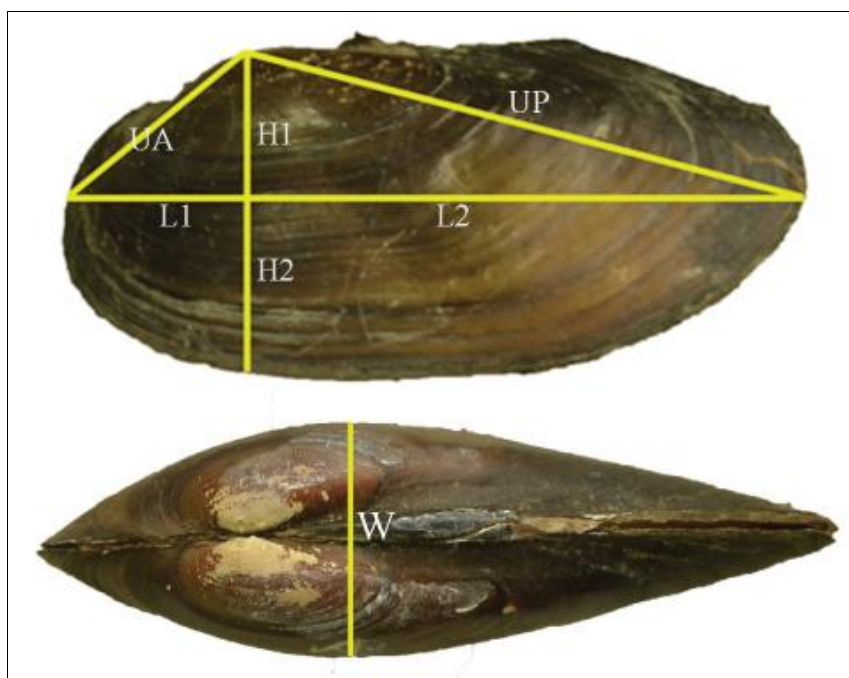
Објекти су фотографисани под истим условима, што подразумева исти положај објекта у односу на раван објектива фото-апарата и константну фокалну дужину. За потребе морфолошких анализа, фотографисана је и унутрашња и спољашња страна љуштуре. Приликом позиционирања објекта, с обзиром на конкавност коју љуштура поседује, у циљу смањења грешке при фотографисању, коришћен је пластелин за причвршћивање објекта у паралелан положај са равни објектива фото-апарата.

3.5.1. Линеарна морфометријска анализа

За традиционалну морфометријску анализу облика љуштуре, извршено је мерење девет дужинских мера (морфометријских варијабли), левог капка љуштуре сваке јединке у оквиру различитих популација. Поред три основне морфометријске варијабле: дужина, висина и ширина, коришћене у радовима више аутора (Badino, 1982; Zettler 1997; Aldridge, 1999; Renard и сар. 2000), извршено је мерење још шест додатних дужинских мера (слика 6, табела 4). Традиционална линеарна морфометријска анализа је извршена на јединкама које су прикупљене током новијих истраживања (укупно 351 јединка), као и на 148 одабраних примерака из музејске збирке (табела 5, табела 6.).

Мерење ширине љуштуре је извршено дигиталним нонијусом. За даљу анализе варијабилности облика, коришћена је половина ове димензије, односно ширина једног капка љуштуре. Мерење осталих дужинских параметара извршено у програму ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), коришћењем дигиталних фотографија.

P. complanata и *A. cygnea*, нису биле обухваћене линеарном морфометријском анализом, због недовољног броја узорака за поређење и статистичку обраду података.



Слика 6. Приказ дужинских параметара љуштуре коришћених при линеарној морфометријској анализи.

Табела 4. Дужински параметри коришћене за линеарну морфометријску анализу.

Опис линеарних димензија левог капка љуштуре	
1	укупна дужина (L1+L2)
2	укупна висина (H)
3	ширна једног капка (W/2)
4	растојање од врха умба до средине постериорне стране тела (UP)
5	растојање од врха умба до средине антериорне стране тела (UA)
6	дужина капка од средине антериорне стране до до тачке пресека (L1)
7	дужина капка од тачке пресека до средине постериорне стране (L2)
8	висина љуштуре од врха умба до тачке пресека (H1)
9	висина љуштуре од тачке пресека до врха вентралне маргине (H2)

Табела 5. Преглед анализираних популација савремених узорака.

Река	Локалитет	број јединки у оквиру анализираних популација				
		<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>	<i>U. crassus</i>	<i>A. anatina</i>	<i>S. woodiana</i>
Дунав	Богојево	22	17			
	Банатска Паланка	14	14			
	Стари Сланкамен					17
	Панчево	21				
	Орешац				16	
Сава	Сремска Митровица			22		
	Јарак	16	17			
	Ушће Босута				8	16
	Шабац		18			
	Дубоко					20
	Остружница	19				
Тиса	Ада	21	17			
Велика Морава	Варварин					16
	Марковачки Мост			10		
	Багрдан					17
	Ћуприја			13		

Табела 6. Преглед анализираних јединки из музејске збирке.

Врста	Опис према колекторским књигама	број јединки
<i>U. tumidus</i>	<i>U. tumidus tumidus</i>	22
	<i>U. tumidus solidus</i>	17
<i>U. pictorum</i>	<i>U. pictorum f. longirostris</i>	18
	<i>U. pictorum f. balatonicus</i>	20
	<i>U. pictorum f. platyrhyncus</i>	12
<i>U. crassus</i>	<i>U. amnicus</i>	18
	<i>U. crassus crassus</i>	28
	<i>U. crassus crassus f. Grandis</i>	13

3.5.2. Геометријска морфометријска анализа

Применом метода геометријске морфометрије (Bookstein, 1991; Rohlf и Marcus, 1993; Dryden и Mardia, 1998), анализирана је варијабилност величине и облика левог капка љуштуре различитих популација савремених узорака шкољки (укупно 241 јединка) и анализа јединки које су припадале музејским узорцима (148 јединки) (табела 5, табела 6).

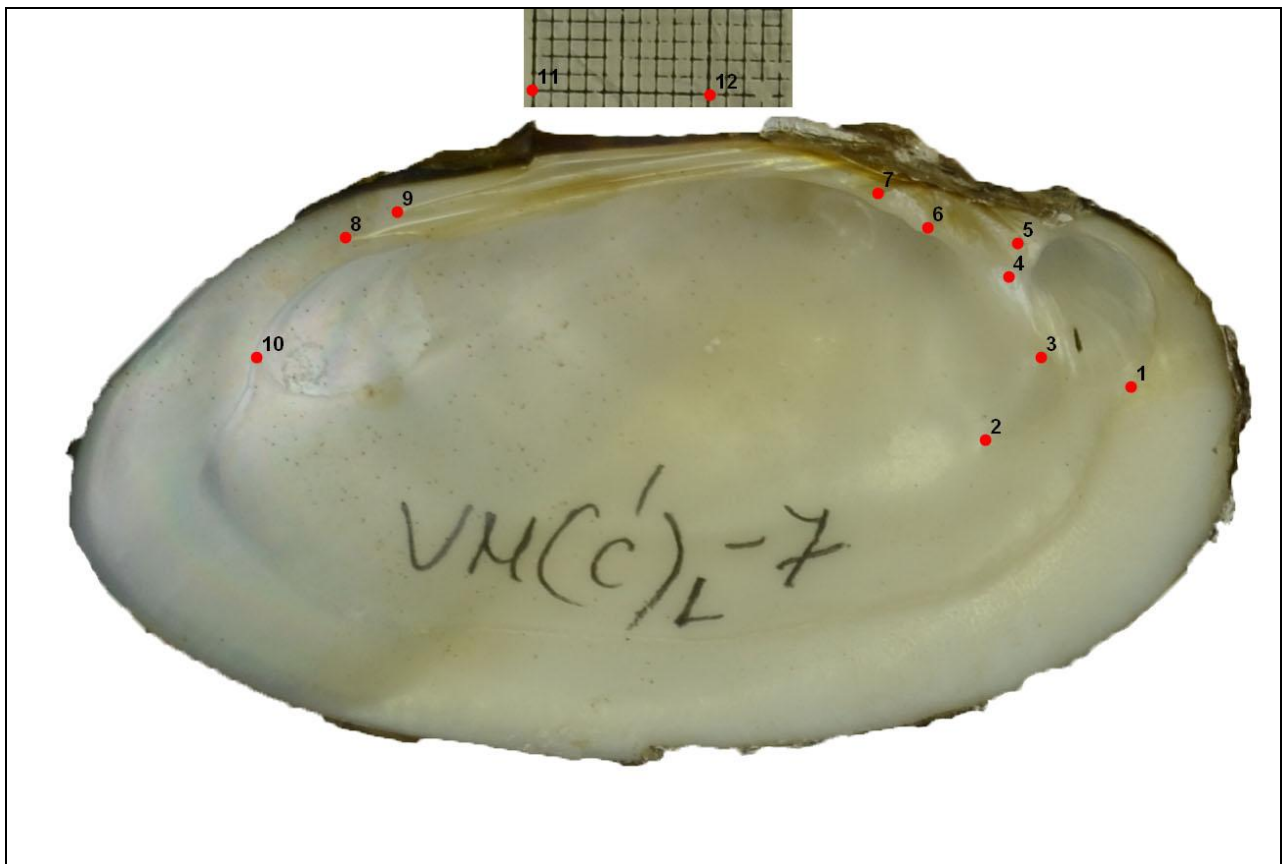
Анализа геометријском морфометријом обухватила је три врсте рода *Unio* (*U. tumidus*, *U. pictorum* и *U. crassus*), с обзиром да је код њих било могуће обезбедити довољан број хомологих специфичних тачака (енгл. *landmarks*), позиционираних у пределу отисака мишића и у региону кардиналних и латералних зуба, левог капка љуштуре (табела 5, табела 6). Хомологе специфичне тачаке коришћене у истраживању које су спровели Morais и сар. (2014), прилагођене су за потребе ове студије.

Остале врсте унионида нису обухваћене геометријско морфометријском анализом, с обзиром на разлике у морфолошким структурама у односу на анализиране врсте рода *Unio*, односно одсуство зуба, није било могуће обезбедити довољан број специфичних тачака, чак и у случају да је постојао довољан број примерака за анализу.

У програмима из TPS серије, који служе за прикупљање дводимензионалних података, односно X и Y координата специфичних тачака, извршена је дигитализација специфичних тачака и припрема фајлова за генерализовану Прокрустову анализу (GPA).

Коришћењем софтвера TpsDig (Rohlf, 2010a), позиционирано је 10 дводимензионалних тачака на левом капку љуштуре, као и две референтне тачке на размернику (тачке 11 и 12) (слика 7, табела 7). У програму TPSUtil (Rohlf, 2012) извршена је манипулација TPS докумената (спајање докумената и уређивање тачака), док је у програму TPSRelw (Rohlf, 2010b) проверавана тачност дигитализације.

Тачке су одабране тако да најрепрезентативније описују облик анализираних морфолошких структура. Према Букштајновој класификацији (Bookstein, 1991), већина тачака припада типу 1 и 2.



Слика 7. Приказ распореда дводимензионалних тачака позиционираних на левом капку љуштуре.

Табела 7. Опис специфичних тачака позиционираних на левом капку љуштуре.

Редни број специфичних тачака	Опис дводимензионалних тачака позиционираних на левом капку љуштуре
1.	тачка сустицања палеалне линије и отиска антериорног мишића адуктора
2.	антериорна тачка отиска мишића протрактора
3.	постериорна тачка отиска мишића протрактора
4.	отисак мишића ретрактора
5.	постериорна инсерција првог кардиналног зуба
6.	постериорна инсерција другог кардиналног зуба
7.	антериорна инсерција другог кардиналног зуба
8.	завршетак доњег лателарног зуба
9.	завршетак горњег лателарног зуба
10.	тачка сустицања палеалне линије и отиска постериорног мишића адуктора

3.6. Статистичка обрада података

3.6.1. Статистичке анализе и геометријска морфометрија

Генерализовом Прокрустовом Анализом (GPA) (Rohlf и Slice, 1990; Dryden и Mardia, 1998; Rohlf, 1999) на нивоу целог узорка су издвојене варијабле величине (величина центроида – енгл. *centroid size*, CS) и варијабле облика (Прокрустове координате).

Варијабилност величине центроида анализирана је факторијалном анализом варијансе (ANOVA). Као фактор који би могао утицати на варијабилност величине центроида тестиран је утицај популације.

Варијабилност облика анализирана је факторијалном мултиваријантном анализом варијансе (MANOVA). Као могући фактор варијабилности облика, односно зависно променљивих варијабли (Прокрустових координата), тестиран је утицај популације.

Издвојене варијабле облика су коришћене за анализу главних компоненти (енгл. *Principal Component Analysis* – PCA). Овом методом је извршена прелиминарна анализа варијабилност унутар целог узорка. Применом анализе главних компоненти (PCA), низ

променљивих које описују неки узорак се преводи у скуп нових променљивих које нису међусобно корелисане и које се називају главне компоненте (PC компоненте). Првих неколико PC компоненти описује највећи проценат варијабилности. PC осе формирају нови координатни систем, тј. користе се као референтне осе, и положаји сваке појединачне јединке у односу на главне компоненте се називају сопствене вредности (енгл. *PC scores*).

Варијабле облика су даље анализирани применом Канонијске дискриминантне анализе (енгл. *Canonical Variate Analysis* – CVA). За разлику од PCA којом се анализира варијабилност на нивоу целог узорка, помоћу CVA се анализирају разлике између унапред дефинисаних група. Издвојене су канонијске осе (енгл. *Canonical Variables* – CV) и добијен графички приказ положаја јединки у односу на прве две издвојене осе (CV1 и CV2). Промене облика које доприносе дискриминацији анализираних група представљене су у облику TPS деформација (енгл. *Thin Plate Spline*), дуж прве и друге канонијске осе.

Мултиваријантном анализом коваријансе (MANCOVA) утврђен је тренд зависности облика од величине (алометријски односи) између анализираних популација и тестирана хомогеност нагиба регресионих правих. У оквиру анализе тестиран је утицај популације као независне варијабле, логаритмоване величине центроида ($\ln CS$) као коваријабле и њихове интеракције на варијабилност облика (Прокрустових координата као зависних варијабли). Статистичка значајност интеракција између ефекта популације и коваријабле ($\ln CS$) указује на да ли су нагиби регресионих кривих хомогени или не, односно да ли се нагиби алометријских правих разликују.

Мултиваријантном регресијом варијабли облика (Прокрустове координате) на логаритмовану варијаблу величине ($\ln CS$) на нивоу целог узорка, процењен је утицај величине на укупну варијабилност облика. Полазећи од нулте хипотезе о одсуству зависности између величине и облика, применом пермутационог теста са 10 000 понављања, процењена је статистичка значајност утицаја алометријског раста (Good, 1994). Промене облика условљене алометријским растом су визуелно представљене у виду TPS деформација.

Величина разлика у облику љуштуре између популација, квантификована је Прокрустовим дистанцама (Pd). Полазећи од нулте хипотезе о непостојању разлика између анализираних група, а на основу пермутационог теста са 10 000 понављања,

процењена је статистичка значајност израчунатих Прокрустових дистанци (Good, 1994).

Варијабилност величине и облика љуштуре статистички је анализирана комбинацијом два програма: „Statistica“ верзија 6 (StatSoft, Inc., 2004) и MorphoJ (Klingenberg, 2011).

3.6.2. Остале статистичке анализе

За анализу заједнице слатководних шкољки, као и повезаности промена у саставу заједница и еколошких (абиотичких) фактора, коришћене су кореспондентна анализа (CA) и канонијско-кореспондентна анализа (CCA) (ter Braak, 1986; Ter Braak и Verdonschot, 1995, Palmer, 2000, Karadžić, 2013).

Одабир најзначајнијих фактора утицаја, извршен је применом претходне селекције (енгл. *forward selection*), уз коришћење Pearson-овог корелационог теста у оквиру CCA анализе. Monte Carlo пермутациони тест (999 пермутација, $p < 0,05$), коришћен је како би се проверила статистичка значајност суме свих својствених вредности (*eigen vrednost*), појединачних фактора (Karadžić, 2013).

За утврђивање разлике између популација, као и значајност тестираних фактора (линеарних морфолошких варијабли), за дискриминацију популација, примењена је Дискриминантна анализа (DA).

Величина разлика у облику љуштуре између популација, квантификована је квадратним Махаланобисовим дистанцама. На основу пермутационог теста процењена је статистичка значајност израчунатих Махаланобисових дистанци.

Наведене анализе извршене су применом статистичких софтвера „Statistica“ верзија 6 (StatSoft, Inc., 2004) и „FLORA“ верзија 6 (Karadžić и Marinković, 2009; Karadžić, 2013).

4. Результати

На истраживаном подручју, забележено је 7 врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae, које су сврстане у четири рода (табела 8).

Табела 8. Списак забележених врста шкољки из фамилије Unionidae у Србији

Род	Врста
<i>Unio</i>	<i>Unio pictorum</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Unio tumidus</i> Philipsson, 1788
	<i>Unio crassus</i> Philipsson, 1788
<i>Anodonta</i>	<i>Anodonta anatina</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Anodonta cygnea</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Pseudanodonta</i>	<i>Pseudanodonta complanata</i> (Rossmässler, 1835)
<i>Sinanodonta</i>	<i>Sinanodonta woodiana</i> (Lea, 1834)

4.1. Резултати истраживања заједнице слатководних шкољки фамилије Unionidae у Србији – приказ забележене фауне

4.1.1. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Дунава

Анализом заједнице слатководних шкољки (унионида), у делу тока Дунава кроз Србију, узимајући у обзир све узорке прикупљене у периоду од 2001. до 2013. године, утврђено је присуство шест врста. Највећу процентуалну заступљеност у заједници, имала је врста *U. tumidus* (51.44%). Мање учешће у заједници забележено је за врсте *U. pictorum* (18.04%), *S. woodiana* (13.83%) и *A. anatina* (4.09%). Са знатно мањим уделом у укупној заједници биле су присутне врсте *P. complanata* (2.07%) и *U. crassus* (0.53%) (табела 9).

Према учесталост налаза врста у српском делу тока Дунава, *U. tumidus* се може означити као еуконстанта врста (веома честа), присутна у преко 80% узорака. Као константне, односно честе врсте, на овом делу тока Дунава, са учесталошћу појављивања у преко 60% узорака, детектоване су *U. pictorum* и *S. woodiana*. Појављивавање у преко 50% узорака (умерено често) бележи се за врсту *A. anatina*, док

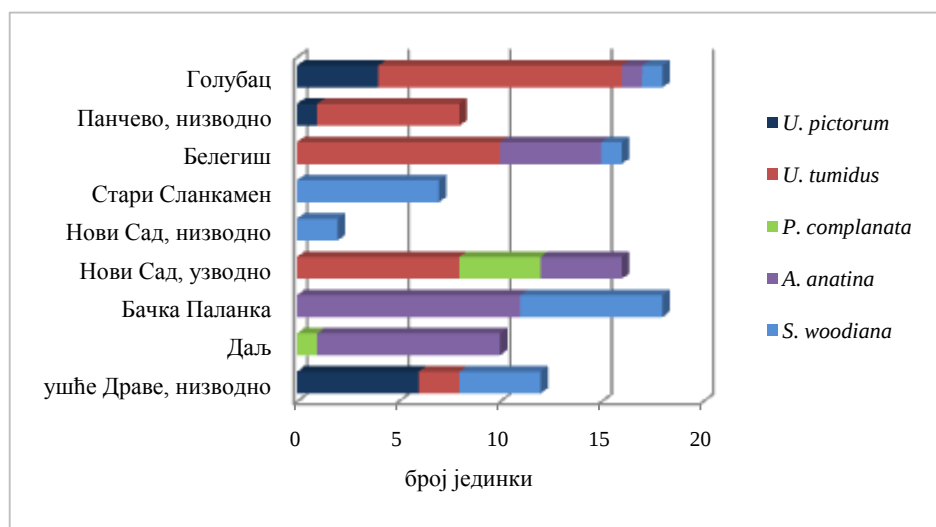
се врсте *P. complanata* и *U. crassus*, могу означити као ретке и/или врло ретке (табела 9).

Таксономска разноврсност и број јединки по локалитету у Дунаву, варирали су током периода истраживања. У 2001. години, укупно је забележено пет врста. Од шест забележених врста у текућим водама Србије, једино није забележена врста *U. crassus*. Највећа разноврсност забележена је на локалитету Голубац (четири врсте), док је на локалитетима Сланкамен и Нови Сад (низводно), била забележена само по једна врста (слика 8).

Број јединки по локалитету варирао је од 2 забележене индивидуе (Нови Сад, низводно), до 18 детектованих јединки у Бачкој Паланци и Голупцу.

Дистрибуција врста, учесталост појављивања и заступљеност у заједници су се, такође, мењали током периода истраживања.

Прво појављивање шкољки у Дунаву након уласка из Мађарске, током истраживања у 2001. години, бележи се на локалитету Ушће Драве (низводно), у пограничном делу између Србије и Хрватске (слика 8). У том, најузводнијем делу тока у Србији где су шкољке регистроване, бележи се значајна бројност популације *U. pictorum*. Поновно појављивање ове врсте са мањом бројношћу популације, регистровано је на још два локалитета (Панчево, низводно и Голубац), у најнизводнијем делу тока кроз Србију, у којем су забележене шкољке током 2001. године. *U. tumidus* се, такође, појављује у најузводнијем делу тока (слика 8), достиже нешто већу бројност око Новог Сада, након чега достиже стабилну популацију на сектору од Белегиша до Голупца. Значајна бројност популације, на сектору од Даља до Новог Сада (узводно), бележи се за врсту *A. anatina*. Поновно појављивање ове врсте је регистровано на локалитету Белегиш, са значајним уделом у заједници, након чега је појављивање ове врсте уочено на најнизводнијем локалитету (Голубац), са знато мањим учешћем у заједници (слика 8). Присуство *S. woodiana* се бележи на најузводнијем локалитету, повећава своју бројност на локалитету Бачка Паланка. На сектору од Новог Сада до Сланкамена, гради униформну популацију, након чега се појављивање ове врсте бележи низводно, са мањим уделом у заједници. *P. complanata*, забележена је на само два локалитета (Даљ и Нови Сад, узводно) (слика 8).



Слика 8. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2001. години

Током 2007. године, укупан специјски диверзитет је био непромењен у односу на 2001. годину (5 врста), при чему је на два локалитета (ушће Драве, узводно и Нови Сад, низводно), забележен максималан диверзитет, а на три локалитета (ушће Драве низводно, Даљ и Сланкамен), детектована је само по једна врста (слика 9). Најмањи број јединки забележен је на локалитетима Сланкамен и Даљ (по једна јединка), док је на локалитету Банатска Паланка, регистрован највећи број јединки (75).

U. pictorum према истраживањима из 2007. године бележи значајну фреквенцу појављивања, у више од 60% узорака (табела 9). Највећа бројност популације је забележена на локалитету Банатска Паланка.

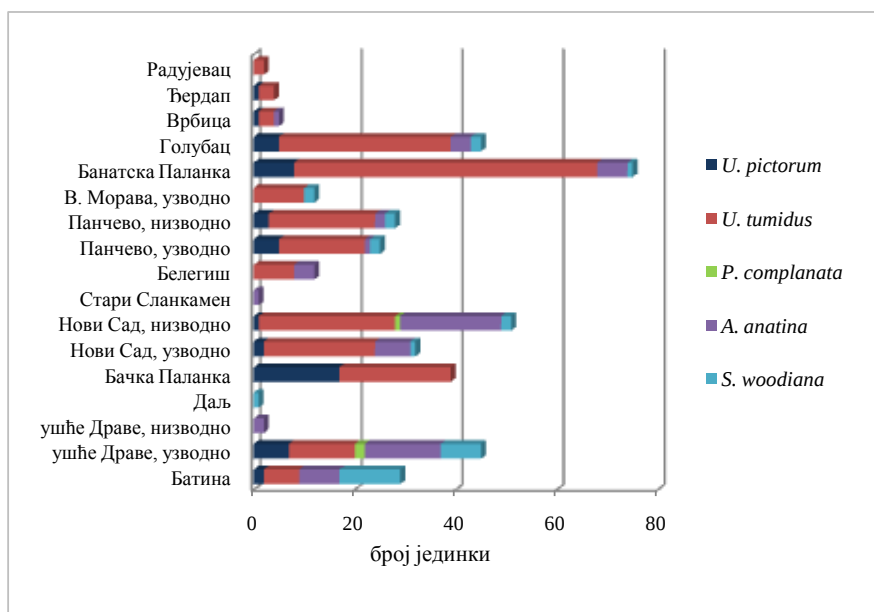
U. tumidus је једна од најприсутнијих и најзаступљенијих врста, на делу тока Дунава кроз Србију, са највећом бројношћу популације на локалитетима Банатска Паланка и Голубац, након чега бројност знатно опада на најнизоводнијим локалитетима (слика 9).

За разлику од 2001. године, *A. anatina* бележи знато већу фреквенцу појављивања, али са знатно мањим учешћем у заједници у односу на претходни период (табела 9). Највећа бројност популације ове врсте је забележена у најузводнијем делу току, и делу тока око Новог Сада, након чега бројност популације опада у низводном делу (слика 9).

Учесталост појављивања *S. woodiana* је незнатно мања у односу на 2001. годину, али је бројност популације значајно смањена у односу на претходни период (табела 9).

На локалитетима у горњем делу тока Дунава на улазу у Србију (Батина и ушће Драве, узводно), забележена је највећа бројност популације ове врсте.

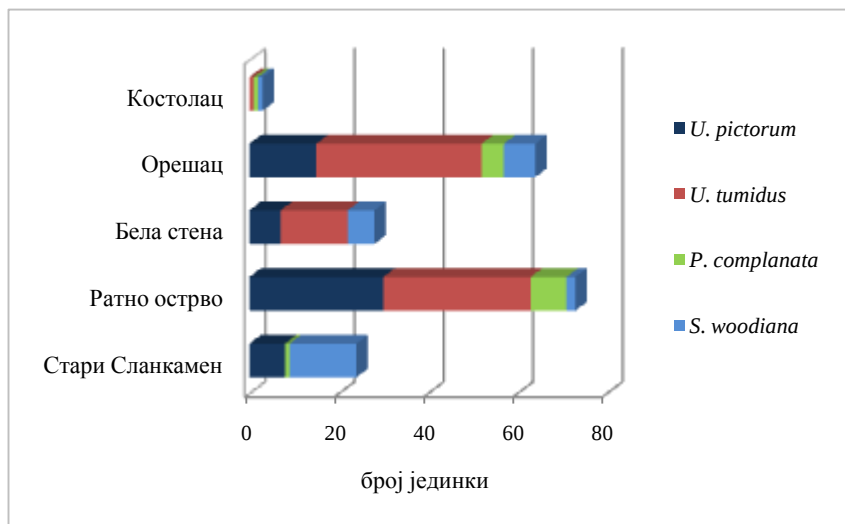
У 2007., слично као и у 2001. години, *P. complanata*, се може означити као веома ретка врста, појављује се на свега два локалитета, са учешћем у заједници испод 1% (табела 9).



Слика 9. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2007. години.

У периоду 2009. до 2012. године, специјски диверзитет је нешто мањи (4 врсте), али је број забележених јединки по узорку знатно већи, и варирао је од 3 јединке (Костолац), до чак 73 забележене јединке (Ратно Острво). У овом периоду, поред врсте *U. crassus*, није детектована ни врста *A. anatina*.

U. tumidus и *U. pictorum*, се у периоду од 2009. до 2012. године могу означити као доминантне врсте на истраживаној деоници, са укупном заступљеношћу у заједници скоро 80% (табела 9). Заједно са врстом *S. woodiana*, представљају еуконстантне врсте (слика 10, табела 9). У овом периоду учесталост налаза за врсту *P. complanata* се значајно повећава (табела 9).



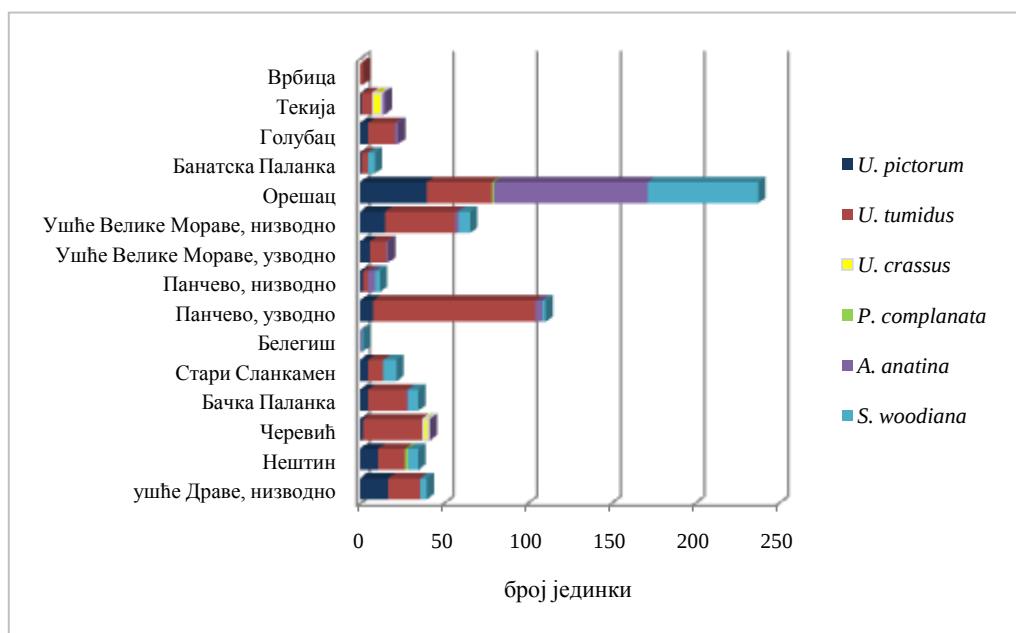
Слика 10. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у периоду 2009-2012. година.

У 2013. години, регистровано је свих шест врста слатководних шкољки (слика 11), карактеристичних за текуће воде. За разлику од претходних истраживања, током 2013. се бележи присуство врсте *U. crassus* на два локалитета (Орешац и Текија).

Највећи специјски диверзитет је забележен на локалитету Орешац (5 таксона), док је само једна врста била забележена на локалитету Врбица (слика 11). Број забележених јединки по узорку је знатно варирао. У узорцима са локалитетета Врбица и Белегиш забележене су по две јединке у узорку, док је на локалитету Орешац регистровано чак 238 јединки у узорку.

Као најчешће налажене врсте (еуконстантне), дуж целог истраживаног дела тока у 2013. години, биле су врсте *U. tumidus* и *U. pictorum*. Бројност популације *U. pictorum* дуж читавог тока је била уједначена, и чинила је мање од 20% укупне заједнице, за разлику од популације *U. tumidus* која је чинила скоро 50% укупне заједнице (табела 9).

Са дистрибуцијом дуж читавог тока, приближно једнаким учешћем у заједници и фреквенцом појављивања, биле су распрострањене *A. anatina* и *S. woodiana* током истраживања у 2013. години (слика 11, табела 9).

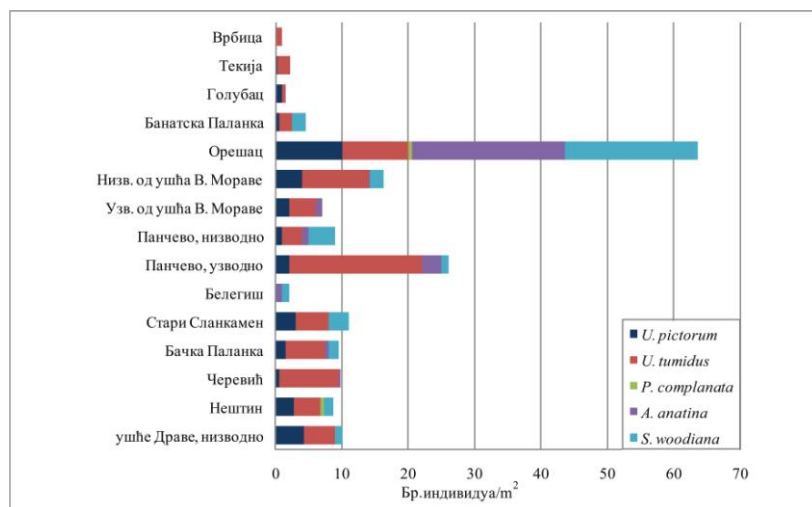


Слика 11. Преглед заједнице у Дунаву са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2013. години.

Табела 9. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједници Дунава у различитим фазама истраживања и у укупном узорку.

	2001		2007		2009-2012		2013		сви узорци	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<i>U. pictorum</i>	0.33	10.28	0.65	12.75	0.85	28.43	0.87	17.64	0.69	18.04
<i>U. tumidus</i>	0.56	36.45	0.82	61.03	0.85	50.80	0.93	48.28	0.81	51.44
<i>U. crassus</i>	/	/	/	/	/	/	0.13	1.20	0.04	0.53
<i>P. complanata</i>	0.22	4.67	0.12	0.74	0.71	6.39	0.13	0.45	0.23	2.07
<i>A. anatina</i>	0.56	28.04	0.71	17.40	/	/	0.67	16.44	0.56	14.09
<i>S. woodiana</i>	0.67	20.56	0.59	8.09	1	14.38	0.67	15.99	0.69	13.83

Густина популације на одабраним локалитетима на Дунаву, приказана је на слици 12.



Слика 12. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку Дунава.

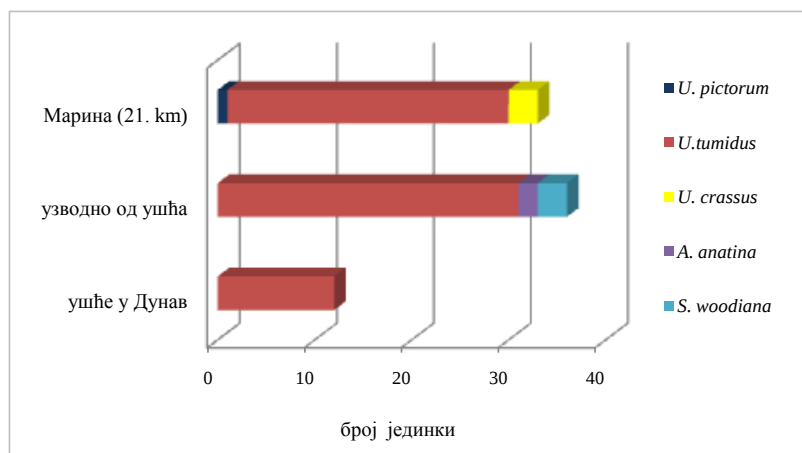
4.1.2. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Саве

Током истраживања реке Саве у периоду од 2001. до 2012. године, укупно је забележено шест врста шкољки на истраживаном подручју, од ушћа Босута у Саву до Београда (табела 10). Доминантна врста у заједници је била *U. tumidus* (48.60%), потом следи *U. pictorum* (17.96%) и са готово једнаким учешћем у заједници врсте *S. woodiana* и *U. crassus* (15.82% и 15.49%). Најмању процентуално учешће у заједници имале су врсте *A. anatina* (1.98%) и *P. complanata* (0.16%).

Према учесталости појављивања, *U. tumidus* и *S. woodiana* се могу означити као еуконстантне врсте, забележене у преко 80% узорака (табела 10). Често појављивање регистровано је за врсте *U. pictorum* и *U. crassus*, у преко 50% узорака, док су *A. anatina* и *P. complanata* биле врло ретке ($F=0.18$; $F=0.06$).

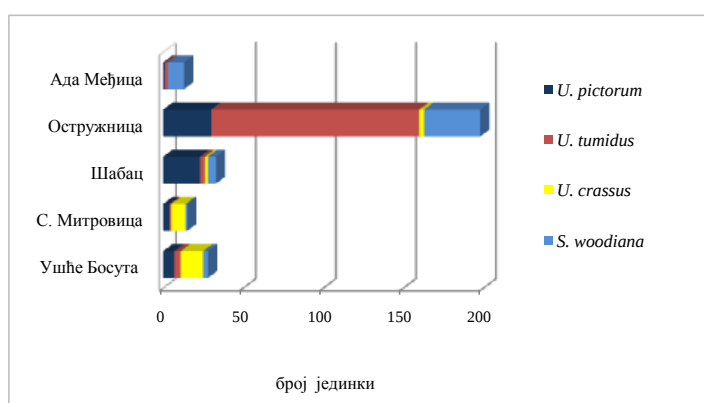
Прикупљање узорака у периоду од 2001. до 2010. извршено је на ограниченом сектору београдског региона, све до 21. km тока и забележено је присуство пет врста (слика 13). Број забележених јединки се кретао од 12 (ушће Саве у Дунав), до 36 (узводно од ушћа Саве). Са учешћем у заједници од скоро 90%, *U. tumidus* је била доминантна врста и забележена је у свим узорцима, док су остале врсте биле

подједнако учестале. Са равномерним уделом у заједници, биле су присутне *U. crassus* и *S. woodiana*, потом следи *A. anatina*, и са најмањим учешћем *U. pictorum* (табела 10).



Слика 13. Преглед заједнице у Сави са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у периоду 2001-2010. године.

Током 2011. године, на истраживаном делу тока Саве кроз Србију, забележене су четири врсте шкољки (слика 14). Специјски диверзитет је уједначен целом дужином тока, док је број забележених јединки варирао од 13 (Ада Међица) до 198 (Остружница). *U. pictorum*, *U. tumidus* и *S. woodiana*, су еуконстантне врсте на Сави, при чему врсте рода *Unio* чине преко 70% укупне заједнице, док је *S. woodiana* имала знато мањи удео у заједници (слика 14, табела 10). За разлику од Дунава где је означена као врло ретка, врста *U. crassus* је забележена у више од 80% узорака на Сави (табела 10).

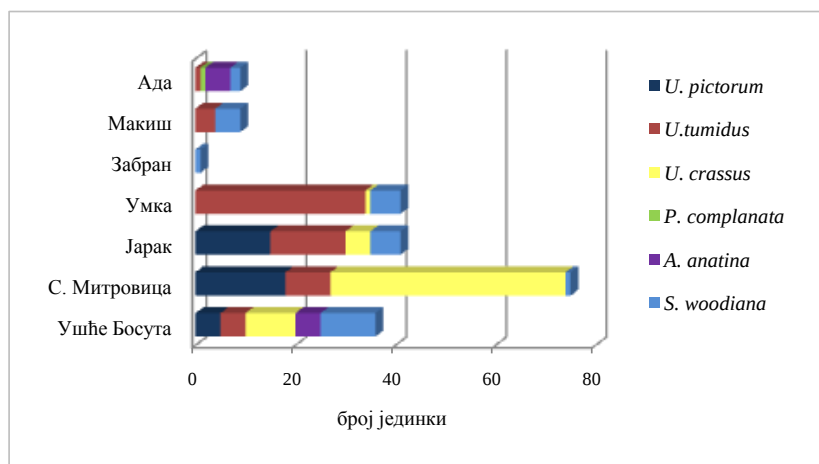


Слика 14. Преглед заједнице у Сави са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2011. години.

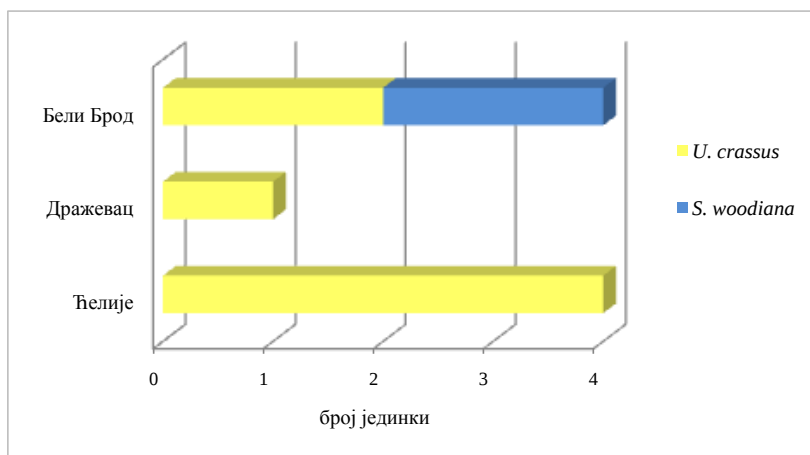
Истраживањем истог сектора реке Саве током 2012. године, бележи се већи диверзитет у односу на претходну годину (6 врста). Највећи специјски диверзитет забележен је на локалитету Ушће Босута, а најмањи на локалитету Забран, где је забележена само једна врста (слика 14). Највећи број јединки у узорку (75) забележен је на локалитету Сремска Митровица, а најмањи на локалитету Забран (1).

Дистрибуција *S. woodiana* обухвата целу истраживану деоницу, као и у претходној години, са нешто мањим учешћем у укупној заједници. Као доминантна врста може се означити *U. tumidus*, који чини трећину укупне заједнице и појављује се у више од 80% узорака (табела 10). У 2012. години, регистровано је значајно повећање бројности популације *U. crassus*, нарочито на локалитету Сремска Митровица (47 јединки) (слика 15). Током 2012. године бележи се појављивање врста *A. anatina* и *P. complanata*, које се могу означити као ретка и врло ретка, с обзиром на учешће појављивања, али и са малим уделом у укупној заједници (слика 15, табела 10).

У сливу Саве, извршено је прикупљање узорака и на реци Колубари, у периоду 2009.-2013. година, на три локалитета. Врста *U. crassus*, била је доминантна у сливу Колубаре, чинила је 77.78% популације и детектована је на свим локалитетима (слика 16, табела 10). Присуство врсте *S. woodiana* са знатно мањим учешћем у заједници (22.22%), регистровано је једино у узорку са локалитета Бели Брод у 2013. години (слика 16, табела 10).



Слика 15. Преглед заједнице у Сави са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима у 2012. години.



Слика 16. Преглед заједнице у Колубари са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима.

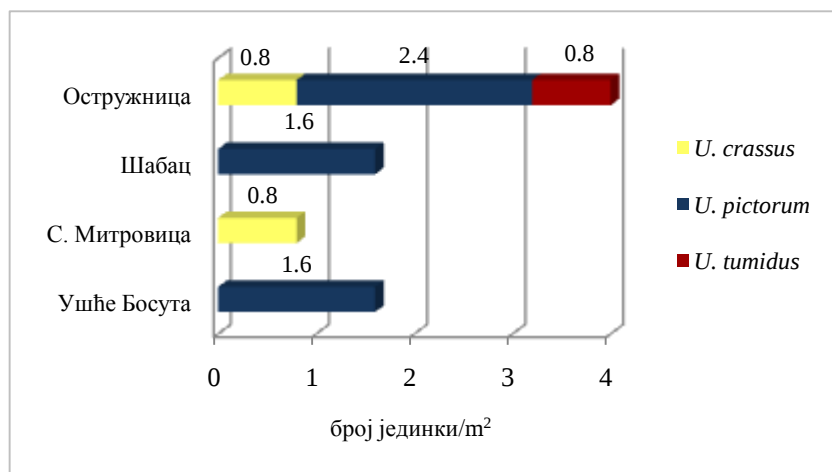
Табела 10. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједници Саве и Колубаре у различитим фазама истраживања и у укупном узорку.

	Сава								Колубара	
	2001-2010		2011		2012		сви узорци		2009-2013	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<i>U. pictorum</i>	0.33	1.23	1	22.65	0.43	17.92	0.59	17.96	/	/
<i>U. tumidus</i>	1	88.89	1	48.78	0.86	32.08	0.88	48.60	/	/
<i>U. crassus</i>	0.33	3.70	0.8	9.76	0.57	29.72	0.53	15.49	1	77.78
<i>P. complanata</i>	/	/	/	/	0.14	0.47	0.06	0.16	/	/
<i>A. anatina</i>	0.33	2.47	/	/	0.29	4.72	0.18	1.98	/	/
<i>S. woodiana</i>	0.33	3.70	1	18.82	1.00	15.09	0.88	15.82	0.33	22.22

За процену густине популације, прикупљени су и квантитативни узорци. У поређењу са семиквантитативним узорцима, диверзитет врста у квантитативним узорцима у Сави је мањи. У квантитативним узорцима са истраживаног сектора реке Саве у периоду 2011.-2012., забележене су све три врсте рода *Unio*. Највећи диверзитет је био на локалитету Остружница (све три врсте рода *Unio*), док је на осталим локалитетима била забележена само по једна врста (слика 17).

У узорцима који су прикупљени са дефинисане површине (25x25cm), највећу учесталост појављивања, имала је врста *U. pictorum*, са густином популације од 1.6 индивидуа/м² (Ушће Босута и Шабац), до 2.4 индивидуе/м², на локалитету

Остружница. Ова врста није регистрована једино у Сремској Митровици, у којој је са густином популације од 0.8 индивидуа/м², забележена само врста *U. crassus*. Са истом густином популације *U. crassus*, је забележен и на локалитету Сремска Митровица (0.8 индивидуа/м²). *U. tumidus*, са густином у популацији од 0.8 индивидуа/м², забележен је само у Остружници (слика 17).



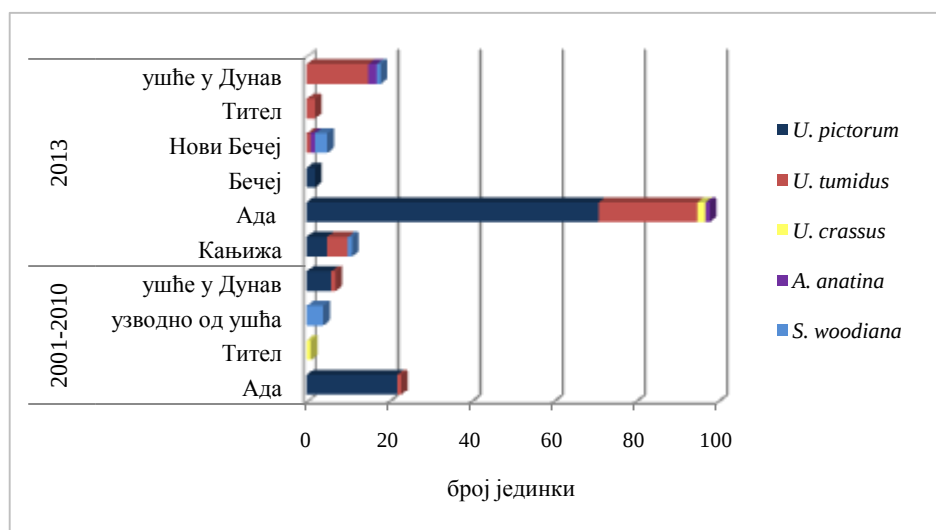
Слика 17. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку у Сави

4.1.3. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Тисе

Истраживање реке Тисе, од Кањиже до ушћа у Дунав, извршено је у периоду 2001.-2010. и 2013. године. Током истраживања, забележено је шест врста слатководних шкољки (слика 18, табела 11). Присуство *A. anatina*, било је детектовано само у 2013. години, док је *P. complanata* регистрована једино у квантитативном узорку. Највећи специјски диверзитет је забележен на локалитету Ада (4 врсте), у 2013. години, док је само по једна врста детектована на два локалитета у периоду 2001.-2010. (Тител, узодно од ушћа у Дунав), и локалитетима Тител и Бечеј, у 2013. години. Највећа абунданца је забележена на локалитету Ада (98 јединки), у 2013. години, а само једна јединка је регистрована на локалитету Тител, у периоду 2001.-2010.

Узимајући у обзир све податке, доминантна врста у Тиси, за разлику од Саве и Дунава, је *U. pictorum* са преко 60% удела у укупној заједници, и уједначеном фреквенцом појављивања (табела 11). *U. tumidus* се може означити као субдоминантан, у укупном узорку, са знатним повећањем удела у заједници и учесталости појављивања

у 2013. години, у односу на претходни период (слика 18, табела 11). Смањење бројности популације и учесталости појављивања у 2013. години у односу на ранији период, забележено је за *U. crassus*. Смањење бројности популације, уз повећање учесталости налаза у 2013. години, уочава се и за *S. woodiana*. *A. anatina* није забележена у периоду 2001.-2010., док је у 2013. години детектована у преко 50% узорака.

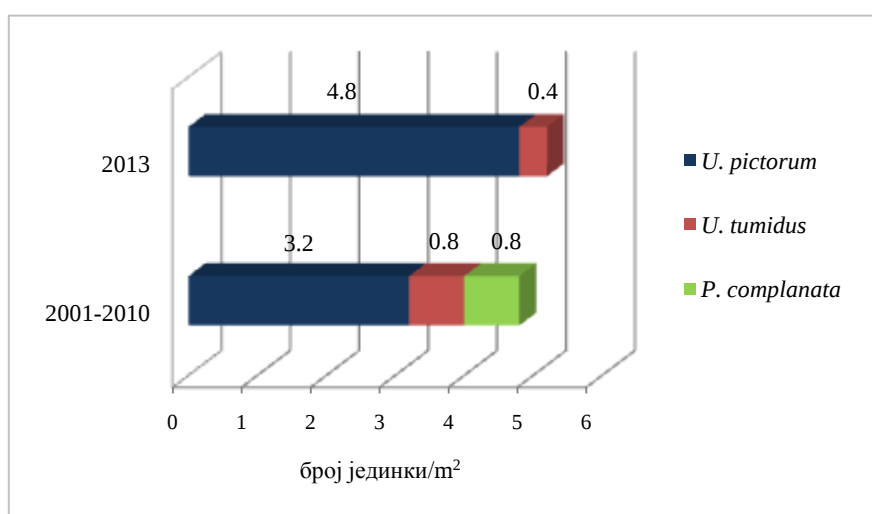


Слика 18. Преглед заједнице реке Тисе са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима.

Табела 11. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједници реке Тисе у различитим фазама истраживања и у укупном узорку.

	2001-2010		2013		сви узорци	
	F	%	F	%	F	%
<i>U. pictorum</i>	0.5	80.00	0.50	57.35	0.5	61.99
<i>U. tumidus</i>	0.5	5.71	0.83	34.56	0.7	28.65
<i>U. crassus</i>	0.25	2.86	0.17	1.47	0.2	1.75
<i>P. complanata</i>	/	/	/	/	/	/
<i>A. anatina</i>	/	/	0.50	2.94	0.3	2.34
<i>S. woodiana</i>	0.25	11.43	0.50	3.68	0.4	5.26

Мањи диверзитет у Тиси (3 врсте), забележен је у квантитативним узорцима у односу на квалитативне, узимајући у обзир оба циклуса истраживања (слика 19). Највећу густину популације у оба циклуса истраживања, имала је врста *U. pictorum*, са тенденцијом повећања густине у 2013. години до 4.8 јединки/ m^2 . Код врсте *U. tumidus*, уочава се смањење густине популације у другом циклусу истраживања од 0.8 до 0.4 индивидуе/ m^2 . Током истраживања у периоду од 2001. до 2010. године, регистрована је *P. complanata* (0.8 индивидуа/ m^2), која није била забележена ни у семиквантитативним, нити у квантитативним узорцима из 2013. године (слика 19).



Слика 19. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку у Тиси.

4.1.4. Преглед заједнице слатководних шкољки у сливу Велике Мораве

У оквиру слива Велике Мораве, истраживање је вршено на Великој и Западној Морави. Прикупљање узорака са Велике Мораве извршено је једном месечно током 2010. године, на потезу од Варварина до ушћа у Дунав, при чему је бројности популације представљена у виду просечних вредности.

Током истраживања у сливу Велике Мораве, пет врста шкољки забележено је у Великој Морави, док је у Западној Морави регистровано присуство три врсте (слика 20, табела 12).

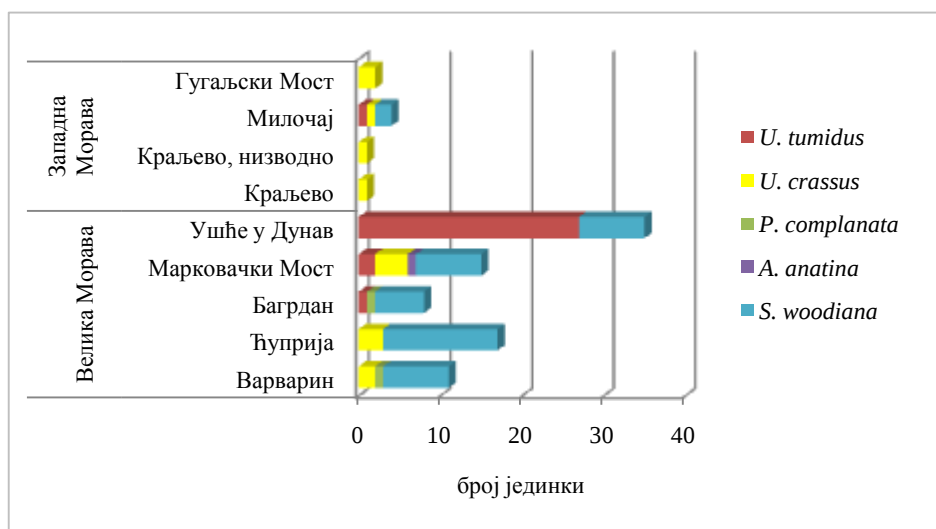
За разлику од Дунава, Саве и Тисе, у Великој Морави није регистровано присуство врсте *U. pictorum*. На локалитету Марковачки Мост, забележен је највећи диверзитет (четири врсте), а најмања разноврсност уочена је на локалитету Ћуприји (две врсте), у поређењу са другим локалитетима на Великој Морави. Просечан број јединки у узорку, варирао је од осам забележених јединки на локалитету Багрдан до 35 јединки забележених у узорку близу ушћа Велике Мораве у Дунав.

Највећа процентуална заступљеност у укупној заједници и максимална учесталост налаза, уочена је за врсту *S. woodiana*, која се може означити као доминантна врста у заједници, односно еуконстантана врста у Великој Морави (табела 12). Подједнака учесталост појављивања забележена је за *U. tumidus* и *U. crassus*, али са знатном разликом у бројности популације на истраживаном сектору. Са процентуалном заступљеношћу од 34.88%, *U. tumidus* представља субдоминантну врсту на Великој Морави (табела 12). Знатно мање учешће у заједници, забележено је за *P. complanata* и *A. anatina* (< 4%). У односу на све присутне врсте у великој Морави, *A. anatina* је имала најмању учесталост појављивања и детектована је само на једном локалитету. Највеће учешће појављивања врсте *P. complanata* узимајући у обзир све истраживане реке забележено је у Великој Морави (0.4).

У квантитативним узорцима са Велике Мораве забележене су три врсте слатководних шкољки (слика 21). Готово подједнака дисперзија популација *U. tumidus* и *U. crassus* забележена је у квантитативним узорцима са оба локалитета, док је значајна густина популације врсте *U. tumidus*, била присутна само у узорку са локалитета Марковачки Мост.

Током истраживања Западне Мораве, у периоду 2010.-2013. година, за разлику од свих истраживаних водотокова, врста *U. crassus* је била доминантна (62.5% учешћа у укупној заједници) и била је присутна на свим локалитетима (слика 20, табела 12). Појединачни налази ове врсте забележени су на три локалитета, а незнатно већа бројност од две јединке, регистрована је на локалитету Гугаљски Мост. Присуство других врста, осим *U. crassus*, забележено је једино у узорку са локалитета Милочај, где су забележене и врсте *U. tumidus* и *S. woodiana*. У укупној заједници Западне Мораве, *S. woodiana* се може означити као субдоминантна врста са процентуалним учешћем од 25%, а нешто ниже учешће у заједници од 12.5%, детектовано је за *U. tumidus*.

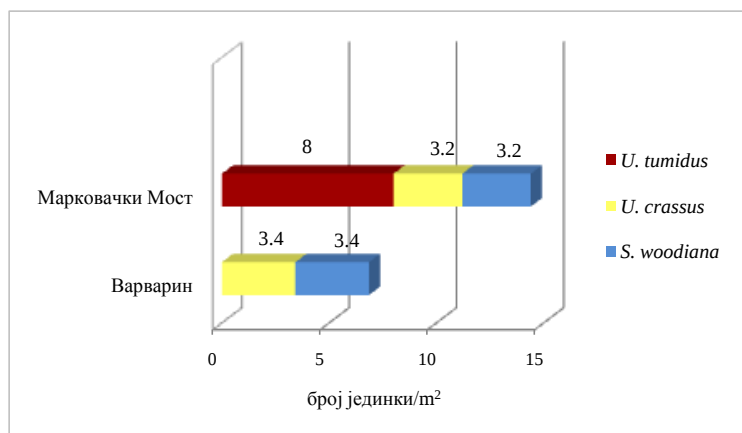
У квантитативном узорку са Западне Мораве забележена је само врста *U. crassus* са густином популације од 3 јединке/m².



Слика 20. Преглед заједница Велике Мораве и Западне Мораве са приказом абунданце врста на истраживаним локалитетима.

Табела 12. Приказ учесталости појављивања врста (F) и њихове процентуалне заступљености (%) у заједницама Велике Мораве и Западне Мораве.

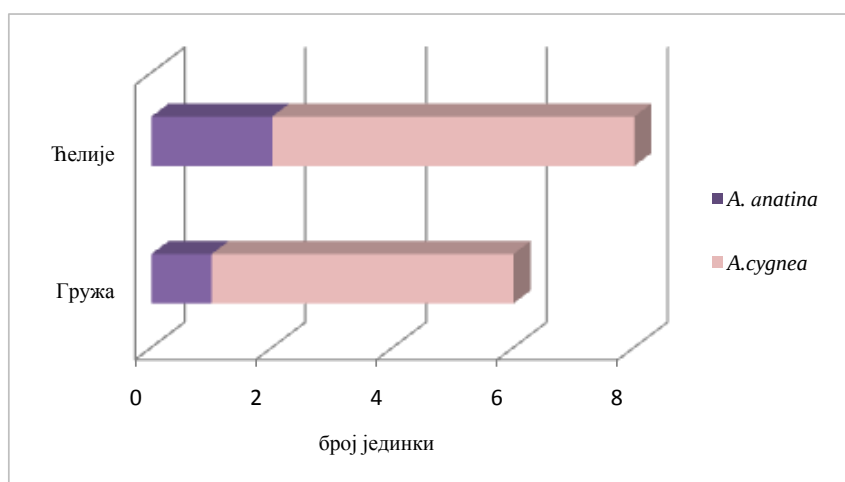
	Велика Морава		Западна Морава	
	F	%	F	%
<i>U. tumidus</i>	0.6	34.88	0.25	12.5
<i>U. crassus</i>	0.6	10.47	1	62.5
<i>P. complanata</i>	0.4	2.33	/	/
<i>A. anatina</i>	0.2	1.16	/	/
<i>S. woodiana</i>	1	51.16	0.25	25



Слика 21. Приказ густине популације присутних врста у квантитативном узорку у Великој Морави.

4.1.5. Преглед заједнице слатководних шкољки у акумулацијама Гружа и Ћелије

Истраживањем акумулација Гружа и Ћелије забележено је присуство две врсте (слика 22, табела 13). У односу на истраживане водотокове, врста *A. cygnea*, детектована је једино у истраживаним акумулацијама, као доминантна врста у заједници. Са знатно мањом процентуалном заступљеношћу у заједницама истраживаних акумулација, била је присутна још једино врста *A. anatina*.



Слика 22. Преглед заједница истраживаних акумулација Гружа и Ћелије са приказом абунданце врста.

Табела 13. Приказ процентуалне заступљености (%) врста у заједницама акумулација Гружа и Ћелије.

	Гружа %	Ћелије %
<i>A. cygnea</i>	83.33	75
<i>A. anatina</i>	16.67	25

4.2. Таксономске и еколошке карактеристике, као и дистрибуција врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae у Србији

4.2.1. *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758)



Слика 23. Примерак врсте *Unio pictorum*

Кратак опис врсте

Просечна димензије врсте: дужин од око 87 mm, висина од 37 mm, и ширина валви од 27 mm. За ову врсту је карактеристична јасно издужена љуштура, са паралелни дорзалним и вентралним маргинама капка, заобљеном антериорном страном и конусном постериорном страном љуштуре. Умбо се налази одмах иза лигамента, који је дуг и узак. Туберкуларни израштаји на умбу су постављени усправно у два реда. Има развијене кардиналне и латералне зубе. Боја љуштуре је маслинасто-жута до браон, са израженим браон линијама раста (слика 23).

Карактеристике макро- и микростаништа

U. pictorum насељава углавном станишта великих равничарских река, језера и акумулација, а може се наћи и у каналима или барским екосистемима. Популације ове врсте показују тенденцију груписања у приобалним (литоралним) деловима водених екосистема, мада велику бројност могу достићи и на већој удаљености од обале и већим дубинама. У односу на брзину тока, може се окарактерисати као лимнофилна врста, која преферира споротекуће воде и лентичке зоне. Прилагођена је на тип супстрата који карактерише велике равничарске реке (песковито-муљевити супстрат). У мањем броју

може се наћи и на стаништима где преовладава шљунковита подлога и детритус или уз ободну макрофитску вегетацију. Заступљеност врста у односу на тип екосистема, надморску висину, преференцији према супстрату, дубини и удаљености од обале представљена је у табели 14.

