

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Stefan P. Anđus

Slatkovodni sunderi (Porifera, Spongillidae) zapadnog
Balkana i Panonske nizije: morfološko-genetička
studija

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

University of Belgrade
Faculty of Biology

Stefan P. Andus

Freshwater Sponges (Porifera, Spongillidae) of the
Western Balkan and Pannonian Plain: a morpho-
genetic Study

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

MENTORI

Dr. Momir Paunović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr. Vera Nikolić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Dr. Momir Paunović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr. Vera Nikolić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr. Bojana Tubić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

DATUM ODBRANE:

Zahvalnica

Veliko hvala mom mentoru dr Momiru Paunoviću, sa kojim sam napravio prve korake u istraživanju slatkovodnih ekosistema i koji je imao sluha za moja interesovanja. Mnogo su mi značili neposredna i otvorena komunikacija i razgovori koji su doveli do izbora ove neobične teme. Hvala na savetima i smernicama, na ukazanom poverenju, podršci i slobodi da na svoj način prokrčim put kroz neutabane staze sveta slatkovodnih sunđerera.

Duboku zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Veri Nikolić, uz koju nije bilo prostora za negativne misli i uz čije sam savete prevazišao brojne prepreke, umišljene ili realne. Zahvaljujem se i na konstruktivnim predlozima koji su doprineli strukturisanju ove disertacije.

Zahvaljujem se kolegini dr Nađi Nikolić na strpljenju i svesrdnoj pomoći u delikatnom delu posla vezanom za genetiku.

Koleginici dr Bojani Tubić iskreno se zahvaljujem na posvećenom vremenu i velikoj pomoći na terenima na kojima ni jedan kamen nije ostao neprevrnut u grozničavoj potrazi za sunđerima. Hvala i na pažljivom čitanju ove disertacije i korisnim sugestijama.

Zahvaljujem se drugarici i kolegini Jeleni Đuknić, neustrašivom terencu, koja je bila uz mene na najzahtevnijim lokalitetima i pratila me ispod površine hladnih jezera širom Balkana.

Iskreno sam zahvalan kolegama iz Prirodnjačkog muzeja u Skoplju, koji su mi omogućili pristup njihovoj zbirci i time obogatili ovu studiju.

Veliko hvala svim kolegama, prijateljima i poznanicima koji su, misleći na mene, zagazili u baru, reku ili jezero i ulovili mi uzorak „nečega“, ispalo to na kraju sunđer ili ne.

Zahvaljujem se svojoj porodici na navijanju, podsticajima i uvek prisutnom zdravom humoru.

Dedi Radetu, glavnom „krivcu“ za moju fascinaciju prirodom

SAŽETAK

Uvod

Slatkovodni sunđeri predstavljaju zanimljivu grupu bentosnih organizama sa važnom ulogom u akvatičnim ekosistemima. Ciljevi ove studije bili su identifikacija različitih vrsta slatkovodnih sunđera u lentičkim i lotičkim ekosistemima Zapadnog Balkana i Panonske nizije, procena njihove rasprostranjenosti u ispitivanom regionu, kao i analiza distribucije vrsta u odnosu na parametre okruženja - fizičko-hemijske karakteristike vode i na prisustvo zagađivača.

Materijali i metode

Istraživanjem je obuhvaćen 171 lokalitet na Dunavu i Savi, kao i na rekama i jezerima Srbije, Severne Makedonije i Crne Gore. Identifikacija sunđera izvršena je svetlosnom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom skeletnih elemenata (spikula) dobijenih nakon digestije sunđera u HNO₃. Determinacija sunđera urađena je i putem genetičke analize, koja je podrazumevala izolaciju DNK, zatim PCR amplifikaciju 3D regiona 28S rDNK i njeno sekvenciranje. Podaci su statistički obrađeni u SPSS.

Rezultati

Ukupno je u toku istraživanja prikupljeno 168 primeraka sunđera. U istraživanom području identifikovano je sledećih pet vrsta (poređanih po opadajućoj učestalosti), od šest, koje trenutno žive u srednjoj Evropi: *Ephidatia fluviatilis*, *Spongilla lacustris*, *Ephidatia muelleri*, *Trochospongilla horrida* i *Eunapius fragilis*. Sunđeri su zabeleženi na 25% pretraženih lokaliteta. Abundanca, učestalost nalaza i biomasa sunđera bili su niski. Sekvenciranjem je otkriveno pet novih haplotipova.

Zaključci

Pet identifikovanih vrsta slatkovodnih sunđera su u području istraživanja pokazali neravnomernu distribuciju i nisku zastupljenost. Analizirane fizičko-hemijske karakteristike kao ni zagađivači nisu imali veći uticaj na distribuciju Porifera.

Ključne reči: Porifera, Slatkovodni sunđeri, Zapadni Balkan, Panonska nizija, mineralni skelet, spikule, 28S rDNK, morfologija, hidroekologija, filogenija.

Naučna oblast: Biologija.

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija životinja.

SUMMARY

Introduction

Freshwater sponges represent a peculiar group of benthic organisms with an important role in aquatic ecosystems. The aims of this study were to identify different species of freshwater sponges in lentic and lotic waterbodies of Western Balkan and Pannonian Plain and to assess their overall distribution in the studied region. Their distribution in relation to physico-chemical characteristics of the water bodies and to the presence of pollutants was assessed as well.

Materials and Methods

The investigation covered 171 localities on the Danube and Sava, and on rivers and lakes of Serbia, Northern Macedonia and Montenegro. Sponge identification was done by light and scanning electron microscopy of skeletal elements (spicules), obtained after sponge digestion in HNO₃. Sponge identification was also done by genetic analysis, including sponge DNA isolation followed by PCR amplification of the 3D region of 28S rDNA and its sequencing. Data were statistically analyzed in SPSS.

Results

During this research 168 samples of sponges have been collected. In the studied area, the following five Porifera species (ordered by decreasing incidence) have been identified, out of six presently extant in Central Europe: *Ephydatia fluviatilis*, *Spongilla lacustris*, *Ephydatia muelleri*, *Trochospongilla horrida* and *Eunapius fragilis*. Only 25% of explored localities harbored sponges. Sponge abundance and biomass were also very low. Sequencing revealed four new haplotypes.

Conclusions

Five identified freshwater sponges proved to be scarce and unevenly distributed along the explored region of the Western Balkan and Pannonian plain. Evaluated physico-chemical characteristics and pollutants did not seem to have a major impact on Porifera distribution.

Keywords: Porifera, Freshwater sponges, Western Balkan, Pannonian plain, mineral skeleton, spicules, 28S rDNA, morphology, hydroecology, phylogeny.

Scientific field: Biology.

Narrower scientific field: Morphology, Systematics and Phylogeny of Animals.

SADRŽAJ

1	Uvod	1
1.1	Istorijat	3
1.2	Građa suđera	4
1.3	Morfologija skeletnih elemenata suđera i njihova klasifikacija	6
1.4	Sistematika	9
1.4.1	Hexactinellida Schmidt, 1870	9
1.4.2	Calcarea Bowerbank, 1864	9
1.4.3	Demospongiae Sollas, 1885	10
1.5	Slatkovodni suđeri	10
1.5.1	Familije slatkovodnih suđera	10
1.5.2	Ekologija slatkovodnih suđera	12
1.5.3	Razmnožavanje	13
2	Ciljevi	14
3	Materijal i Metode	16
3.1	Oblast uzorkovanja	17
3.2	Prikupljanje biološkog materijala	18
3.3	Određivanje fizičko-hemijskih parametara	19
3.4	Preparacija spikula za svetlosnu i elektronsku mikroskopiju	20
3.4.1	Svetlosna mikroskopija	20
3.4.2	Skenirajuća elektronska mikroskopija	20
3.4.3	Analiza anomalija spikula	20
3.5	Izolacija DNK	20
3.5.1	Određivanje koncentracije DNK u uzorku	21
3.5.2	Amplifikacija DNK	21
3.6	Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)	23
3.7	Sekvenciranje	24
3.7.1	Prečišćavanje PCR produkta	24
3.7.2	Direktno sekvenciranje	25
3.7.3	Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja	26
3.7.4	Kapilarna gel elektroforeza	27
3.8	Konstrukcija filogenetskog stabla	27
3.9	Statistička analiza	27
4	Rezultati	28
4.1	Područje istraživanja	29
4.1.1	Dunav i Sava	29
4.1.2	Pritoke Save i Dunava i stajaće vode Srbije	30

4.1.3	Crna Gora i Severna Makedonija	32
4.2	Diverzitet sundera ispitivanog područja	33
4.2.1	<i>Ephydatia fluviatilis</i> (Linnaeus, 1759)	34
4.2.2	<i>Ephydatia muelleri</i> (Lieberkuhn, 1856)	37
4.2.3	<i>Spongilla lacustris</i> (Linnaeus, 1759)	39
4.2.4	<i>Eunapius fragilis</i> (Leidy, 1851)	42
4.2.5	<i>Trochospongilla horrida</i> Weltner, 1893	44
4.3	Muzejski primerci iz Severne Makedonije	48
4.3.1	<i>Eunapius carteri</i> (Bowerbank, 1863)	48
4.3.2	<i>Spongilla stankovici</i> Arndt, 1938	50
4.3.3	<i>Ochridaspongia rotunda</i> Arndt, 1937	51
4.3.4	<i>Spongilla prespensis</i> Hadzische, 1953	53
4.4	Distribucija Porifera u ispitivanim vodnim telima	54
4.5	Distribucija Porifera u odnosu na fizičko-hemijske karakteristike vodnih tela	55
4.5.1	Dunav i Sava	55
4.5.2	Pritoke Save i Dunava	57
4.6	Distribucija Porifera u odnosu na prisustvo zagađivača	58
4.6.1	Dunav i Sava	59
4.6.2	Pritoke Save i Dunava	60
4.6.3	Morfološke anomalije spikula	61
4.7	Objedinjena genetička i filogenetska analiza	66
4.7.1	Uporedna analiza 28S	66
4.7.2	Filogenetska analiza	68
5	Diskusija	71
6	Zaključci	82
7	Reference	84

1 Uvod

“To the natural philosopher there is no natural object unimportant or trifling. From the least of nature’s works he may learn the greatest lessons. The fall of an apple to the ground may raise his thoughts to the laws which govern the revolutions of the planets in their orbits.”

- John Herschel section 9, Preliminary Discourse on the Study of Natural Philosophy (1830).

Phylum Porifera (od grčke reči „poros“ - pora i „ferro“ - nositi, dakle „nosioci pora“), u našem jeziku poznati kao sunđer, smatraju se najstarijim metazoama na planeti. Uz grupe Ctenophora i Cnidaria spadaju i u naprimitivnije višćelijske organizme. Sunđeri nemaju telesnu simetriju, ne poseduju tkiva, pa tako, za razliku od njima evoluciono bliskih grupa, nemaju ni nervni sistem ni muskulaturu. Njihov izuzetno dug opstanak kroz istoriju živog sveta pripisuje se velikoj sposobnosti prilagođavanja klimatskim i drugim sredinskim promenama, uključujući i one najekstremnije, kao što su periodi glacijacija, koje su se odigrale više puta u toku evolutivnog života ovih organizama. Visoka adaptabilnost čini sunđere široko rasprostranjenom i veoma raznovrsnom grupom organizama. Porifera naseljavaju sva mora i okeane sveta, od priobalnih zona do dubina preko 8.000 metara, a predstavnici familije Spongillidae uspešno su naselili i najrazličitije slatkovodne ekosisteme.

Sunđeri su višćelijski organizmi izuzetno jednostavne građe, koji se često nalaze u simbiozi sa mnogobrojnim drugim organizmima, od sitnih prokariota, preko eukariota, kao što su polihete ili hidrozoe, pa sve do krupnijih makrobeskičmenjaka, poput dekapodnih rakova (Hooper and Van Soest, 2002; Manconi and Pronzato, 2002).

Sunđeri su isključivo akvatični organizmi, koji žive sesilnim životom, pričvršćeni za različite podloge – kamen, ostaci egzoskeleta vodenih životinja, spoljašnost drugih životinjskih i biljnih organizama, a često i na podvodnim delovima hidrotehničkih građevina i na različitim potopljenim predmetima.

Hrane se česticama mikroskopskih dimenzija do kojih dolaze filtriranjem vode. Posmatrano sa ekološkog stanovišta, zahvaljujući izraženom filtracionom potencijalu, Porifera imaju značajnu ulogu u prečišćavanju reka i jezera u kojima mogu dostići visoku abundancu.

Kao organizmi koji naseljavaju raznovrsna vodena staništa, uključujući i ona sa relativno visokim nivoom zagađenja, a hranu obezbeđuju filtriranjem vode, sunđeri su konstantno izloženi delovanju različitih polutanata, i mogu potencijalno da se koriste kao bioindikator u određivanju kvaliteta/ekološkog statusa voda (Rao et al., 2009). Neke studije ispituju i mogućnost njihovog korišćenja u određivanju koncentracije teških metala u vodama (Richelle et al., 1995). Pokazali su se kao korisni i u postupku procene stanja staništa, što je utvrđeno na primerima ekosistema priobalnih voda Južne Amerike (Volkmer-Ribeiro and Machado, 2007) i Afrike (Manconi and Pronzato, 2007).

Poslednjih godina vlada veliko interesovanje za korišćenje sunđera, u medicini i farmakologiji. Utvrđeno je da sunđeri sintetišu mnogobrojna bioaktivna jedinjenja sa anti-inflamatornim, anti-infektivnim i anti-neoplastičnim svojstvima (Van Soest et al., 2012). Osim toga, ovi organizmi predstavljaju odlične eksperimentalne modele za izučavanje biohemijskih puteva različitih jedinjenja (Lopp et al., 2007).

1.1 Istorijat

Sistematizacija znanja o grupi Porifera počinje još pre nove ere sa Aristotelom, koji ih je, međutim, zbog razgranatog oblika, pasivnog načina života i jednostavne građe svrstao u carstvo biljaka. Sunđeri su dugo predstavljali zagonetku prvim prirodnjacima, na šta ukazuju brojni pokušaji klasifikacije ovih organizama u ranim fazama njihovog istraživanja. O'Sullivan Beare ih je, na primer, u nedostatku boljeg rešenja, 1630. godine definisao kao organizme „ni životinje, ni biljke“, dok su drugi za ovu grupu uveli termin „nesavršene biljke“ (K'Eogh, 1735). I sam Linnaeus je sunđere svrstao u Alge. Zaslužnim za prva otkrića njihove životinjske prirode smatra se Lamarkov student i mentor mladog Darvina, Robert Edmond Grant (1793-1874.). Grant je bio škotski učenjak koji je završio medicinu, ali se bavio marinskom biologijom i zoologijom beskičmenjaka. Može se reći da su sunđeri inspirisali raniji Darwinov

rad i uopšte, zanimanje za zoologiju, pod uticajem Roberta Edmond Granta (Desmond and Parker, 2006).

Uz razvoj naprednijih mikroskopa, kod sunđera prvi put uočenava pore, njihove pokrete i strujanje vode, na osnovu čega ih objedinjuje pod zajedničkim nazivom „Porifera“. Nakon otkrića načina ishrane putem filtracije, nedostatka ćelijskog zida i prisustva slobodnoplivajućih cilijatnih embriona (larvi), konačno bivaju svrstani u carstvo Animalia (1820. godine), gde zauzimaju mesto najjednostavnijih višećelijskih organizama (Grant, 1825, 1826). Najpre su sa koralima (klasa Anthozoa) svrstavani u danas anahronu i nevažeću klasifikacionu grupu Zoophyta (životinja-biljaka, odnosno faune koja po izgledu podseća na floru). Nakon toga su, zbog jedinstvenih morfoloških karakteristika svrstani u posebno podcarstvo - Parazoa, koje su u jednom periodu delili sa vrstom *Trichoplax adhaerens* F.E. von Schultze, 1883, jedinim poznatim predstavnikom veoma specifične i primitivne grupe - Placozoa. Najzad, na osnovu detaljnih molekularnih i filogenetskih istraživanja, sunđeri su danas svrstani u grupu Metazoa.

Među prvim naučnicima koji su započeli sistematična ispitivanja sunđera i koji su zaslužni za rana saznanja o ovim organizmima svakako je i nemački zoolog Eduard Oscar Schmidt, koji je 1862. godine objavio knjigu o sunđerima Jadranskog mora „*Die Spongien des Adriatischen Meeres*“ (Schmidt, 1862). Kapitalni doprinos istraživanju slatkovodnih sunđera dao je krajem 19. veka jedan od najznačajnijih naučnika koji su se bavili ovom temom, Dr Edward Potts, koji je 1887. godine napisao detaljnu monografiju pod naslovom „*Contributions towards a Synopsis of Fresh-Water Sponges with Descriptions of Those Named by Other Authors from all Parts of the World*“ (Potts, 1887). Između ostalog zaslužan je i za termin „gemula“ koji označava propagulu, odnosno dormantno telo, koje je do tada po H. J. Carteru nazivano statoblast (Neidhoefer, 1940).

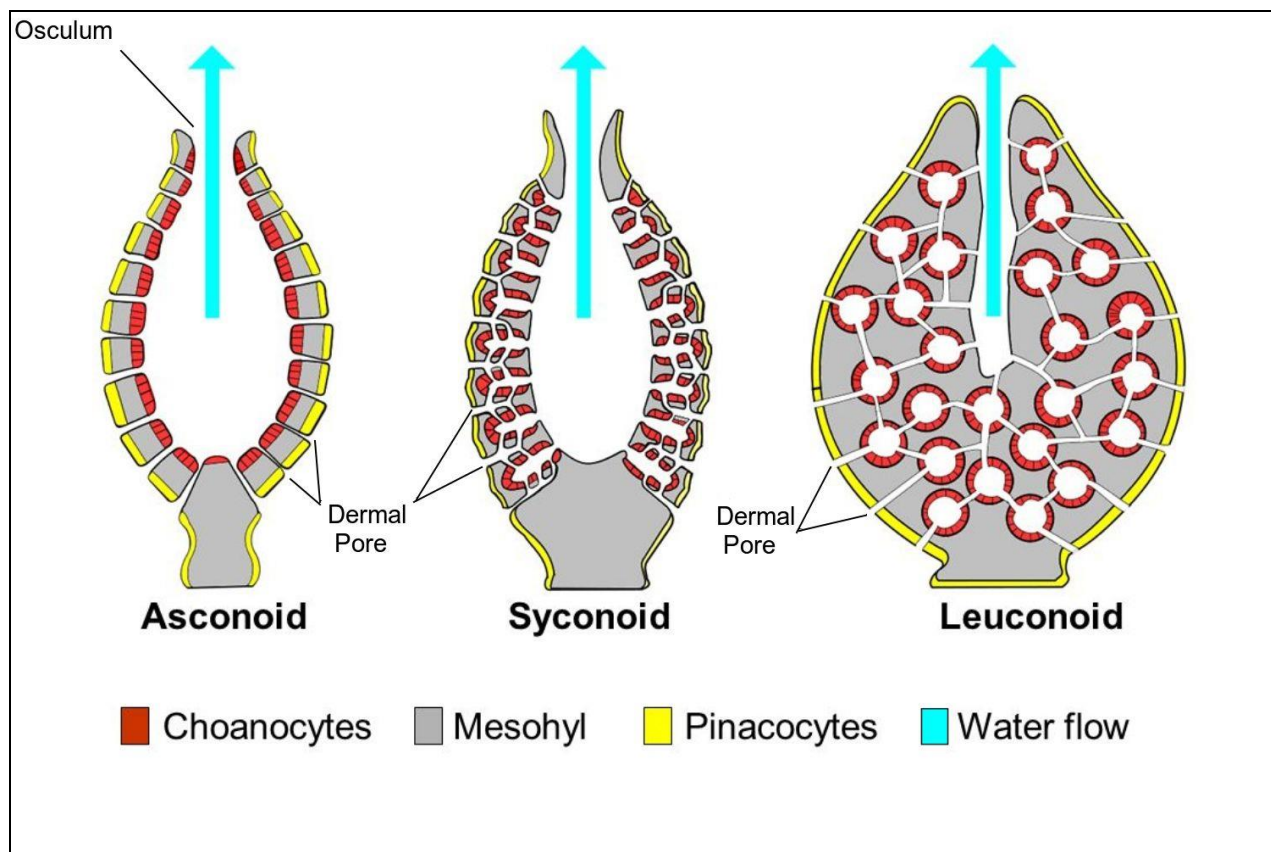
1.2 Građa sunđera

Porifera spadaju u najjednostavnije višećelijske organizme koji pripadaju carstvu Animalia, a ujedno predstavljaju i jednu od najraznovrsnijih grupa Metazoa. Ono što ih odvaja od drugih Metazoa je to što ćelije nisu povezane bazalnom membranom. Ćelije sunđera mogu slobodno da migriraju, nemaju organe ni simetriju tela, a njihova forma isključivo je prilagođena filtriranju vode u datim uslovima (Dunn et al., 2015). Poroznom telu potporu pruža organska materija spongin, koju luče specijalizovane ćelije spongocite, a kod velikog broja vrsta, pored spongina postoji i mikroskelet u obliku iglica, odnosno spikula ili sklerita od kalcijum karbonata ili silicijum dioksida (Manconi and Pronzato, 2015).

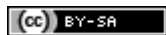
Tkivo sunđera sastoji se iz 3 sloja: tanki spoljni sloj ćelija pinakocita - pinakoderm, koji štiti telo od spoljašnje sredine; mezohil, središnji sloj u kome se nalazi nekoliko vrsta ćelija (arheocite, amebocite i dr.) i unutrašnji sloj, koji oblaže kanale, takozvani hoanoderm. Hoanoderm je važan u ishrani sunđera i sastoji se od specijalizovanih ćelija sa cilijama koje pokreću vodu sa hranljivim česticama kroz sistem pora i kanala, od ostia (ulaznih pora), kroz ulazni sistem kanala, preko izlaznog sistema, sve do osculum-a kroz koji voda izlazi iz tela sunđera (Ruppert et al., 2004).

Ovaj tip strukture zajednički je za sve sunđere. Ono po čemu se razlikuju jeste nivo složenosti organizacije, odnosno rasporeda hoanocita i razvijenosti kanala (Bavestrello and Sarà, 2009).

Među Poriferama ističu se tri osnovna tipa građe: askon, sikon i leukon tip (Slika 1). Ova podela sunđera na osnovu složenosti morfologije nije povezana sa njihovom sistematikom.



Slika 1. Tipovi građe sundera, od najprimitivnije ka najsloženijoj, s leva na desno: a) askon, b) sikon, c) leukon tip; izvor: https://www.coolgalapagos.com/animals/porifera_sponges.php



Askon tip građe je najjednostavniji, najprimitivniji tip koji se sreće samo kod nekih predstavnika klase Calcarea. Karakteriše ga cevast izgled sa velikom centralnom šupljinom, spongocelom, po čijim zidovima su raspoređene hoanocite i koja je u direktnoj vezi sa jednim centralnim otvorom, oskulumom. Telo je prožeto velikim brojem pora. Kroz ove pore voda dopire do unutrašnjeg zida, odnosno spongocela i hoanocita koje filtriraju hranljive materije i usmeravaju vodu ka oskulumu i u spoljašnju sredinu (Slika 2a) (Ruppert et al., 2004).

Sikon tip građe sličan je askon tipu, sreće se kod drugih grupa klase Calcarea. Takođe je cevast, sa centralnim otvorom – oskulum-om. Međutim, dimenzije ovih sundera su obično veće, odnosno telesni zid im je deblji i složeniji u odnosu na askon tip, jer poseduje mrežu radijalnih kanala i prstolikih zavoja zida sundera. Ovi kanali, koji se završavaju u spongocelu, predstavljaju dodatnu površinu za hoanocite kojima su obloženi, čime je povećana efikasnost filtracije (slika 2b). Voda u sunder ulazi kroz brojne dermalne otvore koji se nazivaju ostije (ostia), potom se filtrira kroz sitne otvore, prozopile, i dospeva u radijalne kanale gde hoanocite apsorbuju hranu (Simpson, 2012).

Leukon tip građe je najsloženiji tip koji se sreće kod svih predstavnika klasa Demospongiae i Hexactinellida, kao i kod nekih predstavnika klase Calcarea (Ruppert et al., 2004). Kod ovog tipa građe telo sundera prožeto je sitnijim i gušće raspoređenim komorama obloženim hoanocitama. Ostia nema, kao ni spongocela, a voda ulazi na mikroskopske pore između ćelija pinakocita koje prekrivaju spoljašnju površinu sundera. Nakon ulaska u telo, voda kroz sisteme kanala i šupljina takođe obloženih pinakocitama stiže do komora sa

hoanocitama, ulazi u komore kroz ulazne otvore, prozopile, a izlazi na apopile. Kroz izlazni sistem kanala i šupljina, takođe obložen pinakocitama, voda se skuplja do otvora za izbacivanje vode, osculum-a, kojih može biti i više. (slika 2c). Ovakvom organizacijom znatno je uvećana filtraciona površina sunđera i njihova efikasnost u iskorišćavanju hranljivih materija iz vode.

1.3 Morfologija skeletnih elemenata sunđera i njihova klasifikacija

Spikule predstavljaju osnovne elemente građe sunđera, koji se koriste u njihovoj taksonomiji i identifikaciji. Zbog velike raznovrsnosti formi, spikule su podeljene na veći broj kategorija (Bergquist, 1978).

Spikule ili skleriti najčešće su igličastog oblika i staklastog izgleda. Sačinjene su od kalcijum karbonata ili hidratisanog silicijum dioksida (SiO_2), nataloženog oko organske osovinske niti, u slučaju klase Demospongia (Hooper and Van Soest, 2002).

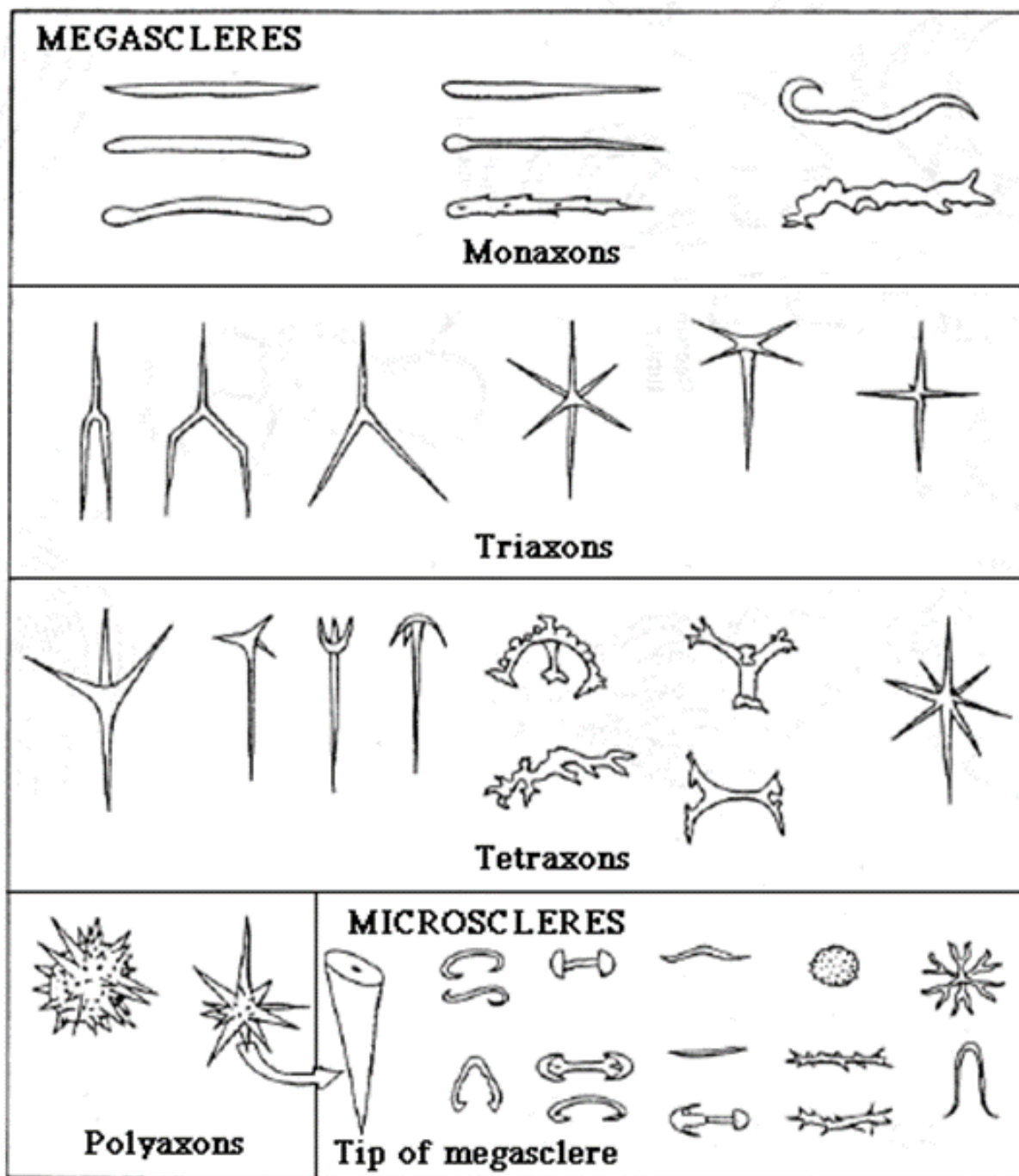
Osnovna podela spikula zasniva se na veličinskim klasama, a veličina spikula je povezana i sa njihovom funkcijom. *Megasklere* su veće i predstavljaju osnovni skeletni element tela sunđera, koji ujedno određuje i njegovu formu. *Mikrosklere* su manji skeletni elementi (Slika 2). One su utkane u mezenhimski sloj, nemaju ulogu u formiranju oblika tela, ali pružaju dodatnu potporu (Bavestrello and Sarà, 2009).

Postoji i treća klasa spikula - *gemulosklere*, koje ulaze u građu gemula, odnosno čine njihov zaštitni sloj (Slika 3). Ova vrsta spikula sreće se isključivo kod slatkovodnih sunđera. S obzirom na svoju veliku morfološku raznovrsnost, predstavljaju najvažniji element za identifikaciju i razlikovanje vrsta (Pronzato and Manconi, 2001).

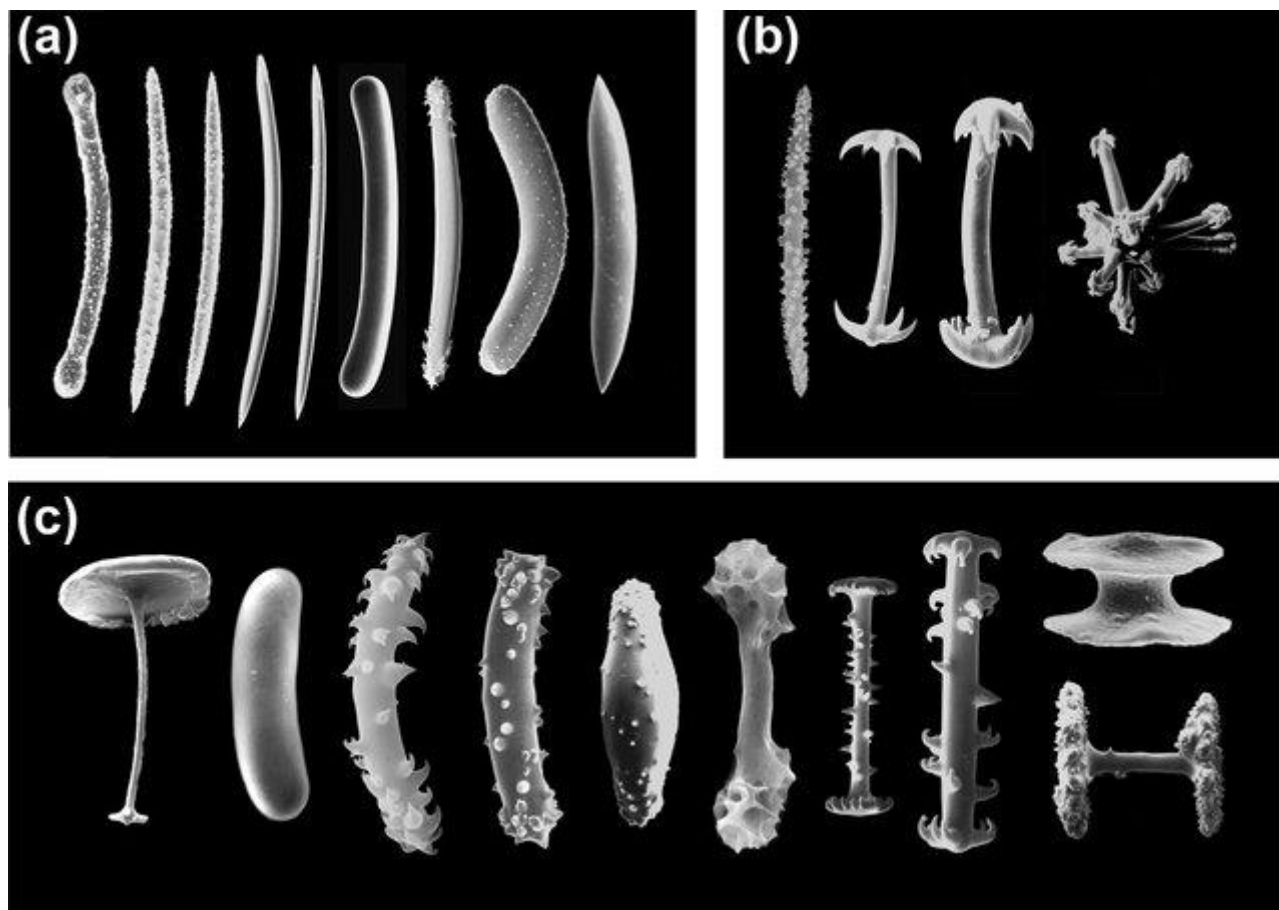
Megasklere mogu biti prave ili blago zakrivljene i dele se na osnovu broja osovina na monaksone, triaksone, tetraksone i poliaksone (Butler, 1961). Pored ovih postoje i dva reda oblika tipa sfere, sa koncentričnim rastom oko središnjeg dela i dezme, čija se osnova sastoji od nekog od prethodno navedenih tipova megasklera, na koje su nepravilno nataloženi slojevi silicijuma (karakterističan za podklasu Heteroscleromorpha, zove se još i litistidni skelet, po starom nazivu ove grupe - red Lithistida) (Boury-Esnault and Rutzler, 1997; Kelly-Borges and Pomponi, 1994). Kod slatkovodnih sunđera sreću se monoaksijalne spikule, odnosno monaksoni. Dele se na nekoliko podtipova u zavisnosti od izgleda završetaka:

- akantostile/oksee – megasklere oštarih vrhova
- strongile – megasklere koje su zatupljene/zaobljene na oba kraja
- stile – jedan kraj oštar, drugi zaobljen
- tilote – zadebljanja na oba kraja

Postoji velika raznovrsnost mikrosklera i gemulosklera. Kod evropskih sunđera, mikrosklere su kao i megasklere monaksonske, ponekad špicaste (oksee) ponekad zatupaste (mikrostrongile). Gemulosklere su takođe monaksonske, manje ili više zakrivljene, prekrivene mikrospinama ili glatke. Osim ovog oblika, mogu biti i u formi *birotule*. Ova forma se sastoji iz dve tanjiraste strukture (rotule), povezane zajedničkom osovinom (Butler, 1961).



Slika 2. Šematski prikaz osnovnih tipova građe i osa spikula (sklerita).
 Izvor: <http://paleo.cortland.edu/tutorial/Protista/porifera.htm>



Slika 3. Različiti tipovi a) megasklera, b) mikrosklera i c) gemulosklera slatkovodnih sundera (skenirajuća elektronska mikroskopija - SEM). Izvor: Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates*.

Površina gemulosklera obično je prekrivena granulacijama, tuberkulama, trnovima ili mikrospinama. Birotule, prisutne kod nekoliko rodova imaju dobro razvijene tanjiraste ili zakrivljene rotule, ponekad bodljikave, sa osovinom koja se nastavlja blago izvan površine rotule u vidu ispupčenja na obe strane. (Slika 3). *Pseudobirotule*, takođe prisutne kod nekoliko rodova, nemaju razvijene rotule već samo radijalno raspoređene kukice oko krajeva osovine. *Grozdaste gemulosklere*, složene građe, prisutne su samo kod roda *Pectispongilla*. *Parmuliformne gemulosklere*, nalaze se isključivo kod roda *Drulia*, poseduju samo jednu rotulu u bazalnom delu kratke, konusne i špicaste osovine. *Tubeliformne-boletiformne gemulosklere* tipične su za rodove *Acalle* i *Metania*. Na proksimalnom kraju tanke i glatke osovine ove gemulosklere, u ulozi potpore, nalaze se kružne rotule nepravilnog oboda, dok se na distalnom kraju nalaze izraštaji u vidu kukastih trnova.

1.4 Sistematika

Tokom evolutivne istorije Animalia, phylum Porifera odvojio se veoma rano od ostalih Metazoa i njihovi fosilni ostaci spadaju među najstarije pronađene životinjske fosile (Brain et al., 2012).

U okviru kola Porifera do sada je opisano preko 8.500 vrsta (Van Soest et al., 2012), a procenjuje se da je između 17 i 18 hiljada vrsta još uvek neotkriveno (Itskovich et al., 2013; Morrow et al., 2013). Sunđeri su pretežno morski organizmi, ali postoje, iako su manje poznati, i slatkovodni predstavnici. Ima ih u svim okeanima sveta, na svim svim dubinama. Brojnost vrsta opada ka polovima i sa porastom dubine, a najveća je u tropskom pojasu. Takoreći sve vrste žive na čvrstom supstratu, sa izuzetkom malobrojnih oblika koji žive na peskovitom ili muljevitom dnu i poseduju posebne izraštaje u vidu peteljki, bazalnih vlakana itd., koja ih odžavaju iznad rastresitog supstrata (Hogg et al., 2010).

Sunđeri vode poreklo iz kasnog prekambrija i starost im se procenjuje na oko 500 miliona godina. Do sada je otkriveno preko 900 fosilnih rodova (Rigby, 1983).

Phylum Porifera se na osnovu građe skeletnih elemenata deli na tri klase: Calcarea, Hexactinellida i Demospongiae.

1.4.1 Hexactinellida Schmidt, 1870

Ova klasa isključivo morskih silikatnih sunđera živi uglavnom na velikim dubinama i nastanjuje sve okeane sveta. Posebno je česta u oblasti Antarktika. Hexactinellida, ili staklasti sunđeri, važna su komponenta bentosnih zajednica, a ponekad mogu činiti i dominantni deo biomase dna (Barthel and Tendal, 1994; Krautter et al., 2001; Rice et al., 1990). Najstariji fosili ove klase sunđera datiraju iz Neoproterozoika (Brasier et al., 1997; Gehling and Rigby, 1996; Steiner et al., 1993) i do danas se nisu mnogo menjali (Mehl, 1996, 1992). Poznato je oko 500 recentnih vrsta koje predstavljaju 7% ukupnog biodiverziteta Porifera (Reiswig, 2002). S obzirom da su dubinski delovi okeana skoro potpuno neistraženi, pretpostavlja se da je raznovrsnost ove klase znatno veća (Janussen et al., 2004). Karakteristični su po tome što su, bez izuzetaka, vertikalno orijentisani, sa strukturama za pričvršćivanje za supstrat u osnovi tela. Uglavnom su radijalno simetrični. Cilindričnog su oblika, ponekad podsećaju na urne ili pehare, a mogu se i granati. U proseku njihove dimenzije kreću se između 10-30 cm, ali mogu biti i veći. Poseduju centralnu šupljinu (atrium), kroz koji cirkuliše voda, oskulum je pokriven isprepletanim spikulama. Boja im je uglavnom beličasta, bleđa. Karakterišu ih spikule koje se sastoje iz tri perpendikularna zraka, odnosno šest vrhova, po kojima su i dobili naziv. Spikule su često stopljene, što im daje dodatnu rigidnost (Leys et al., 2007). Imaju sposobnost da prenose signal kroz sincicalno telo bez nervnog sistema (Leys and Mackie, 1997), što je takođe njihova jedinstvena osobina. Klasa Hexactinellida se deli na dve podklase, Amphidiscophora i Hexasterophora (Reiswig, 2002), čija je osnovna i vrlo jasna razlika u građi mikrosklera, koje su kod prvih *amfidiskusi* a kod drugih *heksasteri*.