Дистрибуција врсте у Србији

Распрострањење врсте *U. pictorum* у Србији, углавном је ограничено на низијски, северни део земље (<200 m надморске висине), и обухвата станишта великих равничарских река. Присуство ове врсте забележено је дуж готово читавог тока Дунава и Саве. У Тиси, представља доминантну врсту и највећу бројност популације достиже у узводном делу тока. Није регистрована у Великој Морави и у мањим истраживаним равничарским рекама.

4.2.2. *Unio tumidus* Philipsson, 1788



Слика 24. Примерак врсте *Unio tumidus*

Кратак опис врсте

Просечна димензије љуштуре: дужина 75 mm, висина 35 mm и ширина валви 26 mm. У поређењу са претходном врстом, ову врсту одликује овалнија љуштура, са израженом заобљеношћу вентралне маргине валви. Убо је изражен и поседује изражајне таласасте гребене. Валве су спојене широким и кратким лигаментом, са израженим кардиналним и латералним зубима. Боја љуштуре варира и може бити маслинасто зелена до браон, са уочљивим браон линијама раста, и често са израженим жуто обојеним деловима, распоређеним у виду зрака (слика 24).

Карактеристике макро- и микростаништа

Ова врста речне шкољке насељава углавном доње токове великих равничарских река, језера, акумулације и канале. У односу на зону речног тока, популације ове врсте се групишу у литоралном делу реке, али и на нешто већој удаљености од обале, све до средине корита реке. Већу бројност достиже на стаништима са песковито-муљевитом подлогом, али може бити присутна у мањем броју у деловима тока где има шљунка, детритуса и у деловима где се налази макрофитска вегетација. Особине микро- и макростаништа које карактеришу ову врсту представљене су у табели 14.

Дистрибуција у Србији

Врста *U. tumidus* је широко распрострањена у великим равничарским рекама и представља најприсутнију врсту слатководних шкољки у Србији. Регистрована је дуж читавог тока Дунава и Саве, где представља доминантну врсту. Као субдоминантна врста, присутна је у Тиси. У односу на *U. pictorum*, чије је распрострањење углавном ограничено на северни део земље, *U. tumidus* има шири ареал и забележено је њено распрострањење јужно од Саве и Дунава, односно Великој и Западној Морави.

4.2.3. *Unio crassus* Philipsson, 1788



Слика 25. Примерак врсте *Unio crassus*

Кратак опис врсте

За разлику од претходне две врсте рода *Unio*, за врсту *U. crassus* је карактеристична изражено заобљена љуштура у постериорном делу, и потпуно заобљена дорзална маргина капка. Просечна димензије врсте: дужина 60 mm, висина 31

mm и ширина валви 22 mm. Лигамент зглоба који спаја валве, на којима се налазе снажно развијени латерални и кардинални зуби, је врло изражен (кратак и проширен). Умбо се пружа од линије зглоба, јасно је изражен и постављен више дорзо-латерално, са уочљивим таласастим ругама. Одликују га јако развијени кардинални зуби. Боја љуштуре је светло- до тамно браон са израженим тамно браон линијама раста (слика 25).

Карактеристике макро- и микростаништа

U. crassus насељава приобалне делове у доњим токовима великих равничарских река, као и равничарске реке мањих површина слива. Може се окарактерисати као рео- до лимнофилна врста, која преферира спорији проток или станишта са умереним протоком воде, где преовладава песковито-шљунковити супстрат. У мањем броју, популација ове врсте може бити присутна и у деловима тока где је заступљен супстрат нешто крупнијих фракција (ситан камен), или макрофитска вегетација (табела 14).

Дистрибуција у Србији

За разлику од Дунава и Тисе, где је регистрован у малом броју на врло ограниченим деловима тока, *U. crassus* је у Сави и Великој Морави забележен дуж готово читавог тока, али и у равничарским рекама мање површине слива, Западној Морави, Колубари и реци Пештан, где представља главни конституент испитиваних заједница.

4.2.4. *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)



Слика 26. Примерак врсте *Anodonta anatina*

Кратак опис врсте

Ову врсту одликује заобљена вентрална маргина капка, док се дорзална маргина благо шири у односу на централну осу љуштуре. Заобљена је у антериорном делу, и благо издужена у постериорном делу. Просечне димензије: дужина 76 mm, висина 41 mm и ширина 26 mm. Предео умба се не издиже изнад дорзалне маргине капка, и на њему се налазе слабо уочљиви, благо таласасти гребени. Боја љуштуре је зеленкаста, браон или жута. Код ове врсте зуби нису развијени (слика 26).

Карактеристике макро- и микростаништа

A. anatina насељава доње токове великих равничарских река, језера, акумулације, канале, а присутна је и у барским екосистемима. Као и код осталих речних шкољки, популације ове врсте се концентришу у приобалним деловима, где преовладава песковито-муљевити супстрат. У мањем броју може бити присутна у деловима тока где има шљунка, ободним деловима где се налази макрофитска вегетација, али и на тресетном супстрату. Лимнофилна је врста која преферира лентичке зоне или спорији проток воде (табела 14).

Дистрибуција у Србији

A. anatina је широко распрострањена дуж готово целог тока Дунава. У реци Сави је забележена на ограниченом деловима тока, на најузводнијем делу, и делу тока око Београда, док су за Тису и Велику Мораву, карактеристични само појединачни налази ове врсте.

4.2.5. *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758)



Слика 27. Примерак врсте *Anodonta cygnea*

Кратак опис врсте

Ова врста представља једну од највећих слатководних шкољки детектованих у Србији. Просечна дужина љуштуре је око 130 mm, висина 63 mm, а ширина валви око 40 mm. Карактерише је издужена љуштурса са скоро паралелним вентралним и дорзалним маргинама капака. Умбо није изражен, не издиже се изнад дорзалне маргине капка, и поседује слабо изражене гребене. Боја љуштуре је најчешће маслинасто зелена или жуто-зелена са браон линијама раста. Валве су спојене слабо развијеним лигаментом и не поседују зубе (слика 27).

Карактеристике макро- и микростаништа

A. cygnea насељава углавном лентичке екосистеме (језера, акумулације, баре), а може бити присутна и у великим равничарским рекама, где преовладава спорији проток. Популације ове врсте показују тенденцију груписања у приобалним

(литоралним) деловима водених екосистема, где преовладава песковито-муљевита подлога, и могу се наћи на дубинама до 2 m (табела 14).

Дистрибуција у Србији

Према тренутним сазнањима *A. cygnea* није детектована у великим равничарским рекама, где је некада била распрострањена. Дистрибуција ове врсте у Србији на основу резултата наших истраживања, је забележена у акумулацијама Гружа и Ћелије, у Шумаричком језеру и барско мочварном екосистему Засавица, где је била доминантна врста у заједници.

4.2.6. *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835)



Слика 28. Примерак врсте *Pseudanodonta complanata*

Кратак опис врсте

Обликом веома подсећа на *A. anatina*, али је ширина њених валви знатно мања (мање тумидна љуштура). За разлику од свих осталих врста које одликује неједнака ширина у различитим деловима љуштуре, ова врста је готово исте ширине целом површином валви. Код ове врсте просечна дужине валви је око 80 mm, висина 38 mm и ширина валви 17 mm. Умбо није изражен, и на њему су парови наизменично распоређених гребена. Боја љуштуре је маслинасто зелена, бакарно зелена до браон (слика 28).

Карактеристике макро- и микростаништа

P. complanata насељава углавном приобалне делове доњих токова великих равничарских река. Преферира станишта где преовладава муљевити супстрат, а у мањем броју може бити присутна и на деловима тока са песковитим супстратом. Показује тенденцију да насељава и нешто дубље делове водених екосистема. Живи у заједици са осталим врстама слатководних шкољки, али са знатно мањом абунданцом у поређењу са осталим врстама (табела 14).

Дистрибуција у Србији

У односу на све слатководне шкољке регистроване у Србији, *P. complanata* има најмању област распрострањења и абунданцу у истраживаном подручју. Са највећом бројношћу налажена је у Дунаву, у горњим и средњим деловима тока кроз Србију. Значајну учесталост појављивања имала је у Великој Морави, док се у Тиси и Сави бележе само појединачни налази у 2012. години.

4.2.7. *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834)



Слика 29. Примерак врсте *Sinanodonta woodiana*

Кратак опис врсте

Ова врста заједно са *A. sугнеа*, спада у највеће слатководне шкољке забележене у Србији. Просечне дужина љуштуре је око 93mm, висина 56mm и ширина 35mm. Љуштуру ове врсте одликује готово полукружни облик, са равнијом дорзалном маргином капка која у постериорном делу благо дивергира у односу на централну осу љуштуре, и јако заобљеном вантралном маргином капка. Умбо се не издиже изнад дорзалне маргине капка и на њему се налазе концентрично распоређени, благо таласасти гребени и може бити знатно *тумидан*. Боја љуштуре може бити зеленкаста или светло до тамно браон.

Карактеристике макро- и микростаништа

S. woodiana насељава приобалне делове токова великих равничарских река, где преовладава фино гранулисани, муљевито-глиновити супстрат. У мањем броју може бити присутна и у мањим равничарским рекама, језерима, акумулацијама и барским екосистемима. Преферира спорији проток воде. Насељава приобалне делове водених екосистема, али се може наћи на и већим дубинама (табела 14).

Дистрибуција у Србији

Истраживања су показала да је *S. woodiana* до сада забележена дуж читавог тока Дунава, Тисе, Саве и Велике Мораве. Ширење ове инвазивне врсте детектовано је и у Западној Морави и Колубари, где имала значајно учешће у заједници.

Табела 14. Заступљеност врста у односу на карактеристике макро- и микростаништа.

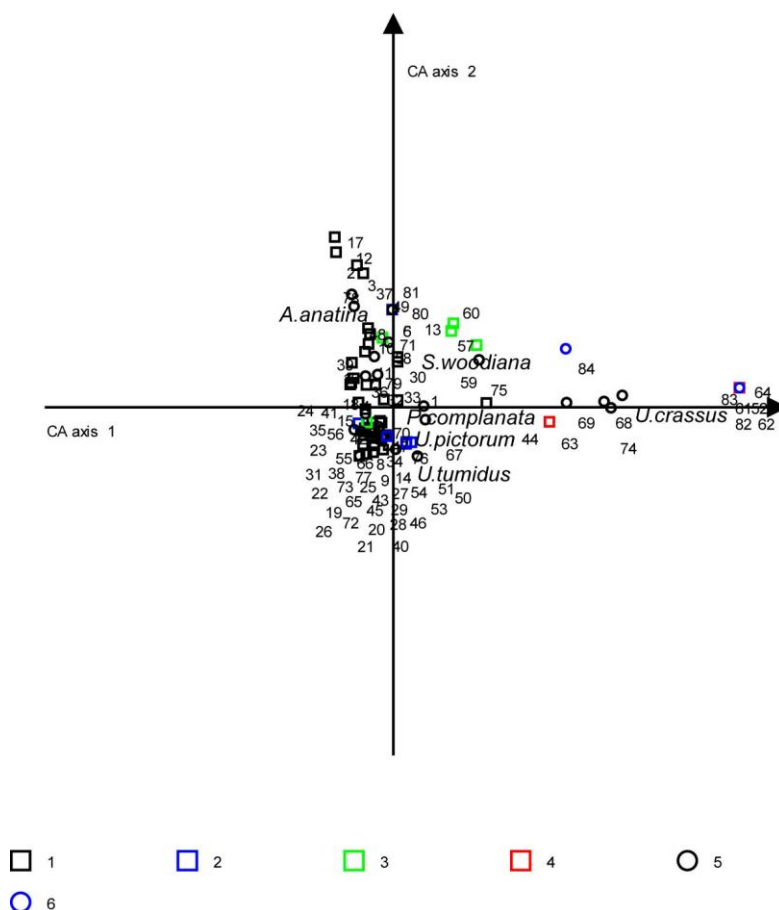
		<i>U. pictorum</i>	<i>U. tumidus</i>	<i>U. crassus</i>	<i>A. anatina</i>	<i>A. cygnea</i>	<i>P. complanata</i>	<i>S. woodiana</i>
станиште	језера/акумулације							
	барски екосистеми							
	мање равничарски реке/потоци							
	велике равничарске реке							
	канални							
супстрат	камен							
	шљунак							
	песак							
	муљ							
	тресет							
	земља							
	макрофите							
	детритус							
надморска висина (m)	<200							
	200-400							
	>400							
дубина (m)	<0.5							
	0.5-1							
	1-2							
	2-5							
	>5							
удаљеност од обале	<0.5							
	0.5-2							
	средина корита							
проток (cm.s ⁻¹)	без протока							
	спор (<25)							
	умерен (25-50)							
	брз (>50)							

*легенда присутна присутна у малом броју отсутна



4.3. Фаунистичка анализа

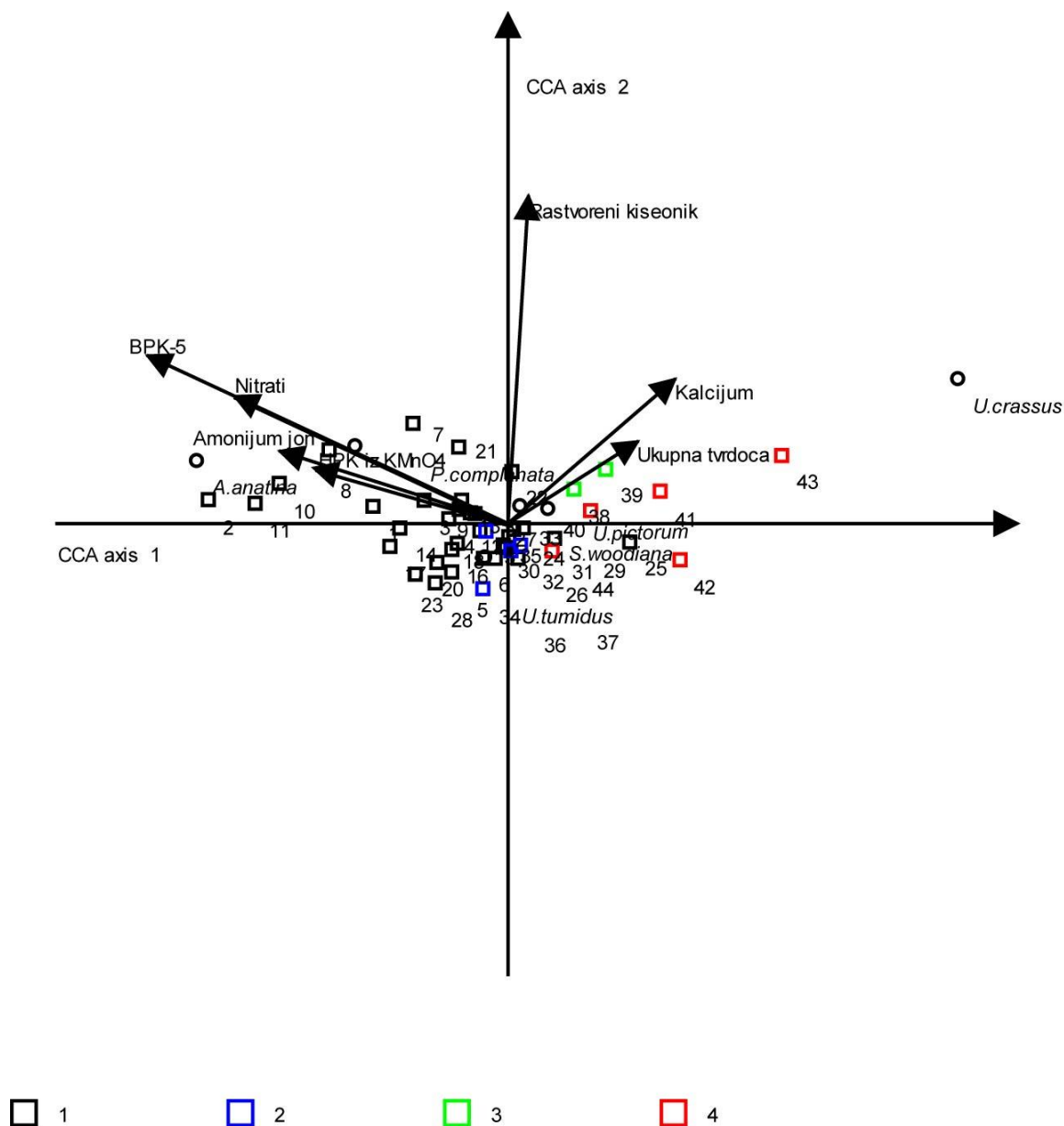
Анализа заједнице шкољки проучаваних водотокова извршена је применом кореспондентне анализе (СА) у оквиру софтверског пакета „Statistica“. Испитивање је извршено на сету од 84 узорка са истраживаних река. Графички приказ резултата извршене анализе (слика 30), у односу на две најзначајније осе, указује на специфичност заједница шкољки на Сави, Западној Морави и Колубари (прва оса - СА1 описује 35% варијабилности, док је другом осом - СА2 описано 26% варијабилности). Овој специфичности највише доприноси врста *U. crassus*, која је доминантан конституент обрађених заједница датих река, при чему је на Колубари, уз *S. woodiana* и једини забележени представник групе унионида, а у Западној Морави поред споменутих врста забележена је још једино врста *U. tumidus*.



Слика 30. Приказ резултата кореспондентне анализе (СА) за заједницу слатководних шкољки у простору прве две кореспондентне осе. Кодирани су узорци са различитих водотокова (1- Дунав; 2 - Тиса; 3 - Велика Морава; 4 - Западна Морава; 5 - Сава; 6 - Колубара).

4.3.1. Анализа утицаја физичко-хемијских параметара воде на испитивану заједницу шкољки

Испитивање односа врста и физичко-хемијских параметара средине, извршено је на одабраном сету узорка са Дунава, Саве, Тисе и Велике Мораве (укупно 44 узорка). Применом FS (Forward Selection) методе, засноване на *Pearson*-овом корелационом тесту ($p < 0.05$), утврђен је градијент утицаја физичко-хемијских параметара на заједницу шкољки и омогућен одабир најзначајнијих параметара. На овај начин одабрано је седам од укупних 24 срединска параметра (табела 15), који су затим анализирани применом Канонијске коресподентне анализе (CCA). Положај врста у оквиру заједнице слатководних шкољки према најзначајнијим физичко-хемијским параметрима у односу на две најзначајније осе, графички је приказан на слици 31. У односу на прву канонијску осу (CCA1) која описује 41% варијабилности, уочава се издвајање врста *U. crassus* у позитивном делу, односно *A. anatina* у негативном делу CCA1 осе. Уколико посматрамо анализиране физичко-хемијске факторе, такође је могуће уочити раздвајање по првој оси, тако да на једној страни (десна страна графика) имамо концентрацију калцијума (Ca) у води и укупну тврдоћу, а на другој страни ВРК5, НРК, концентрацију нитрата и амонијум јона. Концентрација раствореног кисеоника у води, иако један од најважнијих фактора (представљено самом дужином одговарајућег вектора на графику), практично не доприноси срединском градијенту дуж прве осе, али је зато одређујући фактор друге осе (CCA2), при чему је позитивно корелисана са преосталим факторима. Најзад, посматрајући однос параметара и врста у првом срединском градијенту, може се уочити позитивна корелација врсте *U. crassus* са концентрацијом калцијума у води и укупном тврдоћом, односно негативна корелација са вредностима ВРК5, НРК, концентрацијом нитрата и амонијум јона, са којима је у позитивној корелацији *A. anatina*, издвојена у негативном делу осе. У односу на другу канонијску осу (CCA2) која описује 22% варијабилности, уочава се позитивна корелисаност обе врсте са концентрацијом раствореног кисеоника. Остале анализиране врсте могу се означити као индиферентне у односу на анализиране факторе.



Слика 31. Приказ резултата канонијске коресподентне анализе (ССА) за заједницу унионидних шкољки и одабраних срединских параметара у простору прве две канонијске коресподентне осе. Вектори су графички приказ значајности параметара: BPK-5, НРК из KMnO_4 , концентрације калцијума, нитрата, амонијум јона, раствореног кисеоника и укупна тврдоће. Узорци са различитих водотокова су кодирани (1 - Дунав; 2 - Тиса; 3 - Велика Морава; 4 - Сава).

Табела 15. Градијент утицаја физичко-хемијских параметара на заједницу слатководних шкољки као резултат селекције претходне селекције.

средински параметар	својствена вредност	F статистика	вероватноћа
ВРК-5	0.1655	6.7638	0.0000
НРК из КМnO4	0.1176	4.5995	0.0000
Калцијум	0.1098	4.2652	0.0020
Укупна тврдоћа	0.1041	4.0226	0.0020
Амонијум јон	0.1036	4.0030	0.0000
Нитрати	0.1024	3.9510	0.0040
Растворени кисеоник	0.0912	3.4861	0.0280
Сулфати	0.0770	2.9075	0.0560
% засићења воде кисеоником	0.0657	2.4570	0.0760
Укупни фосфор	0.0637	2.3770	0.0820
pH - вредност	0.0591	2.1969	0.0980
Укупни алкалитет	0.0535	1.9791	0.0760
UV екстинкција	0.0518	1.9156	0.0900
Слободни CO ₂	0.0500	1.8450	0.1320
Калијум	0.0445	1.6337	0.1260
Температура воде	0.0431	1.5829	0.2440
Ортофосфати	0.0419	1.5366	0.1920
Електропроводљивост	0.0384	1.4050	0.2200
Силицијум диоксид	0.0378	1.3805	0.2040
Суспендоване материје	0.0374	1.3655	0.4300
Магнезијум	0.0362	1.3205	0.3020
Натријум	0.0298	1.0823	0.3900
Хлориди	0.0276	1.0009	0.4920
Нитрити	0.0224	0.8097	0.5980

4.3.2. Анализа утицаја тешких метала на испитивану заједницу

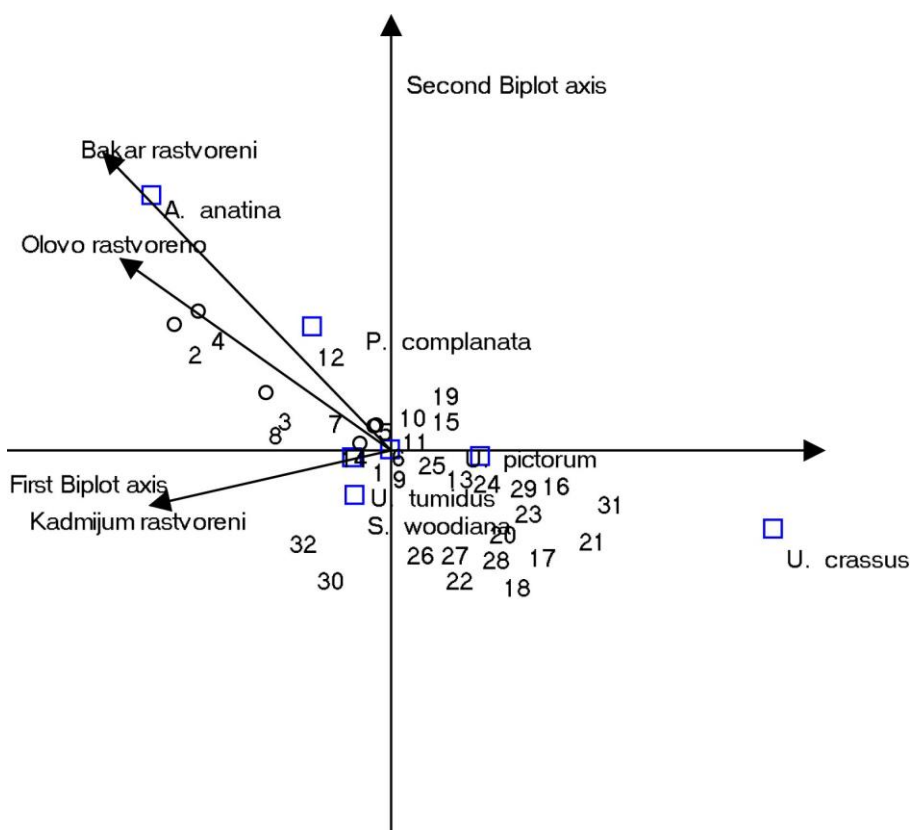
СЛАТКОВОДНИХ ШКОЉКИ

Испитивање утицаја тешких метала на заједницу слатководних шкољки, извршено је на одабраном сету од укупно 33 узорка са Дунава, Саве и Тисе. Одабир најзначајнијих фактора утицаја, извршено је применом претходне селекције (енгл. *forward selection*), у оквиру ССА анализе, при чему су добијени ранжирани фактори, почевши од најбоље корелисаних са испитиваним заједницама слатководних шкољки (табела 16). Применом Канонијске коресподентне анализе (ССА), извршена је даља анализа заједнице у односу на три одабрана најзначајнија параметра. Мултиваријантни односи врста и локалитета према најважнијим факторима из групе тешких метала, приказани су на слици 32. У односу на прву осу (ССА1) која описује 52% варијабилности, може се уочити одвајање врсте *A. anatina*, код које се уочава повећана толеранција на присуство ових метала, у односу на *U. crassus*, који показује негативну

корелисаност, односно осетљивост према анализираним факторима, док за остале анализирани врсте није уочено посебно одвајање у односу на преференцију/толеранцију према факторима.

Табела 16. Градијент утицаја тешких метала на заједницу слатководних шкољки као резултат претходне селекције.

средински параметар	својствена вредност	F статистика	вероватноћа
Бакар растворени	0.1054	3.57457	0.004
Олово растворено	0.0768	2.52466	0.032
Кадмијум растворени	0.0696	2.27056	0.084
Жива растворена	0.047	1.49658	0.104
Манган растворени	0.0451	1.43309	0.16
Гвожђе растворено	0.0305	0.95558	0.39
Никл растворени	0.024	0.74648	0.484
Арсен растворени	0.0131	0.40236	0.606



Слика 32. Приказ резултата Канонијско коресподентне анализе (ССА) за заједницу слатководних шкољки и одабраних срединских параметара из групе тешких метала у простору прве две канонијске коресподентне осе. Вектори су графички приказ значајности параметара: бакар, олово, кадмијум.

4.4. Преглед слатководних шкољки према историјским подацима – ревизија музејске збирке

Анализирану музејску збирку шкољки, колекционара Анте Тадића, чиниле су 244 јединке, прикупљене у периоду 1953.–1972. године. Према музејским протоколима на основу записа аутора, забележено је укупно 30 таксона слатководних шкољки из фамилије Unionidae (табела 17). Подручје истраживања било је веома разноврсно и обухватало је речне системе различитих сливних површина, језера и канале (прилог 1, табела 1).

Провера статуса, ранга врста и постојање потенцијалних синонима извршена је према Фауни Европе (de Jong и сар. 2014) и бази слатководних шкољки MUSSELp database (Graf и Cummings, 2013). Многе врсте/подврсте/форме, према тренутним сазнањима представљају синониме постојећих врста, које су вероватно због велике морфолошке варијабилности и описа од стране различитих аутора одеређене као различити таксони, као на пример, за форму *U.tumidus kopociensis* f. Nova (Тадић), не постоји других података о њеном налазу и опису, сем појединачног налаза у Копачком језеру 1954. године, који је забележио Анте Тадић. На подручју Србије, у оквиру рода *Unio*, користећи и податке базе слатководних шкољки MUSSELp database (Graf и Cummings, 2014), највећи број синонима (класификованих као посебне врсте), као што се може видети у табели 17, уочено је за *U. crassus*, *Unio savensis*, *Unio serbicus*, *Unio rivalis*, *Unio pančići*, први пут је описао Henri Drouët у својој конхолошкој студији о унионидама Србије, са прегледом систематике само за подручје Србије (Drouët, 1882). Опис врсте *Unio bosnensis*, дао је Моленорф (Möllendorff, 1874) у Фауни Босне (Fauna Bosniens). Услед експанзије описа врста, и услед њихове велике морфолошке варијабилности, многе врсте добијају називе према земљи из које потичу, локалитету или подручју, као и према самом сакупљачу. У монографској студији Fritz-а Haas-а из 1969. године (Haas, 1969), појављују се још неки синоними врсте *U. crassus*, карактеристични за примерке сакупљене на подручју Србије. Један од таквих синонима је и назив *Unio dokici*, који је према литературним подацима (Haas, 1969), детектован у Колубари, у близини Ваљева. Врсту је одредио и описао Drouët, вероватно по Лазару Докићу који је био сакупљач.

Велики број синонима, у музејским записима, појављује се и за врсте *A. cygnea* и *A. anatina* (табела 17). На основу објављених података чак 549 синонима позната су за врсту *A. cygnea* на нивоу Европе (Haas, 1969).

Табела 17. Списак забележених таксона на подручју Србије, према историјским подацима из периода 1953.–1972. усаглашени према валидној таксономији.

називи врста према музејској збирци	називи подврсте/форме према музејској збирци	имена врста према валидној таксономији
<i>U. pictorum</i> *	<i>Unio pictorum f. longirostris</i> de Joannis, 1859	= <i>Unio pictorum</i>
	<i>Unio pictorum f. balatonicus</i> Servain, 1881	= <i>Unio pictorum</i>
	<i>Unio pictorum f. platyrhyncus</i> * Rossmassler 1835	
<i>U. tumidus</i> *	<i>Unio tumidus solidus</i> Zelebor, 1851	= <i>Unio tumidus</i>
	<i>Unio tumidus tumidus</i> * Philipson 1788	
	<i>U. tumidus kopociensis f. Nova</i> Тадић	нема података у литератури
<i>U. crassus</i> *	<i>Unio crassus crassus</i> * Philipson 1788	
	<i>Unio crassus cytherea</i> * Kuster 1833	
	<i>Unio crassus batavus</i> * (Maton & Rackett, 1807)	
	<i>Unio crassus f. Grandis</i>	нема података у литератури
	<i>Unio crassus crassus f. Grandis</i>	нема података у литератури
<i>Unio amnicus</i> Rossmässler, 1836	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio consentaneus</i> 'Zigel' Rossmässler, 1836	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio serbicus</i> Drouet, 1884	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio reniformis</i> 'Schmidt' Rossmässler, 1836	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio rivalis</i> Drouet, 1884	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio bosnensis</i> Möllendorff, 1874	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio savensis</i> Drouet, 1882	-	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio pančići</i> Drouet, 1882	-	= <i>U. crassus</i>
<i>A. cygnea</i> *	-	
<i>Anodonta cygnea cellensis</i> Pfeiffer, 1821	-	= <i>A. cygnea</i>
<i>Anodonta moesica</i> Drouët, 1881	-	= <i>A. cygnea</i>
<i>Anodonta ventricosa</i> Pfeiffer, 1825	-	= <i>A. cygnea</i>
<i>Anodonta cariosa</i> Küster, 1842	-	= <i>A. cygnea</i>
<i>Anodonta savensis</i> Drouët, 1881	-	= <i>A. cygnea</i>
<i>A. anatina</i>		
<i>Anodonta rostrata</i> 'Kokeil' Rossmässler, 1836	-	= <i>A. anatina</i>
<i>Anodonta piscinalis</i> Nilsson, 1823	-	= <i>A. anatina</i>
	<i>Anodonta piscinalis f. rostrata</i>	= <i>A. anatina</i>
<i>Anodonta anserirostris</i> (Küster 1842)	-	= <i>A. anatina</i>
<i>P. complanata</i> *	-	
<i>Anodonta complanata</i> Rossmässler, 1835	-	= <i>P. complanata</i> *

* валидни назив врсте/подврсте/форме

Прегледом збирке, потврђено је присуство шест врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae на подручју Србије, у периоду 1953.-1972. година.

Анализа диверзитета, дистрибуције и учесталости налаза примерака шкољки из музејске збирке, извршена је на нивоу врсте, узимајући у обзир само валидне таксономске називе. Највећи диверзитет, према музејским подацима, уочен је у каналима (6 врста). По пет врста је забележено у Дунаву, Тамишу и истраживаним језерима, четири у Сави, док је на осталим водотоковима број врста био мањи (табела 18).

Узимајућу у обзир све узорке прикупљене у периоду 1953.-1972., за разлику од савремених истраживања, најприсутнија врста на подручју Србије била је врста *U. crassus*. Са максималном учесталошћу налаза била је присутна у Тиси, и равничарским рекама мање површине слива (Западна Морава, Црни Тимок, Млава и Нера). Као константна врста, присутна у 60% узорака забележена је у Дунаву, а умерено често појављивање детектовано је у Сави (табела 18). Према резултатима савремених истраживања који су представљени у овом раду, налаз *U. crassus* је у Дунаву детектован тек у 2013. години, на два локалитета са умереном бројношћу, а у Тиси је била присутна у свега 20% узорака. Незнатно већа учесталост појављивања, у односу на ранија истраживања детектована је у Сави, а као еукостантна врсте детектована је Западној Морави, узимајући у обзир оба циклуса истраживања.

Нешто мања учесталост појављивања у односу на претходну врсту, анализирајући све прикупљене узорке у истом периоду, утврђена је за *U. pictorum*. Максимална учесталост налаза детектована је у истраживаним каналима, и мањим равничарским рекама (Бегеј, Језава). Као константна врста, присутна у 60% узорака, забележена је у Дунаву и Сави, што је у сагласности и са новијим истраживањима.

У односу на учесталост појављивања у узорцима прикупљеним у периоду 1953.-1972., године, врста *U. tumidus* је имала мању фреквенцу, у односу на остале врсте рода *Unio* (табела 18). Са максималним учешћем детектована је у Тиси, реци Језава и истраживаним каналима (табела 18). Умерено често је детектована у Дунаву (у 40% узорака), а веома ретко је била присутна у Сави (у 10% узорака), што се знатно разликује у односу на резултате новијих истраживања, који указују да је била апсолутно доминантна и најчешће налажена врста у овим рекама.

Највећа учесталост појављивања за врсту *A. anatina* забележена је у истраживаним језерима и каналима, према подацима из периода 1953.-1972. У односу

на константност појављивања у свим анализираним узорцима, може се означити као ретка врста. Са готово уједначеним учешћем била је присутна у великим равничарским рекама: Дунаву, Сави и Тамишу, али присуство ове врсте није забележено у Тиси (табела 18). Новија истраживања указују на разлике у учесталости налаза у Дунаву и Сави, и присуство у Тиси.

На основу историјских података који су обрађени у овом раду, *A. cygnea* се може означити као ретко налажена врста у периоду 1953.–1972. (табела 18). Највећа учесталост налаза детектована је у истраживаним језерима и каналима. Такође, подаци указују на ретко појављивање ове врсте у Дунаву, међутим резултати новијих истраживања нису потврдили присуство *A. cygnea* у истраживаним водотоцима, већ само у акумулацијама. Поред налаза *A. cygnea*, у акумулацијама Гружа и Ћелије, према још необјављеним подацима, присуство ове врсте детектовано је и у Шумаричком језеру, и барско мочварном екосистему Засавица (Владица Симић, лично саопштење).

P. complanata, представља најређе налажену врсту, детектовану у свега 11% узорака. Присуство ове врсте детектовано је једино у истраживаним каналима, језерима и реци Тамиш (табела 18). Новија истраживања указују на присуство *P. complanata* у истраживаним великим равничарским рекама.

Учесталост налаза *U. pictorum* у Дунаву и Сави, се није много разликовала, узимајући у обзир оба циклуса истраживања. Знато мања заучесталост појављивања у Сави и Дунаву, представљена је на основу музејских података за врсту *U. tumidus* (табела 18), која је према савременим истраживањима била најчешће налажена врста у великим равничарским рекама.

Табела 18. Приказ присутних/отсутних врста и учесталост појављивања врста у периоду 1953.-1972. година

	<i>U. pictorum</i>	<i>U. tumidus</i>	<i>U. crassus</i>	<i>P. complanata</i>	<i>A. anatina</i>	<i>A. cygnea</i>
	F	F	F	F	F	F
Дунав	0.6	0.4	0.6	-	0.2	0.2
Сава	0.6	0.1	0.4	-	0.3	-
Тиса	-	1	1	-	-	-
Тамиш	0.3	0.3	0.3	0.7	0.3	-
Западна Морава	-	-	1	-	-	-
Црни Тимок	-	-	1	-	-	-
Млава	-	-	1	-	-	-
Нера	-	-	1	-	1	1
Бегеј	1	0.5	-	-	-	-
Језава	1	1	-	-	-	-
Језера	0.5	0.5	-	0.5	1	1
Канали	1	1	0.5	0.3	0.8	0.8
Ф (сви узорци)	0.5	0.37	0.53	0.11	0.32	0.21

4.5. МОРФОМЕТРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

4.5.1. МОРФОМЕТРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ РЕЦЕНТНИХ ПОПУЛАЦИЈА

4.5.1.1. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација врсте

U. tumidus

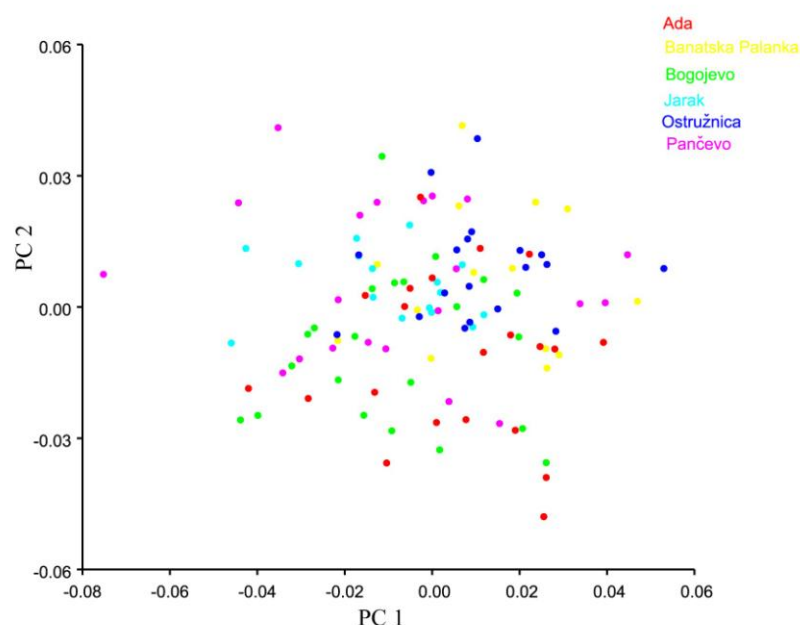
Применом Генерализоване Прокрустове Анализе добијене су варијабле величине (CS) и издвојено је 20 варијабли облика (Прокрустове координате).

Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), утврђена је статистички значајна разлика у величини љуштуре између популација са различитих водотокова (табела 19). Величина центроида (CS) се користила као зависна варијабла, а популација као независна варијабла, тј. фактор.

Табела 19. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).

	SS	df	MS	F	p
Унутаргрупно варирање	384119	1	384119	3536.349	0.000000
Популације	5724.6	2	2862.3	26.351	0.000000
Грешка	11948.2	110	108.6		

Прелиминарном анализом варијабилности облика на нивоу целог узорка (три популације са Дунава, две са Саве и једна са Тисе), применом анализе главних компоненти (PCA), није утврђено раздвајање/груписање популација (локалитета) у мултидимензионалном морфолошком простору (слика 33).



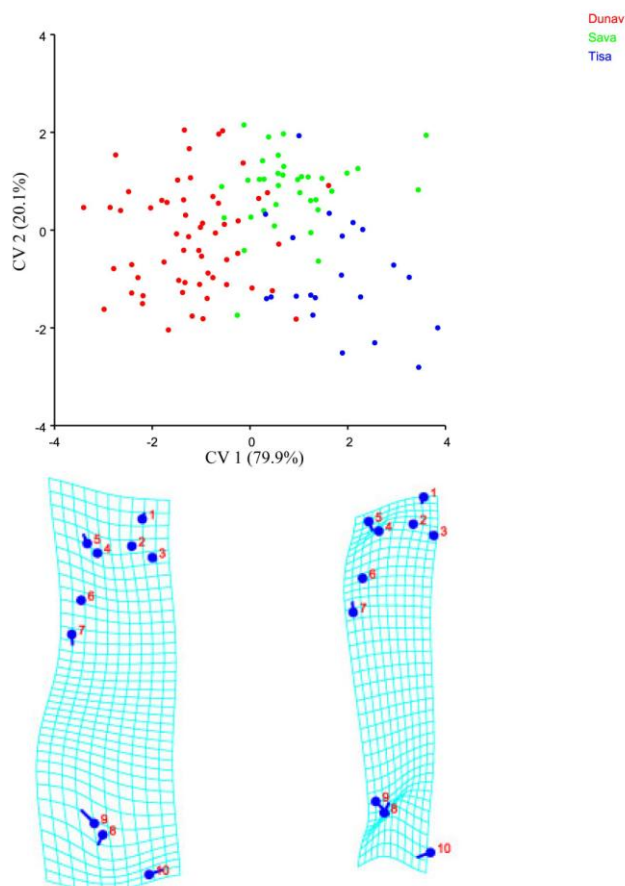
Слика 33. Анализа главних компоненти (PCA) варијабилности облика левог капка љуштуре популација врсте *U. tumidus*. Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.

Једнофакторском мултиваријантном анализом варијансе (MANOVA) утврђено је постојање статистички значајних разлика у облику љуштуре међу јединкама које припадају популацијама из различитих водотокова (табела 20). Прокрустове координате су коришћене као зависне варијабле, а фактори (независне варијабле) биле су популације.

Табела 20. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) (*Wilks* λ – вредност Wilks' Ламбда теста, *F* - *F* вредност, *df1* и *df2* - степени слободе, *P* – статистичка значајност).

	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000002	3823256	16	95	0.000000
Популације	0.277794	5	32	190	0.000000

Применом канонијске варијантне анализе (CVA) на нивоу целог узорка, издвојене су канонијске осе које највише доприносе раздвајању анализираних популација. Положај јединки у односу на прву (CV1) и другу (CV2) канонијску осу, заједно са променама облика љуштуре који су представљени у виду TPS деформација дуж ових оса, приказани су на слици 34. Према првој CV1 оси (CV1 описује 79.9% разлика у облику љуштуре између анализираних популација), издвајају се популације са Дунава и Тисе, док популација са Саве претставља прелазну групу. Променама облика љуштуре које су описане првом осом, у највећој мери доприносе тачке 5 и 7 (регион кардиналних зуба) у антериорном делу љуштуре, а у постериорном делу тачке 8, 9 (подручје завршетака латералних зуба) и тачка 10 (спајања палеалне линије и постериорног мишића адуктора). Јединке популације са Тисе, груписане у позитивном делу CV1 осе, одликује генерално ситнија љуштуре, са тенденцијом сужења у постериорном делу, за разлику од популације са Дунава, коју одликује мало робустнија љуштура (груписање у негативном делу CV1 осе).



Слика 34. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између популација врсте *U. tumidus*.

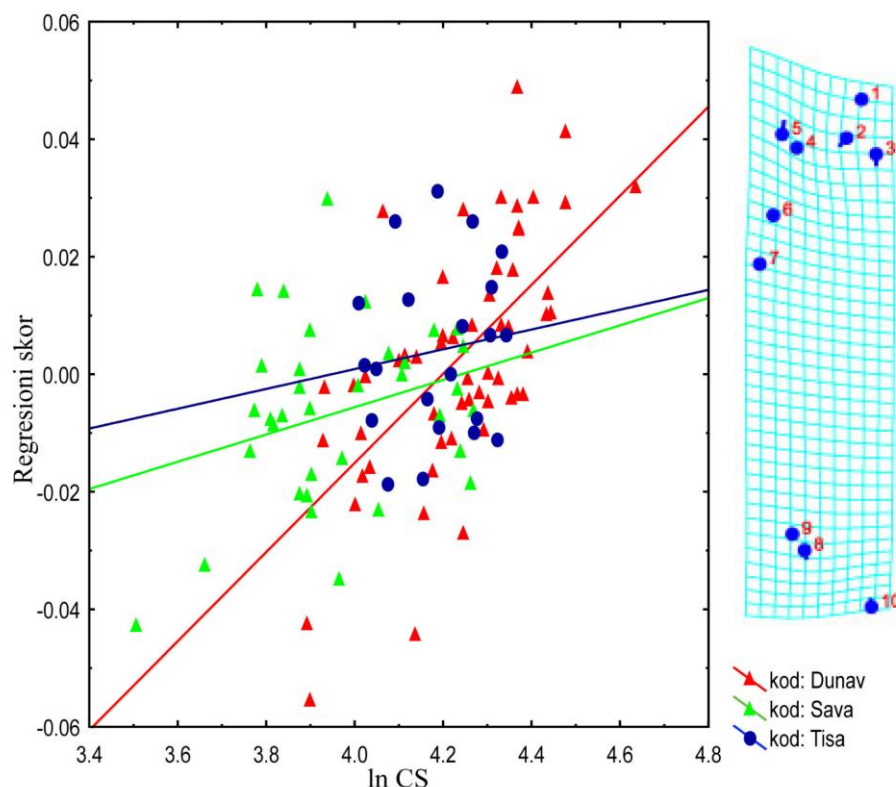
Разлике у облику љуштуре, утврђене су за сваки пар анализираних популација. Најмање разлике у облику љуштуре, утврђене су између популација Дунава и Саве, док је највећа разлика установљена између популација Дунава и Тисе (табела 20).

Табела 21. Прокрустове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.

	Дунав	Сава	Тиса
Дунав	0	0.0007	0.0003
Сава	0.018	0	0.0003
Тиса	0.0249	0.0215	0

Мултиваријантном регресијом варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$), утврђено је да постоји статистички значајан ефекат

величине на промену облика ($P < 0.0001$, вероватноћа добијена пермутационим тестом након 10000 пермутација). У односу на укупну варијабилност облика левог капка, варијабилност условљена алометријом описује 4.45%. Графички приказ представљен је на слици 35. Мултиваријантна анализа коваријансе (MANCOVA) показала је да постоји значајна интеракција између фактора (популације) и коваријабле ($\ln CS$) (Wilks $\lambda = 0.568829$, $F = 1.874$, $P < 0.005459$), што указује на значајне разлике у нагибима алометријских права анализираних популација.



Слика 35. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних популација.

4.5.1.2. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација врсте *U. pictorum*

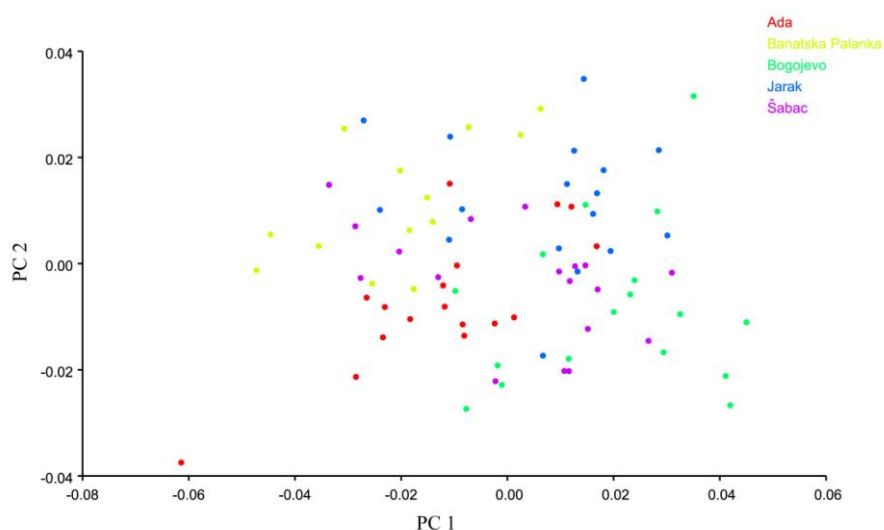
Применом генерализоване Прокрустове Анализе добијене су варијабле величине и облика левог капка љуштуре (величина центроида – CS и Прокрустове координате).

Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) величине центроида – Cs, утврђена је статистички значајна разлика у величини љуштуре између популација ($p=0.000000$).

Табела 22. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободе, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).

	SS	df	MS	F	p
Унутаргрупно варирање	152975394	1	152975394	2854.539	0.000000
Популације	2062338	2	1031169	19.242	0.000000
Грешка	4287219	80	53590		

Анализа варијабилности облика укупног узорка (две популације са Дунава, две са Саве и једна са Тисе), применом анализе главних компоненти (PCA), показала је да нема издвајања популација/локалитета у мултидимензионалном морфолошком простору (слика 36).



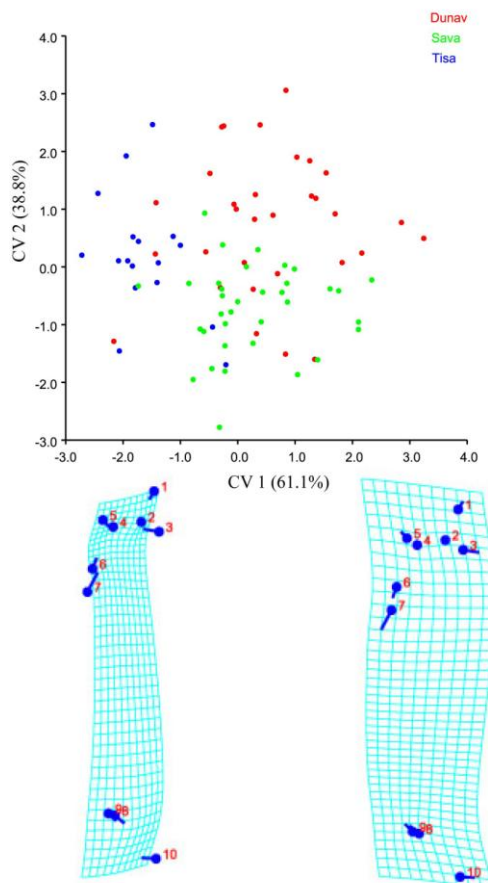
Слика 36. Анализа главних компоненти (PCA) варијабле облика левог капка љуштуре *U. pictorum*. Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.

Статистички значајна разлика у облику љуштуре ($p < 0.000442$) између јединки из популација са различитих река, утврђена је применом Једнофакторске мултиваријантне анализе варијансе (MANOVA) (табела 23).

Табела 23. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) (*Wilks* λ – вредност Wilks' Ламбда теста, *F* - *F* вредност, *df1* и *df2* - степени слободе, *P* – статистичка значајност).

	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000000	11629179	16	0.000000	0.000000
Популација	0.403351	2	32	0.000442	0.000442

Канонијске осе које највише доприносе раздвајању анализираних популације, издвојене су применом канонијске анализе варијансе (CVA) на целом узорку. Утврђено је да се по првој оси (CV1), која описује највећи проценат разлика облика између популација (61.1%), издваја популација са Тисе (груписање у негативном делу CV1 осе), у односу на популације Дунава и Саве (груписање у позитивном делу CV1 осе), док по другој канонијској оси (CV2), која описује 38.9% разлика, нема јасног издвајања популација (слика 37). Положај јединки у односу на прву (CV1) и другу (CV2) канонијску осу, заједно са променама облика љуштуре који су представљени у виду TPS деформација дуж ових оса приказано је на слици 36. У anteriорном делу, променама облика описаним првом канонијском осом, највише доприносе тачке у делу anteriорног мишића протрактора (тачка 3) и у области другог кардиналног зуба (тачке 6 и 7), док се највеће промене у постериорном делу, уочавају у тачки спајања палеалне линије и постериорног мишића адуктора (тачка 10).



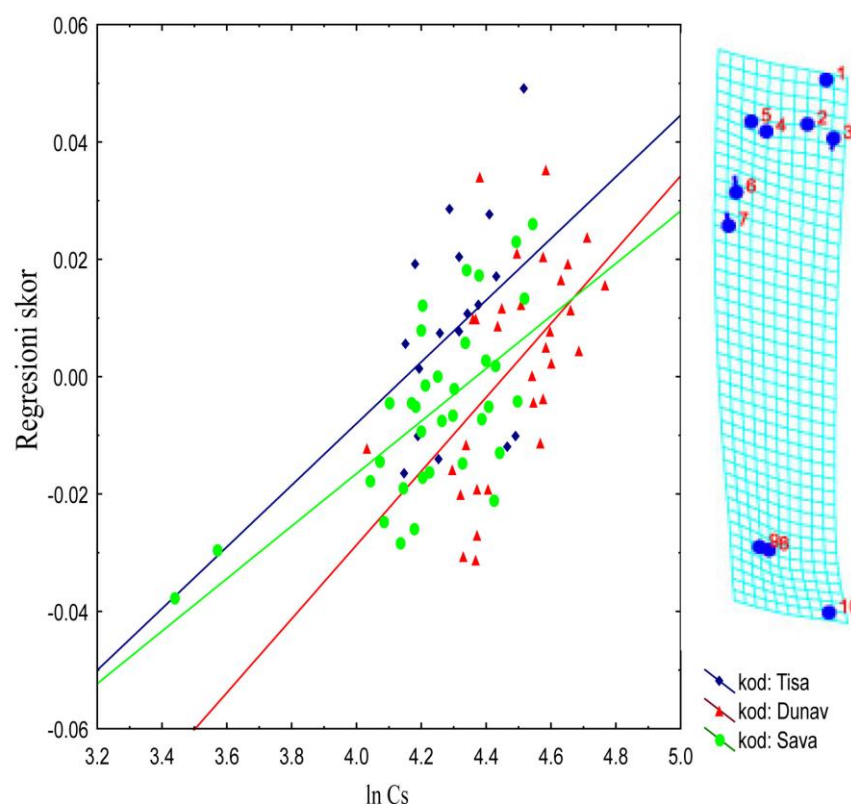
Слика 37. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између популација врсте *U. pictorum* са Дунава, Саве и Тисе.

Величина разлика облика љуштуре између популација, квантификована је Прокрустовим дистанцама (табела 24). Статистички значајне разлике (вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација), нису утврђене једино између популација са Саве и Дунава, док је за остале парове утврђена статистички значајна разлика. Највећа разлика је детектована између популација са Саве и Тисе.

Табела 24. Прокрустове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.

	Дунав	Сава	Тиса
Дунав	0	0.1617	0.0357
Сава	0.0117	0	0.0012
Тиса	0.0182	0.021	0

Мултиваријантном регресијом Прокрустових координата на логаритмовану величину центроида ($\ln CS$), утврђено је да постоји статистички значајан утицај ($P < 0.0003$) алометријског раста на варијабилност облика љуштуре, који чини 5.85% у укупној варијабилности (слика 38). Мултиваријантном анализом коваријансе (MANCOVA) није утврђена статистички значајна интеракција фактора (популација) и коваријабле ($\ln Cs$) (Wilks $\lambda = 0.522611$, $F = 1.49$, $P < 0.065056$), што указује да не постоје значајне разлике у нагибима алометријских права анализираних популација, односно утврђен је исти тренд зависности облика од величине).



Слика 38. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних популација.

4.5.1.3. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација врсте

U. crassus

Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) величине центроида (CS) и једнофакторском мултиваријантном анализом варијансе (MANOVA) варијабли облика утврђена је статистички значајна разлика ($p=0.000000$), у величини (табела 25) и облику (табела 25) љуштура слатководних шкољки различитих популација.

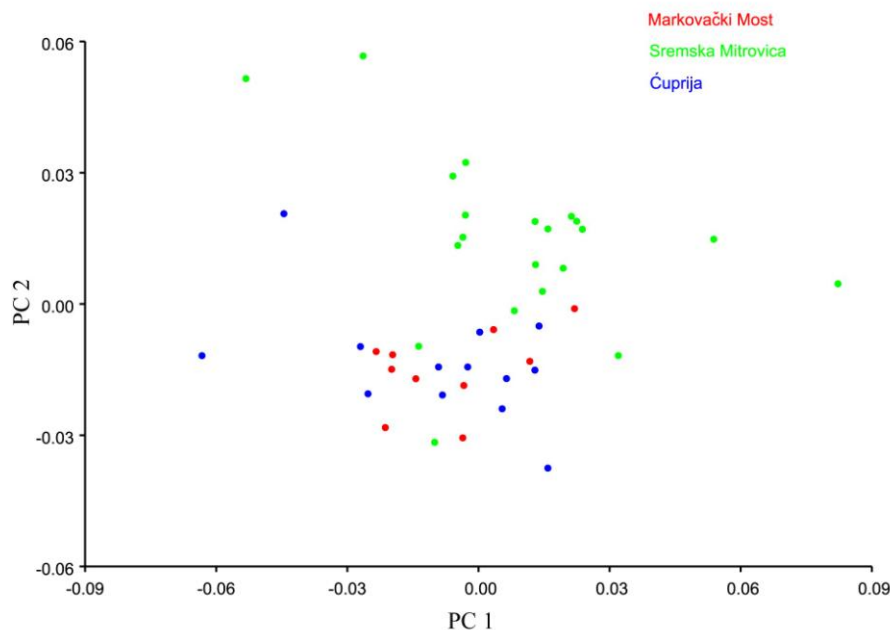
Табела 25. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).

	SS	df	MS	F	p
Унутаргрупно варирање	39418722	1	39418722	2504.602	0.000000
Популације	256874	1	256874	16.321	0.000217
Грешка	676756	43	15739		

Табела 26. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободe, P – статистичка значајност).

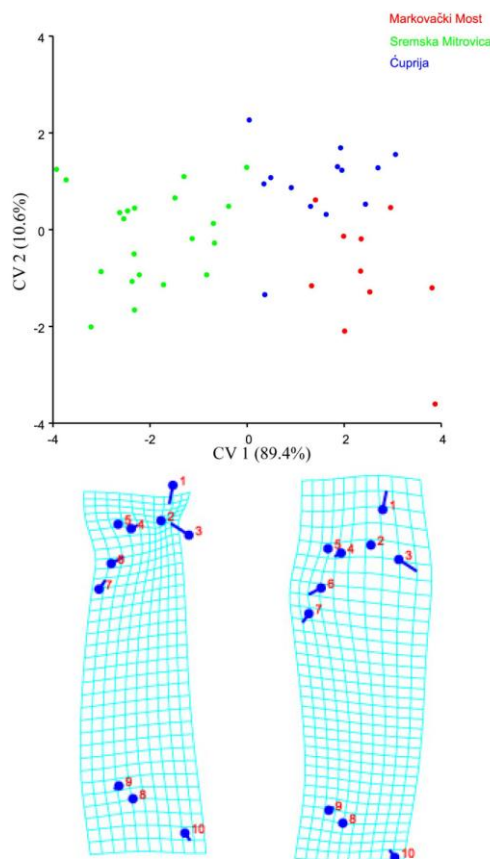
	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000003	598667.2	16	28	0.000000
Популација	0.208971	6.6	16	28	0.000008

Након прелиминарне анализе укупне варијабилности узорка (популација са једног локалитета на Сави, и популација са Велике Мораве, која је обухватила два локалитета) применом анализе главних компоненти (PCA), утврђено је одвајање популације у мултидимензионом морфолошком простору, са локалитета Сремске Митровица (Сава), у односу на популације са локалитета Марковачки Мост и Ћуприја (Велика Морава) (слика 39).



Слика 39. Анализа главних компоненти (PCA) варијабли облика левог капка љуштуре *U. crassus*. Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.

Применом канонијске анализе варијансе (CVA) на нивоу целог узорка, издвојене су канонијске осе које највише доприносе раздвајању анализираних популација. Графички приказ положаја јединки у односу на прву (CV1) и другу (CV2) канонијску осу, заједно са променама облика љуштуре, представљени су у виду TPS деформација дуж ових оса (слика 40). Јединке популације Сремска Митровица (Сава), груписане су у негативном делу CV1 осе (CV1 описује 89.4% разлика у облику љуштуре између анализираних популација) у односу на остале две популације које се групишу у позитивном делу осе. Према другој CV2 оси (описује 10.6% разлика у облику љуштуре између анализираних популација), није уочено јасно издвајање. У антериорном делу, промене облика описане првом канонијском осом (CV1), уочавају се у нивоу антериорних мишића адуктора и ретрактора (тачке 1 и 3), док су у постериорном делу, најуочљивије промене у нивоу тачке 10 (област постериорног мишића адуктора).



Слика 40. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између популација врсте *U. crassus*.

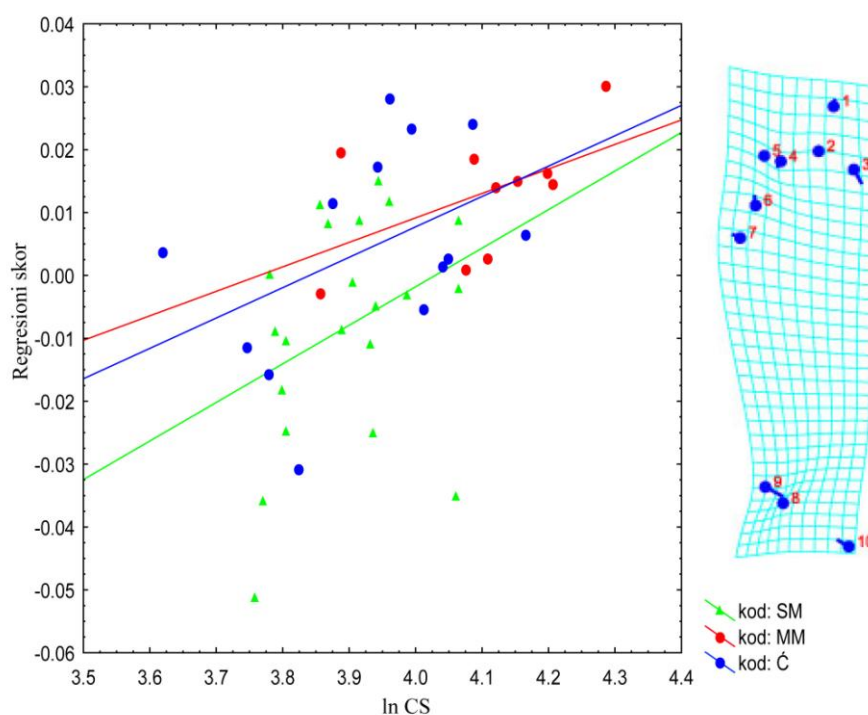
На основу Прокрустових дистанци, квантификована је величина разлика у облика љуштуре између популација (табела 27) Статистички значајне разлике (вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација), добијене су за сваки пар анализираних популација, осим за популације Марковачки Мост и Ћуприја.

Табела 27. Прокрустовете дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.

	Ћуприја	Марковачки Мост	Сремска Митровица
Ћуприја	0	0.7166	0.0005
Марковачки Мост	0.0151	0	0.0001
Сремска Митровица	0.0345	0.0369	0

Мултиваријантном регресијом Прокрустових координата на логаритмовану величину центроида ($\log CS$), није утврђен је статистички значајан утицај алометрије ($P < 0.1254$, вероватноћа добијена пермутационим тестом након 10000 пермутација). Утицај алометријског раста на укупну варијабилност облика љуштуре био је 3.49% (слика 41).

Применом мултиваријантне анализе коваријансе (MANCOVA) није утврђена статистички значајна интеракција између фактора (популација) и коваријабле ($\ln Cs$) (Wilks $\lambda = 0.643073$, $F = 0.9019$, $P < 0.575361$), што указује да не постоје значајне разлике у нагибима алометријских правих анализираних популација, односно утврђен је исти тренд зависности облика од величине.



Слика 41. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних популација.

4.5.1.4. Геометријско морфометријска анализа рецентних популација рода *Unio*

Комбиновањем свих сетова података савремених популација, испитивана је и интерспецијаска варијавилност облика љуштуре врста рода *Unio*.

Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) величине центроида (CS) и једнофакторском мултиваријантном анализом варијансе (MANOVA) варијабли облика утврђена је статистички значајна разлика у величини и облику између врстама (табела 28, табела 29).

Табела 28. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, *df* - степени слободе, MS - варијанса, *F* - *F* вредности, *P* - статистичка значајност).

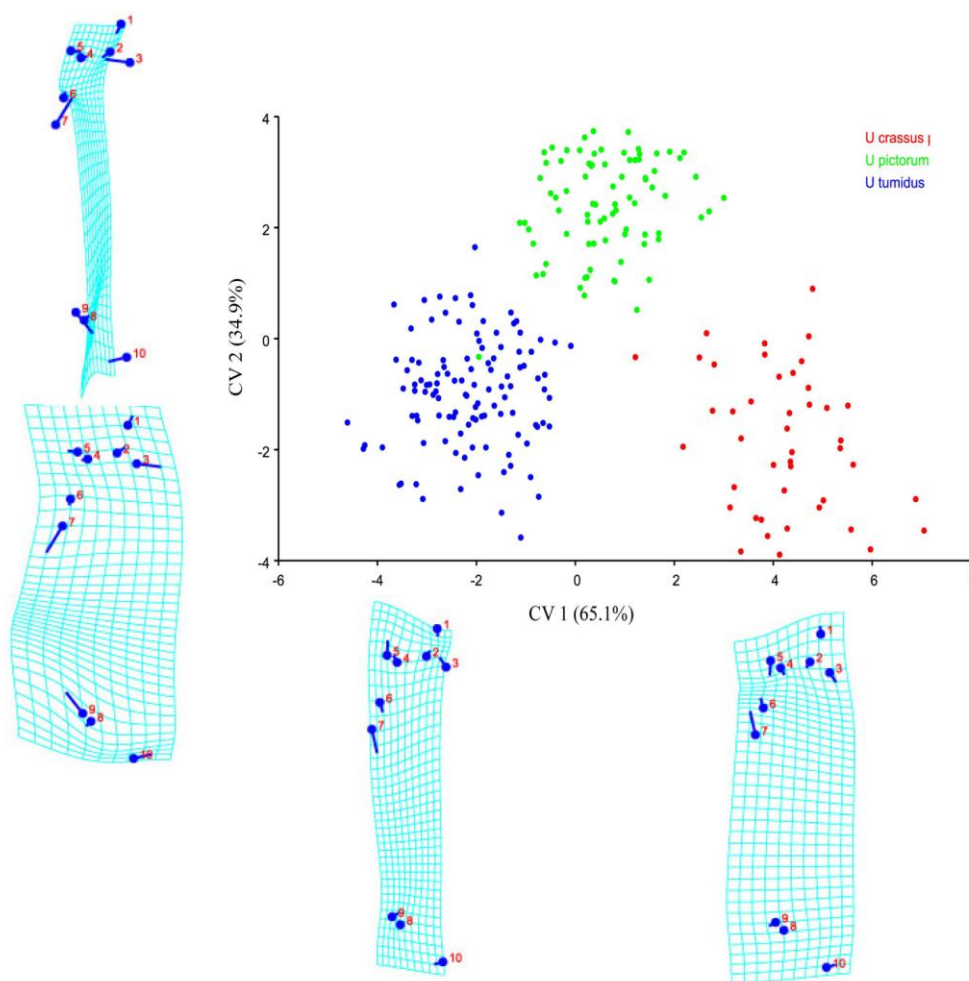
	SS	df	MS	F	p
Унутаргрупно варирање	301194964	1	301194964	5757.015	0.00
Врсте	7174324	2	3587162	68.565	0.00
Грешка	12451662	238	52318		

Табела 29. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) (*Wilks λ* – вредност Wilks' Ламбда теста, *F* - *F* вредност, *df1* и *df2* - степени слободе, *P* – статистичка значајност).

	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000009	3521215	7	232	0.00
Врсте	0.104361	69	14	464	0.00

Канонијском анализом варијансе (CVA), установљено је да се по првој CV осе, која описује 65.1% варијабилности, раздвајају врсте *U. crassus* и *U. tumidus*. Промене облика описане првом канонијском осом у наведеној мери обухватају промене у пределу кардиналних зуба (тачке 5, 6 и 7). Јединке врсте *U. crassus* које се групишу у позитивном делу CV1 осе одликује сужење у области кардиналних зуба, за разлику од јединки врсте *U. tumidus*, које се групишу у негативном делу осе, код којих се уочава повећање растојања између тачака које описују кардиналне зубе. Друга канонијска оса (CV2 описује 34.9% разлика у облику љуштуре између анализираних врста), показује тенденцију раздвајања јединки врсте *U. pictorum* (груписане у позитивном делу CV2

осе) од јединки осталих анализираних врста (слика 42). Варијабилност облика љуштуре, описана другом канонијском осом обухвата промене у готово свим тачкама.



Слика 42. Канонијска анализа варијансе (CVA) варијабилности облика по CV1 и CV2 оси између врста *U. tumidus*, *U. pictorum* и *U. crassus*.

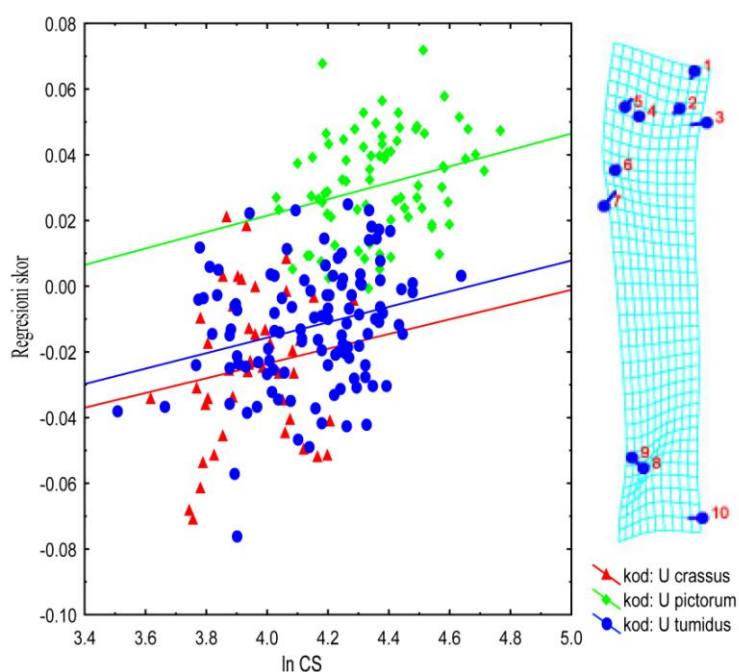
Величина разлика у облика љуштуре између популација квантификована је на основу Прокрустових дистанци (табела 30). Статистички значајне разлике (вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација), добијене су за сваки пар анализираних популација, а највећа дистанца утврђена је између популација *U. pictorum* и *U. crassus*.

Табела 30. Прокрустове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичке значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација. Вредности изнад дијагонале представљају вероватноће добијене пермутационим тестом након 10000 пермутација.

	<i>U. tumidus</i>	<i>U. pictorum</i>	<i>U. crassus</i>
<i>U. tumidus</i>	0	0.0001	0.0001
<i>U. pictorum</i>	0.0553	0	0.0001
<i>U. crassus</i>	0.0586	0.0644	0

Мултиваријантном регресијом варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$), утврђен је статистички значајан утицај алометрије на варијабилност облика љуштуре ($P < 0.0001$, вероватноћа добијена пермутационим тестом након 10000 пермутација), са учешћем од 10.11% у укупној варијабилности (слика 43).

Мултиваријантном анализом коваријансе (MANCOVA) утврђена је статистички значајна интеракција фактора (популација) и коваријабле ($\ln Cs$) (Wilks $\lambda = 0.676569$, $F = 1.899$, $P < 0.000357$), што указује да постоје значајне разлике у нагибима алометријских права анализираних популација.

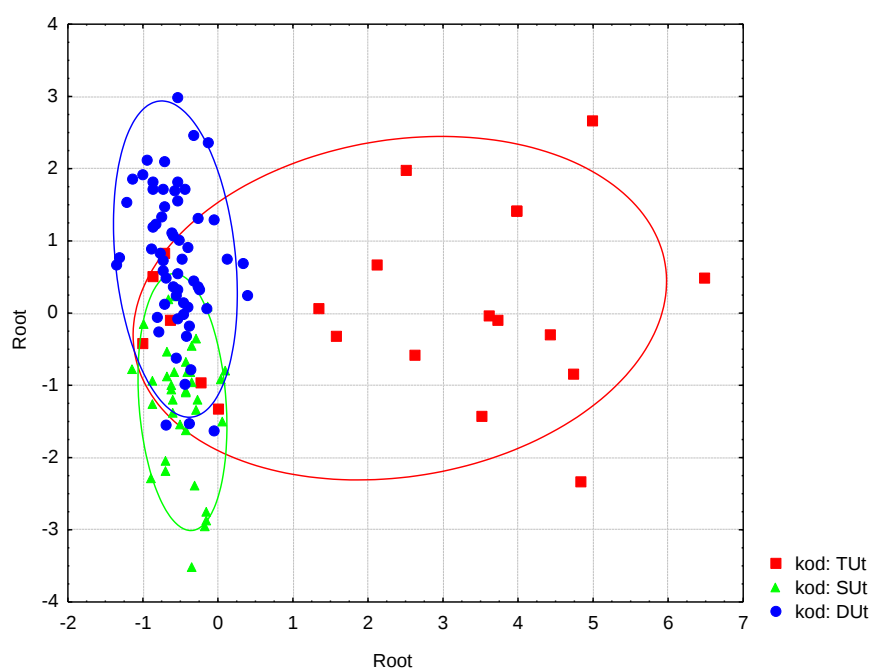


Слика 43. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних врста.

4.5.2. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација

4.5.2.1. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација врсте *U. tumidus*

Да би се утврдиле евентуалне разлике између популација, као и значајност тестираних фактора за дискриминацију популација, примењена је Дискриминантна анализа (DA). Графички приказ положаја јединки у односу на најзначајније осе у мултиваријантном простору, представљен је на слици 44. Према првој оси уочава се одвајање популације са Тисе (локалитет Ада), и груписање у позитивно делу прве осе, у односу на остале две популације које показују тенденцију груписања у негативном делу прве осе. Одвајање/груписање популација по другој оси није јасно изражено.



Слика 44. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте *U. tumidus*. Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (TUt – популација са Тисе; SUt – популација са Саве; DUt – популација са Дунава).

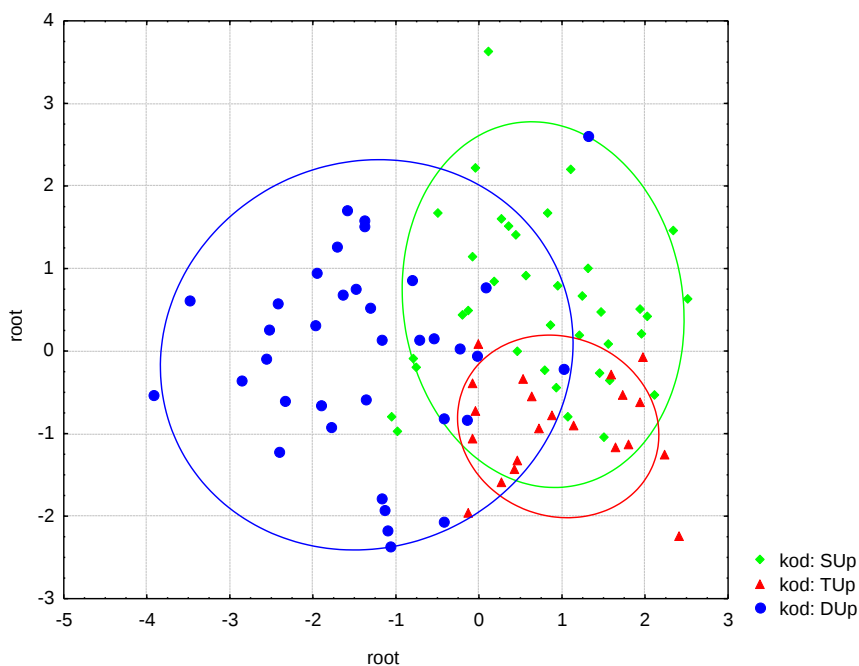
Као показатељ величине разлика између популација, разматране су квадратне Махаланобисове дистанце. Квантификација разлика између сваког пара анализираних популација приказана је у табели 30. Најмања разлика уочена је између популација са Дунава и Саве, а највећа разлика је установљена између популација са Саве и Тисе.

Табела 31. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација

	T_Ut	S_Ut	D_Ut
T_Ut	0	0.000000	0.000000
S_Ut	10.08259	0	0.000000
D_Ut	9.40919	3.92728	0

4.5.2.2. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација *U. pictorum*

Дискриминантна анализа (DA) је примењена да би се утврдило да ли постоји морфолошка разлика између популације и значајност тестираних морфолошких варијабли у њиховој дискриминацији. На слици 45., може се видети графички приказ положаја јединки у мултиваријантном простору, у односу на најзначајније осе. У односу на прву осу, уочава се одвајање популације са Тисе (локалитет Ада) и груписање у позитивном делу осе, у односу на популацију са Дунава, која показује тенденцију груписања у негативном делу прве осе, док популација са Саве не показује тенденцију груписања према првој оси. Према другој оси (ниво значајности), уочава се једино одвајање популације са Тисе, и њено груписање у негативном делу друге осе.



Слика 45. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте *U. pictorum*. Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (SUp – популација са Саве; TUp – популација са Тисе; DUp – популација са Дунава).

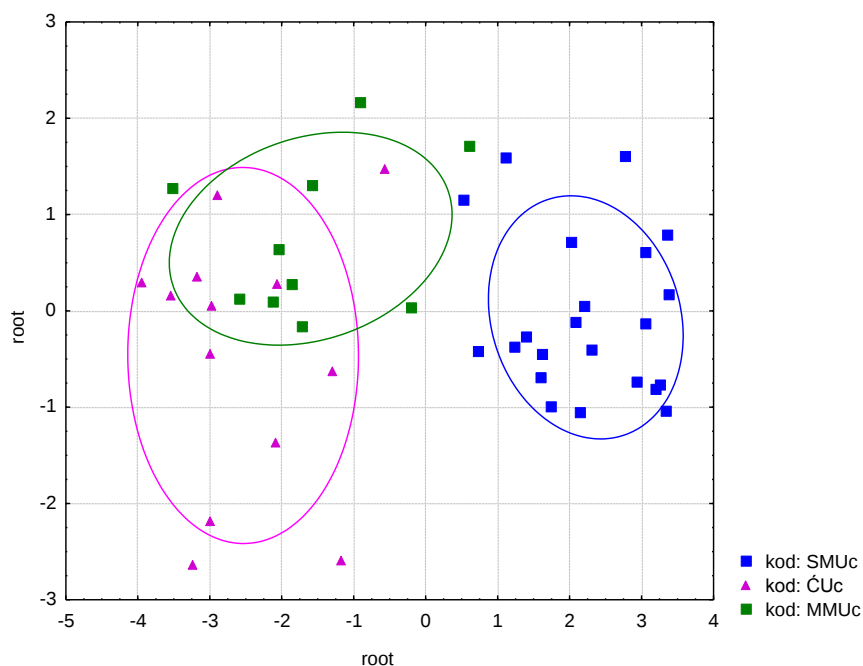
Махаланобисове дистанце представљене су у табели 32, и представљају показатељ величине разлика између популација. Квантификација разлика између сваког пара анализираних популација приказана је у табели 32. Најмања разлика уочена је између популација са Тисе и Саве, а највећа разлика је установљена између популација са Дунава и Тисе.

Табела 32. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	S_Up	T_Up	D_Up
S_Up	0	0.003807	0.000000
T_Up	2.210052	0	0.000000
D_Up	4.882751	6.071056	0

4.5.2.3. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација *U. crassus*

За испитивање морфолошких разлика између популације и значајности тестираних морфолошких варијабли у њиховој дискриминацији, примењена је Дискриминантна анализа (DA). Графички приказ положаја јединки у мултиваријантном простору, у односу на најзначајније осе, представљен је на слици 46. У односу на прву осу, уочава се издвајање популације са Сремске Митровице, и њено груписање у позитивном делу осе, у односу на две популације са Велике Мораве (Марковачки Мост и Ћуприја), које показују тенденцију издвајања у негативном делу прве осе. Према другој оси се не уочава јасно издвајање.



Слика 46. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте *U. crassus*. Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (SMUc – популација са локалитета Сремска Митровица; ČUc – популација са локалитета Ћуприја; MMUc – популација са локалитета Марковачки Мост).

Величина разлика између анализираних парова популација, представљена је квадратним Махаланобисовим дистанцама (табела 32). Статистички значајне разлике утврђене су за парове анализираних популација, осим у случају анализе разлика између

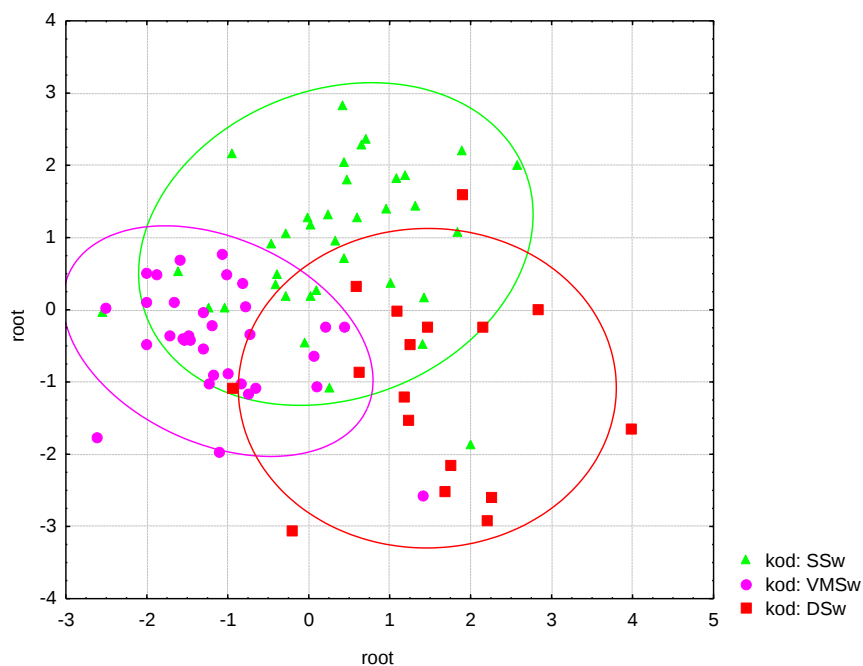
популација са Ћуприје и Марковачког Моста. Нешто већа разлика утврђена је између популација Сремска Митровица-Ћуприја, у односу на популације Сремска Митровица-Марковачки Мост.

Табела 33. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	SM_Uc	Ć_Uc	MM_Uc
SM_Uc	0	0.000000	0.000000
Ć_Uc	22.83076	0	0.329158
MM_Uc	15.28182	2.3526	0

4.5.2.4. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација *S. woodiana*

Као и код врста рода *Unio* и код врсте *S. woodiana* примењена је Дискриминантна анализа, да би се испитало да ли постоје разлике у облику љуштуре међу различитим популацијама шкољки, као и значајност тестираних варијабли у њиховом одвајању. На слици 47, може се уочити одвајање популација са Дунава и Велике Мораве, према првој оси. Јединке популације са Дунава имају тенденцију груписања у позитивном делу прве осе, а јединке популације са Велике Мораве се групишу у негативном делу осе. Према другој оси нема јасног одвајања популација.



Слика 47. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре рецентних популација врсте *S. woodiana*. Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (SSw – популација са Саве; VMSw – популација са Велике Мораве; DSw – популација са Дунава).

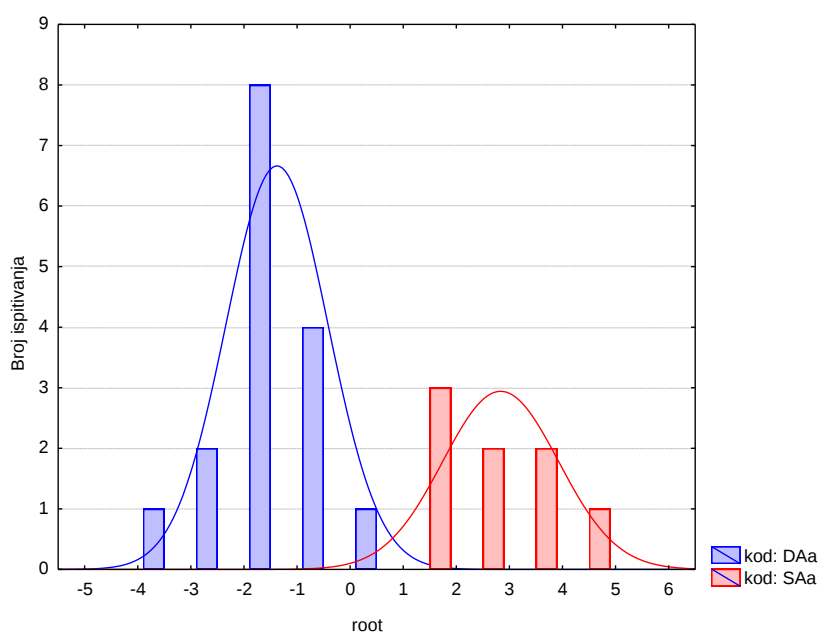
Квантификација разлика између сваког пара популација, представљена је квадратним Махаланобисовим дистанцама (табела 34). Нејвећа разлика се уочава између популација са Дунава и Велике Мораве, а најмања између Саве и Велике Мораве.

Табела 34. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	S_Sw	VM_Sw	D_Sw
S_Sw	0	0.000000	0.000002
VM_Sw	3.926695	0	0.000000
D_Sw	5.260539	7.107705	0

4.5.2.5. Линеарна морфометријска анализа рецентних популација *A. anatina*

Применом Генералне дискриминантне анализе, утврђено је да постоји статистички значајна разлика у облику љуштуре међу различитим популацијама шкољки врсте *A. anatina* са Дунава и Саве. На слици 48, може се уочити да се јединке популације са Дунава групишу у негативном делу осе, за разлику од јединки популације са Саве, које показују тенденцију груписања у позитивном делу осе. Величина разлика између популација, квантификована је квадратним Махаланобисовим дистанцама (табела 34).



Слика 48. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре популација врсте *A. anatina*. Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора. Популације врсте су кодиране (DAa – популација са Дунава; SAa – популација са Саве).

Табела 35. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	DAa	SAa
DAa	0	0.000967
SAa	17.57212	0

4.5.3. Морфометријска анализа примерака врста из музејске збирке

4.5.3.1. Геометријско морфометријска анализа јединки врсте *U. tumidus* из музејске збирке

Анализа музејских примерака врсте *U. tumidus* је подразумевала анализу варијавилности облика љуштуре две групе узорака ове врсте, класификованих од стране аутора као две подврсте (*U. tumidus tumidus* – Т и *U. tumidus solidus* – S).

Применом Генерализоване Прокрустове Анализе (GPA) издвајене су варијабле величине (величина центроида – CS) и варијабле облика (Прокрустове координате).

Статистички значајна разлика између ове две групе јединки у величини и облику, утврђена је Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) величине центроида (CS), односно једнофакторском мултиваријантном анализом варијансе (MANOVA) варијабли облика (табела 36, табела 37).

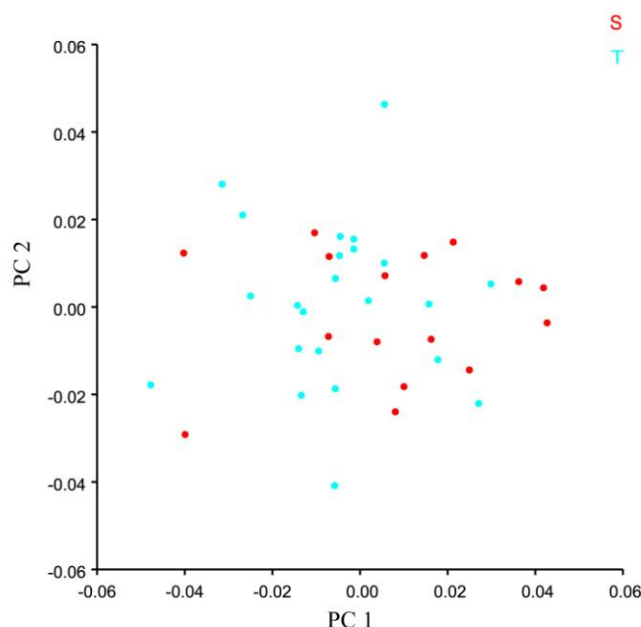
Табела 36. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (*SS* - сума квадрата, *df* - степени слободе, *MS* - варијанса, *F* - *F* вредности, *P* - статистичка значајност).

	SS	df	MS	F	p
Унутаргрупно варирање	40722622	1	40722622	2155.359	0.000000
Популације	981746	1	981746	51.962	0.000000
Грешка	699066	27	18894		

Табела 37. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) (*Wilks λ* – вредност Wilks' Ламбда теста, *F* - *F* вредност, *df1* и *df2* - степени слободе, *P* – статистичка значајност).

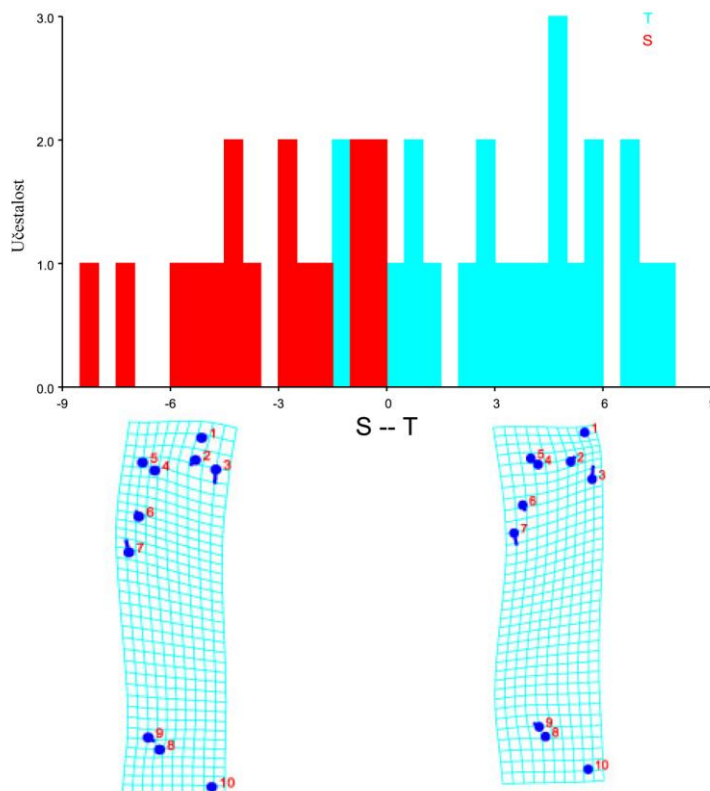
	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000001	2569761	16	22	0
Популација	0.362439	2	16	22	0.027806

Применом анализе главних компоненти (PCA), којом је извршена прелиминарна анализа варијабилности облика на нивоу целог узорка, није утврђено раздвајање група узорака у мултидимензионалном морфолошком простору (слика 49).



Слика 49. Анализа главних компоненти (PCA) варијабилности облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте *U. tumidus*. Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан је првом (PC1) и другом (PC2) главном компонентом.

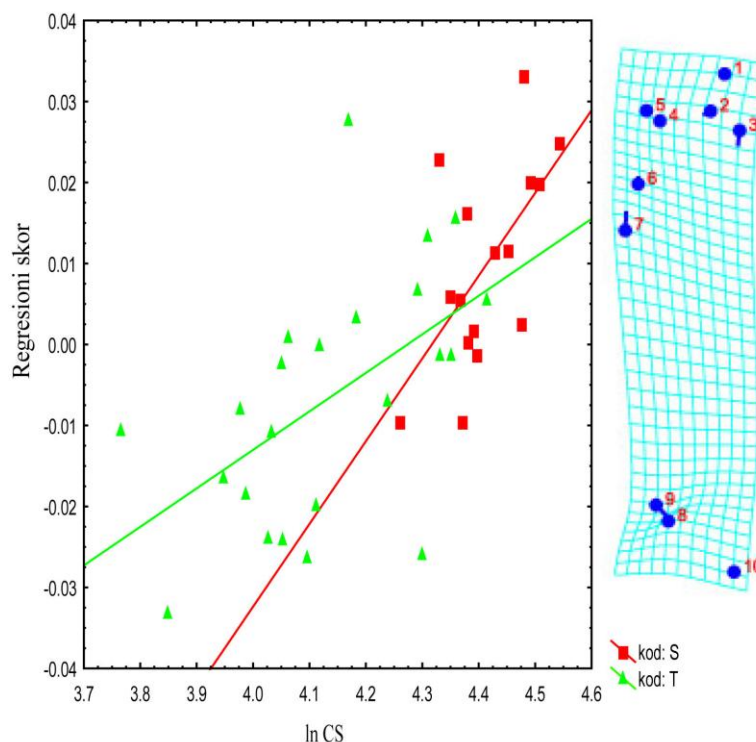
Применом Дискриминантне анализе (DA), утврђено је одвајање две групе јединки у морфолошком простору. Положај јединки у односу, заједно са променама облика љуштуре који су представљени у виду TPS деформација дуж осе, приказани су на слици 49. Јединке класификоване као *U. tumidus tumidus* имају тенденцију груписања у позитивном делу осе, за разлику од друге групе јединки *U. tumidus solidus* које се одвајају у негативном делу осе (слика 50). Величина разлика између група квантификована је Прокрустовом дистанцом (0.01979285) са вероватноћом ($p < 0.0001$), добијеном пермутационим тестом након 1000 пермутација. Променама облика љуштуре, у највећој мери доприносе тачке у делу anteriорног мишића протрактора (тачка 3) и у области другог кардиналног зуба (тачка 7).



Слика 50. Дискриминантна анализа варијабилности облика љуштуре две групе јединки музејских примерака врсте *U. tumidus*

Применом Мултиваријантне регресије Прокрустових координата на логаритмовану величину центроида ($\ln CS$), утврђен је статистички значајан ($P < 0.0055$), утицај алометрије на варијабилност облика љуштуре. Варијабилност условљена алометријом чини 7.4% у укупној варијабилности. Графички приказ алометријских односа анализираних популација и промена облика условљених алометријским растом приказан је на слици 51.

Мултиваријантном анализом коваријансе (MANCOVA) тестирана је хомогеност нагиба регресионих правах. Анализом коваријансе није утврђена статистички значајна интеракција фактора (популација) и коваријабле ($\ln Cs$) ($Wilks \lambda = 0.576857$, $F = 1$, $P < 0.467464$), што указује да анализиране групе јединки показују исти тренд зависности облика од величине.



Слика 51. Мултиваријантна регресија варијабли облика (Прокрустових координата) на варијаблу величине ($\ln CS$) и графички приказ промене облика условљене алометријским растом анализираних група.

4.5.3.2. Геометријско морфометријска анализа јединки врсте *U. pictorum* из музејске збирке

Испитивање варијабилности морфолошких структура код музејских примерака врсте *U. pictorum*, подразумевала је анализу три групе јединки из музејске збирке које су класификоване као три различите форме (*U. pictorum* f. *longirostris*, *U. pictorum* f. *balatonicus* и *U. pictorum* f. *platyrhyncus*).

Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) величине центроида (CS), утврђена је статистички значајна разлика између ових група јединки у величини, док је на основу Једнофакторске мултиваријантне анализе варијанси (MANOVA) варијабли облика, утврђено да разлика у облику између анализираних група није статистички значајна (табела 38, табела 39).

Табела 38. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).

	SS	df	MS	F	P
Унутаргрупно варирање	62636368	1	62636368	3079.668	0.000000
Популације	263735	2	131867	6.484	0.003406
Грешка	894902	44	20339		

Табела 39. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободe, P – статистичка значајност).

	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000079	130301.3	4	41	0.000000
Популација	0.858599	0.8	8	82	0.594121

С обзиром да није утврђена статистичка значајност између анализираних група у облику, већ само у величини, даље морфометријске анализе нису рађене.

4.5.3.3. Геометријско морфометријска анализа јединки врсте *U. crassus* из музејске збирке

Ради анализе морфолошке варијабилности љуштуре три групе јединки из музејске збирке, класификованих од стране аутора као (*U. amnicus*, *U. crassus crassus* и *U. crassus crassus* f. *Grandis*), извршено је испитивање статистичке значајности разлика у величини и облику, ове три групе узорака.

Једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) величине центроида (CS), утврђена је статистички значајна разлика у величини између узорака, док Једнофакторском мултиваријантном анализом варијансе (MANOVA) варијабли облика, није забележена статистички значајна разлика у облику између анализираних група (табела 40, табела 41).

Табела 40. Једнофакторска ANOVA величине центроида (CS) (SS - сума квадрата, df - степени слободe, MS - варијанса, F - F вредности, P - статистичка значајност).

	SS	df	MS	F	p
Унутаргрупно варирање	62636368	1	62636368	3079.668	0.000000
Популације	263735	2	131867	6.484	0.003406
Грешка	894902	44	20339		

Табела 41. Једнофакторска MANOVA варијабли облика (Прокрустових координата) ($Wilks \lambda$ – вредност Wilks' Ламбда теста, F - F вредност, $df1$ и $df2$ - степени слободe, P – статистичка значајност).

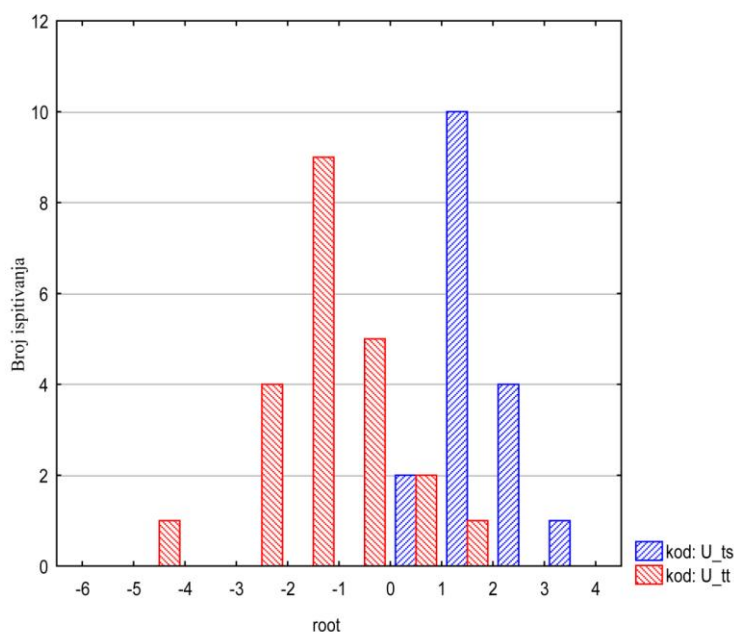
	Wilks λ	F	df1	df2	p
Унутаргрупно варирање	0.000000	3898268	16	29	0.000000
Популација	0.443576	1	32	58	0.607723

Као и у претходној анализи, није утврђена статистичка значајност између анализираних група у облику, већ само у величини, тако да даље морфометријске анализе нису рађене.

4.5.4. Линеарна морфометријска анализа јединки из музејске збирке

4.5.4.1. Линеарна морфометријска анализа музејских примерака *U. tumidus*

Анализа музејских примерака врсте *U. tumidus* је подразумевала анализу варијабилности облика љуштуре две групе узорака ове врсте, класификованих од стране аутора као две подврсте (*U. tumidus tumidus* и *U. tumidus solidus*). Анализом облика на основу дужинских варијабли, ове две групе узорака, применом Дискриминантне анализе (DA) утврђено је делимично одвајање група у морфолошком простору. Јединке популације *U. tumidus solidus* се у потпуности групишу у позитивном делу осе, за разлику од јединки популације *U. tumidus tumidus* које показују тенденцију груписања у негативном делу осе (слика 52). Величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација, и статистичка значајност представљени су у табели 42.



Слика 52. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте *U. tumidus*. Групе анализираних јединки су кодиране (U_ts – *U. tumidus tumidus* и U_tt – *U. tumidus solidus*). Хистограм мултидимензионалног морфолошког простора.

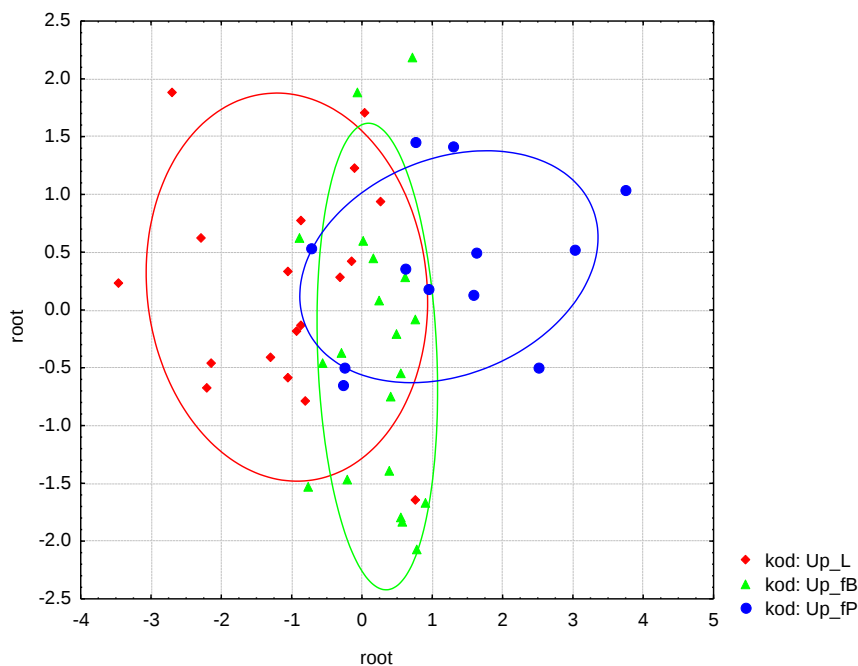
Табела 42. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	U_ts	U_tt
U_ts	0	0.000061
U_tt	7.606274	0

4.5.4.2. Линеарна морфометријска јединки врсте *U. pictorum* из музејске збирке

Применом Дискриминантне анализе (DA), извршена је анализа варијабилности облика љуштуре на основу дужинских морфометријских варијабли музејских примерака врсте *U. pictorum*, које су према колекторским књигама биле класификоване

у три различита морфотипа (*U. pictorum* f. *longirostris*, *U. pictorum* f. *balatonicus* и *U. pictorum* f. *platyrhyncus*). Графичким приказом позиционирања јединки различитих морфотипова у мултидимензионалном морфолошком простору, може се уочити да нема јасног издвајање група у односу на осе слици 53. Величина разлика између класификованих морфотипова, приказана је у табели 43.



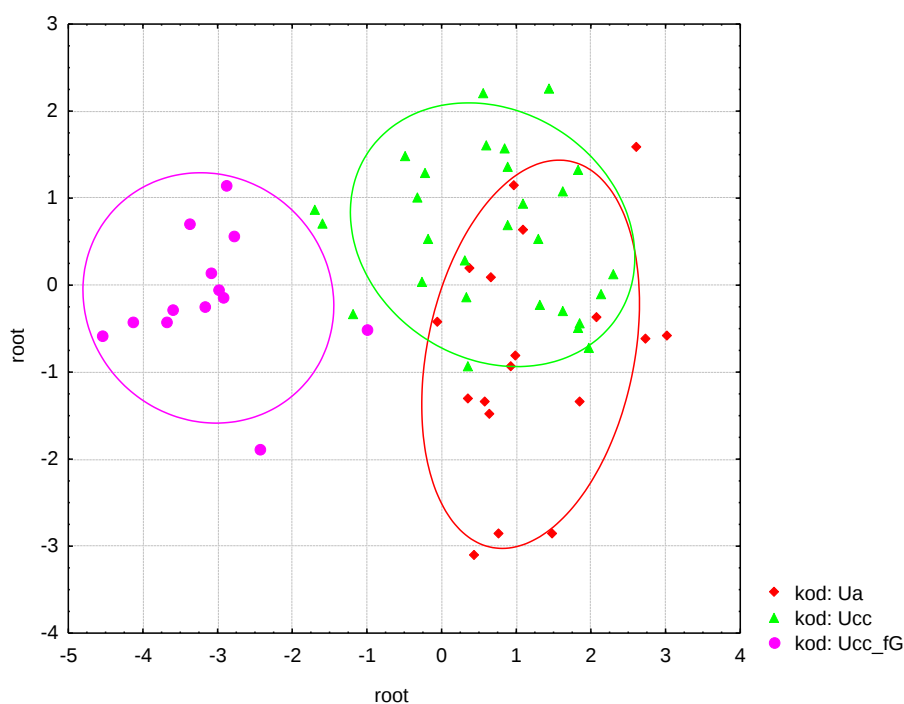
Слика 53. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте *U. pictorum*. Групе анализираних јединки су кодиране (*U. pictorum* f. *longirostris* – Up_L, *U. pictorum* f. *balatonicus*–Up_fB и *U. pictorum* f. *platyrhyncus* – Up_fP). Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан првом и другом осом.

Табела 43. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	Up_L	Up_fB	Up_fP
Up_L	0	0.108176	0.002698
Up_fB	2.013706	0	0.362430
Up_fP	5.340927	1.641449	0

4.5.4.3. Линеарна морфометријска анализа јединки врсте *U. crassus* из музејске збирке

За испитивање варијабилности облика музејских примерака у оквиру врсте *U. crassus*, примењена је Дискриминантна анализа (DA) на делу узорка који је обухватао три групе јединки ове врсте, класификованих од стране аутора као различита врста, подврста и варијетет (*U. amnicus*, *U. crassus crassus* и *U. crassus crassus f. Grandis*). На основу позиционирања анализираних јединки у мултидимензионалном морфолошком простору, може се уочити одвајање према првој оси, групе јединки класификованих као *U. crassus crassus f. Grandis*, и груписање у негативном делу осе, за разлику од остале две групе које се групишу у позитивном делу осе (слика 54). У табели 44 је приказана величина разлика између различитих група.



Слика 53а. Дискриминантна анализа (DA) дужинских варијабли облика левог капка љуштуре музејских примерака врсте *U. crassus*. Дијаграм мултидимензионалног морфолошког простора дефинисан првом и другом осом.

Табела 44. Квадратне Махаланобисове дистанце (вредности испод дијагонале) и статистичка значајности (вредности изнад дијагонале) величина разлика у облику љуштуре између анализираних популација.

	Ua	Ucc	Ucc_fG
Ua	0	0.035210	0.000000
Ucc	2.14606	0	0.000000
Ucc_fG	19.04725	15.02192	0

4.6. Процена приоритета конзервације угрожених врста из фамилије Unionidae на локалном нивоу на основу модела ESHIPPO

Са циљем поуздане процене ризика изумирања и приоритета конзервације угрожених врста из фамилије Unionidae на локалном нивоу извршено је тестирање према моделу ESHIPPO (табела 45).

Табела 45. Степен еколошке специјализације (ES) и утицај HIPPO фактора у процени приоритета конзервације врста

ESHIPPO-PD / врста	<i>U. pictorum</i>	<i>U. timidus</i>	<i>U. crassus</i>	<i>P. complanata</i>	<i>A. anatina</i>	<i>A. cygnea</i>
Биотоп, надморска висина, тип екосистема	3	3	3	3	3	3
Екосистем тип, еколошка зона	3	3	3	3	3	3
Морфометрија биотопа и амбијент	1	1	1	1	1	1
Физички фактори	3	3	3	3	3	3
Хемијски фактори	1	1	3	3	1	3
Исхрана	3	3	3	3	3	3
Репродуктивна стратегија	3	3	3	3	3	3
Животни циклус	3	3	3	3	3	3
Ниво ендемизма	1	1	1	1	1	1
Изолација популација	1	1	1	1	1	3
Укупан резултат (ES)	22	22	24	24	22	26
Промене станишта без фрагментације	5	5	5	5	5	5
Деструкција	5	5	5	5	5	5
Фрагментација и изолација станишта	1	1	3	1	1	3
Инвазивне врсте - већ постоје	3	3	3	3	3	3
случајно унете	3	3	3	3	3	3
намерно унете	1	1	1	1	1	1
Загађење - Еутрофизација	5	5	5	5	5	5
Сапробност	3	3	5	3	3	3
Токсичност	3	3	3	3	3	3
Ацидификација	1	1	1	1	1	1
Радиоактивност	1	1	1	1	1	1
Комбиновано	3	1	5	5	3	3
Хидроморфологија	3	1	5	5	3	5
Раст популације - брзо						
умерено	3	3	3	3	3	3
Стагнација или пад						
Експлоатација - антропогена	1	1	1	1	1	3
природна	1	1	1	1	1	1
Резултат (HIPPO)	42	38	50	46	42	48
Укупно (ESHIPPO)	64	60	74	70	64	74

Табела 46. Утицај елемената популационе динамике (PD) у процени приоритета конзервације врста

Популациона динамика (PD)	<i>U. pictorum</i>	<i>U. timidus</i>	<i>U. crassus</i>	<i>P. complanata</i>	<i>A. anatina</i>	<i>A. cygnea</i>
Заузетост потенцијалног ареала	1	1	3	3	3	5
Кретање (динамика) популације						
Абунданца	3	3	1	3	5	5
Заузетост потенцијалног ареала	3	3	3	3	5	5
Абунданца и дистрибуција на станишту	1	1	5	5	5	3
Укупан резултат (PD)	8	8	12	14	18	18
(ESHIPPO+PD)	72	68	86	88	82	88
Приоритет конзервације	2	3	1	1	2	1

На основу укупног броја бодова еколошке специјализације ES, HIPPO фактора и популационе динамике PD, одређен је приоритет конзервације угрожених врста на националном нивоу. За врсте *U. crassus*, *P. complanata* и *A. cygnea* одређен је први степен приоритета заштите, односно висок ниво ризика од изумирања на националном нивоу, при чему су се укупни бројеви бодова анализираних фактора кретали од 86 до 88. Умерени ризик од изумирања (II степен приоритета заштите), оцењен је за врсте *U. pictorum* (72 бода) и *A. anatina* (82 бода), док се за *U. timidus* уочава да је ризик од изумирања мањи (III степен приоритета заштите), према укупном броју бодова (68) ESHIPPO-PD фактора.

5. Дискусија

Истраживање слатководних шкољки из фамилије Unionidae на подручју Србије, према доступним историјским подацима, у виду литературе и постојеће збирке, али и према савременим истраживања, омогућава приказ фауне унионида на овим просторима, као и усаглашавање имена врста према валидној таксономији. Резултати свих прикупљених података, узимајући у обзир временски период и простор обухваћен истраживањима, пружају допринос у употпуњавање знања о распрострањењу слатководних шкољки, популационој динамици, као и идентификација чинилаца који су најзначајнији за просторну динамику заједница.

На недовољно познавање читаве ове групе у Европи и глобално, указују различите процене укупног броја врста. Велика интерспецијска морфолошка варијабилност слатководних шкољки довела је до експанзије описа врста у XIX веку. Таксономске недоумице, услед великог броја синонима врста, настале углавном у том периоду, и данас су присутне. Према историјским подацима из периода 1953.-1972., година, представљеним у овом раду, на територији Србије укупно је забележено 30 таксона слатководних шкољки из фамилије Unionidae. Велики број назива врста/подврста/форми није валидан према савременој таксономији. Прегледом збирке, доступне музејске литературе, као и на основу савремених истраживања и сазнања о таксономској историје врста према свеобухватној бази података о рецентним унионидама на глобалном нивоу (Graf и Cummings, 2014), није потврђено постојање толиког броја различитих таксона на нашим просторима, чак ни на нивоу Европе, већ су у питању синоними постојећих врста.

Поред синонима, који су приказани у резултатима, а односе се на имена таксона из збирке Анте Тадића (табела 17), у литературним подацима за подручје Србије појављују се још нека имена унионидних шкољки (табела 47), углавном настала идентификацијом материјала које је прикупио Лазар Докић у XIX веку (Tadić, 1960, Naas, 1969). На основу свих података о унионидама на подручју Србије, од почетка истраживања до данас, узимајући у обзир имена врста према валидној таксономији, може се закључити да је највећи број синонима постојао за врсту *U. crassus*.

Табела 47. Листа присутних врста на подручју Србије, према литературним подацима

назив врсте према литературним подацима	назив врсте према валидној таксономији
<i>Unio piscinalis</i> 'Ziegl' Rossmässler, 1835	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio carneus</i> Küster, 1854,	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio striatulus</i> Drouët, 1882	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio pruinosus</i> Schmidt, 1840	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio gangroenosus</i> Schmidt, 1840	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio stevenianus</i> Krynicki, 1837	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio dokici</i> Drouët, 1884	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio desectus</i> , Drouët, 1881	= <i>U. crassus</i>
<i>Unio truncatulus</i> Drouët, 1882	= <i>U. crassus</i>
<i>Anodonta opalina</i> Küster, 1842	= <i>A. cygnea</i>

Резултатима истраживања је утврђено присуство седам врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae на подручју Србије (шест аутохтоних и једна алохтона инвазивна врста), које углавном представљају широко распрострањене врсте у Европи.

С обзиром на укупан број врста детектованих у Европи, може се рећи да је у Србији забележен значајан диверзитет унионида. Распрострањење неких врста из фамилије Unionidae, које нису присутне на нашој територији, углавном је карактеристично јужне делове Европе и област Медитерана (Lopes-Lima и сар., 2015).

Поређењем резултата представљених у овом раду са резултатима других аутора, утврђено је да су промене у саставу заједнице слатководних шкољки и бројности популације у директој вези са комплексом срединских параметара. На основу ранијих истраживања утврђено је да структура супстрата (Neves и Widlak, 1987; Leff и сар., 1990) и брзина протока (Van der Schalie, 1938; Huehner, 1987; Vaughn, 1997; Strayer, 1993, 1999), представљају кључне параметре који одређују да ли је станиште погодно за насељавање шкољки и њихов опстанак, што потврђују и наши резултати. Састав супстрата у литоралној зони водених екосистема, са доминацијом финог до средњег наноса и спорији проток, представља један од предуслова за формирање одрживих станишта и стабилних популација на одређеном простору. Удаљеност од обале и дубина, такође су се показали као ограничавајући фактори за насељавање унионида (Strayer, 1999), с обзиром да је највећа бројност популације, и највећа разноврсност забележена у приобалној зони река, односно зони литорала. Водена ободна вегетација

присутна у лотичким и лентичким екосистемима, такође доприноси разноврсности и абунданци слатководних шкољки, формирајући хетерогена микростаништа са стабилним седиментом, погодна за насељавање фауне шкољки и њихову заштиту (Fritz и сар., 2004; Korzeniak и сар., 2004).

Анализом слатководних шкољки у различитим типовима водотокова и акумулацијама, уочене су извесне разлике у саставу заједница и абунданци равничарских река различитих површина слива и акумулацијама. Промена природних карактеристике биотопа, односно промена типолошких показатеља, надморске висине и површине слива идући од севера ка југу, указује на промене заједнице унионида. Највећи диверзитет и бројност популације унионида у Србији, забележен је у доњим токовима великих равничарских река (зони потамона), што потврђују и ранија истраживања оваквих типова водотокова (Cummings и Mayer, 1992; Pusch и сар., 2001; Рауновић и сар., 2006, 2008; Schwalb и Pusch., 2007; Томовић и сар., 2010, 2012, 2013b, 2014), односно водотокова типа 1, према вежећем правилнику (Службени гласник, 74/2011). Мања разноврсност и абунданца забележена је у равничарским рекама мање површине слива (типа 2), Колубари и Западној Морави, а готово униформне популације детектоване су у акумулацијама, односно значајно измењеним водним телима према вежећем правилнику (Службени гласник, 74/2011), што је и очекивано с обзиром на већу разноврсност микростаништа у великим равничарским рекама. Поредићи разноврсност у водотоцима типа 1, уочен је нешто мањи диверзитет у Тиси и Великој Морави, у односу на Саву и Дунав. Разлике у разноврсности на истраживаним рекама, могу се довести у везу са променама у квалитету воде и нешто бољим статусом Саве и Дунава (Simonović и сар., 2010), што је очекивано, с обзиром на њихову величину и веће аутопурификационе могућности. На подручју Панонске низије, река Тиса представља један од најоптерећенијих сливова различитим стресорима (Vasiljević и сар., 2010; Kolarević и сар., 2011). Утицаји индустрије, агротехничких мера, водопривредне инфраструктуре и посебно каналске мреже, која је повезана са Тисом, условили су промену квалитета воде. Квалитет воде на основу заједнице макробескичмењака, током JDS2 истраживања, кретао се у границама II или III класе (Simonović и сар., 2010), док су анализе у оквиру петогодишњих периода истраживања (Хидролошки годишњак, 1992.-1996., 2003.-2007.), спроведене од стране Републичког хидрометеоролошког завода (РХМЗ), указале на претежно III или чак IV класу квалитета вода (Osokoljić и сар., 2009). Мања разноврсност у Великој Морави, такође може бити резултат повећаног оптерећења реке нутријентима и органским материјама

(Vasiljević, 2010). Квалитет воде Велике Мораве у границама III до IV класе, оцењен је за вишегодишњи период истраживања (Хидролошки годишњак, 1999-2008). Слична процена квалитета воде Велике Мораве, у границама III до IV класе, оцењена је коришћењем одабраних параметара при анализи заједнице макробескичмењака (Marković и сар. 2011).

Анализом распрострањења врста у Србији, уочавају се промене у величини ареала и популационој динамици појединих врста.

Према ранијим истраживањима, заснованим на збирци слатководних шкољки Лазара Докића из XIX века, налаз врсте *A. cygnea*, без прецизиране абунданце детектован је у Јужној Морави, Нишави, Сави и Тамнави (Tadić, 1960). Део резултата који се односи на истраживања у периоду 1953.-1972., и каснија истраживања различитих аутора указују да је врста *A. cygnea* некада била присутна у Дунаву, али је приказ њене учесталости и бројности од стране аутора знатно варирао. Као бројна и фреквентна врста забележена је на подручју Ђердапа у периоду 1992.-2000. (Simić и Simić, 2004). Резултати истраживања Дунава из периода 2003.-2008. (Martinović-Vitanović и сар., 2013), показала су да је *A. cygnea* била једна од најчешће налажених врста у Дунаву. Опсежним истраживањима (од 2000. године до данас), великих равничарских река (Graf и сар., 2008; Рауповић и сар., 2006, 2007а, 2008; Томовић и сар., 2010, 2012, 2013b, 2014) и других различитих типова текућих вода у Србији (Рауповић и сар., 2007b), није потврђен налаз ове врсте, изузев појединачног налаза на Дунаву 2004. године (Tubić и сар., 2013), на локалитету, Ушће Велике Мораве (низводно) и на Тиси, на локалитету Тител 2001. године (JDS-ITR Report, 2002). Резултатима новијих истраживања који су представљени у овом раду, није потврђен налаз *A. cygnea* у истраживаним рекама, али је као доминантна врста, детектована у лентичким екосистемима (језера, акумулације, барски екосистеми).

Узимајући у обзир све доступне податке, може се закључити да је дошло до значајног смањења ареала ове врсте, односно потпуног повлачења са простора где је некада налажена, а као њени рефугијуми могу се означити лентички екосистеми какве су акумулације, језера и барско мочварна подручја у Србији. На стаништима где је присутна ова врста је доминантна у заједници, или чак гради униформне заједнице, као једина забележена врста на том подручју, што одговара резултатима које су представили Zettler и сарадници (2006).

Смањење ареала ове врсте једним делом може се довести у везу са генералним погоршањем квалитета станишта услед загађења и деградације станишта, од половине

XX века до данас, које је посебно уочљиво у гушће насељеним областима, какве су долине већих река и њихових притока, с обзиром на то да се показало да је ова врста генерално осетљива на нарушавање квалитета животне средине и да се може сматрати индикатором чистих вода (Rosińska и сар., 2008).

Као један од могућих фактора нестајања врсте са великог дела акваторије где се некад налазила, могу бити различите биолошке интеракције између врста, нарочито конкуренција са алохтоном врстом каква је *S. woodiana*, али и других инвазивних врста слатководних шкољки које могу бити налажене на истом станишту са нативном фауном унионида.

Према истраживањима које су спровели Вутне и сарадници (2009), утврђен је негативан утицај инвазивне врсте *D. polymorpha* на популацију *A. cygnea*, на подручјима где је дошло до њеног ширења и заузимања станишта (Вутне и сар., 2009). Сама љуштура шкољке може послужити као подлога за коју ће се ова инвазивна врста причврстити, у случају када им није доступан одговарајући супстрат. Пренамножавање инвазивних врста на љуштурсима шкољки, може повећати њихов морталитет и нестајање са тог простора, због ометања процеса исхране, респирације и репродукције (Вутне и сар., 2009).

Сматра се да је широко распрострањена у Европи, од Пиринејског полуострва на југозападу до Сибира на истоку (Zettler и сар., 2006), мада се мали број аутора бавио проучавањем величине и структуре популација ове врсте на простору Европе.

Налази се на IUCN Црвеној листи, сврстана у категорију LC (последња забринутост), док се према националним Црвеним листама нпр. у Пољској сматра угроженом врстом (EN) (Zajac, 2005), у Аустрији је оцењена као (NT) – скоро угрожена (Reischütz и Reischütz, 2007), а у Ирској и Чешкој као рањива (VU) (Вутне и сар., 2009). Посебан статус има и у Немачкој, према важећим законима у тој земљи и означена је као *високо угрожена* (Вутне и сар., 2009).

На основу још необјављених података, истраживањем популације ове врсте на Пиринејском полуострву, утврђена је врло рестриктивна дистрибуција у радијусу од свега 50 km на простору Португалије, а са простора Шпаније се сматра да је ишчезла (Lopes-Lima, 2014a).