1.4.2 Calcarea Bowerbank, 1864

Ova klasa predstavlja najprimitivnije sunđere. Mineralni skelet sačinjen od kalcijum karbonata, po čemu su i dobili naziv, predstavlja njihovu sinapomorfnu karakteristiku. Ne sintetišu spongin. Obično su manjih dimenzija (do 10 cm), oblika vaze radijalne simetrije, ili u

obliku saća. Često poprimaju vrlo interesantne geometrijske oblike (Manuel et al., 2003, 2002). Predstavnici ove grupe široko su rasprostranjeni, žive isključivo u morima i, osim retkih izuzetaka, nastanjuju plitke priobalne zone tropskih mora (Rapp et al., 2011). Klasa je podjeljena na dve podklase i šest redova: podklasa Calcinea, sa redovima Clathrinida i Murrayonida, i podklasa Calcaronea sa redovima Baerida, Leucosolenida, Lithonida i Pharetronida. Ukupno je registrovano 675 vrsta (Van Soest et al., 2018).

1.4.3 Demospongiae Sollas, 1885

Ova klasa sunđera je daleko najraznovrsnija i najbrojnija. Prve dve klase čine 10-20% svih vrsta sunđera dok 80-90% vrsta pripada klasi Demospongiae. Takođe, klasi Demospongiae pripadaju i svi slatkovodni sunđeri. Mogu se naći u velikom opsegu boja, oblika i veličina. Po organizaciji pora i kanala svi pripadaju leukon tipu građe. Skelet im je građen od sponginginskih vlakana (organska materija) i mineralnih spikula od silicijuma (Kelly-Borges and Pomponi, 1994; Reitner and Mehl, 1996). Nakon detaljne globalne revizije sprovedene nakon dvehiljadite godine, klasa Demospongiae organizovana je u 14 redova sa 88 familija i 500 rodova (Hooper and Van Soest, 2002; Van Soest et al., 2018, 2012).

1.5 Slatkovodni sunđeri

Do sada je otkriveno 217 slatkovodnih vrsta, raspoređenih u 45 rodova i 6 familija: Lubomirskiidae, Malawispongiidae, Metaniidae, Metschnikowiidae, Potamolepidae i Spongillidae. Sve one pripadaju redu Spongillida Manconi & Pronzato, 2002, klasi Demospongiae Sollas, 1885 (Manconi and Pronzato, 2007). Najveći diverzitet zabeležen je u neotropskom regionu, a zatim u Palearktiku (Manconi and Pronzato, 2002).

1.5.1 Familije slatkovodnih sunđera

Ono što je slatkovodnim sunđerima omogućilo osvajanje kopnenih voda i odvojilo ih od morskih predstavnika jeste pojava gemule – rezistentnog dormantnog tela, koje im omogućava preživljavanje promenljivih uslova sredine kopnenih voda. Pretpostavlja se da se kolonizacija kopnenih voda odigrala u periodu Jure, pre 210-140 miliona godina, u oblasti Južnog Atlantika. Tokom ovog razdoblja otpočelo je razdvajanje afričkog i južnoameričkog kontinenta i Atlantik je još uvek bio fjord sa plitkim bočatim vodama, koje su karakterisale velike temperaturne oscilacije (Pearson, 1978). Ovaj zaključak potkrepljen je najstarijim registrovanim fosilom sunđera, *Paleospongilla chubutensis* iz Patagonije, koji potiče još iz perioda Mezozoika (Racek and Harrison, 1975). Uprkos starosti, ovaj fosil sadrži gemule koje sa svojim debelim pneumatskim slojem i oblogom od spikula, podsećaju na gemule recentnih vrsta. Ovo takođe govori o tome da su gemule konzervativne strukture, koje se nisu mnogo menjale tokom evolucije slatkovodnih sunđera (Manconi and Pronzato, 2002).

U nastavku su date osnovne karakteristike recentnih familija slatkovodnih sunđera.

1.5.1.1 Spongillidae Gray, 1867

Javljaju se u raznim oblicima, od loptastih do masivnih razraštaja, kao prekrivajući slojevi, ili mogu biti razgranati. Boja varira od beličasto-žučkaste do braon, a u zavisnosti od simbionata može da bude zelena, od svetlih do tamnih nijansi. Telo im je glatko ili hrapavo, konusno. U

skeletnoj građi prisutan je i spongin, ali u malim količinama. Megasklere su po tipu oksee i strongile, glatke ili hrapave, prekrivene trnolikim strukturama, ili granulisane. Mikrosklere, kada su prisutne, po tipu mogu biti oksee, strongile, zvezdaste (asteri), ili pseudobirotule. Sve vrste poseduju gemule, osim retkih vrsta koje žive u stabilnim uslovima, kakvi postoje u tropskim jezerima. Svi, osim roda *Nudispongilla*, poseduju foramen na gemulama. Tek gemule može imati jedan, dva, ili tri sloja. Gemule su uglavnom prekrivene gemulosklerama, retko su bez. Kada su prisutne, gemulosklere su uglavnom tangencijalno pozicionirane u odnosu na površinu gemule, delimično ili potpuno uronjene u teku. Oblik gemulosklera je najčešće specifičan za vrstu, sa velikom raznovrsnošću formi, od bodljikavih do glatkih, a po tipu mogu pripadati grupi oksea, strongila, birotula, pseudobirotula, itd. Kosmopolitskog su rasprostranjenja. Familija Spongillidae sadrži 21 rod:

Anheteromeyenia, *Corvoheteromeyenia*, *Corvospongilla*, *Dosilia*, *Duosclera*, *Ephydatia*, *Eunapius*, *Heteromeyenia*, *Heterorotula*, *Nudospongilla*, *Pachyrotula*, *Pectispongilla*, *Racekiela*, *Radiospongilla*, *Sanidastra*, *Saturnospongilla*, *Spongilla*, *Stratospongilla*, *Trochospongilla*, *Umborotula* i *Uruguayella*.

1.5.1.2 Malawispongiidae Manconi & Pronzato, 2002

Oblik tela može biti u vidu tankog sloja kod mlađih jedinki do većih, globularnih kod razvijenijih jedinki. Uglavnom su neelastični, tvrdi ali krhki. Postoji centralna telesna šupljina. Megasklere su po tipu oksee, špicaste ili zaobljene. Mikrosklere ne postoje, gemule i gemulosklere su takođe odsutne. Postoji pet rodova: *Malawispongia*, *Cortispongilla*, *Ochridaspongia*, *Pachydictyum* i *Spinispongilla*.

Njihova distribucija je izrazito diskontinuirana. Uglavnom se nalaze u starim jezerima: Kinneret (Srednji Istok), Malawi (Afrika), Ohrid (Istočna Evropa) i Poso (Sulawesi/Celebes, Indonezija).

1.5.1.3 Metaniidae Volkmer-Ribeiro, 1986

Telo ovih sunđera uglavnom je krupno, loptasto, u vidu bulbusa ili u vidu sloja koji prekriva supstrat. Mogu biti glatki ili hrapavi, od krhkih do veoma tvrdih i čvrstih. Kod rodova u kojima su prisutne, mikrosklere su tipa akantostongile, akantoksee, asteri ili pseudobirotule. Gemule su subsferične ili jajaste i poseduju foramen. Tek gemule uglavnom je troslojna, sa radijalno raspoređenim gemulosklerama. Gemulosklere mogu biti boletiformne-tubeliformne, parmuliformne ili u vidu pseudobirotula. Ova familija sadrži pet rodova: *Metania*, *Acalte*, *Drulia*, *Houssayella*, i *Corvomeyenia*. Rasprostranjena je u Nearktiku, Neotropima, Afrotropima, Indomalajskoj i Australijskoj zoni.

1.5.1.4 Metschnikowiidae Czerniavsky, 1880

Telo ovih sunđera je globularno ili u vidu sloja na supstratu, izrazito čvrsto. Ova porodica ne poseduje gemule. Megasklere, po tipu oksee, mogu biti glatke, sa tuberkulama, ili gusto zbijenim spinama, sa špicastim vrhovima. Mikrosklere i gemulosklere su potpuno odsutne. Postoji samo jedan, monotipski rod *Metschnikowia*, sa jednom vrstom *Metschnikowia tuberculata* Grimm, 1876. Ova vrsta nalazi se isključivo u Kaspijskom moru.

1.5.1.5 Potamolepidae Brien, 1967

Ovi sunđereri obično su krupni, sa nepravilnim lobusima, grebenima ili granama. Ponekad mogu biti i u vidu sloja na supstratu. Tvrdoća im varira, ali su uglavnom čvrsti, a površina im je najčešće glatka. Megasklere tipa strongile, variraju od glatih do granuliranih ili prekrivenih trnovima, sa proširenim krajevima. Kod rodova koji ih poseduju, mikrosklere su tanke oksee. Gemule se nalaze u bazalnom delu sunđera i u tesnoj su vezi sa supstratom. Tek se sastoji od jednog sloja spongina sa tangencijalno raspoređenim gemulosklerama. Gemulosklere su u obliku kratkih ili jajastih strongila (Manconi and Pronzato, 2015). Familija Potamolepidae sadrži šest rodova: *Potamolepis*, *Echinospongilla*, *Potamophloios*, *Oncosclera*, *Sterrastrolepis*, i *Uruguayia*. Predstavnici ove familije naseljavaju delove Afrotropa, Neotropa i Australijske regije (Copeland et al., 2015).

1.5.1.6 Lubomirskiidae Rezvoi, 1936

Oblik tela pripadnika porodice Lubomirskiidae varira od sasvim tankog sloja, preko jastučaste forme do potpuno razgranatih primeraka. Pripadnici ove familije bogati su sponginom. Megasklere su tipa oksea i strongila. Mikrosklere kod ovih vrsta ne postoje, kao ni gemule, a samim tim ni gemulosklere. Ova familija obuhvata tri roda: *Lubomirskia*, *Baikalospongia*, i *Swartschewskia*. Sva tri roda endemična su za Bajkalsko jezero (Rezvoi, 1936).

1.5.2 Ekologija slatkovodnih sunđera

Slatkovodni sunđereri široko su rasprostranjeni i često predstavljaju uobičajenu komponentu mnogih slatkovodnih ekosistema. Nastanjuju lentička i lotička vodna tela i mogu se naći u efemernim i stalnim vodenim ekosistemima, na svim geografskim širinama i u svim klimatskim pojasevima na Zemlji. Nastanjuju reke, potoke, izvore, brzake, ušća, jezera (čak i alpska i slana), pećine, bare, antropogene akumulacije, bazene, itd. (Pronzato and Manconi, 2001).

Zahvaljujući gemulama i estivaciji, odnosno hibernaciji, mogu preživeti nepovoljne uslove - visoke temperature, sušu i duge periode mrazeva. Gemula, odnosno dormantno telo, im omogućava da prežive i periode anoksije, visoku eutrofizaciju i razne vrste zagađenja – od organskog zagađenja, do povećanih koncentracija teških metala (Richelle-Maurer et al., 1994; Sarà and Vacelet, 1973). Sunđereri se smatraju sesilnim organizmima, iako postoje istraživanja koja su pokazala da manje jedinice poseduju određen nivo mobilnosti (Bond and Harris, 1988). Uglavnom su vezani za čvrstu podlogu, što podrazumeva krupno, sitno kamenje, stene, potopljene grane, korenje i vegetativne organe različitih vodenih biljaka. Često se mogu sresti i na ljušturama mekušaca, kao i na živim školjkama ili puževima. Pokazuju veliki afinitet i prema raznim vrstama antropogenih supstrata potopljenih u vodi, kao što su staklo, cement, plastika, predmeti od metala (Pronzato and Manconi, 2001). Za kolonizaciju sunđera naročito su pogodne veštačke obalne utvrde i naperi.

U nekim staništima su sporadični, sa veoma malim učešćem u ukupnoj biomasi, do su u drugim veoma abundantni (Frost, 2002; Penney and Racek, 1968; Ricciardi and Reisinger, 1993).

Sistemi za varenje i respiraciju ne postoje. Ishrana se odvija na ćelijskom nivou, holozoijski, a respiracija putem difuzije kiseonika iz spoljašnje sredine u ćelije (Ruppert et al., 2004). Oba procesa omogućena su usmeravanjem vode pokretima bičeva hoanocita kroz

sistem kanala i pora. Dermalne pore predstavljaju pore na koje voda ulazi u telo sunđera, dok spongocel predstavlja glavni otvor ka kojem svi kanali konvergiraju i kroz koji se voda, koja je već prošla kroz sistem kanala, izbacuje u spoljašnju sredinu (Langenbruch, 1983). Kao filtratorni organizmi koji apsorbuju širok spektar čestica, od zoo-fito-piko planktona, sve do rastvorene organske materije (Pile et al., 1997) i bakterija, neupotrebljivih većini drugih beskičmenjaka, sunđeri imaju značajnu ulogu u prirodnim procesima prečišćavanja vode (Lucey and Cocchiglia, 2014; Sarà, 1973). Dokazano je da sunđer veličine prsta može profiltrirati i do 125 l vode dnevno (Frost, 1978), ili po drugim procenama 1.000 puta svoju težinu za 24 časa (Reiswig, 1971). Smatra se da pokazuju sklonost ka mirnijim i čistijim vodama, u kojima je manja mogućnost začepjenja pora i sprečavanja disanja i ishrane. Međutim, neretko su pronalazeni i u zagađenijim vodama (Harrison, 1974). Sunđeri često žive u simbiozi sa jednoćelijskim algama iz roda *Zoochlorella* (Manconi and Pronzato, 2015), koje pospešuju efikasnost njihove ishrane. S obzirom na njihovu nisku nutritivnu vrednost, zbog visokog udela mineralne komponente, sunđeri nemaju mnogo predatora. Ipak, postoje primeri životinja koji se mogu hraniti i njima. U retke predatore sunđera spadaju patke (McAuley and Longcore, 1988), rakovi (Williamson, 1979), neki akvatični insekti i puževi (Frost, 1991; Resh et al., 1976).

1.5.3 Razmnožavanje

Sunđeri se razmnožavaju seksualno, najčešće hermafroditски, proizvodeći spermatozoide i jajne ćelije u različitim periodima. Sunđeri spermatozoide ispuštaju u vodu u vidu oblaka i do jajne ćelije bivaju transportovani arheocitama. Iz zigota nastaju cilijarne larve. Neke vrste sunđera larve odmah ispuštaju u spoljašnju sredinu, dok se kod drugih one zadržavaju u telu (Ruppert et al., 2004). Sunđeri se takođe razmnožavaju aseksualno, pupljenjem, ili formiranjem otpornih diseminacionih telašaca gemula. Gemule sadrže sve neophodne ćelije za nastanak nove jedinke, zaštićene višeslojnom opnom od posebne vrste spikula – gemulosklera i proteinskog omotača – spongina. Ova dormantna diseminaciona telašca u stanju su da prežive duge i hladne zime, kao i visoke letnje temperature, pa čak i velike suše. Kada se ponovo uspostave povoljni sredinski uslovi, iz gemula se formiraju nove jedinke (Erpenbeck et al., 2020; Manconi and Pronzato, 2007).

Iz svega prethodno navedenog proističe da sunđeri predstavljaju veoma zanimljivu grupu organizama, značajnu za akvatične ekosisteme. Vodeni ekosistemi jugoistočne Evrope, Zapadnog Balkana, pa i izvesni delovi Panonske nizije slabo su istraženi u pogledu prisustva slatkovodnih sunđera, zastupljenosti određenih vrsta i njihove precizne distribucije (Andjus et al., 2019a, 2019b). Takođe, postoje i mnoge nepoznanice u pogledu delovanja faktora sredine na rasprostranjenje Porifera u zavisnosti od tipa lokaliteta i njegovih fizičko-hemijskih karakteristika. Pored toga, neophodna su i nova znanja o slatkovodnim sunđerima, kako bi se sagledala mogućnost uključanja ove grupe u sisteme ocene ekološkog statusa vodenih ekosistema kao indikatora opšte degradacije, ili indikatora posebnih vidova zagađenja, kao što je prisustvo teških metala i metaloida.

Stoga smatramo da naša studija predstavlja značajan korak u istraživanju ove grupe organizama, a njeni ciljevi koncipirani su kako bi se doprinelo upotpunjavanju znanja o taksonomiji, autekološkim karakteristikama slatkovodnih sunđera, kao i o njihovom aktuelnom rasprostranjenju.

2 Ciljevi

Predmet ove doktorske disertacije je analiza raznovrsnosti i distribucije slatkovodnih sunđerica na području zapadnog Balkana i Panonske nizije na osnovu klasičnih i molekularnih metoda taksonomske analize, kao i ispitivanje delovanja faktora sredine na njihovu rasprostranjenost i diverzitet.

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- utvrđivanje prisutnih vrsta Porifera u Dunavu i Savi, njihovim glavnim pritokama u Srbiji, u jezerima Srbije i u jezerima i rekama Crne Gore i Severne Makedonije na osnovu:

a) analize spikula primenom svetlosne mikroskopije;

b) analize spikula skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM);

c) analize sekvence 3D domena 28S ribozomske DNK;

- utvrđivanje rasprostranjenosti Porifera u vodnim telima ispitivanog područja;

- korelisanje rasprostranjenosti Porifera sa fizičkim i hemijskim parametrima spoljašnje sredine, odnosno vode (temperatura, pH, koncentracija kiseonika, električna provodljivost, prisustvo organskih i neorganskih jedinjenja) i

-korelisanje rasprostranjenosti Porifera i pojave anomalija u građi spikula sa prisustvom teških metala.

3 Materijal i Metode

Materijal je prikupljen prilikom realizacije istraživanja obavljenih u okviru Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (IBISS), Univerziteta u Beogradu. U sklopu ove doktorske disertacije prisustvo sunđera ispitivano je u više tipova vodnih tela, od velikih međunarodnih reka do tokova lokalnog karaktera, kao i stajaćih voda.

3.1 Oblast uzorkovanja

Terenski rad i uzorkovanja sprovedena su u tri faze.

Najveći broj uzoraka sa Dunava obezbeđen je zahvaljujući međunarodnom projektu monitoringa ove reke - ekspedicije „Zajedničko ispitivanje Dunava“ („Joint Danube Survey 3“ - JDS 3) realizovane u periodu avgust - septembar 2013. godine. Međunarodna komisija za zaštitu reke Dunav („International Commission for the Protection of the Danube River“ – ICPDR) svakih šest godina organizuje međunarodnu ekspediciju (JDS), u kojoj učestvuju naučnici iz svih podunavskih zemalja. Veliki broj različitih vrsta uzoraka (vode za mikrobiološka i hemijska testiranja, fitoplanktona, fitobentosa, makrofitna, makrozoobentosa, ihtiofaune, itd.), prikupljen je sa plovnog dela Dunava, koji obuhvata sektor dužine od 2.500 km, od Regenzburga (Nemačka) do delte (Rumunija i Ukrajina).

U okviru međunarodnog projekta GLOBAQUA („Upravljanje efektima višestrukih stresora u uslovima nedostatka vode“ - the European Union's Seventh Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement No 603629), tokom perioda od 01. do 10. septembra 2014. i 2015. godine, prikupljen je materijal iz Save (duž celog toka reke - 937 km). GLOBAQUA projekat, koji pripada projektima Sedmog okvirnog programa Evropske Unije za istraživanje, tehnološki razvoj i ogledne aktivnosti (FP7 projekat), bavi se istraživanjem efekata višestrukih stresora u uslovima nedostatka vode, sa ciljem da se poboljša upravljanje vodama i modifikuju zakonodavne mere kako bi se prilagodile novonastalim uslovima u životnoj sredini.

Treća faza podrazumevala je uzorkovanje pritoka Save i Dunava u Srbiji i istraživanje lokaliteta u Crnoj Gori i Makedoniji. Ispitane su sve glavne pritoke odnosno sledećih 16 reka: Tisa, Velika Morava, Zapadna Morava, Ibar, Južna Morava, Nišava, Drina, Jadar, Uvac, Zložnica, Kolubara, Mlava, Pek, Borska reka, Porečka reka, Beli i Crni Timok.

Pored ispitivanih tekućih voda, istraživanja su vršena i na sledećim jezerima i akumulacijama Srbije: Perućac, Zaovine, Potpeć, Palić, Ludoš, Bela reka, Duboki potok, Pariguz, Srebrno jezero, Zavoj i Bovan.

Treća faza je pripremljena na osnovu analize dostupnih podataka o tipovima voda područja ispitivanja, odnosno uzimajući u obzir staništa na kojima se sunđeri potencijalno mogu detektovati.

Teritorija Republike Srbije se prema opštim karakteristikama može podeliti na dva regiona: Panonski basen (severno od Dunava) i brdsko-planinski region (južno od Dunava). Prelazno područje čini sliv reke Save, nizvodni deo sliva Drine i deo sliva Kolubare. Brdsko-planinsko područje je raznovrsnije u pogledu opštih prirodnih karakteristika u odnosu na znatno homogeniju oblast severno od Dunava, što pogoduje rasprostranjenju flore i faune, uključujući i vodene organizme. Reke Srbije pripadaju slivovima Jadranskog, Egejskog i Crnog mora (Gavrilović and Dukić, 2002), od kojih je najveći crnomorski sliv (92% teritorije Srbije).

Sve veće reke pripadaju ovom basenu, a preko Dunava se ulivaju u Crno more. Jadranski sliv zahvata približno 5% površine Srbije, dok Egejski sliv koji je najmanji, zahvata približno 3% teritorije.

Reke Crne Gore pripadaju Crnomorskom i Jadranskom slivu. Jezera u planinskom delu Crne Gore su ledničkog porekla. Najznačajnija od njih su Plavsko, Biogradsko, Šasko i Crno. Najveće jezero Crne Gore, a ujedno i celog Balkanskog poluostrva, je Skadarsko jezero. Ono je po tipu kriptodepresija (površina mu je iznad, a dno ispod nivoa mora), i predstavlja najzanimljivije i diverzitetom najbogatije jezero u Crnoj Gori (Marković, 1990).

U Crnoj Gori ispitivane su reke Komarnica, Piva, Tara i Morača, a od stajaćih voda Plavsko i Skadarsko jezero.

Severna Makedonija deli se na tri reljefne celine: Zapadna Severna Makedonija, središnji deo ili Povardarje i Istočna Severna Makedonija. Najveći deo zemlje pripada Egejskom slivu, preko reke Vardar, dužine 388 km (od toga 301 km u Severnoj Makedonij). Manji deo je u Jadranskom slivu preko reke Crni Drim i njegovih pritoka, a Crnomorskom slivu pripada reka Binačka Morava. U Severnoj Makedoniji nalaze se i tri značajna prirodna jezera, Dojransko, Prespansko i Ohridsko. Ohridsko jezero spada među najstarija jezera na planeti. Flora i fauna Severne Makedonije odlikuje se velikom raznovrsnošću i prisustvom brojnih endemskih vrsta (Marković, 1990).

U Severnoj Makedoniji istraživanja su vršena na velikim jezerima Dojran, Prespan i Ohrid.

Deo podataka dobijen je na osnovu pregleda uzoraka koji su dobijeni iz Prirodnjačkog muzeja u Skoplju.

3.2 Prikupljanje biološkog materijala

Na svim pomenutim rekama i jezerima, ukupno je pregledan 171 lokalitet, od toga je na 46 ustanovljeno prisustvo sunđera. Sakupljeno je 168 primeraka sunđera (u proseku 2-3 po lokalitetu). Nakon uzorkovanja i fotografisanja sunđeri su odlagani u etanol.

S obzirom da sunđeri retko bivaju detektovani standardnim metodama istraživanja akvatičnih makrobeskičmenjaka, bio je neophodan monitoring specifičnih staništa i ciljano pretraživanje supstrata (stene i kamenje, korenje, potopljeni debla i granje, betonski blokovi nasipa i dr.). Manje reke koje su po pravilu bile pliće i koje je bilo moguće pregaziti, pretraživane su celom širinom. Veće reke su pretraživane u priobalnim zonama u transektima od 100 metara dužine sa oko metar širine, do dubine od 1,5 m. Jezera su pretraživana pretežno ronjenjem, do dubine od oko 10 m. Detaljno je pregledan veliki broj pogodnih supstrata na kojima bi potencijalno sunđeri mogli da rastu (Slika 4).

Kvantifikacija

Izvršena je i procena abundance prema modifikovanoj metodi Droschner-a (Droschner et al., 1993), po sledećim kriterijumima:

- male pojedinačne kolonije označene su kao abundanca 1 (kada je na lokalitetima pronađen samo jedan ili par primeraka);
- kada je na lokalitetu bilo više od 2-3 kolonije, a manje od 10 ovo je označeno kao abundanca 2;
- preko 10 primeraka po lokalitetu označeno je abundancom 3;



Slika 4. a) Izgled lokaliteta na manjoj reci na kome je utvrđeno prisustvo sunđera. b) Potopljeno granje sa velikom kolonijom *E. fluviatilis* na Savi kod Ostružnice.

3.3 Određivanje fizičko-hemijskih parametara

Na terenu su mereni sledeći fizički i hemijski parametri: temperatura vode, električna provodljivost odnosno konduktivitet, pH i zasićenost kisenikom. Temperatura je merena digitalnim termometrom TFA EN 13485, a ostali parametri instrumentima HANNA HI 9126, HI 9146, i HI98130 (HANNA Instruments), odnosno digitalnim pH-metrom, oksimetrom i meračem konduktiviteta. Ostatak podataka iskorišćenih u istraživanju preuzet je iz godišnjeg izveštaja Agencije za zaštitu životne sredine. Fizičko-hemijski parametri koji su na osnovu literaturnih podataka uzeti kao relevantni za život sunđera i koji su ušli u statističku analizu su sledeći: temperatura vode, pH, elektroprovodljivost, suspendovane materije, rastvoreni kiseonik, zasićenje kiseonikom, ukupna tvrdoća vode, rastvoreni ugljen dioksid, bikarbonati, ukupne rastvorene soli, silikati, i kalcijum. U obzir su uzete prosečne vrednosti parametara na nivou celog toka reke, za period od šest meseci (juni-novembar) koji odgovara periodu uzorkovanja. Ovaj period smatra se optimalnim za prikupljanje sunđera (Schletterer and Eggers, 2006), pošto se očekuje da je tada vegetativno telo sunđera, zajedno sa gemulama, dovoljno razvijeno.

Deo podataka preuzet je iz godišnjih izveštaja o kvalitetu vode Agencije za zaštitu životne sredine – Ministarstvo zaštite životne sredine Republike Srbije, za period 2015-2018, kao i iz JDS3 izveštaja Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav („International Commission for the Protection of Danube River“ - ICPDR). Preuzeti parametri su: suspendovane materije, ukupna tvrdoća vode, rastvoreni ugljen dioksid, bikarbonati, ukupne rastvorene soli, silikati, i kalcijum.

Po istom principu su korišćeni podaci iz godišnjeg izveštaja Agencije za zaštitu životne sredine, za prisustvo polutanata u rekama (nitrata, ortofosfata, natrijuma, hlorida, gvožđa, mangana, cinka, bakra, olova, aluminijuma i žive).

3.4 Preparacija spikula za svetlosnu i elektronsku mikroskopiju

Da bi se omogućilo posmatranje finih karakteristika i razlika u mikroskeletu sunđera, neophodno je da se njihove spikule što bolje izoluju, što se postiže rastvaranjem okolnog organskog tkiva. Za ovaj proces postoji više metoda, a najčešće upotrebljavani reagensi su varikina i azotna kiselina. U ovom radu korišćena je metodologija preparacije spikula opisana od strane Manconi i Pronzato (Manconi and Pronzato, 2015), koja podrazumeva rastvaranje organske materije pomoću koncentrovane azotne kiseline (65% HNO₃). Pincetom i makazama, od svakog uzorka odvaja se fragment sunđera veličine 2-5 mm, pri čemu treba obratiti pažnju da se zahvate i gemule koje su obično, ako ih ima, vidljive golim okom. U maloj posudi komad sunđera se po potrebi ispiraprvo vodom, a zatim 96% etanolom kako bi se uzorak oslobodio od primesa mulja, peska, kamenčića, drugih organizama, itd., a zatim se ostavlja na sušenje oko sat vremena na sobnoj temperaturi (ili u sušnici da bi se proces ubrzao). Osušeni fragment stavlja se u staklenu epruvetu od 50 ml i preliva sa oko 5 ml koncentrovane 65% HNO₃. Uzorak se ostavlja u kiselini minimum 24 časa, kako bi se mineralna komponenta oslobodila od organske. Nakon 24 časa, dobija se talog spikula na dnu epruvete. Pipetom, koja mora biti posebna za svaki uzorak, kako bi se izbegla kontaminacija, izvlači se i uklanja kiselina, a zatim preliva sa sličnom količinom destilovane vode (5 ml). Ovaj proces ponavlja se dva do tri puta kako bi se isprala zaostala azotna kiselina. Najzad, pri poslednjem pipetiranju, destilovana voda zamenjuje se 96% etanolom.

3.4.1 Svetlosna mikroskopija

Za pripremu preparata spikula za svetlosnu mikroskopiju, kap suspenzije sa spikulama se iz epruvete pipetom nanosi na pokrovno staklo. Kada alkohol ispari, preko spikula se nanosi kap kanada balzama a pokrovno staklo spušta na predmetnu pločicu. Preparat se zatim zagreva na izvoru toplote, postepeno, dok se isparljiva komponenta balzama skoro potpuno ne oslobodi. Nakon hlađenja, preparat je spreman za posmatranje.

3.4.2 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Za skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM), kapi suspenzije spikula u etanolu se nanose na držače uzoraka obložene zlatom u zlatnom raspršivaču, na 18 mA tokom 1 minuta. Uzorci su analizirani i fotografisani na Institutu za fiziku - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu na VEGA TS 5133MM SEM-u, u režimu visokog vakuma, koristeći detektor za sekundarne elektrone (SE), sa ubrzavajućim naponom.

3.4.3 Analiza anomalija spikula

Na preparatima pripremljenim za svetlosnu mikroskopiju ispitano je i prisustvo deformisanih, nestandardnih oblika spikula. Preparati su u celini pregledani i sve anomalije su klasifikovane i pobrojane. S obzirom da su se preparati značajno razlikovali po ukupnom broju spikula bilo je neophodno utvrditi njihov broj u svakom uzorku. On je izračunat prebrojavanjem svih spikula u 5 vidnih polja na uvećanju od 20x, iz čega je izračunata prosečna vrednost po vidnom polju, a taj broj pomnožen sa ukupnim brojem vidnih polja na preparatu. Oblici i učestalosti anomalija zabeleženi su tamo gde ih bilo. Najzad, broj anomalija izražen je na 1.000 spikula. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara i koncentracija teških metala u vodi su korelisani sa prisustvom anomalija.

3.5 Izolacija DNK

Uzorci koji su korišćeni za ekstrakciju genomske DNK su najpre osušeni na 56 °C, a potom homogenizovani u rastvoru za lizu (u odnosu težina:zapremina 1:5), koji sadrži 4 M guanidin hidrohlorid, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,05 M EDTA, 20 mg / mL proteinaze K i 1% β-merkaptetanol. Suspenzija je inkubirana na 50 °C tokom jednog sata. Zatim je dodata ista

zapremina smeše fenol/hloroform (u odnosu 1:1), uz blago mućkanje da bi rastvor bio što homogeniji. Nakon ovog koraka vrši se centrifugiranje na 3.000 obrtaja u trajanju od 5 minuta kako bi se odvojile organska i vodena faza. Vodena faza odvaja se u čistu mikrotubu. Po potrebi se postupak može ponoviti više puta, dok se ne izdvoji bistra vodena faza. Zatim se nalije identični volumen smeše fenol/hloroform/izoamilalkohol (u odnosu 25:24:1) i nežno mućka da bi se postigla homogenost. Rastvor se ponovo centrifugira se na 3.000 obrtaja u trajanju od 5 minuta radi ponovnog razdvajanja faza. Vodena faza prebacuje se u novu mikrotubu. Dodaje se 2-3 volumena hladnog apsolutnog etanola (-20 °C), 1/10 volumena tromolarnog natrijum acetata i blago se mućka dok DNK u vidu belog končića ne postane vidljiva u rastvoru. Centrifugira se nekoliko sekundi i etanol se odliva. Zatim se talog (DNK) ispira sa hladnim 70% etanolom (-20 °C) i ostavlja da se osuši na vazduhu, na sobnoj temperaturi. DNK se potom rastvara u destilovanoj vodi (u ~200 µl).

Određivanje koncentracije DNK vrši se pomoću spektrofotometra.

3.5.1 Određivanje koncentracije DNK u uzorku

Za određivanje koncentracije DNK neophodno je merenje apsorbance rastvora na 260 i 280 nm na spektrofotometru (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Nemačka). Vrednost apsorbance na 260 nm omogućava računanje koncentracije DNK u uzorku, a vrednost apsorbance izmerene na 280 nm daje količinu proteina u uzorku. Čistoća uzorka procenjuje se na osnovu vrednosti odnosa ovih apsorbanci ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). Uzorak DNK zadovoljavajuće čistoće (bez kontaminacije proteinima) ima odnos $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ oko 1.8 (Hernandez-Rodriguez, 2012).

Vrednost $A_{260\text{nm}}$ merilo je koncentracije DNK: jedna jedinica $A_{260\text{nm}}$ (OD = 1, od engl. optical density), predstavlja količinu DNK sadržanu u 1 ml rastvora i 1 OD na 260 nm za dvolančanu DNK jednako je koncentraciji od 50 ng/µl.

Postupak rada je bio sledeći: pripremani su rastvori 1 µl DNK u 50 µl vode, kako bi se postiglo razblaženje od 50 x. Nakon očitavanja vrednosti $OD_{260\text{nm}}$, koncentracija se računa prema formuli: $OD_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{faktor razblaženja}$.

Na primer, ukoliko je $OD_{260\text{nm}} = 1,2$, onda je koncentracija DNK u uzorku:

$1,2 \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 50 = 3.000 \text{ ng}/\mu\text{l}$, odnosno 3 µg/µl.

3.5.2 Amplifikacija DNK

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) je *in vitro* sinteza, odnosno umnožavanje specifične, željene DNK sekvence, koja u značajnoj meri imitira proces replikacije unutar ćelije (Hernandez-Rodriguez, 2012). Ovo umnožavanje segmenta DNK katalizovano je termostabilnom Taq polimerazom. Eksponencijalna amplifikacija željenog DNK fragmenta postiže se ponavljanjem ciklusa denaturacije DNK, hibridizacije prajmera za matične lance DNK i potom ekstenzije (elongacije) hibridizovanih prajmera od strane enzima Taq polimeraze (MBI Fermentas, Vilnius, Litvanija).

PCR reakcija odvija se u mikrotubama u PCR aparatu (Peqlab PeqSTAR 2X; Erlangen, Nemačka), a reakciona smeša, zapremine obično između 25 i 50 µL, podvrgnuta je strogo definisanim, cikličnim promenama temperature (Hernandez-Rodriguez, 2012). U ovom slučaju PCR je izveden u 25 µl reakcione smeše koja sadrži između 100 i 500 ng DNK sundera, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 µM svakog od nukleotida (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), 0.5 µM svakog primera i jednu jedinicu Taq polimeraze (Tabela 1). Reakciona smeša u koju je umesto uzorka DNK dodata voda, služila je kao negativna kontrola.

Tabela 1. Komponente reakcione smeše za PCR.

MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
10 x PCR pufer	2,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
prajmer F (5 µM)	0,5 µL
prajmer R (5 µM)	0,5 µL
ddH ₂ O	16,5 µL
Taq polimeraza	0,2 µL
DNK uzorak (c = 200 µg/ µL)	3,0 µL

DNK je denaturisana na 95° C u trajanju od 3 min, a inicijalna denaturacija je zatim praćena sa 35 ciklusa denaturacije na 94° C tokom 45 s, hibridizacije prajmera na 55° C tokom 45 s, i ekstenzije na 72° C, tokom 1 min, sa finalnom ekstenzijom na 72° C tokom 5 min (Tabela 2).

Tabela 2. Temperaturni profil PCR reakcije.

	35 ciklusa			
Inicijalna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna ekstenzija
3 minuta	45 sekundi	45 sekundi	1 minut	5 minuta
94°C	95°C	55 °C	72°C	72°C

Korišćen je par prajmera koji specifično prepoznaje D3 domen 28S DNK i čije su sekvence, kao i dužina generisanog amplikona date u Tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju 28S DNK sunđera.

Gen	Sekvenca prajmera	Dužina PCR produkta
28S	5' - GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA - 3'	340 bp
	5' - TCG GAG GGA ACC AGC TAC TA - 3'	

Nakon reakcije umnožavanja ciljnog fragmenta DNK, dobijeni amplikoni su podvrgnuti elektroforezi na poliakrilamidnom gelu.

3.6 Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Gel elektroforeza se zasniva na različitoj pokretljivosti molekula u električnom polju. Pokretljivost zavisi od nekoliko faktora i svi imaju bitan uticaj na kretanje molekula kroz gel: molekulska masa, prostorna konformacija, a iznad svega količina naelektrisanja (od presudnog značaja za smer kretanja makromolekula u električnom polju). DNK molekul je bogat fosfatnim grupama koje ga čine negativno naelektrisanim. Ovakvo ravnomerno raspoređeno naelektrisanje omogućava kretanje ovog makromolekula od katode (negativne elektrode) ka anodi (pozitivnoj elektrodi).

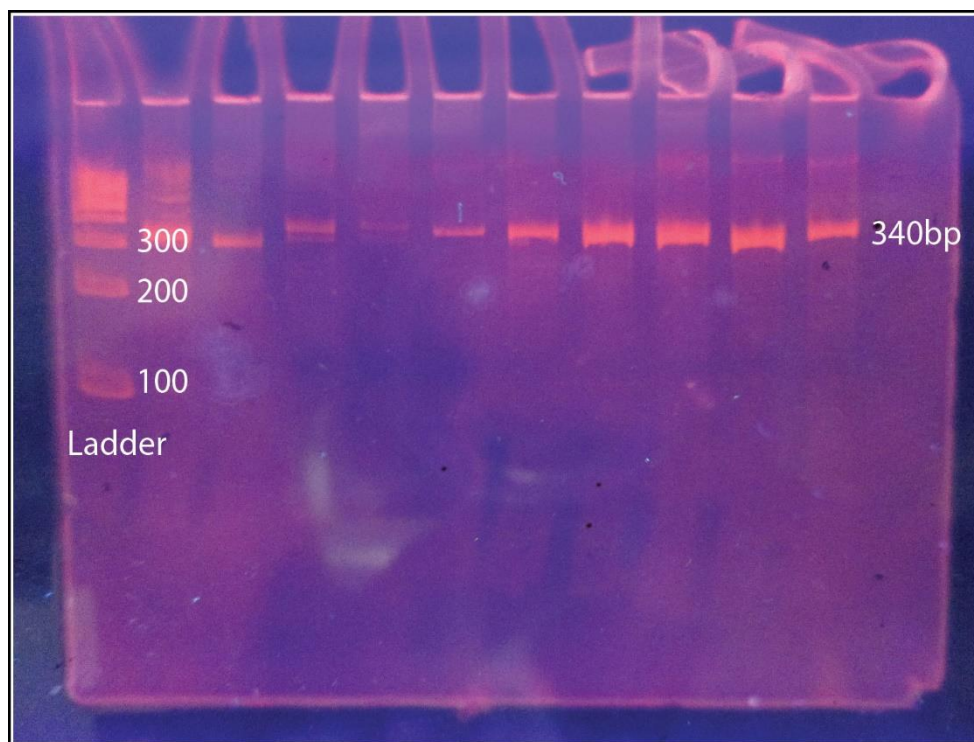
Polimerizacijom monomera akrilamida dobijaju se dugački lanci polimera, među kojima bis-akrilamid formira poprečne veze, te se na taj način dobija mrežasta struktura. Inicijatori i katalizatori reakcije polimerizacije akrilamida su amonijum persulfat (APS) i N, N, N', N'- tetrametiletilendiamin (TEMED). U tabeli 4 su dati odnosi zapremine komponenti poliakrilamidnog gela (Barril and Nates, 2012).

Tabela 4. Sastav 8% poliakrilamidnog gela.

ddH₂O	3,9 mL
5 x TBE pufer	1,3 mL
Akrilamid / bis-akrilamid (40%)	1,3 mL
APS (10%)	46 µL
TEMED	8,4 µL

Uspešnost PCR reakcije, odnosno prisustvo PCR produkata, provereno je analizom produkata vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. PAGE je jedna od najčešće korišćenih metoda za razdvajanje nukleinskih kiselina, zbog velike brzine kojom može da se izvede i visoke rezolucije (Barril and Nates, 2012).

Za potrebe ovog istraživanja elektroforeza je rađena na 8% poliakrilamidnom gelu (Tabela 4) u 1 x TBE puferu, pri konstantnom naponu struje od 200 V, u trajanju od oko 45 minuta. Da bi produkti PCR-a postali vidljivi, gel je nakon potapan u vodeni rastvor etidijum bromida, koji se kao interkalirajući agens ugrađuje unutar molekula DNK koji fluorescira kada se osvetli UV svetlom na transiluminatoru. Prisustvo fluorescentne trake ciljnog fragmenta detektovano je poređenjem položaja ispitivanih PCR produkata sa položajem DNK fragmenata poznatih dužina u gelu, odnosno standardom poznatim kao lestvica ili "ladder" (Slika 5).



Slika 5. Poliakrilamidni gel sa PCR produktom 28S DNK.

3.7 Sekvenciranje

3.7.1 Prečišćavanje PCR produkta

U postupku sekvenciranja koriste se produkti dobijeni PCR-om, kao što je prethodno opisano. Osim željenog PCR produkta u reakcionoj tubici se nalaze i preostali neugrađeni nukleotidi kao i neiskorišćeni prajmeri koji mogu negativno da se odraze na proces sekvenciranja. Kako bi se ovo izbeglo, PCR produkti moraju da prođu najpre kroz proces prečišćavanja da bi se odstranile sve nečistoće (višak nukleotida i prajmera) (Joshi and Deshpande, 2010).

Za suđere je korišćeno takozvano enzimsko prečišćavanje uz upotrebu dva enzima: egzonukleaza I (*Fermentas*, Nemačka) i alkalna fosfataza (Fast alkaline phosphatase) istog proizvođača. Egzonukleaza razlaže jednolančane molekule DNK, drugim rečima uklanja neugrađene prajmere, dok alkalna fosfataza oslobađa 5'- i 3'- fosfatne grupe sa neugrađenih nukleotida.

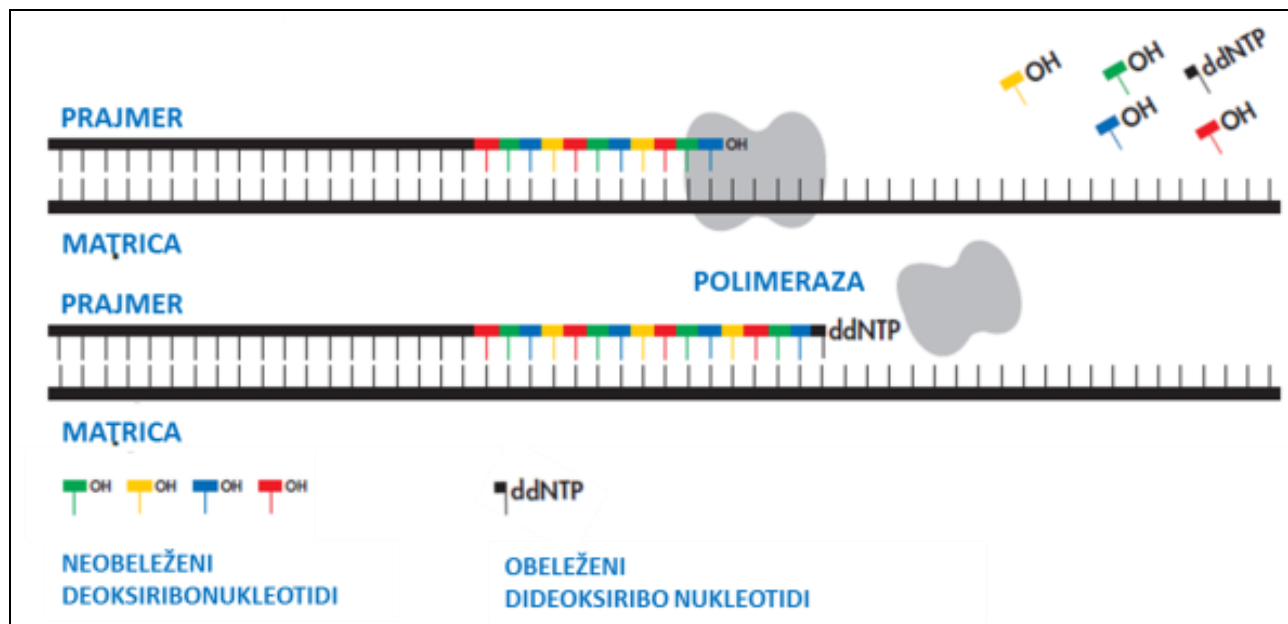
Reakcija se odvija na sledeći način:

- pripremi se smeša enzima koja se sastoji od 20 U egzonukleaze i 2 U alkalne fosfataze (po uzorku);
- 2 μ l ove enzimske smeše se dodaje u 5 μ l PCR produkta;
- inkubacija PCR produkata i enzima traje 15 minuta i odigrava se na 37° C;
- sledi inaktivacija enzima u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 80° C.

Reakcija je pripremana na ledu, a inkubacija i inaktivacija su izvedene u aparatima koji se koriste i za PCR. Ovako prečišćeni uzorci se mogu čuvati na 4°C do nedelju dana, ili na -20°C tokom dužeg vremenskog perioda.

3.7.2 Direktno sekvenciranje

Metoda “direktnog sekvenciranja” koja je primenjena u ovoj disertaciji se naziva *Dye-terminator* sekvenciranje i u reakciji se koriste dideoksiribonukleozid trifosfati obeleženi različitim fluorescentnim bojama (Sanger et al., 1977). Za reakciju su potrebni DNK matrica, DNK polimeraza, jedan prajmer i smeša 2'-deoksiribonukleotid-trifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP). Pored toga se dodaje i smeša dideoksiribonukleotid-trifosfata (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP), koji su fluorescentno obeleženi različitim bojama (Wong et al., 2019).



Slika 6. Prikaz principa sekvenciranja po metodi terminacije sinteze DNK lanca (preuzeto i modifikovano sa <http://www.qiagen.com>).

U toku procesa sekvenciranja sintetiše se novi lanac DNK, sve dok se umesto 2'-deoksiribonukleotida ne ugradi 2',3'-dideoksiribonukleotid (Slika 6). Kada se ovo desi, dolazi do prekida sinteze, jer se za dideoksiribonukleotid ne može vezati sledeći nukleotid. Na taj način se dobija DNK fragment koji na svom 3' kraju ima fluorescentno obeleženi 2',3'-dideoksiribonukleotid (Smith et al., 1986). Ugradnja fluorescentno obeleženih ddNTP je stohastički proces, koji zavisi od koncentracije ovih gradivnih jedinica u reakcionoj smeši. Kao produkt reakcije sekvenciranja dobija se smeša fragmenata različitih dužina.

Za sekvenciranje potrebna je matrica i odgovarajući prajmer dok su ostale komponente obezbeđene u komercijalnom kitu *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies, SAD).

Reakcija sekvenciranja se izvodi na sledeći način (Smith et al., 1986):

- Pripremljena je smeša za sekvenciranje sledećeg sastava:
 - 2 µl 5X pufera za sekvenciranje (BigDye® Terminator Sequencing Buffer),
 - 0,5 µl BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix-a,

- 0,2 µl prajmera,
 - redestilovane vode do ukupne zapremine reakcije od 10 µl.
- U reakciju se dodaje prečišćen PCR produkt (za produkte veličine od 200 do 500 bp, u koje spada i D3 domen 28S DNK, dodaje se 3–10 ng po reakcionoj smeši).
 - Reakcija sekvenciranja se sastoji od inicijalne denaturacije na 96 °C u trajanju od 3 minuta, zatim 25 ciklusa koji se sastoje od denaturacije na 96 °C u trajanju od 20 sekundi, hibridizacije na 50 °C u trajanju od 5 sekundi i elongacije na 60 °C u trajanju od 4 minuta.

Reakcija je pripremljena na ledu, a izvedena u aparatu za PCR. Produkti reakcije su čuvani u mraku na 4 °C.

3.7.3 Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja

Produkti sekvenciranja se prečišćavaju kako bi se uklonili neiskorišćeni gradivni elementi, kao i ostale komponente reakcione smeše (fluorescentni ddNTP, na prvom mestu, da ne bi remenio očitavanje fluorescentnog signala koji potiče od ugrađenih nukleotida u fragmentima DNK koji se analiziraju) (Smith et al., 1986).

Primenjen je protokol prečišćavanja precipitacijom uz upotrebu etanola i natrijum-acetatom (Walker and Lorsch, 2013). Do precipitacije DNK dolazi usled formiranja jonskih veza između jona natrijuma i fosfatnih grupa u DNK. Na ovaj način u talogu ostaju fragmenti DNK, a u supernatantu neugrađeni nukleotidi koji će se odbaciti. Nakon precipitacije talog je rastvoren u formamidu koji denaturiše DNK fragmente i održava ih u jednolančanoj konfiguraciji kako bi mogli biti analizirani tehnikom kapilarne gel elektroforeze.

Prečišćavanje reakcije sekvenciranja i denaturacija DNK molekula urađeni su prema instrukcijama proizvođača na sledeći način:

- u ukupnu količinu reakcije od 10 µl dodata je ista količina redestilovane vode, 2 µl 3M Na-acetata i 50 µl 99% etanola, navedenim redosledom;
- inkubacija je trajala 15 min. na sobnoj temperaturi, u mraku;
- uzorak je centrifugiran na 13.000 rpm tokom 15 min.;
- supernatant je pažljivo uklonjen pipetiranjem;
- zatim je dodato 70 µl 70% etanola;
- uzorak je centrifugiran na 13.000 rpm tokom 10 min.;
- supernatant je ponovo uklonjen pažljivim pipetiranjem;
- potom je talog osušen na 90 °C (tokom dva minuta, sa otvorenim poklopcima tubica);
- na osušen talog naliveno je 20 µl formamida i tubica je vorteksovana oko 10 sek.;
- DNK je denaturisana na 95°C tokom 2 min.;
- uzorci u formamidu su čuvani na -20 °C do elektroforeze.

3.7.4 Kapilarna gel elektroforeza

Razdvajanje fragmenata dobijenih sekvenciranjem vrši se kapilarnom gel elektroforezom koja predstavlja visokosenzitivnu metodu zasnovanu na principima klasične tehnike gel elektroforeze, ali se izvodi u tankoj staklenoj kapilari (Barril and Nates, 2012; Swerdlow et al., 1990). Visoka moć rezolucije ove metode omogućava takođe razdvajanje fragmenata koji se razlikuju u dužini za samo jednu bazu. Ekscitacija fluorescentnih boja na 3' kraju DNK fragmenta i detekcija svetlosne emisije pomoću CCD kamere (svaka boja ima specifičnu talasnu dužinu) omogućava vizuelizaciju fragmenata. Informacija se softverski obrađuje, odnosno, automatski se dobija podatak o svakom ugrađenom nukleotidu. Korišćen uređaj je automatski sekvenator ABI3500 (Life Technologies, SAD).

Sekvence su analizirane korišćenjem Sequencher softvera (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), proverene su čitanjem u oba smera uz pomoć BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) pretraživača i poređenjem sa sekvencama iz banke gena (GenBank) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8 Konstrukcija filogenetskog stabla

Za prikupljene sušdere, urađeno je filogenetsko stablo primenom Neighbor-Joining (NJ) metode u programu MEGA 7 (Saitou and Nei, 1987). Procenat iteracija (replikata) stabla u kojima su se srodni (povezani) uzorci grupisali u bootstrap testu (5.000 replikata) prikazan je uz grane. Analiza je obuhvatila 57 nukleotidnih sekvenci od ukupno 340 baznih parova. Za izračunavanje evolutivnih distanci korišćen je Kimura dvoparametarski metod (Kimura, 1980), a distance su izražene u broju baznih supstitucija po lokusu. Kao „outgroup“ korišćen je isti region morskog sušdera *Scopalina ruetzleri* (AY561872) iz banke gena (GenBank).

3.9 Statistička analiza

Statistička obrada podataka urađena je korišćenjem deskriptivnih i analitičkih statističkih metoda.

Od deskriptivnih metoda korišćeni su:

- apsolutni i relativni brojevi (%);
- mere centralne tendencije (aritmetička sredina) i
- mere disperzije (standardna devijacija, minimum, maksimum).

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su:

- Hi kvadrat (χ^2) test za utvrđivanje razlika u distribuciji sušdera u različitim rekama;
- ANOVA i
- Studentov t-test.

Dobijeni rezultati su obrađeni pomoću statističkog programa SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) i prikazani tabelarno. Sve prikazane p vrednosti bile su *two-sided* i ukoliko je vrednost bila manja od 0,05, vrednosti dobijene odgovarajućim statističkim testom su smatrane statistički značajnim.

4 Rezultati

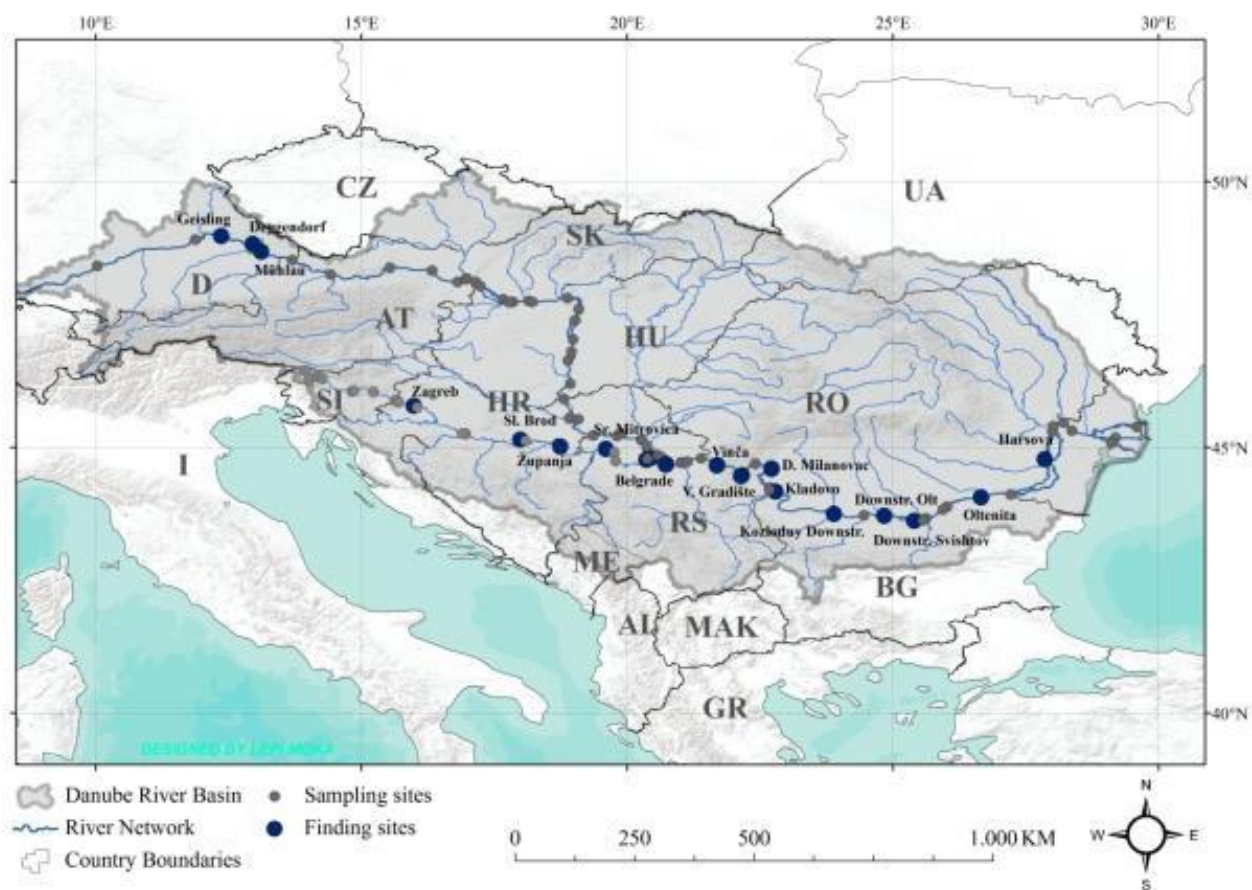
4.1 Područje istraživanja

Uzorkovanje sunđera obavljeno je u nekoliko faza. Prva faza studije odvijala se u okviru međunarodnih projekata, i obuhvatala je ispitivanje dve velike evropske reke, Savu i Dunav. U drugoj fazi su ispitane pritoke ove dve reke i druga vodna tela Srbije. Treća faza obuhvatala je analizu materijala iz Crne Gore i Makedonije. Prema ovim celinama biće izloženi i rezultati istraživanja koji se odnose na distribuciju sunđera.

4.1.1 Dunav i Sava

Uzorkovanje sunđera na Dunavu bilo je omogućeno zahvaljujući učešću IBISS-a u JDS projektu (Joint Danube Survey), ekstenzivnom istraživanju Dunava koje se redovno sprovodi u šestogodišnjim intervalima u svrhu njegovog sveobuhvatnog monitoringa. U sklopu trećeg ovakvog monitoringa (JDS 3), koji je sproveden tokom 2013. godine ispitano je 68 lokaliteta u sledećim državama: Nemačka, Austrija, Mađarska, Srbija i Rumunija (Slika 7). Od pretraženih lokaliteta sunđeri su nađeni na svega 17. Sunđeri su pronađeni u Nemačkoj, Rumuniji i Srbiji. Iako Nemačka i Rumunija ne pripadaju području obuhvaćenim ovom studijom, zbog sveukupno malog broja prikupljenih uzoraka i materijal iz ove dve zemlje uključen je u analizu. Nije prikupljen nijedan primerak iz austrijskog i mađarskog dela Dunava. Mesta na kojima su sunđeri pronađeni su sledeća: Degendorf, Muhlau (Nemačka), Smederevo, Veliko Gradište, Donji Milanovac, Golubac, Kladovo, Vinča, Novi Sad, Ram, Radujevac, Brza Palanka, Tekija (Srbija), Hiršova (Rumunija). Na ovih 17 lokaliteta sakupljeno je ukupno 38 primeraka sunđera.

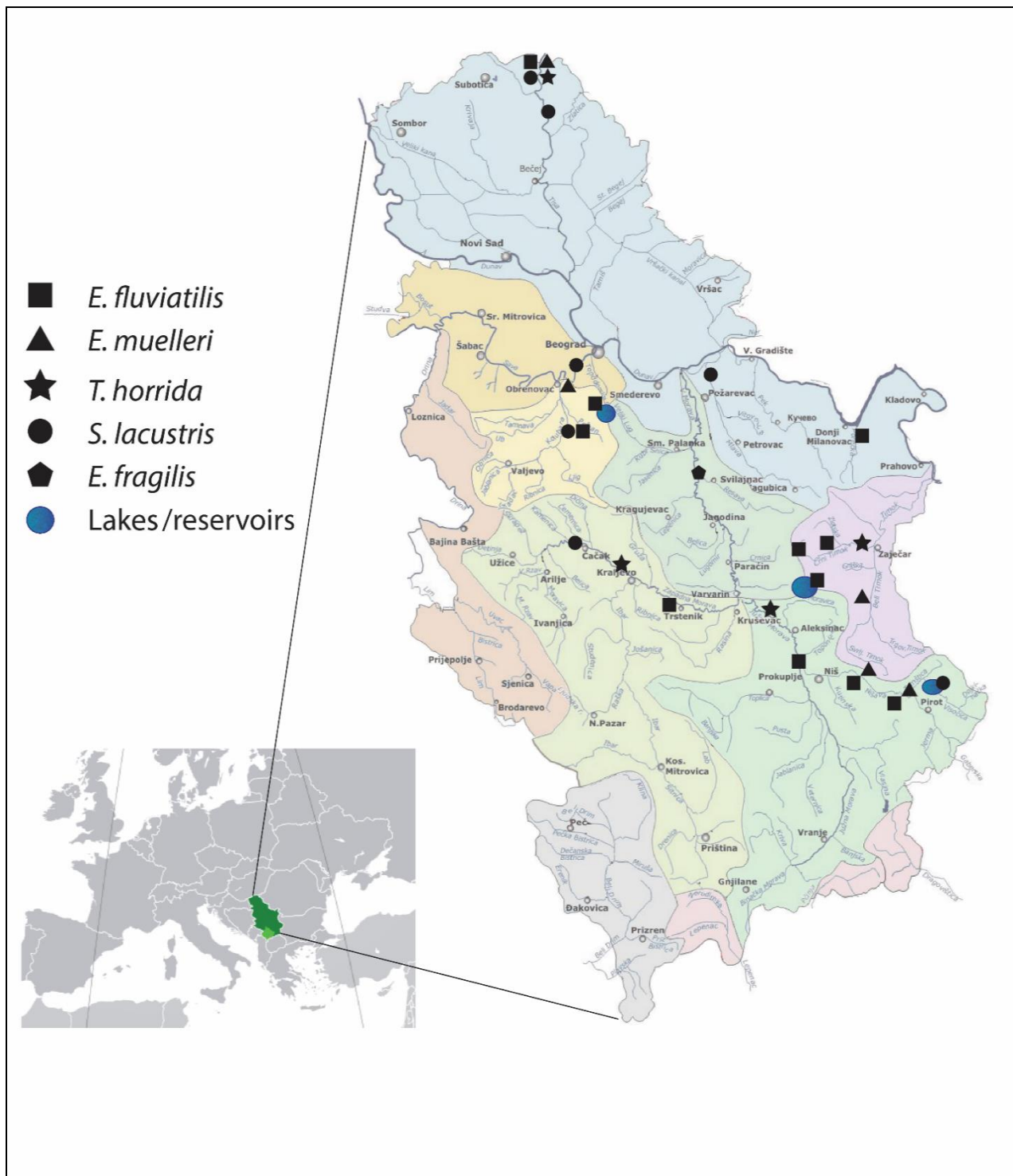
U sklopu međunarodnog projekta GLOBAQUA koji je za cilj imao upravljanje multiplim stresorima na akvatične ekosisteme u uslovima vodnog deficita, ispitana je duž celog svog toka i reka Sava (Slika 7). Od 20 pretraženih lokaliteta od izvora u Sloveniji, do ušća u Dunav u Srbiji, na svega 7 je utvrđeno prisustvo sunđera. U slovenačkom delu Save nisu pronađeni primerci sunđera, dok u hrvatskom i srpskom jesu i to na sledećim lokalitetima: Slavonski Brod i Županja u Hrvatskoj, i Duboko, Ostružnica, Novi Beograd (2 lokaliteta) i Beograd (kod Sajma), u Srbiji. Na ovih 7 lokaliteta pronađeno je ukupno 26 primeraka Porifera.



Slika 7. Mapa lokaliteta uzorkovanja na Dunavu i Savi; veće tačke označavaju lokalitete na kojima su nađeni slatkovodni sunderi; manje tačke označavaju mesta uzorkovanja na kojima prisustvo sundera nije zabeleženo.

4.1.2 Pritoke Save i Dunava i stajaće vode Srbije

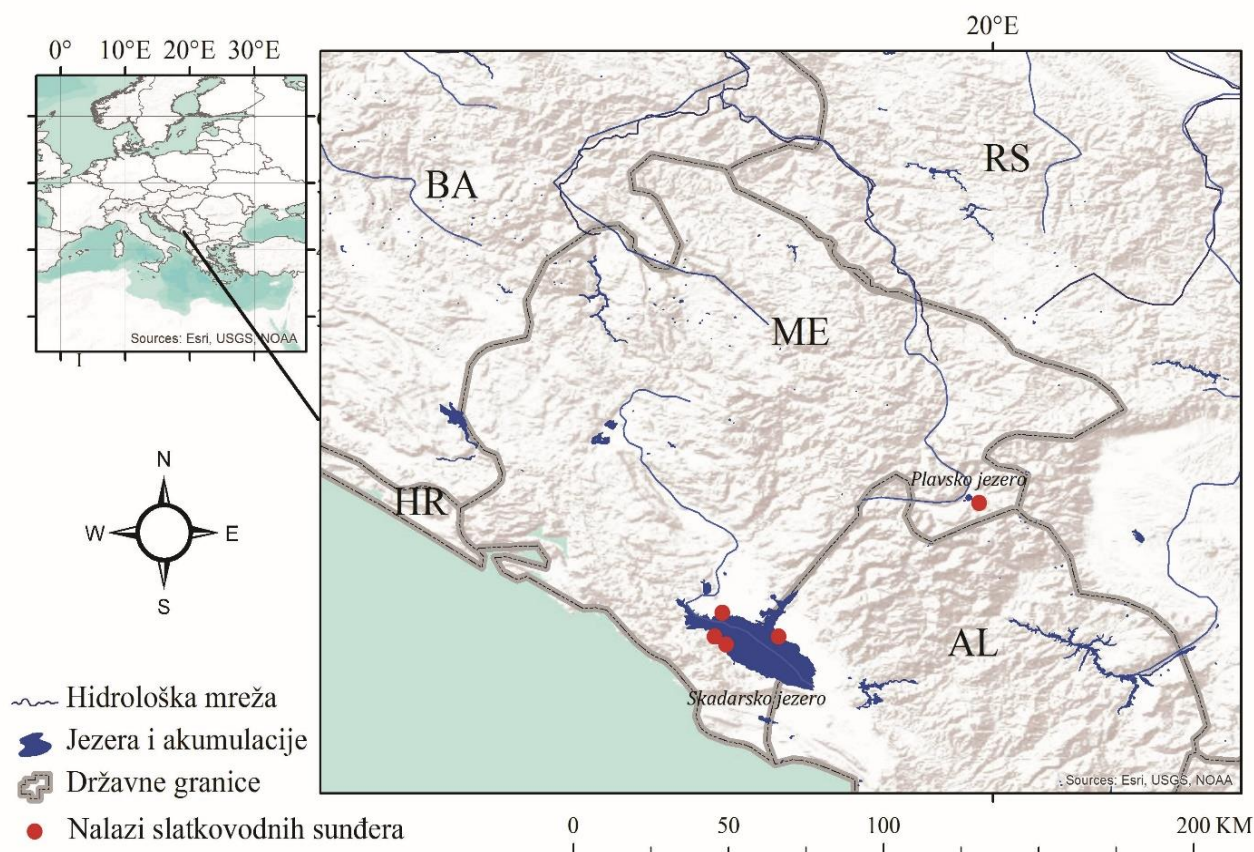
U sklopu naše studije prisustvo sundera ispitano je u sledećih 16 reka: Tisa, Velika Morava, Zapadna Morava, Ibar, Južna Morava, Nišava, Drina, Jadar, Uvac, Zlošnica, Kolubara, Mlava, Pek, Borska reka, Porečka reka, Beli Timok i Crni Timok. Pretraživano je minimum tri lokaliteta po reci. Pored ovih pritoka Save i Dunava, ispitana su i sledeća jezera i akumulacije Srbije: Perućac, Zaovine, Potpeć, Palić, Ludaš, Bela reka, Duboki potok, Pariguz, Srebrno jezero, Zavoj i Bovan (Slika 8). Manje reke su pretraživane celom širinom, a veće samo u priobalnoj zoni. Jezera su pretraživana ronjenjem. Sunderi su uglavnom pronalazeni na kamenom supstratu, a ređe i na drvenom. Na svim pomenutim rekama i jezerima, ukupno je pregledano 83 lokaliteta, od toga je na 22 ustanovljeno prisustvo sundera. U svim ovim vodnim telima prikupljeno je ukupno 65 uzoraka sundera.



Slika 8. Mapa Srbije sa svim mestima detekcije slatkovodnih sundera; svaki oblik predstavlja drugu vrstu; plavi krugovi označavaju jezera.

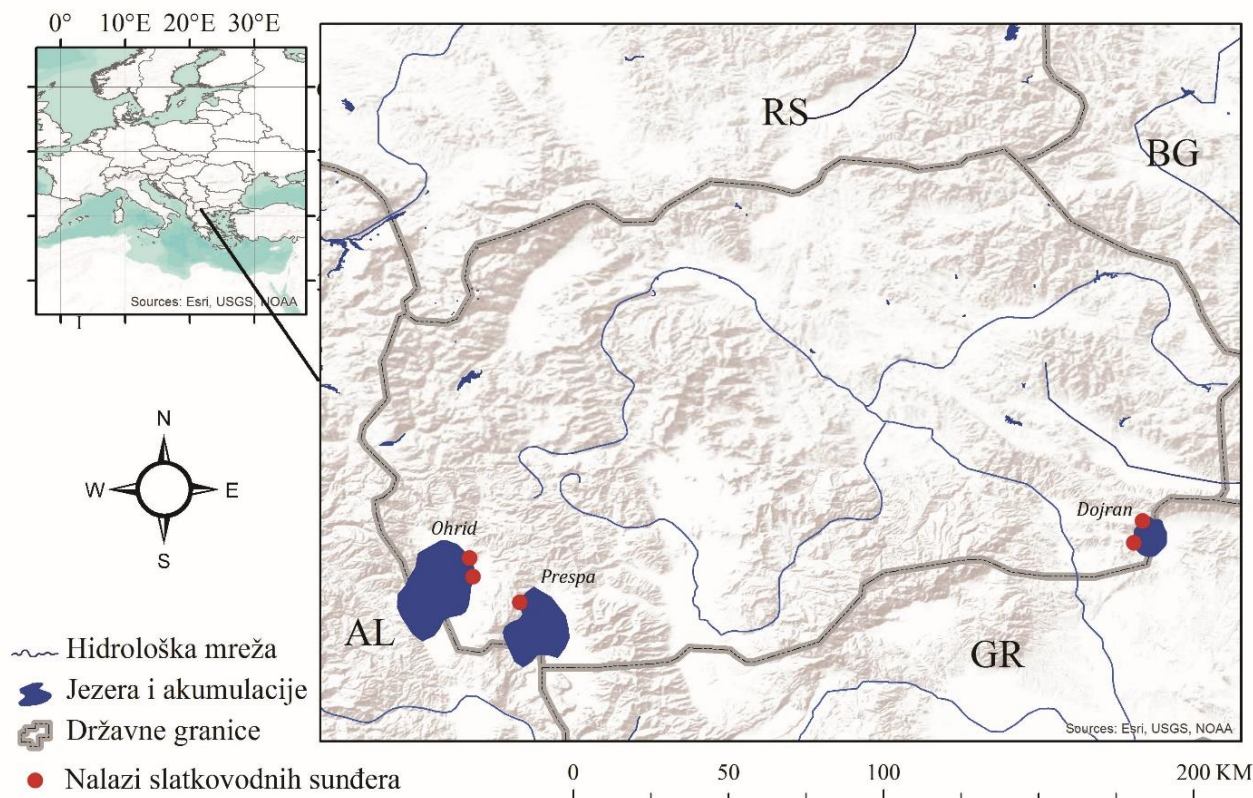
4.1.3 Crna Gora i Severna Makedonija

U okviru projekta „Natura 2000“ čiji je cilj bio određivanje i zaštita biodiverzitetski značajnih staništa, u Crnoj Gori je tokom leta 2017. godine, pretražen određeni broj lokaliteta na rekama i jezerima. Pretraženi su deo reke Pive i skoro celi tok reke Tare, reka Komarnica, Plavsko jezero i Skadarsko jezero. Od svih pregledanih lokaliteta, sunderi su pronađeni samo u Skadarskom i Plavskom jezeru, na nekoliko lokaliteta (Slika 9). Ukupno je prikupljeno 17 primeraka.



Slika 9. Mapa Crne Gore sa označenim lokalitetima gde je utvrđeno prisustvo sundera.

U Severnoj Makedoniji su pregledani lokaliteti na velikim jezerima: Dojransko, Prespansko i Ohridsko jezero (Slika 10). Pored uzoraka prikupljenih tokom terenskog rada, pribavljen je određen broj primeraka iz kolekcije Prirodnjačkog muzeja u Skoplju, sveukupno 22 primerka.



Slika 10. Mapa Severne Makedonije sa označenim lokalitetima gde je utvrđeno prisustvo sundera.

Tokom pretraživanja svih lokaliteta univerzalno zapažanje bilo je izrazito niska abundanca sundera. Dominirali su lokaliteti sa abundancom 1, mali broj njih je imao abundancu 2 (Dunav, Ram; Zapadna Morava, Trstenik), dok je abundanca 3 zabeležena samo na Savi (Županja, Hrvatska; Ostružnica, Srbija).

4.2 Diverzitet sundera ispitivanog područja

Morfološka identifikacija sundera zasnovana na prisustvu specifičnih kategorija spikula (megasklera, mikrosklera, gemulosklera) analiziranih svetlosnom i elektronskom mikroskopijom, kao i genetička analiza koja je podrazumevala sekvenciranje 28S DNK, pokazale su prisustvo pet različitih vrsta sundera na području obuhvaćenim ovim istraživanjem. Identifikovane su sledeće vrste: *E. fluviatilis*, *E. muelleri*, *S. lacustris*, *E. fragilis* i *T. horrida*.

U narednom tekstu biće detaljno opisane sve navedene vrste uz njihove makroskopske i mikroskopske karakteristike, rezultate sekvenciranja 28S DNK i utvrđenu rasprostranjenost.

4.2.1 *Ephydatia fluviatilis* (Linnaeus, 1759)

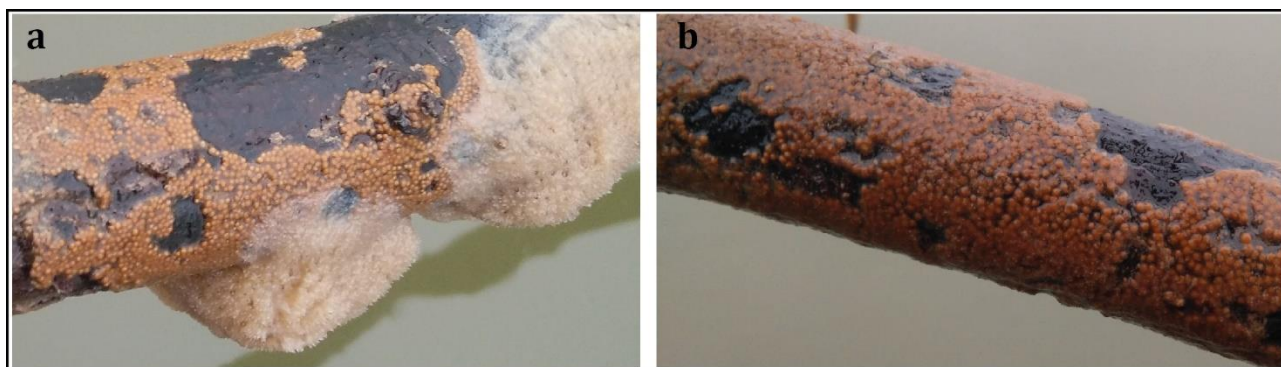
Makroskopske karakteristike

Makroskopski izgled *E. fluviatilis* je vrlo varijabilan; ova vrsta se sreće u različitim oblicima, od relativno tankog sloja na podlozi, koji po izgledu podseća na lišaj, do masivnijih, klobučastih ili grebenastih formi.

Oblik i boja tela mogu u velikoj meri da variraju. *E. fluviatilis* može biti beličast, braon boje, a usled simbioze sa algama mogu se sresti i primerci zelenkaste boje. Na površini tela jasno se zapažaju pore (Slika 11). Gemule su sferoidnog oblika, žućkasto-narandžaste boje, mogu biti u malim grupama ili u vidu kompaktnog sloja prekrivati supstrat (Slika 12).



Slika 11. Jedan od najkrupnijih primeraka *E. fluviatilis* sa jasno vidljivim porama, pronađen u Savi kod Ostružnice.



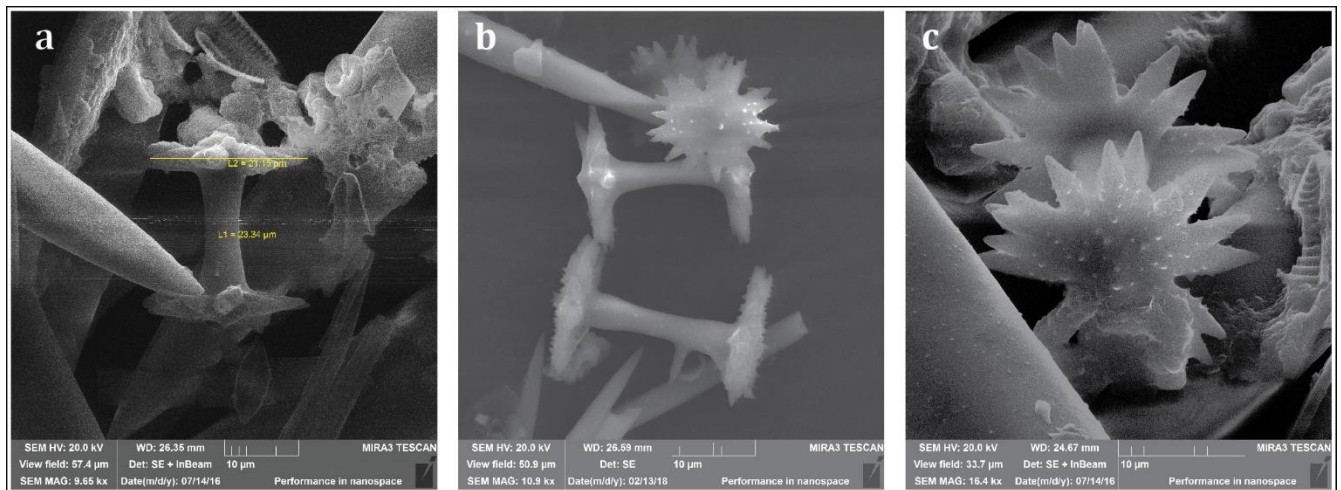
Slika 12. a) Sloj golim okom vidljivih gemula *E. fluviatilis* koji prekriva površinu grane i vegetativno telo sundera u regresiji usled opadanja temperature vode pred zimu; b) grana prekrivena gemulama.