Према разматраним критеријумима који су обухваћени моделом ESHIPPO-PD (еколошка специјализација, угрожавајући фактори диверзитета и популациона динамика), утврђен је први степен приоритета конзервације за врсту *A. cygnea*, односно висок ризик од изумирања на подручју Србије. Смањење ареала и негативан

популациони тренд ове врсте у Србији указују да је неопходно применити адекватне мере заштите врсте у циљу очување њених природних станишта.

A. anatina представља широко распрострањену врсту у Србији, али се уочавају осцилације у бројности популације и учесталости налаза у различитим фазама истраживања. Ареал распрострањења ове врсте није претрпео значајне промене, поредећи резултате савремених истраживања и историјске податке. Најранији записи о налазу ових врста потичу из XIX века, према којима је присуство врсте *A. anatina* детектовано у Колубари, Сави и у реци Ресавчини, притоци Велике Мораве (Tadić, 1960). Каснија истраживања аутора указала су на појединачне налазе ових врста у Нишави и Темштици (Simić и сар., 2006). Већина ових налаза није потврђена каснијим истраживањима. Резултати новијих истраживања указали су на присуство ове врсте у великим равничарским рекама, што је у сагласности са бројним истраживањима оваквих типова водотока (Paunović и сар., 2005, 2007a; 2008; Tomović и сар., 2010, 2012, 2013b, 2014; Martinović-Vitanović и сар., 2013). У односу на остале врсте, коегзистира у заједници са врстом *A. cygnea*, у лентичким екосистемима (језерима, акумулацијама, барско-мочварним екосистемима), али са малом абунданцом. Мала бројност у лентичким екосистемима, може се довести у везу са недовољним капацитетом средине, у којој доминантна врста *A. cygnea*, након потискивања из водотокова, заузима велики део потенцијалних микростаништа.

Прилив инвазивних врста и конкуренција, такође би могао бити један од узрока смањења бројности популације. Утицај конкуренције са инвазивном врстом *S. woodiana* на смањење абунданце популације *A. anatina* је утврђено у Италији и Мађарској (Lopes-Lima, 2014b).

Широко је распрострањена у Европи. Ареал обухвата простор готово целе Европе и део Азије. Дистрибуција врсте *A. anatina* у различитим временским периодима, још увек је недовољно разјашњена, због погрешних идентификација, односно непознавања разлика између врста *A. cygnea* и *A. anatina*, која углавном води порекло из Француске *Нове школе*, што је условило настанак преко 400 различитих синонима ових врста (Graf и Cummings, 2013).

Налази се на IUCN Црвеној листи, оцењена као LC (последња забринутост) за подручје Европе. О заштити ове врсте на националном нивоу у појединим земљама Европе, нема много података, осим за Немачку, где је заштићена према Закону о конзервацији врста (Zettler и сар., 2006).

Узимајући у обзир све анализиране критеријуме, нарочито елементе динамике популације *A. anatina* можемо закључити да је, применом модела ESHIPPO-PD, утврђен умерени ризик од изумирања, односно II степен приоритета заштите ове врсте на националном нивоу. У циљу очувања и заштите, неопходно је даље праћење дистрибуције, абунданце и кретања популација врсте *A. anatina* на подручју потенцијалног ареала у Србији.

Поредећи историјске податке са резултатима савремених истраживања, уочавају се знатне промене у дистрибуцији и бројности популације и код врсте *U. crassus*. Први налази ове врсте потичу још из XIX века (Dokić, 1882; Тадић, 1960). Према историјским подацима, узимајући у обзир саме почетке истраживања у овој области (XIX век), и истраживања Анте Тадића у периоду 1953.–1972., може се закључити да је *U. crassus* имала широко, континуирано распрострањење на целом подручју Србије, обухватајући водотокове различитих сливних површина, до средине 70-их година прошлог века. Истраживањима која су уследила, на простору Србије, уочен је пад бројности популације ове врсте и само спорадични налази на ограниченом простору. Присуство врсте *U. crassus*, без прецизних података о бројности утврђени су у Колубари (Marković, 1999), Пустој реци (Živić и сар., 2001b), на локалитету Нови Бечеј у Тиси (JDS-ITR Report, 2002), и појединачни налаз 2004. године у горњем току Црног Тимока (Simić и сар., 2006).

Поредећи резултате различитих фаза савремених истраживања у периоду 2001.–2013. година, уочава се позитиван популациони тренд у последњих неколико година, при чему се нарочито издваја слив реке Саве. Према истраживању реке Саве током 2012. године, *U. crassus* је била доминантна врста у заједници у средњем делу тока ове реке. Резултати анализе заједнице унионида применом мултиваријантне коресподентне анализе (CA), поред издвајања заједнице са Саве, указали су на издвајање заједница са Западне Мораве и Колубаре. Оваквом груписању доприноси, у највећој мери, врста *U. crassus*, која је у овим водотоцима, за разлику од осталих анализираних, била доминантан таксон. Према још необјављеним резултатима истраживања мањих равничарских река у сливу Саве из 2012. године, забележена је као релативно бројна и у реци Пештан. Скорија истраживања аутора указују на ширење просторне дистрибуције врсте и њено присуство у Јужној Морави (Novaković, 2012) и Нишави (Savić, 2012). С обзиром на све анализиране податке, уочава се позитиван популациони тренд врсте *U. crassus*, повећање бројности и ширење ареала на простору Србије.

Историјски подаци указују да је *U. crassus* била константна врста у Дунаву а према најновијим подацима њено присуство у реци је детектовано тек 2013. године са веома ниском учесталошћу. Нестајање ове врсте из Дунава у последњих неколико деценија може се довести у везу са повећањем загађења и хидроморфолошким променама насталих изградњом брана и регулисањем речног тока, при чему је велики део тока Дунава кроз Србију значајно измењен. Истраживањима бројних аутора, утврђено је да су главни фактори смањења диверзитета и бројности популације унионида редукција и измена карактеристика станишта услед конструкције брана (Bogan, 1993; Layzer и сар. 1993; Watters, 1996; Neves, 1999; Vaughn и Taylor, 1999; Lydeard и сар., 2004; Strayer, 2006). Пре изградње брана, Дунав је представљао ненарушен, континуирани речни систем са пространим плавним подручјима, и великим аутопурификационим капацитетом. Изградњом брана и формирањем великог акумулационог језера, дошло је до изражених промена хидролошког режима, односно успорења речног тока Дунава. Као последица смањења брзине воде, повећава се седиментација дуж обала реке (Nedeljković, 1979), а самим тим долази до и спуштање речних обала, промене структуре станишта у главном току реке што је могло утицати на деградацију потенцијалних микростаништа *U. crassus*, али и станишта у приобалним и плавним подручјима. Изградњом брана, створене су препреке и у миграцији риба, које представљају потенцијалне домаћине ларвама унионида, што такође може бити ограничавајући фактор за популацију врсте *U. crassus*, али и осталих унионида.

Дистрибуција ове врсте на простору Европе је некада, такође била континуирана, за разлику од савремених података који указују на неуједначено распрострањење (Lopes-Lima и сар., 2014c). Подаци о налазима ове врсте забележени су и у подручју Блиског истока (басени Тигра и Еуфрата), и даље ка истоку у басену реке Амур, у источној Русији (Graf, 2007). Присуство ове врсте није забележено у Великој Британији, Ирској, Исланду, Италији и Пиринејском полуострву.

Са становишта заштите ова врста је од посебног значаја и сврстана је у категорију угрожених таксона (EN), према IUCN класификацији. Налази се на националној Црвеној листи као критично угрожена (CR) у Немачкој, Швајцарској и Аустрији, рањива (VU) у Албанији, док се у Холандији води као изумрли таксон (EX) (Schultes, 2010). Поред тога, налази се и на листи Европске директиве о стаништима (92/43/ECC) (Anex II и IV).

На подручју Србије, строго је заштићена врста према Правилнику о проглашењу строго заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива

(Службени гласник РС, 05/2010). Резултати наших истраживања, добијени оценом релевантних параметара, коришћењем модела ESHIPPO-PD, указују на први степен приоритета заштите врсте *U. crassus* на подручју Србије, односно висок ризик од изумирања. Први степен приоритета заштите утврђен је у односу на укупни потенцијални ареал распрострањења у Србији. Овакву врсту процене могуће је разматрати и на појединачним сливовима, при чему је уочен позитиван популациони тренд у сливу Саве и мањим равничарским рекама. Резултати свеобухватне анализе указују да је потребно спроводити адекватне мере заштите популација врсте *U. crassus* на простору Србије.

Мали ареал распрострањења и учесталост појављивања, према савременим истраживањима, али и према историјским подацима, забележени су за врсту *P. complanata*.

У заједници са осталим врстама, *P. complanata* је најмање бројна, и често забележена само са појединачним налазима. Поредећи резултате истраживања у различитим временским периодима, уочавају се извесне разлике у дистрибуцији. Подаци Лазара Докића, указују на присуство ове врсте у Сави и Дунаву још у XIX веку (Тадић, 1960), али налази нису потврђени истраживањима у периоду 1953.-1972. година. Узимајући у обзир резултате новијих истраживања, присуство врсте детектовано је у великим равничарским рекама Дунаву, Сави, Тиси и Великој Морави са ниском бројношћу и учешћем појављивања. Налази врсте у великим рекама у складу су са истраживањима других аутора, али су се прикази њене бројности у извесној мери разликовали (JDS-ITR Report, 2002; Paunović и сар., 2008; Tomović и сар., 2012; Martinović-Vitanović и сар. 2013).

Као могући узрок разлика у динамици популације, узимајући у обзир резултате савремених истраживања и историјске податке, може се узети и то да јасна методологија прикупљања узорака за музејску збирку није дефинисана, и не може се искључити могућност да су извесне разлике настале због неадекватне методологије. Према подацима о учешћу налаза ове врсте, може се рећи да је још увек релативно широко распрострањена у Србији, али бројност указује на нестабилну популацију.

Пад бројности популације и фрагментисана дистрибуција, уочена је и на простору Европе, осим у њеном северном делу, односно у области Балтичког слива, где се још увек сматра да је релативно широко распрострањена (Van Damme, 2011a). Значајан пад бројности популације у последњих неколико деценија (око 40 година) за

преко 30%, бележи се у западном, централном и југоисточном делу Европе (Van Damme, 2011a).

На европском нивоу, према IUCN категоријама и критеријумима, оцењена је као рањива (VU) (Van Damme, 2011a). Сврстана је у неке од категорија угрожености и према националним Црвеним листама. Критично угрожена (CR) је у Немачкој и Пољској (Zajas 2009a); угрожена (EN) је у Чешкој, Белорусији, Мађарској и Словачкој (Bódis 2008, Van Damme, 2011a); рањивом (VU) се сматра у Украјини (Korniushin, 2002).

Приоритет заштите првог степена, односно висок ризик од изумирања врсте *P. complanata* утврђен је за подручје Србије. У циљу заштите и очувања популације, потребно је спроводити адекватне мере заштите, кроз различите активности у заштити станишта, али и кроз дефинисање и усвајање одговарајућих законских мера.

Широко распрострањење на истраживаном подручју, уочено је за *U. pictorum* и *U. tumidus*, али се такође уочавају промене у дистрибуцији, у различитим фазама истраживања. Ареал врсте *U. pictorum* није битно измењен, док се код *U. tumidus* уочава шире распрострањење, поредећи историјске податке и резултате савремених истраживања. Анализом учесталости налаза и бројности популације према резултатима савремених истраживања, утврђено је да је *U. tumidus* апсолутно доминантна врста у заједницама Дунава и Саве и најчешће је налажена у свим истраживаним великим равничарским рекама, за разлику од података из ранијег периода који указују на нешто мању учесталост ове врсте у односу на *U. pictorum* и *U. crassus*.

Најранији записи о овим врстама у Србији су из XIX века и углавном се односе на налазе у Дунаву и Сави (Dokić, 1882; Тадић, 1960). Након истраживања Анте Тадића у периоду 1953–1972, па до почетка новијих истраживања представљених у овом раду, мало је објављених података о распрострањењу врста. Без прецизиране абунданце, налази ових врста детектовани су у Дунаву (Arambašić, 1994), Пустој реци (Živić и сар., 2001b) и Тиси (JDS-ITR Report, 2002), а према истраживањима које је представио Simić (1993), са малом бројношћу детектован је налаз *U. tumidus* у Сврљишком и Трговишком Тимоку и у Великој Морави (Simić и сар., 2006). Каснијим истраживањима утврђено је углавном широко распрострањење и умерена до висока бројност популација врста *U. pictorum* и *U. tumidus* у великим равничарским рекама типа 1 (Службени гласник, 74/2011), што су потврдили и наши резултати. На шири ареал врсте *U. tumidus*, према резултатима представљеним у овом раду, указују налази у Великој и Западној Морави, где врста *U. pictorum* није детектована. Такође, присуство врсте *U. tumidus*

регистровано је у Нишави (Novaković, 2012), док су обе врсте детектоване у Јужној Морави (Savić, 2012).

Широко распрострањење две врсте рода *Unio* уочено је и на простору Европе, где је такође уочена нешто мања дистрибуција за *U. pictorum*. Присуство ове врсте није забележено у Шкодској, Шпанији и Португалији (Van Damme, 2011b).

На подручју Европе статус обе врсте је оцењен категоријом LC (последња забринутост), али о њиховој заштити на националном нивоу нема много података, с обзиром на широко распрострањење и релативно стабилне популације.

На националном нивоу, према резултатима истраживања, *U. pictorum* се налази под умереним ризиком од изумирања (II степен приоритета заштите), што указује да је потребно вршити даље праћење популација ове врсте и интензивнија истраживања. Трећи степен приоритета заштите на националном нивоу (мала вероватноћа изумирања) оцењен је за *U. tumidus*. Према представљеним резултатима, заузетост потенцијалног ареала, бројност, као и дистрибуција врсте *U. tumidus* на станишту, указују на стабилну популацију на простору Србије.

S. woodiana, представља алохтону инвазивну врсту и једна је од ретких врста у оквиру фамилије Unionidae чија дистрибуција обухвата готово читав свет (Cummings, 2011). Нативни ареал ове врсте је источна и југоисточна Азија. Крајем прошлог века, бележи се њено ширење ван природног ареала. Први налаз за Србију забележили су Пауновић и сарадници (2006). Регистрована је и у великом броју земаља Европе – Мађарској (Petró, 1984), Румунији (Sárkány-Kiss, 1986), Француској (Girardi и Ledoux, 1989), Словачкој (Košel, 1995), Чешкој (Beran, 1997), Аустрији (Reischutz, 1998), Пољској (Bohme, 1998), Украјини (Urishients и Korniushev, 2001), Италији (Manganelli et. al., 1998), Хрватској (Lajtner и Crnčan, 2011) и Црној Гори (Tomović и сар., 2013a), али и на подручју неких Индонезанских острва, Доминиканској Републици и Коста Рики (Paunović и сар., 2006; Bogan и сар., 2011).

Сматра се да је унос поменуте врсте повезан са интродукцијом риба из тзв. „кинеског комплекса“ (*Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), *Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783; *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) и *Arstichthys nobilis* Richardson, 1844) 60-тих и 70-тих година XX века (Čakić и Hristić, 1987; Paunović и сар., 2006), првенствено ради регулисања продукцију водене вегетације у рибањацима (Paunović и сар., 2006). Негативни ефекти уноса и ширења *S. woodiana* уочавају се првенствено у конкуренцији са нативним врстама адулtnих унионида (Cianfanelli и сар., 2007), али и због конкуренције ларвених овлика услед преференце према истом

домаћину (Berau, 2008). Према ранијим истраживањима сматрало се да је за репродукцију и сазревање гамета основни предуслов одређена температура воде, тако да су и налази у Европи били ограничени на јужне делове континента или термално загађене воде (Kraszewski, 2007). Новија истраживања су показала да температурни режим воде ипак не ограничава репродукцију у мери у којој се раније сматрало, а сезонска динамика је врло слична динамици коју врста има у нативном ареалу (Dudgeon и Morton, 1983), што потврђује и велики број налаза широм Европе.

На европском нивоу према IUCN, статус ове врсте оцењен је као LC (последња брига), док за остале регије где је ова врста присутна, нема података о мерама заштите.

Као најзначајнији физичко-хемијски параметри средине, који утичу на састав и структуру заједнице и бројност популације издвојени су: ВРК-5, НРК из KMnO_4 , концентрације калцијума, нитрата, амонијум јона, раствореног кисеоника и укупна тврдоће.

На основу резултата мултиваријантне кореспондентне канонијске анализе, уочава се издвајање врсте *U. crassus* и позитивна корелација са концентрацијом калцијумом и укупном тврдоћом воде. Као ограничавајући фактори дистрибуције ове врсте показали су се ВРК, НРК, концентрација нитрата и амонијум јона. Овакво издвајање је у сагласности са ранијим истраживањима, с обзиром да је утврђено да је *U. crassus* изразито осетљива врста на промене хемизма воде (Zajac и Zajac, 2009) и органско загађење (Schulte, 2010). Повећана концентрација нитрата у води, негативно утиче на јувенилне јединке, али се негативно одражава и на репродукцију адултних примерака (Schulte, 2010).

У односу на поменуте ограничавајуће факторе, повећана толеранција уочава се за врсту *A. anatina*, што одговара запажањима о нешто већој отпорности ове врсте на органске видове загађења (Mouthon, 1996). У односу на опште карактеристике квалитета окружења и количину присутних нутријената, *A. anatina* се означава као врста која се равноправно може наћи и у олиготрофним и еутрофним водама (Zettler и сар., 2006).

Као најзначајнији параметри из групе тешких метала, који утичу на дистрибуцију, абунданцу и структуру заједнице унионида издвојени су: бакар, олово и кадмијум. Као и код претходног сета срединских параметара и у овом случају врста *U. crassus* означена је као потенцијални индикатор пораста токсичности. Овакви резултати су очекивани с обзиром на опажања о већој осетљивости ове врсте и о генерално великим могућностима слатководних шкољки у складиштењу потенцијално токсичних

елемената у својим ткивима, усвајајући их директно преко воде која долази до шкрга, или уношењем преко суспендованих материја, или из седимента (Jamil и сар., 1999).

У овој студији, анализе морфолошке варијабилности популација методама геометријске и линеарне морфометрије су се показале као поуздане у утврђивању међупопулационих (интраспецијских), разлика у овиру врста из фамилије Unionidae. Анализом интраспецијске морфолошке варијабилности популација врста *U. tumidus* и *U. pictorum*, утврђен је сличан образац промене морфолошких структура јединки са Дунава, Саве и Тисе.

Применом метода геометријске морфометрије утврђено је постојање статистички значајних међупопулационих разлика у варијабилности величине и облика љуштуре врсте *U. tumidus*. Највеће разлике у морфолошкој структури показале су јединке популације са Дунава и Тисе, у односу на јединке анализиране популације са Саве, која се може означити као прелазна група, узимајући у обзир варијабилност облика и величине љуштуре. Анализа варијабилности девет дужинских карактера љуштура јединки различитих популација, заснована на традиционалном морфометријском приступу, показала је, такође међупопулационе разлике и сличан тренд одступања. Популација са Тисе, показује највеће одступање у односу на остале две просторно блиске популације, код којих се уочава нешто слабије одвајање.

Анализом међупопулационих разлика врсте *U. pictorum* методама геометријске и линеарне морфометрије, утврђено је готово исто одступање, као и код претходне врсте. Јединке популације са Тисе су показале највеће разлике у облика и/или величине морфолошке структуре у односу на јединке популација са Дунава и Саве.

Поређењем промена облика представљених у виду TPS деформација код јединки обе анализиране врсте рода *Unio*, уочено је да јединке популација са Тисе одликује генерално ситнија љуштура. Утврђено је такође да је алометријски раст, односно промена облика љуштуре условљена променом величине, такође утицала на варијабилност облика морфолошких структура. На нивоу целог узорка утврђен је статистички значајан удео алометрије (4.45% за *U. tumidus* и 5.85% за *U. pictorum*), у генерисању укупних варијабилности облика љуштуре.

Готово исти тренд одступања међупопулационих разлика код анализираних популација у оквиру врста *U. tumidus* и *U. pictorum*, имајући у виду њихову еколошку пластичност и прилагодљивост, указује на морфолошку сличност популација са сличних станишта у оквиру анализираних водотокова. Слична морфолошка пластичност може бити додатни разлог њихове широке распрострањености.

Интраспецијска морфолошка варијабилност, утврђена је и између јединки анализираних популација врсте *U. crassus*, методама геометријске и линеарне морфометрије. Јединке популације са Саве су показале највеће разлике у облика и/или величине морфолошких структура у односу на јединке популација са Велике Мораве. Поређењем промена облика представљених у виду TPS деформација код јединки популација са Велике Мораве се уочава заобљенија љуштура, односно скраћење дужине у антериорно-постериорном делу и повећање растојања од врха умба до вентралне маргине. За разлику од остале две врсте рода *Unio*, код врсте *U. crassus* није утврђен статистички значајан утицај алометријског раста на промену облика тела, што може бити један од показатеља да се ради о адаптивној дивергенцији популација са различитих типова микростаништа у оквиру анализираних река.

Анализа интраспецијске варијабилности код врста *S. woodiana* и *A. anatina* на основу девет дужинских карактера, заснована на традиционалном морфометријском приступу, показала је, такође међупопулационе разлике. Мултиваријантна анализа морфометријских варијабли показала је морфолошку дискриминацију популација *S. woodiana* са Велике Мораве и Дунава, односно популација *A. anatina*, са Дунава и Саве.

Имајући у виду чињеницу да анализиране популације врста рода *Unio* потичу из водотокова сличног типа, односно великих равничарских река, особине микростаништа свакако би могле бити узрок регистрованим међупопулационим разликама у облику љуштуре врста. Повезаност интраспецијске морфолошке варијабилности љуштуре и карактеристика станишта код унионида је била предмет истраживања више студија у прошлости, према којим је установљено да присуство различитих морфотипова представља одговор, односно адаптацију врста на услове средине (Hazay, 1881; Buchner, 1910; Israel, 1910; Haas и Schwarz, 1913; Ortmann, 1920; Grier и Mueller, 1926; Bloomer, 1938). Узимајући у обзир претходна разматрања и анализирајући параметре средине који би могли условити морфолошке промене анализираних врста, може се закључити да се као потенцијални фактори који се могу довести у везу са морфолошким разликама популација могу означити, структура седимента, хидролошки параметри (лотичка и лентичка микростаништа), односно максимална и минимална брзина тока, дубина водотока, што одговара раније спроведеним истраживањима на различитим врстама слатководних шкољки (Claxton и сар., 1998; Trussell, 2002; Hornbach и сар., 2010). Такође, као један од битних фактора може се означити и промена температурног режима воде (Grier, 1920; Negus, 1966; Reigle, 1967; Ghent и сар., 1978).

Поред утицаја абиотичких параметара, свакако при анализи треба узети у обзир и биотичке компоненте средине, као нпр. инфицираност паразитима (Zieritz и Aldridge, 2011), бројност присутних предатора (Neo и Todd, 2011; Bourdeau, 2012), али и количину доступне хране (Preston и Roberts, 2007).

Уочене разлике у облику морфолошких структура између група јединки могу бити последица разних фактора, од историјских до промена у погледу развића, функције или одговора на различите селективне притиске (Zelditch и сар., 2004).

Анализа варијабилности морфолошких структура узорака врста рода *Unio* из музејске збирке, методама линеарне и геометријске морфометрије, није оправдала њихово издвајање са становишта морфологије љуштуре у различите врсте/подврста/форме. Узимајући у обзир резултате обе морфолошке анализе, статистички значајне разлике у варијаблама облика и величине, уочене су једино код анализираних подврста *U. tumidus*. Као разлог одвајања ове две групе узорака, свакако се треба узети у обзир утицај статистички значајног алометријског раста, који је на нивоу целог узорка износио 7.4%. Код осталих врста рода *Unio* из музејске збирке, методама геометријске морфометрије није утврђена статистички значајна разлика у облику, већ само у величини морфолошких структура. С обзиром на то, може се закључити да је узрок издвајања групе *U. crassus crassus f. Grandis* методом линеарне геометријске анализе, заправо припадност различитој величинској класи у односу на остале анализираних јединки. Приликом разматрања морфолошке варијабилности у оквиру врсте *U. pictorum*, такође је утврђено издвајање различитих група анализираних јединки само по величини, док за промене облика није утврђена статистичка значајност.

Резултати приказани у овој студији, потврдили су морфолошку варијабилност љуштуре у оквиру анализираних врста, на основу чега се може закључити да се као разлог оваквих промена, могу одредити карактеристике микростаништа и различити селекциони притисци на појединим локалитетима. Увођење контурне геометријске морфометрије у даљу анализу, би свакако унапредило разумевање и сагледавање морфолошке варијабилности, нарочити код родова *Sinanodonta*, *Anodonta* и *Pseudanodonta*, с обзиром да код њих нису присутне морфолошке структуре као код рода *Unio*. За даљу анализу интерспецијских и интраспецијских односа врста у оквиру фамилије Unionidae, неопходно је и укључивање модерних метода молекуларне систематике.

6. Закључци

-
- С обзиром на број врста детектованих у Европи, у Србији је забележен значајан диверзитет слатководних шкољки из фамилије Unionidae. Укупно је забележено 7 врста, које су сврстане у четири рода. Највећи диверзитет и бројност популације забележени су у доњим токовима великих равничарских река (зони потамона).
 - Анализа узорака из музејске збирке, из периода 1953.-1972., није потврдила присуство већег броја таксона на подручју Србије од броја који се бележи данас. Утврђено је да је, због велике морфолошке варијабилности унутар врста, често долазило до погрешне идентификације и/или проглашавања нових, невалидних, таксона. Експанзија описа врста настала је у XIX веку потиче углавном из Француске „Нове школе“. Велики број синонима постојећих врста на подручју Србије датира из тог периода.
 - Поредићи историјске податке о налазима врста и савремена истраживања, уочене су промене у величини ареала и популационој динамици појединих врста. Нестајање врсте из великог дела акваторије коју је насељавала, може се довести у везу са генералним погоршањем квалитета станишта услед еутрофизације, загађења и деградације станишта, од половине XX века до данас.
 - Према историјским подацима представљеним у овом раду, *U. crassus* је била широко распрострањена и једна од најприсутнијих врста на целом подручју Србије до средине 70-их година прошлог века. Након тог периода, истраживањима извршеним у последњих неколико декада, уочен је пад бројности популације ове врсте и само спорадични налази на ограниченом простору. Најновија истраживања указују на позитиван популациони тренд ове врсте, при чему се нарочито издваја слив Саве.
 - Хидротехнички радови, регулација речних корита и заштита од поплава представљају факторе који доводе до хидроморфолошких и хидролошких промена водотока. Изградња бране на Дунаву, условила је изражене промена хидролошког режима, односно успорења речног тока Дунава, а са тим и интензивну седиментацију. Наведене промене су могле утицати на деградацију потенцијалних микростаништа за нпр. врсту *U. crassus*.
-

-
- Значајно смањење ареала врсте, односно потпуно повлачење са простора где је некада налажена, утврђено је за *A. cygnea*, а као њени рефугијуми могу се означити лентички екосистеми какве су акумулације, језера и барско мочварна подручја у Србији, где представља доминантну врсту.
 - Као један од могућих фактора нестајања врсте са великог дела акваторије где се некад налазила, могу бити различите биолошке интеракције између врста, нарочито конкуренција са алохтоном врстом каква је *S. woodiana* и *D. polymorpha*, које могу бити налажене на истом станишту са нативном фауном унионида.
 - Анализом односа врста у оквиру фамилије Unionidae и хемијских параметара воде, утврђено је да су издвојени фактори (BPK-5, НРК из KMnO₄, концентрације калцијума, нитрата, амонијум јона, раствореног кисеоника и укупна тврдоће), најзначајније утицали на *U. crassus*.
 - Као најзначајнији средински параметри из групе тешких метала издвајају се бакар, олово и кадмијум. Према нашим истраживањима повећане концентрације тешких метала негативно утичу на *U. crassus*, док се повећана толеранција уочава за врсту *A. anatina*.
 - Геометријско морфометријском анализом рецентних узорака потврђено је постојање статистички значајних међупопулационих разлика у варијабилности величине и облика морфолошких структура.
 - Геометријско морфометријском анализом рецентних популација врста *U. tumidus* и *U. pictorum* утврђен је статистички значајан удео алометријског раста на укупну варијабилност облика љуштуре.
 - Анализом морфолошких структура, методама геометријске морфометрије код врсте *U. crassus* није утврђен статистички значајан утицај алометријског раста на промену облика тела, што може указивати да се ради о адаптивној дивергенцији анализираних популација из Саве и Велике Мораве.
 - Анализом варијабилности морфолошких структура узорака из музејске збирке, применом метода геометријске морфометрије, није потврђено постојање значајних разлика у варијабилности величине и облика различитих подврста,

изузев у случају *U. tumidus* где је утврђен и статистички значајан удео алометријског раста у укупној варијабилности.

- Анализом варијабилности љуштура на основу девет дужинских карактера, применом традиционалног морфометријског приступа, утврђено је постојање међупопулационих разлика и сличан тренд одступања као и при геометријско морфометријској анализи.
- На основу елемената еколошке специјализације ES, HIPPO фактора и популационе динамике (PD) одређени су приоритети заштите угрожених врста на националном нивоу. Први степен приоритета заштите, односно висок ниво ризика од изумирања на националном нивоу утврђен је за врсте: *U. crassus*, *P. complanata* и *A. cygnea*. Умерени ризик од изумирања (II степен приоритета заштите), оцењен је код врста *U. pictorum* и *A. anatina*, док је за *U. tumidus* утврђено да је под малим ризиком од нестајања (III степен приоритета заштите).
- Анализа елемената модела (ES + HIPPO +PD) од великог је значаја у очувању аутохтоних врста за које се сматра да су угрожене, јер омогућава издвајање фактора на локалном нивоу који највише утичу на угроженост дате врсте и неопходан је корак у дефинисању стратегије конзервације.
- У циљу заштите и очувања популација врста, потребно је спроводити адекватне мере заштите, кроз различите активности у циљу очувања и заштите станишта. Осим тога, укључивање врста, за које је утврђено да су под одређеним ризиком од изумирања у одговарајуће законске регулативе које се тичу заштите и очувања биодиверзитета, такође је потребно, с обзиром да се на примеру врсте *U. crassus* показало као делотворно.

7. Литература

- Adams D. C., Rohlf F. J., Slice D. E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the „revolution“. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5-16.
- Aguirre M. L., Perez S. I., Sirch Y. N. (2006). Morphological variability of *Brachidontes Swainson* (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239: 100-125.
- Aldridge D. C. (1999). The morphology, growth and reproduction of Unionidae (Bivalvia) in a fenland waterway. *Journal of Molluscan Studies*, 65: 47-60.
- AQEM (2002). Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0, Contract No: EVK1-CT1999-00027.
- Arambašić M. (1994). Composition and structure of mollusc fauna of the Yugoslav part of the Danube and saprobity estimation. In: Janković D, Jovičić M (eds.), *The Danube in Yugoslavia: Contamination, protection and exploitation*, Beograd: Institute for Biological Research Siniša Stanković, pp. 124-130.
- Araujo R., Ramos M. Á. (2000). Status and conservation of the giant European freshwater pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) (Spengler, 1793) (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Conservation*, 96: 233-239.
- Badino G. (1982). *Unio elongatulus* Pfeiffer (Bivalvia): variabilité biométrique et génétique des populations du Piémont (Italie du nord). *Malacologia*, 22: 673-677.
- Baker A. M., Bartlett C., Bunn S. E., Goudkamp K., Sheldon F., Hughes A. M. (2003). Cryptic species and morphological plasticity in long lived bivalves (Unionoida: Hyriidae) from inland Australia. *Molecular Ecology*, 12: 2707-2717.
- Bauer G. (1988). Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in central Europe. *Biological Conservation*, 45: 239-253.
- Bauer G. (2001). Characterization of the Unionoida (=Naiads). In: G. Bauer and K. Wachtler eds., *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida*. Ecological Studies, Vol. 145. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg 2001.
- Beran L. (1997). First record of *Sinanodonta woodiana* (Mollusca, Bivalvia) in the Czech Republic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemica. Praha*, 61 (1): 1-2.
- Beran L. (2008). Expansion of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) in the Czech Republic. *Aquatic Invasions* 3 (1): 91-94.
- Beran L. (2009). Vodní měkkyši ČR. Reegionalni centrum ČSOP, Vlašim.

- Bloomer H. H. (1938). The British species of *Anodonta* Lamarck, and their varieties. *Journal of Conchology*, 21: 33-48.
- Bódis E. (2008). Contribution to the macroinvertebrate fauna of the Hungarian Danube IV. Mussels (Bivalvia: Corbiculidae, Dreissenidae, Sphaeriidae, Unionidae). *Folia Historiconaturalia Musei Matraensis*, 32: 57-68.
- Bogan A. (1993). Freshwater Bivalve extinctions (Mollusca: Unionoida): a search for causes. *American Zoologist*, 33: 599-609.
- Bogan A. E. (2008). Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 139-147.
- Bogan A. E., Bowers-Altman J., Raley M. E. (2011). The first confirmed record of the chinese pond mussel (*Sinanodonta woodiana*) (Bivalvia: Unionidae) in the United States. *Nautilus*, 135 (1): 41-43.
- Bogan A.E., Roe K. (2008). Freshwater bivalve (Unioniformes) diversity, systematics, and evolution: status and future directions. *Journal of the North American Benthological Society*, 27: 349-369.
- Bohme M. (1998). Ein neuer Fundort der Chinesischen Teichmuschel (*Sinanodonta woodiana*) in Mitteleuropa. *Heldia*, 2 (5-6): 166.
- Bookstein F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Bourdeau P. E. (2012). Intraspecific trait cospecialization of constitutive and inducible morphological defences in a marine snail from habitats with different predation risk. *Journal of Animal Ecology*, 81: 849-858.
- Brennan S., Withgott J. (2005). Biodiversity and conservation biology. In: *Environment: The Science behind the stories*. Pearson, Bewamin Cumming. San Francisco.
- Buchner O. (1910). Ueber individuelle Formverschiedenheiten bei Anodonten. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg* 65: 50.
- Byrne A., Moorkens E. A., Anderson R., Killeen I. J. Regan E. C. (2009). Ireland Red List No. 2 – Non- Marine Molluscs. National Parks and Wildlife Service. Department of the Environment, Heritage and Local Government, Dublin, Ireland.
- Cakic P., Hristic Dj. (1987). The ichthyofauna of Pancevacki rit wetlands (Belgrade) with special reference to the allochthonous fish species. *Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle*, Belgrade, Serie B, Livre 42: 103-118.

- Campbell D. C., Serb J. M., Buhay J. E., Roe K. J., Minton R. L., Lydeard C. (2005). Phylogeny of North American amblesmines (Bivalvia, Unionoida): prodigious polyphyly proves pervasive across genera. *Invertebrate Biology*, 124: 131-164.
- Cianfanelli S., Lori E., Bodon M. (2007). Non-indigenous freshwater molluscs and their distribution in Italy. U: Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution and threats (ur. Gherardi, F.). Springer, Dordrecht, pp. 103-121.
- Claxton W. T., Wilson A. B., Mackie G. L., Boulding E. G. (1998). A genetic and morphological comparison of shallow- and deep-water populations of the introduced dreissenid bivalve *Dreissena bugensis*. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 1269-1276.
- Clifford H. F. (1991). Aquatic invertebrates of Alberta. University of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canada.
- Costa C., Aguzzi J., Menesatti F., Antonucci F., Rimatori V., Attocchia M. (2008). Shape analysis of different populations of clams in relation to their geographical structure. *Journal of Zoology*, 276: 71-81.
- Csányi B. (2002). Joint Danube Survey: Investigation of the Tisza River. International Commission for the Protection of the Danube River, pp. 1-135.
- Csányi B., Paunovic M. (2006). The Aquatic Macroinvertebrate Community of the River Danube between Klostenburg (1942 rkm) and Calafat – Vidin (795 rkm). *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung* 14: 91-106.
- Cummings K. S., Mayer C. A. (1992). Field Guide to Freshwater Mussels of the Midwest. Illinois Natural History Survey Manual 5, 194 pp.
- Cummings K. (2011). *Sinanodonta woodiana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011:e.T166313A6198609.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T166313A6198609.en>. Downloaded on 14 September 2015.
- Cuttelod A., Seddon M., Neubert E. (2011). European Red List of Non-marine Molluscs. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 93 pp.
- De Jong Y.S.D.M. (2013). Fauna Europaea version 2.6. Web Service available online at <http://www.fauna-eu.org/>
- Dokić L. (1882). Školjke u Srbiji. Kraljevsko-srpska državna štamparija, Beograd.
- Drouët H. (1882). Unionidae de Serbie.
- Drouët H. (1884). Suppl. Unionidae de Serbie.
- Dryden I. L., Mardia K. V. (1998). Statistical shape analysis. John Wiley and Sons, New York.

- Dudgeon D., Morton B. (1983). The population dynamics and sexual strategy of *Anodonta woodiana* (Bivalvia: unionacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. *Journal of Zoology*, 201: 161-183.
- EU (2000). Council Directive 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and fauna, Annex II: animal and plant species of community interest whose conservation requires the designation of special area of conservation; Annex IV: Animal and plant species of community interest in need for strict protection. Office for Official Publication of the European Communities, 1-19.
- Fijan N. (1950). Gospodarska vrijednost školjke za otvorene vode i ribnjake. *Slatkovodno ribarstvo Jugoslavije*, 11-12, Zagreb.
- Fritz M.K., Gangloff M.M., Feminella W.J. (2004). Habitat modification by the stream macrophyte *Justicia Americana* and its effects on biota. *Oecologia*, 140: 388 – 397.
- Ghent A. W., Singer R., Johnson-Singer L. (1978). Depth distributions determined with SCUBA, and associated studies of the freshwater unionid clams *Elliptio complanata* and *Anodonta grandis* in Lake Bernard, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 56: 1654-1663.
- Girardi H., Ledoux J. C. (1989). Présence d' *Anodonta woodiana* (Lea) en France Mollusques, Lamellibranches, Unionidae). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 58: 186-290.
- Glöer P., Meier-Brook C. (2003). Süßwassermollusken: Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. DJN, Hamburg. 138 pp.
- Good P (1994) *Permutation test: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses*. Springer-Verlag, New York.
- Graf D. L. (2007). Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) diversity and the Comparative Method as a species concept. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 156: 71-88.
- Graf D. L., Cummings K. S. (2006). Palaeoheterodont diversity (Mollusca: Trigonioidea + Unionoida): what we know and what we wish we knew about freshwater mussel evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148: 343-394.
- Graf D. L., Cummings K. S. (2007). Review of the systematic and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies*, 73: 291-314.

- Graf D. L., Cummings K. S. (2013). MUSSEL Project Web Site; [2013-08-08T00:00:00+03:00]. The Freshwater Mussels (Unionoida) of the World (and other less consequential bivalves).
- Graf D. L., Cummings K. S. (2014). The Freshwater Mussels (Unionoida) of the World (and other less consequential bivalves), updated 15 November 2014. MUSSEL Project Web Site, <http://www.mussel-project.net/>.
- Graf W., Csányi B., Leitner P., Paunovic M., Chiriac G., Stubauer I., Ofenböck T., Wagner F. (2008). Macroinvertebrate. In: Liška, I., Wagner, F., J. Slobodnik, Joint Danube Survey 2 - Final Scientific Report, ICPDR - International Commission for The Protection of The Danube River, Vienna, pp. 41-47.
- Grier N. M. (1920). Morphological features of certain mussel-shells found in Lake Erie, compared with those of the corresponding species found in the drainage of the Upper Ohio. *Annales of the Carnegie Museum*, 13: 145-182.
- Grier N. M., Mueller J. F. (1926). Further studies in correlation of shape and station in fresh water mussels. *Bulletin of the Wagner Free Institute of Science* 1: 11-28.
- Haas F., Schwarz E. (1913). Die Unioniden des Gebietes zwischen Main und deutscher Donau in tiergeographischer Hinsicht. *Abhandlungen der Königlich Bayerischen Akademie der Wissenschaften, mathematisch-physikalische Klasse*, 26: 1-34.
- Haas F. (1969). Superfamilia Unionacea. Das Tierreich, Vol. 88. De Gruyter, Berlin.
- Hazay J. (1881). Die Mollusken-Fauna von Budapest. *Malakozoologische Blätter* 4: 132-208.
- Heard W.H., Guckert R.H. (1970). A re-evaluation of the recent Unionacea (Pelecypoda) of North America. *Malacologia*, 10: 333-355.
- Хидролошки годишњак – квалитет вода (1992-1996; 2003-2007). Републички хидрометеоролошки завод Србије (ПХМЗ).
- Хидролошки годишњак – квалитет вода (1999-2008). Републички хидрометеоролошки завод Србије (ПХМЗ).
- Хидролошки годишњак – квалитет вода (2001-2010). Републички хидрометеоролошки завод Србије (ПХМЗ).
- Хидролошки годишњак – квалитет вода (2011-2013). Агенција за заштиту животне средине Србије (SEPA - Serbian Environmental Protection Agency), Министарство енергије, развоја и заштите природе.

- Hornbach D. J., Kurth V. J., Hove M. C. (2010). Variation in freshwater mussel shell sculpture and shape along a river gradient. *American Midland Naturalist*, 164: 22-36.
<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
<http://www.faunaeur.org>
- Huber M. (2010). Compendium of bivalves . Conchbooks, Hack-enheim, 904 pp.
- Huehner M. K. (1987). Field and laboratory determination of substrate preferences of unionid mussels. *Ohio Journal of Science*, 87: 29-32.
- Huff S. W., Campbell D., Gustafson D. L., Lydeard C., Altaba C. R., Giribet G. (2004). Investigations into the phylogenetic relationships of freshwater pearl mussels (Bivalvia: Margaritiferidae) based on molecular data: implications for their taxonomy and biogeography. *Journal of Molluscan Studies*, 70: 379-388.
- Israel F. B. (1910). Die Najadeen des Weidagebietes. *Nachrichtenblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft* 4: 4.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
- Ivanović A., Kalezić M. (2009). Evolucionarna morfologija: Teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Biološki fakultet, Beograd: 216 p.
- Jamil, A, Lajtha K, Radan S., Ruzsa G, Cristofor S., Postolache C. (1999). Mussels as bioindicators of trace metal pollution in the Danube Delta of Romania. *Hydrobiologia*, 392: 143-158.
- JDS-ITR National Tisza Report (2002). Report on the joint investigation of the Tisza River on the territory of the FR Yugoslavia within the international JDS-ITR Program. Republic of Serbia, Ministry for Protection of Natural Resources and Environment, Federal Hydro-Meteorological Institute, Belgrade, 1-52.
- Jojić, V. (2010). Održavanje B hromozoma u populacijama žutogrlog miša *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia): Geometrijsko-morfometrijska analiza komponenti morfološke varijabilnosti. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Karadžić B., Marinković S. (2009). Kvantitativna ekologija. Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd. 489 pp.
- Karadžić B. (2013). FLORA. A Software Package for Statistical Analysis of Ecological Data. *Water Research and Management*, 3 (1): 45-54.
- Kendall D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9: 428-430.

-
- Klingenberg C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Kolarević S., Knežević-Vukčević J., Paunović M., Gačić Z., Vuković-Gačić B. (2011). Assessment of the Microbiological Quality of the River Tisa in Serbia. *Water Research and Management*, 1 (2): 57-61.
- Korniushin A. V. (2002). On the Species Diversity of Freshwater Bivalve Molluscs in Ukraine and the Strategy of their Conservation. *Vestnik Zoologii*, 36 (1): 9-23.
- Korzeniak J., Zając K., Zając T. (2004). Relations between Unionids occurrence, in-stream vegetation and morphology of the channel in the Nida River. *Nature Conservation*, 60: 23 – 29.
- Košel V. (1995). The first record of *Anodonta woodiana* (Mollusca, Bivalvia) in Slovakia. *Acta Zoologica Universitatis Comenianae*, 39: 3-7.
- Krastewski A. (2006). Morphological Variation In The Chinese Clam *Sinanodonta woodiana* (LEA, 1834) In The Heterogeneous Conditions Of The Konin Heated Lake System In Central Poland. *Folia Malacologica* 14 (1): 11-23.
- Kraszewski A., Zdanowski B. (2007). *S. woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca) a new mussel species in Poland: occurrence and habitat preferences in a heated lake system. *Poland Journal of Ecology*, 55: 337-356.
- Küster H. C. (1848). Die Flussperlmuscheln (*Unio* et *Hyria*) in Abbildungen nach der Natur, mit Beschreibungen. *Systematisches Conchylien-Cabinet (Martini-Chemnitz)*.
- Lajtner J., Crnčan P. (2011). Distribution of the invasive bivalve *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Croatia. *Aquatic Invasions* 6, Supplement 1: S119-S124.
- Lamarck J. B. P. A. (1799). Prodrome d'une nouvelle classification des coquilles, comprennent une ré'daction appropriée des caractères gé'ne'riques, et l'é'tablissement d'un grand nombre de genres nouveaux. *Memoirs de la Societie d'Histoire Naturelle Paris*, 1: 63-91.
- Lamarck J. B. P. A. (1819). Les nayades. Pages 67–100 in *Histoire naturelle des animaux sans verte'bres*. Volume 6. *Muse'e d'Histoire Naturelle*, Paris, France.
- Layzer J. B., Gordon M. E., Anderson R. M. (1993). Mussels: the forgotten fauna of regulated rivers. A case study of the Caney Fork River. *Regulated Rivers: Research and Management*, 8: 63-71.
- Lea I. (1836). A Synopsis of the Family of Naiades, 1st ed. Pennsylvania, Philadelphia.
- Lea I. (1838). A Synopsis of the Family of Naiades, 2nd ed. Pennsylvania, Philadelphia.
-

-
- Lea I. (1852). A Synopsis of the Family of Naiades, 3rd ed. Pennsylvania, Philadelphia.
- Lea I. (1870). A Synopsis of the Family Unionidae, 4th ed. Pennsylvania, Philadelphia.
- Leff L. G., Burch J. L., McArthur J. V. (1990). Spatial distribution, seston removal, and potential competitive interactions of the bivalves *Corbicula fluminea* and *Elliptio complanata*, in a Coastal Plain stream. *Freshwater Biology*, 24:409-416.
- Linnaeus C. (1758). Systema Naturae per Regna Tria Naturae. Salvii, Stockholm.
- Locard A. (1890). Contributions á la faune malacologique française. 14. Catalogue des espèces françaises appartenant aux genres *Pseudanodonta* et *Anodonta* connues jusqu'à ce jour. *Annales de la Société Linnéenne de Lyon* 36: 50-285.
- Lopes-Lima M., Teixeira A., Froufe E., Lopes A., Varandas S., Sousa R. (2014). Biology and conservation of freshwater bivalves: past, present and future perspectives. *Hydrobiologia*, 735: 1-13.
- Lopes-Lima M. (2014a). *Anodonta cygnea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T156066A21400900. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T156066A21400900.en> . Downloaded on **19 October 2015**.
- Lopes-Lima M. (2014b). *Anodonta anatina*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T155667A21400363. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T155667A21400363.en>. Downloaded on 12 September 2015.
- Lopes-Lima, M., Kebapçı U., Van Damme D. (2014c). *Unio crassus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T22736A42465628. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T22736A42465628.en> . Downloaded on **19 October 2015**.
- Lopes-Lima M., Araujo R., Sousa R., Bergengren J., Geist J., Bernal Y., Aldridge C. D., Bodis E., Burlakova L., Van Damme D., Douda K., Froufe E., Georgiev D., Gumpinger C., Karatayev A., Kebapçı U., Killeen I., Lajtner J., Larsen M. B., Lauceri R., Legakis A., Lundberg S., Moorkens E., Motte G., Lois S., Nagel K. O., Ondina P., Outeiro A., Paunovic M., Prie V., Von Proschwitz T., Riccardi N., Rudzite M., Rudzitis M., Scheder C., Seddon M., Sereflisan H., Simic V., Sokolova S., Stoeckl K., Taskinen J., Teixeira A., Thielen F., Trichkova T., Varandas S., Vicentini H., Zajac K., Zajac T., Zogaris S. (2015). Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews*, doi: 10.1111/brv.12244.
- Lydeard C., Mulvey M., Davis G.M. (1996). Molecular systematics and evolution of reproductive traits of North American freshwater unionacean mussels
-

- (Mollusca:Bivalvia) as inferred from 16S rRNA gene sequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B–Biological Sciences* 351: 1593-1603.
- Lydeard C., Minton R. L., Williams J. D. (2000). Prodigious polyphyly in imperiled freshwater pearlymussels (Bivalvia:Unionidae): a phylogenetic test of species and generic designations. Pages 145–158 in E. M. Harper, J. D. Taylor, and J. A. Crame (editors). *The evolutionary biology of the Bivalvia*. Geological Society Special Publication 177. Geological Society, London, UK.
- Lydeard C., Cowie R. H., Ponder W. F., Bogan A. E., Bouchet P., Clark S. A., Cummings K. S., Frest T. J., Gargominy O., Herbert D. G., Hershler R., Perez K. E., Roth B., Seddon M., Strong E. E., Thompson F. G. (2004). The global decline of nonmarine molluscs. *Bioscience*, 54: 321-330.
- Machordom A., Araujo R., Erpenbeck D., Ramos M. A (2003). Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society*, 78: 235-252.
- Magnus O. (1555). *Historiae de gentibus septentrionalibus*. Icannem Mariam de Viottis Parmensem, Rome, Italy.
- Manganelli G., Bodon M., Favilli L., Castagnolo L., Giusti F. (1998). Checklist delle specie della fauna d'Italia, molluschi terrestri e d'acqua dolce. Errata ed addenda, 1. *Boll Mal.*, 33 (9-12): 151-156.
- Marković Z., Miljanović B., Mitrović -Tutundzić V. (1999). Macrozoobenthos as an indicator of the Kolubara Reka river water quality. *Annual proceedings of the Yugoslav society for water protection*, 261-266.
- Marković V., Atanacković A., Tubić B., Vasiljević B., Simić V., Tomović J., Nikolić V., Paunović M. (2011). Indicative status assessment of the Velika Morava River based on aquatic macroinvertebrates. *Water Research and Management*, 1 (3): 47-53.
- Marković V., Atanacković A., Tubić B., Vasiljević B., Kračun M., Tomović J., Nikolić V., Paunović M. (2012). Indicative status assessment of the Danube River (Iron Gate sector 849 - 1,077 rkm) based on the aquatic macroinvertebrates. *Water Resarch and Management*, 2 (2): 41-46.
- Marković V., Tomović J., Atanacković A., Kračun-Kolarević M., Ilić M., Nikolić V., Paunović M. (2014). Macroinverebrate Communities Along the Velika Morava River. *Turkish Jornal og Zoology*, 39: 210-224.

-
- Martinović-Vitanović V., Raković M., Popović N., Kalafatić V. (2013). Qualitative study of Mollusca communities in the Serbian Danube stretch (river km 1260–863.4). *Biologia*, 68 (1): 112-130.
- Matoničkin I. (1953). Utcjecaj gladi na organizam. *Priroda*, 2, Zagreb.
- Möllendorff (1874). Beitr. Fauna Bosniens.
- Moorkens E. A., Killeen I. J. (2009). Database of association with habitat and environmental variables for non-shelled slugs and bivalves of Britain and Ireland. Irish Wildlife Manuals, No. 41. National Parks and Wildlife Service, Department of the Environment, Heritage and Local Government, Dublin, Ireland.
- Mouthon J. (1996). Molluscs and biodegradable pollution in rivers: proposal for a scale of sensitivity of species. *Hydrobiologia*, 317: 221 -229.
- Morais P., Rufino M.M., Reis J., Dias E., Sousa R. (2014). Assessing the Morphological Variability of *Unio delphinus* Spengler, 1783 (BIVALVIA: UNIONIDAE) Using Geometric Morphometry. *Journal of Molluscan Studies*, 80: 17-23.
- Mršić V. (1933). Rupe u plaštu jezerske školjke (*Anodonta cygnea* L.). Zbornik radova posvećen Živojinu Đorđeviću povodom njegove 60-godišnjice, Beograd.
- Nedeljković R. (1979). Zoobentos Dunava u godinama posle izgradnje brane u Đerdapu. Kongres ekologa Jugoslavije (II). Zagreb. 1881-1888.
- Negus C. L. (1966). A quantitative study of growth and reproduction of unionid mussels in the River Thames at Reading. *Journal of Animal Ecology*, 35: 513-532.
- Neo M. L., Todd P. A. (2011). Predator-induced changes in fluted giant clam (*Tridacna squamosa*) shell morphology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397: 21-26.
- Neves R. J., Widlak J. C. (1987). Habitat ecology of juvenile freshwater mussels (Bivalvia:Unionidae) in a headwater stream in Virginia. American Malacological Union Bulletin 5 (1): 1-7.
- Neves R. J., Bogan A. E., Williams J. D., Ahlstedt S. A., Hartfield P. W. (1997). Status of aquatic mollusks in the southeastern United States: A downward spiral of diversity. Pp. 43-85. In: G.W. Benze and D.E. Collins, editors. Aquatic Fauna in Peril: The Southeastern Perspective. Special publication 1, Southeast Aquatic Research Institute. Lenz Design and Communications, Decatur, Georgia.
- Neves R. J. (1999). Conservation and commerce: management of freshwater mussel (Bivalvia:Unionoidea) resources in the United States. *Malacologia*, 41: 461-474.
-

- Novaković B. (2012). Indicative Ecological Status Assessment of the Južna Morava River Based on Aquatic Macroinvertebrates. *Water Research and Management*, 2 (4): 45-50.
- Ocokoljić M., Milijašević D., Milanović A. (2009). Klasifikacija rečnih voda Srbije po stepenu njihove zagađenosti. Zbornik radova – Geografski fakultet Univerziteta u Beogradu. Volumen LVII, Beograd.
- Ogilvie S. C., Mitchell S. F. (1995). A model of mussel filtration in a shallow New Zealand lake, with reference to eutrophication control. *Archiv fur Hydrobiologie*, 133: 471-482.
- Ortmann A. E. (1912). Notes upon the families and genera of the najades. *Annals of the Carnegie Museum*, 8: 222-365.
- Ortmann A. E. (1919). A monograph of the naiades of Pennsylvania. Part III: systematic account of the genera and species. *Memoirs of the Carnegie Museum*, 8: 1-384.
- Ortmann A. E. (1920). Correlation of shape and station in freshwater mussels (Naiades). *Proceedings of the American Philosophical Society*, 19: 269-312.
- Ortmann A. E. (1921). The anatomy of certain mussels from the upper Tennessee. *Nautilus*, 34:81-91.
- Ortmann A. E. (1923a). The anatomy and taxonomy of certain Unioninae and Anodontinae from the Gulf drainage. *Nautilus*, 36:73-84, 129-132.
- Ortmann A. E. (1923b). Notes on the anatomy and taxonomy of certain Lampsilinae from the Gulf drainage. *Nautilus*, 37: 56-60.
- Ortmann A.E. (1924). Notes on the anatomy and taxonomy of certain Lampsilinae from the Gulf drainage. *Nautilus*, 37:99-105, 137-144.
- Ostrovsky I., Gophen M., Kalikhman I. (1993). Distribution, growth, production, and ecological significance of the clam *Unio terminalis* in Lake Kinneret, Israel. *Hydrobiologia*, 271: 49-63.
- Oxnard C. E. (1978) On biologist's view of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 9: 219-241.
- Palmer M. (2000). Ordination methods for ecologists. Oklahoma State University, Botany Department (<http://ordination.okstate.edu/>).
- Parodiz J. J., Bonetto A. A (1963). Taxonomy and zoogeographic relationships of the South American naiades (Pelecypoda:Unionacea and Mutelacea). *Malacologia* 1: 179-213.

-
- Paunović M., Kalafatić V., Martinović J., Jakovčev D., Martinović-Vitanović V. (1999). Reka Vlasina - kvalitet vode, procena ugroženosti i zaštita. Zbornik radova «Zaštita voda 99», Soko Banja, 37-46.
- Paunović M., Simić V., Jakovčev-Todorović D., Stojanović B. (2005) Results on macroinvertebrate community investigation in the Danube River in the sector upstream the Iron Gate (1083-1071 km). *Archives of Biological Sciences*, 57: 57-63.
- Paunovic M., Csanyi B., Simic V., Stojanovic B., Cakic P. (2006). Distribution of *Anodonta* (*Anodonta*) *woodiana* (Rea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquatic Invasions* 1 (3): 154-160.
- Paunović M., Jakovčev-Todorović D., Simić V., Stojanović B., Cakić P. (2007a). Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429-925). *Biologia*, 62: 1-9.
- Paunović M. (2007b). Struktura zajednica makroinvertebrata kao indikator tipova tekućih voda Srbije. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 218 pp.
- Paunović M., Borković S., Pavlović S., Saičić Z., Cakić, P. (2008). Results of the 2006 Sava survey – aquatic macroinvertebrates. *Archives of Biological Sciences*, 60: 265-270.
- Pavlović P. S. (1907). Priložak za poznavanje gastropodske faune u Srbiji. Zapisi srpskog geološkog društva, 5: 1-6.
- Pavlović P. S. (1909). Razmatranja o vrsti *Helicogena lucorum* L. s poglavitim obzirom na njenu pojavu i rasprostranjenost u Staroj Srbiji i Makedoniji. Srpska Akademija nauka. Beograd, 77: 105-126.
- Pavlović P. S. (1911). Prilozi poznavanju mekušaca iz Stare Srbije i Makedonije. Glas Srpske kraljevske Akademije, 85: 51-108.
- Pavlović P. S. (1912). Mekušci iz Srbije. I. Suvozemni puževi. Srpska kraljevska akademija, Beograd, 140 p.
- Petró E. (1984). Occurrence of *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionacea) in Hungary. *Állatani közlemenyek*, 71: 181-191.
- Pfleger V. (1998). A Field Guide in Colour to Molluscs. Blitz Editions.
- Preston S. J., Roberts D. (2007). Variation in shell morphology of *Calliostoma izyphinum* (Gastropoda: Trochidae). *Journal of Molluscan Studies*, 73: 101-104.
- Pusch M., Siefert J., Walz N. (2001). Filtration and Respiration Rates of Two Unionid Species and Their Impact on the Water Quality of a Lowland River. *Ecology and*
-

- Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida (eds) Bauer G., and K. Wächtler . Vol. 145, pp 317-326 Springer Berlin Heidelberg.
- Rafinesque C. S. (1820). Monographie des coquilles bivalves fluviatiles de la Rivie`re Ohio, contenant douze genres et soixante-uit espe`ces. Annales Ge´ne´rales des Sciences Physiques a Bruxelles 5:287-322.
- Rafinesque C. S. (1831). Continuation of a monograph of the bivalve shells of the River Ohio. William Sharpless, Philadelphia.
- Rakovic M., Popovic N., Kalafatic V., Martinovic-Vitanovic V. (2013): Spreading of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in the Danube River (Serbia). *Acta zoologica bulgarica*, 65 (3): 349-357.
- Reigle N. J. (1967). An occurrence of *Anodonta* (Mollusca, Pelecypoda) in deep water. *American Midland Naturalist*, 78: 530-531.
- Reis J. (2006). Atlas dos bivalves de água doce de Portugal continental. Instituto de Conservação da Natureza, Lisboa.
- Reis M. C. J. (2010). Systematics, Biology and conservation of *Unio tumidiformis* Castro, 1885 (Unionidae: Bivalvia), in the South-West of the Iberian Peninsula. PhD thesis, University of Lisbon, 273 p.
- Reischütz A., Reischütz P.L. (2007). Rote Liste der Weichtiere (Mollusca) Österreichs. In: Zulka, K.P. (ed.), *Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs Teil 2: Kriechtiere, Lurche, Fische, Nachtfalter, Weichtiere.*, pp. 363-433. Böhlau Verlag, Wien.
- Reischutz P. L. (1998). Vorschlag fur deutsche Namen der in Osterreich nachgewiesenen Schnecken- und Muschelarten. *Nachrichtenblam der Ersten orarlberger Malakologischen Gesellschaft*, 6: 31-44.
- Renard E.,V. Bachmann M. L., Cariou Moreteau C. (2000). Morphological and molecular differentiation of invasive freshwater species of the genus *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) suggest the presence of three taxa in French rivers. *Molecular Ecology* 9:2009-2016.
- Retzius A.J. (1788). Dissertatio historico-naturalis sistens nova testaceorum genera. Quam venia ampliss. Facult. Philosophicae preaeside D. M. Andr. J. Retzio.Ad publicum examen defert Laurentius Munter Philipsson scanus. Typis Berlingianis, Lund, Sweden.
- Rohlf F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 299–316.