Mikroskopske karakteristike

Mineralni skelet karakterišu dve vrste spikula: megasklere i gemulosklere. Kod ove vrste ne postoje mikrosklere. Veličina megasklera (oksea) kreće se od 250-380 μm dužine (srednja vrednost 323 μm) i 12-19 μm širine (srednja vrednost 16,8 μm). Igličastog su oblika, blago zakrivljene, ređe prave. Površina megasklere može biti glatka ili prekrivena mikrotrnovima (Slika 13). *E. fluviatilis* proizvodi brojne gemule koje su rasprostrte po supstratu, sferoidnog oblika, veličine 350-459 μm . Gemulosklere imaju formu birotula, sa glatkom ili trnastom osovinom, pljosnatim rotulama istog prečnika, sa mikrotrnovima i nepravilno urezanim ivicama sa 15-20 zubaca. Dimenzije gemulosklera kreću se od 21-25 μm (u proseku 23 μm) visine, dok je širina osovine od 2-4 μm (srednja vrednost 3 μm). Dijametar rotule kreće se od 18-23 μm širine (srednja vrednost 21 μm) (Slika 13 i Slika 14).



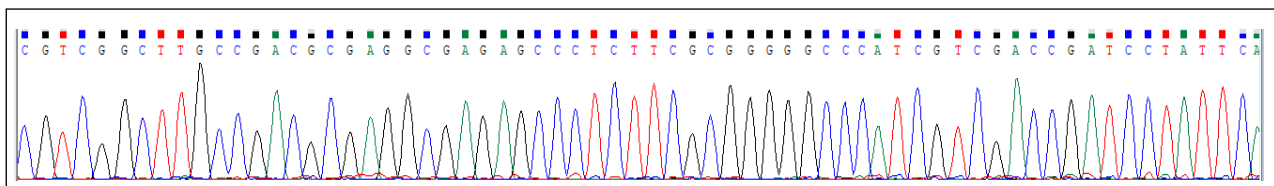
Slika 13. a) Spikule pod svetlosnim mikroskopom (megasklere i gemulosklere); b) SEM mikrografija megasklera; c) megasklera sa naznačenim dimenzijama i malformacijom u vidu trna.



Slika 14. SEM mikrografije gemulosklera *E. fluviatilis* sa karakterističnim rotulama, a i b prikazi po longitudinalnoj osi sa dimenzijom osovine i rotule, c) detalj rotule sa mikro-trnovima i nepravilnim zupcima.

Genetička analiza (28S DNK)

U sklopu ove studije sekvenciran je 31 uzorak vrste *E. fluviatilis* i 29 je pokazalo potpunu podudarnost sa već postojećom 28S sekvencom deponovanom u NCBI bazi (100%), dok su dva uzorka predstavljala nove haplotipove koje smo registrovali u ovoj bazi: *E. fluviatilis* sa Dunava kod Rama i *E. fluviatilis* sa Save kod Županje (evidencioni brojevi MN114522 i MN098868). Genetička identifikacija bila je u skladu sa morfološkom. Na Slici 15 prikazan je primer reprezentativne sekvence 28S D3 domena.



Slika 15. Hromatogram parcijalne sekvence D3 domena 28S rDNK *E. fluviatilis*.

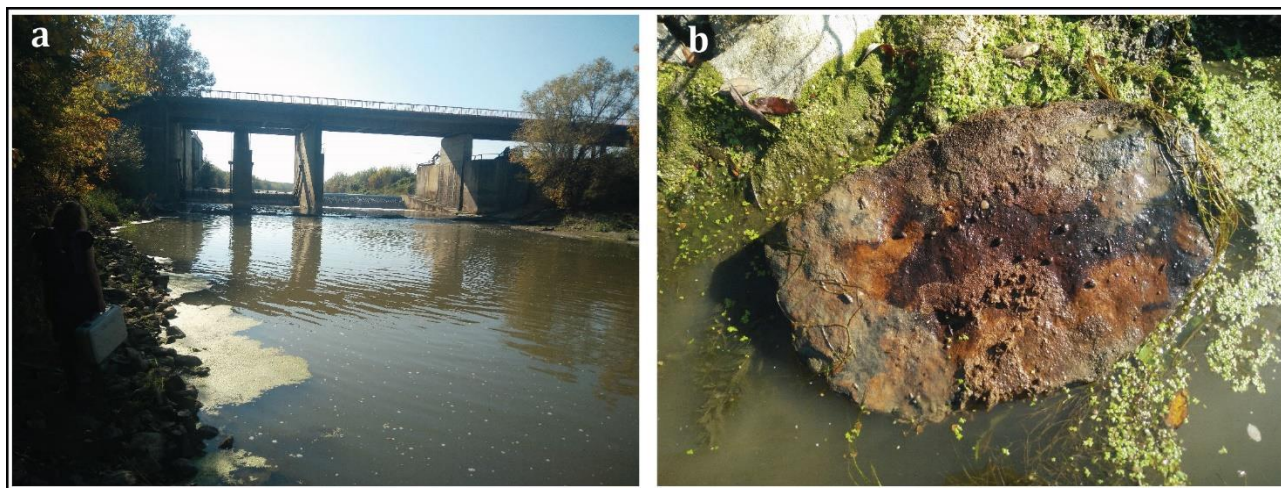
Rasprostranjenost

E. fluviatilis je pronađen na najviše lokaliteta i u najrazličitijim staništima. Nađen je kako u većim tako i u manjim rekama, jezerima, akumulacijama i kanalima. Detektovan je u sledećim lentičkim i lotičkim vodama: Dunav (u Nemačkoj: Degendorf, Muhlau; u Srbiji: Veliko Gradište, Donji Milanovac, Kladovo, Vinča, Ram, Radujevac, Brza Palanka), Sava (u Srbiji: Ostružnica, Novi Beograd; u Hrvatskoj: Županja, Slavonski Brod), Tisa (Kanjiža), Kolubara (Ćelije), Južna Morava (Mezgraja), Velika Morava (Markovac), Zapadna Morava (Trstenik), Crni Timok (Lukovo), Nišava (Sićevačka klisura, Bela Palanka), Bovansko jezero i Ohridsko jezero (Makedonija).

4.2.2 *Ephydatia muelleri* (Lieberkuhn, 1856)

Makroskopske karakteristike

Makroskopski posmatrano *E. muelleri* i *E. fluviatilis* su veoma slične, do te mere da su dugi niz godina ove dve vrste poistovećivane. Usled simbioze sa algama i *E. muelleri* može biti zelene boje, ali sreće se i u raznim nijansama braon, sive i žute boje (Slika 16). Oblik tela je nepravilan a površina često papilozna. Gemule su žućkaste boje, sferičnog oblika i prožimaju ceo sunder.

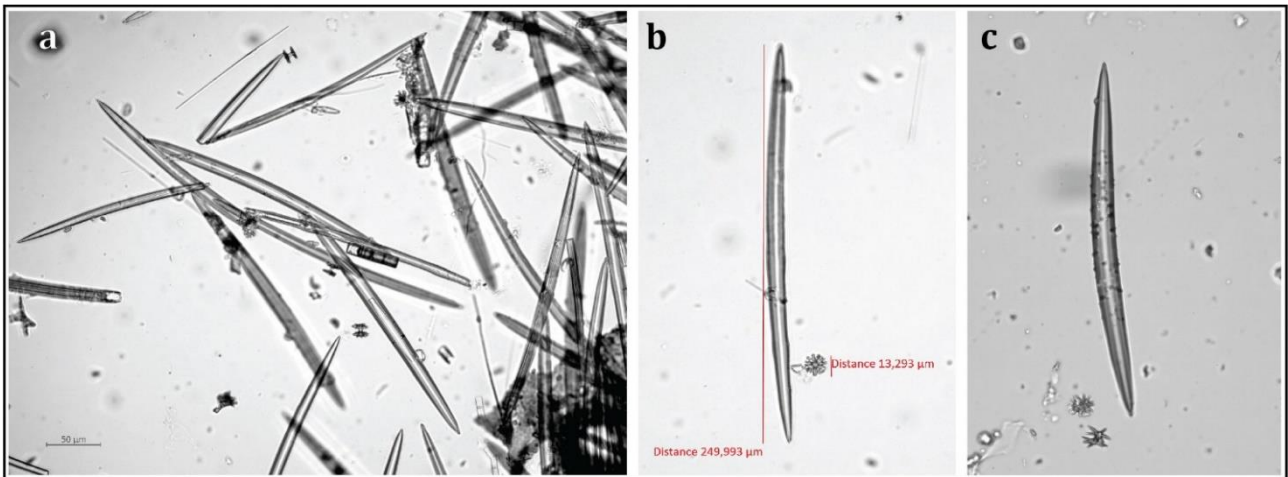


Slika 16. a) Lokalitet Veliki Crljeni (Kolubara); b) kamen prekriven sunderom *E. muelleri* u fazi regresije.

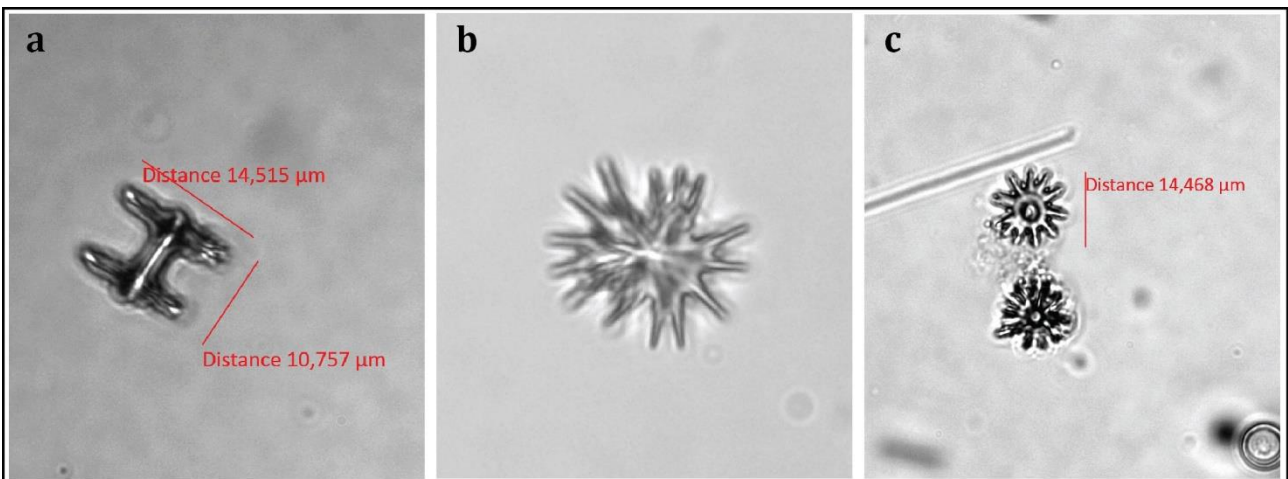
Mikroskopske karakteristike

Zbog velike morfološke sličnosti, teško je razlikovati *E. muelleri* od *E. fluviatilis*, čak i mikroskopski. *E. muelleri* karakteriše prisustvo dve varijante megasklera i vrlo često u istom sunderu može da se uoči prisustvo oba tipa. Najčešće su gusto prekrivene mikro-trnovima (osim na krajevima), a mogu biti i potpuno glatke (Slika 17). Dužina megasklera kreće se od 170-320 μm (srednja vrednost iznosi 250 μm). Kao i *E. fluviatilis*, ni ova vrsta ne poseduje mikrosklere.

Osnovna razlika između ove dve vrste ogleda se u morfologiji gemulosklera. One su, kao i kod *E. fluviatilis*, u formi birotula. Međutim, birotule *E. muelleri* imaju nešto deblju osovinu, čija je dužina jednaka dijametru rotule ili manja od nje. Po pravilu su urezi u rotuli dublji, a broj zubaca manji nego kod *E. fluviatilis* (Slika 18). Dijametar rotule je od 9-25 μm (srednja vrednost 15 μm), dok se visina osovine birotule kreće od 8-24 μm (srednja vrednost 14 μm).



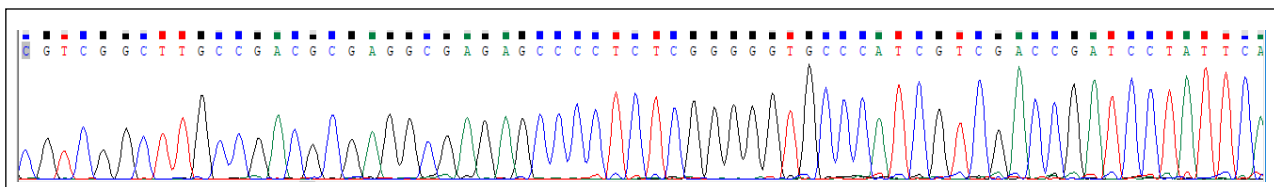
Slika 17. Svetlosna mikroskopija *E. muelleri*: a) grupa megasklera b) glatka megasklera i c) hrapava megasklera.



Slika 18. Svetlosna mikroskopija gemulosklera *E. muelleri*: a) dimenzije gemulosklere; b) i c) disk rotule sa izraženim zupcima.

Genetička analiza (28S DNK)

Skvencirana su 4 uzorka vrste *E. muelleri* i svi su pokazali potpunu podudarnost sa ranije deponovanim sekvencama. Registrovali smo jednu sekvencu, pod evidencionim brojem MK483833.



Slika 19. Hromatogram parcijalne sekvence D3 domena 28S rDNK *E. muelleri*.

Genetička identifikacija bila je u skladu sa morfološkom. Na Slici 19 prikazan je primer reprezentativne sekvence 28S D3 domena.

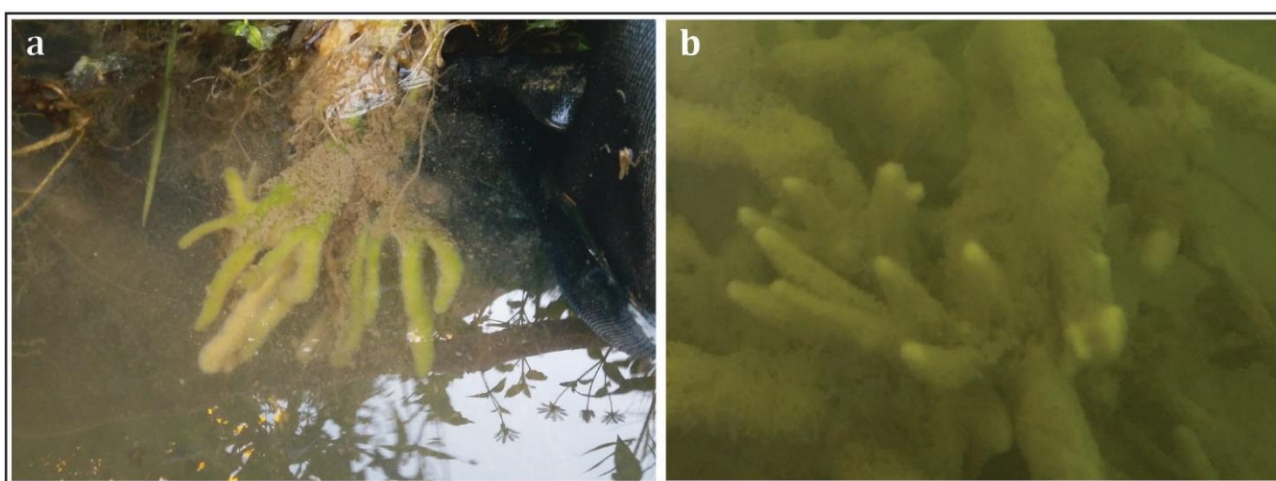
Rasprostranjenost

E. muelleri je pronađena u sledećim rekama, odnosno na lokalitetima: Tisa (Kanjiža), Nišava (Bela Palanka i Sićevačka klisura), Kolubara (Veliki Crljeni), Beli Timok (nizvodno od Knjaževca) i u Skadarskom jezeru u Crnoj Gori.

4.2.3 *Spongilla lacustris* (Linnaeus, 1759)

Makroskopske karakteristike

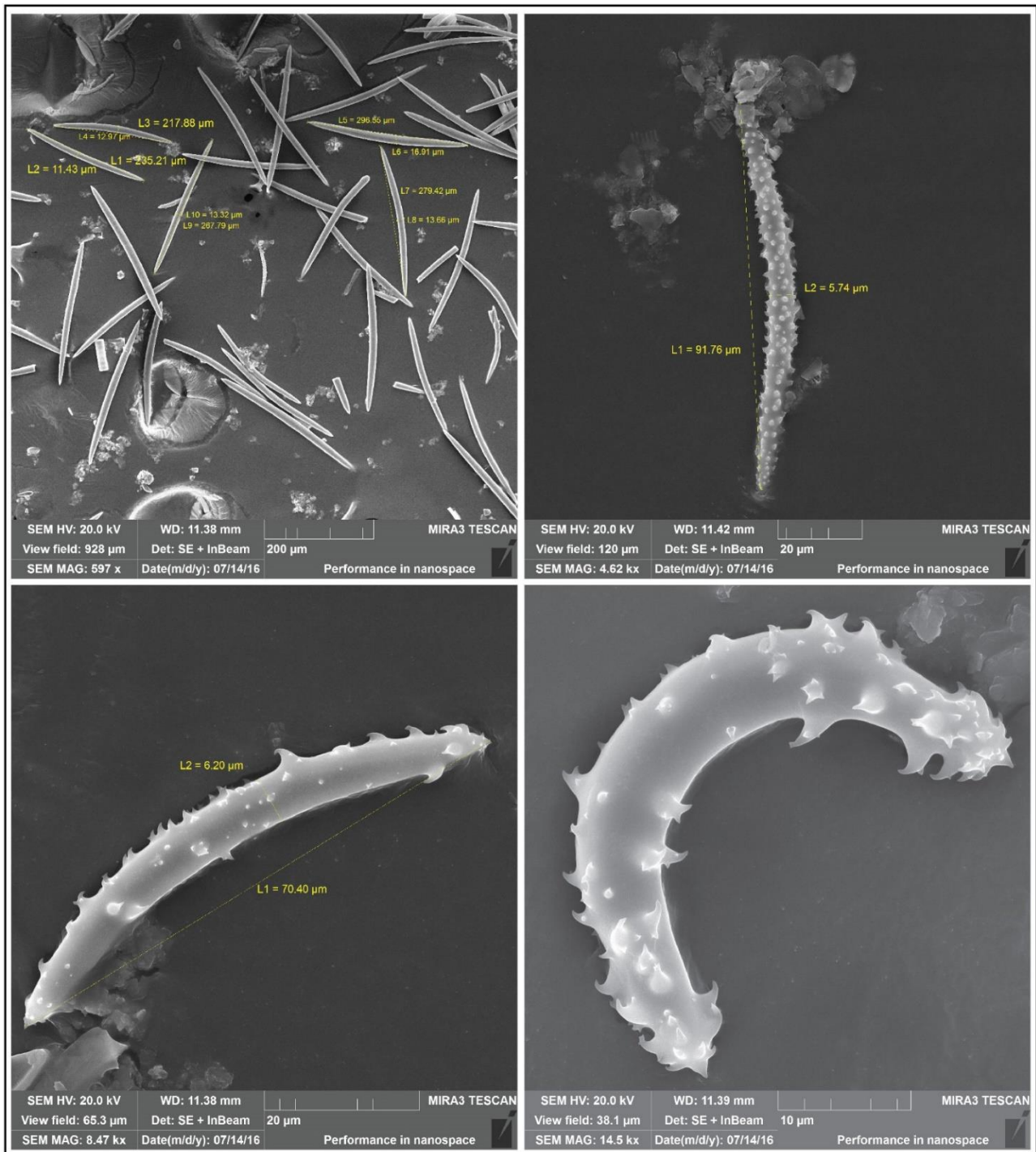
Makroskopski posmatrano vegetativno telo *S. lacustris*, kada je potpuno razvijeno, poseduje cilindrične, prstolike izraštaje koji se zračno prostiru granajući se od osovine tela pričvršćene za supstrat. Zahvaljujući ovim izraštajima *S. lacustris* se u većini slučajeva, sa visokom sigurnošću, može razlikovati od ostalih vrsta. Boja tela je, usled prisustva simbiotskih algi najčešće zelenkasta, dok je u apikalnim delovima izraštaja bela ili svetlo žuta (Slika 20). Inače može biti i braon ili beličasta.



Slika 20. *S. lacustris* u prirodnom staništu: a) Kolubara, Čelije: uz obalu reke na submerznom korenju riparijalne vegetacije; b) Sava, Ostružnica: grupacija sundera obrasta potopljene grane, na oko 4 m dubine.

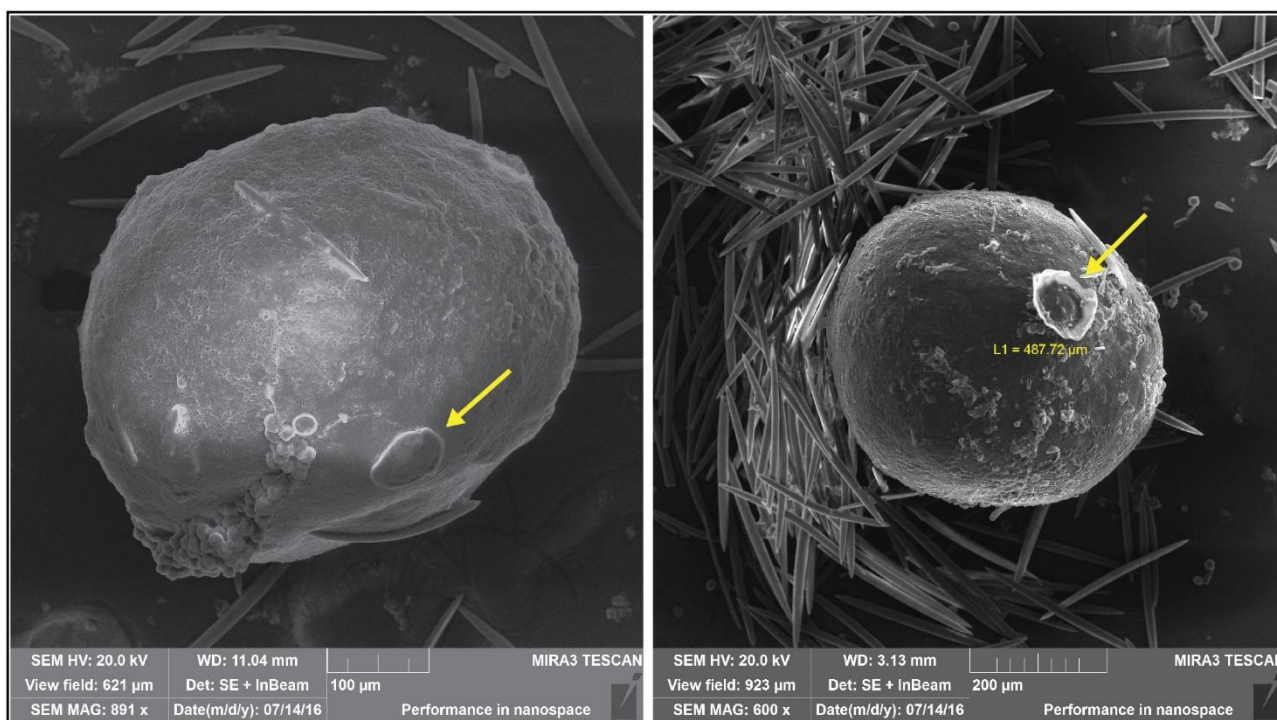
Mikroskopske karakteristike

Mikroskelet *S. lacustris* razlikuje se od prethodno pomenutih vrsta i po tome što poseduje još jednu klasu spikula – mikrosklere. Ove spikule nalaze se između megasklera i daju sunderu dodatnu potporu. Megasklere su u obliku glatkih amfioksea dužine od 160-350 μm (srednja vrednost 259 μm), širine od 5-17 μm (srednja vrednost 13 μm). Mikrosklere su takođe po tipu amfioksee, blago do jako zakrivljene, gusto prekrivene sitnim trnovima. Dužina mikrosklera kreće se od 35-95 μm (srednja vrednost 70 μm). Gemulosklere su po tipu amfioksee, blago do jako zakrivljene, prekrivene trnolikim, isto tako zakrivljenim, skoro kukastim izraštajima. Dužina gemulosklera kreće se od 18-70 μm (srednja vrednost 40 μm), širina od 3-10 μm (srednja vrednost 4 μm) (Slika 21).



Slika 21. SEM spikula *S. lacustris*: a) mikrografija grupe glatkih megasklera (oksea); b) mikrosklera gusto prekrivena trnovima; c) i d) gemulosklere – izrazito zakrivljena i blago zakrivljena varijanta (na obe su vidljivi tipični kukasti trnovi).

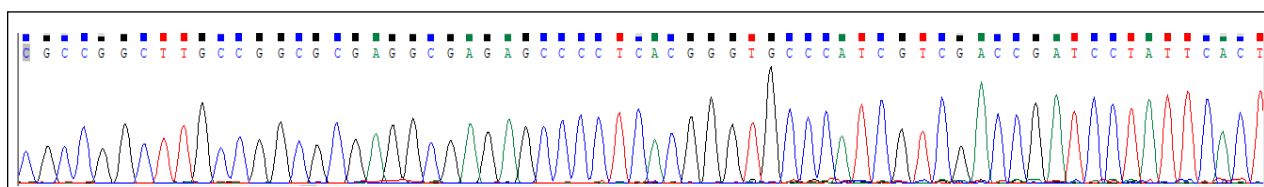
Gemule su braonkaste, sferičnog do ovalnog (elipsoidnog) oblika, sa foramenom koji poseduje „kragnu“ ili bez nje (Slika 22).



Slika 22. SEM gemula: a) gemula sa foramenom bez „kragne“; b) gemula sa foramenom sa „kragnom“.

Genetička analiza (28S DNK)

U sklopu ove studije sekvencirano je 11 uzoraka vrste *S. lacustris* i svi su pokazali podudarnost sa sekvencama iz NCBI baze. Deponovana je sekvenca uzorka sa Mlave (lokalitet Bradarac) pod evidencionim brojem MK483709.



Slika 23. Hromatogram parcijalne sekvence D3 domena 28S rDNK *S. lacustris*.

Genetička identifikacija bila je u skladu sa morfološkom. Na slici 23 prikazan je primer reprezentativne sekvence 28S D3 domena.

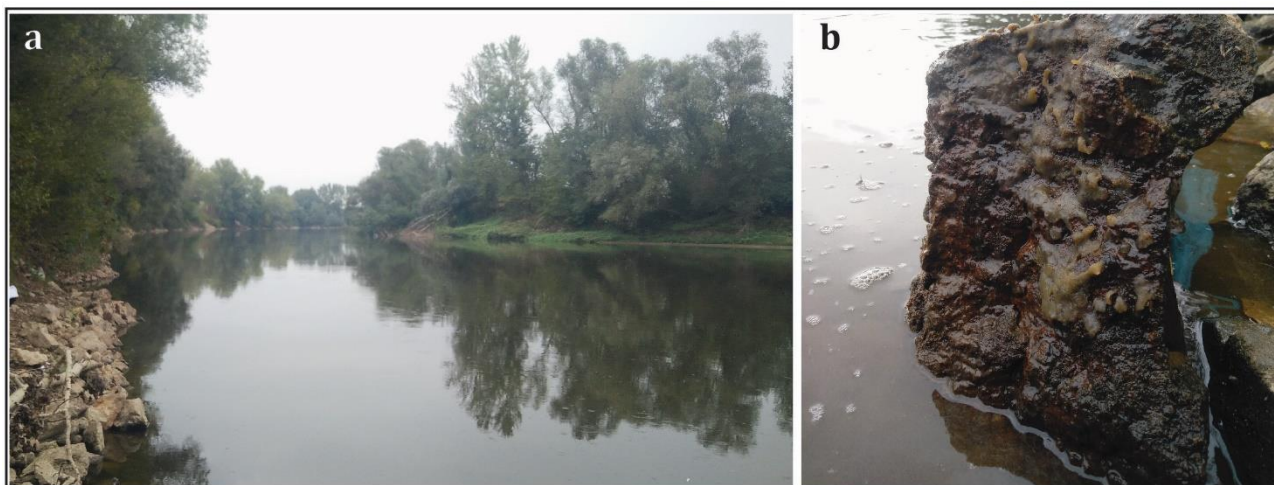
Rasprostranjenost

Nakon *E. fluviatilis*, *S. lacustris* je bila najrasprostranjenija vrsta na istraživanom području. Zabeležena je i u rekama i jezerima i to: u Dunavu (u Nemačkoj: Degendorf, Muhlau; u Srbiji: Golubac, Veliko Gradište, Ram), Savi (u Srbiji: Beograd kod sajma, Novi Beograd, Ostružnica, Duboko; u Hrvatskoj: Županja), Tisi (Kanjiža, Sanad), Kolubari (Ćelije), Zapadnoj Moravi (Čačak), Mlavi (Bradarac), Plavskom i Skadarskom jezeru u Crnoj Gori i Dojranskom jezeru u Makedoniji.

4.2.4 *Eunapius fragilis* (Leidy, 1851)

Makroskopske karakteristike

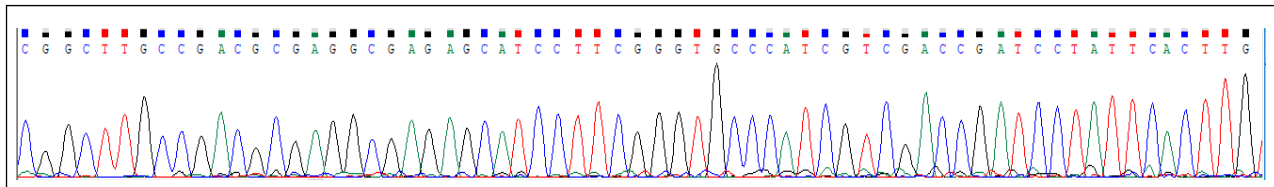
E. fragilis je takođe često u simbiozi sa algama i tada mu je boja zelena, a inače je braon ili sivkasto-beličast. Najčešće je nalažen na kamenu, a kada je telo dovoljne veličine poprima jastučast oblik sa vidljivim porama (ostia) na površini. Ponekad se mogu primetiti mali izraštaji u vidu pupoljaka (protuberanci) (Slika 24). U slučaju *E. fragilis*, bez obzira što je na preparatima bilo gemulosklera čime je potvrđeno prisustvo gemula, one *in situ* nisu zapažene (golim okom).



Slika 24. a) lokalitet Markovac na Velikoj Moravi; b) *E. fragilis* prekriva u tankom sloju donju površinu kamena.

Mikroskopske karakteristike

E. fragilis karakterišu megasklere tipa amfioksea, glatke i sličnih dimenzija kao kod prethodne dve vrste (165-261 μm). Ova vrsta sunđera ne poseduje mikrosklere. Gemulosklere su po tipu amfistrongile, zatupastih krajeva i prekrivene trnovima koji su uglavnom koncentrisaniji u vrhovima (Slika 25). Dimenzije izuzetno variraju: dužina se kreće od 50-110 μm (prosečna vrednost 75 μm) a širina od 4-9 μm (u proseku 6 μm).



Slika 27. Hromatogram parcijalne sekvence D3 domena 28S rDNK *E. fragilis*.

Genetička identifikacija bila je u skladu sa morfološkom. Na Slici 27 prikazan je primer reprezentativne sekvence 28S D3 domena.

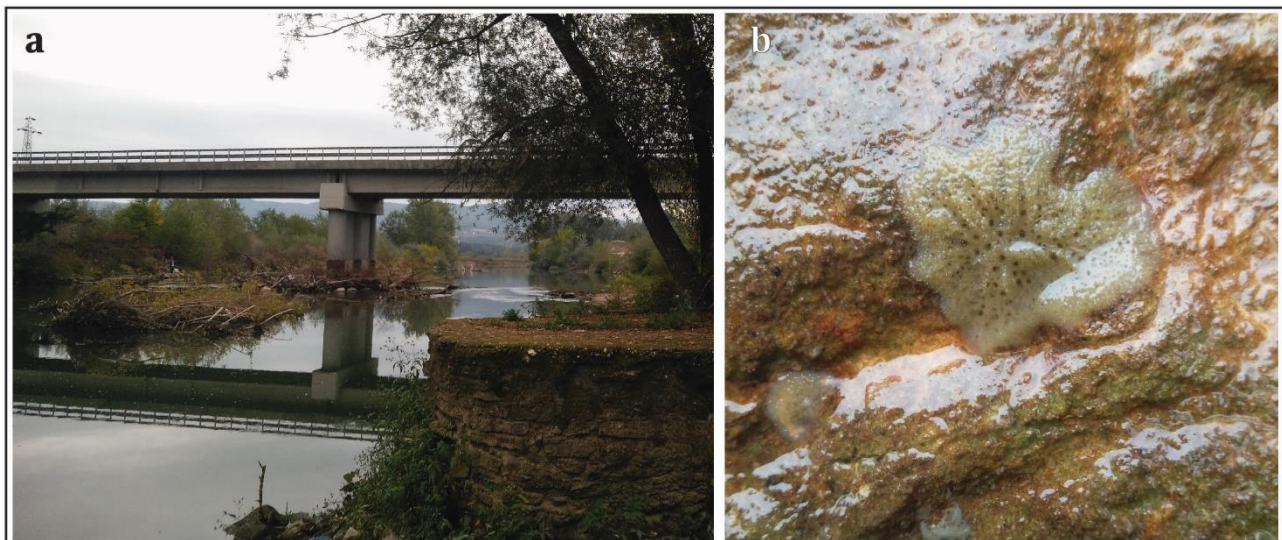
Rasprostranjenost

Ova vrsta je, zajedno sa *T. horrida*, najređe nalažena vrsta. Ukupno je sakupljeno pet primeraka na četiri lokaliteta: Dunav (Donji Milanovac, Kladovo), Sava (Županja), Velika Morava (Markovac).

4.2.5 *Trochospongilla horrida* Weltner, 1893

Makroskopske karakteristike

Telo *T. horrida* uglavnom je pljosnato i prekriva supstrat u vidu tankog sloja nepravilnog oboda (Slika 28). Boja tela ove vrste kreće se od žućkaste do tamno braon, a čest je slučaj i da usled simbioze sa algama bude zelenkasta.

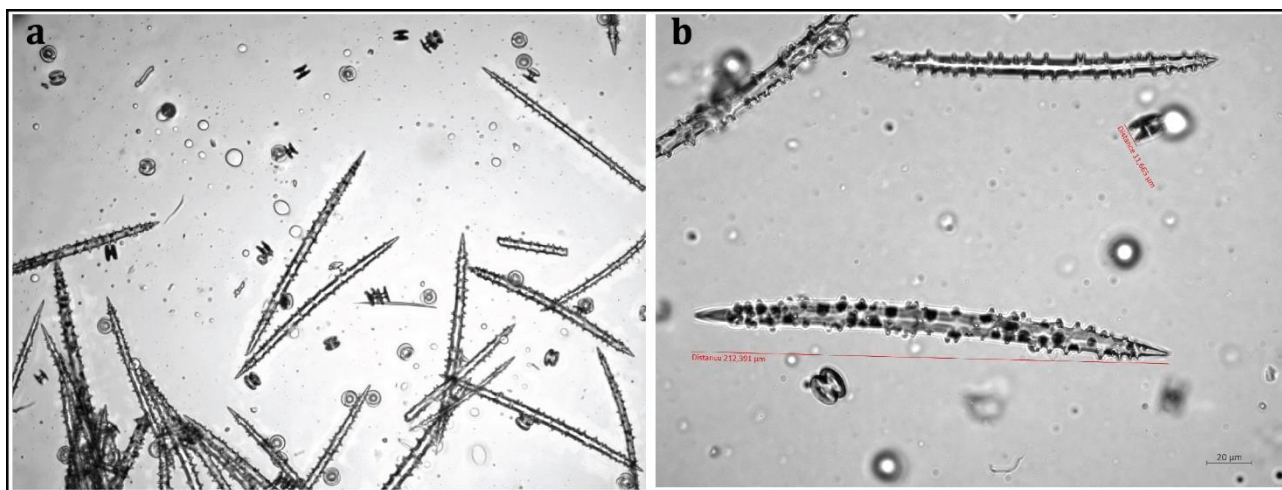


Slika 28. Stanište i makroskopski izgled *T. horrida*: a) Zapadna Morava, lokalitet uzvodno od Kraljeva; b) primerak na supstratu (sa donje strane kamena).

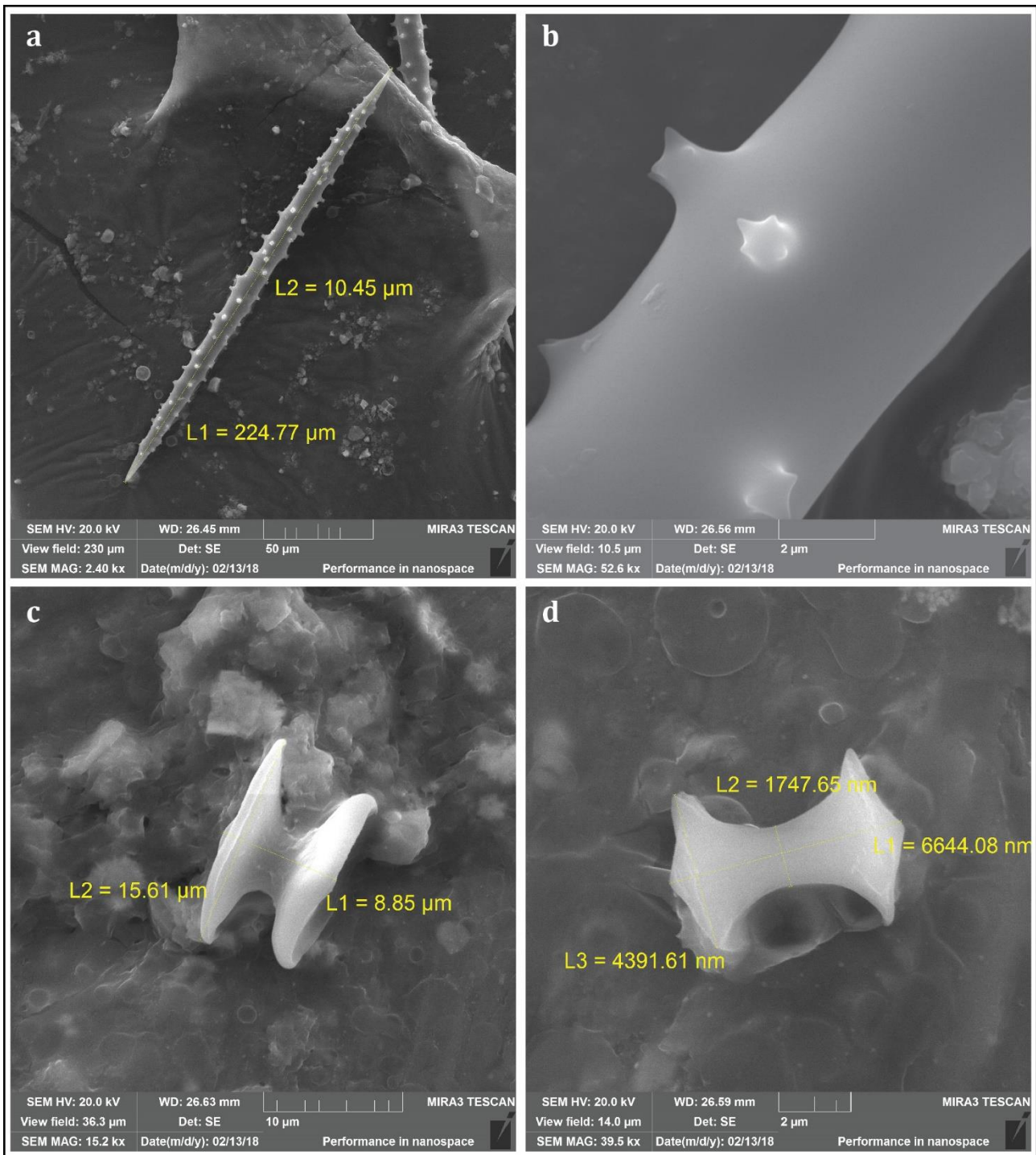
Mikroskopske karakteristike

Megasklere ove vrste po tipu su amfioksee, gusto prekrivene zatupastim, trnolikim izraštajima. Dimenzije se kreću od 165-245 µm (prosečna vrednost 210 µm). Mikrosklere ne postoje. Gemulosklere su u formi birotule sa kratkom glatkom osovinom (dužina osovine kraća je od prečnika rotule) i rotulama sa glatkim, nenazubljenim ivicama (Slika 29 i Slika 30). Jedna je obično nešto većeg prečnika od druge. Gemule su sferične, od 475-450 µm u prečniku.

Nalaze se u bazalnom delu sundera i mogu biti pojedinačno izolovane pneumatskim slojem prekrivenim akantokseama, ili formirati gemularni sloj na površini supstrata.



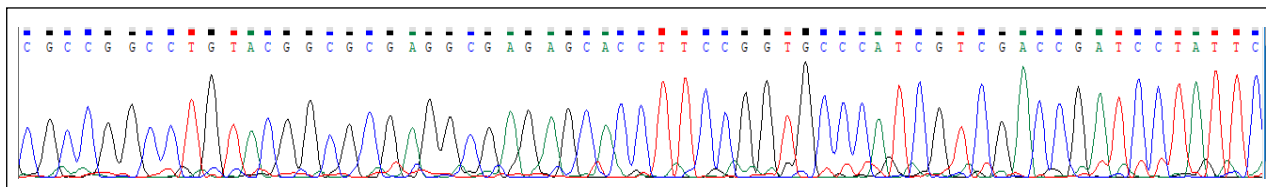
Slika 29. Svetlosna mikroskopija spikula *T. horrida*: a) skupina megasklera i gemulosklera; b) pojedinačna megasklera sa vidljivim karakterističnim trnovima i gemulosklera.



Slika 30. SEM spikula *T. horrida*: a) megasklera prekrivena trnastim izraštajima; b) megasklera – detalj sa trnom; c) formirana gemulosklera tipa birotule; d) nezrela gemulosklera (birotula u nastanku), sa osovinom dužom od prečnika rotula.

Genetička analiza (28S DNK)

Samo jedan uzorak vrste *T. horrida* sekvenciran je i pohranjen u NCBI bazi. Ovo je istovremeno i prvi put da je 28S sekvenca korišćena za identifikaciju ove vrste i zavedena je pod šifrom MH569483 (Slika 31).



Slika 31. Hromatogram parcijalne sekvence D3 domena 28S rDNK *T. horrida*.

Rasprostranjenost

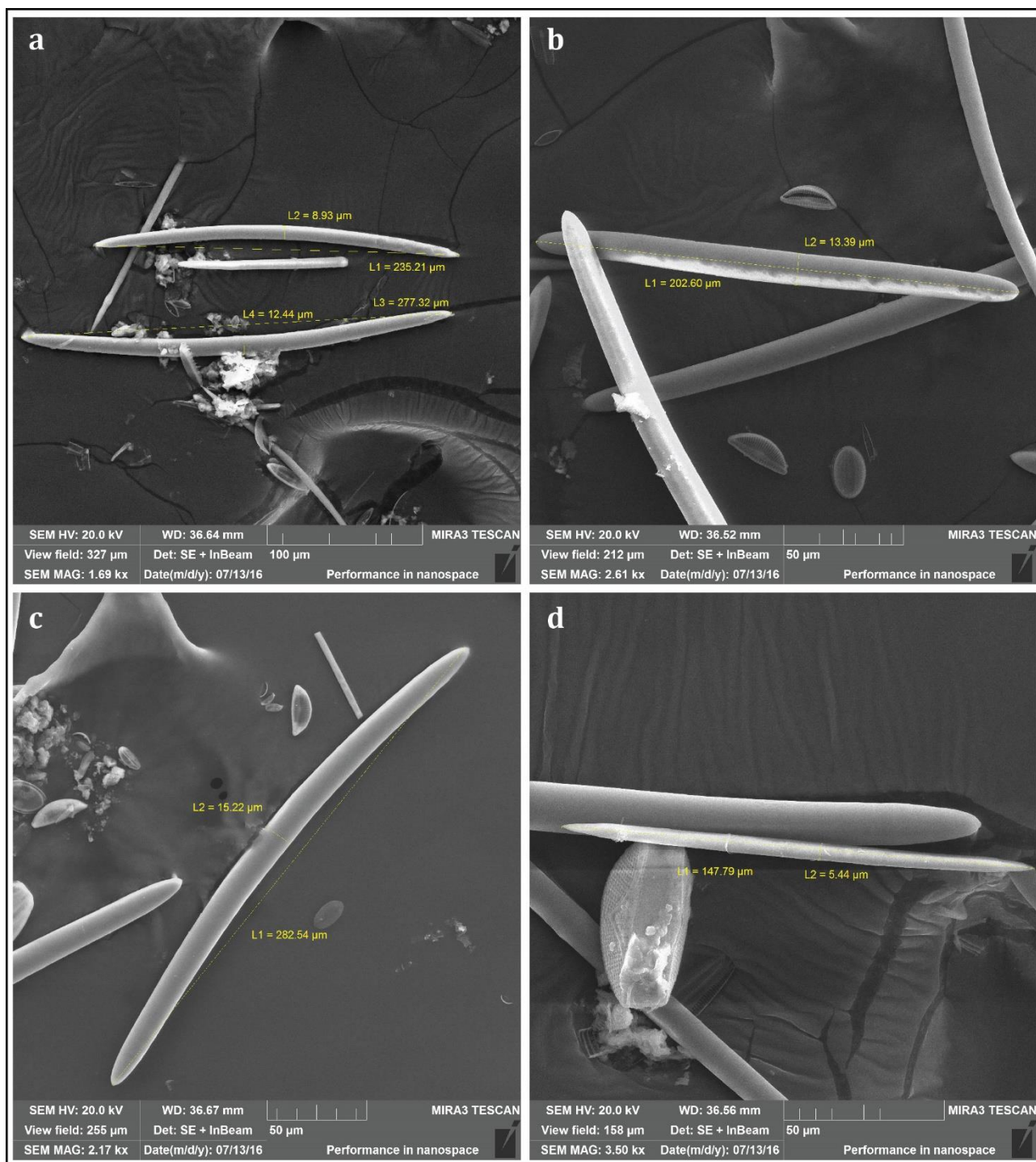
Uz *E. fragilis*, *T. horrida* je bila najređa vrsta. Nađeno je svega 7 primeraka u 4 reke: u Dunavu (Hiršova), Tisi (kod Kanjiže), Zapadnoj Moravi (uzvodno od Kraljeva), Južnoj Moravi (Sveti Roman).

4.3 Muzejski primerci iz Severne Makedonije

Pored opisanih pet vrsta sunđera, koje su prikupljene tokom terenskih istraživanja, ustupleno je i 13 primeraka sunđera iz zbirke Prirodnjačkog muzeja u Skoplju (Severna Makedonija). Među njima su detektovane sledeće vrste, za koje nije bilo moguće uraditi kompletnu analizu (makroskopski opis, sekvenciranje i utvrđivanje rasprostranjenosti), već samo identifikaciju zasnovanu na morfologiji spikula. To su: *Eunapius carteri* (Bowerbank, 1863), *Spongilla stankovici* Arndt, 1938, *Ochridaspongia rotunda* Arndt, 1937 i *Spongilla prespensis* Hadzische, 1953.

4.3.1 *Eunapius carteri* (Bowerbank, 1863)

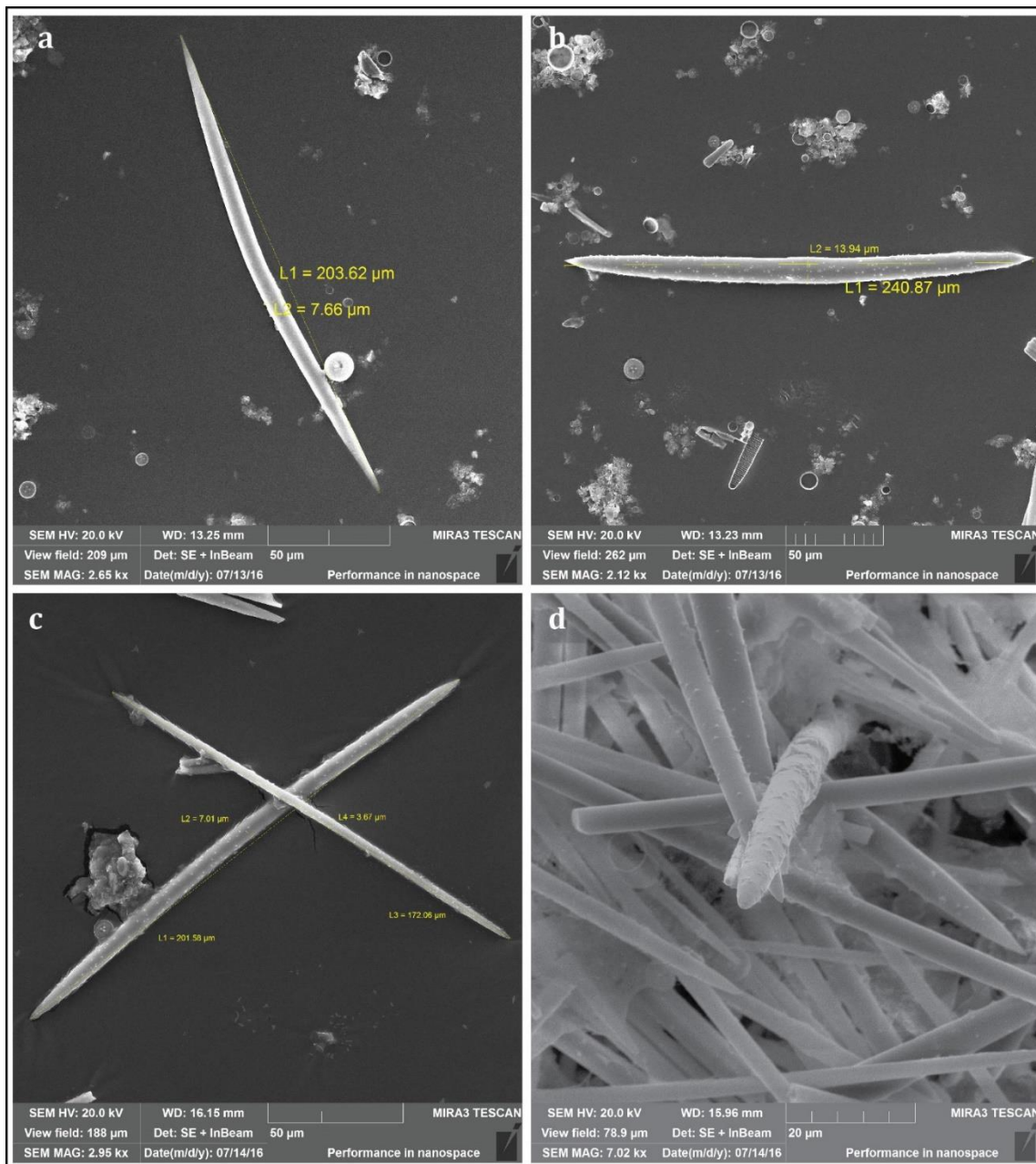
Kod ove vrste sunđera megasklere su glatke, najčešće blago zakrivljene, ponekad mogu biti i prave. Skoro celom dužinom imaju istu debljinu. Oba vrha su zaobljena. Dužina megasklera kreće se od 202-300 μm (srednja vrednost 258 μm), dok se debljina kreće od 9-16 μm (srednja vrednost 12,5 μm). Ređe se mogu pronaći tanje, kraće spikule oštih vrhova za koje se ne može sa sigurnošću tvrditi kojoj klasi pripadaju (Slika 32). Njihova dužina se kreće od 140-200 μm (u proseku 168 μm), a širina od 4-7 μm (u proseku 5,4 μm).



Slika 32. SEM spikula *E. carteri*: a, b, c) primeri tipičnih megasklera gladke površine, ravnomerne debljine i zaobljenih krajeva; d) gladka, tanka i špicasta mikrosklera.

4.3.2 Spongilla stankovici Arndt, 1938

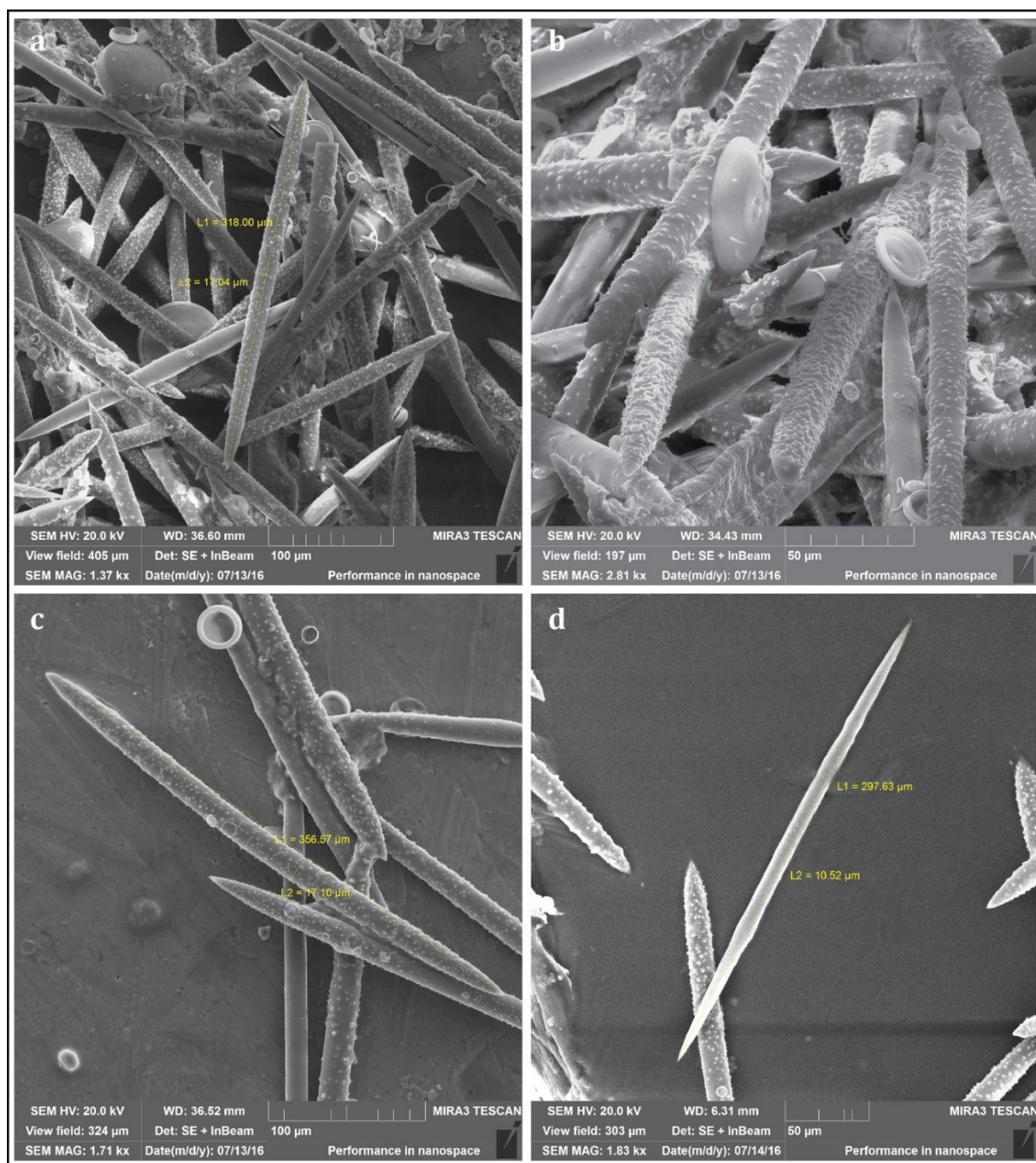
Megasklere ove vrste najčešće su glatke, tipa oksea, oštih vrhova, ali često se mogu naći i hrapave, sa sitnim trnjem ravnomerno raspoređenim celom dužinom, koja se kreće od 195-250 μm (srednja vrednost 228 μm), dok im je širina od 7-14 μm (srednja vrednost 10 μm). Mikrosklere su takođe oblika oksea, prave ili blago zakrivljene, gusto prekrivene trnovima. Dužina im se kreće od 97-190 μm , (srednja vrednost 156 μm), a širina od 3-6 μm (srednja vrednost 4 μm). Gemulosklere su vrlo retke, uočena je samo jedna, zakrivljena i gusto prekrivena trnolikim izraštajima (Slika 33). Zbog položaja na preparatu, dimenzije spikula nije bilo moguće odrediti.



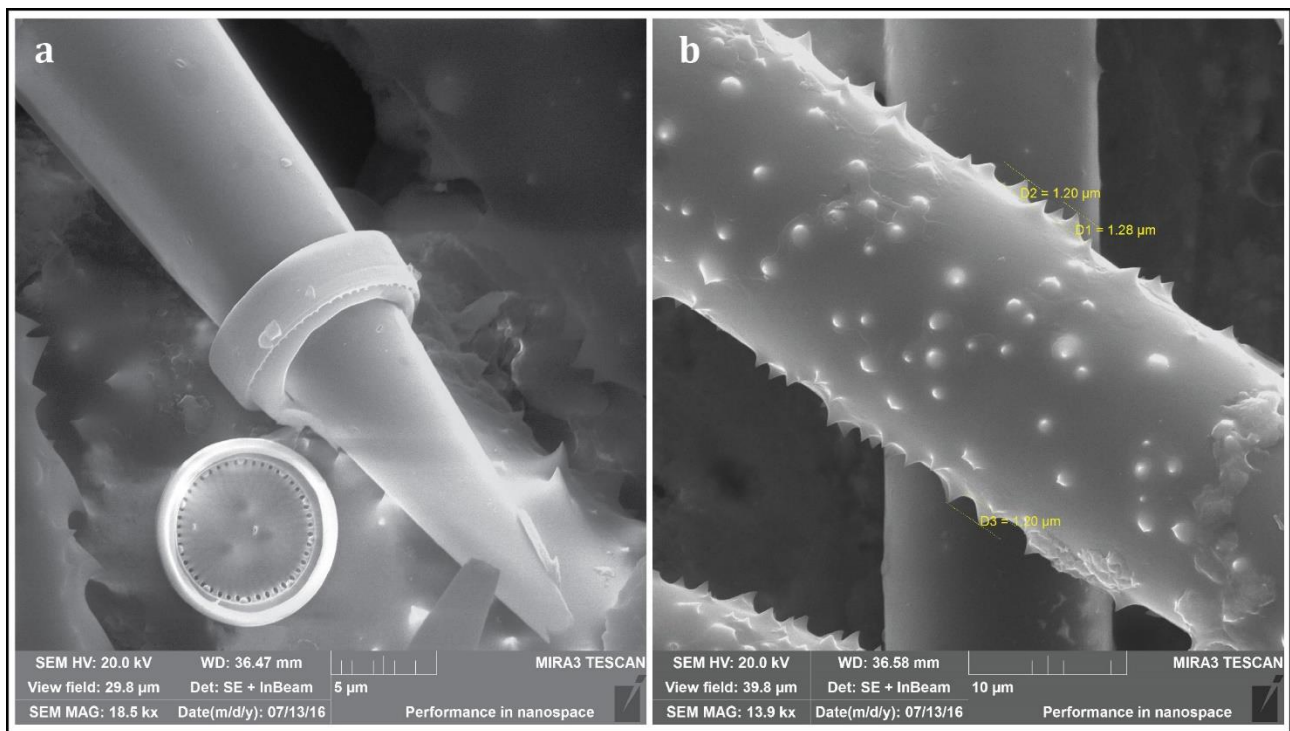
Slika 33. SEM spikula *S. stankovici*: a) Tipična glatka megasklera; b) megasklera prekrivena trnolikim izraštajima; c) megasklera i mikrosklera, obe prekrivene trnolikim izraštajima; d) gemulosklera (u sredini) prekrivena trnovima.

4.3.3 *Ochridaspongia rotunda* Arndt, 1937

Ovaj poznati reliktni endemit Ohridskog jezera, specifičan je kako po makroskopskim, tako i po mikroskopskim karakteristikama. Megasklere ove vrste su oksee, izrazito varijabilnog izgleda. Od tankih do debelih, od pravih do blago zakrivljenih, od glatkih do formi prekrivenih trnolikim izraštajima. Gustina ovih izraštaja takođe je veoma heterogena, pa tako srećemo oblike sa retkim trnovima, one srednje prekrivene, do spikula sa gusto zbijenim trnovima raspoređenim celom njenom dužinom. Na pojedinim spikulama se mogu uočiti sferična ispupčenja (Slika 34 i 35). Dužina je varirala od 250-356 μm (u proseku 313 μm), a širina od 7-19 μm (u proseku 13 μm). Mikrosklere ne postoje, a zbog stabilnih i slabo promenljivih uslova sredine *O. rotunda* ne proizvodi gemule, pa nema ni gemulosklera.



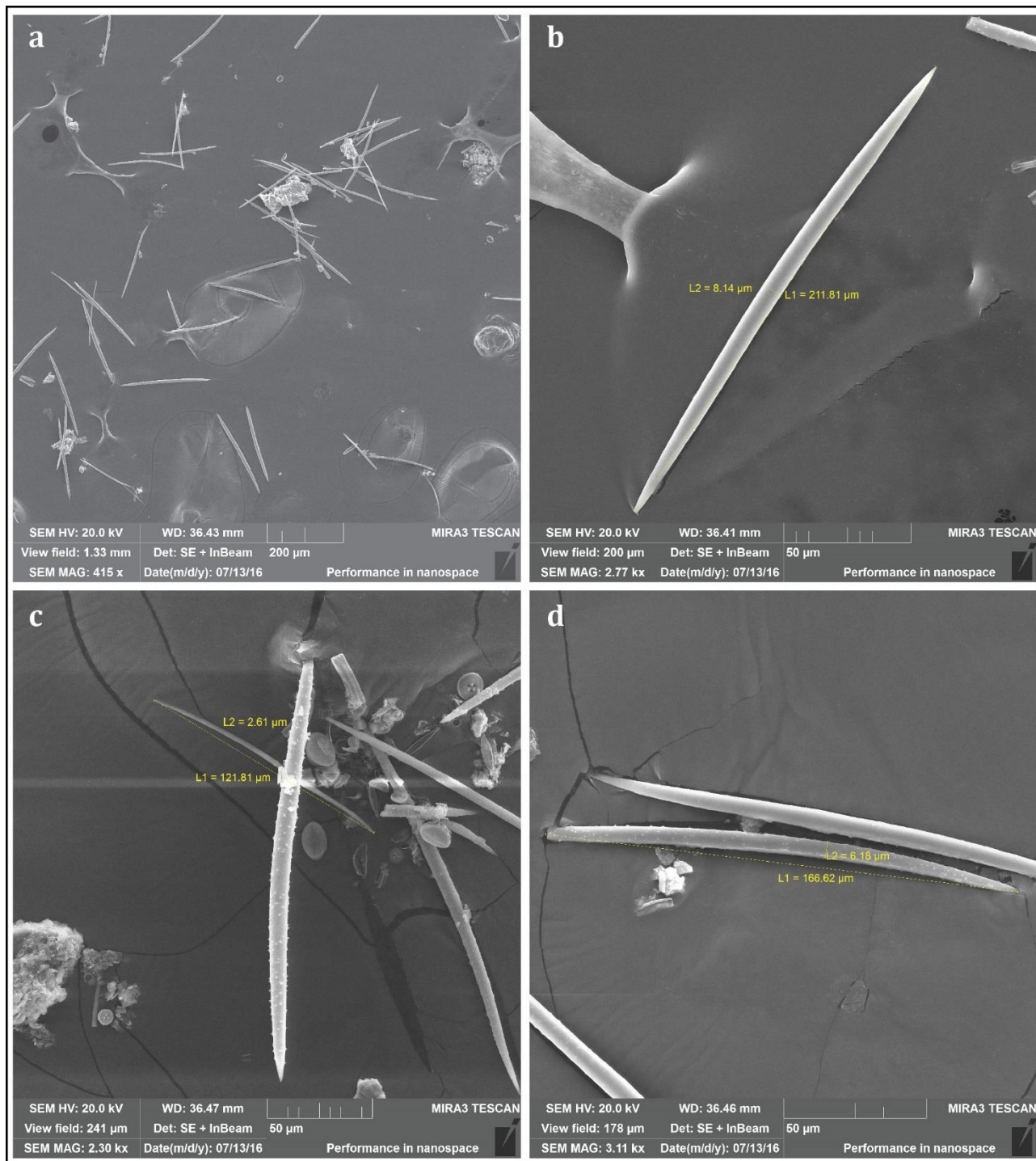
Slika 34. SEM spikula *O. rotunda*: a, b, c) megasklere koje se razlikuju po dimenzijama i stepenu pokrivenosti trnovitim izraštajima; d) tanka, glatka megasklera sa naznakom sferičnog zadebljanja.



Slika 35. SEM spikula *O. rotunda*: a) detalj vrha spikule sa silikatnom algom; b) detalj trnolikih izraštaja na spikulama sa dimenzijama.

4.3.4 *Spongilla prespensis* Hadzische, 1953

S. prespensis je endemit Prespanskog jezera. Njegove spikule (sva tri tipa) najčešće su pokrivene različitom gustinom trnolikih izraštaja. Megasklere dužine 166-235 μm (srednja vrednost 204 μm) i širine 6-8 μm (srednja vrednost 7 μm), mogu biti blago savijene ili prave, na vrhovima su zaoštrene. Obično su prekrivene sitnim trnovima, čija je gustina vrlo varijabilna. Ređe mogu biti i glatke. Mikrosklere su nešto kraće, dužine oko 120 μm i širine od 2-4 μm (Slika 36). Gemulosklere nisu pronađene na našim preparatima.



Slika 36. SEM mikrografije megasklera i mikrosklera *S. prespensis* sa dimenzijama.

4.4 Distribucija Porifera u ispitivanim vodnim telima

Generalno posmatrano, slatkovodni sunđeri su bili slabo zastupljeni organizmi u istraživanim vodnim telima. Broj lokaliteta na kojima su nađeni predstavlja manji deo (jednu četvrtinu) ukupnog broja pretraženih lokaliteta. Takođe, njihova abundanca je, osim u par izuzetaka, bila vrlo niska, odnosno mali broj primeraka je prikupljen sa mesta gde je utvrđeno njihovo prisustvo. Sunđeri su nađeni u sledećim rekama: Dunav (u Nemačkoj, Srbiji i Rumuniji), Sava (u Hrvatskoj i Srbiji), Tisa, Velika Morava, Zapadna Morava, Južna Morava, Nišava, Kolubara, Mlava, Porečka reka, Beli Timok i Crni Timok, kao i u sledećim jezerima odnosno akumulacijama: Bela reka, Duboki potok, Zavoj, Bovan, Skadarsko jezero (Crna Gora), Ohridsko jezero, Prespansko i Dojransko jezero (Makedonija). Ukupno je prikupljeno 164 primerka.

U Dunavu su zabeležene četiri vrste sa sledećom učestalošću: *E. fluviatilis* (oko 80%), *S. lacustris* (10%), *E. fragilis* (10%) i samo jedan primerak *T. horrida* (kod Hiršove). Zanimljivo je da je u srpskom delu reke Dunav dominantna bila vrsta *E. fluviatilis* i samo je na jednom lokalitetu (Tekija) pronađen i *E. fragilis*. U reci Savi detektovane su iste vrste kao i u Dunavu, ali sa drugačijom učestalošću: *S. lacustris* je bila najzastupljenija vrsta i činila je 46% sakupljenih primeraka. Sledeća je bila vrsta *E. fluviatilis* sa zastupljenošću od 37%, a najređi je i ovde bio *E. fragilis* sa učestalošću od 17%. Samo na jednom lokalitetu na Savi (Županja, Hrvatska) pronađene su sve tri vrste.

U pritokama Save i Dunava zabeleženo je ukupno 5 vrsta Porifera, navedenih po opadajućoj učestalosti: *E. fluviatilis*, *S. lacustris*, *E. muelleri*, *T. horrida* i *E. fragilis*.

Vrsta *E. fluviatilis* je predstavljala 45% svih prikupljenih primeraka sunđera, nađena u 8 od 17 istraženih reka (Tisa, Nišava, Velika Morava, Južna Morava, Zapadna Morava, Crni Timok, Porečka reka, Kolubara), dok je vrsta *S. lacustris* činila 21% sakupljenih primeraka. Pomenuta vrsta nađena je u četiri reke: Tisi, Zapadnoj Moravi, Kolubari i Mlavi. Vrsta *E. muelleri* (18% prikupljenih sunđera) je bila nađena takođe u četiri reke i to: Tisi, Nišavi, Kolubari i Belom Timoku. *T. horrida* predstavljala je svega 10% ukupnog broja primeraka i nađena je u tri reke: Tisi, Zapadnoj Moravi i Južnoj Moravi. U rekama Srbije uzetih u obzir za ovo istraživanje najređe je bio zastupljen *E. fragilis* čija je učestalost u ukupnom broju uzorkovanih primeraka sunđera bila samo 6%. Nađen je u Tisi i Velikoj Moravi.

U jezerima i akumulacijama konstatovane su svega dve vrste: *E. fluviatilis* u Bovanskom jezeru i Beloj reci (četiri primerka) i *S. lacustris* u Zavojskom jezeru (tri primerka).

U površinskim vodama Crne Gore sunđeri su takođe bili retki, tj. zabeleženi su na malom broju lokaliteta i bili su malobrojni. Zabeleženi su samo u Plavskom i Skadarskom jezeru. U Plavskom jezeru je pronađena samo vrsta *S. lacustris* (dva primerka). U Skadarskom jezeru je zastupljenost sunđera bila nešto veća. Od 15 prikupljenih primeraka identifikovane su dve vrste: *S. lacustris* i *E. muelleri*.

U Severnoj Makedoniji primerci sunđera prikupljeni su tokom terenskog rada na velikim jezerima Dojranskom, Prespanskom i Ohridskom (10 primeraka), a deo je ustupljen od strane Prirodnjačkog muzeja u Skoplju (12 primeraka).

U toku terenskog rada na jezerima konstatovani su samo malobrojni primerci *E. fluviatilis*. Nije zabeležena nijedna endemska vrsta. Međutim, pregledom primeraka sunđera ustupljenih iz muzejske zbirke bili su prisutni i endemiti karakteristični za ovo područje.

4.5 Distribucija Porifera u odnosu na fizičko-hemijske karakteristike vodnih tela

Na svim lokalitetima, sa ili bez pronađenih sunđerica, mereni su osnovni fizičko-hemijski parametri: temperatura, pH, konduktivitet i zasićenost vode kiseonikom. Ostali fizičko-hemijski parametri korišćeni su iz godišnjih izveštaja Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije, koja vrši redovan monitoring kvaliteta vode i raspolaže detaljnim podacima o prisustvu mnogih važnih jedinjenja/indikatora statusa voda. S obzirom da Agencija vrši merenja na mesečnom nivou, koristili smo podatke koji odgovaraju mesecima u kojima je vršeno uzorkovanje. Za reke Savu i Dunav analiza fizičko-hemijskih parametara urađena je pojedinačno, zbog postojanja podataka za veliki broj lokaliteta (lokaliteti sa sunđerima i lokaliteti bez sunđerica). Pošto je na pritokama Save i Dunava pregledan manji broj lokaliteta, analiza fizičko-hemijskih parametara rađena je objedinjeno za reke sa sunđerima s jedne strane, i reke bez sunđerica sa druge. Za jezera Srbije, kao i za vodna tela Severne Makedonije i Crne Gore, s obzirom na mali broj nalaza, nije urađena analiza distribucije u odnosu na pomenute parametre.

4.5.1 Dunav i Sava

Duž reke Dunav ispitan je veliki broj lokaliteta od Nemačke do delte u Rumuniji i Ukrajini. Fizičko-hemijski parametri koje smo na osnovu literaturnih podataka (Richelle-Maurer et al., 1994) smatrali relevantnim za život sunđerica i koji su ušli u statističku analizu su sledeći: temperatura vode, pH, elektroprovodljivost, suspendovane materije, rastvoreni kiseonik, zasićenje kiseonikom, ukupna tvrdoća vode, rastvoreni ugljen dioksid, bikarbonati, ukupne rastvorene soli, silikati, i kalcijum.

Za statističku analizu fizičko-hemijskih parametara korišćeni su podaci sa ukupno 74 lokaliteta, pribavljeni iz izveštaja ICPDRa za JDS3, odnosno iz Agencije za zaštitu životne sredine Srbije. U Tabeli 5 je prikazan zbirni pregled vrednosti fizičko-hemijskih parametara na lokalitetima sa sunđerima i onim na kojima sunđerici nisu nađeni.

U Dunavu su samo dva parametra pokazala statistički značajnu razliku između lokaliteta na kojima su pronađeni sunđerici, u odnosu one na kojima ih nije bilo. To su suspendovane čestice i ugljen dioksid.

U Savi nijedan od izmerenih parametara nije se razlikovao sa statističkom značajnošću između lokaliteta sa i bez sunđerica. Na granici značajnosti bili su parametri električna provodljivost ($p=0,053$) i rastvoreni organski ugljenik – DOC ($p=0,060$) (Tabela 6).

Tabela 5. Srednje vrednosti i standardne devijacije izmerenih fizičko-hemijskih parametara na Dunavu. Poređenje između lokaliteta gde je zabeleženo prisustvo sundera i onih gde sunderi nisu nađeni.

PARAMETRI	Sunderi prisutni		Sunderi odsutni		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
Temperatura °C	19.08	3.03	20.38	2.02	0.084
Suspend. čestice mg/l	8.80	6.22	19.41	14.55	0.027
Rastvoreni O ₂ mg/l	8.11	1.06	8.09	1.17	0.964
Zasićenje O ₂ %	87	5.04	89.75	6.68	0.519
Tvrdoća vode	181.31	7.88	174.5	2.07	0.102
CO ₂ mg/l	3.68	1.29	1.55	0.94	0.021
HCO ₃ mg/l	187.88	6.31	182.55	2.27	0.119
pH	8.00	0.20	8.08	0.24	0.324
Konduktivitet μS/cm	404	48.18	395.87	102.96	0.728
Ukupne soli mg/l	226.63	6.63	223.70	9.05	0.607
Silikati mg/l	5.43	0.58	5.67	1.14	0.717
Kalcijum (Ca ²⁺) mg/l	56.15	10.31	62.21	23	0.417

Tabela 6. Fizičko-hemijski parametri izmereni u Savi na lokalitetim sa i bez sundera.

PARAMETRI	Sunderi prisutni		Sunderi odsutni		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
Temperatura °C	24.20	0.56	20.218	4.43	0.157
pH	8.18	0.34	8.00	0.54	0.603
Rastvoreni O ₂ ppm	7.44	0.69	8.46	1.25	0.210
Zasićenje O ₂ %	89.37	9.39	94.55	13.22	0.541
Konduktivitet μS/cm	362.33	56.32	269.27	68.32	0.053
DOC mg/l	2.75	0.34	2.20	0.42	0.060
Silikati mg/l	2.06	0.07	1.48	0.56	0.108
Kalcijum (Ca ²⁺) mg/l	66.32	8.27	59.21	7.42	0.175

4.5.2 Pritoke Save i Dunava

U pritokama Save i Dunava, šest fizičko-hemijskih parametara je pokazalo statistički značajnu razliku vrednosti između reka sa sušerima i reka u kojima sušeri nisu zabeleženi. To su: rastvoreni kiseonik, tvrdoća vode, bikarbonati, konduktivitet, ukupne rastvorene soli i kalcijum (Tabela 7).

Tabela 7. Uporedni prikaz srednjih vrednosti i standardnih devijacija izmerenih parametara pritoka Save i Dunava sa i bez sušera i značajnost (p-vrednost) za svaki parametar.

PARAMETRI	Sušeri prisutni		Sušeri odsutni		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
Temperatura °C	16.09	6.12	14.82	6.23	0.364
Suspend. čestice mg/l	25.11	72.41	4.79	3.96	0.173
Rastvoreni O ₂ mg/l	9.09	1.59	10.19	2.38	0.040
Zasićenje O ₂ %	92.45	205.2	99.37	19.79	0.068
Tvrdoća vode	205.2	50.95	313.25	162.8	0.004
CO ₂ mg/l	2.39	2.27	1.92	2.81	0.380
HCO ₃ mg/l	222.11	57.93	264.96	78.62	0.003
pH	8.05	0.24	8.12	0.38	0.364
Konduktivitet μS/cm	454	97.29	645.92	329.71	0.009
Ukupne soli mg/l	262.41	55.96	379.63	200.31	0.009
Silikati mg/l	8.02	3.85	8.42	2.96	0.662
Kalcijum (Ca ⁺⁺) mg/l	61.25	18.13	88.52	34	0.001

Da bi se utvrdilo da li određene fizičko-hemijske karakteristike utiču povoljno na pojavu većeg broja vrsta tj. veći biodiverzitet, poređeni su parametri reke Tise u kojoj su zabeležene četiri vrste sušera, sa rekama u kojima nije nađen nijedan primerak. Kao značajan parametar, izdvojila se dodatno i koncentracija silikata (Tabela 8).

Tabela 8. Poređenje reke Tise sa rekama u kojima nema suđera.

PARAMETRI	Tisa		Reke bez suđera		p vrednost (t-test)
	sred. vrednost	STD	sred. vrednost	STD	
Temperatura vode	18.15	7.82	15.13	5.92	0.192
Susp. materije	23.92	17.80	4.66	3.85	0.003
Rastv. kiseonik	8.68	1.58	9.90	2.17	0.075
Zasićenje kiseonikom	90.67	7.64	97.75	17.80	0.075
Ukup. tvrdoća	152.08	9.64	275.03	155.59	0.000
Rastv. CO ₂	1.93	0.69	2.20	2.55	0.738
Bikarbonati	158.33	8.95	246.25	75.36	0.000
pH	8.00	0.07	8.10	0.34	0.147
Elektroprovodljivost $\mu\text{S}/\text{cm}$	458.83	47.12	562.66	319.63	0.009
Ukup. rastv. soli	274.42	20.95	330.06	193.36	0.015
Silikati	6.21	2.16	7.52	3.21	0.011
Ca	46.23	3.33	79.82	33.13	0.000

4.6 Distribucija Porifera u odnosu na prisustvo zagađivača

Pored opštih fizičkih i hemijskih parametara kvaliteta vode, u razmatranje je uzeto prisustvo određenih zagađivača i njihov uticaja na rasprostranjenje suđera.