- Rohlf F. J., Slice D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39: 40-59.
- Rohlf F. J., Marcus L. F. (1993) A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 129-132.
- Rohlf F. J. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, 16: 197-223.
- Rohlf F. J. (2000). On the use of shape space to compare morphometric methods. *Hystrix, Italian Journal of Mammalogy* 11: 9-25.
- Rohlf F. J. (2010a). TpsDig, ver. 2.16. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F. J. (2010b). TpsRelw, ver. 1.49. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F. J. (2012). TpsUtil, ver. 1.53. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rosińska B., Chojnacki J. C., Lewandowska A., Matwiejczuk A. Samiczak A. (2008). Biometrics of swan mussels (*Anodonta cygnea*) from chosen lakes in the Pomeranian Region. *Limnological Review*, 8 (1-2): 79-84.
- Rufino M. M., Gaspar M. B., Pereira A. M., Vasconcelos P. (2006). Use of shape to distinguish *Chamelea gallina* and *Chamelea striatula* (Bivalvia: Veneridae): linear and geometric morphometric methods. *Journal of Morphology*, 267: 1433-1440.
- Rufino M. M., Vasconcelos P., Pereira F., Fernandez Tajés J., Darriba S., Mendez J., Gaspar M. B. (2012). Geographical variation in shell shape of the pod razor shell *Ensis siliqua* (Bivalvia: Pharidae). *Helgoland Marine Research*, 67: 49-58.
- Sárkány-Kiss A. (1986). *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) a new species in Romania Bivalvia: Unionacea). *Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle „Grigore Antipa“* 28: 15-17.
- Savić A. (2012). Ekološka analiza zajednice makrozoobentosa reke Nišave. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 174 p.
- Say T. (1817). Article conchology. 14 pages in W. Nicholson (editor). American edition of the British encyclopedia or dictionary of arts and sciences, comprising an accurate and popular view of the present improved state of human knowledge. Volume 2. 1st edition. Samuel A. Mitchel and Horace Ames, Philadelphia, Pennsylvania.

- Schultes F. W. (2010). Animal Base species summary: *Unio crassus*. Available at: <http://www.animalbase.uni-oettingen.de/zooweb/servlet/AnimalBase/home/species?id=1561>.
- Schwalb N. A., Pusch T. M. (2007). Horizontal and vertical movements of unionid mussels in a lowland river. *Journal of the North American Benthological Society*, 26 (2): 261-272.
- Simić V. (1993). Saprobijološka valorizacija Svrliškog i Trgoviškog Timoka na osnovu sastava makrozoobentosa. Magistarska teza, Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, Srbija.
- Simić V., Simić S. (1999). Use of the river macrozoobenthos of Serbia to formulate a biotic index. *Hydrobiologia*, 416: 51-64.
- Simić V., Simić S. (2004). Macroinvertebrates and fishes in the part of the Danube flowing through the Iron Gate National Park and possibilities of their protection under in situ and ex situ conditions. *Archives of Biological Sciences*, 56 (1-2): 53-57.
- Simić V., Simić S., Petrović A., Paunović M., Šorić V., Dimitrijević V. (2006). Biodiversity in aquatic ecosystems in Serbia, ex situ conservation (BAES exsitu). (<http://baes.pmf.kg.ac.rs>).
- Simić V., Simić S., Paunović M., Cakić P. (2007). Model of assessment of critical risk of extinction and the priorities of protection of endangered aquatic species at the national level. *Biodiversity and Conservation*, 16: 2471-2493.
- Simonović P., Paunović M., Atanacković A., Vasiljević B., Simić S., Petrović A., Simić V. (2010). Chapter 17 Water quality and assessment of the chemical and ecological status of the Danube River and its tributaries after records from the JDS2 Survey pp.295-310 In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.
- Simpson C. T. (1900). Synopsis of the naiades, or pearly freshwater mussels. Proceedings of the US National Museum 22: 501-1044.
- Simpson C. T. (1914). A descriptive catalogue of the naiades, or pearly fresh-water mussels. Parts I–III. Bryant Walker, Detroit, Michigan.

- Службени гласник Републике Србије 5/2010. Правилник о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива (Прилог 1 и 2).
- Службени гласник РС 74/2011. Правилник о параметрима еколошког и хемијског статуса површинских вода и параметрима хемијског и квантитативног статуса подземних вода.
- Soto D., Mena G. (1999). Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture*, 171: 65-81.
- Stanković S. (1933). Ljušturina zona južno-balkanskih jezera. Zbornik radova posvećen Živojinu Đorđeviću povodom njegove 60-godišnjice, Beograd.
- Starobogatov Y. I. (1970). Fauna molluskov i zoogeographicheskoe raionirovanie kontinental'nykh vodoemov zemnogo shara (Mollusk fauna and zoogeographical partitioning of continental water reservoirs of the world). Zoologicheskii Institut Nauka, Akademiya Nauk Sojus Sowjetskich Sozialistitscheskich Respublik, Leningrad, Union of Soviet Socialist Republics.
- Strayer D. (1993). Macrohabitats of freshwater mussels (Bivalvia: Unionacea) in streams of the northern Atlantic Slope. *Journal of the North American Benthological Society*, 12: 236-246.
- Strayer D. L., Ralley J. (1993). Microhabitat use by an assemblage of stream-dwelling unionaceans (Bivalvia), including two rare species of *Alasmidonta*. *Journal of the North American Benthological Society*, 12: 247-258.
- Strayer D. (1999). Use of flow refuges by unionid mussels in rivers. *Journal of the North American Benthological Society*, 18: 468–476.
- Strayer D. L., Downing J.A., Haag W.R., King T.L., Layzer J.B., Newton T.J., Nichols S.J. (2004). Changing perspectives on pearly mussels, North America's most imperiled animals. *BioScience*, 54:429-439.
- Strayer D. L. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society*, 25: 271-287.
- Strayer D. L. (2008). Freshwater mussel ecology: a multifactor approach to distribution and abundance. Freshwater Ecology Series, volume 1. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Szumowski S. C., Boyer S. L., Hornbach D. J. (2012). Genetic diversity of two common freshwater mussel species, *Lampsilis cardium* and *Quadrula pustulosa* (Bivalvia:

- Unionidae), in a large federally protected waterway (St. Croix River, Minnesota/Wisconsin, U.S.A.).
- Tadić A. (1952). O značaju slatkovodnih školjaka. *Ribarstvo Jugoslavije*, 8, Zagreb.
- Tadić A. (1953). Ogledna stanica za ribarstvo NR Srbije započela je proučavanje školjaka. *Ribarstvo Jugoslavije*, 2., Zagreb.
- Tadić A. (1956). Prekomeran ulov školjaka i njihova zaštita. *Ribarstvo Jugoslavije*, 2., Zagreb.
- Tadić A. (1957a). Način lova školjaka nanašim rekama. *Ribarstvo Jugoslavije*, 1, Zagreb.
- Tadić A. (1957b). Vrste slatkovodnih školjaka podesnih za industriju. *Ribarstvo Jugoslavije*, 3, Zagreb.
- Tadić A. (1957c). Rukovanje školjkinim ljušturama. *Ribarstvo Jugoslavije*, 9., Beograd.
- Tadić A. (1960). Najvažniji predstavnici školjaka roda *Unio* iz Save, Dunava i Kopačkog jezera. Prirodnjački muzej. Posebna izdanja. Beograd. 28: 3-46.
- Tadić A. (1971). Anodonte iz nekih voda Jugoslavije. *Glasnik Prirodnjačkog muzeja*. Beograd. 26: 25-35.
- Tadić A. (1979). Slatkovodne školjke Srbije. *Arhiv bioloških nauka*. Beograd. 28: 53-58.
- Ter Braak C. J. F. (1986). Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67: 1167-1179.
- Ter Braak C. J. F., Verdonschot P. F. (1995). Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic sciences*, 57: 255-289.
- Tomović J., Vranković J., Zorić K., Borković Mitić S., Pavlović S., Saičić Z., Paunović M. (2010). Chapter 12 Malakofauna of the Serbian stretch of the Danube River and studied tributaries (the Tisa, Sava and Velika Morava). Pp. 207-224. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). *Danube in Serbia – Joint Danube survey 2*. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.
- Tomović J., Zorić, K., Kračun, M., Marković, V., Vasiljević, B., Simić, V., Paunović M. (2012): Freshwater Mussels of the Velika Morava River. *Water Research and Management*, 2 (4): 51-55.

-
- Tomović J., Zorić K., Simić V., Kostić M., Kljajić Z., Lajtner J., Paunović M. (2013a). The first record of the Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Montenegro. *Archives of Biological Sciences*, 65 (4): 1525-1533.
- Tomović J., Simić V., Tubić B., Zorić K., Kračun M., Marković V., Paunović M. (2013b). Freshwater Mussels of the Serbian Stretch of the Tisa River. *Water Research and Management*, 3 (1): 35 - 40.
- Tomović J., Paunović M., Atanacković A., Marković V., Gačić Z., Csányi B., Simić V. (2014). Biotic Typology of the Danube River based on Distribution of Mollusc Fauna as Revealed by the Second Joint Danube Survey (2007). *Acta zoologica bulgarica*, 66 (4): 527-537.
- Trussell G. C. (2002). Evidence of counter gradient variation in the growth of an intertidal snail in response to water velocity. *Marine Ecology Progress Series*, 243: 123-131.
- Tubić B., Simić V., Zorić K., Gačić Z., Atanacković A., Csanyi B., Paunović M. (2013). Stream section types of the Danube River in Serbia according to the distribution of macroinvertebrates. *Biologia*, 68 (2): 294-302.
- Urishients V. I., Korniushev A. V. (2001). The new species in the fauna of Ukraine *Sinanodonta woodiana* (Bivalvia, Unionidae), its diagnostics and possible ways of introduction. *Vestnik zoologii*, 35: 79-84.
- Van Damme D. (2011a). *Pseudanodonta complanata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T18446A8279278. Downloaded on 12 September 2015.
- Van Damme D. (2011b). *Unio pictorum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T155543A4795613. Downloaded on 13 September 2015.
- Van der Schalie H. (1938) The naiad fauna of the Huron River, in southeastern Michigan. University of Michigan Museum of Zoology Miscellaneous Publication, 40: 1–83.
- Vanderploeg H. A., Liebig J. R., Nalepa T. F. (1995). From picoplankton to microplankton: temperature-driven filtration by the unionid bivalve *Lampsilis radiata siliquoidea* in Lake St. Clair. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 63–74.
- Vasiljević M. (2010). Chapter 8. Results of physical and chemical analysis of water and sediment in the Danube River in the Danube River and observed tributaries. Pp. 103-130. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for
-

- Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.
- Vaughn C. C. (1997) Regional patterns of mussel species distributions in North American rivers. *Ecography*, 20: 107–115.
- Vaughn C. C., Taylor C. M. (1999). Impoundments and the decline of freshwater mussels: a case study of an extinction gradient. *Conservation Biology*, 13: 912-920.
- Watters G. T. (1995). A Guide to the Freshwater Mussels of Ohio, 3rd ed., Ohio Department of Natural Resources, Division of Wildlife. 122 pp.
- Watters G. T. (1996). Hosts for the northern riffleshell (*Epioblasma torulosa rangiana*). Triennial Unionid Report, Report No.10, September 1996. 14 pp.
- Welker M., Walz N. (1998). Can mussels control the plankton in rivers? – a planktological approach applying a Lagrangian sampling strategy. *Limnology and Oceanography*, 43: 753–762.
- WFD (2000). Directive of the European Parliament and of the Council 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy. European Union, the European Parliament and Council, Luxembourg.
- Williams J. D., Warren M. L. Jr., Cummings K. S., Harris J. L., Neves R. J. (1993). Conservation status of freshwater mussels of the United States and Canada. *Fisheries* 18 (9): 6-22.
- Wu X. P. (1998). Studies on Freshwater Mollusca in MidLower Reaches of Chang Jiang River. Doctoral Dissertation. Academia Sinica, Wuhan, China, 197 pp.
- Young M., Cosgrove P., Hastie L. (2001). The extent of, and causes for, the decline of a highly threatned naiad: *Margaritifera margaritifera*. Pages 337-357 in G. Bauer, and K. Wächtler, editors. *Ecology and Evolutionary Biology of the freshwater mussels Unionoidea*. Springer Verlag, Berlin.
- Zajac K. (2005). *Anodonta cygnea*. In: Głowaciński Z., Nowacki J. (eds), *Polish Red Data Book of Animals: Invertebrates*, pp. 349-351. Krakow.
- Zajac K. (2009). *Pseudanodonta complanata*. Polish Red Data Book of Animals.
- Zajac K., Zajac T. (2009). Habitat selection of *Unio crassus*. Krakow, Poland Available at: http://www.senckenberg.de/odes/06-16/Zajac_and_Zajac_Unio-crassus-Mobility.pdf. (Accessed: 13-10-2009).
- Zelditch M. L, Swiderski D. L, Sheets H. D, Fink W. L (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier Academic, San Diego.

- Zettler M. L. (1997). Morphometrische Untersuchungen an *Unio crassus* Philipsson 1788 aus dem nordeuropäischen Vereisungsgebiet (Bivalvia: Unionidae). Malakologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden 18: 213-232.
- Zettler M. L., Jueg U., Menzel-Harloff H., Göllnitz U., Petrick S., Weber E., Seemann R. (2006). *Die Land- und Süßwassermollusken Mecklenburg-Vorpommerns*. Obotritendruck Schwerin.
- Zieritz A., Aldridge D. C. (2011). Sexual, habitat-constrained and parasite-induced dimorphism in the shell of a freshwater mussel (*Anodonta anatina*, Unionidae). *Journal of Morphology*, 272: 1365-1375.
- Živić I., Marković Z., Karaman B., Brajković M. (2001a). Uporedna analiza sekundarne produkcije makrozoobentosa tri fruškogorska potoka. Naučni skup Zasavica 2001, Sremska Mitrovica, Zbornik radova, 32-38.
- Živić I., Marković Z., Brajković M. (2001b). Macrozoobenthos in the Pusta Reka river, left tributary of the south Morava river. *Archives of Biological Sciences*, 53: 109-122.

8. Прилози

Прилог 1. Табела 1. Локалитети узорковања у оквиру истраживаних водотокова, у периоду 2001-2013. година

редни бр. локалитета	Локалитети	Река_ акумулаци ја	Географске координате	
			Е	N
1	Батина	Дунав	18.86217146260	45.84424316700
2	Ушће Драве, узводно	Дунав	18.91820963180	45.55668706890
3	Ушће Драве, низводно	Дунав	19.07451877650	45.53041728960
4	Даљ	Дунав	19.00581698630	45.49182713960
5	Бачка Паланка	Дунав	19.36393903030	45.23258311710
6	Нештин	Дунав	19.46160325180	45.23737654030
7	Ђеревих	Дунав	19.67268352180	45.22246416230
8	Ратно Острво	Дунав	20.42845177430	44.84086578840
9	Бела Стена	Дунав	20.58887204170	44.84499203160
10	Орешац	Дунав	20.81860975820	44.65850987000
12	ушће Велике Мораве, низводно	Дунав	21.12790726420	44.73404901040
13	Банатска Паланка	Дунав	21.33636301830	44.82391642670
14	Панчево, низводно	Дунав	20.64531958650	44.81693984260
15	Панчево, узводно	Дунав	20.57587286070	44.84919134920
16	Белегиш	Дунав	20.36541710190	45.02647810630
17	Стари Сланкамен	Дунав	20.26334219950	45.14510487640
18	Нови Сад, узводно	Дунав	19.80298783180	45.22167267690
19	Нови Сад, низводно	Дунав	19.88601910770	45.26037140460
20	Текија	Дунав	22.41558616680	44.68844173750
21	Голубац	Дунав	21.69434047200	44.66188843410
22	Врбица	Дунав	22.71378891030	44.60074176930
23	Ђердап II	Дунав	22.48128286340	44.43065506920
58	Радујевац	Дунав	22.68060644890	44.24283129020
11	Смедерево	Дунав	21.00769000000	44.71637000000
27	Остружница	Сава	20.32225435300	44.73584576590
28	Шабац	Сава	19.70742361450	44.76436414050
29	Ада Међица	Сава	20.37548000000	44.78568000000
30	Сремска Митровица	Сава	19.62028890640	44.96244635530
31	Ушће Босуна	Сава	19.37574595890	44.94247224470
32	Забран	Сава	20.23787483550	44.71236401920
33	Дубоко (Умка)	Сава	20.31019068910	44.68426065140
34	Макиш	Сава	20.36401374330	44.77240941000
35	узводно од ушћа	Сава	20.45007903100	44.82117642640
36	Марина (21. km)	Сава	20.28308461810	44.66089954150

Табела 1. наставак

37	Јарак	Сава	19.75647756010	44.91408707800
38	Ада Циганлија	Сава	20.43039939000	44.79724207290
40	Тиса, ушће у Дунав	Тиса	20.28506559810	45.14610735340
41	Тиса, узводно од ушћа	Тиса	20.30435036890	45.17863781520
42	Нови Бечеј	Тиса	20.13447103440	45.58948482210
43	Ада	Тиса	20.14290940330	45.79070340450
44	Кањижа	Тиса	20.09318944760	46.04930495240
45	Бечеј	Тиса	20.06422317710	45.60752841580
46	Тител	Тиса	20.31879623240	45.21199340900
24	Ћелије	Колубара	20.20576170940	44.37113320430
25	Дражевац	Колубара	20.20728880560	44.57324862090
26	Бели Брод	Колубара	20.26867652260	44.46623122780
47	ушће у Дунав	В. Морава	21.04224787170	44.70637069170
48	Марковачки Мост	В. Морава	21.15819561180	44.22709593320
49	Багрдан	В. Морава	21.19648498800	44.08423134900
50	Ћуприја	В. Морава	21.37570110670	43.94288317180
51	Варварин	В. Морава	21.37596597220	43.73293956820
52	Краљево, изнад ушћа Ибра	З. Морава	20.73607847740	43.74089039060
53	Краљево	З. Морава	20.77460441050	43.72035239850
54	Милочај	З. Морава	20.62892960060	43.77801485890
55	Гугаљски Мост	З. Морава	20.09436553600	43.85865484640
56	Гружа	акумулаци ја	20.69547906800	43.95691784000
57	Ћелије	акумулаци ја	21.17849149770	43.36759185360

Прилог 1. Табела 2. Локалитети на којима је прикупљен материјал за музејску збирку у периоду 1953.-1972.

Водени екосистем	Река/Језеро/Канал	Локалитети
РЕКЕ	Дунав	Апатин
		Сремски Карловци
		Земун
		Београд
		Смедерево
		Бела Црква
		Голубац
		ушће Медорнице
		Иваново
	Сава	176. km
		158. km
		111. km
		35.5. km
		31. km
		24. km
		Бежанија
	Тиса	Сента
	Тамиш	Панчево
		Бучево
	Западна Морава	Руђинци, низводно
		Трстеник
		Клемјак, низводно
	Млава	Петровац
		Горњак
	Нера	Бела Црква
	Бегеј	Ватин
		Зрењанин
	Језава	Смедерево
Језера	Копачко језеро	
	Бело језеро	
Канали	Галовица	
	Дунав Тиса Дунав	Влајковац, 9. km
	Велики канал	Сомбор
	Караш	

Прилог 1. Табела 3. Преглед заједнице слатководних шкољки фамилије Unionidae у прикупљеним узорцима.

Река/година	Узорци	<i>U. pictorum</i>	<i>U. tumidus</i>	<i>U. crassus</i>	<i>P. complanata</i>	<i>A. anatina</i>	<i>A. czugnea</i>	<i>S. woodiana</i>	*код
Дунав JDS1 (2001)	Ушће Драве, низводно (Богојево)	6	2					4	1
	Даљ				1	9			1
	Бачка Паланка					11		7	1
	Нови Сад, узводно		8		4	4			1
	Нови Сад, низводно							2	1
	Стари Сланкамен							7	1
	Белегиш		10			5		1	1
	Панчево, низводно	1	7						1
	Голубац	4	12			1		1	1
Дунав JDS 2 (2007)	Батина	2	7			8		12	1
	Драва, узводно	7	13		2	15		8	1
	Богојево					2			1
	Даљ							1	1
	Бачка Паланка	17	22						1
	Нови Сад, узводно	2	22			7		1	1
	Нови Сад, низводно	1	27		1	20		2	1
	Стари Сланкамен					1			1
	Белегиш		8			4			1
	Панчево, узводно	5	17			1		2	1
	Панчево, низводно	3	21			2		2	1
	Велика Морава, узводно		10					2	1
	Банатска Паланка	8	60			6		1	1
	Голубац	5	34			4		2	1
	Врбица	1	3			1			1
	Ђердап	1	3						1
	Рудујевац		2						1
Дунав 2009	Бела Стена	7	15					6	1
	Орешац	32	80		5			4	1
	Ратно острво	30	33		8			2	1
Дунав 2010	Стари Сланкамен	8			1			15	1
	Орешац	6	29		5			6	1
	Костолац		1		1			1	1
Дунав 2012	Орешац	6	1					11	1
Дунав JDS 3 (2013)	Богојево (ушће Драве)	17	19					4	1
	Бачка Паланка	5	23			1		6	1
	Стари Сланкамен	5	9					8	1
	Белегиш					1		1	1
	Панчево, узводно	8	97			4		2	1
	Панчево, низводно	2	3			4		3	1
	Велика Морава, узводно	6	10			1			1
	Велика Морава, низводно	15	42			2		7	1
	Банатска Паланка	1	4					4	1

Табела 3. наставак

	Голубац	5	16			2			1
	Текија	1	7	5		2			1
	Врбица		2						1
	Ћеревић	2	36	3		1			1
	Нештин	11	16		2			6	1
	Орешац	40	39		1	92		66	1
Тиса 2001	Узводно од ушћа у Дунав							4	2
Тиса 2007	ушће у Дунав	6	1						2
Тиса 2010	Ада	22	1						2
	Тител			1					2
Тиса 2013	Кањижа	5	5					1	2
	Ада	71	24	2		1			2
	Ушће у Дунав		15			2		1	2
В.Морава	Ушће у Дунав		27					8	3
Велика Морава 2010	Варварин			2	1			8	3
	Багрдан		1		1			6	3
	М. Мост		2	4		1		8	3
	Ћуприја			3				14	3
Западна Морава	низводно од Краљева			1					4
	Краљево			1					4
	Милочај		1	1					4
	Гугаљски Мост			2					4
Сава 2001	ушће у Дунав		12						5
Сава 2007	узводно од ушћа у Дунав		31			2		3	5
Сава 2010	Марина (21. km)	1	29	3					5
Сава 2011	С. Митровица	4	1	9				1	5
	Ушће Босута	7	4	14				3	5
	Шабац	23	3	2				5	5
	Ада Међица	1	2					10	5
	Остружница	5	15					1	5
	Остружница	30	130	3				35	5
Сава 2012	С. Митровица	18	9	47				1	5
	Ушће Босута	5	5	10		5		11	5
	Јарак	15	15	5				6	5
	Дубоко (Умка)		34	1				6	5
	Ада		1		1	5		2	5
	Макиш		4					5	5
	Забран							1	5
Сава	ушће у Дунав							6	5
Колубара	Ћелије			4					6
	Дражевац			1					6
	Бели Брод			2				2	6
Акумулације	Гружа					1	5		
	Ћелије					2	6		

Прилог 1. Табела 4. Приказ заједнице унионида и одабраних физичко-хемијских параметара на истраживаним локалитетима.

	низводно од ушћа Драве	Бачка Паланка	Нови Сад	Стари Сланкамен	Белегиш	Голубац	Батина
<i>U. pictorum</i>	6					4	2
<i>U. tumidus</i>	2		8		10	12	7
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>			4				
<i>A. anatina</i>		11	4		5	1	8
<i>S. woodiana</i>	4	7	2	7	1	1	12
*код	1	1	1	1	1	1	1
ВРК-5 (mg/l)	3.091	4.030	2.636	2.660	2.315	2.045	2.852
НРК из KMnO ₄ (mg/l)	4.900	4.890	4.315	5.320	3.415	3.064	4.725
Калцијум Ca (mg/l)	52.273	52.100	52.346	49.800	49.480	56.040	56.375
Укупна тврдоћа (mg/l)	184.691	183.900	178.892	168.790	191.480	214.500	161.333
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.121	0.219	0.222	0.159	0.090	0.129	0.099
Нитрати NO ₃ - N (mg/l)	1.830	1.510	1.732	1.475	1.123	1.006	1.708
Растворени кисеоник (mg/l)	10.227	9.850	9.177	9.720	9.362	8.582	11.438
	Узводно од ушћа Драве	низводно од ушћа Драве	Бачка Паланка	Нови Сад	Стари Сланкамен	Белегиш	Панчево
<i>U. pictorum</i>	7		17	2			4
<i>U. tumidus</i>	13		22	25		8	19
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>	2			1			
<i>A. anatina</i>	15	2		14	1	4	2
<i>S. woodiana</i>	8			2			2
*код	1	1	1	1	1	1	1
ВРК-5 (mg/l)	2.967	2.946	3.150	3.068	2.925	2.224	2.721
НРК из KMnO ₄ (mg/l)	4.683	5.100	4.880	4.363	4.950	3.588	5.489
Калцијум Ca (mg/l)	56.167	53.867	55.100	55.083	54.333	61.167	50.368
Укупна тврдоћа (mg/l)	198.667	188.133	197.100	195.875	192.750	222.958	175.316
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.094	0.087	0.125	0.160	0.153	0.091	0.114
Нитрати NO ₃ - N (mg/l)	1.825	1.685	1.588	1.539	1.542	1.892	1.228
Растворени кисеоник (mg/l)	10.708	10.893	10.180	9.513	10.292	9.475	9.995

Табела 4. наставак

	узводно од ушћа Велике Мораве	Банатска Паланка	Голубац	Врбица	Радујевац	Бела Стена	Орешац
<i>U. pictorum</i>		8	5	1		7	32
<i>U. tumidus</i>	10	60	34	3	2	15	80
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>							5
<i>A. anatina</i>		6	4	1			
<i>S. woodiana</i>	2	1	2			6	4
*код	1	1	1	1	1	1	1
ВРК-5 (mg/l)	2.150	2.143	2.408	2.073	2.440	2.333	2.540
НРК из KMnO ₄ (mg/l)	3.652	4.242	3.746	3.108	3.368	2.333	3.512
Калцијум Са (mg/l)	58.000	54.042	60.615	60.231	60.833	49.727	58.294
Укупна тврдоћа (mg/l)	223.000	189.083	211.769	209.154	217.167	171.727	198.176
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.070	0.167	0.097	0.076	0.120	0.107	0.149
Нитрати NO ₃ - N (mg/l)	1.306	1.339	0.692	0.985	1.378	1.371	0.818
Растворени кисеоник (mg/l)	9.420	8.658	9.092	8.508	9.608	9.700	10.012
	Стари Сланкамен	Орешац	Орешац	Низводно од ушћа Драве (Богојево)	Бачка Паланка	Стари Сланкамен	Панчево
<i>U. pictorum</i>	8	6	6	17	5	5	5
<i>U. tumidus</i>		29	1	19	23	9	50
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>	1	5					
<i>A. anatina</i>					1		4
<i>S. woodiana</i>	15	6	11	4	6	8	3
*код	1	1	1	1	1	1	1
ВРК-5 (mg/l)	2.367	2.250	2.086	2.025	1.722	2.218	2.091
НРК из KMnO ₄ (mg/l)	4.825	3.707	3.213	4.317	4.300	4.509	5.764
Калцијум Са (mg/l)	54.400	59.714	55.917	53.083	55.778	48.382	51.909
Укупна тврдоћа (mg/l)	194.000	214.714	194.167	182.750	204.778	171.818	185.273
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.074	0.089	0.141	0.066	0.054	0.063	0.085
Нитрати NO ₃ - N (mg/l)	1.691	0.606	0.758	0.066	1.584	1.422	1.396
Растворени кисеоник (mg/l)	10.908	8.836	9.159	10.533	9.000	10.591	8.982

Табела 4. наставак

	Узводно од ушћа Велике Мораве	Банатска Паланка	Голубац	Текија	Врбица	Ада	Тител
<i>U. pictorum</i>	6	1	5	1		22	
<i>U. tumidus</i>	10	4	16	7	2	1	
<i>U. crassus</i>				5			1
<i>P. complanata</i>							
<i>A. anatina</i>	1		2	2			
<i>S. woodiana</i>		4					
*код	1	1	1	1	1	2	2
ВРК-5 (mg/l)	1.778	1.860	2.150	1.910	1.703	1.967	2.111
НРК из KMnO ₄ (mg/l)	3.062	3.290	3.233	3.383	2.909	4.575	5.967
Калцијум Са (mg/l)	54.575	51.310	57.583	55.200	53.127	47.429	48.667
Укупна тврдоћа (mg/l)	185.500	169.800	219.833	181.400	181.091	159.857	168.000
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.106	0.128	0.105	0.115	0.102	0.098	0.161
Нитрати NO ₃ -N (mg/l)	0.896	1.268	0.617	0.710	0.709	1.105	1.107
Растворени кисеоник (mg/l)	9.449	8.990	9.258	8.766	9.782	9.017	8.600
	Ада	Кањижа	Варварин	Багрдан	С. Митровица	Шабац	Остружница
<i>U. pictorum</i>	4	5			4	23	30
<i>U. tumidus</i>	1	5		1	1	3	130
<i>U. crassus</i>	1		2		9	2	3
<i>P. complanata</i>	1		1	1			
<i>A. anatina</i>							
<i>S. woodiana</i>	1	1	8	6	1	5	35
*код	2	2	3	3	4	4	4
ВРК-5 (mg/l)	1.682	2.029	2.358	1.944	1.608	1.383	1.758
НРК из KMnO ₄ (mg/l)	4.613	5.414	4.833	4.591	2.531	2.877	2.858
Калцијум Са (mg/l)	54.286	44.429	54.917	60.636	62.769	66.231	61.917
Укупна тврдоћа (mg/l)	186.286	148.643	221.000	232.545	212.077	213.846	207.750
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.087	0.117	0.152	0.160	0.036	0.042	0.055
Нитрати NO ₃ -N (mg/l)	0.975	1.210	0.542	0.814	0.618	0.677	0.478
Растворени кисеоник (mg/l)	8.664	9.800	10.692	10.582	10.123	9.700	9.475

Табеле 4. наставак

	С. Митровица	Дубоко (Умка)
<i>U. pictorum</i>	18	
<i>U. tumidus</i>	9	34
<i>U. crassus</i>	47	1
<i>P. complanata</i>		
<i>A. anatina</i>		
<i>S. woodiana</i>	1	6
*kod	4	4
ВРК-5 (mg/l)	1.556	1.871
НРК из КМnO4 (mg/l)	2.144	2.829
Калцијум Са (mg/l)	65.583	60.143
Укупна тврдоћа (mg/l)	230.083	209.000
Амонијум јон NH ₄ -N (mg/l)	0.047	0.083
Нитрати NO ₃ -N (mg/l)	0.617	0.500
Растворени кисеоник (mg/l)	10.242	9.245

Прилог 1. Табела 5. Приказ заједнице унионида и одабраних елемената из групе тешких метала на истраживаним локалитетима

	Батина	Узводно од ушћа Драве	Бачка Паланка	Нови Сад	Стари Сланкамен	Белегиш	Панчево
<i>U. pictorum</i>	2	7	17	2			4
<i>U. tumidus</i>	7	13	22	25		8	19
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>		2		1			
<i>A. anatina</i>	8	15		14	1	4	2
<i>S. woodiana</i>	12	8		2			2
*код	1	1	1	1	1	1	1
Кадмијум растворени (µg/l)	0.20	0.25	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Олово растворено (µg/l)	2.60	2.67	3.33	2.20	1.75	1.44	2.00
Бакар растворени (µg/l)	8.00	20.00	12.67	21.13	18.25	11.88	14.50

Табела 5. наставак

	Банатска Паланка	Голубац	Врбица	Радујевац	Бела Стена	Орешац	Орешац
<i>U. pictorum</i>	8	5	1		7	32	6
<i>U. tumidus</i>	60	34	3	2	15	80	29
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>						5	5
<i>A. anatina</i>	6	4	1				
<i>S. woodiana</i>	1	2			6	4	6
*код	1	1	1	1	1	1	1
Кадмијум растворени (µg/l)	0.20	0.20	0.22	0.20	0.11	0.14	0.11
Олово растворено (µg/l)	3.25	1.20	1.20	1.00	0.58	0.81	3.86
Бакар растворени (µg/l)	10.50	10.80	12.60	8.83	22.50	8.39	7.41
	Орешац	Орешац	Низводно од ушћа Драве	Бачка Паланка	Стари Сланкамен	Панчево	Узводно од ушћа В. Мораве
<i>U. pictorum</i>	6	6	17	5	5	5	6
<i>U. tumidus</i>	29	1	19	23	9	50	10
<i>U. crassus</i>							
<i>P. complanata</i>	5						
<i>A. anatina</i>				1		4	1
<i>S. woodiana</i>	6	11	4	6	8	3	
*kod	1	1	1	1	1	1	1
Кадмијум растворени (µg/l)	0.11	0.07	0.01	0.01	0.01	0.04	0.09
Олово растворено (µg/l)	3.86	1.66	0.25	0.25	0.25	0.50	0.25
Бакар растворени (µg/l)	7.41	10.77	6.25	5.82	3.44	13.99	3.80
	Низводно од ушћа В. Мораве	Банатска Паланка	Голубац	Текија	Врбица	Ада	Кањижа
<i>U. pictorum</i>	15	1	5	1		4	5
<i>U. tumidus</i>	42	4	16	7	2	1	5
<i>U. crassus</i>				5		1	
<i>P. complanata</i>						1	
<i>A. anatina</i>	2		2	2			
<i>S. woodiana</i>	7	4				1	1
*код	1	1	1	1	1	2	2
Кадмијум растворени (µg/l)	0.12	0.02	0.06	0.06	0.05	0.02	0.05
Олово растворено (µg/l)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.31	0.25
Бакар растворени (µg/l)	3.75	2.25	6.63	7.63	6.47	2.78	3.97

Табела 5. наставак

	С. Митровица	Шабац	Остружница	С. Митровица	Дубоко (Умка)
<i>U. pictorum</i>	4	23	30	18	
<i>U. tumidus</i>	1	3	130	9	34
<i>U. crassus</i>	9	2	3	47	1
<i>P. complanata</i>					
<i>A. anatina</i>					
<i>S. woodiana</i>	1	5	35	1	6
*код	3	3	3	3	3
Кадмијум растворени (µg/l)	0.03	0.02	0.48	0.02	0.72
Олово растворено (µg/l)	0.25	0.27	0.42	0.31	0.36
Бакар растворени (µg/l)	7.08	7.73	8.87	5.45	9.72

БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



Универзитет у Крагујевцу
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Јелена Томовић
Ментор	Проф. Др Владица Симић
Наслов рада	Екологија, биодиверзитет и конзервација слатководних шкољки фамилије Unionidae у Србији
Језик публикације	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публиковања	Србија
Година публикације	2015.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Радоја Домановића 12 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Хидробиологија
Предметна одредница/кључне речи	Unionidae, екологија, стратегија конзервације, биодиверзитет

Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Важна напомена	
Извод	
Слатководне шкољке из фамилије Unionidae, представљају једну од најзначајнијих и широко распрострањених компонената водених екосистема копнених вода. Еколошка улога ове таксономске групе у воденим екосистемима је од великог значаја, с обзиром да представља битан елемент структуре и функције бентосних заједница. Разноврсност и распрострањење унионида, до сада, није адекватно проучено у Србији, како у погледу броја врста, тако и у односу на опште познавање распрострањења појединих врста и фактора који утичу на појаву таксона и густину популација. Циљеви овог истраживања били су: преглед укупног броја врста у Србији; анализа структуре и динамике популација унионида; дефинисање односа врста и најзначајнијих параметара окружења; анализа морфолошке варијабилности различитих популација, применом метода геометријске и традиционалне морфометрије и као крајњи циљ, процена ризика од изумирања акватичних врста на националном нивоу и предлог стратегије конзервације. Материјал коришћен за анализу прикупљен је при реализације више националних и међународних пројеката у периоду 2001.-2013. година. Осим савремених истраживања, анализом су обухваћени и историјски подаци, добијене на основу прегледа доступне збирке Анте Тадића, Природњачког музеја у Београду, из периода 1953.-1972. Свеобухватном анализом материјала, на простору Србије је утврђено присуство 7 врста слатководних шкољки из фамилије Unionidae, сврстаних у четири рода. Највећи диверзитет и бројност популације забележени су у доњим токовима великих равничарских река (зони потамона). У раду је дат детаљан преглед састава заједница истраживаних сливова, са приказом таксономских и еколошких карактеристика појединачних врста. Поредећи историјске податке о налазима врста и савремена истраживања, уочене су промене у величини ареала и популационој динамици појединих таксона. Значајно смањење ареала, односно потпуно повлачење са простора где је некада налажена, утврђено је за врсту <i>A. sugnea</i>, а као њени рефугијуми могу се означити лентички екосистеми какве су акумулације, језера и барско мочварна подручја у Србији. На основу историјских података утврђено је да је врста <i>U. crassus</i> некада била широко распрострањена и једна од најприсутнијих врста на целом подручју Србије до средине 70-их година прошлог века. Након тог периода, истраживањима извршеним у последњих неколико декада, уочен је пад бројности популације ове врсте и само спорадични налази на ограниченом простору. Најновија истраживања указују на позитиван популациони тренд ове врсте, при чему се нарочито издваја слив Саве. Испитивање односа присутних врста према физичко-хемијским особинама воде	

на анализираним локалитетима, показало је да су најважнији физичко-хемијски параметри: концентрација калцијума, укупна тврдоћа воде, ВРК, НРК, концентрација нитрата и амонијум јона. Резултати канонијске кореспондентне анализе указују на очекивано већу осетљивост врсте *U. crassus* на ВРК, НРК, концентрацију нитрата и амонијум јона, односно већу толеранцију врсте *A. anatina* на поменуте факторе.

Као најзначајнији параметри утицаја на заједницу слатководних шкољки, из групе тешких метала, издвајају се концентрације бакра, олова и кадмијума у води. Резултати канонијске кореспондентне анализе указују на повећану осетљивост врсте *U. crassus* на ове факторе, док је већа толеранција утврђена за *A. anatina*.

Применом метода геометријске морфометрије, анализирана је варијабилност величине и облика левог капка љуштуре различитих популација савремених узорака шкољки и анализа јединки које су припадале музејским узорцима. Геометријско морфометријском анализом рецентних узорака потврђено је постојање статистички значајних међупопулационих разлика у варијабилности величине и облика морфолошких структура. Анализом варијабилности морфолошких структура узорака из музејске збирке, применом метода геометријске морфометрије, није потврђено постојање значајних разлика у варијабилности величине и облика различитих подврста, изузев у случају *U. tumidus*.

Анализом варијабилности љуштуре на основу девет дужинских карактера, применом традиционалног морфометријског приступа, утврђено је постојање међупопулационих разлика и сличан тренд одступања као и при геометријско морфометријској анализи.

Применом модификованог модела ESHIPPO-PD, утврђен је ризик од изумирања и приоритет конзервације на локалном нивоу за анализиране врсте. За *U. crassus*, *P. complanata* и *A. cygnea* одређен је први степен приоритета заштите, односно висок ниво ризика од изумирања на националном нивоу. Умерени ризика од изумирања (II степен приоритета конзервације) оцењен је за врсте *U. pictorum* и *A. anatina*, док се за *U. tumidus* уочава да је ризик од изумирања мањи (III степен приоритета заштите). Анализом елемената модела (ES+HIPPO+PD), издвајају се фактори који највише утичу на угроженост датих врста и на тај начин омогућавају дефинисање адекватних мере конзервације на националном нивоу.

Датум прихватања теме од стране ННВ	
Датум одбране	
Чланови комисије	Проф. др Владица Симић Виши научни сарадник др Момир Пауновић Доцент др Јасна Лајтнер



Универзитет у Крагујевцу
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ
Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Jelena Tomović
Mentor	Prof. Dr Vladica Simić
Title	Ecology, Biodiversity and conservation of freshwater mussels family Unionidae in Serbia
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2015.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Hydrobiology
Key words	Unionidae, ecology, strategy of conserving,

	biodiversity
Holding data	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	
Abstract	
Freshwater mussels from the family Unionidae, represent one of the most significant and widespread components of inland water ecosystems. Ecological role of this taxonomic group within water ecosystems is of great significance being an important structural and functional element of benthic communities. The diversity and distribution of Unionidae have not been researched adequately so far in Serbia, neither the species richness, nor general distribution of individual species and factors affecting the emergence of the taxon and populations density. The aims of this research were: review of total number of species in Serbia; analysis of structure and dynamics of Unionidae populations; definition of relations between species and most significant environment parameters; morphological variability analysis of different populations applying the method of geometric and traditional morphometrics and, as the final aim, risk evaluation regarding aquatic species extinction on national level and a conservation strategy recommendation. Material used for analysis was collected during the realization of several national and international projects during the period 2001-2013. Besides contemporary researches, the analysis also includes historical data obtained from available collection of Ante Tadić from the Natural History Museum in Belgrade, period 1953-1972. A thorough material analysis in the region of Serbia led to the determination of presence of 7 fresh water mussels species from family Unionidae, classified into 3 genera. The highest diversity and population abundance were recorded in lower parts large lowland rivers (potamon zone). The detailed overview of communities composition found in the investigated river basins with a review of taxonomic and ecological traits of individual species was presented. The comparison of historical data and contemporary investigations shows there are changes in habitat size and population dynamics of individual taxons. Significant reduction in the habitat size, i.e. complete retreat from the area where it used to be found earlier was determined for the species <i>A. cygnea</i> and lentic ecosystems can be marked as their refugium, such as accumulations, lakes, marsh and swamp regions in Serbia. Based on historical data, it was determined that <i>U. crassus</i> species used to be widespread and one of the most represented species in whole region of Serbia until mid-1970's. After that period, in the investigations carried out during last several decades, the decrease in the number of this population was observed, as well as only sporadic findings in a limited area. The latest investigations indicate to a positive population trend of this species, especially in the Sava river basin. The investigation of relations among present species based on physical and chemical characteristics of water in analyzed localities has shown that the most important physical and	

chemical parameters are as follows: Calcium concentration, total water hardness, BPK, HPK, nitrate concentration and ammonium ion concentration.

The results of canonical correspondence analysis indicate to an expectedly higher sensitivity of species *U. crassus* to BPK, HPK, nitrates and ammonium ion concentration, i.e. greater tolerance of species *A. anatina* to the above listed factors.

The parameters with the most significant influence on freshwater mussels community among the group of heavy metals are the concentrations of copper, lead and cadmium in water. The results of canonical correspondence analysis indicate to an increased sensitivity of species *U. crassus* to these factors, while a greater tolerance of species *A. anatina* to these factors was recorded.

Using geometric morphometrics method, the size and shape variability of shell left valva of different contemporary shell populations samples were analyzed, as well as the specimens belonging to museum samples. Geometric morphometrics analysis of recent samples confirms the existence of statistically significant intrapopulation differences in size and shape variability of morphological structures. Morphological structures variability analysis of museum samples, applying the geometric morphometrics method, does not confirm the existence of significant differences within variability of size and shape of various varieties, except in the case of *U. tumidus*.

Using shell variability analysis based on nine linear characters, applying the traditional morphometric approach, the existence of intrapopulation differences was determined, as well as a similar trend of deviations like in geometric morphometrics analysis.

Applying the modified model ESHIPPO-PD, the risk of extinction and the priority of conservation on a local level were determined for the analyzed species. The first level of protection priority was determined for *U. crassus*, *P. comlanata* and *A. cygnea*, i.e. high extinction risk at local level. A moderate risk (the second level of conservation priority) was estimated for species *U. pictorum* and *A. anatina*, while the extinction risk is lower for *U. tumidus* (the third level of protection priority). The analysis of element included in model ES+HIPPO+PD, singles out the factor of greatest influence on endangeredness of given species and therefor enables the definition of adequate conservation measures at national level.

Accepted by Scientific Board on	
Defended on	
Commission	Prof. Vladica Simić, PhD Scientific Associate, Momir Paunović, PhD Associate Professor, Jasna Lajtner, PhD

Biotic Typology of the Danube River Based on Distribution of Mollusc Fauna as Revealed by the Second Joint Danube Survey (2007)

Jelena Tomović¹, Momir Paunović¹, Ana Atanacković¹, Vanja Marković¹, Zoran Gačić², Bela Csányi³, Vladica Simić⁴

¹Institute for Biological Research 'Siniša Stanković', University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; E-mail: simic@kg.ac.rs

²Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, 11060 Belgrade, Serbia

³Danube Research Institute, Centre for Ecological Research, MTA (Hungarian Academy Of Sciences), Göd, H-2131, Hungary

⁴Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

Abstract: The aim of this study is to present the distribution of aquatic molluscs along a 2600 km long stretch of the Danube River based on information obtained during the Second Joint Danube Survey (JDS2) in 2007. The collected data are used to validate the abiotic typology of the Danube River and to determine the extent of variations in mollusc richness and composition that can be explained by the basic habitat characteristics of the sites. The examination of the distribution of mollusc fauna reveals differences between the three main sectors of the river, the Upper, Middle and Lower Danube. The Iron Gate Section was identified as the boundary between the Middle and Lower Danube. A total of 42 aquatic mollusc species-group taxa of 14 families are detected within the study area. The Middle and Upper sectors are characterised by higher species richness and diversity as compared to the Lower Danube.

Keywords: Aquatic molluscs, river section type, Danube River

Introduction

The aim of the present study is to divide the Danube River into sectors as a framework for the identification of water bodies, the main sub-objects of the water management as stated in the requirements of the EU Water Framework Directive (WFD 2000), based on the distribution of mollusc fauna.

A series of localities was sampled along the entire length of the Danube River during the Second Joint Danube Survey (JDS 2) in 2007. The Survey provided comparable data on the composition of mollusc fauna of this complex river system. This fact illustrates the necessity for an effective sectioning (typology) that should reflect the natural state in order to define efficacious management. Namely, the WFD (2000) requires the design of specific monitoring and assessment system, which implies necessity of using specific metrics and threshold values for

each water type/ group of types, in order to assess properly the ecological status.

The main characteristics of the Danube River Basin are presented in LÁSZLÓFFY (1965), LITERÁTHY *et al.* (2002), ROBERT *et al.* (2003), and TUBIĆ *et al.* (2013). The Danube River is the second largest European river (length of 2857 km and catchments size of 801 463 km²) and more than 80 million people, residing in 19 countries, share the Danube River catchment area, making it the world's most international river basin.

Until the end of the 19th century, the Danube River possessed a natural dynamics, exhibiting a huge capacity for self-purification and constant changes of its course (TUBIĆ *et al.* 2013). The steady degradation of the Danube's environment has destroyed over 80% of its wetlands, floodplains and floodplain forests (TUBIĆ *et al.* 2013) and consequently much of its biodiversity.

A precise typology has been considered by the Water Framework Directive (WFD 2000) to be an important aspect of effective water management and monitoring of the ecological status.

Based on the catchment geology, described by several authors (LÁSZLÓFFY 1965, LITERÁTHY *et al.* 2002, ROBERT *et al.* 2003), the Danube River can be divided into three sub-regions: the Upper, Middle and Lower Danube.

The Upper Basin, which has an area of 132,000 km², extends from the source tributaries in the Black Forest (Germany) to the Devin Gate (Slovak Republic). The Middle Basin, with an area of 445,000 km², is the largest sub-region. It includes the part from the Devin Gate (Slovakia/ Austria) to the Iron Gate Dams (Serbia/ Romania). The Lower Danube Basin, with an area of 241,000 km², extends from the Iron Gate to Sulina (the Black Sea Mouth of the Danube River) and includes the very large river delta.

A division based on the river slope has generated six sections (LÁSZLÓFFY 1965). Nine distinct reaches have been characterised considering specific geomorphological landscape features, as well as anthropogenic impacts (LITERÁTHY *et al.* 2002), while ROBERT *et al.* (2003) have divided the Danube River into ten section types.

Molluscs constitute one of the largest invertebrate phyla with regard to the number of identified species and relative abundance, especially in large lowland rivers (JAKOVČEV 1987, 1988, ARAMBAŠIĆ 1994, SIMIĆ *et al.* 1997, SIMIĆ, SIMIĆ 2004, GOMES *et al.* 2004, PAUNOVIĆ *et al.* 2005, 2007a, TUBIĆ *et al.* 2013). The Gastropoda and Bivalvia are best represented in benthic systems and the species belonging to these classes have been used to characterise benthic associations (DIAZ, PUYANA 1994).

While several studies have been carried out on the benthic communities of the Danube River basin, the spatial patterns displayed by benthic communities and identification of the factors responsible for the observed patterns have not been investigated fully (SIMIĆ *et al.* 1997, MOOG 2002, SIMIĆ, SIMIĆ 2004, LORENZ, HERING 2004, PAUNOVIĆ *et al.* 2005, 2007a, TOMOVIĆ *et al.* 2010, BÓDIS *et al.* 2011, TUBIĆ *et al.* 2013).

Considering the actual stretch that was covered by the present investigation, the results of this study should contribute to a more accurate sectioning of a large lowland river such as the Danube River.

Material and Methods

Study area and sampling

Sampling was performed at 96 sites along 2600 km of the Danube River (Table 1, Fig. 1) from

13 August to 26 September 2007. Out of the total number of sites, 24 sampling points were positioned in the mouth section of the main tributaries or side arms. The samples were collected by a hand net with mesh size of 500 µm (EN 27828:1994), benthological dredge, scratching from hard substrates, and by free diving (up to a depth of 5 m).

The essential habitat characteristics of the sites: type of river channel, the level of hydromorphological degradation, the predominant substrate, habitat diversity, and the data about surface flow velocity were collected during the survey (LIŠKA *et al.* 2008).

Data analysis

The basic community characteristics (saprobic condition, current preference, preference to bottom substrate type, general river zonation and feeding types) were calculated using Asterics software (AQEM 2002). The autecological data were taken from AQEM (2002) and NESEMAN, REISCHÜTZ (2002a,b).

In order to analyse the differences between the sites and sections, frequency analyses for each species were performed. The following scale was used to evaluate constancy: $F_1=0-0.25$ – accidental species; $F_1=0.25-0.50$ – accessory taxa; $F_1=0.50-0.75$ – constant; and $F_1=0.75-1$ – euconstant.

The Correspondence Analysis (PIELOU 1984) was performed in order to analyse the mollusc distribution. The software package Statistica 6 for Windows was used for statistical processing of the data and graphic visualisation. To downweight large numbers and ensure normal distributed values, the statistical analysis was performed on transformed logarithmic individual abundance values. Adding the number 1 was performed before transformation of the abundance values on each number.

The basic abiotic typology of the Danube River served as a framework for the analyses (ROBERT *et al.* 2003). The typology of the Danube River according to ROBERT *et al.* (2003) comprises ten sections: Upper course of the Danube, Western Alpine Foothills Danube, Eastern Alpine Foothills Danube, Lower Alpine Foothills Danube, Hungarian Danube Bend, Pannonian Plain Danube, Iron Gate Danube, Western Pontic Danube, Eastern Wallachian Danube and Danube Delta. The aim was to validate this division of the river into ten section types, based on the distribution of molluscs which served as a parameter that could provide more precise sectioning of the Danube River.

Results

During our investigation, molluscs were found to be one of the principal components of the macroinver-

Table 1. Sampling sites along the Danube River studied by the Second Joint Danube Survey (JDS2), 2007

JDS2	Site	rkm	JDS2	Site	rkm
1	Upstream Iller	2600	49	Tisa (rkm 1.0)	1215
2	Kelheim – gauging station	2415	50	Downstream Tisa/ Upstream Sava (Belegis)	1200
3	Geisling Power Plant	2354	51	Sava (rkm 7.0)	1170
4	Deggendorf	2285	52	Upstream Pancevo/ Downstream Sava	1159
5	Niederalteich	2278	53	Downstream Pancevo	1151
6	Inn, rkm 4.2	2225	54	Grocka	1132
7	Jochenstein	2204	55	Upstream Velika Morava	1107
8	Upstream dam Abwinden-Asten	2120	56	Velika Morava	1103
9	Upstream dam Ybbs-Persenbeug	2061	57	Downstream Velika Morava	1097
10	Oberloiben	2008	58	Starapalanka – Ram	1077
11	Upstream dam Greifenstein	1950	59	Banatska Palanka/ Bazias	1071
12	Klosterneuburg	1942	60	Irongate Reservoir (Golubac/ Koronin)	1040
13	Wildungsmauer	1895	61	Donji Milanovac	991
14	Upstream Morava (Hainburg)	1881	62	Irongate Reservoir (Tekija/ Orsova)	954
15	Morava (rkm 0.08)	1880	63	Vrbica/ Simijan	926
16	Bratislava	1869	64	Iron Gate II	865
17	Gabčikovo Reservoir	1852	65	Upstream Timok (Rudujevac/ Gruia)	849
18	Medvedov/ Medve	1806	66	Timok (rkm 0.2)	845
19	Moson Danube Arm – end (rkm 0.1)	1794	67	Pristol/ Novo Selo Harbour	834
20	Komarno/ Komarom	1768	68	Calafat	795
21	Vah (rkm 0.8)	1766	69	Downstream Kozloduy	685
22	Iza/ Szony	1761	70	Upstream Iskar (Bajkal)	640
23	Sturovo/ Esztergom	1719	71	Iskar (rkm 0.3)	637
24	Hron (rkm 0.5)	1716	72	Downstream Iskar	629
25	Ipoly (rkm 0.7)	1708	73	Upstream Olt	606
26	Szob	1707	74	Olt (rkm 0.4)	605
27	Upstream end of Szentendre Island	1692	75	Downstream Olt	602
28	Upstream end of Szentendre Island (arm)	1692	76	Downstream Turnu-Magurele/ Nikopol	579
29	Budapest upstream	1659	77	Downstream Zimnicea/ Svishtov	550
30	Budapest (old Danube) end of S.arm	1658	78	Yantra (rkm 1.0)	537
31	Rackeve-Soroksar Danube Arm - start	1642	79	Downstream Yantra	532
32	Budapest downstream	1632	80	Upstream Ruse	500
33	Adony/ Lórév	1605	81	Russenski Lom	498
34	Rackeve-Soroksar Danube Arm - end	1586	82	Downstream Ruse/ Giurgiu	488
35	Dunafoldvar	1560	83	Upstream Arges	434
36	Paks	1533	84	Arges	432
37	Sio (rkm 1.0)	1497	85	Downstream Arges, Oltenita	429
38	Baja	1481	86	Chiciu/ Silistra	378
39	Hercegszanto	1434	87	Upstream Cernavoda	295
40	Batina	1424	88	Giurgeni	235
41	Upstream Drava	1384	89	Braila	167
42	Drava (rkm 1.4)	1379	90	Siret (rkm 1.0)	154
43	Downstream Drava (Erdut/ Bogojevo)	1367	91	Prut (rkm 1.0)	135
44	Dalj	1355	92	Reni	130
45	Ilok/ Backa Palanka	1300	93	Vilkova - Chilia arm/ Kilia arm	18
46	Upstream Novi-Sad	1262	94	Bystroe canal (to be confirmed)	8
47	Downstream Novi-Sad	1252	95	Sulina - Sulina arm	0
48	Upstream Tisa (Stari Slankamen)	1216	96	Sf. Gheorghe - Sf. Gheorghe arm	0

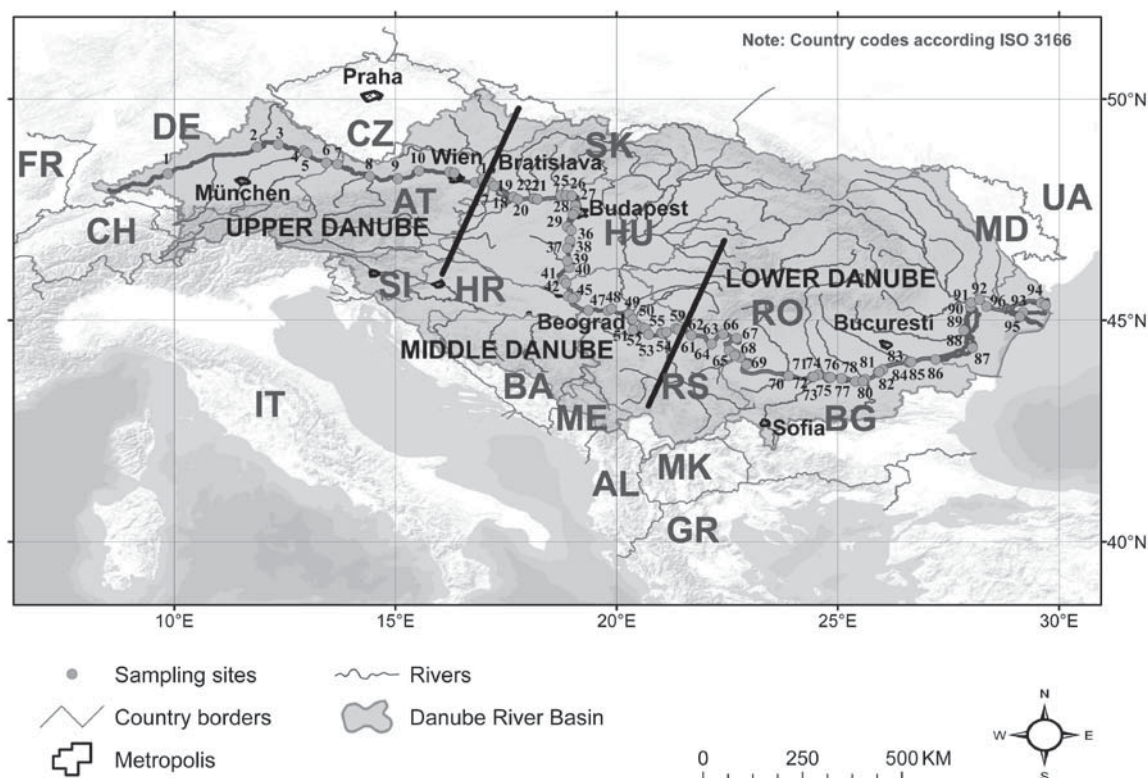


Fig. 1. Sampling location within the study area

tebrate communities with regard to species richness (19%) and relative abundance (35.7%). A total of 42 aquatic mollusc species-group taxa of 14 families were detected in the area of investigation. A total of 21 species, belonging to 10 families of gastropods and 21 taxa belonging to four families of bivalves was recorded (Table 2).

According to the ecological classification of taxa with regard to the saprobic conditions (saprobic valence) of NESEMAN, REISCHÜTZ (2002a, b), a majority of 47.25% of the registered species belonged to the beta-mesosaprobic, while 15.89% of the taxa could be characterised as an alpha-mesosaprobic group (the species tolerant of moderate organic loading). The species adapted to high organic loading (poly-saprobic) were represented by only 0.1% of the total number of taxa. The percentage participation of the species classified as sensitive to organic pollution (xeno-saprobic and oligo-saprobic taxa) was 4.1%. For the remaining species (27.7%) there were no available data about saprobic tolerance.

The majority of the recorded taxa (43.32%) were characteristic of bottom substrate types typical for large lowland rivers (the observed substrate types were pelal, psammal and argillal). The argillophilous taxa contributed to 9.69% of the total number of recorded mollusc species, while the taxa with preferences for psammal and pelal macrohabitats contrib-

uted to 16.93% and 16.7, respectively. The lithophilous species that prefer larger fraction of the substrate (>2cm) were represented by 13.1%, while taxa characterised as phytophilous participated with 2.83% of the total number of the identified species. For the remaining species there was not enough information about their microhabitat preference (AQEM 2002).

According to classification with regard to the longitudinal zonation, the greatest part of the recorded taxa (75.5%) were potamal species (characteristic of the lower stretches of the river). A smaller number (5.8%) of species was confined to the upper stretch of the river (rithral species).

In respect of the current preferences of mollusc species, the majority of the identified species was characteristic of slow-flowing streams and lentic zones (rheo- to limnophilous taxa – RL–41.81% of the total number of the recorded species). The recorded community was characterised by small numbers of species, distinguished as limno- to rheophilous taxa (Type LR–1.50%), *i.e.* taxa that prefer standing waters. A significant number of species (12%) was apparently indifferent to the prevailing current conditions, while 31.56% of the taxa could not be classified with regard to the prevailing preference due to a lack of relevant data (AQEM 2002).