Ispitana je povezanost prisustva ili odsustva suđera sa različitim koncentracijama sledećih parametara: nitrata, ortofosfata, natrijuma, hlorida, gvožđa, mangana, cinka, bakra, olova, aluminijuma i žive. Treba napomenuti da nije bilo moguće doći do podataka o koncentracijama svih navedenih jedinjenja i teških metala na svim vodotokovima, pa se stoga i tabele razlikuju.

4.6.1 Dunav i Sava

U Tabelama 9 i 10 prikazane su vrednosti glavnih zagađivača i vrednosti t-testa, odnosno statistička značajnost, ukoliko je postojala, između lokaliteta sa i bez suđera. Razlike za Savu i Dunav su gotovo zanemarljive.

Tabela 9. Koncentracije polutanata na lokalitetima na Dunavu i njihov uticaj na rasprostranjenje slatkovodnih suđera.

PARAMETRI	Suđeri prisutni		Suđeri odsutni		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
N-NO ₃	0.007	0.004	0.006	0.003	0.515
O-PO ₄	0.0002	0.00005	0.0002	0.0003	0.648
Hloridi (Cl-)	0.024	0.003	0.024	0.011	0.966
Natrijum (Na)	0.016	0.001	0.018	0.011	0.580
Živa (Hg)	0.004	0.001	0.004	0.001	0.631
Bakar	2.51	0.93	2.31	2.00	0.763
Cink (Zn)	4.35	3.45	6.32	7.83	0.546
Olovo (Pb)	0.452	0.210	0.801	1.159	0.466

Tabela 10. Koncentracije polutanata na lokalitetima na Savi i njihov uticaj na rasprostranjenje suđera.

PARAMETRI	Suđeri prisutni		Suđeri odsutni		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
Cink (Zn)	4	1.010	3.585	2.571	0.797
Olovo (Pb)	0.486	0.089	0.500	0.484	0.959
Mangan (Mn)	50.667	23.260	21.669	17.730	0.035
Gvožđe (Fe)	127.500	49.160	70.296	70.045	0.215
Natrijum (Na)	11.069	6.027	7.238	2.796	0.123
Hloridi (Cl)	25.063	20.138	13.237	8.090	0.126
Nitrati (N-NO ₃)	3.233	0.496	2.693	0.653	0.212

4.6.2 Pritoke Save i Dunava

Slično Savi i Dunavu, ni u pritokama ovih reka nisu se izdvojili parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku (Tabela 11).

Tabela 11. Polutanti u pritokama i uticaj na prisustvo sunđera.

PARAMETRI	Sunđeri prisutni		Sunđeri odsutni		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
Nitrati (N-NO ₃)	0.890	0.346	1.104	0.308	0.234
Ortofosfati (O-PO ₄)	0.068	0.031	0.064	0.029	0.795
Natrijum (Na)	14.931	10.476	13.947	4.723	0.834
Hloridi (Cl)	18.710	14.766	13.017	3.957	0.378
Gvožđe (Fe)	429.518	1605.647	483.456	841.365	0.607
Mangan (Mn)	66.466	75.309	65.353	38.166	0.974
Cink (Zn)	25.720	6.794	266.322	4.071	0.851
Bakar	5.694	2.874	13.056	11.589	0.184
Olovo (Pb)	21.774	53.328	3.240	2.705	0.416
Aluminijum (Al)	260.235	217.976	274.406	252.451	0.915

Pošto nije ustanovljen značajniji uticaj bilo kog od ispitivanih zagađivača na prisustvo odnosno odsustvo sunđera, u razmatranje je uzet njihov uticaj na pojavu anomalija u građi spikula. Poređene su koncentracije zagađivača u reci u kojoj su sunđeri imali najmanje anomalija (Tisa), sa rekom u kojoj su sunđeri imali najviše anomalija (Velika Morava). Uočena je statistički značajna razlika u koncentracijama ortofosfata, natrijuma i hlorida na ova dva lokaliteta (Tabela 12).

Treba uzeti u obzir da vrste pronađene na ovim lokalitetima nisu iste, što poređenje i statističku analizu čini složenijim. Ovom problematikom je potrebno baviti se detaljnije u daljim istraživanjima.

Tabela 12. Pregled značajnosti razlika parametara sa lokaliteta u kome je detektovano najviše anomalija spikula (Velika Morava, Bagrdan) i tamo gde ih je uočeno najmanje (Tisa, Martonoš).

PARAMETRI	Tisa, Martonoš		V. Morava Bagrdan		Sign. (T-test)
	Sred. vrednost	STD	Sred. vrednost	STD	
Nitrati (N-NO ₃)	0.675	0.314	1.200	0.455	0.106
Ortofosfati (O-PO ₄)	0.050	0.004	0.090	0.014	0.001
Natrijum (Na)	41.700	1.871	15.300	6.284	0.000
Hloridi (Cl)	55.600	4.412	14.650	3.535	0.000
Gvožđe (Fe)	501.175	326.819	966.250	1495.120	0.566
Mangan (Mn)	43.050	22.329	110.625	69.893	0.115
Cink (Zn)	21.800	5.213	31.875	13.413	0.211
Bakar	5.850	0.968	6.975	3.625	0.571
Olovo (Pb)	1.725	1.103	5.375	7.040	0.378
Aluminijum (Al)	343.875	225.354	533.550	751.903	0.646

4.6.3 Morfološke anomalije spikula

Na određenom broju uzoraka sundera prikupljenih na terenu uočeno je, sa različitim učestalostima, prisustvo atipičnih spikula, odnosno spikula sa različitim anomalijama. Zabeležene su sledeće vrste anomalija: zalomljene spikule, zatim spikule sa račvastim krajevima, odnosno bifurkacijama. Nešto ređe zastupljene bile su anomalije u vidu krupnijih, pojedinačnih trnova, pozicioniranih pod pravim uglom duž tela spikule. Najinteresantniju anomaliju predstavljala su sferična zadebljanja, jedno ili više, najčešće na sredini, ali ponekad i u nizovima celom dužinom spikule. Vrste anomalija kao i njihove učestalosti varirale su u većoj meri između prikupljenih jedinki sundera. Uglavnom su se sretale na megasklerama i mikrosklerama, a izuzetno retko anomalije su nalažene i na gemulosklerama.

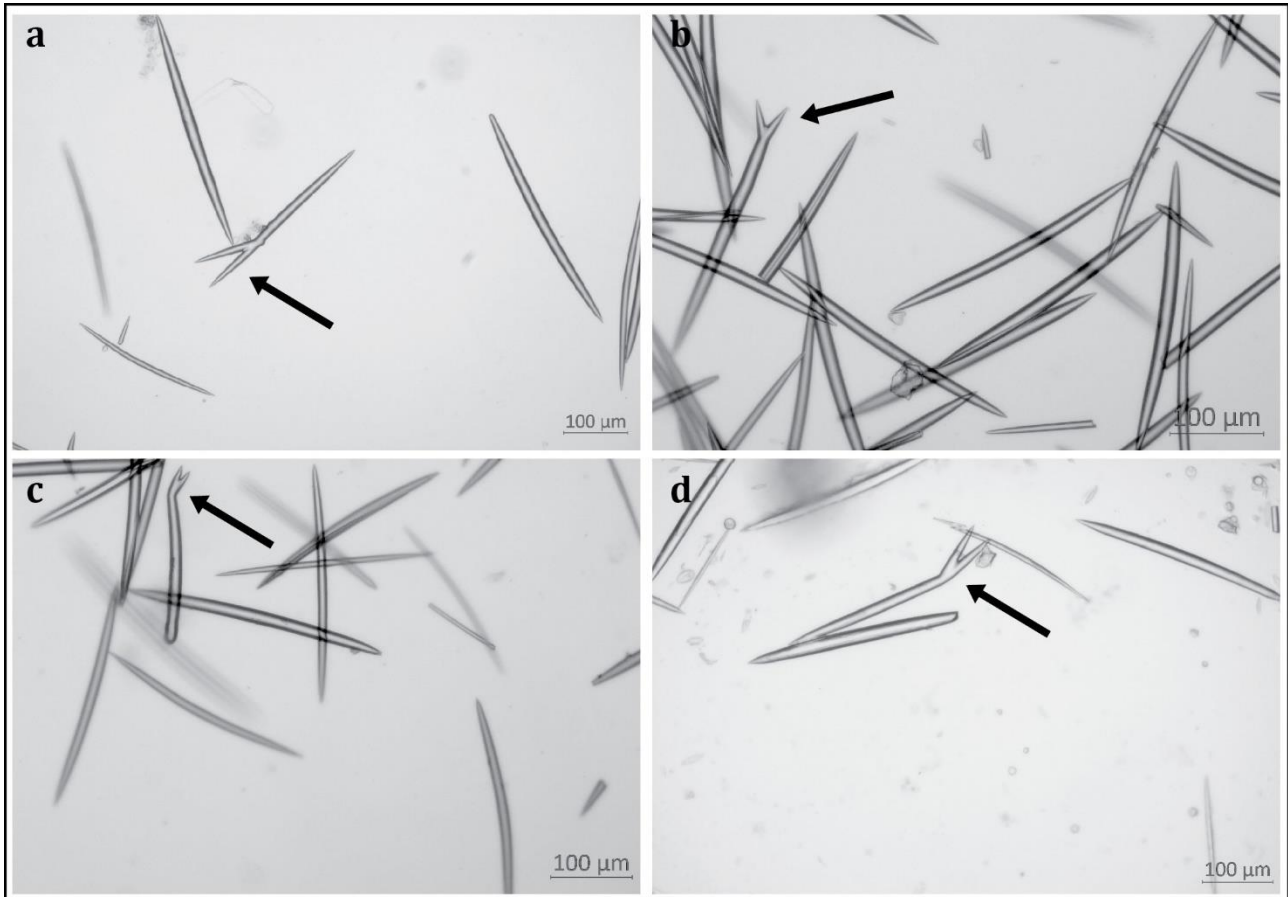
Pokušali smo da utvrdimo da li postoji povezanost prisustva anomalija sa koncentracijom poznatih zagađivača među kojima je posebna pažnja posvećena teškim metalima (Tabele 9-12).

Frekvencije anomalija kretale su se od 1×10^{-3} do 97×10^{-3} (prosečna vrednost 12×10^{-3}). Najveći broj anomalija zabeležen je kod primeraka vrste *E. fragilis* (97×10^{-3}), uzorkovanih na Velikoj Moravi kod Markovca. Kod ovog primerka najčešće anomalije bile su u vidu sferičnih zadebljanja spikula. Najniža učestalost anomalija zabeležena je kod primerka vrste *E. fluviatilis* (1×10^{-3}), prikupljenog na Tisi kod Kanjiže, čije su se anomalije uglavnom bile u obliku zalomljenih megasklera na jednom od krajeva. Iako su se lokaliteti na kojima su se nalazili sunderi sa najviše i oni sa najmanje anomalija u spikulama značajno razlikovali u koncentracijama merenih jedinjenja, ni jedna od koncentracija razmatranih jedinjenja nije prelazila granice propisane regulativama.

U ovom radu prikazani su osnovni tipovi anomalija spikula.

Račvaste spikule

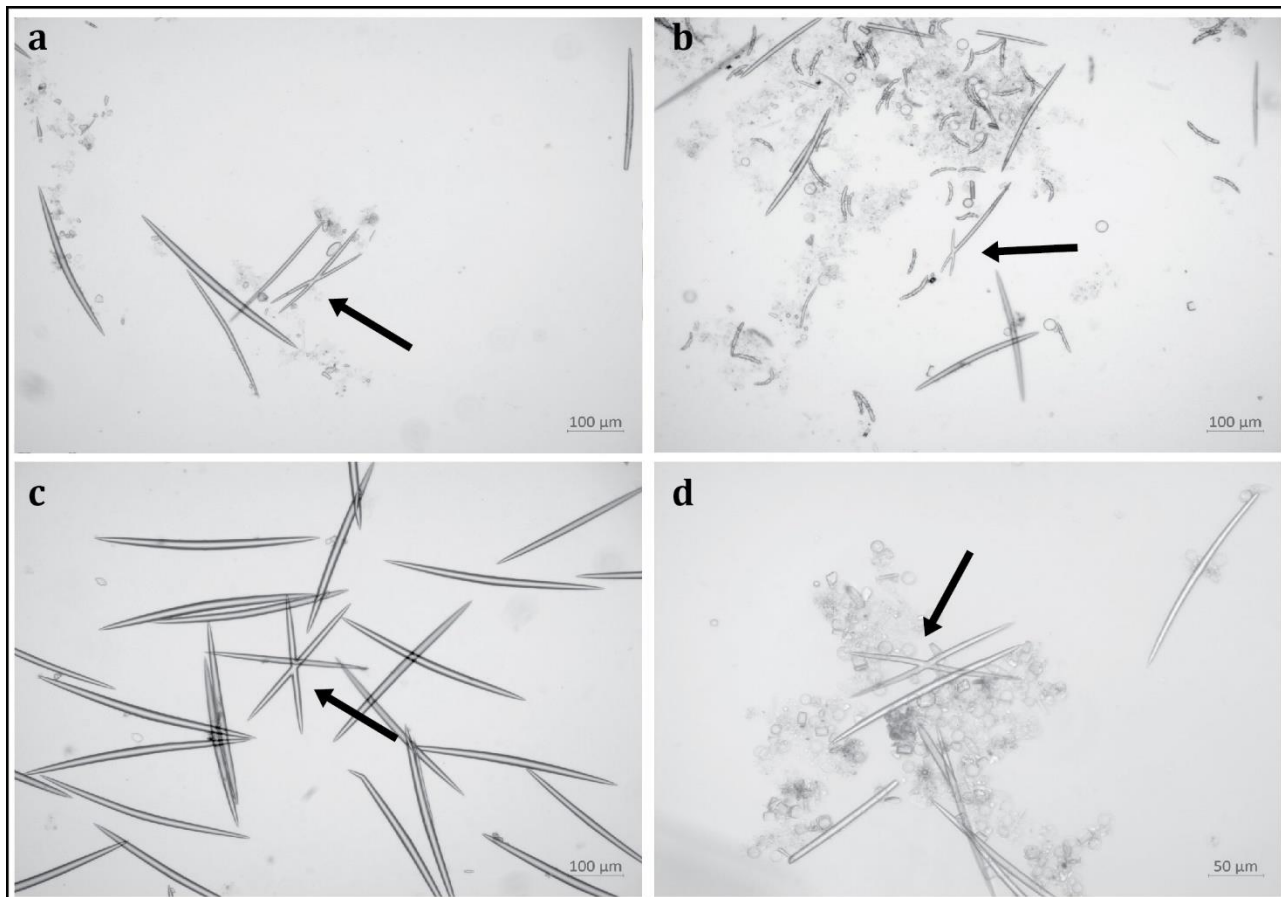
Ova vrsta anomalija je bila relativno često zapažena. Račvanje, odnosno bifurkacije mogu da se formiraju na jednom kraju, ili na oba, sa dubljim ili plićim usecima. Na Slici 37 se može videti nekoliko karakterističnih primera račvastih megasklera.



Slika 37. Svetlosna mikroskopija nekoliko reprezentativnih primera anomalija u obliku bifurkacija.

Makazaste spikule

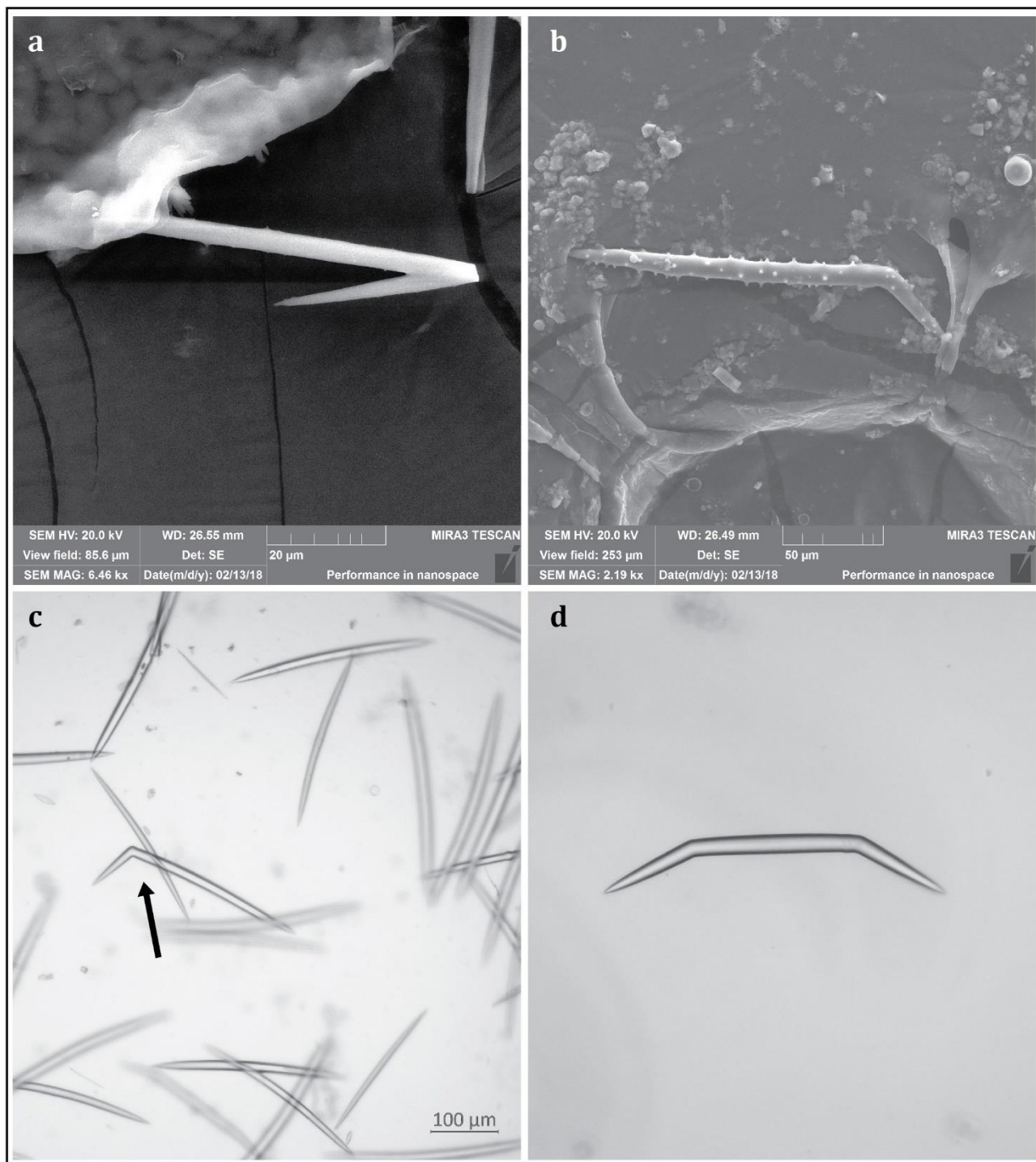
Ova vrsta anomalija je relativno česta. Kraci „makaza“ mogu da budu istih ili različitih dimenzija. Makaze mogu da budu zatvorenije i otvorenije tj. da formiraju krstastu strukturu. Na Slici 38 je dato nekoliko tipičnih primera makazastih megasklera.



Slika 38. Svetlosna mikroskopija: reprezentativni primeri anomalija u obliku makaza.

Zalomljene spikule

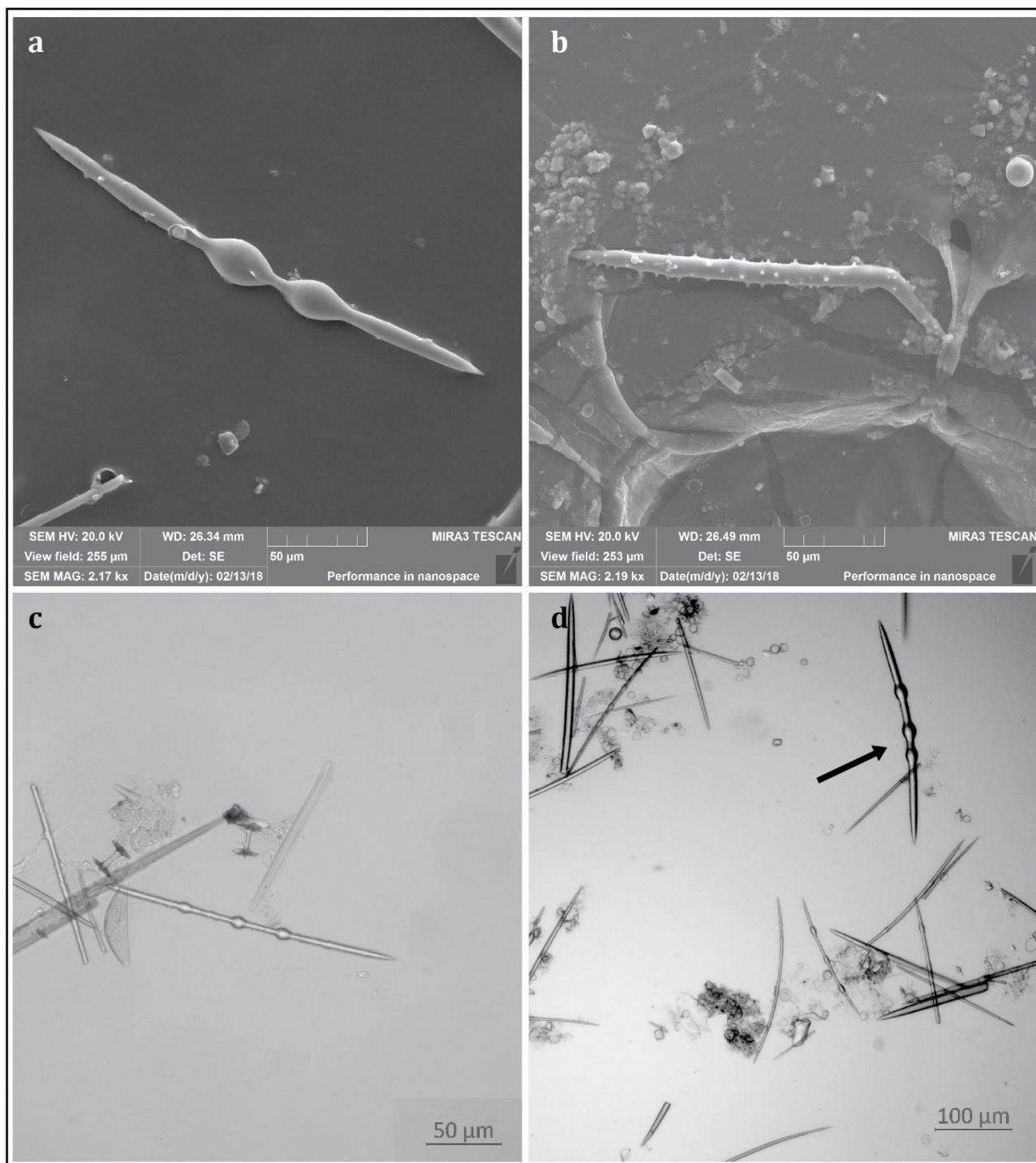
Zalomljene spikule su najčešće zabeležene anomalije i njihovo prisustvo utvrđeno je kod više vrsta. Neke megasklere su bile savijene bliže jednom od vrhova, neke na oba kraja, a neke po sredini. Uglovi pod kojim spikule mogu biti zalomljene variraju od tupih do oštrih. Na Slici 39 dato je nekoliko primera spikula savijenih na jednom i oba kraja, pod tupim i ostrim uglom. Ova vrsta anomalija najčešće je bila prisutna kod vrste *E. fluviatilis* i *E. muelleri*.



Slika 39. Reprezentativni primeri zalomljenih spikula. a) i b) SEM, c) i d) svetlosna mikroskopija.

Spikule sa proširenjima

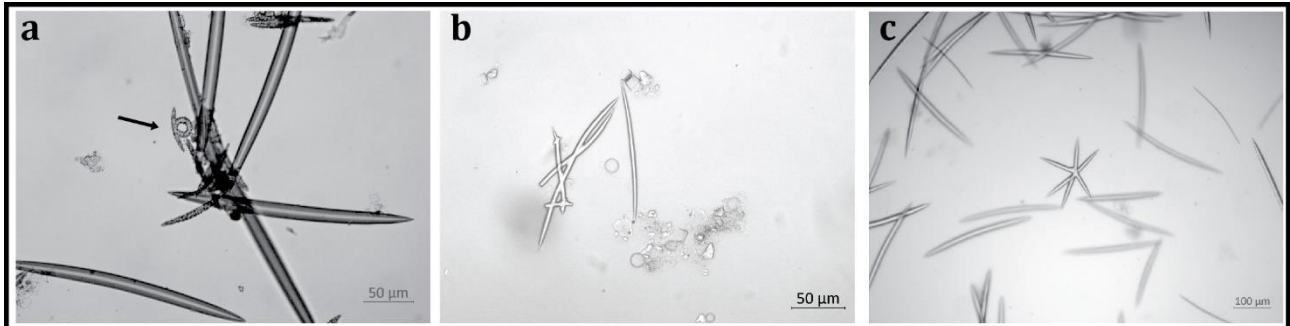
Ova zanimljiva anomalija bila je relativno retka u prikupljenom materijalu, i zabeležena je u najvećem broju kod vrste *E. fragilis*, u najrazličitijim varijantama, od pojedinačnih zadebljanja, preko zadebljanja samo na krajevima spikula, do čitavih nizova perlatah struktura duž cele spikule (Slika 40). Ova proširenja su primećena i kod megasklera i kod mikrosklera.



Slika 40. Reprezentativni primeri spikula sa anomalijama u vidu proširenja: a) i b) SEM, c) i d) svetlosna mikroskopija.

Retke anomalije

U veoma malom broju ili čak kao pojedinačni slučajevi, zapažene su sledeće anomalije: kružno uvijene gemulosklere, stopljene megasklere i zvezdaste poliaksijalne spikule (Slika 41).



Slika 41. Retke anomalije: a) uvrnuta gemulosklera *S. lacustris*; b) račvasta mineralna tvorevina koja podseća na nekoliko naizgled stopljenih spikula; c) atipična tvorevina koja podseća na poliaksijalnu spikulu morskih sunđera.

4.7 Objedinjena genetička i filogenetska analiza

4.7.1 Uporedna analiza 28S

Primarni cilj genetičkih analiza je potvrda rezultata dobijene putem morfološke identifikacije (svetlosna mikroskopija i SEM). Ukupno je sekvencirano 53 uzorka i dobijena je značajna podudarnost između dva pristupa u determinaciji vrsta (morfološke i genetičke). Kao što je prethodno istaknuto, u sklopu analize pojedinačnih vrsta, bez obzira na ograničenja genetičke analize, došlo se i do značajnih rezultata. Treba istaći da je prvi put parcijalna 28S sekvenca upotrebljena u identifikaciji vrste *T. horrida*. Takođe, otkrivena su i dva nova haplotipa *E. fluviatilis*, kao i novi haplotip vrste *E. fragilis*. Na Slici 42 istaknute su sličnosti i razlike između 28S sekvenci svih zabeleženih vrsta i haplotipova.

Za razlikovanje ovih pet vrsta sundera najznačajniji je region sekvence koji se prostire od 90-134. baznog para, gde se nalazi najveći broj mutacija („hotspots“).

	10	20	30	40	50
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	g a c c c g t c t	t	g a a a c a c g g	a	C C A A G G A G T	G	C A A C A T G C G	C	G C G A G T C T T	T
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43	T
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52
<i>Spongilla lacustris</i>
<i>Ephydatia muelleri</i>
<i>Trochospongilla horrida</i>
<i>Eunapius fragilis</i>	C
	60	70	80	90	100
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	G G G T G A G A C	G	A A A A G C C C T	G	T G G C G C A A T	G	A A A G T G A A G	C	G T C G G C T T G	-
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52
<i>Spongilla lacustris</i>	C	-
<i>Ephydatia muelleri</i>	-
<i>Trochospongilla horrida</i>	C	C T
<i>Eunapius fragilis</i>	-
	110	120	130	140	150
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	C C G A C G C G A	G	G C G A G A G C	-	C C T C T T C G C	G	G G G G C C C A T	C	G T C G A C C G A	T
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52	T
<i>Spongilla lacustris</i>	G	-	C	-	A	T
<i>Ephydatia muelleri</i>	-	C	G	T
<i>Trochospongilla horrida</i>	A	G	A	C	-	-	T
<i>Eunapius fragilis</i>	A	T	-	-	T
	160	170	180	190	200
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	C C T A T T C A C	T	T G T G A A G G G	A	T T C G A G T G A	G	A G C G T G C C T	G	T T G C G A C C C	G
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52
<i>Spongilla lacustris</i>
<i>Ephydatia muelleri</i>
<i>Trochospongilla horrida</i>
<i>Eunapius fragilis</i>
	210	220	230	240	250
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	A A A G A T G G T	G	A A C T A T G C C	T	G A G T A G G G T	G	A A G C C A G A G	G	A A A C T C T G G	T
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52
<i>Spongilla lacustris</i>
<i>Ephydatia muelleri</i>
<i>Trochospongilla horrida</i>
<i>Eunapius fragilis</i>
	260	270	280	290	300
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	G G A A G C T C G	T	A G C G A T T C T	G	A C G T G C A A A	T	C G A T C G T C A	A	A C T T G G G T A	T
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52
<i>Spongilla lacustris</i>
<i>Ephydatia muelleri</i>
<i>Trochospongilla horrida</i>
<i>Eunapius fragilis</i>
	310	320	330	340	
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 25	A G G G G C G A A	A	G A C T A A T C G	A	A C C A T C t a g	t	a g c t g g t t c	c	c t c c g a	
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 43	
<i>Ephydatia fluviatilis</i> 52	
<i>Spongilla lacustris</i>	
<i>Ephydatia muelleri</i>	
<i>Trochospongilla horrida</i>	
<i>Eunapius fragilis</i>	

Slika 42. Komparativna analiza sekvenci najčešćih evropskih sundera (istaknuti novootkriveni haplotipovi *T. horrida*, *E. fragilis* i *E. fluviatilis*).

4.7.2 Filogenetska analiza

Filogenetsko stablo konstruisano je na osnovu pojedinačnih predstavnika različitih haplotipova, primenom Neighbor-Joining (NJ) metode sa Kimura dvoparametarskim modelom na 5.000 iteracija, u programu MEGA X (Saitou and Nei, 1987).

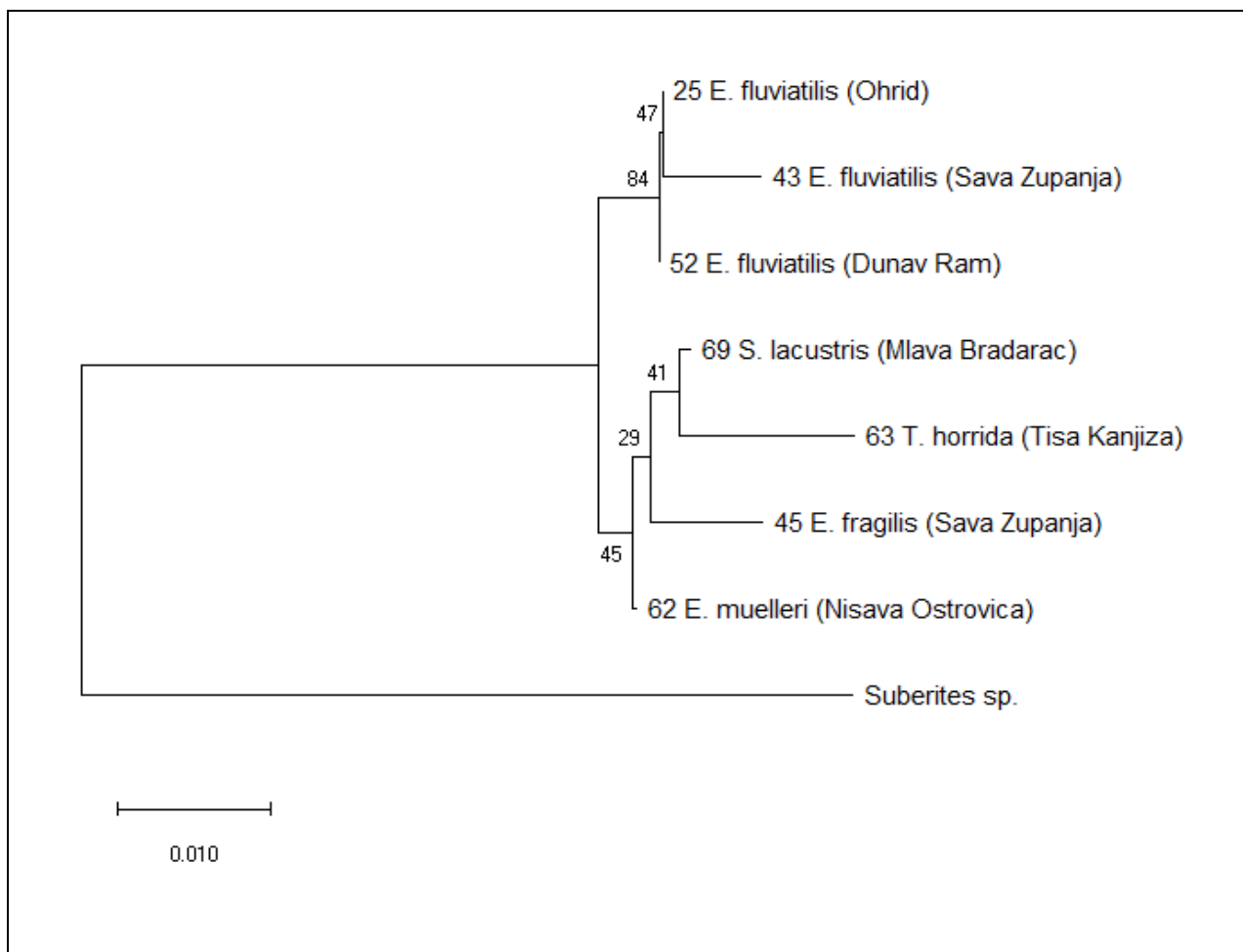
U Tabeli 5 prikazan je spisak svih sekvenciranih sundera po mestu nalaženja. Osim za identifikaciju vrsta sundera, dobijene sekvence iskorišćene su i za filogenetsku analizu, koja je obavljena na sedam prethodno navedenih haplotipova (od kojih tri karakterišu *E. fluviatilis*, dok su četiri preostala haplotipa specifična za četiri preostale vrste).

Uočava se da su analizirane vrste slatkovodnih sundera grupisane u dva sestrinska skupa (Slika 43). U prvu grupu izdvojili su se haplotipovi vrste *E. fluviatilis*, dok se u drugoj grupi nalaze sve preostale zabeležene vrste slatkovodnih Porifera. Druga grupu odlikuje slabija statistička podrška (verovatnoća ovakvog ishoda je ispod 50%), tako da je prezentovana topologija upitna.

Tabela 13. Spisak sekvenci analiziranih u ovoj studiji, vodna tela i zemlje porekla uzoraka. Sekvence sa „GenBank Accession“ brojem preuzete su iz NCBI baze radi poređenja.

redni br PCR	28S	vodno telo	zemlja	GenBank Accession #
64	Ephydatia fluviatilis	Nišava	Srbija	
12	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Nemačka	
30	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
31	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
32	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
33	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
34	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
35	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
38	Ephydatia fluviatilis	Sava	Srbija	
39	Ephydatia fluviatilis	Sava	Hrvatska	
42	Ephydatia fluviatilis	Sava	Hrvatska	
43	Ephydatia fluviatilis	Sava	Hrvatska	
47	Ephydatia fluviatilis	Sava	Srbija	
25	Ephydatia fluviatilis	Ohridsko jezero	Makedonija	
51	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
52	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
56	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
57	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
81	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
81	Ephydatia fluviatilis	Dunav	Srbija	
67	Ephydatia fluviatilis	Kolubara	Srbija	
75	Ephydatia fluviatilis	J. Morava	Srbija	
76	Ephydatia fluviatilis	J. Morava	Srbija	
70	Ephydatia fluviatilis	Z. Morava	Srbija	
73	Ephydatia fluviatilis	Crni Timok	Srbija	
77	Ephydatia fluviatilis	Crni Timok	Srbija	
78	Ephydatia fluviatilis	Crni Timok	Srbija	
80	Ephydatia fluviatilis	Crni Timok	Srbija	

60	Ephydatia fluviatilis	Nišava	Srbija	
59	Ephydatia fluviatilis	Nišava	Srbija	
68	Ephydatia fluviatilis	Bovansko jezero	Srbija	
	Ephydatia fluviatilis		Estonia	DQ454152
	Ephydatia fluviatilis		Italy	EF591285
	Ephydatia fluviatilis var. syriaca		Israel	JN116226
	Ephydatia fluviatilis var. syriaca		Israel	JN116227
	Ephydatia fluviatilis var. syriaca		Israel	JN116228
62	Ephydatia muelleri	Nišava	Srbija	
65	Ephydatia muelleri	Nišava	Srbija	
	Ephydatia muelleri		Belgija	EF591286
	Ephydatia muelleri		Estonia	DQ454153
71	Eunapius fragilis	V. Morava	Srbija	
45	Eunapius fragilis	Sava	Hrvatska	
44	Eunapius fragilis	Sava	Hrvatska	
14	Eunapius fragilis	Dunav	Nemačka	
	Eunapius fragilis		Estonia	DQ454155
36	Spongilla lacustris	Sava	Srbija	
37	Spongilla lacustris	Sava	Srbija	
40	Spongilla lacustris	Sava	Hrvatska	
41	Spongilla lacustris	Sava	Hrvatska	
46	Spongilla lacustris	Sava	Srbija	
48	Spongilla lacustris	Sava	Srbija	
49	Spongilla lacustris	Sava	Hrvatska	
53	Spongilla lacustris	Dunav	Srbija	
66	Spongilla lacustris	Kolubara	Srbija	
69	Spongilla lacustris	Mlava	Srbija	
	Spongilla lacustris		Estonia	DQ454154



Slika 43. Filogenetsko stablo haplotipova slatkovodnih sundera konstruisano na osnovu parcijalne sekvence D3 domena 28S rDNK.

5 Diskusija

Sunđeri čine veoma važnu komponentu slatkovodnih bentosnih zajednica. Bez obzira na široku distribuciju sunđera, njihov diverzitet, kao i abundanca, izrazito su varijabilni. Prisustvo sunđera zavisi od klimatskih faktora kao i od različitih fizičko-hemijskih i hidromorfoloških karakteristika vodnih tela koja naseljavaju (De Santo and Fell, 1996; Lucey and Cocchiglia, 2014; Poirrier, 1969).

Balkansko poluostrvo i Panonsku niziju karakterišu velika raznovrsnost i bogatstvo vodene faune (Bănărescu, 2004), Poslednjih godina se posvećuje velika pažnja sistematičnom i sveobuhvatnom monitoringu dve značajne reke pomenutog područja, Dunavu i Savi (Graf et al., 2015; Navarro-Ortega et al., 2015). Ipak malo ima podataka o slatkovodnim sunđerima za pomenuto područje. Među značajnim međunarodnim studijama koje se bave monitoringom Dunava i Save, jednu od najvećih predstavlja „Joint Danube Survey“ (JDS), istraživanje Dunava u koje su uključene sve zemlje kroz koje Dunav protiče (Graf et al., 2015; Sommerwerk et al., 2009). Temeljnim ispitivanjem reke Save bavio se projekat „Globaqua“, koji je objedinio Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu i Srbiju (Navarro-Ortega et al., 2015). Ovi projekti izučavali su najrazličitije aspekte ekologije Dunava i Save. Između ostalog, uključena je bila i opsežna studija makroinvertebrata, koja je ukazala na izuzetno bogatstvo vrsta. Međutim, bez obzira na svu njihovu opsežnost, ovi veliki projekti ponudili su veoma oskudne podatke o slatkovodnim sunđerima.