Concerning the prevalent feeding types, the highest proportion of molluscs were gatherers and

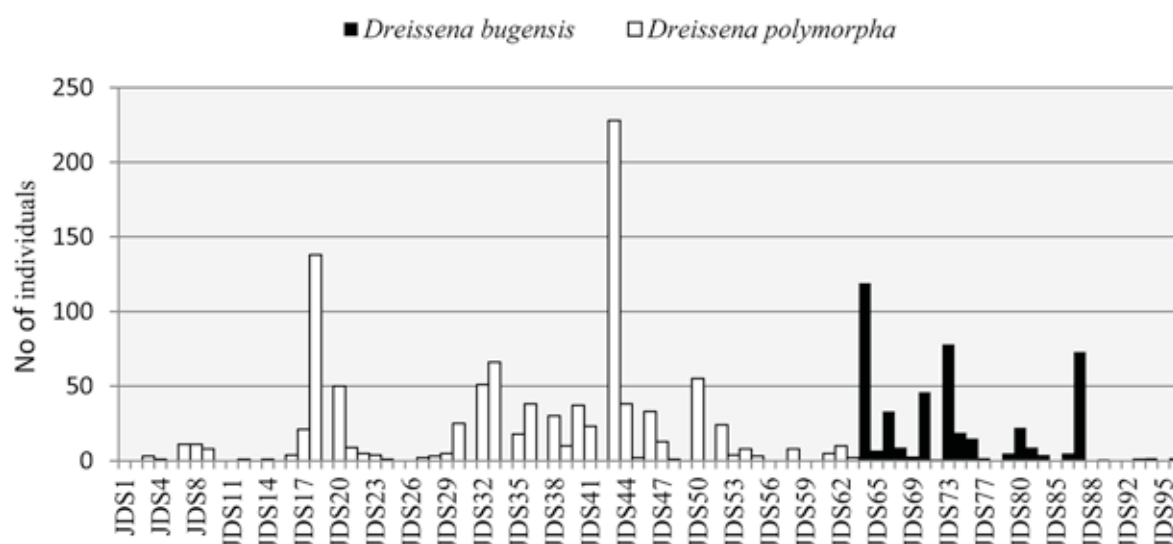


Fig. 2a. Distribution of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* along the Danube River

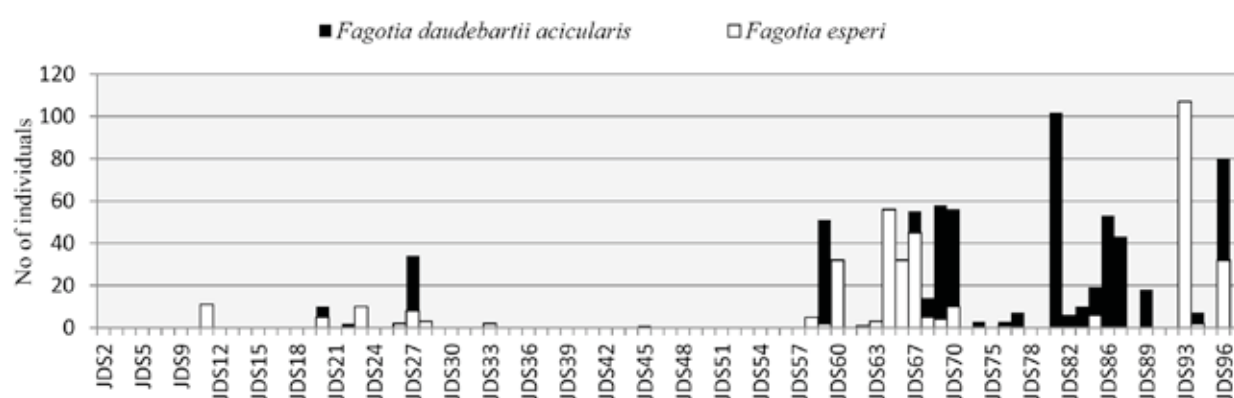


Fig. 2b. Distribution of *Fagotia daudebartii acicularis* and *Fagotia esperi* along the Danube River

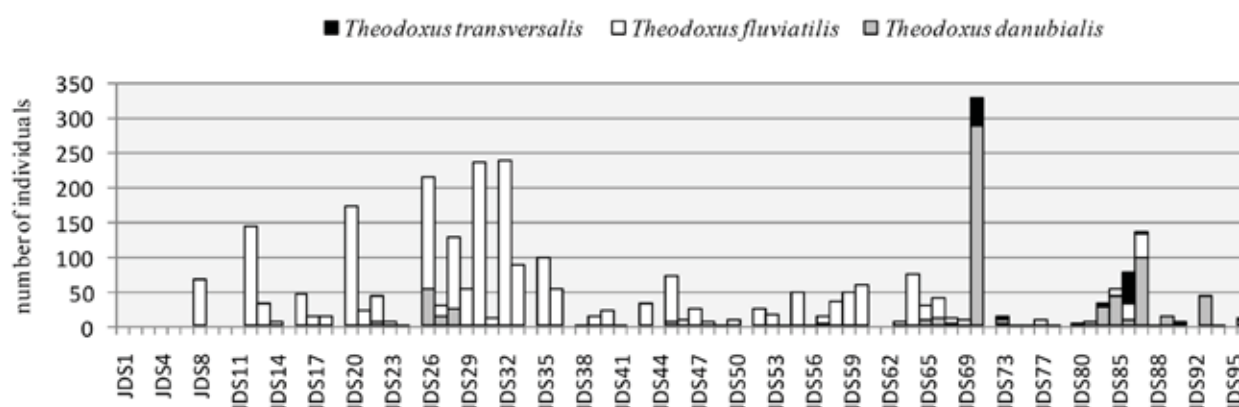


Fig. 2c. Distribution of *Theodoxus danubialis*, *Theodoxus fluviatilis* and *Theodoxus transversalis* along the Danube River

collectors (27.86%). The proportion of the active filter-feeding organisms was 22.93%, while the grazers and scrapers participated with 21.05% species in the total mollusc community. For 24.15% of detected taxa, data about the feeding types were not available.

When the Danube sections were compared in terms of taxa richness, the Hungarian Danube Bend (middle stretch) section with 30 recorded taxa, clearly stood out as significant with regard to biodiversity. Considerable taxa richness was detected in the Lower Alpine Foothills Danube section (the upper

stretch) and in the Pannonian Plain Danube section (the middle stretch), with 27 taxa each, as well as in the Western Pontic Danube section (the lower stretch), with 20 taxa; the number of taxa in the other sections was lower.

The analysis of the faunistic composition revealed that the main members of the mollusc community with regard to relative abundance were the gastropods *Lithoglyphus naticoides* (37.5%) and *Theodoxus fluviatilis* (7.5%) as well as the bivalves *Corbicula fuminea* (25.5%) and *Dreissena polymorpha* (3.3%). The percentage participation of other taxa was significantly lower.

According to the frequency analyses (occurrence of taxa in all samples/ at sampling sites), two euconstant taxa were recorded – *C. fuminea* and *L. naticoides* ($F_1=0.79-0.87$). *Unio tumidus* and *T. fluviatilis* were constant taxa ($F_1=0.54-0.65$). Four gastropods (*Fagotia esperi*, *Fagotia daudebartii acicularis*, *Theodoxus danubialis*, and *Viviparus acerosus*) and six bivalve species (*Anodonta anatina*, *Pisidium supinum*, *Sinanodonta woodiana*, *Sphaerium rivicola*, *Unio pictorum* and *Dreissena polymorpha*) could be considered as accessory ($F_1=0.25-0.48$). The frequencies of the remaining taxa were very low (F_1 ranged 0.01-0.23).

Two invasive species of Asian clams were detected in the area of investigation. The first of them, *Corbicula fluminalis*, was extremely rare and occurred only at three sampling sites: JDS 5 (2278 rkm), JDS 11 (1950 rkm) and JDS 38 (1481 rkm) from the Upper and Middle Danube, according to the classification of LÁSZLÓFFY (1965). This finding is in striking contrast with another species, *C. fuminea*, which was found in dense populations in many sections.

Unio pictorum and *U. tumidus* were the most common large mussel taxa in the investigated area. *U. pictorum* was identified already in the uppermost section of the Danube River and both species attained very high abundance in the Hungarian-Slovakian section up to the Iron Gate I Reservoir (Golubac/Koronin).

A stable population density of the invasive species *Sinanodonta woodiana* was observed between the Middle Danube and the Danube Delta, with the largest population density in the stretch from Hungary to the Drava confluence. *A. anatina* was rarely observed in the upper sections and was abundant in the stretch from the Gabčíkovo Reservoir (JDS17) to the Drava confluence.

Two introduced dreissenid species were detected in the Danube River. *D. polymorpha* was one of the most abundant species in the Upper and Middle

Danube, while the new invader *Dreissena bugensis* was detected in the section between the Iron Gate II (JDS64) and the Delta – JDS96 (Fig. 2a).

Based on our data, all species of the genus *Pisidium* (7 species) were observed to populate the section between Kelheim (JDS 2; 2415rkm) and Paks (JDS 37; 1497 rkm). Among them, only *P. amnicum* was detected in the downstream part of the river until 1132 rkm (site JDS54), with low abundance.

While occasionally occurring in the Middle Stretch, *F. daudebartii acicularis* and *F. esperi* were more frequent and abundant in the Lower Sector and the Danube Delta (Fig. 2b).

The highest population density of *T. fluviatilis* was detected in the Upper and Middle Sectors of the Danube River, according to the classification of LÁSZLÓFFY (1965). Peaks in the population density were detected in the Austrian, Slovakian and Hungarian Sections (Fig. 2c).

T. danubialis had a stable population in the Slovakian-Hungarian Danube. It was also recorded in the Serbian stretch. Downstream of the Iron Gate II it was one of the most frequent species in the Lower Stretch (Fig. 2c). *Theodoxus transversalis* (Fig. 2c) was detected in a very restricted section and only in the Lower Danube (JDS70-86).

The distribution of the sampling sites in a bi-dimensional space generated by the correspondence analyses (PIELOU 1984) is presented in Fig. 3. The Upper course of the Danube River (Section 1) contains only one locality (the source of the Danube River) and it is completely different from the other Danube Sections. In order to present more clearly the distribution of molluscs along the Danube, Section 1 was excluded from the analysis. The correspondence analysis clearly shows changes in mollusc communities along the watercourse. The sites along the Upper Danube are situated in the upper right area of the diagram. The sites that belong to the Middle Sector are grouped around zero position. The Lower Danube sites are located on the left side of the diagram (classification according to LÁSZLÓFFY 1965). The greatest dispersion was observed between the sampling sites in the Upper Danube Sector (the sampling sites at the Alpine Foothills Danube and the Lower Alpine Foothills Sections). Moreover, based on the resulting diagram, smaller differences were detected between the sites of the Middle Danube and Lower Danube Sector. In the Middle Danube, most of the species were found in the Hungarian Danube Bend and were also presented in the Pannonian Plain Danube. The positioning of the sampling sites on the graph (Fig. 3) revealed some similarities in the composition of mollusc fauna among the samples from

Table 2. List of identified molluscs taxa from the Danube River in the frames of the Second Joint Danube Survey (JDS2), 2007

GASTROPODA	
ACROLOXIDAE	
<i>Acroloxus lacustris</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Viviparus acerosus</i> (Bourguignat, 1862)
PLANORBIDAE	<i>Viviparus viviparus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Ancylus fluviatilis</i> O. F. Müller, 1774	<i>Viviparus</i> sp.
<i>Gyraulus albus</i> (O. F. Müller, 1774)	BIVALVIA
<i>Planorbis carinatus</i> O. F. Müller, 1774	CORBICULIDAE
BITHYNIIDAE	<i>Corbicula fluminalis</i> (O. F. Müller, 1774)
<i>Bithynia tentaculata</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Corbicula fluminea</i> (O. F. Müller, 1774)
VALVATIDAE	DREISSENIDAE
<i>Borysthenia naticina</i> (Menke, 1845)	<i>Dreissena bugensis</i> (Andrusov, 1897)
<i>Valvata piscinalis piscinalis</i> (O. F. Müller, 1774)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Pallas, 1771)
MELANOPSIDAE	SPHAERIIDAE
<i>Fagotia daudebartii acicularis</i> (A. Férussac, 1823)	<i>Musculium lacustre</i> (O. F. Müller, 1774)
<i>Fagotia esperi</i> (A. Férussac, 1823)	<i>Pisidium amnicum</i> (O. F. Müller, 1774)
<i>Amphimelania holandrii</i> (Pfeiffer, 1828)	<i>Pisidium casertanum</i> var. <i>ponderosum</i> (Stelfox, 1918)
HYDROBIIDAE	<i>Pisidium henslowanum</i> (Sheppard, 1823)
<i>Lithoglyphus naticoides</i> (C. Pfeiffer, 1828)	<i>Pisidium moitessierianum</i> Paladilhe, 1866
<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Gray, 1843)	<i>Pisidium nitidum</i> Jenyns, 1832
PHYSIDAE	<i>Pisidium subtruncatum</i> Malm, 1855
<i>Physa fontinalis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Pisidium supinum</i> A. Schmidt, 1851
<i>Haitia acuta</i> (Draparnaud, 1805)	<i>Sphaerium corneum</i> (Linnaeus, 1758)
LYMNAEIDAE	<i>Sphaerium rivicola</i> (Lamarck, 1818)
<i>Radix balthica</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Sphaerium solidum</i> (Normand, 1844)
NERITIDAE	UNIONIDAE
<i>Theodoxus danubialis</i> (Pfeiffer, 1828)	<i>Pseudanodonta complanata</i> (Rossmässler, 1835)
<i>Theodoxus fluviatilis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Sinanodonta woodiana</i> (Lea, 1834)
<i>Theodoxus transversalis</i> (Pfeiffer, 1828)	<i>Anodonta anatina</i> (Linnaeus, 1758)
VIVIPARIDAE	<i>Unio crassus</i> Philipsson, 1788
	<i>Unio pictorum</i> (Linnaeus, 1758)
	<i>Unio tumidus</i> Philipsson, 1788

the Lower Danube (Western Pontic Danube, Eastern Wallachian Danube) and the Danube Delta.

The Iron Gate area could be considered as an intermediary zone between the Middle and Lower Danube.

The characteristic locations of the samples on the diagram are mainly a result of both a shift in the principal components of mollusc communities (the euconstant, constant and abundant species described above) and the absence of certain species in particular stretches of the river.

In the Upper Danube, 28 taxa were identified. The stretch was typified by the presence of taxa that were not identified in other sectors, such as *Ancylus fluviatilis*, *Gyraulus albus* and *Planorbis carinatus*. The dominant taxa in the Upper Sector with regard to frequency and abundance were the invasive snail species *Potamopyrgus antipodarum* ($F=0.71$, 31.9%) and *L. naticoides* ($F=0.71$, 15.8%).

The greatest species richness (36 taxa) was observed in the Middle Sector. In terms of abundance,

the most dominant species were *L. naticoides* (43.9%) and *T. fluviatilis* (12.2%), with frequencies of occurrence of $F=0.9$ and $F=0.8$, respectively. Two characteristic species that occurred only in the Middle Sector were *Acroloxus lacustris* and *Unio crassus*. A single finding of *Unio crassus* at three sampling sites (JDS 21, 23 and 25 – the Middle Danube) is worth mentioning. According to the IUCN classification, this species is considered endangered in Europe (VAN DAMM 2011a) and is included in the European Union list of species of special community interest (92/43/EEC).

It is also worth mentioning the occasional occurrence of *Pseudanodonta complanata* in the Middle and Lower sections of the Danube River. This species is endangered in many countries and included as a vulnerable species in the IUCN Red List (VAN DAMM 2011b).

In the Lower Danube, 26 mollusc taxa were identified. Three distinct species identified in the Lower reach and found only in this sector were *Amphimelania holandrii*, *T. transversalis* and *D. bu-*

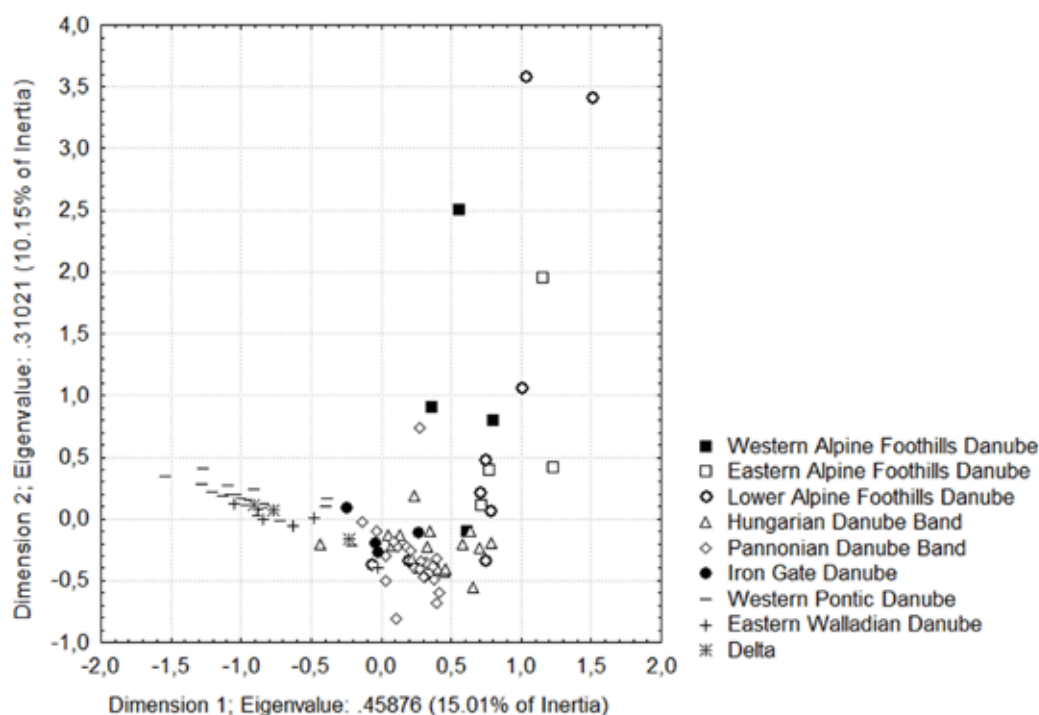


Fig 3. Correspondence analysis of mollusc community

gensis. The most dominant taxa in regard to relative abundance were *L. naticoides* (33.9%) and *C. fluminea* (43.6%), which were also observed as dominant species with respect to frequency ($F=0.94$). Aside from the most frequent mussel species in the Lower sector, a high frequency was determined for the snail *T. danubialis* ($F=0.68$).

Discussion

In general, the recorded mollusc fauna described along the Danube River is characteristic of the large potamon types of rivers in the Danube Basin (PAUNOVIĆ *et al.* 2008, 2012, TOMOVIĆ *et al.* 2012, 2013, TUBIĆ *et al.* 2013). This result confirmed that the major part of the investigated stretch is a typical potamon river type. A shift in the distribution patterns in the mollusc communities correlated highly with changes in the complex of environmental parameters, such as the dominant type of river bed and current velocity.

The Danube River belongs to the Southern Invasive Corridor (the Black Sea-Danube-Main/Danube Channel-Main-Rhine-North Sea waterway), being one of the four most important European routes of spread of invasive species (GALIL *et al.* 2007). The river is exposed to intensive colonisation by aquatic invasive species throughout the Danube Basin. The dispersal of certain non-indigenous mollusc species in the Danube River has been discussed by several authors (PAUNOVIĆ *et al.* 2006, 2007b,

SON 2007, RAKOVIĆ *et al.* 2013, BÓDIS *et al.* 2012a, b, 2014.). Based on our results, several mollusc invaders in the Danube River. These were five species of Bivalvia (*C. fluminea*, *C. fluminalis*, *D. polymorpha*, *D. bugensis* and *S. woodiana*), and one gastropod species (*P. antipodarum*). The latter was the predominant species, with huge population size, inhabiting the stretch from the Geisling Power Plant (2354 rkm) to the Gabčíkovo Reservoir (1852 rkm), with occasional occurrence up to Paks (1533 rkm).

The distribution of the mollusc fauna clearly revealed the differences between the three main stretches of the river. Based on the results of the correspondence analysis supported by the total mollusc data set, three sector types of the Danube River with one transitional zone might be distinguished. The sites that are in the transitional zone (JDS59, JDS60, JDS61, and JDS62) were not clearly positioned along one stretch. The Iron Gate Section has been identified as the boundary between the Middle and Lower Danube with respect to the hydro-morphological conditions and concentration of natural differences between the sectors situated upstream and downstream (ROBERT *et al.* 2003, TUBIĆ *et al.* 2013). The analysis of the composition of the macroinvertebrate community in the sector upstream of the Iron Gate (km 1083-1071) revealed a similar situation. In this sense, the Iron Gate was indicated as the border zone between the Middle and Lower Danube (PAUNOVIĆ

et al. 2005). We pointed out previously that the sector concerned is influenced both by the downstream sector (the Lower Danube) and the upstream zone (the Middle Danube). This case confirms the concept of a gradual longitudinal change as described by STANKOVIĆ (1960) and later discussed in the River Continuum concept by VANNOTE *et al.* (1980).

The separation into a larger number of stretches by abiotic typology (ROBERT *et al.* 2003) was not confirmed in our study. This was probably because of the ecological plasticity in a significant number of the recorded species (MOOG 2002) and the hydrological pressures that can significantly change the natural distribution of taxa and the structure of communities. The intensity of hydromorphological pressure, which was most pronounced in the Upper Sector and the Iron Gate stretch, is illustrated by the fact that along the main course of the Danube River, 69 dams were built and that 30% of the Danube's total length was affected by changes in the sediment transport, flow velocity and the groundwater regime (SOMMERWERK *et al.* 2009). According to ELLIS (1942), an impounded river exhibits silt accumulation, loss of shallow water habitats, stagnation, accumulation of pollutants and depletion of nutrients. The changes in mollusc communities caused by hydromorphological modifications are complex and range from a reduction in species numbers and their replacement with other species to exchanges of abundant taxa with non-indigenous taxa.

A considerable amount of data collected in the course of JDS2 illustrates the longitudinal distribution of mollusc taxa in the Danube River. These results form a very important part of the second detailed international Danube survey program that is aimed at describing the basic faunal composition of this river. In general, the Mollusca (Gastropoda, Bivalvia) contribute to the most characteristic taxonomic group, which inhabits the near-littoral zone of the Danube River. Mollusc taxa are one of the principal components of the macrozoobenthos communities at any of the sampling sites in the Upper, Middle and Lower Sections of the river (GRAF *et al.* 2008).

Our results are in agreement with authors who investigated the Danube River or other large European rivers in that the molluscs are one of the main groups of animal communities in large lowland rivers that could clearly demonstrate the river typology (PAUNOVIĆ *et al.* 2008, TUBIĆ *et al.* 2013).

The composition and spatial heterogeneity of the bottom substrate exerts the most important influence on the structure and composition of mollusc communities, as well as their diversity and abundance in different lentic waters (*e.g.* HARMAN 1972, BAILEY 1988, ŠPORKA

and NAGY 1998, WEIGAND, STADLER 2000, LEWIN 2006). Previous studies (HAUKIOJA, HAKALA 1974, LEWANDOWSKI, STANCZYKOWSKA 1975) and our results demonstrate that molluscs prefer free flowing stretches of rivers and that they attain high abundance in shallow waters in the littoral part, with a relatively few species capable of colonising impoundment depths.

The findings presented herein document the patterns of species composition and diversity in relation to the substrate type. The malacocoenoses in the habitats of the Middle and Upper Danube were characterised by higher species richness and diversity as compared to the sites in the Lower Danube. Considering the variation among the dominant sediment types in the particular stretches of the Danube River, this could be the main reason for the observed differences. The Upper Danube is characterised by reaches of the Alpine river type. The transitional zone between the Alpine and lowland river types is situated between the Gabčíkovo Reservoir (river km 1816) and Budapest (upstream the city, river km 1659). This sector is characterised by a preponderance of coarse (20-63 mm) and medium gravel (6.3-20 mm). The Middle Sector is distinguished by a higher proportion of habitats with fine and medium gravel (2-6.3 mm and 6.3-20 mm, respectively) and silt (<0.63 mm), while the Lower stretch is predominantly characterised by sand (0.63-2 mm) and silt (<0.63 mm), with significant amounts of organic material.

Concerning the longitudinal zonation, the majority of the recorded species is typical of the lower stretches of the river (potamal species). The recorded assemblages were characterised by a predominance of taxa that prefer slow-flowing streams and lentic zones (rheo- and limnophilous taxa), as well as by species that prefer fine-grained substrates.

It seems that the characteristics of the habitat type in the study area are one of the most important environmental factors that influence the composition of mollusc communities and their species richness in this large lowland river.

Acknowledgements: The material was collected during the Joint Danube Survey 2 and the Secretariat General of the International Commission for the Protection of the Danube River coordinated the investigation. We would like to express our gratitude to all of the participants in the JDS 2 expedition, especially Patrick Leitner and Wolfram Graf. We are thankful to Dr. Erika Bódis for her work on the taxonomical determination of the Pisidium taxa of the JDS2 samples. The preparation of the manuscript was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project No. 173025. We also express our thanks to Dr. Goran Poznanovic for his constructive comments during preparation of the manuscript, as well as to anonymous referees for constructive suggestions for improving the manuscript.

References

- AQEM 2002. Manual for the application of the AQEM system: A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Contract No: EVK1-CT1999-00027.
- ARAMBAŠIĆ M. 1994. Composition and structure of mollusc fauna of the Yugoslav part of the Danube and saprobity estimation. 124-130. In: JANKOVIĆ D., M. JOVIĆIĆ (Eds.), The Danube in Yugoslavia - Contamination, Protection and Exploitation. Publs. Institute for Biological Research 'Siniša Stanković', Institute for Development of Water Resources "Jaroslav Černi", Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, Belgrade.
- BAILEY R. C. 1988. Correlations between species richness and exposure: Freshwater molluscs and macrophytes. – *Hydrobiologia*, **162**: 183–191.
- BÓDIS E., J. NOSEK, N. OERTEL, B. TÓTH, E. HORNING and R. SOUSA 2011. Spatial distribution of bivalves in relation to environmental conditions (Middle Danube catchment, Hungary). – *Community Ecology*, **12** (2): 210–219.
- BÓDIS E., Cs. SIPKAY, B. TÓTH, N. OERTEL, J. NOSEK and E. HORNING 2012a. Spatial and temporal variation in biomass and size structure of *Corbicula fluminea* in Middle Danube catchment, Hungary. – *Biologia Bratislava*, **67**(4): 739–750.
- BÓDIS E., P. BORZA, I. POTYÓ, M. PUKY, A. WEIPERT and G. GUTI 2012b. Invasive mollusc, crustacean, fish and reptile species along the Hungarian section of the River Danube and some connected waters. – *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **58** (Supplement 1): 29–45.
- BÓDIS E., B. TÓTH and R. SOUSA 2014. Massive mortality of invasive bivalves as a potential resource subsidy for the adjacent terrestrial food web. – *Hydrobiologia*, **735**: 253–262.
- DÍAZ J. M., M. PUYANA 1994. Moluscos del Caribe Colombiano. Un catálogo ilustrado. COLCIENCIAS, Fundación Natura e INVEMAR, Bogotá. 367 pp.
- EEC 92/43 - Council Directive of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora.
- ELLIS M. M. 1942. Fresh-water impoundments. Transactions of the American Fisheries Society, 71st Annual Meeting, 80–93.
- EN 27828:1994, ISO 7828-1985. Water quality. Methods for biological testing. Methods of biological sampling: guidance on handnet sampling of aquatic benthic macroinvertebrates.
- GALIL B. S., S. NEHRING and V. E. PANOV 2007. Waterways as invasion highways – Impact of climate change and globalisation. In: NENTWIG W. (Ed.), – *Biological Invasions*. Ecological Studies Nr. 193, Springer, Berlin: 59–74.
- GOMES M. A., R. NOVELLI, I. R. ZALMON and C. M. SOUZA 2004. Malacological assemblages in sediments of eastern Brazilian continental shelf, coordinates 108 and 208 S, between Bahia and Espírito Santo State. – *Bios*, **12**: 11–24.
- GRAF W., B. CSÁNYI, B. LEITNER, M. PAUNOVIC, G. CHIRIAC, I. STUBAUER, T. OFENBÖCK and F. WAGNER 2008. Macroinvertebrates. In: LIŠKA I., F. WAGNER, J. SLOBODNIK (Eds.): Joint Danube Survey. Final Scientific Report. 41–53; ICPDR – International Commission for the Protection of the Danube River, Wien.
- HARMAN W. N. 1972. Benthic substrates: their effect on fresh-water Mollusca. – *Ecology* **53**: 271–277.
- HAUKIOJA E., T. HAKALA 1974. Vertical distribution of freshwater mussels (Pelecypoda, Unionidae) in southwestern Finland. – *Annales Zoologici Fennici*, **11**: 127–130.
- JAKOVČEV D. 1988. Zustand der Benthofauna der Flusses Sava im Region Belgrad. – 27. Arbeitstagung der IAD, SIL, Limnologische Berichte Donau 1988, 259–263, Mamaia, Rumänien.
- JAKOVČEV D. 1987. Die Saprobologische Analyse der Donau im Belgrader Gebiet Anhand der Boden Fauna. 26. Arbeitstagung der IAD, SIL, Passau, Deutschland, Wissenschaftliche Referate, 529–532.
- LÁSZLÓFFY W. 1965. Die Hydrographie der Donau. Der Fluß als Lebensraum. In: Liepolt, R. (ed.), Limnologie der Donau – Eine monographische Darstellung. II. Kapitel. Stuttgart (Schweizerbart): 16–57.
- LEWANDOWSKI K., A. STANCZYKOWSKA 1975. The occurrence and role of bivalves of the family of the family Unionidae in Mikolajskie Lake. – *Ekologia Polska*, **23**: 317–334.
- LEWIN I. 2006. The gastropod communities in the lowland rivers of agricultural areas – their biodiversity and bioindicative value in the Ciechanowska Upland, Central Poland. – *Malacologia*, **49**: 7–23.
- LIŠKA I., F. WAGNER and J. SLOBODNIK 2008. Joint Danube Survey - Final Report ICPDR - International Commission for the Protection of The Danube River: 235.
- LITERÁTHY P., V. KOLLER-KREIMEL and I. LIŠKA 2002. Joint Danube Survey. Technical Report of the International Commission for the Protection of the Danube River, 261 pp.
- LORENZ A., C. K. FELD and D. HERING 2004. Typology of streams in Germany based on benthic invertebrates: Ecoregions, zonation, geology and substrate. – *Limnologica*, **34**: 390–397.
- MOOG O. 2002. Fauna Aquatica Austriaca. Katalog zur autecologischen Erfassung. Aquatischer Organismen Österreichs. Teil II B, Metazoa, Saprobienle Valenzen.
- NESEMANN H., P. REISCHÜTZ 2002a. Mollusca: Gastropoda – part III, 19 pp. – In: Moog O. (Ed) 2002. Fauna Aquatica Austriaca, Edition 2002. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.
- NESEMANN H., P. REISCHÜTZ 2002b. Mollusca: Bivalvia – part III, 10 pp. – In: Moog O. (Ed.) 2002. Fauna Aquatica Austriaca, Edition 2002. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.
- PAUNOVIĆ M., V. SIMIĆ, D. JAKOVČEV-TODOROVIĆ and B. STOJANOVIĆ 2005. Results on macroinvertebrate community investigation in the Danube River in the sector upstream the Iron Gate (1083–1071 km). – *Archiv of Biological Sciences*, **57**: 57–63.
- PAUNOVIĆ M., B. CSÁNYI, V. SIMIĆ, B. STOJANOVIĆ and P. ČAKIĆ (2006). Distribution of *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* (Lea, 1834) in inland waters of Serbia. – *Aquatic Invasions*, **1**: 154–160.
- PAUNOVIĆ M., D. JAKOVČEV-TODOROVIĆ, V. SIMIĆ, B. STOJANOVIĆ and P. ČAKIĆ 2007a. Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429–925). – *Biologia*, **62**: 1–9.
- PAUNOVIĆ M., B. CSÁNYI, S. KNEZEVIĆ, V. SIMIĆ, D. NENADIĆ, D. JAKOVČEV-TODOROVIĆ, B. STOJANOVIĆ and P. ČAKIĆ 2007b. Distribution of Asian clams *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) and *C. fluminalis* (Müller, 1774) in Serbia. – *Aquatic Invasions* **2** (2): 99–106.

- PAUNOVIĆ M., S. BORKOVIĆ, S. PAVLOVIĆ, Z. SAIČIĆ and P. ČAKIĆ 2008. Results of the 2006 Sava survey – aquatic macroinvertebrates. – *Archive of Biological Sciences*, **60**: 265-270.
- PAUNOVIĆ M., J. TOMOVIĆ, S. KOVAČEVIĆ, K. ZORIĆ, K. ŽGANEC, V. SIMIĆ, A. ATANACKOVIĆ, V. MARKOVIĆ, M. KRAČUN, S. HUDINA, J. LAJTNER, S. GOTTSTEIN and A. LUCIĆ 2012. Macroinvertebrates of the Natural Substrate of the Sava River – Preliminary Results. – *Water Research and Management*, **2** (4): 32-39.
- PIELOU E. C. 1984. The Interpretation of Ecological Data - A Primer on Classification and Ordination. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 265 pp.
- ROBERT S., S. BIRK and M. SOMMERHÄUSER 2003. Typology of the Danube River – part 1: top-down approach. In UNDP/GEF Danube Regional Project, Activity 1.1.6, Typology of Surface Waters and Definition of Reference Conditions for the Danube River. – Final report, 51–59.
- RAKOVIĆ M., N. POPOVIĆ, V. KALAFATIĆ and V. MARTINOVIĆ-VITANOVIĆ 2013. Spreading of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the Danube River (Serbia). – *Acta Zoologica Bulgarica*, **65** (3): 349-358.
- SIMIĆ, S., A. OSTOJIĆ, V. SIMIĆ and D. JANKOVIĆ 1997. Promene u strukturi planktona i bentosa na delu toka Dunava od Velikog Gradišta do Prahova tokom letnjeg aspekta. – *Ekologija*, **32**: 65-80. (In Serbian)
- SIMIĆ, V., S. SIMIĆ (2004). Macroinvertebrates and fishes in the part of the Danube River flowing through the Iron Gate National Park and possibilities of their protection under *in situ* and *ex situ* conditions. – *Archive of Biological Sciences*, **56**: 53-57.
- SOMMERWERK, N., C. BAUMGARTNER, J. BLOESCH, T. HEIN, A. OSTOJIĆ, M. PAUNOVIĆ, M. SCHNEIDER-JAKOBY, R. SIBER and K. TOCKNER 2009. The Danube River Basin, Part 3, pp. 59-113. – In: TOCKNER K., U. UEHLINGER and C. T. ROBINSON (Eds.), Rivers of Europe. Academic Press, San Diego.
- SON O. M. 2007. Native range of the zebra mussel and quagga mussel and new data on their invasions within the Ponto-Caspian Region. – *Aquatic Invasions*, **2** (3): 174-184.
- ŠPORKA F., S. NAGY 1998. The macrozoobenthos of parapotamon-type side arms of the Danube River in Slovakia and its response to flowing conditions. – *Biologia*, **53**: 633-643.
- STANKOVIĆ S. 1962. Ekologija životinja. Univerzitet u Beogradu i Zavod za izdavanje udžbenika SR Srbije, Beograd. 432. (In Serbian)
- TUBIĆ B., V. SIMIĆ, K. ZORIĆ, Z. GAČIĆ, A. ATANACKOVIĆ, B. CSÁNYI and M. PAUNOVIĆ 2013. Stream section types of the Danube River in Serbia according to the distribution of macroinvertebrates. – *Biologia*, **68** (2): 294-302.
- TOMOVIĆ J., J. VRANKOVIĆ, K. ZORIĆ, S. BORKOVIĆ MITIĆ, S. PAVLOVIĆ, Z. SAIČIĆ and M. PAUNOVIĆ 2010. Chapter 12 Malakofauna of the Serbian stretch of the Danube River and studied tributaries (the Tisa, Sava and Velika Morava). Pp. 207-224. – In: PAUNOVIĆ M., P. SIMONOVIĆ, V. SIMIĆ and S. SIMIĆ (Eds.). Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research 'Siniša Stanković', Belgrade.
- TOMOVIĆ J., K. ZORIĆ, M., KRAČUN, V. MARKOVIĆ, B. VASILJEVIĆ, V. SIMIĆ and M. PAUNOVIĆ 2012. Freshwater Mussels of the Velika Morava River. – *Water Research and Management* **2** (4): 51-55.
- TOMOVIĆ J., V. SIMIĆ, B. TUBIĆ, K. ZORIĆ, M. KRAČUN, V. MARKOVIĆ and M. PAUNOVIĆ 2013. Freshwater mussels of the Serbian stretch of the Tisa River. – *Water Research and Management*, **3** (1): 35-40.
- VAN DAMME D. 2011a. *Unio crassus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Accessed 09 March 2014.
- VAN DAMME, D. 2011b. *Pseudanodonta complanata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **27 July 2014**.
- VANNOTE R. L., G. W. Minshall, K. W. Cummings, J. R. Sedell and C. E. Cushing 1980. The River Continuum Concept. – *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**: 130 -137.
- WEIGAND E., F. STADLER 2000. Die aquatischen Mollusken der Regelsbrunner Au. Abh. – *Zoologisch-Botanische Gesellschaft in Österreich*, **31**: 99–124.
- WFD 2000. Water Framework Directive - Directive of European Parliament and of the Council 2000/60/EC – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy.

Received: 02.05.2014

Accepted: 22.08.2014

THE FIRST RECORD OF THE CHINESE POND MUSSEL *SINANODONTA WOODIANA* (LEA, 1834) IN MONTENEGRO

JELENA TOMOVIĆ¹, KATARINA ZORIĆ¹, V. SIMIĆ², MARIJA KOSTIĆ³, Z. KLJAJIĆ³,
JASNA LAJTNER⁴ and M. PAUNOVIĆ¹

¹ Institute for Biological Research "Siniša Stanković" University of Belgrade, 11060 Belgrade, Serbia

² Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

³ Institute for Marine Biology, 85330 Kotor, Montenegro

⁴ Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

Abstract - *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834), Chinese pond mussel (Bivalvia: Unionoida: Unionidae) is one of the most invasive aquatic macroinvertebrate species found in Europe. We report the Chinese pond mussel for the first time in Montenegro, in August 2012, in Lake Šasko (Adriatic part of the Central Mediterranean subarea). One specimen of the Chinese pond mussel was observed in a habitat with a predominantly silt-clay substrate. The main pathway of species introduction was evaluated to be via fish stocking.

Key words: Alien species, biological invasions, nonindigenous species, Montenegro

INTRODUCTION

The aim of this paper is to present the first finding of the nonindigenous invasive species *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) or the Chinese pond mussel, (Bivalvia: Unionoida: Unionidae), one of the most invasive freshwater mussel species (Lowe et al., 2000), in Montenegro.

Aquatic biotopes are ecosystems most predisposed to bio-invasions. Increasing colonization by allochthonous organisms has been observed during the last few decades due to their unique features. Once these species are established in a new environment, they multiply, spread over large areas, compete with native organisms, modify local habitats and affect ecosystem functioning. In other words, they

cause biological invasions that have recently been recognized as one of the major driving forces of global change (Occhipinti-Ambrogi, 2008).

Some species of freshwater mussels, such as *S. woodiana* and *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), were found to be among the most prominent invaders of freshwater ecosystems (Paunovic et al., 2006; Zaiko, 2009; Lajtner and Crnčan, 2011).

The native distribution areas of *S. woodiana* include the basin of the Amur River, Hanka Lake, China, Hong Kong, Taiwan, Kampuchea, Thailand and Japan (Popa et al., 2007). It was recorded in Europe for the first time in Romania in 1979 (Sárkány-Kiss, 1986). The species has been subsequently observed in Hungary (Petró, 1984; Sárkány-Kiss, 1986), France

(Girardi and Ledoux, 1989), Slovakia (Košel, 1995), Czech Republic (Beran, 1997), Austria (Reischutz, 1998), Poland (Bohme, 1998), Ukraine (Юришинец and Корнюшин, 2001), Italy (Manganelli, et al., 1998; Lodde et al., 2005), Germany (Glöer and Zeitler, 2005), Serbia (Paunovic et al., 2005a), Moldova (Munjiu and Shubernetski, 2008), Spain (Pou-Rovira et al., 2009), Croatia (Lajtner and Crnčan, 2011) and most recently in the United States (Bogan et al., 2011). The presence of the Chinese pond mussel was also recorded in some Indonesian islands, the Dominican Republic and Costa Rica (Watters, 1997). The species is dispersed along lowland rivers, associated wetlands and manmade canals. Heavily modified and artificial aquatic habitats with high silting rates were found to be especially suitable for population by *S. woodiana* (Paunovic et al., 2006).

MATERIAL AND METHODS

Field research was conducted at two lakes in Montenegro (Lakes Skadar and Šasko) that are connected in a system by the Bojana River (Fig.1). Sampling was done in August 2012. Material was collected at four sampling sites (two on the Šasko and two on the Skadar Lake – Fig.1), using a benthic hand net (mesh size was 500 µm) by the kick and sweep technique (EN 27828:1994), from all of the available substrates represented by more than 5% of the total habitat area, as well as by free diving.

The bottom of all sampling sites was dominated by the silt-sand substrate, but stony substrate (small to medium size stones, from 5 to 30 cm in diameter) was found to be mosaically distributed within limited areas.

Three linear shell distances (shell length, height and width) were measured in the laboratory using a digital caliper to the nearest 0.01 mm. The coordinates of the sampling points were measured by GPS ("Garmin Etrex"), and charted by ArcView software (map 1:300,000; system WGS_1984).

For the presentation of general characteristics of the water quality of Lake Šasko, the data on physi-

cal and chemical parameters measured by Institute of Marine Biology, Kotor, were used. The oxygen concentration was measured at the same depth and similar distance from the shore as where the Chinese pond mussel was recorded.

Both investigated systems are shallow karstic lakes of tectonic origin. Lake Skadar is the largest natural lake on the Balkan Peninsula (depending on the water level, its surface area varies between 370 and 530 km²). This transboundary lake is shared between Albania and Montenegro, and was declared a Ramsar site (No. 784) and granted National Park status in Montenegro. The Bojana River (Adriatic Sea Basin) flows out of Lake Skadar and into the Adriatic Sea near the settlement of Ulcinj. The Bojana River is connected with Lake Šasko by a side channel.

Lake Šasko is about 3 km long and 1.5 km wide. Depending on the current hydrological status of the lake, the Bojana River can flow into Lake Šasko. The lake is located in the southeastern part of Montenegro (Ulcinj Field), i.e. the Adriatic part of the Central Mediterranean subarea, according to the FAO classification of geographical units (FAO, 1990-2012).

RESULTS AND DISCUSSIONS

One adult specimen of Chinese pond mussel (Fig. 3) was observed at a sampling site located on the northern shore of Lake Šasko (Fig. 2) (Site 1; N 41°58'35.71"; E 19°20'19.47"), within the habitat with a predominantly silt-clay substrate (grains are visible by eye; diameter <0.125 mm). Besides Chinese Pond mussel, abundant occurrence of the invasive mussel species *D. polymorpha* was detected at the same locality, but only in stony habitats without dense development of aquatic vegetation. Therefore, the presence of only two mussel species were registered in Lake Šasko, both nonindigenous, while three native mussel species were found in Lake Skadar: *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758), *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) and *Unio tumidus* (Philipsson, 1788).

The mussel was collected at a depth of 2.5 m, at a distance of about 40 m from the shore, outside an



Fig. 1. Sampling sites at Lakes Skadar and Šasko

area with a dense covering of aquatic macrophytes (*Myriophyllum* sp., *Najas marina* and *Potamogeton pectinatus*).

Based on the measurements on sites 1 and 2 (Site 2; southern shore of Lake Šasko: N 41°58'22.50"; E 19°19'16.67") for a four-year period (2008-2011) provided by the Institute for Marine Biology, Kotor, Šasko Lake is characterized by a range of pH values between 7.1 and 7.8, oxygen concentration between 7.8 and 11.5 ml L⁻¹ and salinity between 0.48 and 0.58 ‰. A higher variation of salinity has been observed within the area of southern shore of Lake Šasko (site 2), during the drought summer period.

The temperature regime of Lake Šasko could be described based on the results of continuous meas-

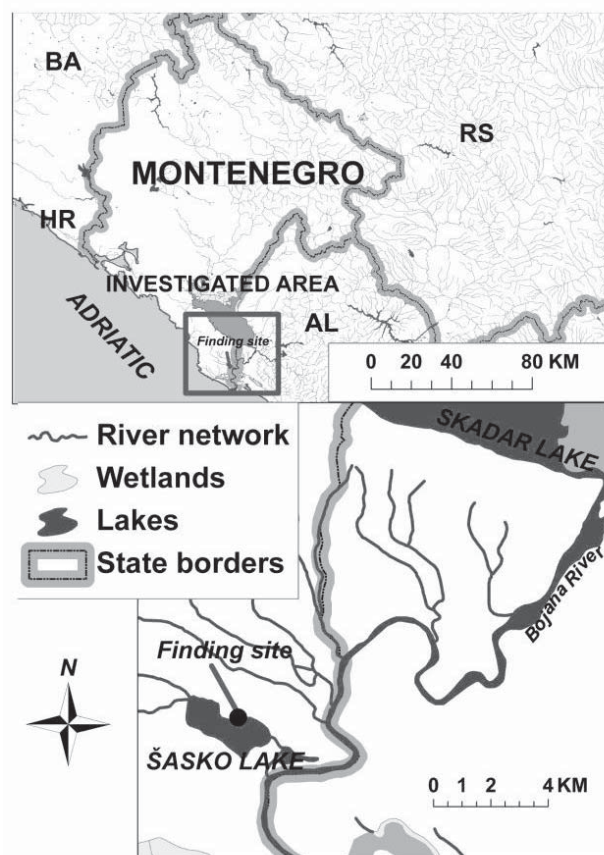


Fig. 2. Investigated area and finding site.

urement during 15 months (hourly measurement during 2003-2004) on site 1 by automatic station – Institute for Marine Biology, Kotor (all together 10,335 measurements). The mean monthly temperature and mean temperature for measuring period are presented in Fig. 4.

Thermal conditions, water flow and character of the substrate mostly determine the distribution and density of Chinese pond mussel (Kraszewski and Zdanowski, 2007). According to Demayo et al. (2012), *S. woodiana* prefers habitats with higher temperatures (the optimal thermal conditions vary within 10 and 35°C). It could be assumed that in Lake Šasko, the high water temperature with recorded mean monthly values that exceed 20°C during fifth month period could favor the establishment and fur-

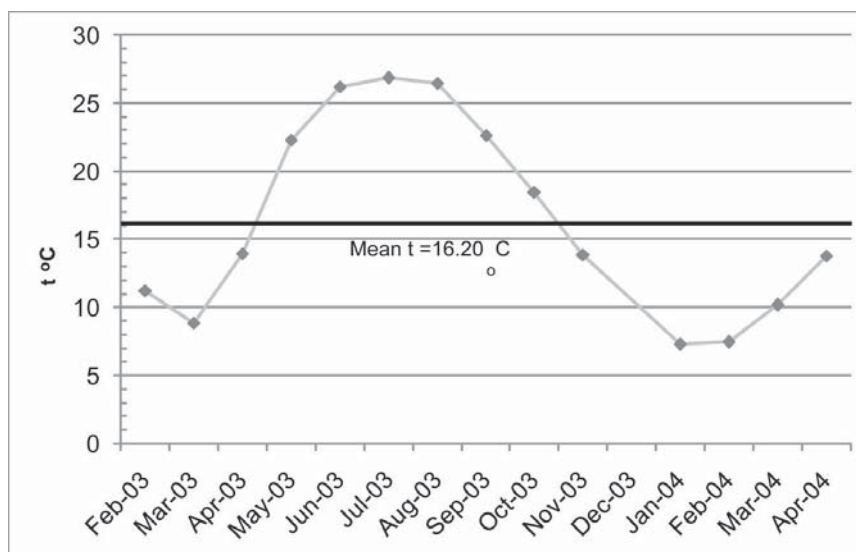


Fig. 3. The mean measured temperature for a 15-month period.

ther dispersal of thermophilous species *S. woodiana* along the lake system. Kraszewski and Zdanowski (2007) reported that Chinese pond mussels prefer sandy substrate and moderate water flow, but according to recent investigations in the southeastern Europe (Paunovic et al., 2006; Lajtner and Crnčan, 2011), the species prefers slow current conditions or absence of flow, and muddy and sand-silt dominated substrate.

Accompanying species of Chinese Pond mussel in Lake Šasko were only the Ponto-Caspian species



Fig. 4. *S. woodiana* – specimen collected from Lake Šasko.

D. polymorpha Pallas 1771 (Zebra Mussel). Zebra mussel was found to be tolerant to salinity up to 0.07 ‰ (DAISIE, 2006). Having in mind that other limiting factors were not identified for other mussel species, based on available data (no oxygen deficit recorded, favourable substrate type for other mussel species is observed, other mussel taxa were identified in the Skadar Lake, fish species known as mussel glochidia hosts in the lakes and in the Bojana River are present – *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844), *Hypophthalmichthys nobilis* (Richardson, 1845), *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), etc.) could indicate that salinity is a limiting factor for other mussel species, as well as that Chinese Pond Mussel could tolerate a higher degree of salinity in comparison to other mussel taxa characteristic for the region (*U. tumidus*, *U. pictorum* and *A. anatina* (this article and Paunovic et al., 2004, 2006; Lajtner and Crnčan, 2011)).

Considering the lack of relevant data about the distribution of Unionidae species (unionids) in the lake systems in Montenegro, further research is necessary, especially study on the dependence of the unionid communities on the physicochemical envi-

ronmental parameters. The autecological characteristics of species (salinity tolerance, temperature and life history) should be taken into the consideration, since there is no available data about local unionid populations.

This report represents the first finding of Chinese pond mussel in Montenegro and the Southern Adriatic region (the Central Mediterranean subarea, according to FAO (1990-2012) classification of geographical units). The presence of *S. woodiana* in the Adriatic Sea Basin was only reported in Lake Vrana in Croatia (in the Central Adriatic Region) by Lajtner and Crnčan (2011). It is important to emphasize that the authors presumed that findings of empty shells of this species on the lakeshore was a consequence of sport fishing. In fact, Vrana Lake is known as an important destination for sports anglers who bring bivalves from continental Croatia with them for use as bait. Malacological research carried out in the Vrana Lake during 2011 years did not confirm the presence of this species in the lake ecosystem (Lajtner et al., 2012). Based on the foregoing, it can be concluded that the finding of live specimens of *S. woodiana* in Lake Šasko was the first in this part of Europe. During our investigation, the Chinese pond mussel was not recorded in Lake Skadar.

The linear dimensions of the examined specimen were as follows: length (L) = 110 mm; height (H) = 68 mm; width across the valves (W) = 39 mm. Taking into account the known data about the growth of the shell of this species (Dudgeon and Morton, 1983; Afanasyev et al., 2001), we can estimate that the specimen is about 3-4 years old.

While *S. woodiana* has been discovered in most European countries, recently the Chinese pond mussel has become widely distributed across freshwater ecosystems in Europe and worldwide, as noted in the Introduction.

The rapid spread and mass occurrence of *S. woodiana* has been reported in several recipient areas within the Western Balkans (Paunovic et al., 2005a, 2006; Lajtner and Crnčan, 2011).

The introduction and spread of the Chinese pond mussel to Europe seems to be closely correlated with the introduction of fish from China and other Far-East countries, described as the Chinese fish complex, comprising the Grass Carp *C. idella* (Valenciennes, 1844), Prussian Carp *C. gibelio*, Silver Carp *H. molitrix* and Bighead Carp *H. nobilis*, Richardson, 1844 (Paunovic et al., 2006). These species were imported to the Western Balkans for fish stocking in the sixties and mid-seventies (Cakic and Hristic, 1987) of the 20th century, which suggests that the Chinese pond mussel was introduced at about the same time. The increasing colonization of inland waters of the Balkan Peninsula by allochthonous organisms has already been reported, and alien aquatic species have been identified among plants, vertebrates and invertebrates (reviewed in: Paunovic et al., 2004, 2005b). The inland waters of Montenegro are no exception. Therefore, an investigation of the distribution of *S. woodiana*, as well as other aquatic neobiota in Montenegro, is necessary in order to identify the distribution and assess the impact of biological invasions on native communities, and to provide effective prevention measures for mitigating the introduction and dispersal of invasive species. Since Lake Šasko is connected to Lake Skadar (via the Bojana River), monitoring the further spread of the Chinese pond mussel is of special concern in view of its potential negative influence on native biota of this, according to its native biodiversity, important ecosystem. Further spread of the Chinese pond mussel is of particular importance if we bear mind that the species is listed in the IUCN register of "100 of the World's Worst Invasive Alien Species" (IUCN, 2000). Considering the invasive characteristics of *S. woodiana*, an impact on autochthonous bivalves via competition is to be expected (Essl and Rabitch, 2002). It is known that the Chinese pond mussel is a direct competitor for food, habitat and fish hosts (Rashleigh, 1995; Fabri and Landi, 1999). Dudgeon and Morton (1983) have stated that *S. woodiana* reproduces two to three times year, unlike native species, which typically reproduce only once a year. The invasive potential of *S. woodiana* has been attributed to its ability to spread rapidly during its free-living larval stage or glochidia (Douda et al., 2012). The fact that *S. woodiana* is

so widespread implies that both juvenile and adult *S. woodiana* individuals can cope with a wide range of environmental conditions. The species is biologically more successful compared to native species, especially unionids, because of its better tolerance to increasing pollution and decreasing oxygen concentration (Sirbu et al., 2005).

Furthermore, a transitional type of ecosystem (freshwater-to-brackish lakes), due to its salinity regime and high level of human activity (pollution, hydromorphological degradation, nuisance activities, navigation, etc.) may serve as an “acclimatization chamber” for potentially euryhaline species, enabling them to colonize inland waters.

Acknowledgments -This work was financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project No. III 43002. and ON 173025. We would like to thank the Institute for Marine Biology in Kotor for the support during fieldwork. We are also grateful to Dr. Goran Poznanović for his constructive comments during preparation of the manuscript, as well as for English proofreading.

REFERENCES

- Afanasjev, S.A., Zdanowski, B. and A. Kraszewski (2001). Growth and population structure of the mussel *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia, Unionidae) in the heated Konin lakes system. *Archives of Polish Fisheries*, **9** (1), 123-131.
- Beran, L., (1997). First record of *Sinanodonta woodiana* (Mollusca, Bivalvia) in the Czech Republic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, Praha, **61** (1), 1-2.
- Bogan, A.E., Bowers-Altman, J. and M.E. Raley (2011). A new threat to conservation of North American freshwater mussels: Chinese Pond Mussel (*Sinanodonta woodiana*) in the United States. *Tentacle*, **19**, 39-40.
- Bohme, M. (1998). Ein neuer Fundort der Chinesischen Teichmuschel (*Sinanodonta woodiana*) in Mitteleuropa. *Heldia*, **2**(5-6), 166.
- Cakic, P. and Dj. Hristic (1987). The ichthyofauna of Pancevacki rit wetlands (Belgrade) with special reference to the allochthonous fish species. *Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle*, Belgrade, Serie B, Livre **42**, 103-118.
- Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe, Database (2006) <http://www.europe-aliens.org/speciesFact-sheet.do?speciesId=50169#>. Cited 05 Marth 2013.
- Demayo, G.C., Cabacaba, C. K. M. and J.M.A. Torres (2012). Shell Shapes of the Chinese Pond Mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) from Lawis Stream in Iligan City and Lake Lanao in Mindanao, Philippines, *Advances in Environmental Biology*, **6**(4), 1468-1473.
- Douda, K., Vrtilek, M., Slavik, O. and M. Reichard (2012). The role of host specificity in explaining the invasion success of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* in Europe. *Biological Invasions*, **14**, 127-137.
- Dudgeon, D. and B. Morton (1983). The population dynamics and sexual strategy of *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. *Journal of Zoology*, London, **201**, 161-183.
- Essl, F. and W. Rabitch (2002). *Neobiota in Österreich*. Umweltbundesamt, Wien, 432 pp.
- Fabbri, R. and L. Landi (1999). Nuove segnalazioni di molluschi, crostacei e pesci esotici in Emilia-Romagna e prima segnalazioni di *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774) in Italia (Mollusca Bivalvia, Crustacea Decapoda, Osteichthyes Cypriniformes). *Quaderno di Studi e Notizie di Storia Naturale della Romagna*, **12**, 9-20.
- FAO (1990-2012). FAO Major Fishing Areas, Mediterranean and Black Sea (Major Fishing Area 37). CWP Data Collection, In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 1 October 2004. [Cited 24 October 2012]. Available online at: <http://www.fao.org/fishery/area/Area37/en#NB0097>
- Girardi, H. and J.C. Ledoux (1989). Présence d *Anodonta woodiana* (Lea) en France (Mollusques, Lamellibranches, Unionidae). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, **58**, 186-290.
- Glöer, P. and M.L. Zeittler (2005). Kommentierte Artenliste der Süßwassermollusken. *Deutschlands Malakologische Abhandlungen*, **23**, 3-23.
- IUCN (2000). 100 of the World's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. <http://www.issg.org>
- Košel, V. (1995). The first record of *Anodonta woodiana* (Mollusca, Bivalvia) in Slovakia *Acta Zoologica Universitatis Comenianae, Bratislava*, **39**, 3-7.
- Kraszewski, A. and B. Zdanowski (2007). *S. woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca) a new mussel species in Poland: occurrence and habitat preferences in a heated lake system. *Poland Journal of Ecology*, **55**, 337-356.

- Lajtner, J. and P. Crnčan (2011). Distribution of the invasive bivalve *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Croatia. *Aquatic Invasions*, 6, Supplement 1, S119-S124.
- Lajtner, J., Crnčan, P. and L. Beran (2012). Freshwater malacofauna of the Vrana Lake. Division of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb.
- Lodde, A., Palmerini, E. and L. Castagnolo (2005). *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca, Bivalvia, Unionidae), a non-indigenous species wide-spread in Italy: Comparison of the biological cycle in native countries (far east) and in Italy (Modena Canals). Presented at IV International Congress of the European Malacological Societies, Naples, Italy 10-14. October 2005.
- Lowe, S.J., Browne, M. and S. Boudjelas (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species) Published by the IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG), Auckland, New Zealand.
- Manganelli, G., Bodon, M., Favilli, L., Castagnolo, L. and F. Giusti (1998). Checklist delle specie della fauna d'Italia, molluschi terrestri e d'acqua dolce. Errata ed addenda, 1. *Bolletino Malacologico*, 33(9-12), 151-156.
- Munjiu, O. and I. Shubernetski (2008). First record of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) in Moldova. *Aquatic Invasions*, 3(4), 441-442.
- Occhipinti-Ambrogi, A. (2008). Global change and marine communities: alien species and climate change. *Marine Pollution Bulletin*, 55(7-9), 342-352.
- Paunovic, M., Cakic, P., Hegedis, A., Kolarevic, J. and M. Lenhardt (2004). A report of *Eriocheir sinensis* (H. Milne Edwards, 1854) [Crustacea: Brachyura: Grapsidae] from the Serbian part of the Danube River. *Hydrobiologia*, 529, 275-277.
- Paunovic, M., Simic, V., Jakovcev-Todorovic, D. and B. Stojanovic (2005a). Results on macroinvertebrate community investigation in the Danube River in the sector upstream the Iron Gate (1083-1071 km). *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 57(1), 57-63.
- Paunovic, M., Miljanovic, B., Simic, V., Cakic, P., Djikanovic, V., Jakovcev-Todorovic, D., Stojanovic, B. and A. Veljkovic (2005b). Distribution of non-indigenous tubificid worm *Branchiura sowerbyi* (Beddard, 1892) in Serbia. *Biotechnological Equipment*, 3, 91-97.
- Paunovic, M., Csány, B., Simic, V., Stojanovic, B. and P. Cakic (2006). Distribution of *Anodonta* (*Sinanodonta*) *woodiana* (Lea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquatic Invasions*, 1, 154-160.
- Petró, E. (1984). Occurrence of *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionacea) in Hungary. *Állatani közlemények*, 71, 181-191.
- Popa, O.P., Kelemen, B.S., Murariu, D. and L.O. Popa (2007). New records of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) from Eastern Romania. *Aquatic Invasions*, 2(3), 265-267.
- Pou-Rovira, Q., Araujo, R., Boix, D., Clavero, M., Feo, C., Ordeix, M. and I. Zamora (2009). Presence of the alien Chinese pond mussel *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia, Unionidae) in the Iberian Peninsula. *Graellsia*, 65, 67-70.
- Rashleigh, B. (1995). Simulation modelling of competition between freshwater mussels for fish hosts. *Association of Southeastern Biologists Bulletin*, 42, 114.
- Reischutz, P.L. (1998). Vorschlag für deutsche Namen der in Österreich nachgewiesenen Schnecken- und Muschelarten. *Nachrichtenblatt der Ersten österreichischen Malakologischen Gesellschaft*, 6, 31-44.
- Sárkány-Kiss, A. (1986). *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) a new species in Romania (Bivalvia: Unionacea). *Travaux du Muséum d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"*, 28, 15-17.
- Sirbu, I., Sárkány-Kiss, A., Sirbu, M. and A.M. Benedek (2005). The Unionidae from Transylvania and neighbor regions. *Heldia*, 6, 183-192.
- Watters, G.T. (1997). A synthesis and review of the expanding range of the Asian freshwater mussel *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionidae). *Veliger*, 40, 152-156.
- Zaiko, A. (2009). Habitat engineering role of the invasive bivalve *Dreissena polymorpha* (PALLAS, 1771) in the boreal lagoon ecosystem. PhD Thesis, Klaipeda University, Lithuania, 135 pp.
- Юришинец, В.И. and А.В. Корнюшин (2001). Новый для фауны Украины вид двустворчатых моллюсков *Sinanodonta woodiana* (Bivalvia, Unionidae), его диагностика и возможные пути интродукции [Urishients VI and Kornushin AV (2001). The new species in the fauna of Ukraine *Sinanodonta woodiana* (Bivalvia, Unionidae), its diagnostics and possible ways of introduction] (in Russian). *Vestnik zoologii*, 35, 79-84.



Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay



Stoimir Kolarević^{a,*}, Jelena Knežević-Vukčević^a, Momir Paunović^b, Margareta Kračun^b, Božica Vasiljević^b, Jelena Tomović^b, Branka Vuković-Gačić^a, Zoran Gačić^c

^a University of Belgrade, Faculty of Biology, Chair of Microbiology, Center for Genotoxicology and Ecogenotoxicology, Studentski trg 16, 11000 Beograd, Serbia

^b University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia

^c University of Belgrade, Institute for Multidisciplinary Research, Kneza Višeslava 1, 11000 Belgrade, Serbia

HIGHLIGHTS

- We investigated genotoxic response of the mussel *S. woodiana* to environmental pollution.
- The comet assay was performed on the haemolymph directly upon sampling.
- The seasonal differences in response were recorded in mussels collected from polluted sites.
- The level of response correlated with the concentration of zinc, temperature and oxygen.
- The effect of temperature on zinc- and cadmium-induced genotoxicity was confirmed *in vitro*.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2012

Received in revised form 8 March 2013

Accepted 27 April 2013

Available online 27 May 2013

Keywords:

Comet assay

Sinanodonta woodiana

Haemocytes

Velika morava river

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the potential of the freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* for detection of genotoxic pollution of the environment. Study was performed at two sites in the Velika Morava River, from May 2010 to February 2011. The alkaline comet assay on haemocytes was used, and the olive tail moment (OTM) was chosen as a measure of DNA damage. The specimens held on acclimation under controlled laboratory conditions for 10 d were used as a control. Chemical analysis revealed the presence of phosphates and increased concentrations of zinc, copper and nickel at both sites during the entire sampling period. The values of OTM in mussels collected from the environment, significantly correlated with the concentration of zinc ($r = 0.6248$), temperature ($r = 0.7006$) and dissolved oxygen ($r = 0.7738$). Seasonal variations in genotoxic response were observed, with the highest OTM values obtained during summer months. Preliminary results of the *in vitro* study indicated the effect of water temperature on genotoxic response to zinc and cadmium in *S. woodiana* suggesting that the presence of genotoxic pollutants during months with lower temperature could be under-estimated. Obtained results indicate that *S. woodiana* could be a valuable tool for active biomonitoring of aquatic environments and emphasizes the importance of seasonal genotoxic monitoring with this organism.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aquatic ecosystems are usually exposed simultaneously to a mixture of toxic substances; however, the majority of studies investigate the genotoxic potential of certain agents in laboratory conditions while only few investigate the impact of pollutants on the environment *in situ*. The simple detection of pollutants provides only limited data on the substances present in the environment and give no information on the relationship between

contaminant exposure and biological effects in aquatic organisms; therefore a proper evaluation of the impact of pollutants by biomarkers becomes essential (Nigro et al., 2006; Jha, 2008).

Mussels are commonly used as sentinel organisms for the screening of pollution and potential environmental harm (Andral et al., 2004; Viarengo et al., 2007). Moreover, freshwater mussels are widely employed for assessing genotoxicity (Mersch and Beauvais 1997; Black and Belin 1998; De Lafontaine et al., 2000; Pavlica et al., 2001; Klobučar et al., 2003; Rocher et al., 2006; Binelli et al., 2007, 2010; Parolini et al., 2011).

The Chinese pond mussel (the Eastern Asiatic freshwater clam or swan-mussel), *Anodonta* (*Sinanodonta*) *woodiana* (Rea, 1834)

* Corresponding author. Tel./fax: +381 11 2637364.

E-mail address: stoimirk@bio.bg.ac.rs (S. Kolarević).

(Bivalvia: Unionida: Unionidae) fulfils the main criteria required for a bioindicator organism. Earlier studies have revealed the ability of *S. woodiana* to accumulate trace elements (Liu et al., 2010) and pesticides (Uno et al., 2001), as well as its potential to detect genotoxicity (Woznicki et al., 2004; Kolarević et al., 2011). In addition, this is an invasive species of freshwater mussel that has become widely distributed throughout the world and appears to be an important organism from an ecological point of view. The introduction and dispersion of this mussel from Eastern Asia (Watters, 1997) was found to be correlated with the introduction of the Carp species into Serbian waters and neighboring regions. In Serbian waters, the Velika Morava River was found to be an area suitable for the introduction and spread of *S. woodiana*. In a previous investigation of the inland waters of Serbia, many specimens of the species *S. woodiana* with a preference for fine substrate, in the range from silt to clay, were registered (Paunovic et al., 2006).

The major aim of this study was to investigate the applicability of the freshwater mussel *S. woodiana* as a bioindicator for *in situ* assessment of genotoxicity. For this purpose, we used the comet assay as this method is considered to be one of the major tools for assessing pollution-related genotoxicity in aquatic organisms (Dixon et al., 2002; Chen et al., 2007; Picado et al., 2007). The comet assay is a sensitive and rapid technique for the detection of DNA damage in individual cells, based on the migration of denatured DNA during electrophoresis.

Another aim of the current study was to investigate seasonal variations in response to genotoxic pollution by the comet assay, using haemocytes from this freshwater mussel. The impact of abiotic factors, such as the chemical and physical parameters of the sampling site/sampling month on the level of DNA strand-breaks, was examined. Among the studied parameters, special attention was paid to temperature. Like most aquatic organisms, mussels cannot regulate their body temperature in response to environmental temperature changes, and as a result most physiological and biochemical processes are temperature-dependent (Mubiana and Blust, 2007). Therefore, impact of temperature on heavy metal-induced genotoxicity was also studied *in vitro* on haemocytes of *S. woodiana*.

This study was carried out in the period from May 2010 to February 2011 on two polluted sites on the Velika Morava River, a significant right-bank tributary of the Danube River, upstream of the Iron Gate Gorge. Due to the level of pollution of the Velika Morava River, a proper reference site on the river could not be provided. Therefore, one of the aims of this study was to investigate the ability of DNA damage recovery in the haemocytes of *S. woodiana* in order to provide the reference values needed for an evaluation of the extent of DNA damage.

2. Materials and methods

2.1. Description of sampling sites

The Velika Morava is the largest river in Central Serbia, with a catchments area of 37 444 km². It is formed by the confluence of two rivers, the Južna and Zapadna Morava Rivers. The Velika Morava River flows through a region of intense agriculture (over 25 000 ha) which affects water quality due to high concentrations of nitrogen and phosphorus; in addition, large amounts of wastewaters from settlements are released into the Velika Morava River without being previously treated, leading to the debasement of water quality.

The Varvarin site is situated near the confluence of the Južna and Zapadna Morava rivers (the most upstream point on the Velika Morava River), downstream of the town of Kruševac (65 000 inhabitants) and receiving a large amount of urban wastewaters (Fig. 1).

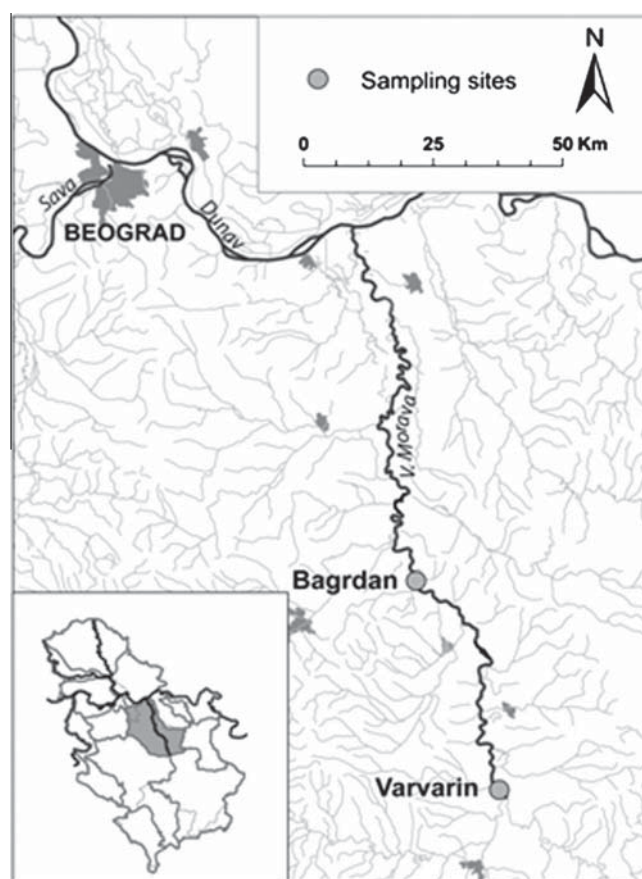


Fig. 1. Sampling sites along the Velika Morava River.

The Bagrdan site is located downstream of Jagodina (35 000 inhabitants) receiving domestic sewage through the Velika Morava tributaries Belica and Lugomir. This site is also under the impact of upstream pollution from urban wastewaters, textile, and sugar industries located in the town of Paraćin (25 000 inhabitants). The coordinates of the sampling sites were measured by GPS ("Garmin Etrex") and charted by using ArcView software (map 1:300,000, system WGS_1984).

2.2. Physical, chemical and microbiological analyses of water

Physical and chemical parameters were measured on site using a multi-parameter instrument Multi 340i (WTW, Germany). The results of analyses of the concentrations of dissolved heavy metals were provided by the Republic Hydrometeorological Service of Serbia. The target values used are provided by the International Commission for the Protection of the Danube River (ICPDR, 2002). Microbiological indicators of the sanitary status were analyzed using standard procedures according to the EU-Bathing water quality directive 2006/7/EEC (European Commission, 2006). Sanitary quality included an assessment of recent faecal pollution by monitoring faecal indicators (faecal coliforms and faecal enterococci) using a membrane filtration method. The faecal coliforms-to-enterococci ratio was used to indicate the origin of pollution. A ratio lower than 1.5 indicates pollution by soil run-off, while ratios higher than four are typical for anthropogenic pollution (Geldreich and Kenner, 1969).

2.3. Mussel collecting

The mussels with 7–15 cm shell lengths were collected at the beginning of each month in the period May 2010–February 2011.

Samples were collected with a benthological hand net (Kick and Sweep technique), benthological dredge and scuba diving, and transferred to the laboratory using cooling boxes. Mussels were not sampled in May and July at the Bagrdan site and in December at either of the sites. High water level at the Bagrdan site in May made sampling impossible, while in July and December extreme temperatures caused withdrawal of mussels to the deeper and inaccessible waters.

2.4. *In situ* assessment of genotoxicity

The mussels collected from the polluted sites were tested immediately after sampling in order to measure the DNA damage response to environmental stress. Haemolymph was collected from 3 to 10 specimens brought to the laboratory and then subjected to the comet assay. For evaluation of genotoxicity, specimens held on acclimation for 10 d were used as the control.

2.5. DNA damage recovery test (acclimation)

At the Varvarin site in August, mussels were available in the quantities required for DNA damage recovery testing. About 30 collected specimens were kept under controlled aquarium conditions (four glass aquaria 100 L each) in dechlorinated, well-aerated water (conc. $O_2 > 8$ mg/L, O_2 saturation $> 90\%$, $t = 22$ °C, pH 7.2–8.1), with a bottom environment composed of fine sand that had been washed with clean water to eliminate debris and heat-treated (4 h, 250 °C) before the set-up of the aquarium system, in order to eliminate potential disease vectors. The animals were fed every third day with the dry leaves of string nettle (*Urtica dioica*) that were macerated and minced with a pestle and mortar. The haemolymph was sampled after 2, 5, 10 and 30 d of acclimation. Each time, samples were collected from six different specimens, and subjected to the comet assay. The mussels were further maintained under laboratory conditions (same as above) for 20 months. Water was changed monthly.

2.6. *In vitro* assessment of the impact of temperature on cadmium- and zinc-induced genotoxicity

For *in vitro* studies, we used mussels collected from the Velika Morava River during 2010. Specimens were held in a controlled aquarium conditions until March 2012. To minimize inter-individual variability, haemolymph sampled (as described later) from specimens was immediately pooled together in a test tube and mixed with the same volume of Hank's buffered saline solution with addition of 4 mM EDTA, until the necessary volume for the experiment was obtained (24 mL). The haemolymph pool was divided into 24 microtubes (1 mL per each) and centrifuged for 10 min at 2000 rpm. The supernatant was discarded and the pellets were resuspended in 1 mL of 1xPBS containing increasing concentrations of $CdCl_2$ (4, 40 and 100 μ M) and $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (83 μ M and 834 μ M). Haemocytes resuspended in 1xPBS served as control. The temperatures were chosen to simulate the environmental water temperatures in February (4 °C) and August (24 °C). After treatment, the microtubes were centrifuged for 10 min at 2000 rpm. The supernatant was discarded and the pellets were resuspended in 1xPBS, centrifuged for 10 min at 2000 rpm and subjected to standard alkaline comet procedure.

2.7. Haemolymph collection

A mussel was placed on soft tissue paper; the blade of a scalpel was inserted between the mussel's shells and gently opened about 1 cm to allow the paper to drain all the water caught in the mussel's shell. The haemolymph was collected from the posterior

adductor muscle of 3–5 specimens using a hypodermic syringe, to obtain at least 1 mL of sample. Haemocyte viability was determined by 0.4% Trypan blue dye; cells dyed blue were considered non-viable. The haemolymph samples were centrifuged for 10 min at 2000 rpm and subjected to standard alkaline comet procedure.

2.8. Comet assay

The alkaline comet assay procedure used was as described by Singh et al. (1988) and performed under yellow light. Microscopic slides were precoated with 1% normal melting point (NMP) agarose and air dried for 24 h. To form a second, supportive layer, 80 μ L of 1% NMP agarose was gently placed on the top of the 1% NMP layer and spread over the slide using a coverslip. The slide was placed on ice for 5 min to allow the agarose to set. After the coverslips were removed, 30 μ L of the haemolymph suspension was gently mixed with 70 μ L of 1% low melting point (37 °C) agarose and pipetted onto the supportive layer of 1% NMP agarose and covered with a coverslip. After 5 min on ice, the coverslips were removed and the slides were lowered into freshly made cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1.5% Triton X-100, pH = 10) for 1 h. To allow DNA unwinding, the slides were put into an electrophoresis chamber containing cold alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH = 13) for 20 min. Electrophoresis was performed by setting the power supply to 25 V and adjusting the current to 300 mA for 20 min. After electrophoresis, the slides were placed in a freshly made neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH = 7.5) for 15 min. Staining was performed with 20 μ L per slide of ethidium bromide (2 μ g/mL). The slides were examined with a fluorescence microscope (Leica, DMLS, Austria) at 400 $\times$ magnification with an excitation filter of 510–560 nm and a barrier filter of 590 nm. Microscopic images of the comets were scored using Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). From each sample, 1–3 slides were prepared and the images of 50 cells from each slide were scored. Among the parameters available for analyses, we chose the olive tail moment (OTM). A major advantage when using the OTM as an index of DNA damage is that both the amount of the damaged DNA and the distance of the genetic material migration in the tail are represented by a single number (Cok et al., 2011; Rosenberger et al., 2011).

2.9. Statistical analyses

Statistical analysis of the results obtained in the experiment was carried out using Statistica 6.0 Software (StatSoft, Inc., 2001). Kolmogorov–Smirnov test for normality of distribution was used prior to statistical analysis. Considering that the data were not in line with the requirements for the application of parametric tests, differences between samples were tested using Mann–Whitney U test. Pearson's correlation analyses were performed with a significance level of $p < 0.05$. OTM values are expressed as MEAN $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Physical, chemical and microbiological analyses of water

The results of physical, chemical and microbiological analyses of the water at the Varvarin and Bagrdan sites are shown in Table 1. At both sites, the water reaction was mildly alkaline during the sampling months.

At the Varvarin site, the highest concentrations of nitrates and phosphates were recorded in June. The highest concentrations of zinc (6-fold higher than target value), lead (almost 2-fold higher than target value) and nickel (6-fold higher than target value) were

Table 1
Physical, chemical and microbiological parameters measured in water at the Varvarin and Bagrdan site.

Site	Parameter	Target value	Varvarin					Bagrdan					January	February		
			June	August	September	October	November	January	February	June	August	September			October	November
t (C°)	mg/L	/	24.1	24.8	18.8	13.2	10	11.9	1.8	25.9	27	20.5	/	10.2	11	2
	%	6	9.7	10.1	6.94	7.48	10.8	9.11	10.6	10	7.9	8.55	/	9.8	7.79	10.4
pH		/	97	118	74.5	71.6	95	78.6	76.2	104	96	95.6	/	87	69.9	74.8
		6.8–8.5	7.79	8.20	8.00	8.50	9.00	7.90	8.80	8.28	8.50	8.20	/	8.90	8.00	8.30
NH ₄ ⁺	mg/L	0.3	0.03	0.05	0.08	0.22	0.08	0.18	0.12	0.50	0.03	0.08	/	0.38	0.17	0.12
NO ₃ -	mg/L	3	12.1	2.7	1.2	1.3	3.4	3.0	3.7	6.6	1.8	11.1	/	5.9	12.3	3.0
PO ₄ 3-	mg/L	0.1	50.0	0.8	44.1	42.9	0.3	3.2	2.5	48.7	1.0	13.9	/	0.4	2.9	1.0
Fe	mg/L	0.3	0.13	0.16	0.1	0.17	0.49	0.09	0.13	0.15	0.07	0.21	/	0.06	0.07	/
Zn	µg/L	5	19.9	31.7	11.5	12	24.8	17.5	/	46	18.1	44.7	/	10.8	12.8	/
Cu	µg/L	2	10.9	11	13.8	13.5	9.5	24.7	/	9.7	7.6	24.2	/	7.3	16.6	/
Cr	µg/L	2	1.5	1.1	1.1	0.6	0.8	0.5	/	0.7	0.7	1	/	1.2	1.4	/
Pb	µg/L	1	0.6	1.8	0.5	0.5	0.5	0.9	/	0.5	0.5	0.7	/	0.5	0.9	/
Cd	µg/L	0.1	0.07	0.25	0.08	0.28	0.05	0.06	/	0.09	0.025	0.05	/	0.04	0.1	/
Hg	µg/L	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	/	0.1	0.1	0.2	/	0.5	0.1	/
Ni	µg/L	1	4.8	6	3.2	4.2	4.8	3.2	/	4.1	3.1	6.5	/	3.6	5.4	/
FC	CFU/100 mL	900	21	200	10	1778	436	871	1584	602	501	10	/	380	1000	646
FE	CFU/100 mL	330	70	110	18	96	73	1905	1000	71	162	6	/	46	776	1096

Target values are provided from the ICPDR and EU directive 2006/7/EEC. Marked values exceeded target values. / - not measured.

detected in August. Cadmium had the highest values in October (almost 3-fold higher than target value), while copper had the highest concentration (12-fold higher than target value) in January. Faecal coliforms and faecal enterococci pointed to unsatisfactory water quality in October, January and February. The anthropogenic source of faecal pollution was identified in October and November.

At the Bagrdan site, the highest concentrations of ammonia and phosphates were detected in June while nitrates exhibited the highest concentration in January. The highest concentration of zinc (9-fold higher than permitted) was detected in June, while copper (12-fold higher than target value) and nickel (6-fold higher than target value) had the highest values in September. In November, the concentration of mercury was 5-fold higher than target value.

Faecal indicator bacteria revealed unsatisfactory levels of water quality in January and February. The anthropogenic source of faecal pollution was identified in June and November.

The Hydrometeorological Service of Serbia also provided data on the concentrations of herbicides, pesticides and detergent precursors, but none of these parameters exceeded the permitted values during the sampling period.

3.2. DNA damage recovery

Mussels collected from the Varvarin site in August were chosen for DNA damage recovery (Fig. 2). The high level of DNA damage detected in the haemocytes directly upon sampling from the polluted site made it easy to evaluate the response after the acclimation period. For all samples studied, there was a direct relation between the time of acclimation and OTM values. After two days recovery there was a significant reduction ($p < 0.001$) in DNA damage; the reduction reached a maximum after ten days, remaining constant until the end of the acclimation period (30 d). When the haemolymph was sampled from the animals maintained in laboratory conditions for 21 months, there was an insignificant increase in DNA damage in comparison with values obtained after 10 and 30 d (see Fig. 2).

3.3. In situ assessment of genotoxicity

Differences in response to environmental stress were observed during different months of sampling from the chosen sites. Comparing to values detected after 10 d of acclimation (0.47 ± 0.1), the highest levels of DNA damage were detected in August at the Varvarin site (5.24 ± 0.38), and in June at the Bagrdan site (5.67 ± 0.56) (Fig. 3). A statistically significant difference ($p < 0.05$) in response to environmental stress was observed in the mussels collected in August, September, November and February at the Bagrdan site when compared with mussels collected at the Varvarin site. In August, mussels collected from the Varvarin site showed a higher level of DNA damage, while in September, November and February the response was higher in the mussels collected from the Bagrdan site. Among the measured physical and chemical parameters of water, the values of OTM significantly correlated with the concentration of dissolved zinc ($r = 0.6248$), water temperature ($r = 0.7006$) and dissolved oxygen ($r = 0.7738$) (Fig. 4).

3.4. In vitro assessment of the impact of temperature on cadmium- and zinc-induced genotoxicity

Impact of temperature on heavy metal induced genotoxicity was studied *in vitro* with zinc, considering that OTM values were significantly correlated with concentration of dissolved zinc, and cadmium as well known model mutagen. The tested

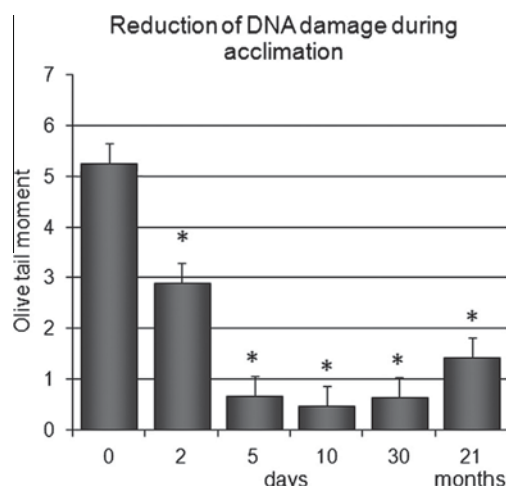


Fig. 2. Nuclear DNA damage in haemocytes of *S. woodiana* (expressed as the OTM) upon sampling from the Varvarin site in August followed by 2, 5, 10 and 30 d of acclimation and 21 months of specimens maintenance in laboratory conditions; the results of 100 comets per group are shown *significant difference in comparison with mussels collected at the site Varvarin in August ($p < 0.05$). Haemocyte viability upon collection, evaluated by the trypan blue staining, was about 90% in each sample.

concentrations of CdCl_2 (4, 40 and 100 μM) and the lower concentration of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (83 μM) did not reduce viability by more than 20%. However, the higher concentration $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (834 μM) reduced viability by more than 50% and therefore this concentration was excluded from genotoxicity analyses. At the both temperatures, the level of DNA damage in cadmium and zinc treated samples was significantly higher in comparison with the control at corresponding temperature (with the exception of 4 μM CdCl_2 at 24 °C when no increase was detected). The level of DNA damage in haemocytes treated at 24 °C was significantly higher in comparison with haemocytes treated at 4 °C (Fig. 5).

As shown in Fig. 6, the OTM values showed a significant correlation with comet tail length ($r = 0.7388$ for *in situ*; $r = 0.6811$ for *in vitro*) and comet tail intensity parameters ($r = 0.8902$ for *in situ*; $r = 0.9040$ for *in vitro*) in all experiments.

4. Discussion

In this study we investigated variations in the extent of DNA damage in the haemocytes of the freshwater mussel *S. woodiana* and the relation between the observed variations in response and the physical and chemical characteristics of the sampling sites/sampling seasons. Genotoxic effects were studied on haemocytes because of their role in processes such as the transport and digestion of nutrients, and elimination of toxic substances and small particles, which makes them constantly exposed to water-borne pollutants (Makala and Oikari, 1990; Soares-da-Silva et al., 2002). Moreover, haemolymph readily provides a single cell suspension; it is easily collectable and its usage permits repeatable tissue sampling of individuals (Štambuk et al., 2008).

Considering that the Varvarin site was the furthest upstream point on the Velika Morava River and could not be considered as a reference site, the mussels were subjected to a DNA recovery test to provide suitable reference data needed for the evaluation of the extent of DNA damage. The results revealed the ability of *S. woodiana* to recover DNA damage, which complies with studies previously performed on the other species of the Unionidae (Štambuk et al., 2008). In the haemocytes of mussels that were maintained under controlled environment conditions in the laboratory, the most significant decrease of DNA damage was observed after 10 d of acclimation.

During our investigation, heavy metal contamination, faecal pollution and genotoxic effects were detected at both sampling sites. Mussels collected from these sites were exposed to a mixture of untreated municipal and industrial wastewaters that have a noteworthy genotoxic potential (Ciccotelli et al., 1998; Claxton et al., 1998; White and Rasmussen, 1998; Grover and Kaur, 1999). Although a significant correlation of OTM with the concentration of dissolved zinc was observed, the detected genotoxic effects should not be attributed only to this element. Besides the concentration of dissolved zinc, increased concentrations of copper, nickel, cadmium, lead and mercury were also detected. Bagdonas and Vosyliene (2006) emphasized the synergistic genotoxic effects of a mixture of copper and zinc on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), while Costa et al. (2002) showed the impact of nickel on the induction of oxidative stress in mammalian cells.

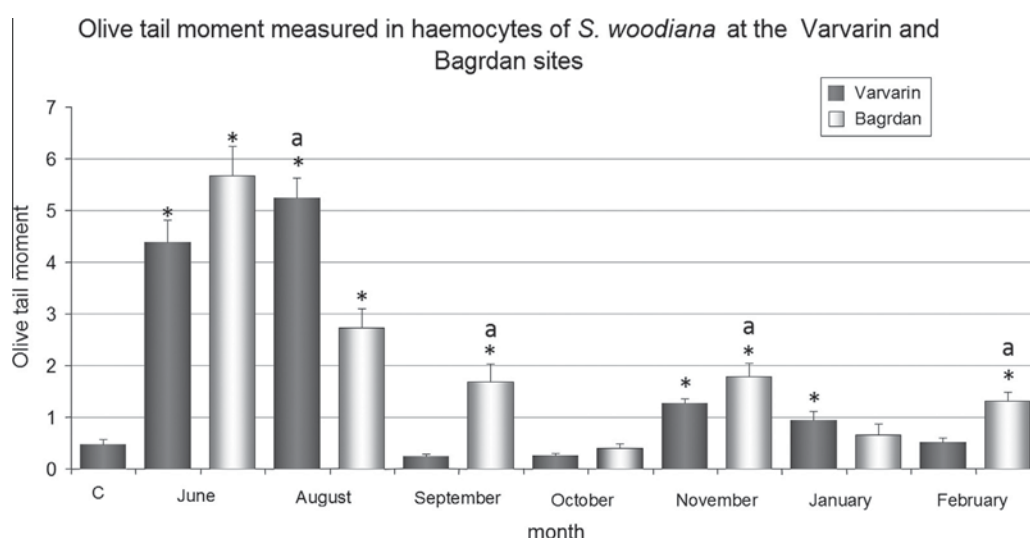


Fig. 3. Nuclear DNA damage in haemocytes of *S. woodiana* (expressed as OTM) upon sampling from the Varvarin and Bagrdan sites during the sampling period, results of 50–150 comets per group are shown *significant difference ($p < 0.05$), in comparison with acclimated mussels (C); *significantly higher level of DNA damage in comparison with the other sampling site ($p < 0.05$). Haemocyte viability upon collection, evaluated by the trypan blue staining, was about 90% in each sample.

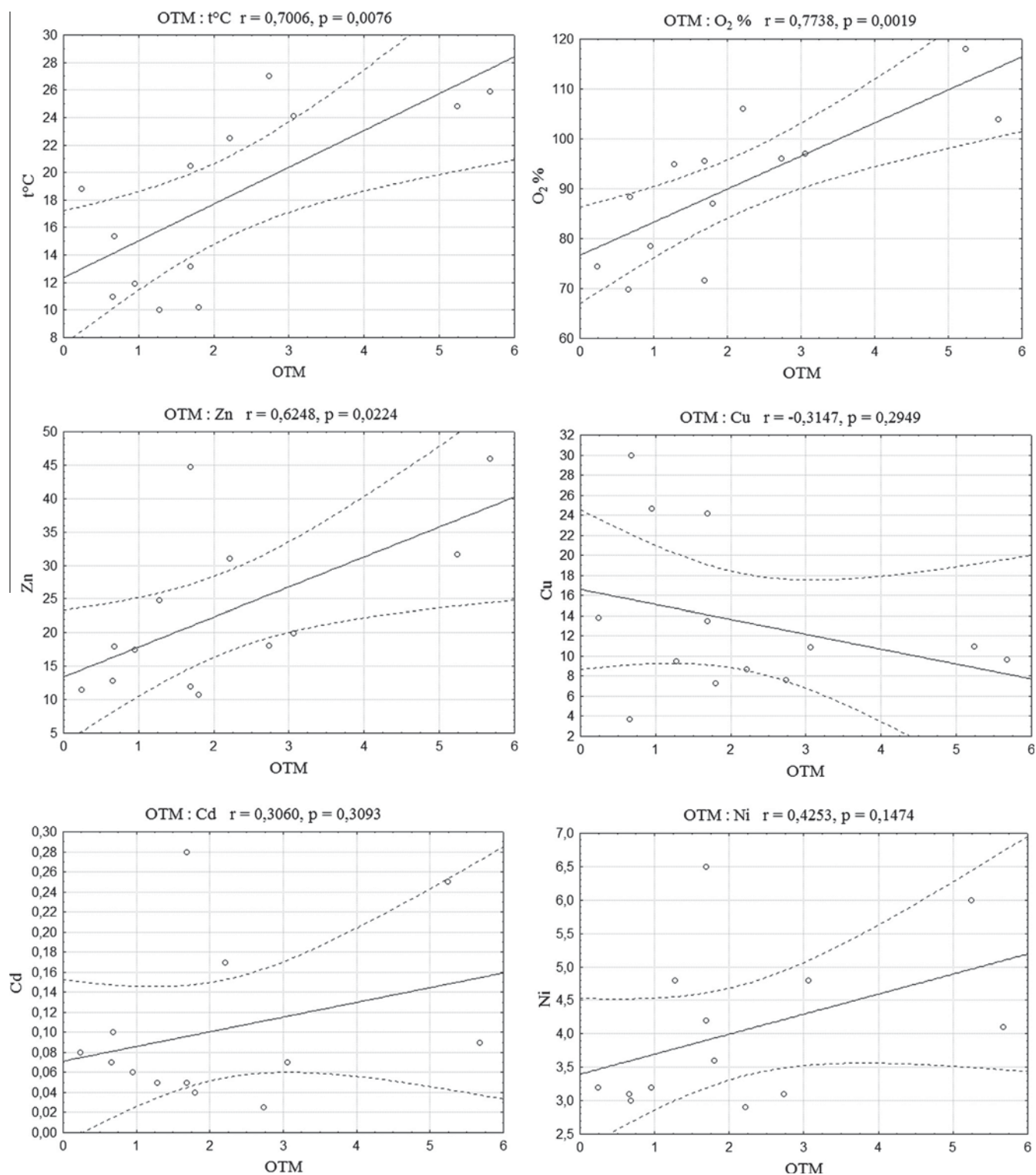


Fig. 4. Pearson's correlation of OTM with physical and chemical parameters measured in water.

The genotoxic effects of lead on the freshwater mussel *Anodonta grandis* were shown in the study of Black et al. (1996), the impact of mercury on the marine mussel *Mytilus edulis* was revealed in the study of Tran et al. (2007), while Vincent-Hubert et al. (2008) described the genotoxic effects of cadmium on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Although the concentrations of other pollutants, such as herbicides and pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons, were in permitted concentrations, mixtures of these

substances, even when present in small concentrations, could exert an additive genotoxic effect on freshwater mussels (Connors and Black, 2004).

However, differences in the levels of DNA damage were observed in mussels collected at the Varvarin and Bagrdan sites. The significantly higher response of the mussels collected at the Varvarin site in August indicated the higher pollution of this site in August, which was confirmed by chemical analyses of the water.

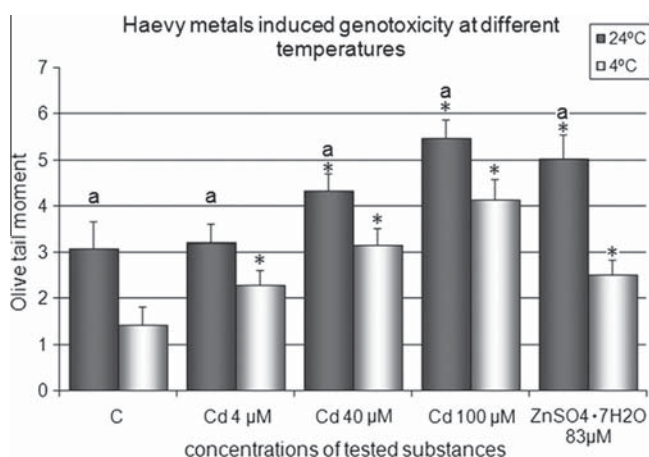


Fig. 5. Impact of temperature on cadmium- and zinc-induced genotoxicity. Results of 100 comets per group are shown; *statistical significance in comparison with control held at corresponding temperature ^astatistical significance ($p < 0.05$) in comparison with corresponding concentration from series held on 4 °C.

A similar situation was observed at the Bagrdan site in September, when the concentrations of heavy metals in the water were much higher than in Varvarin.

We also observed differences in response to environmental stress during different periods of the year. The analysis showed a high correlation of OTM values with temperature and dissolved oxygen. The highest level of DNA degradation was detected in the mussels collected during June and August, followed by a decrease in the OTM values during the rest of the sampling period. Although the concentrations of heavy metals measured at the Varvarin site in November had values similar to those measured in June and August, the level of DNA damage was significantly higher in the mussels collected in June and August. Similarly, using the comet assay, Frenzilli et al. (2001) described a seasonal effect on DNA integrity and antioxidant scavenging efficiency which inversely correlated with water temperature. In addition, earlier studies revealed that temperature has a significant effect on the filtration rates of aquatic organisms (Burns, 1969; Jorgensen et al., 1990), including the freshwater mussel *S. woodiana* (Xu et al., 2007). The filtration rates were more significant at 20 °C and 25 °C than that at 15 °C. We assume that the decrease in filtration rate during months with a lower water temperature may be one of the reasons for the decrease in DNA damage due to lower exposure to genotoxic substances in water. Cherkasov et al. (2007a, 2007b) have emphasized the impact of environmental temperature on the modulation of the toxicity of waterborne metals in ectotherms such as mollusks, through changes in metal uptake and accumulation rates, and through modulation of the intrinsic sensitivity of intracellular targets to toxic metals. The main routes of metal

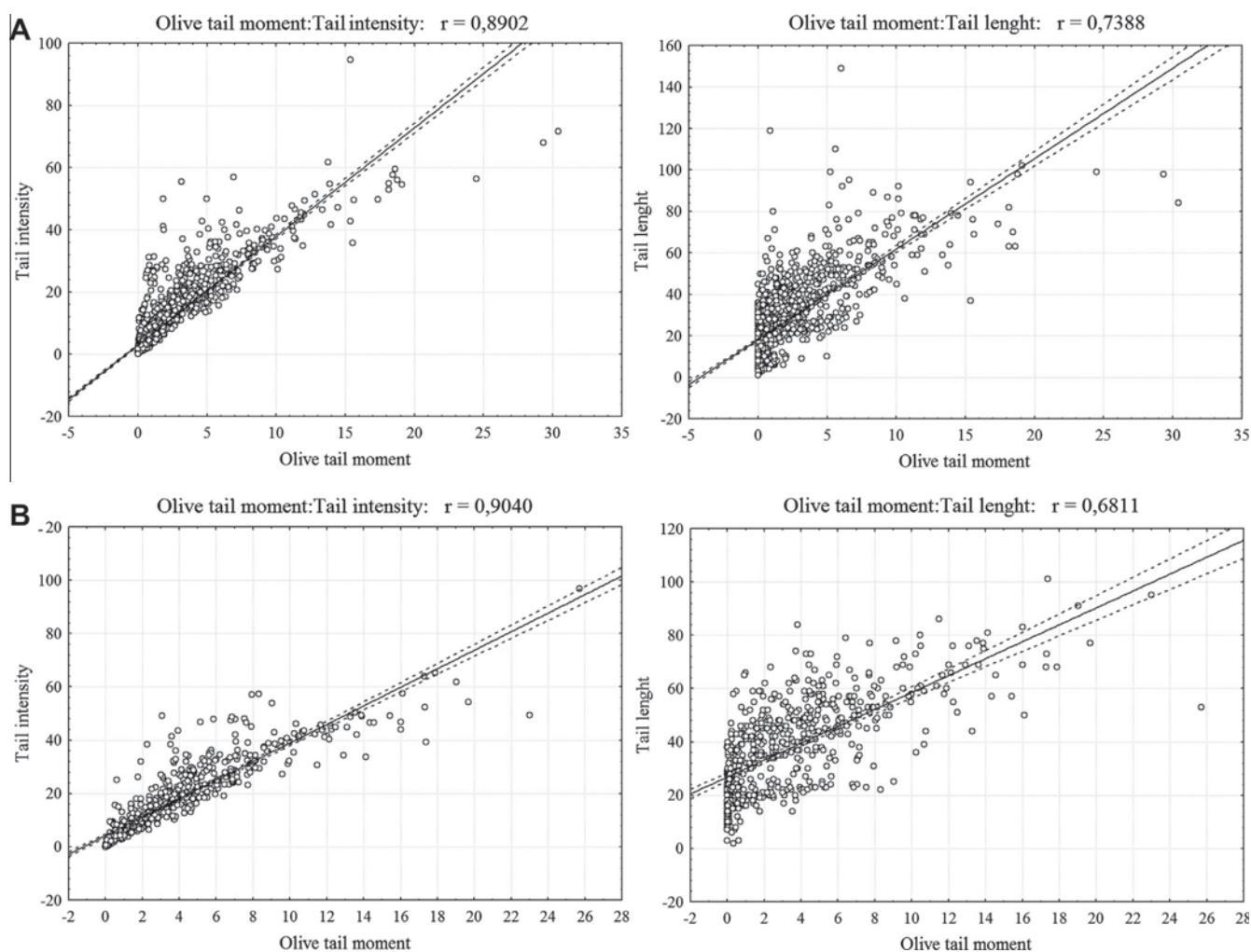


Fig. 6. Correlation of the OTM with other comet parameters (tail intensity and tail length); A – *in situ* performed tests; B – *in vitro* performed tests.

uptake are active ATP – dependent transport by ion pumps and facilitated diffusion by ion channels. Numerous studies (for review see Sokolova and Lannig, 2008) indicated that these processes were strongly affected by the environmental temperature in aquatic ectotherms; a rise of temperature resulted in a profound increase in metal uptake rates and an elevated accumulation of metals in the organism.

Our results of *in vitro* treatment of haemocytes with cadmium indicated concentration-dependent increase in DNA damage at both temperatures; also temperature-related increase of DNA damage was detected in control samples held at 24 °C. Taking this in consideration, we assume that higher levels of DNA damage in cadmium- and zinc-treated haemocytes obtained at 24 °C comparing to 4 °C are the result of combined effects of the genotoxic agents and the treatment temperature. Similar effect of treatment temperature on the genotoxic response to sodium hypochlorite was detected by Buschini et al. (2003) in haemocytes of *Dreissena polymorpha*.

In conclusion, our results show the high sensitivity of the freshwater mussel *S. woodiana* in detecting genotoxicity induced by waterborne pollutants, and the ability to recover DNA damage after acclimation in controlled conditions. These characteristics could make *S. woodiana* a valuable tool for active biomonitoring of aquatic environments. On the other hand, observed seasonal variations in the genotoxic response, probably caused by water temperature, suggest that the presence of genotoxic pollutants during months with lower temperature could be under-estimated with *S. woodiana*. This emphasizes the importance of seasonal genotoxic monitoring with this organism.

Acknowledgment

This research has received funding from the European Community's FP7/2007–2013 agreement no. 265264.

References

- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712.
- Bagdonas, E., Vosyliene, M.Z., 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Biologija* 1, 8–13.
- Binelli, A., Riva, C., Provini, A., 2007. Biomarkers in zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). *Biomarkers* 12, 349–368.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79, 518–528.
- Black, M.C., Belin, J.L., 1998. Evaluating sublethal indicators of stress in Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) caged in an urban stream. In: Little, E. E., Delonay, A.J., Greenberg, B. M. (Eds.), *Environmental toxicology and risk assessment ASTM STP 1333 American Society for Testing and Materials West* 7, pp. 76–88.
- Black, C.M., Ferrell, R.J., Horning, C.R., Martin, K.L., 1996. DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 802–808.
- Burns, W.C., 1969. Relation between filtering rate, temperature and body size in four species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 14, 693–701.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C., 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat. Res.* 537, 81–92.
- Chen, Y., Chen, H., Wu, Y., Li, Z., Sun, L., Qu, M., Kong, Z., 2007. Toxicity evaluation of Meiliang Bay, Lake Taihu, China – a drinking water source. *Hydrobiologia* 581, 297–303.
- Cherkasov, A.A., Overton, J.R.A., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2007a. Temperature dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *J. Exp. Biol.* 210, 46–55.
- Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007b. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Therm. Biol.* 32, 162–170.
- Ciccolitelli, M., Crippa, S., Colombo, A., 1998. Bioindicators for toxicity assessment of effluents from a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 37, 2823–2832.
- Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410, 237–243.
- Cok, I., Ulutas, O.K., Okusluk, O., Durmaz, E., Demir, N., 2011. Evaluation of DNA damage in common Carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). *Sci. World J.* 11, 1455–1461.
- Connors, E.D., Black, C.M., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in Lawn Care. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 362–371.
- Costa, M., Salnikow, K., Sutherland, J.E., Broday, L., Peng, W., Zhang, Q., Kluz, T., 2002. The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 265–275.
- De Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, Gagnon, Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N., 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicity: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 495–507.
- European Commission, 2006. Directive 2006/7/EEC, Directive concerning management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. *Official Journal of European Communities L* 64, 37–51.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F., 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophic coastal lagoon. *Aquat. Toxicol.* 53, 19–32.
- Geldreich, E.E., Kenner, B.A., 1969. Concepts of faecal streptococci in stream pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* 41, R336–R352.
- Grover, S., Kaur, S., 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 183–188.
- ICPDR, 2002. Water Quality in the Danube River Basin. *TNMN Yearbook 2002*. <http://www.icpdr.org/icpdr-pages/tnmn_yearbooks.htm>.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological application and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221.
- Jorgensen, C.B., Larsen, P.S., Riisgard, H.U., 1990. Effects on temperature on the mussel pump. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 64, 89–97.
- Klobučar, G., Pavlica, M., Erben, R., Papeš, D., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.* 64, 15–23.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Tomović, J., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B., 2011. Anthropogenic impact on water quality of the River Danube in Serbia: microbiological analysis and genotoxicity monitoring. *Arch. Biol. Sci.* 63, 1209–1217.
- Liu, H., Yang, J., Gan, J., 2010. Trace element accumulation in bivalve mussels *Anodonta woodiana* from Taihu Lake, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 593–601.
- Makala, P., Oikari, A.O.J., 1990. Uptake and body distribution of chlorinated phenolic in the freshwater mussel, *Anodonta atina* L. *Ecotox. Environ. Saf.* 20, 354–362.
- Mersch, J., Beauvais, M.N., 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutat. Res.* 393, 141–149.
- Mubiana, K.V., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 63, 219–235.
- Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* 77, 339–347.
- Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A., 2011. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* 84, 91–100.
- Paunovic, M., Csányi, B., Simic, V., Stojanovic, B., Cakic, P., 2006. Distribution of *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* (Rea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquat. Invasions* 3, 154–160.
- Pavlica, M., Klobučar, G., Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.* 490, 209–214.
- Picado, A., Bebianno, M.J., Costa, M.H., Ferreira, A., Vale, C., 2007. Biomarkers: a strategic tool in the assessment of environmental quality of coastal waters. *Hydrobiologia* 587, 79–87.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat. Toxicol.* 79, 65–77.
- Rosenberger, A., Rössler, U., Hornhardt, S., Sauter, W., Bickelböller, H., Wichmann, H.E., Gomolka, M., 2011. Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair* 10, 322–337.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Machado, J., 2002. Cytometric, morphologic and enzymatic characterization of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 132, 541–553.
- Sokolova, I.M., Lannig, 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201.

- Štambuk, A., Pavlica, M., Malović, L., Klobučar, G., 2008. Persistence of DNA damage in the Freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to Ethyl Methanesulphonate and Hydrogen peroxide. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 225–271.
- StatSoft, Inc., 2001. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., <<http://www.statsoft.com>>.
- Tran, D., Moody, J.A., Fisher, A.S., Foulkes, M.E., Jha, A.N., 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.* 84, 11–18.
- Uno, S., Shiraishi, H., Hatakeyama, S., Otsuki, A., Koyama, J., 2001. Accumulative Characteristics of Pesticide Residues in Organs of Bivalves (*Anodonta woodiana* and *Corbicula leana*) Under Natural Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 35–47.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 146, 281–300.
- Vincent-Hubert, F., Arini, A., Gourlay-France, C., 2008. Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B(a)P and combination of B(a)P and Cd. *Mut. Res.-Genetic Toxicol. Environ. Mutagen.* 723, 26–35.
- Watters, G.T., 1997. A synthesis and review of the expanding range of the Asian freshwater mussel *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionidae). *Veliger* 40, 152–156.
- White, P., Rasmussen, J.B., 1998. The genotoxic hazard of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410, 223–236.
- Woznicki, P., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E., Bardega, R., 2004. The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels (*Anodonta woodiana*) exposed to benzo[a]pyrene. *Acta Toxicol.* 12, 41–45.
- Xu, G.C., Gu, R.B., Wen, H.B., Hua, D., Wang, Y.F., 2007. Influence of Water Temperature and pH on Filtration Rate of *Anodonta woodiana pacifica*. *Acta Hydrobiol. Sin.* 31, 600–603.

Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress

Branka Vuković-Gačić · Stoimir Kolarević ·
Karolina Sunjog · Jelena Tomović · Jelena Knežević-Vukčević ·
Momir Paunović · Zoran Gačić

Received: 1 October 2012 / Accepted: 4 April 2013 / Published online: 24 April 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Genotoxic response of freshwater mussels *U. tumidus* and *U. pictorum* to environmental stress was studied using comet assay on hemocytes and gill cells. The mussels were acclimated to controlled laboratory conditions for 10 days, and then exposed at 4 sites in the Sava and Danube rivers in the area of the city of Belgrade. Samples of each species were taken after 7, 14, and 30 days of exposure. The mussels sampled immediately after acclimation served as controls. Genotoxic response in both species was induced earlier at sites receiving untreated wastewaters from the city's main collectors (7 days), than at the site receiving only domestic wastewaters from small settlements located upstream from the city (30 days). There was a correlation between the comet tail intensity values in tissues of

exposed mussels and the concentrations of zinc, copper, iron, and arsenic at the exposure sites. The genotoxic responses in both tissues of *U. pictorum* and in hemocytes of *U. tumidus* were similar, while *U. tumidus* gill cells failed to exhibit significant genotoxic response at two sites. These findings, together with higher mortality of *U. tumidus* at the most polluted sites, promote *U. pictorum* as a model for genotoxicity monitoring in freshwater environments.

Keywords *Unio pictorum* · *Unio tumidus* · Comet assay

Introduction

Active biomonitoring is increasingly used for quantifying the impact of pollutants on aquatic ecosystems. Active biomonitoring entails the use of bioindicator organisms obtained from unstressed populations and

Guest editors: Manuel P. M. Lopes-Lima, Ronaldo G. Sousa, Simone G. P. Varandas, Elsa M. B. Froufe & Amílcar A. T. Teixeira / Biology and Conservation of Freshwater Bivalves

B. Vuković-Gačić · S. Kolarević (✉) ·
K. Sunjog · J. Knežević-Vukčević
Faculty of Biology, Chair of Microbiology, Centar for
Genotoxicology and Ecogenotoxicology, University of
Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia
e-mail: stoimirk@bio.bg.ac.rs

B. Vuković-Gačić
e-mail: brankavg@bio.bg.ac.rs

K. Sunjog
e-mail: sunjogkarolina@imsi.rs

J. Knežević-Vukčević
e-mail: jelenakv@bio.bg.ac.rs

K. Sunjog · Z. Gačić
Institute for Multidisciplinary Research, University of
Belgrade, Kneza Višeslava 1, 11000 Belgrade, Serbia
e-mail: zorga@imsi.rs

J. Tomović · M. Paunović
Institute for Biological Research Siniša Stanković,
University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142,
11060 Belgrade, Serbia
e-mail: jelenatomovic@ibiss.bg.ac.rs

M. Paunović
e-mail: mpaunovi@ibiss.ac.rs

their subsequent exposure to polluted sites (De Kock & Kramer, 1994). The employment of translocated organisms provides a powerful tool for an ecologically sound risk assessment (Smolders et al., 2003). This approach provides useful information, as the biological variability in the responses related to different age and the reproductive status of the organisms in situ are avoided. In addition, it can overcome the hydrological, hydrochemical, and other abiotic and biotic factors that can influence species distribution, contaminant bioaccumulation and biomarker responses (Bauer et al., 1991; Cossu et al., 2000; Arbuckle & Downing, 2002; Andral et al., 2004; Viarengo et al., 2007; Štambuk et al., 2009). In the last decade, a range of phylogenetically separate groups of animal and plant organisms have been used in active biomonitoring (Nigro et al., 2006; Jha, 2008).

Mussels have several characteristics, such as a wide distribution, filter feeding, sessile life form, and ability to accumulate pollutants, which make them favored organisms for estimating environmental pollution levels and the bioavailability of various types of pollutants (Ravera, 2001; Roméo et al., 2003; Andral et al., 2004; Bocquené et al., 2004; Pampanin et al., 2005; Amiard et al., 2006; Lehtonen et al., 2006). In response to environmental stress they show a range of physiological, histological, and molecular responses, including abnormal morphology, alterations of antioxidative status, induction of DNA strand breaks, etc. (Pavlica et al., 2001; Binelli et al., 2007; Bolognesi et al., 2004; Rocher et al., 2006; Coffinet et al., 2008; Klobučar et al., 2008).

Mussels from the Dreissenidae, Unionidae, and Corbiculidae families have been used in many studies for evaluating genotoxicity in vivo and in vitro; however, none of these studies have dealt with comparative assessments of the responses in different species. The aim of this study was to investigate and compare the genotoxic responses of different mussel species exposed to the same level of environmental stress by the active biomonitoring approach. The present study was carried out on two mussel species from the Unionidae family, *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. Both mussels are native to Serbian rivers and widely distributed in Central, Northern and Eastern Europe, and they exhibit relatively low genetic variability (Bauer & Wachtler, 2001). Since none of the sites for collection of mussels could be characterized as unpolluted (ICPDR, 2002), we first maintained the collected specimens under controlled laboratory

conditions for 10 days, and then exposed them to environmental stress at 4 different sites in the Sava and Danube rivers in the area of the city of Belgrade.

To evaluate genotoxicity, we employed the comet assay and used the tail intensity (TI) and Olive tail moment (OTM) as measures of DNA damage. The comet assay is accepted as one of the major tools for assessing pollution-related genotoxicity in aquatic organisms (Dixon et al., 2002; Jha, 2004, 2008; Sunjog et al. 2012). It has been used in many studies with freshwater mussels and it exhibits significant correlation with the micronucleus test (De Lafontaine et al., 2000; Pavlica et al., 2001; Klobučar et al., 2003; Binelli et al., 2007; Štambuk et al., 2009; Guidi et al., 2010; Kolarević et al., 2011). We evaluated DNA damage in hemocytes and gill cells which are constantly exposed to water-born pollutants and are commonly used in biomonitoring studies that employ these organisms (Makala & Oikari, 1990; Soares-da-Silva et al., 2002; Štambuk et al., 2008).

Materials and methods

The specimen collection

In April 2011, specimens of *U. pictorum* and *U. tumidus* were collected from the site Orešac which is located on the River Danube. This site was chosen because of the availability of mussels in quantities required to perform the experiment. April was chosen for specimen collection due to low number of burrowed specimens during reproductive period (Schwalb & Pusch, 2007). About 250 specimens of each species (shell length 7–10 cm; 10 ± 2 years old; Aldridge, 1999), were collected from a depth ranging from 1 to 2 m using a benthological hand net (Kick and Sweep technique), a benthological dredge and by diving. After collection and transport to the laboratory (within 4 h at 4°C), the hemolymph and gills were sampled from 5 specimens of each species and subjected to the comet assay separately for each specimen. The remaining mussels were subjected to an acclimation procedure to obtain baseline levels of DNA damage.

Acclimation procedure

Mussels were maintained under controlled conditions (14 h/10 h day/night cycle, artificial light was not

used) in aquaria. Eight aquaria (about 60 specimens per aquarium, species were separated), each containing 50 l of de-chlorinated, well-aerated water (conc. $O_2 > 8 \text{ mg l}^{-1}$, O_2 saturation $>90\%$, $t = 22^\circ\text{C}$, pH 7.2–8.1) were used. The bottom substrate was composed of fine sand that was washed with clean water to eliminate debris and pre-treated with heat (at 250°C for 4 h) to eliminate potential disease vectors. The mussels were fed every third day with dry leaves of string nettle (*Urtica dioica*) that were macerated and minced with a mortar and pestle. During acclimation, mortality was not observed. After 10 days of acclimation, the hemolymph and gills were sampled from 5 specimens of each species and subjected to the comet assay separately for each specimen. The values of TI and OTM obtained from these organisms served as controls for the exposure experiments.

Exposure sites

Mussels that were acclimated as described above, were transferred to 4 sites in the wider area of the city of Belgrade. One group was kept in the River Danube and 3 were kept in the River Sava. These sites are characterized by different sources and levels of pollution. The site in the Danube (Danube's branch) receives untreated wastewater from the city's eastern area collector. This site is under the impact of urban, industrial, and hospital wastewaters. One of the sites in the Sava (Sava's branch) is located downstream of the sewage outlet of the southern part of the city. This site receives urban, industrial, and hospital wastewaters. The other site (Sava's dock) is mainly under the impact of household wastewaters of the city's western part. The third one (Duboko) is located upstream from Belgrade. It receives only domestic wastewaters from minor settlements located upstream. The site is characterized by vast dilution by water flow (about $3000 \text{ m}^3/\text{s}$) and good aeration. This site was chosen to detect the occurrence of translocation-related stress. The coordinates of the collection and exposure sites were measured by GPS ("Garmin Etrex") and were charted with ArcView software (map 1:300,000, system WGS_1984) (Table 1).

Exposure procedure

For the exposure experiments, 40 specimens of each species were held at selected sites in plastic net bags

(mesh size 2 mm) at 2 m depth for 30 days (from April 14 to May 15). The samples of hemolymph (obtained from 5 mussels) and gills (obtained from 2 out of 5 mussels) from each species were taken for DNA damage analysis after 7, 14, and 30 days of exposure. Mussels sampled immediately after acclimation served as the control group.

Hemolymph collection and gill cells suspension preparation

The tissue samples were collected and analyzed immediately after the mussels were transferred to the laboratory. Hemolymph was collected in darkness from the posterior adductor muscle sinus with a hypodermic syringe. One ml of hemolymph from each mussel was transferred to a 1.5 ml microtube (held on 4°C) and centrifuged for 10 min at 2,000 rpm at 4°C ; the cell suspension was made in 60 μl of residual supernatant. After the animals were sacrificed, single-cell suspensions of gill tissue were prepared using the method of Wilson et al. (1998), adapted for freshwater mussels. The gills were excised and chopped separately 10 times in 0.2 ml of Hank's balanced saline solution (HBSS) using two fresh scalpel blades in a scissor-like movement on a petri dish on ice, washed gently in a 15 ml centrifuge tube with a further 2.8 ml of HBSS and 0.03 ml of 0.5% trypsin. The suspensions were gently rocked for 10 min at room temperature, after which 10 ml of HBSS was added and the suspension was passed through a sieve to remove any remaining large fragments. After centrifugation at 2,000 rpm for 5 min at 4°C , the supernatant was discarded and the pellet carefully resuspended in 1 ml of HBSS (4°C). The sample was then centrifuged at 2,000 rpm for 10 min at 4°C , and the cells re-suspended in 60 μl of residual supernatant. The viability of cells in suspension was determined by the trypan blue exclusion test, using 0.4% trypan blue dye. Cells staining blue were considered non-viable.

Comet assay

DNA damage was evaluated in hemocytes and gill cells collected within 4 h after sampling from the environment/aquaria. The alkaline comet assay procedure was performed under yellow light as described by Singh et al. (1988). Microscopic slides were pre-coated with 0.5% NMP agarose and air dried for 24 h. To form a second,

Table 1 Collection and exposure sites

River	Locality	Source of pollution	Latitude	Longitude	Above sea (m)
Sava	Sava's dock	Outlet of untreated household wastewaters	44°48'22.75"	20°26'35.99"	70.0
	Sava's branch	Outlet of untreated urban, industrial and hospital wastewaters	44°47'39.95"	20°25'42.07"	71.0
	Duboko	Domestic wastewaters of minor settlements	44°39'40.03"	20°16'51.53"	77.0
Danube	Danube's branch	Outlet of untreated urban, industrial and hospital wastewaters	44°49'15.51"	20°31'46.75"	70.0
	Orešac ^a	Wastewaters from Belgrade and Pančevo	44°39'18.30"	20°49'26.94"	69.5

^a Collection site

supportive layer, 80 µl of 1% NMP agarose was gently placed on top of the 0.5% NMP layer and spread over the slide using a coverslip. The slide was placed on ice for 5 min to allow complete polymerization of agarose. After the coverslips were removed, 30 µl of cells were gently mixed with 70 µl of 1% LMP (37°C) agarose, pipetted onto the supportive layer of 1% NMP agarose and covered with a coverslip. After 5 min on 4°C, the coverslips were removed and the slides were lowered into freshly made cold (4°C) lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1.5% Triton X-100, pH 10) for 1 h. To allow DNA unwinding, slides were placed in an electrophoresis chamber containing cold (4°C) alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min. Electrophoresis was performed at 0.5 V/cm and 300 mA for 20 min at (4°C). After electrophoresis, the slides were placed into freshly made cold (4°C) neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) for 15 min. Staining was performed with 20 µl per slide of ethidium bromide (2 µg/ml). The slides were examined with a fluorescence microscope (Leica, DMLS, Austria, under magnification 400 X, excitation filter 510–560 nm, barrier filter 590 nm). Microscopic images of comets were scored using Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Fifty nuclei were analyzed per slide, and the TI (the percent of the fluorescence in the comet tail) and OTM (calculated as a product of the TI and the distance between the means of the head and tail distributions; Olive & Judit, 2006), were scored and served as a measure of the level of DNA damage.

Physical, chemical, and microbiological analyses

Water quality parameters were measured on the first and the last days of exposure. Physical and chemical

parameters (temperature, conductivity, pH, oxygen concentration, ammonia, nitrates, and phosphates) were measured on site by a multi-parameter instrument Multi 340i (WTW, Germany). Microbiological indicators, i.e., fecal coliforms and intestinal enterococci were analyzed by standard procedures according to the national legislation and EU-Bathing Water Quality Directive 2006/7/EEC. The concentrations of dissolved heavy metals were provided by the Institute of Public Health, Belgrade, and the Republic Hydro Meteorological Service of Serbia.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed by one-way analyses of variance (ANOVA) and post hoc Duncan's multiple range test, using Statistica 6.0 Software (StatSoft, Inc., USA, 2001). The mean values for tail intensities were used for Pearson's correlation analyses.