Pored nekoliko studija starijeg datuma, među kojima svakako treba spomenuti kapitalno delo Rudesku-a o sunđerima u Rumuniji „Porifera Potamospongiae“ (Rudescu, 1975), Gilberta i Hadžišćea o makedonskim sunđerima (Gilbert and Hadzisce, 1984), Bedeka i saradnika o slatkovodnim sunđerima u pećinama Jugoslavije (Bedek et al., 2008), generalno, malo je radova koji se bave grupom Porifera u oblasti Zapadnog Balkana i Panonske nizije. Treba istaći činjenicu da podataka o slatkovodnim sunđerima u rekama i jezerima Srbije do sada nije bilo, pa se stoga javila potreba za ovom studijom. Takođe, treba imati na umu da sunđeri postaju sve aktuelniji organizmi u domenu bioindikacije stanja voda. Istraživanja u tom smeru uglavnom su vezana za morske sunđere, tako da bi proučavanje diverziteta i rasprostranjenja slatkovodnih sunđera na prostoru Zapadnog Balkana i Panonske nizije obezbedilo temelje za nova saznanja o bioindikatorskom potencijalu sunđera kopnenih voda.

Istraživanja u okviru ove disertacije predstavljaju početak rada na ovoj problematici.

Kao jedan od ključnih nalaza ove studije treba istaći da je uzorkovanje sunđera duž Dunava (od Nemačke do Rumunije), Save (od Slovenije do Srbije), većine njihovih pritoka, kao i u jezerima Zapadnog Balkana i Panonske nizije, pokazalo nisku zastupljenost populacija sunđera, malu gustinu, mali broj vrsta po lokalitetu, i u većini slučajeva malu biomasu. Zabeležena je velika raznovrsnost oblika i boja sunđera, čije varijacije nisu bile u korelaciji sa vrstama, već su zavisile od faktora životne sredine, na šta ukazuju Manconi i Pronzato (Manconi and Pronzato, 2002).

Detektovane vrste Porifera

Od ukupno šest vrsta registrovanih u Centralnoj Evropi (Dröscher and Waringer, 2007), u području obuhvaćenim ovom studijom zabeleženo je pet vrsta: *E. fluviatilis*, *S. Lacustris*, *E. muelleri*, *E. fragilis* i *T. horrida*. Iz literaturnih podataka može se zaključiti da vrste rodova *Ephydatia*, *Spongilla* i *Eunapius* spadaju u najrasprostranjenije (Manconi et al., 2013; Manconi and Pronzato, 2008, 2002; Van Soest et al., 2018), što su potvrdili i rezultati ovog istraživanja.

U ovoj studiji *E. fluviatilis* je vrsta koja je detektovana na najvećem broju lokaliteta i u najrazličitijim staništima. Vrsta je zabeležena kako u većim tako i u manjim rekama, jezerima, akumulacijama i kanalima. Zabeležen je u sledećim vodnim telima: Dunav (Degendorf i Muhlau-Nemačka, Veliko Gradište, Donji Milanovac, Kladovo, Vinča, Ram, Radujevac, Brza Palanka-Srbija, Novoselo-Bugarska), Sava (u Srbiji: Ostružnica, Novi Beograd; u Hrvatskoj: Županja, Slavonski Brod), Tisa (Kanjiža), Kolubara (Ćelije), Južna Morava (Mezgraja), Velika Morava (Markovac), Zapadna Morava (Trstenik), Crni Timok (Lukovo), Nišava (Sićevačka klisura, Bela Palanka), Bovansko jezero i Ohridsko jezero (Makedonija). Ovakav nalaz potvrđuje kosmopolitsku distribuciju *E. fluviatilis* i u saglasnosti je sa većinom dosadašnjih istraživanja. Naime u mnogim studijama pokazano je da je *E. fluviatilis* široko rasprostranjen na severnoj hemisferi, dok su podaci za južnu hemisferu nešto oskudniji (Manconi and Pronzato, 2002). U evropskim rekama i jezerima, prisustvo *E. fluviatilis* opisali su brojni autori: Nemačka (Gugel, 2001, 2000), Belgija (Richelle-Maurer et al., 1994), Austrija (Dröscher and Waringer, 2007; Troyer-Mildner and Mildner, 2008), Italija (Cubeddu et al., 1995; Manconi and Pronzato, 2015; Pronzato and Manconi, 1987), Irska (Lucey and Cocchiglia, 2014) i drugi. Kako u pogledu makroskopskog izgleda (od beličaste, do braonkaste ili zelenkaste boje usled simbioze sa algama, sa jasno vidljivim porama i žučkasto-narandžastim sferoidnim gemulama) i supstrata koji ovi sunderi preferiraju, tako i u pogledu građe skeletnih elemenata, naši rezultati su podudarni sa rezultatima drugih autora koji su ispitivali građu slatkovodnih sundera (Manconi and Pronzato, 2015). Srednje dimenzije megasklera, mikrosklera i gemulosklera, kao i njihov izgled, u saglasnosti su sa nalazima objavljenim u nekoliko studija (Cocchiglia et al., 2013; Pronzato and Manconi, 2001; Ricciardi and Reiswig, 1993). Genetička analiza naših primeraka *E. fluviatilis* bila je u većini slučajeva podudarna sa sekvencama deponovanim u bazi podataka NCBI. Naime od 31 parcijalne sekvence 28S DNK, za 29 njih je pokazana stopostotna bazna podudarnost sa NCBI sekvencama, dok su dve predstavljale nove haplotipove vrste *E. fluviatilis*.

Nakon *E. fluviatilis*, *S. lacustris* je bila najrasprostranjenija vrsta među prikupljenim primercima sundera. Zabeležena je na sledećim lokalitetima ispitivane oblasti: u Dunavu (Degendorf, Muhlau-Nemačka, Golubac, Veliko Gradište, Ram-Srbija), Savi (u Srbiji: Beograd kod sajma, Novi Beograd, Ostružnica, Duboko; u Hrvatskoj: Županja), Tisi (Kanjiža, Sanad), Kolubari (Ćelije), Zapadnoj Moravi (Čačak), Mlavi (Bradarac), Plavskom i Skadarskom jezeru u Crnoj Gori i Dojranskom jezeru u Severnoj Makedoniji. Većina autora koja se bavila rasprostranjenjem ove vrste (Copeland et al., 2019; Manconi and Pronzato, 1991; Roovere et al., 2006) se slaže da je i *S. lacustris* izrazito kosmopolitska vrsta poput *E. fluviatilis*, što su potvrdili i rezultati ovog istraživanja. Rasprostranjen je od Severne Amerike, preko Azije do Evrope, a smatra se najčešćom vrstom u Centralnoj Evropi (Manconi and Pronzato, 2000, 1991). Opisan je u rekama Nemačke (Gugel, 2000), Belgije (Richelle-Maurer et al., 1994), Austrije (Dröscher and Waringer, 2007), Irske (Lucey and Cocchiglia, 2014), Italije (Pronzato and Manconi, 1987). Makroskopski izgled ove vrste u rekama i jezerima obuhvaćenim ovom studijom, bio je sličan ranije opisanom. Cilindrični, prstoliki izraštaji koji se zračno prostiru granajući se od osovine tela pričvršćene za supstrat, najčešće zelenkaste boje zbog prisustva simbiotskih algi, ponekad braon ili beličast, je opis *S. lacustris* koji navodi većina autora i koji je u saglasnosti sa izgledom primeraka ove vrste koji su zabeleženi u ovom istraživanju (Manconi and Pronzato, 2008, 2007; Pronzato et al., 2017). Dimenzije spikula i njihova morfologija poklapaju su se sa prethodno objavljenim podacima o karakteristikama mineralnog skeleta ove vrste (Pronzato and Manconi, 2001). Takođe, analiza 11 parcijalnih sekvenci 28S DNK pokazala je potpunu homologiju sa ranije publikovanim sekvencama, deponovanim u bazi NCBI.

E. muelleri je bila treća najzastupljenija vrsta u ovoj studiji, što je takođe u saglasnosti sa literaturnim podacima o njenoj distribuciji u Evropi (Hooper and Van Soest, 2002; Lucey

and Cocchiglia, 2014; Manconi and Pronzato, 2002; Roovere et al., 2006). *E. muelleri* je pronađena na sledećim rekama, odnosno lokalitetima: Tisa (Kanjiža), Nišava (Bela Palanka i Sićevačka klisura), Kolubara (Veliki Crljeni), Beli Timok (nizvodno od Knjaževca) i u Skadarskom jezeru, u Crnoj Gori. Makroskopski teško razlikovati *E. fluviatilis* od *E. muelleri*, te su ove dve vrste dugo smatrane jednom. Usled simbioze sa algama, i *E. muelleri* je često zelene boje, ali može se sresti i u raznim nijansama braon, sive i žute boje. Oblik tela je nepravilan a površina često papilozna, sa gemulama sferičnog oblika koje prožimaju ceo sunder. Opis vrste koji su dali autori koji su se bavili njenom morfologijom poklapa se sa izgledom primeraka zabeleženih tokom ovog istraživanja (Pronzato and Manconi, 2001; Ricciardi and Reiswig, 1993). Mikroskopska identifikacija omogućava sa značajnom sigurnošću razlikovanje *E. muelleri* od *E. fluviatilis*, iako su im i megasklere vrlo slične. Međutim, gemulosklere ove dve srodne vrste pokazuju fine razlike (urezi u rotuli *E. muelleri* su dublji a broj zubaca manji nego kod *E. fluviatilis*) što je dovoljno za razlikovanje ove dve vrste (Pronzato and Manconi, 2001; Ricciardi and Reiswig, 1993). Genetičkom analizom utvrđena je potpuna podudarnost četiri sekvencirana primerka sa odgovarajućim 28S DNK sekvencama iz NCBI.

Vrsta *E. fragilis* je bila je slabo zastupljena na lokalitetima obuhvaćenim ovim istraživanjem, sa uzorcima sakupljenim samo na pet lokaliteta u sledećim rekama: Dunav (Donji Milanovac, Kladovo-Srbija, Pristol-Rumunija), Sava (Županja) i Velika Morava (Markovac). Autori ovu vrstu, uz *T. horrida*, navode kao najređu u evropskim rekama (Lopp et al., 2007; Richelle-Maurer et al., 1994). Zanimljivo je da je ova vrsta pronađena na samo jednom lokalitetu od preko 200 reka pregledanih u južnoj Irskoj (Cocchiglia et al., 2013). Makroskopske karakteristike naših primeraka (telo jastučastog oblika sa vidljivim porama na površini, braon ili sivkasto-beličaste boje, a kada je u simbiozi sa algama zelenkast), kao i mikroskopski izgled spikula, uglavnom su u saglasnosti sa opisima ove vrste publikovanim od strane drugih autora (Pronzato and Manconi, 2001; Schletterer and Eggers, 2006). Dimenzije spikula izrazito su varijabilne, što je u skladu sa veličinama spikula primeraka sundera ove vrste zabeleženih u ovom istraživanju. Ricciardi navodi da se dužina megasklera kreće od 165-261 μm , a širina od 4-14 μm (Ricciardi and Reiswig, 1993), Manconi i Pronzato navode dimenzije koje su znatno veće (265-370 μm za dužinu i 14-24 μm za širinu megasklere) (Pronzato and Manconi, 2001) dok su na GBIF (Global Biodiversity Information Facility) date vrednosti 195-291 μm dužine i 9-18 μm širine ("*Eunapius fragilis* (Leidy, 1851)," n.d.). Gemulosklere su od 90-138 μm dužine i 6-9 μm širine. Ovakva varijabilnost dimenzija spikula najverovatnije je uslovljena i geografskim poreklom (ekotip) i sredinskim faktorima. Za morske Demospongia, potvrđen je jasan uticaj dubine i temperature vode na dužinu spikula (Bavestrello et al., 1993). Sekvenciranje četiri uzorka vrste *E. fragilis* pokazalo je izvesne razlike u odnosu na jedinu do sada objavljenu sekvencu *E. fragilis*, primerka poreklom iz Estonije. Haplotip koji je zabeležen u toku ovog istraživanja na svim sekvenciranim primercima razlikovao se od postojeće estonske 3D 28S sekvence (DQ454155) za dva bazna para (Lopp et al., 2007).

T. horrida, kao i *E. fragilis*, bila je vrlo slabo zastupljena na ispitivanim lokalitetima. Nađena je samo u sledećim rekama: u Dunavu (Veliko Gradište-Srbija i Hiršova-Rumunija), Tisi (kod Kanjiže), Zapadnoj Moravi (uzvodno od Kraljeva), Južnoj Moravi (Sveti Roman). Makroskopski izgled primeraka sakupljenih tokom ove studije (pljosnato telo koje prekriva supstrat u vidu tankog sloja nepravilnog oboda, od žućkaste do tamno braon boje, ili zelenkast usled simbioze sa algama), kao i građa spikula, a pre svega izuzetno karakteristična gemulosklera, u saglasnosti su sa opisima ove vrste koji su ranije objavljeni (Manconi and Pronzato, 2015, 2002; Schletterer and Eggers, 2006). Što se tiče genetičke analize, ova vrsta nikada ranije nije identifikovana korišćenjem parcijalne 28S sekvence, tako da je naša sekvenca (MH569483) prva te vrste i ne može biti poređena sa drugima.

U sklopu ove disertacije urađena je morfološka analiza ograničenog broja endemskih sundera poreklom iz velikih makedonskih jezera Dojranskog, Prespanskog i Ohridskog. Treba naglasiti da tokom rada na terenu u Makedoniji nije pronađen nijedan primerak ovih endemskih vrsta, svi primerci su ustupljeni iz zbirke Prirodnjačkog muzeja u Skoplju. Mali broj studija se bavi morfologijom endemskih vrsta sundera koji naseljavaju stara jezera Makedonije. Morfološke karakteristike *E. carteri prespensis*, endemske podvrste iz Prespanskog jezera, analizirane u ovoj disertaciji uglavnom su podudarne sa dimenzijama i oblikom elemenata mineralnog skeleta odnosno megasklera, koje je dao Hadžišće (Hadzisce, 1953). Prema Hadžišće kod *E. carteri* mikrosklere postoje i po svojoj građi dosta podsećaju na megasklere, ali su manjih dimenzija. Gemulosklere su identične samo nešto manjih dimenzija od mikrosklera, pa je veoma teško razlikovati ove dve grupe spikula, što je u skladu s našim rezultatima, jer kod analiziranih muzejskih primeraka nisu nađene spikule koje po formi i dimenzijama odgovaraju opisu mikro- i gemulosklera *E. carteri prespensis*. Treba napomenuti da preparat nije sadržao veliki broj spikula, pa je to možda objašnjenje zašto nisu uočene ove kategorije skeletnih elemenata. Pored megasklera jedino su uočene tanke spikule oštih vrhova za koje Hadžišće, ne definišući klasu kojoj pripadaju, pretpostavlja da su spikule koje ulaze u sastav bazalne membrane, odnosno da se nalaze u sloju koji je u kontaktu sa supstratom (Hadzisce, 1953).

Malobrojni literaturni podaci (Hadzisce, 1953), ukazuju na to da ovu makedonsku endemsku vrstu često naseljavaju organizmi iz grupa Chironomidae, Nematoda i Hydracarina, što nije uočeno kod analiziranih muzejskih primeraka.

Dimenzije analiziranih megasklera muzejskih primeraka *S. prespensis*, se uglavnom podudaraju sa malobrojnim literaturnim podacima. Naime Hadžišće (Hadzisce, 1953) i Pronzato i Manconi (Pronzato and Manconi, 2001) pominju vrednosti od 170-200 μm dužine, dok megaskleremuzejskih primeraka dostizale dužine i do 235 μm . Ovi autori ne navode dužine mikrosklera, ali se njihova širina od 2-4 μm , podudara sa onom ustanovljenom u analiziranim muzejskim primercima. Takođe, stepen „hrapavosti“, odnosno prekrivenosti spikula trnovima se kako kod nas tako i kod ostalih autora pokazao kao izrazito varijabilan.

Distribucija

U Dunavu, od šest zemalja koje je istraživanje obuhvatalo, duž 2.580 km rečnog toka, sunderi su nađeni u četiri zemlje (u Nemačkoj, Srbiji, Rumuniji i Bugarskoj). Najučestalija vrsta u Dunavu bila je *E. fluviatilis* i predstavljala je oko 80% svih prikupljenih primeraka. Procentualna zastupljenost vrsta *S. lacustris* i *E. fragilis* u odnosu na ukupan broj prikupljenih primeraka sundera iznosila je oko 10% dok je samo po jedan primerak vrste *T. horrida* pronađen na dva lokaliteta na Dunavu (Veliko Gradište – Srbija i Hiršova - Rumunija). Sunderi su nađeni na relativno malom broju pregledanih lokaliteta i brojnost pronađenih primeraka bila je mala. Takođe, nije utvrđeno prisustvo jedne od vrsta karakterističnih za ovaj deo Evrope, vrste *Heteromeyenia stepanowii* (Dybowski, 1884). Pretpostavka je da je jedan od razloga za ovo i nivo zagađenja vode na ispitivanim lokalitetima. Značajan je podatak da je u reci Rajni, početkom 20. og veka bilo preko 80 zoobentosnih vrsta (Tittizer et al., 1990), da bi sedamdesetih godina prošlog veka taj broj pao na svega 12, što je dovedeno u vezu sa visokim zagađenjem ove reke. Dvadesetak godina kasnije, broj vrsta je ponovo počeo da raste, ali je zajednica bentosnih organizama bila značajno izmenjena. Što se samih sundera tiče, početkom 20. og veka u Rajni su zabeležene sledeće vrste sundera: *S. lacustris*, *E. fluviatilis*, *E. muelleri* i *T. horrida*, da bi sedamdesetih godina konstatovana samo jedna vrsta - *E. fluviatilis* (Conrath et al., 1977). Početku ovog veka dolazi do obnavljanja populacije sundera koju koju čini šest vrsta: *T. horrida*, *E. fluviatilis*, *S. lacustris*, *E. muelleri*, *E. fragilis* i *E. carteri* (Gugel, 2001). U periodu 2016-2018., kada je obavljeno uzorkovanje na Dunavu za potrebe ove doktorske disertacije, primerci sundera su bili izrazito retki. Grupa Porifera zahteva detaljan monitoring

specifičnih staništa u svim tipovima vodotokova da bi se pratila promena brojnosti vrsta. Za reku Rajnu zanimljiv je i podatak da je *T. horrida* bila najčešće zastupljena vrsta sunđera, kao i za reku Volgu (Schletterer and Eggers, 2006), što se ne podudara sa rezultatima ovog istraživanja, u kome je na Dunavu *E. fluviatilis* bio dominantna vrsta, a *T. horrida* nađena je na samo dva lokaliteta (jedan u Srbiji i jedan u Rumuniji). Za razliku od Rajne, reke i kanali Belgije pokazuju značajnu podudarnost sa našim nalazima za Dunav u pogledu zastupljenosti vrsta (sa izuzetkom *E. muelleri*). Najzastupljenija vrsta je *E. fluviatilis*, slede vrste *E. muelleri* i *S. lacustris*, a najređe su vrste *E. fragilis* i *T. horrida* (Richelle-Maurer et al., 1994). Slična distribucija sunđera, sa izuzetkom *Racekiela ryderi* (Potts, 1882), registrovana je i u Južnoj Irskoj, gde je istraživanje obavljeno u periodu 1982-2013. Nađene su sledeće vrste: *E. fluviatilis*, *R. ryderi*, *S. lacustris*, *E. muelleri* i *E. fragilis* (Lucey and Cocchiglia, 2014). U rekama Estonije najčešća vrsta je *E. fluviatilis*, sledi vrsta *S. lacustris*, a najslabije zastupljena je bila *E. fragilis* (Lopp et al., 2007). U rekama Ukrajine nađene su vrste *S. lacustris*, *E. fluviatilis*, *E. müelleri*, *E. fragilis*, *E. carteri*, *T. horrida* i *H. stepanovii* (Trylis and Shcherbak, 1996), pri čemu je zastupljenost bila slična onoj zabeleženoj u našoj studiji.

Već je istaknuto da postoji malo radova vezanih za rasprostranjenje sunđera u Dunavu (Andjus et al., 2017). U zajednici makrozoobentosa Dunava u austrijskom delu pominju se sledeće vrste po opadajućoj učestalosti: *E. fluviatilis*, *S. lacustris*, *E. muelleri*, *E. fragilis* i *T. horrida* (Dröscher and Waringer, 2007). Od šest centralnoevropskih vrsta ovi autori su pronašli čak pet vrsta u plavnoj zoni Dunava u blizini Beča. Tokom našeg istraživanja, u delu Dunava koji protiče kroz Austriju, nije pronađen nijedan primerak Porifera. Treba istaći da naše uzorkovanje nije obuhvatilo područje plavne zone nizvodno od Beča, čime se objašnjava odstupanje naših rezultata od nalaza ova dva autora.

U izveštaju ICPDR-a detaljno su analizirani podaci prikupljeni tokom Trećeg zajedničkog istraživanja Dunava (JDS3) (Graf et al., 2015). Od svih zabeleženih taksona makrozoobentosa, navodi se da najveću abundancu ima grupa Amphipoda, a najveću biomasu grupi Mollusca (Graf et al., 2015). Grupa Porifera se pominje kao deo zajednice makrozoobentosa, bez detaljnijih informacija o broju vrsta, tako da je bilo teško porediti ove podatke sa podacima našeg istraživanja.

Broj prikupljenih primeraka sunđera u Savi bio je mali, kao i u Dunavu. Primerci su pronađeni na lokalitetima u Hrvatskoj i u Srbiji, odnosno u srednjem i donjem toku reke Save. Ovde Sava postaje tipično ravničarska reka koju odlikuje šire korito, sporiji tok i pojava muljevite podloge, što mogu biti faktori rasprostranjenja slatkovodnih sunđera. Kao što je već rečeno, na reci Savi sprovedeno je nekoliko međunarodnih istraživanja, ali sunđeri nikada nisu bili u fokusu, poput situacije sa monitoringom Dunava, već je njihovo prisustvo samo konstatovano. U slovenačkom delu sunđeri nisu zabeleženi. U hrvatskom delu Save, na lokalitetu kod Županje zabeležene su tri vrste sunđera, dok su na lokalitetima u Srbiji (svi u zoni Beograda) bili retki. Najčešća vrsta bila je *S. lacustris*, praćena sa *E. fluviatilis*, dok je vrsta *E. fragilis* bila retka.

Grupa Porifera slabo je bila zastupljena i na ostalim ispitivanim lokalitetima u regionu. Ova studija predstavlja početak (detaljnog) istraživanja ove grupe organizama u Srbiji. Slatkovodni sunđeri predstavljaju relativno retku grupu organizama unutar zajednice vodenih makrobeskičmenjaka. Njihova raznovrsnost je ograničena na, za sada, šest (pet u Srbiji) opisanih vrsta, i abundanca je niska (pregledana vodna tela predstavljaju veliki procenat vodenih ekosistema u Srbiji, te se mogu smatrati reprezentativnim). U 11 od 17 istraživanih reka prikupljeno je relativno malo primeraka sunđera, a u tri od 11 jezera svega sedam primeraka. U pet reka (Sava, Mlava, Beli Timok, Crni Timok i Porečka reka) nađena je samo po jedna vrsta. U Nišavi, Velikoj Moravi i Južnoj Moravi pronađene su po dve vrste sunđera. Samo jedna ili dve vrste sunđera u određenom vodnom telu, nije retka pojava i zabeležena je u slivu

reke Ebro u Španiji, gde su pronađene dve vrste, *E. fluviatilis* i *E. fragilis* (Oscoz et al., 2009), u reci Temo (Sardinija, Italija) *E. fluviatilis* je jedina zabeležena vrsta (Cubeddu et al., 1995; Pronzato and Manconi, 1994), a *E. fluviatilis* je takođe bio jedina zabeležena vrsta u Rajni sedamdesetih godina prošlog veka (Conrath et al., 1977). U Kolubari i Zapadnoj Moravi pronađene su tri vrste, a sa najvećim zabeleženim diverzitetom bila je Tisa (lokalitet kod Kanjiže) u kojoj su zabeležene četiri vrste sunđera: *E. fluviatilis*, *E. muelleri*, *S. lacustris* i *T. horrida*. U Drini, Ibru, Jadru, Peku, Zložnici i Uvcu, sunđeri nisu pronađeni.

Sunđeri su bili slabo zastupljeni i u stajaćim vodama koje su obuhvaćene ovim istraživanjem. U svim jezerima u kojima su sunđeri nađeni, kako u Srbiji, tako i u Severnoj Makedoniji i Crnoj Gori, samo dve vrste su bile prisutne: *E. fluviatilis* i/ili *S. Lacustris*. U ispitivanim jezerima sunđeri su bili oskudni. Druge vrste nisu identifikovane u periodu kada je vršeno uzorkovanje. Prisustvo vrsta *E. fluviatilis* i *S. lacustris* sasvim je očekivano. Izostale su druge vrste koje su inače nađene u rekama Zapadnog Balkana i Panonske nizije tokom ove studije. Imajući u vidu (nekadašnje) bogatstvo severno makedonskih jezera endemskim vrstama sunđera, kao što su *S. stankovici*, *E. carteri*, *S. prespensis* i *O. rotunda* (Gilbert and Hadzisce, 1984; Hadzisce, 1953), nalazi ovog istraživanja za Severnu Makedoniju indikuju smanjenje raznovrsnosti sunđera, što ujedno može da bude polazna tačka za buduća istraživanja ove grupe organizama. Rezultati vezani za nalaženje sunđera u jezerima Evrope i sveta uopšte su veoma raznoliki. U Ženevskom jezeru pronađene su četiri vrste: *S. lacustris*, *E. fragilis*, *E. fluviatilis* i *E. muelleri*, dok je u jezeru Neuchatel (Švajcarska), na jednom lokalitetu, pored pomenute četiri vrste nađena i *T. horrida* (Manconi and Desqueyroux-Faundez, 1999). U jezeru Bajkal (Rusija) zabeležena je ekstremno velika raznovrsnost Porifera, sa 13 vrsta i jednom podvrstom koja pripada endemskoj familiji Lubomirskiidae iz reda Cornacuspongida (Maikova et al., 2017). Ne samo što je u pitanju veliki broj vrsta, već se radi i o velikoj biomasi, jer ovi sunđeri formiraju podvodne šume u priobalnim delovima Bajkalskog jezera, što nije slučaj u našim krajevima (Pile et al., 1997). Jezero Kineret (Izrael) takođe karakteriše značajna raznovrsnost endemskih vrsta Malawispongiidae (Itskovich et al., 2013). Međutim, s druge strane ima i jezera siromašnih sunđerima, pa je tako *S. lacustris* jedina pronađena vrsta u jezeru Saklıgol u Turskoj (Altınsoçlı et al., 2014). Ove nalaze treba uzimati s rezervom jer bi se u daljim istraživanjima na novim lokalitetima, moglo zabeležiti prisustvo drugih vrsta sunđera.

Tokom ovog istraživanja sunđeri su načelno pokazali sklonost ka priobalnim zonama i sporijoj vodenoj struji, ali u plitkim rekama pronađeni su i na mestima dalje od obala, u sredini toka, bliže matici. Uglavnom su nalaženi na relativno malim dubinama (1 do 2 m dubine). Zabeleženi su na delimično potopljenom kamenju u plitkim brzacima, ali i na nešto većim dubinama u pojedinim jezerima. Bilo ih je kako na prirodnim, tako i na veštačkim supstratima što je u skladu sa nalazima drugih autora (Dröscher and Waringer, 2007; Manconi and Pronzato, 2008, 1991; Schletterer and Eggers, 2006). Tipičan supstrat na istraživanim lokalitetima u vodama Zapadnog Balkana i Panonske nizije činilo je manje ili veće kamenje, plutajuća debla ili korenje drveća, metalna burad splavova, i dr. Sunđeri često obrastaju ljuštore školjki koje za njih predstavljaju pogodnu podlogu.

U ovoj studiji sunđeri nisu nalaženi na peščanoj podlozi i u mulju, kao što navode drugi autori (Frost, 1991). Takođe nisu nađeni ni na glinenoj podlozi, kao što navode irski autori (Lucey and Cocchiglia, 2014). U nekim studijama su nalaženi na vrlo neobičnim podlogama. Tako je, na primer, *E. muelleri* zabeležena na unutrašnjem čeličnom zidu potopljenog kamiona u jezeru Centralne Nebraske (SAD) (Paulsen and Hoback, 2011). Ustanovljeno je da antropogene promene hidromorfologije vodnih tela, kao što su utvrđene obale i naperi, imaju pozitivan uticaj na populacije sunđera, jer stvaraju mikrohabitate sa sporijom strujom i pružaju stabilan supstrat za rast sunđera.

S obzirom da je period godine u kom je vršeno uzorkovanje bio adekvatan, slaba zastupljenost sunđera pripisuje se drugim faktorima, kao npr. tipu lokaliteta. Svi istraženi lokaliteti nisu imali podjednako povoljne uslove za život i razvoj sunđera. Pored karakteristika vrsta, odsustvo odgovarajućeg supstrata, brz protok vode, visok ili nizak vodostaj, nepovoljni fizičko-hemijski uslovi i druge karakteristike staništa mogli su imati uticaja na prisustvo odnosno odsustvo sunđera na određenom lokalitetu (Elexová and Némethová, 2003).

Fizičko hemijski parameri i distribucija sunđera

Bez obzira na zanemarljive razlike u vrednostima različitih parametara zabeleženih u našoj studiji, može se zaključiti da su sunđeri generalno pokazivali afinitet prema blago alkalnoj i dobro oksigenisanoj vodi, kao i afinitet prema višim temperaturama (oko 20 stepeni Celzijusa) i provodljivošću, srednjom količinom suspendovanih čestica, i nešto višom količinom kalcijuma i CO₂. Rezultati ovog istraživanja se ne razlikuju bitnije od rezultata drugih studija koje su uključivale analizu fizičko-hemijskih karakteristika lentičkih i lotičkih vodnih tela naseljenih sunđerima. Tako Richelle-Maurer i saradnici navode vrednosti veoma slične našim kada je reč o pH, njihovom konduktivitetu, temperaturi vode, rastvorenom kiseoniku, silikatima belgijskih reka u kojima su pronađeni sunđeri, (Richelle-Maurer et al., 1994) Fizičko hemijski uslovi u Dunavu gde Dröscher i Waringer nalaze sunđere slični su onima koji su zabeleženi tokom ove studije, u pogledu temperature vode, silikata, konduktiviteta i pH (Dröscher and Waringer, 2007). Ricciardi navodi slične fizičko-hemijske podatke za reke i jezera Istočne Kanade u kojima su pronađene iste vrste sunđera kao kod nas (Ricciardi and Reiswig, 1993). Međutim, studija slatkovodnih sunđera Konektikata (SAD) pokazala je da vrste koje su detektovane i kod nas (*S. lacustris*, *E. muelleri*, *E. fragilis*) žive u vodama sa kiselim ili neutralnim pH i sa znatno nižim konduktivitetom nego što je zabeležen u našim rekama (De Santo and Fell, 1996). Ovo upućuje na zaključak da kosmopolitske vrste sunđera karakteriše velika moć adaptacije, odnosno velika fiziološka plastičnost.

Zanimljivo je da je prilikom analize pritoka Save i Dunava nekoliko fizičko-hemijskih parametara pokazalo statistički značajnu razliku u vrednostima između reka sa sunđerima i reka u kojima sunđeri nisu nađeni. To su: rastvoreni kiseonik, tvrdoća vode, bikarbonati, konduktivitet, ukupne rastvorene soli i kalcijum. Iako su značajne varijacije zabeležene u pogledu većine fizičkih i hemijskih karakteristika analiziranih reka, čini se da samo nekoliko parametara utiče na distribuciju sunđera. Zapaženo je da je kalcijum jedinjenje koje pokazuje najveću statistički značajnu razliku između reka u kojima su sunđeri prisutni i onih u kojima nisu, što je u skladu sa postojećim kako terenskim, tako i laboratorijskim istraživanjima koja ukazuju na značajan uticaj koncentracije kalcijuma na rast, distribuciju i ekologiju Porifera uopšte (Belas et al., 1989; Francis et al., 1982; Økland and Økland, 1996). Ukupna tvrdoća vode, koja je često u korelaciji sa koncentracijom kalcijuma (Økland and Økland, 1996), očekivano je pokazala statistički značajne razlike u vodnim telima sa i bez sunđera. Čini se i da je prisustvo silikata takođe pozitivno uticalo na diverzitet sunđera, pošto se koncentracija silikata izdvojila kao značajan parametar u poređenju Tise, reke sa četiri vrste sunđera i reka bez sunđera.

Poređenjem fizičko hemijskih parametara lokaliteta na Dunavu na kojima su nađeni sunđeri i onih na kojima nisu statistički značajnu razliku pokazala se jedino u slučaju koncentracije CO₂ dok su se u sličnoj analizi za pritoke Save i Dunava izdvojili i drugi parametri. Jedno od mogućih objašnjenja je da vrsti *E. fluviatilis* koja je najrasprostranjenija u

Dunavu i čini 80% svih zabeleženih vrsta sunđera, odgovara širi spektar ekoloških uslova. Pošto je u pritokama pronađen veći broj vrsta, one zajedno, pokazuju veću osetljivost na pojedine faktore, pa otuda i veća značajnost ustanovljenih razlika ispitivanih parametara. Drugo moguće objašnjenje je da je ukupan broj lokaliteta koji su ušli u analizu bio veći kada se radilo o pritokama, što je takođe moglo da utiče na rezultate.

Distribucija Porifera i zagađenost voda

Ovo istraživanje predstavlja pokušaj dovođenja u vezu distribucije Porifera sa zagađenošću reka, odnosno prisustvom sledećih materija: nitrata, ortofosfata, natrijuma, hlorida, gvožđa, mangana, cinka, bakra, olova, aluminijuma i žive. Međutim, u Dunavu i u pritokama Save i Dunava nijedan parametar se nije izdvojio kao značajan. Samo je u Savi mangan pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji poređenjem reka sa i bez sunđera. Treba naglasiti da je nivo antropogenog zagađenja u istraživanoj oblasti relativno visok i varijabilan duž rečnih tokova (Antonijević et al., 2014). Ipak, dozvoljene koncentracije teških metala najčešće nisu prekoračene. Čak i u industrijskim zonama, sa neadekvatnim tretmanom otpadnih voda, većina teških metala nije prekoračila interventne vrednosti (Antonijević et al., 2014). Ipak, u nešto kasnijoj studiji pokazano je da su u Dunavu prosečne godišnje koncentracije žive i kadmijuma premašivale standarde kvaliteta životne sredine („Annual Average Environmental Quality Standards“ - AA-EQS), određene direktivom Evropske komisije („Directive 2008/105/EC“). Međutim ova studija takođe ističe da druga dva važna zagađivača, olovo i nikl, nisu premašivala dozvoljene vrednosti prema tada važećim standardima („Direktive 2008/105/EC“) (Ferenc, 2014). Osim toga, pokazano je da sunđeri mogu opstati u relativno zagađenoj vodi kao što je to slučaj sa Savom i Dunavom. Richelle-Maurer i saradnici su pokazali da vrste sunđera koje su zabeležene i u ovom istraživanju, mogu da tolerišu širok dijapazon koncentracija aluminijuma, barijuma, kadmijuma, kobalta, gvožđa i magnezijuma. Međutim *E. fluviatilis* i *E. fragilis* ipak imaju usporen rast u vodama sa visokom koncentracijom hroma, bakra, nikla, molibdena, olova i cinka, što nije slučaj sa *E. muelleri* i *S. lacustris* (Richelle-Maurer et al., 1994).

Bez obzira na to što su sunđeri nađeni i u rekama sa relativno visokim nivoom zagađenja, pretpostavljamo da prisustvo zagađivača ima posledice na biologiju sunđera, između ostalog, da uzrokuje malformacije spikula. Anomalije spikula su susretane kod različitih vrsta i na različitim lokalitetima. U ovom istraživanju, učestalosti anomalija znatno su se razlikovale, kako po lokalitetima tako i između vrsta, negde i po dva reda veličine. Mali broj sakupljenih primeraka sunđera, kao i činjenica da nisu sve vrste sunđera bile prisutne na istim lokalitetima, ograničile su poređenje specifičnih vrsta i njihovu sklonost ka aberantnoj spikulogenezi u datoj životnoj sredini. Najveći procenat anomalija nađen je kod *E. fragilis* (gotovo 10% spikula je bilo aberantno), dok je najniži bio kod *E. fluviatilis* (samo 1‰). Činjenica da je vrsta *E. fragilis* imala 10 puta više aberacija nego što je zabeleženo u proseku kod drugih vrsta, sugeriše da bi ova vrsta mogla biti osetljivija od ostalih na različite izvore zagađenja.

Pokušali smo da utvrdimo najčešće anomalije koje se sreću kod zabeleženih vrsta Porifera u rekama Zapadnog Balkana i Panonske nizije i utvrdimo mogućnost postojanja veze između pojave anomalija i fizičkih i hemijskih karakteristika vode. Interesantno je da su, uprkos brojnim studijama koje su se bavile procesom geneze spikula i njenom regulacijom, kako u morskim tako i u slatkovodnim sunđerima, *in vitro* i *in vivo* (Cao et al., 2007; Imsiecke et al., 1995; Müller et al., 2009; Nakayama et al., 2015; Wang et al., 2011), informacije u vezi sa pojavom anomalija spikula vrlo ograničene. Nekoliko značajnih radova pokrenulo je pitanje anomalija spikula i njihove veze sa zagađenjem vode. Na primer, uočene su nepravilnosti u

spikulama *Trochospongilla leidii* (Bowerbank, 1863), koja raste u metalnim vodovodnim cevima (Potts, 1887) i megasklerama *E. fluviatilis*, koja raste u vodi zagađenoj industrijskim otpadom (Old, 1932). Neka terenska zapažanja sugeriraju da su sunđeri osetljivi na hemijsko zagađenje (Harrison, 1974), dok druga istraživanja nisu uspela da pronađu jasnu vezu između malformacija spikula i specifičnih uzročnika (Penney and Racek, 1968). U izveštaju o sunđerima iz jezera Ilopango, El Salvador, velika učestalost spikula sa zadebljanim globularnim strukturama, opisana je kod vrste *Spongilla alba* Carter, 1849, a njihovo pojavljivanje povezano je sa visokim koncentracijama arsena (Belas et al., 1989; Poirrier and Trabanino, 1989). Ovakve strukture zabeležene su u velikom broju kod vrste *E. fragilis* i u ovom istraživanju. Zanimljivo je da su gemulosklere *E. fluviatilis* iz istog jezera bile bez malformacija. U studiji (Richelle et al., 1995) pokazano je da su na vrstu *E. fluviatilis* uticali kadmijum (Cd) i Živa (Hg), i da relativno niske koncentracije metala mogu izazvati malformacije u spikulama. U ovoj studiji sunđeri su veštački uzgajani u odabranim delovima reka koje karakterišu različite vrste zagađenja.

Postoje različite studije koje se eksperimentalno bave mehanizmima spikulogeneze i Holvoet i Van de Vyver su pokazali veliki uticaj koncentracije silikata na formiranje spikula *E. fluviatilis*, pre svega na njihovu brojnost (Holvoet and Van de Vyver, 1986). Broj spikula bio je uvek obrnuto proporcionalan koncentraciji silikata, bilo da su sunđeri uzgajani u standardnim uslovima u medijumu bogatom mineralima, bilo da su držani u medijumu sa hidroksiureom, inhibitorom formiranja filtracionog sistema, ili pak u medijumu sa puromicinom, koji remeti formiranje trodimenzionalne mreže. Ipak, u toj studiji nije bilo osvrta na mogući uticaj na morfologiju spikula (Van De Vyver et al., 1990). U studiji Nakaiama i sar. (Nakayama et al., 2015), detaljno je opisan složeni proces formiranja i pozicioniranja spikula, koji uključuje aktivnost različitih klasa ćelija kod *E. fluviatilis*, ali i u ovom slučaju razmatrana je isključivo normalna morfogeneza, bez pominjanja aberantne morfogeneze. U celini posmatrano, malo je radova u kojima se pominju i opisuju različiti tipovi anomalija spikula. Jedna od retkih je studija Richelle-Maurer i saradnika u kojoj se pominju anomalije slične onima koje su pomenute u ovom radu, kao što su spikule sa proširenjima, spikule sa bifurkacijama i spikule sa trnovima (Richelle-Maurer et al., 1994). Pomenuti autori dovode pojavu anomalija u vezu sa zagađenjem bilo iz domaćinstava, ili industrijskim.

Genetska studija

Molekularne metode u ovom radu su omogućile, na prvom mestu, proveru nalaza dobijenih morfološkim analizama, odnosno povećale su pouzdanost identifikacije i tako omogućile potvrdu određene vrste. Pored toga, pružile su izvestan uvid i u filogeniju ispitivanih vrsta. Treba napomenuti da ove metode imaju svoja ograničenja. Naime, mogu da se jave teškoće prilikom izolacije DNK, kao na primer da prinos DNK bude nedovoljan, ili da se javi kontaminacija poreklom od simbiotskih organizama. Takođe, ukoliko je sunđer čuvan u formalinu, česta je i fragmentacija DNK, što za posledicu ima otežanu reakciju amplifikacije željenog gena (Andjus et al., 2017). Osim toga, problem može predstavljati i odabir gena, jer su se pojedini lokusi pokazali nedovoljno informativnim (Hooper and Van Soest, 2002).

Genetska analiza sunđera bila je u skladu sa njihovom morfološkom analizom, a 28S sekvence dobijene u našem istraživanju uglavnom su bile u skladu sa sekvencama objavljenim od strane drugih grupa (Roovere et al., 2006). Regioni DNK molekula koji se najčešće koriste za ovu vrstu ispitivanja kod sunđera su: 18S i 28S rDNK (geni za ribozomske RNK male, odnosno velike subjedinice ribozoma), COI mtDNK (citohrom oksidaza subjedinica I mitohondrijalne DNK) i ITS2 ("Internal transcribed spacer") region (Addis and Peterson, 2005). Zbog spore stope evolucije, visoko konzervativna 18S rDNK najpodesnija je za analize

sundera na nivou klase i reda (Borchiellini et al., 2004; Manuel et al., 2002). Nasuprot tome, COI mitohondrijska DNK kod mnogih grupa životinja evoluirala dovoljno brzo da omogućava razlikovanje blisko srodnih vrsta (Addis and Peterson, 2005). Međutim, kod sundera je ovaj proces sporiji pa je ovaj region upotrebljiviji na nivou reda, familije i roda (Erpenbeck et al., 2002; Nichols, 2005). ITS2 rDNK ima brzu stopu evolucije (Addis and Peterson, 2005) i korišćena je za raščlanjivanje srodnih rodova i vrsta (Wörheide et al., 2004), kao i populacija (Duran et al., 2004). Prethodne studije pokazale su da je za identifikaciju sundera na nivou vrste veoma podesna analiza dela sekvence gena za 28S ribozomsku RNK nizvodno od 1.060-og nukleotida, za koju smo se i mi opredelili, jer sadrži idealan odnos konzervativnih i varijabilnih segmenata (Lopp et al., 2007; Roovere et al., 2006). U pitanju je sekvenca od 340 baznih parova, sa visoko očuvanim regionom od oko 150 baznih parova. Ova sekvenca od 340 baznih parova poslužila je i za osnovnu filogenetsku analizu. U okviru najzastupljenije vrste na ovom području, *E. fluviatilis*, utvrđena su tri različita haplotipa. Od toga dva nova haplotipa, i to po jedan u Savi kod Županje i Dunavu kod Rama, dok je treći haplotip zajednički za sve preostale primerke. Najčešći haplotip je podudaran sa prethodno publikovanim sekvencama iz Italije (EF591285), Izraela (JN116226/7/8) i Estonije (DQ454152). Primerci vrste *E. muelleri* iz obe reke u kojima su nađeni imali su isti haplotip, koji je bio u saglasnosti sa haplotipom iz Estonije (DQ454153). Vrsta *S. lacustris* zabeležena u većem broju istraživanih vodotokova predstavljena je samo jednim haplotipom, koji je bio potpuno identičan sa sekvencom iz Estonije (DQ454154). Vrsta *E. fragilis* bila je predstavljena takođe jednim haplotipom, koji se razlikovao od jedine ranije registrovane 28S parcijalne sekvence *E. fragilis* (99,34% sličnosti sa sunderom iz Estonije) za dva bazna para (Lopp et al., 2007). Za vrstu *T. horrida* trenutno postoji samo naša sekvenca ovog domena. U skladu sa rezultatima dobijenim ispitivanjem sekvenci možemo zaključiti da dati 28S rDNK domen nije dovoljno varijabilan, ili je previše kratak, da bi omogućio precizniju analizu intraspecijske raznolikosti. U budućim istraživanjima bilo bi poželjno koristiti dodatne markere kao što su ITS1, ITS2, i COI zajedno sa D3 domenom 28S rDNK (Itskovich et al., 2013).

Tokom ovog istraživanja zabeležen je mali broj vrsta Porifera, a njihova abundanca i frekventnost nalaza bile su niske na ispitivanom području. Iako je abundanca sundera bila izrazito niska, ipak smo uspeali da od šest vrsta koje su zabeležene u Centralnoj Evropi i koje su široko rasprostranjene u čitavoj Evropi i većem delu sveta (Dröscher and Waringer, 2007; Manconi and Pronzato, 2015; Pronzato and Manconi, 2001), potvrdimo prisustvo njih pet u lentičkim i lotičkim staništima ispitivanih vodenih ekosistema Zapadnog Balkana i Panonske nizije. Tri najčešće vrste bile su *E. fluviatilis*, *S. lacustris* i *E. muelleri*, dok su dve najređe vrste bile *T. horrida* i *E. fragilis*.

Dalja istraživanja ovog nedovoljno ispitanog područja svakako se nameću i treba ih nastaviti. Međutim, neophodno je prilagođavanje metoda uzorkovanja specifičnostima Porifera s obzirom da se klasičnim načinom uzorkovanja makrozoobentosa ne dobijaju zadovoljavajući rezultati.

S obzirom na sesilan način života, kao i činjenicu da mogu opstati u vodama različitog stepena zagađenja i u raznovrsnim staništima, predstavnici grupe Porifera mogli bi predstavljati korisne bioindikatore kvaliteta vode. Preko određivanja vrste i broja anomalija u građi njihovog mineralnog skeleta, sunderi bi mogli naći primenu i u proceni količine teških metala u vodnim telima. Pored toga, slatkovodni sunderi, za razliku od njihovih morskih srodnika, ostaju još uvek velika nepoznanica u pogledu bioaktivnih jedinjenja koja proizvode, pa bi buduća istraživanja vredelo usmeriti i u tom pravcu. Iz svega navedenog proističe da podaci dobijeni ispitivanjem ove zanimljive grupe organizama mogu imati, pored fundamentalnog, i veliki aplikativni značaj.

6 Zaključci

- Grupa Porifera zahteva detaljan i ciljani monitoring specifičnih staništa.
- Slatkovodni sunđeri su slabo istražena grupa, kako u okviru ispitivanog područja (ceo tok reke Dunav, Zapadni Balkan i Panonska nizija), tako i globalno i ovaj rad predstavlja doprinos poznavanju ove grupe organizama.
- Diverzitet sunđera je bio očekivan za ovaj deo evropskog kontinenta, s obzirom da je pronađeno pet od do sada opisanih šest vrsta koje naseljavaju Centralnu Evropu.
- Pet pronađenih vrsta, po opadajućoj zastupljenosti (iako su postojale male varijacije u zavisnosti od regiona), su sledeće: *E. fluviatilis*, *S. lacustris*, *E. muelleri*, *T. horrida* i *E. fragilis*.
- Genetska analiza je otkrila prisustvo nekoliko novih haplotipova.
- Vodna tela Zapadnog Balkana i Panonske nizije karakteriše niska učestalost nalaza Porifera - sunđeri su nađeni na svega jednoj četvrtini ispitanih lokaliteta.
- Abundanca Porifera u ispitanom regionu je takođe bila niska.
- Niska učestalost i mala gustina populacija sunđera na ispitivanom području odraz su karakteristika vrsta i uslova staništa.
- Prema našim rezultatima, na distribuciju slatkovodnih sunđera utiču sledeći parametri: rastvoreni kiseonik, tvrdoća vode, bikarbonati, električna provodljivost, ukupne rastvorene soli, kalcijum i silikati.
- Porifera su zabeleženi u vrlo varijabilnim sredinskim uslovima, što ukazuje na visoku ekološku plastičnost identifikovanih vrsta.
- S obzirom na sesilan način života, široko geografsko rasprostranjenje zabeleženih vrsta, kao i činjenicu da mogu opstati u vodama različitog stepena zagađenja i u raznovrsnim staništima, predstavnici grupe Porifera mogli bi predstavljati korisne bioindikatore kvaliteta vode i neophodna su dodatna ispitivanja u ovom pravcu.

7 Reference

- Addis, J.S., Peterson, K.J., 2005. Phylogenetic relationships of freshwater sponges (Porifera, Spongillina) inferred from analyses of 18S rDNA, COI mtDNA, and ITS2 rDNA sequences. *Zool. Scr.* 34, 549–557. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00211.x>
- Altınışçılı, Selçuk, Sevilla, J.R., Altınışçılı, Songül, 2014. On occurrence of *Spongilla lacustris* (Linnaeus, 1759) from Lake Saklıgöl, Kandıra District, Turkey. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2, 68–73.
- Andjus, S., Lazović, V., Nikolić, N., Tubić, B., Nikolić, V., Paunović, M., 2019a. Distribution of freshwater sponges in Serbia. *Fundam. Appl. Limnol. für Hydrobiol.*
- Andjus, S., Nikolic, N., Dobricic, V., Marjanovic, A., Gacic, Z., Brankovic, G., Rakovic, M., Paunovic, M., 2017. Contribution to the knowledge on the distribution of freshwater sponges—the Danube and Sava rivers case study. *J. Limnol.* 77, 199–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1677>
- Andjus, S., Nikolic, N., Marjanovic, A., Brankovic, M., Lazovic, V., Tubić, B., Čanak Atlagić, J., Nikolić, V., Paunović, M., 2019b. First record of freshwater sponge *Trochospongilla horrida* Weltner, 1893 in Serbia – A morphological and genetic study. *Limnologica* 76, 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2019.03.004>
- Antonijević, M.D., Arsović, M., Časlavsky, J., Cvetković, V., Dabić, P., Franko, M., Ilić, G., Ivanović, M., Ivanović, N., Kosovac, M., 2014. Actual contamination of the Danube and Sava rivers at Belgrade (2013). *J. Serbian Chem. Soc.* 79, 1169–1184.
- Bănărescu, P.M., 2004. Distribution pattern of the aquatic fauna of the Balkan Peninsula, in: Griffiths, H.I., Kryštufek, B., Reed, J.M. (Eds.), *Balkan Biodiversity*. Springer, Dordrecht, pp. 203–217. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2854-0_12
- Barril, P., Nates, S., 2012. Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities. *Gel Electrophor. Basics* 3–15.
- Barthel, D., Tendal, O.S., 1994. *Antarctic hexactinellida*. Koeltz Scientific Books.
- Bavestrello, G., Bonito, M., Sarà, M., 1993. Influence of depth on the size of sponge spicules. *Sci. Mar.* 57, 415–420.
- Bavestrello, G., Sarà, M., 2009. PORIFERA, CNIDARIA, AND CTENOPHORA. *Biol. Sci. Fundam. Syst.* III 129.
- Bedek, J., Bilandžija, H., Jalžić, B., 2008. Ogulinska špiljska spužvica *Eunapius subterraneus* Sket et Velikonja, 1984, rasprostranjenost i ekologija vrste i staništa. *Modruški Zb.* 2, 103–130.
- Belas, F.J., Francis, J.C., Poirrier, M.A., 1989. Effects of Calcium, Magnesium, and Sodium on Growth of *Ephydatia fluviatilis* (Porifera: Spongillidae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 108, 139. <https://doi.org/10.2307/3226370>
- Bergquist, P.R., 1978. *Sponges*. University of California Press, Berkeley; Los Angeles.
- Bond, C., Harris, A.K., 1988. Locomotion of sponges and its physical mechanism. *J. Exp. Zool.* 246, 271–284.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.02.021>
- Boury-Esnault, N., Rutzler, K., 1997. *Thesaurus of Sponge Morphology*. *Smithson. Contrib. to Zool.* 55 pp.
- Brain, C., Prave, A.R., Hoffmann, K.-H., Fallick, A.E., Botha, A., Herd, D.A., Sturrock, C., Young, I., Condon, D.J., Allison, S.G., 2012. The first animals: ca. 760-million-year-old sponge-like fossils from Namibia. *S. Afr. J. Sci.* 108, 1–8.
- Brasier, M., Green, O., Shields, G., 1997. Ediacarian sponge spicule clusters from southwestern Mongolia and the origins of the Cambrian fauna. *Geology* 25, 303–306.

- Butler, P.E., 1961. Morphologic classification of sponge spicules, with descriptions of siliceous spicules from the Lower Ordovician Bellefonte dolomite in central Pennsylvania. *J. Paleontol.* 191–200.
- Cao, X., Fu, W., Yu, X., Zhang, W., 2007. Dynamics of spicule production in the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* during in vitro cell culture and seasonal development in the field. *Cell Tissue Res.* 329, 595–608.
- Cocchiglia, L., Kelly-Quinn, M., Lucey, J., 2013. Classification of Freshwater Sponge Collection at EPA Kilkenny. Environmental Protection Agency Wexford, Wexford, Ireland.
- Conrath, W., Falkenhagen, B., Kinzelbach, R., 1977. Übersicht über das Makrozoobenthon des Rheins im Jahre 1976. *Gewässer und Abwässer* 62, 63–84.
- Copeland, J., Kunigelis, S., Tussing, J., Jett, T., Rich, C., 2019. Freshwater Sponges (Porifera: Spongillida) of Tennessee. *Am. Midl. Nat.* 181, 310. <https://doi.org/10.1674/0003-0031-181.2.310>
- Copeland, J., Pronzato, R., Manconi, R., 2015. Discovery of living Potamolepidae (Porifera: Spongillina) from Nearctic freshwater with description of a new genus. *Zootaxa* 3957, 37–48. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3957.1.2>
- Cubeddu, T., Deriu, A., Sechi, A., Manconi, R., 1995. Spongillidi (Porifera, Demospongiae) del Fiume Temo (Sardegna nord-occidentale). *Boll. della Soc. sarda di Sci. Nat.* 30, 41–51.
- De Santo, E.M., Fell, P.E., 1996. Distribution and ecology of freshwater sponges in Connecticut. *Hydrobiologia* 341, 81–89.
- Desmond, A., Parker, S., 2006. The bibliography of Robert Edmond Grant (1793–1874): illustrated with a previously unpublished photograph. *Arch. Nat. Hist.* 33, 202–213. <https://doi.org/10.3366/anh.2006.33.2.202>
- Dorschner, J., Dreyer, U., Gugel, J., Guhr, H., Kinzelbach, R., Meister, A., Seel, P., 1993. Der Gewässerzustand der Elbe 1991. Ergebnisse einer Bereisung mit dem Hess. Meß- und Laborschiff 'Argus' zwischen Veletov und Geesthacht. *Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz* 153, 99.
- Dröscher, I., Waringer, J., 2007. Abundance and distribution of freshwater sponges (Spongillidae) in Danube floodplain waters near Vienna, Austria. *Dep. Freshw. Ecol. Vienna Univ.* 52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01747.x>
- Dunn, C.W., Leys, S.P., Haddock, S.H.D., 2015. The hidden biology of sponges and ctenophores. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.03.003>
- Duran, S., Giribet, G., Turon, X., 2004. Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.* 13, 109–122. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02022.x>
- Elexová, E., Némethová, D., 2003. The effect of abiotic environmental variables on the Danube macrozoobenthic communities. *Limnol. Manag. Inl. Waters* 33, 340–354.
- Erpenbeck, D., Breeuwer, J., Velde, H. van der, Soest, R. van, 2002. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Mar. Biol.* 141, 377–386. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0785-x>
- Erpenbeck, D., Galitz, A., Wörheide, G., Albrecht, C., Pronzato, R., Manconi, R., 2020. Having the balls to colonize – The Ephydatia fluviatilis group and the origin of (ancient) lake “endemic” sponge lineages. *J. Great Lakes Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.09.028>
- Eunapius fragilis* (Leidy, 1851) [WWW Document], n.d. URL <https://www.gbif.org/species/5181774> (accessed 1.8.20).
- Ferenc, L., 2014. Pollution by heavy metals in the Danube River Basin, in: *The Danube River Basin*. Springer, pp. 85–93.

- Francis, J.C., Poirrier, M.A., LaBiche, R.A., 1982. Effects of calcium and salinity on the growth rate of *Ephydatia fluviatilis* (Porifera: Spongillidae). *Hydrobiologia* 89, 225–229. <https://doi.org/10.1007/BF00005708>
- Frost, T.M., 2002. Freshwater sponges, in: *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*. Springer, pp. 253–263.
- Frost, T.M., 1991. Porifera. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. JH Thorp & AP Covich.
- Frost, T.M., 1978. In situ measurements of clearance rates for the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1034–1039.
- Gavrilović, L., Dukić, D., 2002. Reke Srbije. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- Gehling, J.G., Rigby, J.K., 1996. Long expected sponges from the Neoproterozoic Ediacara fauna of South Australia. *J. Paleontol.* 70, 185–195.
- Gilbert, J.J., Hadzisce, S., 1984. Taxonomic notes on the shallow-water endemic sponges of Lake Ohrid, Yugoslavia, with a description of two new species and a redescription of *Spongilla stankovići*. *Arch. für Hydrobiol.* 99, 331–339.
- Graf, W., Csányi, B., Leitner, P., Paunović, M., Huber, T., Szekeres, J., Nagy, C., Borza, P., 2015. Macroinvertebrates, in: Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodnik, J. (Eds.), *Joint Danube Survey 3 A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality*. ICPDR - International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, pp. 81–99.
- Grant, R., 1825. Observations and experiments on the structure and functions of the sponge. *Eding Phil J* 13, 94–343.
- Grant, R.E., 1826. Remarks on the structure of some calcareous sponges. *Edinb. New Philos. J* 1, 166–170.
- Gugel, J., 2001. Life cycles and ecological interactions of freshwater sponges (Porifera, Spongillidae) in the River Rhine in Germany. *Limnol. Manag. Int. Waters* 31, 185–198. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(01\)80020-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0075-9511(01)80020-7)
- Gugel, J., 2000. High abundance of *Trochospongilla horrida* (Porifera, Spongillidae) in the Rhine (Germany) 1992–1995. *Hydrobiologia* 421, 199–207. <https://doi.org/10.1023/a:1003946604832>
- Hadzisce, S., 1953. Beitrag zur Kenntnis der Spongillidenfauna der großen mazedonischen Seen (Dojran, Prespa und Ohridsee). *Recl. des Traveaux. Stn. Hydrobiol. Ohrid* 1, 73–103.
- Harrison, F.W., 1974. Sponges (Porifera: Spongillidae). *Pollut. Ecol. Freshw. Invertebr. Acad. Press. New York* 2966.
- Hernandez-Rodriguez, P., 2012. Polymerase Chain Reaction. IntechOpen, Rijeka (Croatia).
- Hogg, M., Tendal, O., Conway, K., Pomponi, S., van Soest, R., Gutt, J., Krautter, M., Roberts, J., 2010. Deep-sea sponge grounds: Reservoirs of biodiversity. *Clin. Exp. Allergy - CLIN Exp. ALLERGY* 32.
- Holvoet, S., Van de Vyver, G., 1986. Regulation of sclerocyte differentiation in the hydroxyurea treated sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Differentiation* 31, 10–13.
- Hooper, J.N.A., Van Soest, R.W.M., 2002. Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges, in: Hooper, J.N.A., Van Soest, R.W.M., Willenz, P. (Eds.), *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_1
- Imsiecke, G., Steffen, R., Custodio, M., Borojevic, R., Müller, W.E.G., 1995. Formation of spicules by sclerocytes from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* in short-term cultures in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 31, 528–535.
- Itskovich, V., Kaluzhnaya, O., Ostrovsky, I., McCormack, G., 2013. The number of endemic species of freshwater sponges (Malawispongiidae; Spongillina; Porifera) from Lake Kinneret is overestimated. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 51, 252–257. <https://doi.org/10.1111/jzs.12022>

- Janussen, D., Tabachnick, K.R., Tendal, O.S., 2004. Deep-sea hexactinellida (porifera) of the Weddell sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51, 1857–1882.
- Joshi, M., Deshpande, J.D., 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* 2, 81–97.
- K'Eogh, J., 1735. *Botanologia Universalis Hibernica*. Printed and sold by G. Harrison.
- Kelly-Borges, M., Pomponi, S.A., 1994. Phylogeny and classification of lithistid sponges (Porifera: Demospongiae): a preliminary assessment using ribosomal DNA sequence comparisons. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 87–103.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Krautter, M., Conway, K.W., Barrie, J.V., Neuweiler, M., 2001. Discovery of a “living dinosaur”: globally unique modern hexactinellid sponge reefs off British Columbia, Canada. *Facies* 44, 265–282.
- Langenbruch, P.F., 1983. Body structure of marine sponges. *Mar. Biol.* 75, 319–325.
- Leys, S.P., Mackie, G.O., 1997. Electrical recording from a glass sponge. *Nature* 387, 29.
- Leys, S.P., Mackie, G.O., Reiswig, H.M., 2007. The biology of glass sponges. *Adv. Mar. Biol.* 52, 1–145.
- Lopp, A., Reintamm, T., Vallmann, K., Päre, M., Mikli, V., Richelle-Maurer, E., Kelve, M., 2007. Molecular identification, characterization and distribution of freshwater sponges (Porifera: Spongillidae) in Estonia. *Fundam. Appl. Limnol. für Hydrobiol.* 168, 93–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1127/1863-9135/2007/0168-0093>
- Lucey, Cocchiglia, 2014. Distribution of sponges (Porifera: Spongillidae) in southern Irish rivers and streams. *Biol. Environ. Proc. R. Irish Acad.* 114B, 89. <https://doi.org/10.3318/bioe.2014.24>
- Maikova, O.O., Bukshuk, N.A., Itskovich, V.B., Khanaev, I. V., Nebesnykh, I.A., Onishchuk, N.A., Sherbakov, D.Y., 2017. Transformation of Baikal sponges (family Lubomirskiidae) after penetration into the Angara River. *Russ. J. Genet.* 53, 1343–1349.
- Manconi, R., Desqueyroux-Faundez, R., 1999. Freshwater sponges (Porifera, Spongillidae) from the Lake of Geneva, Switzerland. *Rev. suisse Zool.* 106, 571–580.
- Manconi, R., Pronzato, R., 2015. Phylum Porifera, in: James, T.H., Christopher, R.D. (Eds.), Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates*. Elsevier, pp. 133–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00008-5>
- Manconi, R., Pronzato, R., 2008. Global diversity of sponges (Porifera: Spongillina) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 27–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10750-007-9000-x>
- Manconi, R., Pronzato, R., 2007. Gemmules as a key structure for the adaptive radiation of freshwater sponges: a morphofunctional and biogeographical study. *Porifera Res. biodiversity, Innov. Sustain. Série Livros* 28, 61–77.
- Manconi, R., Pronzato, R., 2002. Suborder Spongillina subord. nov.: Freshwater Sponges, in: Hooper, J.N.A., Van Soest, R.W.M., Willenz, P. (Eds.), *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Springer US, Boston, MA, pp. 921–1019. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_97
- Manconi, R., Pronzato, R., 2000. Rediscovery of the type material of *Spongilla lacustris* (L., 1759) in the Linnean herbarium. *Ital. J. Zool.* 67, 89–92.
- Manconi, R., Pronzato, R., 1991. Life cycle of *Spongilla lacustris* (Porifera, Spongillidae): a cue for environment-dependent phenotype. *Hydrobiologia* 220, 155–160.
- Manconi, R., Ruengsawang, N., Vannachak, V., Hanjavanit, C., Sangpradub, N., Pronzato, R., 2013. Biodiversity in South East Asia: an overview of freshwater sponges (Porifera: Demospongiae: Spongillina). *J. Limnol.* 72, 15. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s2.e15>

- Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2003. Phylogeny and evolution of calcareous sponges: Monophyly of calcinea and calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Syst. Biol.* 52, 311–333. <https://doi.org/10.1080/10635150390196966>
- Manuel, M., Borojevic, R., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., 2002. Class Calcarea Bowerbank, 1864, in: *Systema Porifera*. Springer, pp. 1103–1116.
- Marković, J.Đ., 1990. *Enciklopedijski geografski leksikon Jugoslavije*. Sarajev. Svjetl.
- McAuley, D.G., Longcore, J.R., 1988. Survival of juvenile Ring-necked Ducks on wetlands of different pH. *J. Wildl. Manage.* 169–176.
- Mehl, D., 1996. Phylogenie und evolutionsökologie der hexactinellida (Porifera) im paläozoikum.
- Mehl, D., 1992. Die Entwicklung der Hexactinellida seit dem Mesozoikum: Paläobiologie, Phylogenie und Evolutionsökologie. Selbstverl. Fachbereich Geowissenschaften, FU Berlin.
- Morrow, C.C., Redmond, N.E., Picton, B.E., Thacker, R.W., Collins, A.G., Maggs, C.A., Sigwart, J.D., Allcock, A.L., 2013. Molecular phylogenies support homoplasy of multiple morphological characters used in the taxonomy of Heteroscleromorpha (Porifera: Demospongiae). *Integr. Comp. Biol.* ict065.
- Müller, W.E.G., Custódio, M.R., Wiens, M., Zilberberg, C., Châtel, A., Müller, I.M., Schröder, H.C., 2009. Effect of bacterial infection on stem cell pattern in Porifera, in: *Stem Cells in Marine Organisms*. Springer, pp. 309–336.
- Nakayama, S., Arima, K., Kawai, K., Mohri, K., Inui, C., Sugano, W., Koba, H., Tamada, K., Nakata, Y.J., Kishimoto, K., 2015. Dynamic transport and cementation of skeletal elements build up the pole-and-beam structured skeleton of sponges. *Curr. Biol.* 25, 2549–2554.
- Navarro-Ortega, A., Acuña, V., Bellin, A., Burek, P., Cassiani, G., Choukr-Allah, R., Dolédec, S., Elosegi, A., Ferrari, F., Ginebreda, A., 2015. Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA project. *Sci. Total Environ.* 503, 3–9.
- Neidhoefer, J.R., 1940. The fresh-water sponges of Wisconsin. *Trans. Wisconsin Acad. Sci. Arts, Lett.* 32, 177–197.
- Nichols, S.A., 2005. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 81–96. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.019>
- Økland, K.A., Økland, J., 1996. Freshwater sponges (Porifera: Spongillidae) of Norway: distribution and ecology. *Hydrobiologia* 330, 1–30. <https://doi.org/10.1007/bf00020819>
- Old, M.C., 1932. Environmental selection of the fresh-water sponges (Spongillidae) of Michigan. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 51, 129–136.
- Oscoz, J., Tomás, P., Durán, C., 2009. New records of *Eunapius fragilis* (Leidy, 1851) and *Ephydatia fluviatilis* (Linnaeus, 1759)(Porifera, Spongillidae) in Ebro River Basin (N Spain). *Limnetica* 28, 185–188.
- Paulsen, T.S., Hoback, W.W., 2011. A report of freshwater sponge (Porifera: Spongillidae) in central Nebraska.
- Pearson, R., 1978. *Climate and evolution*.
- Penney, J.T., Racek, A.A., 1968. Comprehensive revision of a worldwide collection of freshwater sponges (Porifera, Spongillidae). *Bull. United States Natl. Museum*.
- Pile, A.J., Patterson, M.R., Savarese, M., Chernykh, V.I., Fialkov, V.A., 1997. Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2. Sponge abundance, diet, feeding efficiency, and carbon flux. *Limnol. Oceanogr.* 42, 178–184. <https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.1.0178>

- Poirrier, M.A., 1969. Louisiana Freshwater Sponges: Taxonomy, Ecology and Distribution. LSU Hist. Diss. Theses. Louisiana.
- Poirrier, M.A., Trabanino, S., 1989. Freshwater sponges (Porifera: Spongillidae) from Lake Ilopango, El Salvador, with observations on spicule malformation in *Spongilla alba*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 211–214.
- Potts, E., 1887. Contributions Towards a Synopsis of the American Forms of Fresh Water Sponges with Descriptions of Those Named by Other Authors and from All Parts of the World on JSTOR [WWW Document]. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* Vol. 39, No. 2 (Apr. - Aug., 1887), pp. 158-279. URL https://www.jstor.org/stable/4061447?seq=1#metadata_info_tab_contents (accessed 11.1.19).
- Pronzato, R., Manconi, R., 2001. Atlas of European freshwater sponges. *Ann. del Mus. Civ. di Stor. Nat. di Ferrara* 4, 3–64.
- Pronzato, R., Manconi, R., 1994. Adaptive strategies of sponges in inland waters. *Bolletino di Zool.* 61, 395–401. <https://doi.org/10.1080/11250009409355912>
- Pronzato, R., Manconi, R., 1987. Chiave dicotomica per il riconoscimento delle spugne d'acqua dolce Italiane. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova* 53, 81–99.
- Pronzato, R., Pisera, A., Manconi, R., 2017. Fossil freshwater sponges: taxonomy, geographic distribution, and critical review. *Acta Palaeontol. Pol.* 62, 467–495. <https://doi.org/10.4202/app.00354.2017>
- Racek, A.A., Harrison, F.W., 1975. The systematic and phylogenetic position of *Palaeospongilla chubutensis* (Porifera: Spongillidae), in: *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*. pp. 157–165.
- Rao, J.V., Srikanth, K., Pallela, R., Rao, T.G., 2009. The use of marine sponge, *Haliclona tenuiramosa* as bioindicator to monitor heavy metal pollution in the coasts of Gulf of Mannar, India. *Environ. Monit. Assess.* 156, 451–459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10661-008-0497-x>
- Rapp, H.T., Janussen, D., Tendal, O.S., 2011. Calcareous sponges from abyssal and bathyal depths in the Weddell Sea, Antarctica. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 58, 58–67.
- Reiswig, H.M., 2002. Class Hexactinellida Schmidt, 1870, in: *Systema Porifera*. Springer, pp. 1201–1210.
- Reiswig, H.M., 1971. Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol. Bull.* 141, 568–591.
- Reitner, J., Mehl, D., 1996. Monophyly of the Porifera. *Verhandlungen des naturwissenschaftlichen Vereins Hambg.* 5–32.
- Resh, V.H., Morse, J.C., Wallace, I.D., 1976. The Evolution of the Sponge Feeding Habit in the Caddisfly Genus *Ceraclea* (Trichoptera: Leptoceridae)1. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 937–941. <https://doi.org/10.1093/aesa/69.5.937>
- Rezvoi, P.D., 1936. Freshwater sponges of the USSR. fauna USSR. AS USSR, Moscow 1–42.
- Ricciardi, A., Reiswig, H.M., 1993. Freshwater sponges (Porifera, Spongillidae) of eastern Canada: taxonomy, distribution, and ecology. *Can. J. Zool.* 71, 665–682.
- Rice, A.L., Thurston, M.H., New, A.L., 1990. Dense aggregations of a hexactinellid sponge, *Pheronema carpenteri*, in the Porcupine Seabight (northeast Atlantic Ocean), and possible causes. *Prog. Oceanogr.* 24, 179–196.
- Richelle-Maurer, E., Degoudenne, Y., de Vyver, G., Dejonghe, L., 1994. Some aspects of the ecology of Belgian freshwater sponges. *Sponges time Sp.* 341–350.
- Richelle, E., Degoudenne, Y., Dejonghe, L., de Vyver, G., 1995. Experimental and field studies on the effect of selected heavy metals on three freshwater sponge species: *Ephydatia fluviatilis*, *Ephydatia muelleri* and *Spongilla lacustris*. *Arch. fur Hydrobiol. Stuttgart* 135, 209–231.

- Rigby, J.K., 1983. Introduction to the Porifera. Stud. Geol. Notes a Short Course 7, 1–11.
- Roovere, T., Lopp, A., Reintamm, T., Kuusksalu, A., Richelle-Maurer, E., Kelve, M., 2006. Freshwater sponges in Estonia: genetic and morphological identification, in: Hillar, A., Virve, K. (Eds.), Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Biology and Ecology. Estonian Academy Publishers, pp. 216–227.
- Rudescu, L., 1975. Porifera Potamospongiae. Academia republicii socialiste românia.
- Ruppert, E.E., Barnes, R.D., Fox, R.S., 2004. Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463–5467.
- Sarà, M., 1973. Animali filtratori ed autodepurazione nel mare: il ruolo dei Poriferi, in: Atti Del III Simposio Nazionale Sulla Conservazione Della Natura, Bari. pp. 35–52.
- Sarà, M., Vacelet, J., 1973. Ecologie des Demosponges: influence des facteurs physicochimiques, in: Grasse, P.P. (Ed.), Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Masson et Cie Eds, Paris. Masson et Cie Editeurs, Paris, pp. 462–576.
- Schletterer, M., Eggers, T.O., 2006. Evidence of Freshwater Sponges (Porifera: Spongillidae) in the Upper Volga River (Russia). Berichte-Naturwissenschaftlich Medizinischen Vereins in Innsbruck 93, 73.
- Schmidt, O., 1862. Die Spongien des Adriatischen Meeres. W. Engelmann.
- Simpson, T.L., 2012. The cell biology of sponges. Springer Science & Business Media.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature 321, 674–679.
- Sommerwerk, N., Baumgartner, C., Bloesch, J.D., Hein, T., Ostojić, A., Paunović, M., Schneider-Jacoby, M., Siber, R., Tockner, K., 2009. The Danube River Basin, in: Tockner, K., Robinson, C., Uehlinger, U. (Eds.), Rivers of Europe. Elsevier Ltd, London, pp. 59–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369449-2.00003-5>
- Steiner, M., Mehl, D., Reitner, J., Erdtmann, B.-D., 1993. Oldest entirely preserved sponges and other fossils from the lowermost Cambrian and a new facies reconstruction of the Yangtze Platform (China). Berliner geowissenschaftliche Abhandlungen 9, 293–329.
- Swerdlow, H., Wu, S., Harke, H., Dovichi, N.J., 1990. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing: laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. J. Chromatogr. A 516, 61–67.
- Tittizer, T., Schöll, F., Schleuter, M., 1990. Beitrag zur Struktur und Entwicklungsdynamik der Benthofauna des Rheins von Basel bis Düsseldorf in den Jahren 1986 und 1987. Limnol. aktuell 1, 293–323.
- Troyer-Mildner, J., Mildner, P., 2008. Die Spongilliden-Sammlung des Landesmuseums Kärnten (Porifera, Demospongiae, Spongillidae). na.
- Trylis, V. V., Shcherbak, S.D., 1996. Towards the question of rare and threaten freshwater sponge and Bryozoa species in Ukraine. Vestn. Ehol. 129–132.
- Van De Vyver, G., Holvoet, S., Dewint, P., 1990. Variability of the immune response in freshwater sponges. J. Exp. Zool. 254, 215–227.
- Van Soest, R.W.M., Boury-Esnault, N., Hooper, J.N.A., Rützler, K. de, De Voogd, N.J., Alvarez de Glasby, B., Hajdu, E., Pisera, A.B., Manconi, R., Schoenberg, C., 2018. World porifera database. World Regist. Mar. Species (WoRMS). Available online [http://www. Mar. org/porifera](http://www.mar.org/porifera) (accessed 25 Oct. 2018).
- Van Soest, R.W.M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N.J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., Hooper, J.N.A., 2012. Global diversity of sponges (Porifera). PLoS One 7, e35105.

Reference

- Volkmer-Ribeiro, C., Machado, V. de S., 2007. Freshwater sponges (Porifera, Demospongiae) indicators of some coastal habitats in South America: redescrptions and key to identification. *Iheringia. Série Zool.* 97, 157–167.
- Walker, S.E., Lorsch, J., 2013. RNA purification–precipitation methods, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 337–343.
- Wang, X., Wiens, M., Schröder, H.C., Schloßmacher, U., Pisignano, D., Jochum, K.P., Müller, W.E.G., 2011. Evagination of cells controls bio-silica formation and maturation during spicule formation in sponges. *PLoS One* 6, e20523.
- Williamson, C.E., 1979. Crayfish predation on freshwater sponges. *Am. Midl. Nat.* 245–246.
- Wong, K.-C., Zhang, J., Yan, S., Li, X., Lin, Q., Kwong, S., Liang, C., 2019. DNA sequencing technologies: Sequencing data protocols and bioinformatics tools. *ACM Comput. Surv.* 52, 1–30.
- Wörheide, G., Nichols, S.A., Goldberg, J., 2004. Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers in sponges (Phylum Porifera): Implications for phylogenetic studies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 816–830. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.005>

Biografija

Stefan Anđus rođen je 15. juna 1984. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2003/2004. godine, na studijskoj grupi Biologija i diplomirao 2012. sa prosekom 8,88.

Doktorske akademske studije upisao je školske 2014/2015. godine, na studijskom programu Biologija, modul Morfologija, sistematika i filogenija životinja. Od novembra 2013. godine angažovan je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Geološka i ekotoksikološka istraživanja u identifikaciji geopatogenih zona toksičnih elemenata u akumulacijama vode za piće – istraživanje metoda i postupaka smanjivanja uticaja biogeohemijskih anomalija“ (OI 176018).

Takođe, angažovan je na nekoliko međunarodnih projekata:

- FP7 projekat Evropske komisije “GLOBAQUA”
- COST (CA18239) „Conservation of freshwater mussels: a pan-European approach“
- Bilateralna između Srbije i Belorusije „Uticaj alohtonih vrsta na funkcionalnu stabilnost nativnih zajednica, procena rizika i identifikacija nivoa pritiska izazvanog biološkim invazijama u slatkovodnim ekosistemima“
- „Joint Danube Survey 4“ (JDS4)

kao i u nekoliko nacionalnih projekata finansiranih od strane Ministarstva za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu, Instituta za vodoprivredu “Jaroslav Černi” i Gradskog zavoda za javno zdravlje u Beogradu.

Do sada je objavio 8 naučnih radova, od toga četiri iz M22, dva iz M23 i dva iz M53 kategorije. Koautor je poglavlja u monografiji (M13). Učestvovao je sa 23 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Član je Srpskog društva za zaštitu voda, Društva genetičara Srbije, Srpskog biološkog društva, Fonda za zaštitu ptica grabljivica.