Results

Physical, chemical, and microbiological analyses of water

The results of the performed analyses revealed unsatisfactory levels of water quality at all of the studied sites with regard to the threshold values recommended by the Bathing Water Directive (European Commission, 2006). Increased counts of coliform bacteria and elevated concentrations of ammonia and phosphates indicated recent fecal pollution. The extremely low oxygen level (1.6%) measured at the Danube's branch site designated it as the most polluted. Moreover, the concentrations of dissolved zinc, copper, and arsenic

Table 2 Physical, chemical, and microbiological analysis of water at the exposure and collection sites

Site	ICPDR target value	Duboko		Sava's dock		Savas's branch		Danube's branch		Orešac ^a	
Date		15.04.	14.05.	15.04.	14.05.	15.04.	14.05.	15.04.	14.05.	24.03.	14.04. 15.04.
t (°C)	–	13.4	15.8	13.6	19.1	13.4	17.2	12.9	19.6	11.6	12.5 12.9
Conductivity (µS/cm)	–	257	283	275	441	280	nd	430	475	420	430 430
Oxygen (mg/l)	6	8.29	6.27	8.34	3.93	8.10	7.98	0.18	6.80	9.90	9.40 0.18
Oxygen (%)	–	80.1	65.2	80.1	41.6	77.8	83.3	1.6	75.2	107.0	88.0 1.6
pH	6.5–8.5	8.0	7.9	8.0	8.3	8.2	8.9	7.5	8.5	8.0	8.4 7.5
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0.3	0.41	1.21	0.84	3.05	1.17	1.12	5.00	7.61	0.18	0.16 5
NO ₃ [–] (mg/l)	3	0.75	1.36	1.40	1.60	1.42	1.14	0.64	1.32	1.50	1.60 0.64
PO ₄ ^{3–} (mg/l)	0.1	nd	0.220	nd	1.370	nd	0.310	nd	3.080	0.060	0.045 –
Fe (mg/l)	0.3	0.122		0.117		0.219		0.140		0.114	
Zn (µg/l)	5	3		7		16		19.2		8	
Cu (µg/l)	2	1		1		12		16.6		3	
Cr (µg/l)	2	2		2		2		0.6		<1	
Pb (µg/l)	1	<1		<1		<1		<0.1		<1	
Cd (µg/l)	0.1	<0.1		<0.1		<0.1		<0.1		<0.1	
Hg (µg/l)	0.1	<0.1		<0.1		<0.1		0.1		<0.1	
Ni (µg/l)	1	<1		<1		<1		2.1		<1	
As (µg/l)	1	1		1		10		1.8		1	
<i>F. coliforms</i> /100 ml ^b	900	2800	nd	2300	nd	4900	nd	16100	nd	2100	3800 16100
<i>E. fecalis</i> /100 ml ^b	330	32	nd	80	nd	20	nd	1008	nd	345	31 1008

The numbers marked in bold exceed target values (ICPDR, 2002). The concentrations of dissolved metals were measured once during exposure period

nd not determined

^a Collection site

^b Enumeration of fecal coliforms and intestinal enterococci was performed by membrane filtration method; the permitted values are from EU Directive 2006/7/EEC

at the Sava's branch and Danube's branch were several-folds higher than the permitted values (Table 2). The Institute of Public Health Belgrade and the Republic Hydro Meteorological Service of Serbia also provided data about the concentrations of herbicides, pesticides, detergent precursors, and PAHs, however, none of these exceeded the permitted values during the exposure period (data not shown).

All parameters, except the number of fecal coliforms and the concentrations of ammonia and phosphates, were within the permitted values at the Duboko site.

At the mussel collection site Orešac, the increased numbers of fecal coliforms and increased concentrations of dissolved zinc and copper (Table 2) indicated unsatisfactory water quality. Therefore, the acclimation procedure was carried out to allow recovery of

DNA damage, and to provide data for the control values for subsequent exposure experiments.

Acclimation of mussels: DNA damage recovery

The 10 day acclimation period was found to be sufficient for DNA damage recovery in both studied species. By comparing the TI and OTM values in hemocytes and gill cells of mussels from the collection site Orešac before and after acclimation, statistically significant decrease in DNA damage parameters were observed in both tissues (Fig. 1).

Mortality of mussels and induction of DNA damage at exposure sites

During 30 days of exposure, 12 specimens of *U. tumidus* (30%), and 4 specimens of *U. pictorum* (10%) at the Danube's branch died. Two specimens of

U. tumidus (5%) died at the Sava's branch, while all of the specimens at sites Duboko and Sava's dock survived the exposure period.

The genotoxic responses in both tissues of the analyzed mussel species showed similar patterns that depended on the levels of pollution at the different exposure sites. As is shown in Fig. 2, at the least polluted site Duboko, the TI values increased after 30 days of exposure. The increase was statistically significant in both tissues of *U. pictorum* and in *U. tumidus* hemocytes. No increase of TI values was observed upon translocation of the mussels to this site; in *U. pictorum* hemocytes, even a significant decrease of DNA damage was observed after 7 and 14 days.

At the Sava's dock site where water pollution was moderate, a genotoxic response was induced after 7 days of exposure; however, it subsided to control levels. The increase of TI was statistically significant in all of the examined samples (Fig. 2).

At the two most polluted sites, the Sava's branch and Danube's branch, the genotoxic response in mussels lasted throughout the entire exposure period; induction of DNA damage was observed after 7 days and reached a maximum level after 14 days of exposure. The increase of TI was statistically significant in both species, with the exception of gill cells of *U. tumidus* at the Sava's branch (Fig. 2). Curiously, at this site, the maximum level of DNA damage after 14 days was missing in *U. pictorum* gill cells. At present we have no explanation for this result.

When the DNA damage in hemocytes and gill cells of the two species were compared by Pearson's correlation analyses, a significant correlation between TI values in hemocytes of *U. pictorum* and *U. tumidus* ($r = 0.79$) was obtained, while the correlation in gill cells was not significant ($r = 0.53$).

The level of DNA damage was also studied by OTM (Table 3). Although the correlation between TI and OTM was highly significant ($r = 0.88$), TI displayed a higher potential for detecting significant differences, especially when the level of DNA integrity was close to the control values. Moreover, when the results of chemical analyses were correlated with TI and OTM values (Table 4), the concentrations of dissolved heavy metals were more significantly correlated with TI. The most significant correlations were obtained in *U. pictorum* hemocytes with the concentrations of zinc ($r = 0.78$), copper ($r = 0.77$), iron ($r = 0.64$) and arsenic ($r = 0.58$).

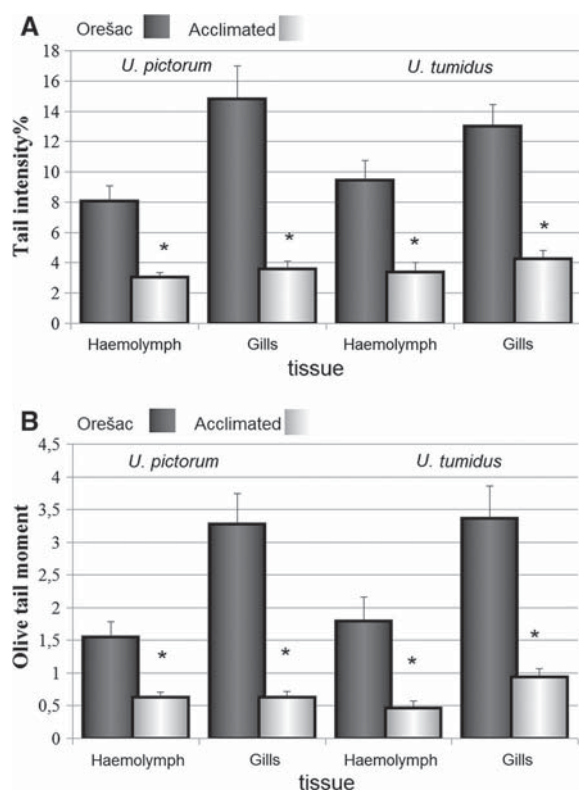


Fig. 1 Comparison of DNA damage in tissues of *U. pictorum* and *U. tumidus* collected at the Orešac site before and after acclimation to controlled conditions, assessed by TI (A) and OTM (B). For each plot, 250 nucleoids of hemocytes and gill cells were scored and the results are expressed as MEAN $\pm$ SE. *Statistical significance ($P < 0.05$)

Fig. 2 DNA damage in hemocytes and gill cells of freshwater mussels *U. pictorum* and *U. tumidus* during the exposure period at the sites Duboko and Sava's dock (A), and Sava's branch and Danube's branch (B). Control values (marked with C) are from acclimated specimens. For each plot, 200–250 nucleoids of hemocytes and 100 nucleoids of gill cells were scored, and the results were expressed as TI % (MEAN $\pm$ SE). *Statistical significance ($P < 0.05$)

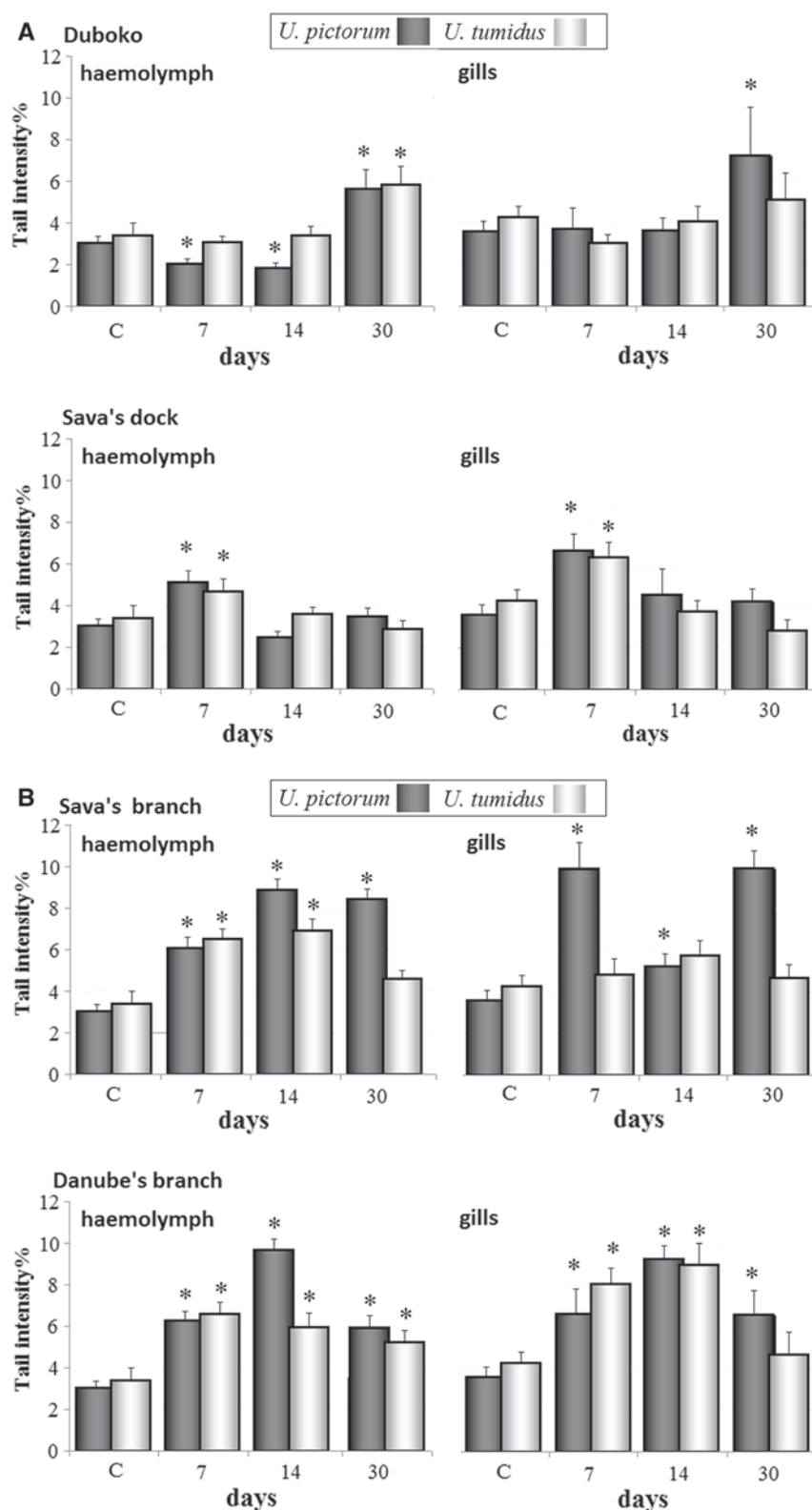


Table 3 OTM values measured in tissues of *U. pictorum* and *U. tumidus* at exposure sites

Site/Days	Hemolymph			Gills		
	7	14	30	7	14	30
<i>U. pictorum</i>						
Duboko	0.27 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.58 ± 0.14	0.52 ± 0.17	0.29 ± 0.05	0.93 ± 0.36
Sava's dock	0.53 ± 0.08	0.25 ± 0.04	0.42 ± 0.05	0.93 ± 0.16	0.37 ± 0.13	0.72 ± 0.13
Sava's branch	0.73 ± 0.07	0.83 ± 0.05*	1.31 ± 0.09*	1.06 ± 0.21	0.69 ± 0.08	1.59 ± 0.14*
Danube's branch	0.65 ± 0.05	0.99 ± 0.07*	0.82 ± 0.10	1.06 ± 0.24	1.26 ± 0.09*	0.70 ± 0.14
Control	0.63 ± 0.07			0.62 ± 0.09		
<i>U. tumidus</i>						
Duboko	0.37 ± 0.04	0.47 ± 0.05	0.43 ± 0.13	0.43 ± 0.09	0.30 ± 0.08	0.43 ± 0.17
Sava's dock	0.63 ± 0.11	0.46 ± 0.04	0.42 ± 0.05	0.69 ± 0.09	0.42 ± 0.07	0.72 ± 0.13
Sava's branch	0.80 ± 0.06*	0.84 ± 0.07*	0.37 ± 0.04	0.59 ± 0.11	0.72 ± 0.09	0.51 ± 0.08
Danube's branch	0.99 ± 0.10*	0.36 ± 0.04	0.79 ± 0.09*	1.04 ± 0.11	0.73 ± 0.09	0.57 ± 0.13
Control	0.47 ± 0.10			0.94 ± 0.12		

OTM values are expressed as MEAN ± SE. Marked values are significantly higher in comparison with controls.

* $P < 0.05$

Table 4 Pearson's correlation of TI and OTM values measured in different tissues/species with values of parameters measured in water at exposure sites

	<i>U. pictorum</i> hemolymph	<i>U. pictorum</i> gills	<i>U. tumidus</i> hemolymph	<i>U. tumidus</i> gills
TI				
Conductivity	0.47	0.32	0.29	0.68*
Ammonia	0.52	0.37	0.33	0.69*
Iron	0.64*	0.58*	0.59*	0.11
Zinc	0.78*	0.62*	0.58*	0.61*
Copper	0.77*	0.61*	0.60*	0.63*
Nickel	0.40	0.30	0.20	0.70*
Arsenic	0.58*	0.53	0.55*	0.03
OTM				
Conductivity	0.41	0.32	0.41	0.61*
Ammonia	0.46	0.36	0.44	0.64*
Iron	0.70*	0.51	0.34	0.14
Zinc	0.77*	0.59*	0.55	0.64*
Copper	0.75*	0.57	0.54	0.58
Nickel	0.30	0.30	0.40	0.60
Arsenic	0.64*	0.47	0.29	0.08

* $P < 0.05$

Discussion

In this study, we used the active biomonitoring approach to investigate and compare the genotoxic response of freshwater mussels *U. pictorum* and *U. tumidus* to environmental stress. We used the

comet assay on hemocytes and gill cells to assess genotoxicity; TI and OTM parameters served as measures of DNA damage. Our analysis confirmed previous findings that TI was a more reliable parameter for estimating genotoxicity than OTM (Collins et al., 2008).

The animals used for active biomonitoring are usually obtained from unpolluted sites. According to chemical analysis and evaluation of DNA damage in the tissues of collected mussels, the Orešac site could not be considered as unpolluted. For that reason, we carried out the acclimation procedure before the exposure experiments. In the study of Štambuk et al. (2009) which also employs caged mussel procedure with *U. pictorum*, the level of DNA damage in hemocytes of the native population of mussels at the unpolluted site at the Kupa River (tributary of the Sava River) closely resembles to the level of DNA damage in hemocytes of *U. pictorum* obtained after 10 days of acclimation in our study. This suggests that the 10 days acclimation period was sufficient to allow a significant recovery of DNA damage and to provide control values for the exposure experiments.

The exposure experiments revealed that the time-course of the genotoxic response and the extent of DNA damage in both analyzed species depended on the level of pollution at the investigated sites. At the sites characterized by high levels of organic pollutants and several-fold increased concentrations of zinc, copper, and arsenic (Sava's branch and Danube's branch), the genotoxic response was induced earlier than at the Duboko site which was characterized only by a low level of organic pollution. Moreover, we observed a significant correlation between the TI values in tissues of exposed mussels and the concentrations of zinc, copper, iron, and arsenic at the exposure sites. Since zinc, copper, arsenic, and nickel are known to induce genotoxic effects in aquatic organisms (Ramírez & García, 2005; Bagdonas & Vosyliene, 2006; Ahmed et al., 2011; Ali et al., 2011; Millward et al., 2012), it is reasonable to conclude that the genotoxic responses observed in our study were mainly caused by pollution with heavy metals. However, we cannot exclude the contribution of other pollutants at the exposure sites. The genotoxic potential of industrial, hospital, and household wastewaters containing complex mixtures of chemicals has been confirmed in many studies, even if single pollutants were present at below limit concentrations (Richardson and Bowron, 1985; Claxton et al., 1998; Halling et al., 1998; White & Rasmussen, 1998; Grover & Kaur, 1999; Connors & Black, 2003; Ferrari et al., 2003; Parolini et al., 2011). This indicates that herbicides, pesticides, PAHs, and other pollutants which were within the permitted values at the exposure sites could have contributed to the observed genotoxic responses.

It has been proposed that DNA damage observed early upon translocation of the animals to the new environment was induced by translocation-related stress rather than by pollution (Regoli et al., 2004). At the least polluted site Duboko, no induction of DNA damage in either mussel species was detected after 7 days, indicating the absence of translocation-related stress. Therefore, we can assume that the genotoxic response detected at the Sava's dock site after 7 days of exposure was a true response to pollution.

It is of interest to note that the genotoxic response in both studied mussel species declined after the maximum level of DNA damage was reached at sites with considerable levels of pollution. Regoli et al. (2004) described similar variations in concentrations of heavy metals and biomarkers such as DNA damage, antioxidant parameters, and lysosomal membrane stability in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. We can speculate that the adaptive responses of the mussels (increased antioxidative defense and/or enhanced DNA repair capacity), could account for the decreased genotoxic response during later exposure. It is also possible that longer periods of exposure select individuals that are more resistant to environmental stress, while sensitive ones are eliminated. In favor of this idea is the increased mortality, especially of *U. tumidus* observed after 30 days of exposure at sites with high levels of pollution (Sava's branch and Danube's branch).

Taken together, our results demonstrate that both tissues of *U. pictorum* and hemocytes of *U. tumidus* responded in a similar manner to environmental stress at each of the studied sites. On the other hand, gill cells of *U. tumidus* failed to exhibit a significant genotoxic response at the sites Duboko and Sava's branch. These findings, together with the observed higher mortality of *U. tumidus* at the most polluted sites, promote *U. pictorum* as a model organism for genotoxicity screening and monitoring of freshwater environments.

Acknowledgment This research received funding from the European Community's FP7/2007-2013 Agreement No. 265264.

References

- Ahmed, M. K., M. Habibullah-Al-Mamun, M. A. Hossain, M. Arif, E. Parvin, M. S. Akter, M. S. Khan & M. M. Islam,

2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere* 84: 143–149.
- Aldridge, D. C., 1999. The morphology, growth and reproduction of Unionidae (Bivalvia) in a Fenland waterway. *Journal of Molluscan Studies* 65: 47–60.
- Ali, D., S. Alarifi, S. Kumar, M. Ahamed & M. A. Siddiqui, 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquatic Toxicology* 15: 124–125.
- Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin & P. S. Rainbow, 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: 160–202.
- Andral, B., J. Y. Stanisiere, D. Sauzade, E. Damier, H. Thebault, F. Galgani & P. Boissery, 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin* 49: 704–712.
- Arbuckle, K. E. & J. A. Downing, 2002. Freshwater mussel abundance and species richness: GIS relationships with watershed land use and geology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 310–316.
- Bagdonas, E. & M. Z. Vosyliene, 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Biologija* 1: 8–13.
- Bauer, G. & K. Wachtler, 2001. Ecology and evolution of the freshwater mussels unionoida. In Bauer, G. & K. Wachtler. (eds), *Ecological Studies*. Vol. 145. Berlin: Springer.
- Bauer, G., S. Hochwald & W. Silkenat, 1991. Spatial distribution of freshwater mussels: the role of host fish and metabolic rate. *Freshwater Biology* 26: 377–386.
- Binelli, A., C. Riva & A. Provini, 2007. Biomarkers in zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). *Biomarkers* 12: 349–368.
- Bocquené, G., S. Chantreau, C. Clérendeau, E. Beausir, D. Ménard, B. Raffin, C. Minier, T. Burgeot, A. P. Leszkowicz & J. F. Narbonne, 2004. Biological effects of the “Erika” oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 17: 309–316.
- Bolognesi, C., A. Buschini, E. Branchi, P. Carboni, M. Furlini, A. Martino, M. Monteverde, P. Poli & C. Rossi, 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment* 333: 127–136.
- Claxton, L. D., V. S. Houk & T. J. Hughes, 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research* 410: 237–243.
- Coffinet, S., C. Cossu-Leguille, A. Bassères, J. F. Gonnet & P. Vasseur, 2008. Response of the bivalve *Unio tumidus* and freshwater communities in artificial streams for hazard assessment of methyl methacrylate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1371–1382.
- Collins, A. R., A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaiva, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith & R. Stetina, 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143–151.
- Connors, E. D. & C. M. Black, 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in Lawn Care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 362–371.
- Cossu, C., A. Doyotte, M. Babut, A. Exinger & P. Vasseur, 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 106–121.
- De Kock, W. C. & K. J. M. Kramer, 1994. Active biomonitoring (ABM) by translocation of *Bivalves mollusks*. In Kramer, K. J. M. (ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, FL: 51–84.
- De Lafontaine, Y., F. Gagne, C. Blaise, G. Costan, P. Gagnon & H. M. Chan, 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50: 51–71.
- Dixon, D. R., A. M. Pruski, L. R. J. Dixon & A. N. Jha, 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicity: a methodological overview. *Mutagenesis* 17: 495–507.
- European Commission, 2006. Directive 2006/7/EEC, Directive concerning management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. *Official Journal of European Communities L*. 64: 37–51.
- Ferrari, B., N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio & J. Garric, 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated waste waters: study of carbamazepine, clofibrac acid and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 359–370.
- Grover, S. & S. Kaur, 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 183–188.
- Guidi, P., G. Frenzilli, M. Benedetti, M. Bernardeschi, A. Falleni, D. Fattorini, F. Regoli, V. Scarcelli & M. Nigro, 2010. Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology* 100: 75–83.
- Halling, S., N. Nors, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, L. Holten & S. E. Jorgensen, 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36: 357–393.
- ICPDR, 2002. Water Quality in the Danube River Basin. *TNMN Yearbook 2002*. http://www.icpdr.org/icpdr-pages/tnmn_yearbooks.htm.
- Jha, A. N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research* 552: 1–17.
- Jha, A. N., 2008. Ecotoxicological application and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23: 207–221.
- Klobučar, G., M. Pavlica, R. Erben & D. Papeš, 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology* 64: 15–23.
- Klobučar, G., A. Štambuk, K. Hylland & M. Pavlica, 2008. Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir Bays, Croatia. *Science and Total Environment* 405: 330–337.
- Kolarević, S., J. Knežević-Vukčević, M. Paunović, J. Tomović, Z. Gačić & B. Vuković-Gačić, 2011. Anthropogenic impact on water quality of the River Danube in Serbia: microbiological analysis and genotoxicity monitoring. *Archives of Biological Science* 63: 1209–1217.

- Lehtonen, K. K., D. Schiedek, A. Köhler, T. Lang, P. J. Vuorinen, L. Förlin, J. Baršienė, J. Pempkowiak & J. Gercken, 2006. The BEEP project in the Baltic Sea: overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Marine Pollution Bulletin* 53: 523–537.
- Makala, P. & A. O. J. Oikari, 1990. Uptake and body distribution of chlorinated phenolic in the freshwater mussel, *Anodonta atina* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20: 354–362.
- Millward, G. E., S. Kadam & A. N. Jha, 2012. Tissue-specific assimilation, depuration and toxicity of nickel in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 162: 406–412.
- Nigro, M., A. Falleni, I. Del Barga, V. Scarcelli, P. Lucchesi, F. Regoli & G. Frenzilli, 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77: 339–347.
- Olive, P. L. & P. B. Judit, 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *British Columbia Cancer Research Center*. doi:10.1038/nprot.2006.5675.
- Pampanin, D. M., L. Camus, A. Gomiero, I. Marangon, E. Volpato & C. Nasci, 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 50: 1548–1557.
- Parolini, M., A. Binelli & A. Provini, 2011. Assessment of the potential cyto-genotoxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water, Air, Soil, Pollution* 217: 589–601.
- Pavlica, M., G. Klobučar, N. Mojaš, R. Erben & D. Papeš, 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research* 490: 209–214.
- Ramírez, O. A. & F. P. García, 2005. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutagenesis* 20: 291–295.
- Ravera, O., 2001. Monitoring of the aquatic environment by species accumulators of pollutants: a review, in: Ravera, O. (eds), *Scientific and legal aspects of biological monitoring in freshwater*. *Journal of Limnology* 60: 63–72.
- Regoli, F., G. Frenzilli, R. Bocchetti, F. Annarumma, V. Scarcelli, D. Fattorini & M. Nigro, 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis* during a field translocation experiment. *Aquatic toxicology* 68: 167–178.
- Richardson, M. L. & J. M. Bowron, 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37: 1–12.
- Rocher, B., J. Le Goff, L. Peluhet, M. Briand, H. Manduzio & J. Gallois, 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology* 79: 65–77.
- Roméo, M., P. Hoarau, G. Garello, M. Gnassia-Barelli & J. P. Girard, 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* 122: 369–378.
- Schwalb, A. N. & M. T. Pusch, 2007. Horizontal and vertical movements of unionid mussels in a lowland river. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 261–272.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Schneider, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184–191.
- Smolders, R., L. Bervoets, V. Wepener & R. Blust, 2003. A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human and Ecological Risk Assessment* 9: 741–760.
- Soares-da-Silva, I. M., J. Ribeiro, C. Valongo, R. Pinto, M. Vilanova, R. Bleher & J. Machado, 2002. Cytometric, morphologic and enzymatic characterization of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 132: 541–553.
- Štambuk, A., M. Pavlica, L. Malović & G. Klobučar, 2008. Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49: 217–225.
- Štambuk, A., M. Pavlica, G. Vignjević, B. Bolarić & G. Klobučar, 2009. Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*. *Ecotoxicology* 18: 430–439.
- StatSoft, Inc., 2001. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., <http://www.statsoft.com>.
- Sunjog, K., Z. Gačić, S. Kolarević, Z. Višnjić-Jeftić, I. Jarić, J. Knežević-Vukčević, B. Vuković-Gačić, & M. Lenhardt, 2012. Heavy metal accumulation and the genotoxicity in Barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube river pollution. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/351074.
- Viarengo, A., D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri & A. Koehler, 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology* 146: 281–300.
- White, P. & J. B. Rasmussen, 1998. The genotoxic hazard of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research* 410: 223–236.
- Wilson, J. T., P. L. Pascoe, J. M. Parry & D. R. Dixon, 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research* 399: 87–95.

Freshwater Mussels of the Serbian Stretch of the Tisa River

Jelena Tomović¹, Vladica Simić², Bojana Tubić¹, Katarina Zorić¹, Margareta Kračun¹, Vanja Marković¹, and Momir Paunović¹

¹ University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia; E-mail: jelena.tomovic@ibiss.bg.ac.rs

² University of Kragujevac, Institute of Biology and ecology, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

Abstract

This paper provides a list of recorded taxa and discusses the distribution and relative abundance of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida: Unionidae) along the Serbian stretch of the Tisa River. The objective of the work is to contribute to the general knowledge about the distribution and autecological characteristic of the species that could play a part in more effective assessment of ecological status. The results are especially interesting because Mollusca were found to be one of the principal components of the macroinvertebrate community in the lowland rivers. During the investigation six species of mussels were recorded. The most abundant and frequent species were found to be *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) and *Unio tumidus* (Philipsson, 1788).

Keywords: Unionoida, Tisa River, community structure

Introduction

This work is a part of a research aimed to contribute to the better knowledge on freshwater mussels, or unionids (Bivalvia: Unionoida: Unionidae). According to the EU Water Framework Directive (WFD, 2000), ecological status assessment of water bodies are primarily based on analyses of aquatic communities – Biological Quality Elements (BQEs), including mollusks as one of the most important component in large lowland rivers (in regards to number of recorded species, relative abundance and biomass) in the Danube Basin (Graf *et al.*, 2008; Paunović *et al.*, 2007, 2012; Tomović *et al.*, 2010; 2012; Tubić *et al.*, 2013). Further, freshwater mussels represent one of the most of severely endangered groups of animals due to habitat degradation, pollution pressure and introduction of alien species. Thus, the aim of this paper is to present the data needed to contribute to the knowledge of the unionids community and its use in ecological status assessment.

Study area

The Tisa Sub-Basin is the largest sub-basin of the Danube Basin. The basin area is shared by five

countries (Ukraine, Slovakia, Romania, Hungary, and Serbia). The lower, 160 km-long course of the Tisa (16.6% of the length of its main stream) is located within the territory of Serbia. The Tisa River comes from Hungary and reaches the Danube in Serbia, near Slankamen (at rkm 1215). Here only 5% of its catchments area is on the territory of Serbia, and this stretch has the typical characteristics of a lowland river (lower Tisza). In this sector, the river receives the Begej River and some smaller tributaries indirectly through the Danube-Tisza-Danube Canal System (HS DTD).

The Tisa River Basin in Serbia is under the influence of various stressors (Vasiljević *et al.*, 2010; Kolarević *et al.*, 2011) - pollution (organic, nutrient, wastewater from industrial facilities and agricultural activities) and hydromorphological degradation (cutting of the meanders, shortening, channeling, as well as gravel and sand extraction). The investigated part of the river is under the influence of untreated urban waste waters, as well as the sugar and fermentation industry wastes (Senta municipality) and effluents of the paper and cardboard industry (Novi Kneževac).

Water quality of the Tisa River was assessed as good to moderate (class II-III) based on the results of a macroinvertebrates survey (Simonović *et al.*, 2010).

Material and Methods

The study is based on the results of investigation of freshwater mussels (order Unionoida) in the Serbian part of the Tisa River during the period from 2001 to 2012. Investigation was conducted on five sampling sites along the Tisa River (Figure 1, Table 1).



Figure 1: Sampling sites along the Tisa River

Table 1: Sampling sites on the Tisa River

Sampling site	Titel	Begej River (next to the confluence)	Novi Bečej	Ada	Novi Kneževac
Latitude, N	45° 11'41,1"	45° 12'37,0"	45° 35'18,3"	45° 47' 55,57'	45° 03'17,0"
Longitude, E	20° 18'39,5"	20° 19'01,40"	20° 08'01,2"	20° 8' 50,88"	20° 05'205,9"
Altitude (m.a.s.l)	74	74	90.7	126	128
River km	9.7	9.8	72.0	103	144

Samples were collected by benthic hand nets and free diving. The coordinates of the sampling points were measured by GPS ("Garmin Etrex") and charted by using ArcView software (map 1:300,000, system WGS_1984). The analysis of autecological characteristics (AQEM 2002) was performed and discussed. Relative abundance was evaluated according to the scale presented in the Table 2.

Table 2: Scale used for the relative abundance assessment

Relative abundance	Description	Number of individuals per sample
1	present	1-2
2	low abundance	3-5
3	moderate abundance	6-50
4	high abundance	51-150
5	very high abundance	>150

Result and Discussion

During the investigation six species of freshwater mussels (order Unionida) were detected (Table 3).

Table 3: Relative abundance of mussel species per sampling sites

Taxa name / Sampling sites	Titel	Begej River	Novi Bečej	Novi Kneževac	Ada
<i>Anodonta cygnea</i> (Linnaeus, 1758)	1	0	0	0	0
<i>Pseudoanodonta complanata</i> Rossmassler 1835	0	0	1	0	1
<i>Sinanodonta woodiana</i> (Lea, 1834)	3	5	2	0	0
<i>Unio crassus</i> Philipsson, 1788	0	0	1	0	1
<i>Unio tumidus</i> Philipsson, 1788	3	1	3	2	2
<i>Unio pictorum</i> (Linnaeus, 1758)	2	1	3	2	4

The most diversified mussel fauna was identified on the Novi Bečej site (5 species). Lower taxa richness was registered on the Titel and Ada sites (4 species). Diversity on the other sampling sites was lower (Begej River, next to the confluence – 3 species and Novi Kneževac – 2 species).

The most frequent and abundant species were found to be *U. pictorum* and *U. tumidus*. *Sinanodonta woodiana* (Philipsson, 1788), *Pseudoanodonta complanata* (Rossmassler 1835) and *Unio crassus* (Philipsson, 1788), were found with a lower number of individuals and frequency of occurrence (Figures 2 - 4).



Figure 2: *U. pictorum* (up), *U. crassus* (middle) and *U. tumidus* (down)



Figure 3: *S. woodiana*



Figure 4: *P. complanata*

Swan mussel, *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758) (Figure 5) was detected only on the Titel site during the 2001 investigation (JDS-ITR Report, 2002). Recent research (from 2000 up to now) has not reported this species in lowland rivers in Serbia (Graf *et al.*, 2008; Paunović *et al.*, 2006, 2008; Tomović *et al.*, 2010, 2012) except for one finding in the Danube, downstream of the Velika Morava confluence (Tubić *et al.*, 2013). In the period 1952–1955, the species has been reported for the Nišava and Sava Rivers, but no data about abundance were presented (BAES database, Simić *et al.*, 2006). Species was reported to be frequent and abundant in the period 1992–2000 by Simić and Simić (2004) for the Iron Gate stretch of the Danube River. A report on frequent occurrence of Swan mussel along the Serbian stretch of the Danube River by Martinović-Vitanović *et al.* (2013) for a more recent period, is not in accordance with other studies of this river (Berneth *et al.*, 2002; Paunović *et al.*, 2007, 2013; Graf *et al.*, 2008) and this finding should be reconsidered. According to the presented results, Swan mussel could be assessed as endangered in the region, having in mind the decline in frequency and abundance since 2000 onward. According to the distribution presented in the BAES database (Simić *et al.*, 2006) *A. cygnea* prefers standing or very slow-flowing water and it occupies mostly bottom substrate in lakes and large ponds.



Figure 5: *A. cygnea*

Thick Shelled River Mussel *U. crassus* was recorded on the Novi Bečej (in 2001) and Ada (in 2010) sites. According to the results of the ITR international expedition (JDS-ITR Report, 2002), significant decline in population density of *U. crassus* was observed from the Middle Tisa in Hungary (685 km) to the Lower Tisa in Serbia. This species is vulnerable to changes in water chemistry, species composition of the surrounding ichthyofauna and the degradation of natural river valleys (Zajac and Zajac, 2009). It is assessed as an endangered species in Europe according to IUCN classification (Van Damm, 2011). As endangered taxa, the Thick Shelled River Mussel is of special interest, included in the European Union list of species of special

community interest (92/43/EEC), but also covered by the Serbian national regulative (Official Gazette of RS 5/2010, listed in Annex 1 – strictly protected species). The newest researches in Serbia (Paunović *et al.*, 2012; Tomović *et al.*, 2012) have shown a growth in population density of *U. crassus*. The reasons for population recovery have to be further investigated.

Other species reported for the Tisa River in this work are frequent in other lowland rivers in Serbia (Tomović *et al.*, 2010, 2012). Abundant occurrence of invasive species *S. woodiana*, previously reported for the Tisa River by Paunović *et al.* (2006), is confirmed by this study for three localities (Titel, the Begej River and Novi Bečej).

Species richness and distribution along the Tisa River could be explained by the influence of pollution but also by means of habitat richness. Composition and spatial heterogeneity of substratum are regarded as one of the most important variables controlling composition of molluscan communities, as well as species abundance (e.g. Harman, 1972; Bailey, 1988; Šporka and Nagy, 1998; Weigand and Stadler, 2000; Lewin, 2006). Substrate structure could be the factor that contributes to the capability of the sampling sites to become a suitable recipient area where the unionids population can become stable.

According to autecological metrics (AQEM, 2002), recorded taxa are characterized mostly as rheo- to limnophilous taxa (Type RL - prefers slow-flowing streams and lentic zones). All identified species are adapted to the bottom substrate types typical of large lowland rivers (substrate types pelal, psammal and argillal). In regard to a preferred zone within the river continuum (longitudinal zonation) recorded species are characteristic for the lower stretches of the rivers (hypopotamal, epipotamal, metapotamal) – potamal species (AQEM, 2002).

The Tisa River is under the influence of organic load from industrial and municipal wastewater (Vasiljević *et al.*, 2010; Kolarević *et al.*, 2011). A less diversified mussel community on the Novi Kneževac site could be explained by high levels of organic pollution and the influence of the paper and cardboard industry.

The necessity of using unionids in ecological status assessment, according to the EU Water Framework Directive (WFD, 2000) is obvious, having in mind that they were found to be the principal component of the macroinvertebrate communities in large lowland rivers. Nevertheless, there is a need for more information about the relation of mussel species and environmental variables in order to properly involve this group as indicator organisms. Variations in mussel community structure clearly indicate fine changes in the overall conditions along the river continuum. For these reasons, as well as to

be able to design effective conservation measures for mussel species, extensive research is needed in the future.

Acknowledgements

The reported work is supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project No. III-43002

References

- AQEM Consortium (2002). Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0, February 2002. Contract No: EVK1-CT1999-00027.
- Bailey, R.C. (1988). Correlations between species richness and exposure: Freshwater molluscs and macrophytes – *Hydrobiologia*, 162:183–191.
- Berneth, H., Tobias, W., Stein, S. and S. Turowski. (2002). Ecological status characterisation – Macrozoobenthos. In Literathy, P., Koller-Kreimel, V., Liska, I Joint Danube Survey, Final Report, International Commission for the Protection of the Danube River 33-64
- Graf, W., Csányi, B., Leitner, P., Paunovic, M., Chiriac, G., Stubauer, I., Ofenböck, T. and F. Wagner (2008). Macroinvertebrate. In: Liška, I., Wagner, F., J. Slobodnik, Joint Danube Survey 2 - Final Scientific Report, ICPDR - International Commission for The Protection of The Danube River, Vienna, 41-47.
- EC (2006). European Commission. Directive 2006/7/EEC, Directive concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of European Communities L 64: 37-51.
- 92/43/EEC - Council Directive of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora
- Harman, W.N. (1972). Benthic substrates: their effect on water Mollusca – *Ecology*, 53: 271–277.
- JDS-ITR National Tisza Report (2002). Report on the joint investigation of the Tisza River on the territory of the FR Yugoslavia within the international JDS-ITR Program. Republic of Serbia, Ministry for Protection of Natural Resources and Environment, Federal Hydro-Meteorological Institute, Belgrade, 1-52.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. and B. Vuković-Gačić (2011). Assessment of the Microbiological Quality of the River Tisa in Serbia. *Water Research and Management*, 1(2):57-61.
- Lewin I. 2006 – The gastropod communities in the lowland rivers of agricultural areas – their biodiversity and bioindicative value in the Ciechanowska Upland, Central Poland *Malacologia*, 49: 7–23.
- Official Gazette of RS 5/2010. The regulation on proclamation of strictly protected and protected wild species of plants, animals and fungi.
- Martinović-Vitanović, V., Raković, M., Popović, N. and V. Kalafatić (2013). Qualitative study of Mollusca communities in the Serbian Danube stretch (river km 1260–863.4). *Biologia* 68(1), 112-130.
- Paunović, M. M., Borković, S.S., Pavlović, Z.S., Saičić, S.Z. and D.P Cakić (2008). Results of the 2006 Sava survey – aquatic macroinvertebrates. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 60 (2), 265-271.
- Paunović, M., Csányi, B., Simić, V., Stojanović, B. and P. Cakić (2006). Distribution of Anodonta (Sinanodonta) woodiana (Rea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquatic Invasions* (2006) 1(3): 154-160 URL: <http://www.aquaticinvasions.ru>
- Paunović, M., Jakovčev-Todorović, D., Simić, V., Stojanović, B. and P. Cakić (2007). Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429-925). *Biologia, Bratislava* 62(2): 1-9.
- Paunović, M., Tomović, J., Kovačević, S., Zorić, K., Žganec, K., Simić, V., Atanacković, A., Marković, V., Kračun, M., Hudina, S., Lajtner, J., Gottstein, S. and A. Lucić, (2012). Macroinvertebrates of the Natural Substrate of the Sava River – Preliminary Results. *Water Research and Management* 2(4):32-39.
- Simonović, P., Paunović, M., Atanacković, A., Vasiljević, B., Simić, S., Petrović, A. and V. Simić (2010) Chapter 17 Water quality and assessment of the chemical and ecological status of the Danube River and its tributaries after records from the JDS2 Survey pp.295-310 In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). *Danube in Serbia – Joint Danube survey 2*. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.

- Simić, V. and S. Simić (2004). Macroinvertebrates and fishes in the part of the Danube flowing through the Iron Gate National Park and possibilities of their protection under in situ and ex situ conditions. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 56(1-2), 53-57.
- Simić, V., Simić, S., Petrović, A., Paunović, M., Šorić, V. and V. Dimitrijević (2006). Biodiversity in aquatic ecosystems in Serbia, ex situ conservation (BAES ex situ). <http://baes.pmf.kg.ac.rs>
- Šporka F. and S. Nagy (1998). The macrozoobenthos of parapotamon-type side arms of the Danube river in Slovakia and its response to flowing conditions – *Biologia*, Bratislava, 53:633–643.
- Tomović, J., Vranković, J., Zorić, K., Borković Mitić, S., Pavlović, S., Saičić, Z. and M. Paunović (2010). Chapter 12 Malakofauna of the Serbian stretch of the Danube River and studied tributaries (the Tisa, Sava and Velika Morava). Pp. 207-224. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). *Danube in Serbia – Joint Danube survey 2*. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.
- Tomović, J., Katarina, Z., Kračun, M., Marković, V., Vasiljević, B., Simić, V. and M. Paunović (2012). Freshwater Mussels of the Velika Morava River. *Water Research and Management* 2(4): 51-55.
- Tubić, B., Simić, V., Zorić K., Gačić, Z., Atanacković, A., Csanyi, B. and M. Paunović (2013). Stream section types of the Danube River in Serbia according to the distribution of macroinvertebrates. *Biologia*, Bratislava 2:68, 294-302, DOI: 10.2478/s11756-013-0152-z. ISSN: 0006-3088
- Van Damme, D. (2011). *Unio pictorum*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 November 2012.
- Vasiljević, M. (2010). Chapter 8 Results of physical and chemical analysis of water and sediment in the Danube River in the Danube River and observed tributaries. Pp. 103-130. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). *Danube in Serbia – Joint Danube survey 2*. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.
- Weigand E. and F. Stadler (2000). Die aquatischen Mollusken der Regelsbrunner Au – *Abh. Zool.-Bot. Ges. Österreich*, 31: 99–124. (in German).
- WFD (2000). Directive of the European Parliament and of the Council 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy. European Union, the European Parliament and Council, Luxembourg.
- Zajac, K. and T. Zajac (2009). Habitat selection of *Unio crassus*. Krakow, Poland Available at: http://www.senckenberg.de/odes/06-16/Zajac_and_Zajac_Unio-crassus-Mobility.pdf. Accessed: 08-03-2013

Freshwater mussels of the Velika Morava River

Jelena Tomović¹, Katarina Zorić¹, Margareta Kračun¹, Vanja Marković¹, Božica Vasiljević¹, Vladica Simić² and Momir Paunović¹

¹ University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Despota Stefana 142, Belgrade, Serbia; E-mail: jelena.tomovic@ibiss.bg.ac.rs

² University of Kragujevac, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia

Abstract

The aim of this paper is to present the records and relative abundance of freshwater mussels (order Unionoida) along the Velika Morava River. The objective is to contribute to the general knowledge about the distribution of the species. This information is necessary to design more effective assessment of ecological status, as well as to identify the level of endangerment and to set up a prioritisation in protection on the national level. During the investigation five species of mussels were recorded. The most abundant and frequent species was found to be Chinese Pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834), followed by *Unio crassus*, Philipson, 1788. The records of abundant population of *U. crassus* is of special interest as the species is assessed as endangered at the European and national level.

Keywords: Unionoida, Velika Morava, community structure

Introduction

Freshwater mussels (order Unionoida) are an important component of freshwater ecosystems, especially in large lowland rivers (Csanyi, 2002; Paunović et al., 2007a, 2008; Graf et al., 2008; Tomović et al., 2010). They play a significant role in functionality of ecosystems and could be effectively used as typological parameters and essential organisms in assessment of ecological status of water bodies, as described in EU Water Framework Directive (WFD 2000). Freshwater mussels represent one of the most severely endangered groups of animals due to habitat destruction, introduction of nonnative species, and loss of host fishes, which their larvae (glochidia) are obligate parasites on. Thus knowledge on the distribution of freshwater mussels could contribute to more accurate assessment of the ecological status, as well as design of protection and restoration measures such as habitat restoration or restocking of native populations.

Freshwater mussels of the Velika Morava Basin have not been investigated in a satisfactory way. This order of molluscs of the basin has been studied only as part of macroinvertebrate communities (Marković et al., 2011), or research covering a wider area (Tomović et al., 2010).

Study area

The Velika Morava River originates from the West and the South Morava Rivers. It is 175 km long. With a catchment area of 38.000 km² and mean annual flow of 230 m³ s⁻¹ (gauge station Ljubičevo, near the mouth of the Danube - Annual Water Quality Report 1999-2008), the Velika Morava is one of the major tributaries of the Danube. Over 95% of the basin is located on the territory of the Republic Serbia.

The area is densely populated and the river is under the influence of various pollution (organic, nutrient, as well as other substances originating from industry), hydromorphological pressures (cutting of the meanders, shortening, channelling, gravel and sand extraction).

Material and Methods

During the 2010-2011 macroinvertebrate survey of the Velika Morava River special attention has been placed on collecting data on the distribution of freshwater mussels (order Unionoida).

Benthic samples were collected by benthic hand nets and free diving at five sampling points (Table 1, Figure 1).

The coordinates of the sampling points were measured by GPS ("Garmin Etrex") and charted by using ArcView software (map 1:300,000, system WGS_1984).

Relative abundance was evaluated according to scale presented in Table 2.

Table 1: Sampling sites on the Velika Morava River

Sampling site	Varvarin	Ćuprija	Bagrdan	Markovac	Ljubičevo
Latitude, N	43 43.022	43 56.921	44 05.099	44 13.485	44 35.182
Longitude, E	21 23.053	21 21.873	21 11.377	21 09.215	21 7.748
Altitude (m)	130	115	102	95	72
Distance from mouth (rkm)	169.83	135.2	108.81	82.27	21.52
River bed width (m)	120	110	95	85	135

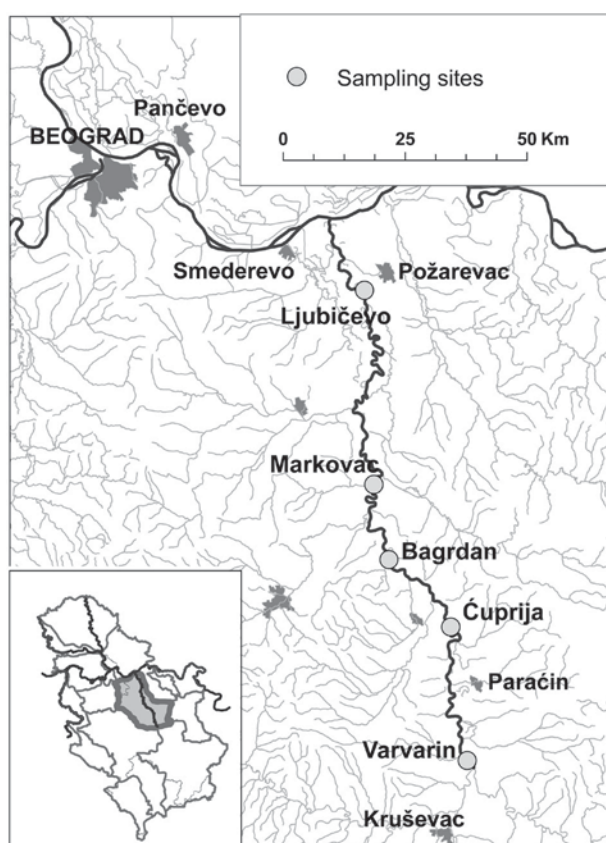


Figure 1: Sampling sites along the Velika Morava

Table 2: Relative abundance scale

Relative abundance	Description	Number of individuals
1	present	1-2
2	low abundance	3-5
3	moderate abundance	6-50
4	high abundance	51-150
5	very high abundance	>150

Result and Discussion

During the investigation five species of freshwater mussels (order Unionoida) have been detected (Table 3, Figures 2-6).

The most diversified mussel fauna was observed on the Varvarin and Markovac sites (4 species). On the Bagrdan site three species were recorded, while on the Ćuprija site, two species were detected. No mussels were recorded on the Ljubičevo site during the investigation period.

The spatial pattern in species richness could be explained by the influence of pollution, but also by means of habitat richness. Localities Varvarin and Markovac are assessed as less influenced sites according to macroinvertebrate fauna (Marković et al., 2011). At the same time, those sites, together with the Bagrdan site, are characterised by larger amounts of different microhabitats in comparison with the rest of the sites.

The absence of mussels on the Ljubičevo site could be explained by high level of organic pollution (Vasiljević, 2010; Marković et al., 2011) and less diversified habitat. Namely, on the Ljubičevo site the bottom is characterised by clay and artificial stones, which does not provide the conditions for the development of a mussel community.

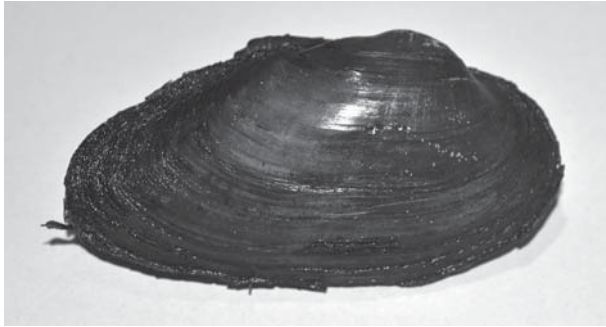
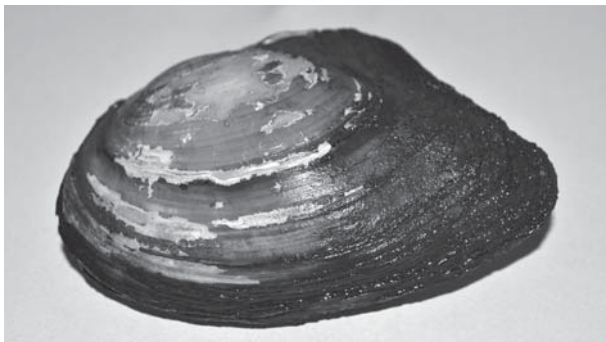
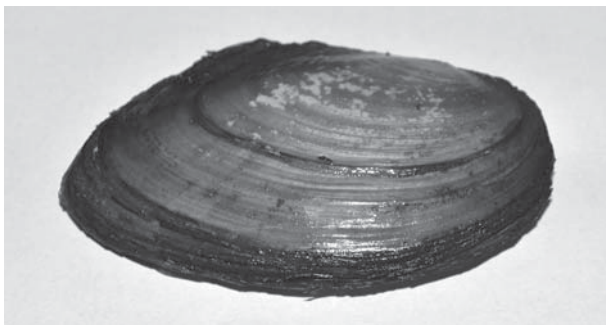
The most frequent and abundant species according to the data collected during 2010-2011 was found to be a non-indigenous mussel *S. woodiana* (Chinese Pond Mussel).

Dense population of Thick Shelled River Mussel *U. crassus* was recorded on the Varvarin, Ćuprija and Markovac sites. According to the BAES database (Simić et al., 2006), as well as our previous investigations (Tomović et al., 2010), the species was not recorded at the Velika Morava River. *U. crassus* is of special interest as endangered taxa - assessed as an endangered species according to IUCN classification (Van Damm, 2011). Further, Thick Shelled River Mussel is included in the European Union list of species of special community interest (92/43/EEC), but also covered by Serbian national regulative (Official Gazette of RS 5/2010, listed in Annex 1 – strictly protected species).

It should be underlined that during our investigations the Painter's Mussel *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) was not detected. *U. pictorum* is a species that is

Table 3: Relative abundance of mussel species per sampling sites

Taxa name / Sampling sites	Varvarin	Ćuprija	Bagrdan	Markovac
<i>Anodonta anatina</i> (Linnæus, 1758)	1	0	0	1
<i>Pseudoanodonta complanata</i> (Rossmassler 1835)	2	0	1	0
<i>Sinanodonta woodiana</i> (Lea, 1834)	3	3	3	3
<i>Unio crassus</i> (Philipsson, 1788)	1	3	0	2
<i>Unio tumidus</i> (Philipsson, 1788)	0	0	1	1

Figure 2: *Unio tumidus*Figure 3: *Unio crassus*Figure 4: *Anodonta anatina*Figure 5 *Pseudoanodonta complanata*Figure 6 *Sinanodonta woodiana*

frequent in large rivers in the region (Csanyi, 2002; Paunović et al., 2007a, 2008; Graf et al., 2008; Tomović et al., 2010). The absence of this species could be explained by high organic and nutrient pollution of the river (Vasiljević, 2010). Thus, the general water quality of the Velika Morava River could be assessed as moderate to poor (class III-IV) based on the results of the national water quality monitoring for period 1999-2008 (Annual Water Quality Report, 1999-2008). The same evaluation was provided by Marković et al. (2011) based on macroinvertebrate communities (III-IV class based on selected metrics). The Painter's Mussel was not recorded during the 2007 survey of the Velika Morava (Tomović et al., 2010) and was not reported for this river in BAES database (Simić et al., 2006). According to Van Damme (2011), based on IUCN classification, *U. pictorum* has been assessed as Least Concern, since it has a wide distribution and is tolerant to stress conditions. From the other side, the species was found to be sensitive to hydromorphological modification and competition with exotic species (Van Damme, 2011) and biodegradable pollution (Mouthon, 1996), both being assessed as considerable stressors at the Velika Morava River (SCG ICPDR National Report 2004).

The reasons of reappearance (it could be supposed that it was present in the Velika Morava River in period before 1950's) of Thick Shelled River Mussel (*U. crassus*), as well as absence of Painter's Mussel (*U. pictorum*) should be further investigated. One of the important further steps is assessment of the critical risk of extinction and the protection priorities

on a national level, not only for *U. crassus* and *U. pictorum*, but also for *U. tumidus*. For that purpose, extensive field work is needed in order to collect additional data on the distribution of freshwater mussels within aquatic ecosystems of Serbia, as well as to determine the relation of native fauna and non-indigenous bivalves, especially those characterised as invasive for the territory of Serbia (Zorić et al., 2010), especially *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Paunović et al., 2007b) and *S. woodiana* (Paunović et al., 2006). In that regards, it should be underlined that dense population of *C. fluminea* was reported for the Velika Morava River (Zorić et al., 2010; Vranković et al., 2010).

Acknowledgements

The reported work is supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Project No. III-43002

References

- Annual Water Quality Report (1999-2008). Hydrometeorological Service of Serbia.
- Csanyi, B. (2002). Joint Danube Survey: Investigation of the Tisza River. International Commission for the Protection of the Danube River, pp. 1-135.
- European Communities (1992). COUNCIL DIRECTIVE 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. Text and Annexes of the Habitat Directive. Office for Official Publications of the European Communities, 21 May 1992.
- Graf, W., Csányi, B., Leitner, P., Paunovic, M., Chiriac, G., Stubauer, I., Ofenböck, T., and F. Wagner (2008). Macroinvertebrate. In: Liška, I., Wagner, F., J. Slobodnik, Joint Danube Survey 2 - Final Scientific Report, ICPDR - International Commission for The Protection of The Danube River, Vienna, pp. 41-47.
- Marković, V., Atanacković, A., Tubić, B., Vasiljević, B., Simić, V., Tomović, J., Nikolić, V., and M. Paunović (2011). Indicative status assessment of the Velika Morava River based on aquatic macroinvertebrates. *Water Research and Management*, 1(3): 47-53.
- Mouthon, J. (1996). Molluscs and biodegradable pollution in rivers: proposal for a scale of sensitivity of species. *Hydrobiologia* 317: 221-229.
- Official Gazette of Republic of Serbia 5/2010. The regulation on proclamation of strictly protected and protected wild species of plants, animals and fungi.
- Paunovic, M., Csányi, B., Simic, V., Stojanovic, B., and P. Cakic (2006). Distribution of Anodonta (Sinanodonta) woodiana (Rea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquatic Invasions* (2006), 1 (3): 154-160 URL: <http://www.aquaticinvasions.ru>
- Paunovic, M., Jakovcev-Todorovic, D., Simic, V., Stojanovic, B., and P. Cakic (2007a). Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429-925). *Biologia, Bratislava* 62 (2): 1-9.
- Paunović, M., Csányi, B., Knežević, S., Simić, V., Nenadić, D., Jakovčev-Todorović, D., Stojanović, B., and P. Cakić (2007b). Distribution of Asian clams *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) and *C. fluminalis* (Müller, 1774) in Serbia. *Aquatic Invasions* (2007), 2 (2): 105-112. URL: <http://www.aquaticinvasions.ru>
- Paunović, M., Borković, S., Pavlović, S., Saičić, Z., and P. Cakić (2008). Results of the 2006 Sava survey – aquatic macroinvertebrates. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 60 (2): 265-271.
- SCG ICPDR National Report (2004). National Report of Serbia and Montenegro – ICPDR Roof Report, Part B. www.icpdr.org
- Simić, V., Snežana Simić, Ana Petrović, Paunović, M., Šorić, V., and V. Dimitrijević (2006). Biodiversity in aquatic ecosystems in Serbia, ex situ conservation (BAES ex situ). <http://baes.pmf.kg.ac.rs>
- Tomović, J., Vranković, J., Zorić, K., Borković Mitić, S., Pavlović, S., Saičić, Z., and M. Paunović (2010). Chapter 12 Malakofauna of the Serbian stretch of the Danube River and studied tributaries (the Tisa, Sava and Velika Morava). Pp. 207-224. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). *Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Belgrade.*
- Van Damme, D. (2011). *Unio pictorum*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 November 2012.
- Vasiljević, M. (2010). Chapter 8 Results of physical and chemical analysis of water and sediment in the Danube River in the Danube River and observed tributaries. Pp. 103-130. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). *Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University*

- of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade.
- Vranković, J., Zorić, K., Đikanović, V., Simić, V., and M. Paunović (2010). Rasprostranjenost alohtonih vrsta školjki roda *Corbicula* sa nalazima na novim lokalitetima u Srbiji. „Zaštita voda 2010“, Zbornik radova, pp. 59-62, Divčibare [In Serbian]. [Distribution of allohtonous mussel species genus *Corbicula* with findings at new localities in Serbia. "Water protection 2010", Conference Proceedings, pp. 59-62, Divčibare].
- WFD (2000). Directive of the European Parliament and of the Council 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy. European Union, the European Parliament and Council, Luxembourg.
- Zorić, K., Vranković, J., Cakić, P., Tomović, J., Vasiljević, B., Simić, V., and M. Paunović (2010). Chapter 15 Introduced species of aquatic macroinvertebrates. pp. 267-280. In: Paunović, M., Simonović, P., Simić, V. & S. Simić (eds.). Danube in Serbia – Joint Danube survey 2. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Directorate for Water, University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute for Biology and Ecology, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade.