

UDK 63/66 (058)0808.1/2

BH ISSN 0033-8583

**RADOVI**  
**POLJOPRIVREDNO-PREHRAMBENOG FAKULTETA**  
**UNIVERZITETA U SARAJEVU**



**WORKS**  
**OF THE FACULTY OF AGRICULTURE**  
**AND FOOD SCIENCES**  
**UNIVERSITY OF SARAJEVO**

Godina  
Volume

**LXIV**

Broj  
No.

**69/1**

Sarajevo, 2019.

UREDNIČKI ODBOR - Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta  
Univerziteta u Sarajevu

*EDITORIAL BOARD - Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences  
University of Sarajevo:*

prof. dr. Mirha Đikić (BiH)	prof. dr. Milenko Blesić (BiH)
prof. dr. Enisa Omanović-Miklićanin (BiH)	prof. dr. Ervin Zečević (BiH)
prof. dr. Dragana Ognjenović (BiH)	prof. dr. Fuad Gaši (BiH)
prof. dr. Nedžad Karić (BiH)	prof. dr. Zilha Ašimović (BiH)
prof. dr. Aleksandra Dimitrijević (Srbija)	prof. dr. Zdenko Lončarić (Hrvatska)
prof. dr. Žarko Ilin (Srbija)	prof. dr. Zoran Jovović (Crna Gora)
prof. dr. German Kust (Rusija)	prof. dr. Miroljub Barać (Srbija)
prof. dr. Emil Erjavec (Slovenija)	prof. dr. Cosmin Salasan (Rumunija)
prof. dr. Ante Ivanković (Hrvatska)	prof. dr. Vladan Bogdanović (Srbija)
prof. dr. Renata Bažok (Hrvatska)	prof. dr. Bogdan Cvjetković (Hrvatska)
prof. dr. Vlasta Piližota, akademkinja (Hrvatska)	prof. dr. Ivan Pejić (Hrvatska)
prof. dr. Dragan Nikolić (Srbija)	prof. dr. Mekjell Meland (Norveška)
prof. dr. Metka Hudina (Slovenija)	prof. dr. Mihail Blanke (Njemačka)
prof. dr. Zlatan Sarić (BiH)	prof. dr. Ahmed Smajić (BiH)
prof. dr. Hamid Čustović (BiH)	prof. dr. Mirsad Kurtović (BiH)

Glavni i odgovorni urednik - *Editor:*  
prof. dr. Mirha Đikić

Zamjenik glavnog i odgovornog urednika - *Deputy Editor:*  
prof. dr. Milenko Blesić

Računarska obrada - *Computer processing:*  
Arzija Jusić

Uredništvo i administracija - *Address of the Editorial Board:*  
Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu / *Faculty of Agriculture  
and Food Sciences University of Sarajevo*  
Zmaja od Bosne 8  
71000 Sarajevo  
Bosna i Hercegovina

---

Tel.: +387 (0) 33 225 727  
Fax.: +387 (0) 33 667 429  
e-mail: radovi@ppf.unsa.ba

---

---

Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu  
AGRIS - Agricultural Information Servis, 1959; CAB Publishing - UK, 2002.

---

Štampa:  
„ŠTAMPARIJA FOJNICA“ d.o.o. Fojnica

Izdavač - *Publisher:*  
Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu / *Faculty of Agriculture and Food  
Sciences University of Sarajevo*

Authors are fully responsible for contents, contact information and correctness of English.

### **Opoziv dva rada**

1. Detekcija i kvantifikacija pigmenata u genetičkim resursima lisnatog povrća Slovenije, autora: ŽNIDARČIČ, Dragan, MEGLIČ, Vladimir, KARIĆ, Lutvija, MIRECKI, Nataša, SINKOVIČ, Lovro, GLAMOČLIJA, Petar, publikovanog u časopisu »Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu« (2016, vol. 61, no. 66/2, 61-67).  
Skoro sličan rad je već publikovan, ali sa drugačijim naslovom »Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries«, autora: ŽNIDARČIČ, Dragan, BAN, Dean, ŠIRCELJ, Helena, u časopisu »Food chemistry« (2011, vol. 129, no. 3, 1164-1168).
2. Effect of post harvest treatments on physicochemical properties of cantaloupe, autora: ŽNIDARČIČ, Dragan, KARIĆ, Lutvija, POGAČNIK, Marijan, KACJAN-MARŠIĆ, Nina, publikovanog u časopisu »Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu« (2016, vol. 61, no. 66/1, 386-391).  
Skoro sličan rad je već publikovan, ali sa drugim naslovom »The influence of temperature and storage time on Cantaloupe melons physicochemical quality«, autora: ŽNIDARČIČ, Dragan, ŠIRCELJ, Helena, KACJAN-MARŠIĆ, Nina, u časopisu »Italian Journal of Food science« (2013, vol. 25, no. 4, 459-464).

### **Withdraw two articles**

1. Selected nutrient evaluation of Slovenian leafy vegetable genetic resources (authors: ŽNIDARČIČ, Dragan, MEGLIČ, Vladimir, KARIĆ, Lutvija, MIRECKI, Nataša, SINKOVIČ, Lovro, GLAMOČLIJA, Petar) published in »Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu« (2016, vol. 61, no. 66/2, 61-67).  
Almost identical article has already been published - with a different title, namely »Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries« (authors: ŽNIDARČIČ, Dragan, BAN, Dean, ŠIRCELJ, Helena) in the »Food chemistry« (2011, vol. 129, no. 3, 1164-1168).
2. Effect of post harvest treatments on physicochemical properties of cantaloupe« (authors: ŽNIDARČIČ, Dragan, KARIĆ, Lutvija, POGAČNIK, Marijan, KACJAN-MARŠIĆ, Nina) published in »Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu« (2016, vol. 61, no. 66/1, 386-391).  
An identical article has already been published - with a different title, namely »The influence of temperature and storage time on Cantaloupe melons physicochemical quality« (authors: ŽNIDARČIČ, Dragan, ŠIRCELJ, Helena, KACJAN-MARŠIĆ, Nina) in the »Italian Journal of Food science« (2013, vol. 25, no. 4, 459-464).

## SADRŽAJ / CONTENT

	Stranica Page
<b>Melisa Ljuša, Hamid Čustović, Marija Misilo .....</b>	9
Potencijalna erozija tala brdsko-planinskog područja Tuzle <i>Potential soil erosion in the hilly-mountainous region of Tuzla</i>	
<b>Višnja Vasilj, Mihaela Blažnikov, Adrijana Filipović, Zrinka Knezović, Sanja Sikora .....</b>	20
Genetska identifikacija i simbiozna učinkovitost sojeva <i>Rhizobium leguminosarum</i> izoliranih iz različitih tipova tala Hercegovine <i>Genetic identification and symbiotic efficiency of indigenous Rhizobium leguminosarum strains isolated from different soil types of Herzegovina</i>	
<b>Belma Raščić, Anesa Jerković-Mujkić .....</b>	39
Efekti soljenja prometnica na ukupan broj aktinomiceta i streptomiceta u Sarajevskom polju <i>Effects of road salinization on total number of actinomycetes and streptomycetes in Sarajevo field</i>	
<b>Ivan Ostojić, Mladen Zovko, Aida Kohnić, Danijela Petrović, Dragan Jurković, Luka Bošnjak .....</b>	46
Prvi nalaz crvene palmine pipe <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> (Olivier, 1790) u Bosni i Hercegovini <i>First report of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier, 1790) in Bosnia and Herzegovina</i>	
<b>Ivan Ostojić, Mladen Zovko, Danijela Petrović, Dragan Jurković, Luka Bošnjak .....</b>	59
Lisna uš smilja <i>Macrosiphoniella helichrysi</i> (Hemiptera: Aphididae), nova vrsta u fauni lisnih uši u Bosni i Hercegovini <i>The immortal aphid Macrosiphoniella helichrysi Remaudiere, 1952 (Hemiptera: Aphididae), a new species in aphid fauna in Bosnia and Herzegovina</i>	
<b>Mladen Zovko, Ivan Ostojić, Dragan Jurković, Nedžad Karić .....</b>	68
Prvi nalaz smeđe mramoraste stjenice <i>Halyomorpha halys</i> (Stål, 1855) u Bosni i Hercegovini <i>First report of the brown marmorated stink bug, Halyomorpha halys (Stål, 1855) in Bosnia and Herzegovina</i>	

<b>Selma Pilić, Anesa Jerković-Mujkić, Sabina Dahija, Renata Bešta-Gajević .....</b>	79
Citopatološke promjene na ukrasnim petunijama izazvane virusom mozaika lucerke <i>Cytopathological changes induced by Alfalfa mosaic virus infection in ornamental petunia</i>	
<b>Almira Konjić, Mirsad Kurtović, Fuad Gaši, Jasmin Grahić, Osman Musić, Mirza Uzunović, Sabrija Čadro, Alen Mujčinović, Arneta Okić .....</b>	90
Kreiranje prognoznog modela za plemenjaču krastavca u agroekološkim uslovima Tuzlanskog kantona <i>Creating a cucumber downy mildew forecasting model in agro ecological conditions of Tuzla Canton</i>	
<b>Ervin Zečević, Admir Dokso, Alma Rustempašić, Suzana Đorđević Milošević .....</b>	102
Polimorfizam PrP gena u populacijama bosanskih i hrvatskih koza <i>Polymorphisms of the caprine prion protein (PrP) gene in the goat population(s) in Bosnia and Herzegovina and Croatia</i>	
<b>Senada Čengić-Džomba, Emir Džomba, Salko Muratović, Dženan Hadžić, Azra Škulj, Berin Čanić .....</b>	112
Promjene sadržaja hranjivih materija tokom vegetativnog razvoja lucerke iz prvog otkosa <i>Change of yield and nutritional quality during vegetative phase of lucerne in the first cut</i>	
<b>Samir Muhamedagić .....</b>	121
Biološke karakteristike uzgojnih populacija potočne pastrmke ( <i>Salmo trutta</i> Lineaus, 1758) i njihov utjecaj na divlje populacije u gornjem toku rijeke Neretve <i>Biological characteristics of farm populations of brown trout (Salmo trutta Lineaus, 1758) and their impact on the wild populations in the upper stream of the Neretva river</i>	
<b>Samir Muhamedagić, Jerko Pavličević, Nebojša Savić .....</b>	135
Sastav ihtiopopulacije gornjeg toka rijeke Neretve, pola vijeka nakon izgradnje prve brane <i>Composition of ichthyopopulations in the upper stream of the Neretva river, half a century after the construction of the first dam</i>	

<b>Adla Kahrić, Andrej Gajić, Samir Muhamedagić .....</b>	146
Prvi podatak o gravidnoj drhtulji šarulji, <i>Torpedo mamorata</i> (Risso, 1810) u Bosni i Hercegovini: morfološke i biološke karakteristike <i>First observed gravid marbled electric ray, Torpedo mamorata (Risso, 1810), in Bosnia and Herzegovina: morphological and biological characteristics</i>	
<b>Aldijana Mušović, Rifat Škrijelj, Sadbera Trožić-Borovac, Senad Šljuka, Mahir Gajević .....</b>	157
Efekat fizičko-hemijskih faktora na distribuciju vodenih cvjetova u makrozoobentosu Crne rijeke <i>Impact of physical and chemical enviromental characteristics on the distribution of mayflies in benthic fauna from the Crna rijeka river</i>	
<b>Sabina Trakić, Adil Homoraš, Velida Durmić, Sadbera Trožić-Borovac, Samir Đug .....</b>	171
Priobalna vegetacija kao hidromorfološki parametar upravljanja vodenim ekosistemima (rijeka Željeznica) <i>Riparian vegetation as a hydromorphological parameters for the management of aquatic ecosystems (Željeznica river)</i>	
<b>Ahmed Busuladžić, Zlatan Sarić .....</b>	189
Analiza prisustva aflatoksina M <sub>1</sub> u sirovom kravljem mlijeku sa otkupnog područja mljekare Milkos d.d. Sarajevo <i>The detection of aflatoxin M<sub>1</sub> quantity in raw milk from the purchase area of dairy Milkos d.d. Sarajevo</i>	
<b>Tijana Brčina, Milica Vilušić, Snježana Hodžić, Amel Selimović .....</b>	204
Utjecaj tehnoloških parametara na održivost <i>Enterococcus faecium</i> u svježem siru <i>Influence of production parameters on sustainability of the Enterococcus faecium in fresh cheese</i>	
<b>Sabina Operta, Ibrahim Ganjgo .....</b>	216
Fizičko-hemijska i senzorna svojstva pilećih pljeskavica sa različitim koncentracijama NaCl <i>Physicochemical and sensory properties of chicken patties with different NaCl concetrations</i>	
<b>Đurađ Hajder, Mirsad Kurtović, Nikola Mičić .....</b>	230
Eksperimentalni uzorci u biološko-poljoprivrednim istraživanjima <i>Experimental samples in a biological-agricultural research</i>	

<b>Indeks autora / Authors' index</b>	246
<b>In memoriam</b>	249
<b>Uputstvo za objavljivanje radova</b>	252
<b>Instructions for publishing papers</b>	255



## POTENCIJALNA EROZIJA TALA BRDSKO-PLANINSKOG PODRUČJA TUZLE

Melisa Ljuša<sup>1</sup>, Hamid Čustović<sup>1</sup>, Marija Misilo<sup>2</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Tuzlanski bazen jedan je od bazena u Dinaridima, pripada peripanonskoj oblasti, i nalazi se na kontaktu zone Dinarida i Panonske nizine, stvorenih u toku oligocena kao posljedica intenzivnih tektonskih pokreta. To je područje unutarnjih Dinarida, građeno od postorogenih neogenih i kvartarnih sedimenata marinskog i slatkovodnog porijekla koje sadrže naslage uglja i magmatske stijene. Nadmorske visine rastu od jugozapada prema sjeveroistoku i kreću se u rasponu od 200 do 760 m. Područje je pretežno brežuljkasto-brdskog karaktera, sa dominacijom visinskog razreda 300-700 m koji zauzima >75% površine grada. Dominiraju nagibi terena između 5-12° i 12-32°, što je karakteristika brdsko-planinskog područja.

S obzirom na nagibe padina i dominantnu zastupljenost sedimentnih stijena prostor Tuzle predisponiran je za razvoj padinskih erozionih procesa. Naročito su razvijeni procesi linijske erozije i proces klizanja.

U ovom radu izračunata je potencijalna erozija za najvažnije tipove tala brdsko-planinskog područja Tuzle. Potencijalna erozija pokazuje šta bi se, s obzirom na erozivnost kiše i osobine tla, dogodilo s nekim tlom na padini određenog nagiba i dužine. Za proračun erozije tla korištena je metoda Univerzalne jednadžbe gubitka tla erozijom (USLE). Prema kriteriju za ocjenu erodibilnosti tla, može se reći da većinu tipova tala Tuzle karakterizira osrednja erodibilnost iz čega proizilazi da su to tla najvećim dijelom neotporna na eroziju. Jedanaest od četrnaest analiziranih tipova tala karakterizira erodibilnost 0,1-0,3, odnosno to su tipovi tala uglavnom neotporni na eroziju, posebno pri većem nagibu.

Ključne riječi: *USLE, potencijalna erozija, rizik od erozije, tlo*

### UVOD

Jedna od brojnih definicija erozije je da je to opći proces ili grupa procesa kojim se materijal Zemljine kore premješta s jednog na drugo mjesto djelovanjem snage vode, vjetra, leda i gravitacije (Gobin i sar., 2003). Uz ovaj opći pojam erozije, erozija tla se definira kao proces koji dovodi do razaranja i odnošenja, odnosno gubitka tla djelovanjem vode i vjetra (Resulović i sar., 2008; Gobin i sar., 2003).

---

<sup>1</sup>Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Univerziteta u Sarajevu, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo,

<sup>2</sup>Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Sarajevu, Zmaja od Bosne 33-35, 71000 Sarajevo  
Korespondencija: m.ljusa@ppf.unsa.ba

Jasno je da je erozija tla prirodan proces i da postoji otkada postoje kopno, hidrosfera i atmosfera. Ovakav proces koji se odvijao tokom geološke prošlosti, a odvija se i danas, u literaturi se naziva i geološka erozija (Pavićević i Lujčić, 1967; Kohnke i Bertrand, 1972). Takav prirodni proces nije predstavljao problem jer je iznos erozije bio prirodno i nadoknađen. Nakon što se čovjek počeo baviti poljoprivredom, iznos erozije je znatno povećan zbog uklanjanja prirodnog vegetacijskog pokrivača. Erozijska nastala pod uticajem čovjeka naziva se još i antropogena erozija, a zbog činjenice da su gubici tla puno veći nego što se može nadoknaditi pedogenetskim procesima često se naziva i ubrzana erozija (Pavićević i Lujčić, 1967). Prema FAO Global Soil Partnership (GSP), svake godine erodira oko 75 milijardi tona poljoprivrednog zemljišta, dok finansijski gubici iznose oko 400 milijardi američkih dolara (GSP, 2017; preuzeto iz Borelli i sar., 2018).

Dva osnovna oblika erozije tla su: erozija vodom i erozija vjetrom. Osim o reljefu i klimi, oba tipa erozije ovise o teksturi tla, količini vode, količini organske tvari i o prisutnosti i vrsti vegetacije na površini (Resulović i sar., 2008). Tla se razlikuju po erodibilnosti. Erozijski su manje podložna tla koja imaju bolju, stabilniju strukturu, koja su teža za transport i tla koja imaju veći kapacitet infiltracije (Kohnke i Bertrand, 1972).

U ovom radu, izdvojili smo pet grupa faktora koji dominiraju nad erozijskim procesima i to su: 1) režim padavina; 2) geomorfologija i nagibi terena; 3) način obrade zemljišta; 4) način korištenja zemljišta; i 5) svojstva tla.

## MATERIJAL I METODE RADA

Najčešće primjenjivana metodologija za proračun erozije tla je metoda Univerzalne jednadžbe gubitka tla erozijom (eng. *Universal Soil Loss Equation* (USLE)):

$$A = R \times K \times L \times S \times C \times P$$

gdje je:

A – prosječna količina erozijskog nanosa tla u t/ha/godišnje

R – erozivnost kiše – pokazatelj intenziteta kiše izračunat na osnovu kinetičke energije kiše koja uzrokuje površinsko oticanje ( $J/m^2/mm/h$ )

K – erodibilnost tla – osobine tla

L – dužina padine (m)

S – nagib padine (%)

C – biljni pokrov i gospodarenje tlom

P – mjere i zaštite tla od erozije (konturna obrada, sjetva u pojaseve, terasiranje i dr.)

Potencijalna erozija podrazumijeva prosječni višegodišnji gubitak tla erozijom u t/ha/godišnje za period za koji je izračunat pokazatelj R (erozivnost kiše). Za brojčani pokazatelj potencijalne erozije uzima se vrijednost RKLS prema USLE. Kisić i sar. (2000) su stepen rizika nastanka erozije podijelili u šest kategorija (Tabela 1.).

Tabela 1. Kriterij za ocjenu stepena rizika erozije

*Table 1. Criteria for erosion risk assessment*

<b>Rizik nastanka erozije</b>	<b>Vrijednost gubitka tla (t/ha/god)</b>
<b>neznatan</b>	<20
<b>mali</b>	21-50
<b>umjeren</b>	51-100
<b>visok</b>	101-200
<b>ekstreman</b>	200-400
<b>katastrofalan</b>	>400

*Izvor: Kisić i sar., 2000.*

U svrhu proračuna R faktora korištena je jednačba Fourniera (1967), kao kod Kisić i sar. (2000):

$$R = \sum (p^2 : P)$$

gdje je:

p – srednja mjesečna količina padavina u mm

P – srednja godišnja količina padavina u mm

Za proračun su korišteni podaci s meteorološke stanice Tuzla za period 1961-1991. godina. Izračunati podaci ukazuju da se u navedenom periodu erozivnost kiše kreće od 65 do 124.

Za potrebe izračunavanja K faktora (faktora erodibilnosti tla) korišteni su podaci o osnovnim fizičko-hemijskim obilježjima tla posmatranog područja iz Studije upotrebne vrijednosti zemljišta za područje Grada Tuzla (2017). Proračun se temelji na nomografu (Wischmeier i sar., 1958, 1971) koji odražava odnos između K faktora i karakteristika tla, a izražava se i jednačbom:

$$K = [2,1 \times 10^{-4} \times (12 - OM) \times M^{1,14} + 3,25 \times (s - 2) + 2,5 \times (p - 3)] / 100$$

gdje je: OM - % udio organske materije, M – [% udio praha x (% udio praha + % udio pijeska)]; s – oznaka strukture, p – oznaka propusnosti.

S obzirom na dobivene rezultate, i prema kriteriju za ocjenu erodibilnosti tla (Tabela 2.), može se reći da većinu tipova tala Tuzle karakterizira osrednja erodibilnost. Jedanaest od četrnaest analiziranih tipova tala karakterizira erodibilnost 0,1-0,3, te su ti tipovi tala neotporni na eroziju. Tri tipa tla (Distrično smeđe tlo na pijescima i pješčarima, Vertisol tipični i Vertisol posmeđeni) imaju K faktor <0,1, te ih karakterizira vrlo niska erodibilnost i smatraju se otpornima na eroziju.

Tabela 2. Kriterij za ocjenu erodibilnosti tla  
 Table 2. Criteria for soil erodibility assessment

<b>Erodibilnost tla</b>	<b>Ocjena erodibilnosti</b>	<b>Otpornost na eroziju</b>
<b>&lt;0,1</b>	vrlo niska erodibilnost	otporno na eroziju
<b>0,1 – 0,3</b>	osrednja erodibilnost	neotporno
<b>0,3 – 0,6</b>	visoka erodibilnost	neotporno
<b>&gt;0,6</b>	vrlo visoka erodibilnost	vrlo neotporno

Izvor: Kisić i sar., 2000.

S obzirom na zabilježene nagibe terena na posmatranom području izračunat je indeks topografije (LS faktor) za devet dužina padine 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 i 90 m, koristeći nomogram za izračunavanje LS faktora.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Područje Tuzle ima umjereno-kontinentalnu klimu sa određenim specifičnostima izazvanim lokalnim reljefom i položajem u odnosu na dominantne regije u okolini (Bosanski planinski masiv s jedne i Panonska nizija s druge strane). Prosječna godišnja količina padavina u Tuzli iznosi 894 l/m<sup>2</sup>. Najviše padavina ima u proljeće i ljeto, tako je juni mjesec sa najvećom prosječnom količinom padavina 111 l/m<sup>2</sup>. Godišnje je u prosjeku 132 dana sa padavinama, od čega 132 sa kišom i 46 sa snijegom. Pljuskovite padavine u ljetnim mjesecima su jedna od karakteristika klime ovog područja.

Geološka podloga utiče na erodibilnost svojom trošnošću i propusnošću. Kristalasti škriljci, meki pješčari, fliš, serpentini i dolomiti spadaju u stijene koje su veoma podložne eroziji i fizičkom trošenju. Gline, fliš i dolomiti svojom nepropusnošću onemogućavaju poniranje vode. Ako se takvi slojevi nalaze blizu površine, nakon prvih kiša dolazi do saturacije i do snažnih erozijskih procesa.

Prema osnovnoj geotektonskoj podjeli Dinarida BiH, područje Tuzle dio je unutrašnjih Dinarida. To je prostor koji predstavlja prelaznu zonu, tj. kontaktnu zonu između Dinarida i Panonske nizine. Područje grada izgrađeno je većim dijelom od geoloških sedimenta neogena i kvartara. Ekonomski značajni sedimenti (ugljen, kamena sol, kvarcni pijesak) su sedimenti eocena, miocena i pliocena. Eocenski sedimenti zastupljeni su u sjevernom, sjeveroistočnom i istočnom dijelu grada, na padinama Majevice. Predstavljani su naslagama fliša, zatim glinovito-karbonatnom serijom sa slojevima uglja, te kompleksom glinaca, laporaca, pješčara i konglomerata. Miocenske naslage prekrivaju najveći dio teritorije Tuzle. Predstavljene su naslagama krečnjaka, crvenim glinama, glincima, pješčarima, konglomeratima, trakastom serijom (dolomiti, dolomitski laporci, tufovi, anhidriti, haliti), laporima i laporcima, glinama, pijescima i šljuncima. Pliocenski sedimenti zastupljeni su u zapadnom i jugozapadnom dijelu grada i čine ih kvarcni pijesci, šljunci, gline, te ugallj.

Kvartarni sedimenti su najvećim dijelom zastupljeni u nižim dijelovima dolina rijeka i predstavljani su šljuncima, pijescima, valuticama i muljevima. Osim u ovim

područjima, kvartarne naslage su zastupljene i u znatno višem nivou: na starijim riječnim terasama, padinama i slično.

Sama tuzlanska kotlina pruža se u dužini od 40 km pravcem sjeverozapad-jugoistok. U hipsometrijskom pogledu, visine rastu od jugozapada prema sjeveroistoku i kreću se u rasponu od 200 do 760 m. Visinski razred 300-700 m zauzima >75% površine grada, te se može reći da je Tuzla dominantno brežuljkasto-brdskog karaktera. Nizijski predjeli obuhvataju nešto više od 10% teritorije grada (visine do 300 m). Najniže visine (<200 m) zabilježene su u krajnjem jugozapadnom dijelu grada. Kategorija niskih planina (visine iznad 700 m) obuhvata, također, oko 10% površine u sjevernom-sjeveroistočnom dijelu grada. Na prostoru grada dominiraju nagibi kategorije 5-12°, te 12-32° i vezani su uz brežuljkasto-brdski prostor. Kategorija najnižih nagiba (<5°) zastupljena je u najnižim dijelovima riječnih dolina.

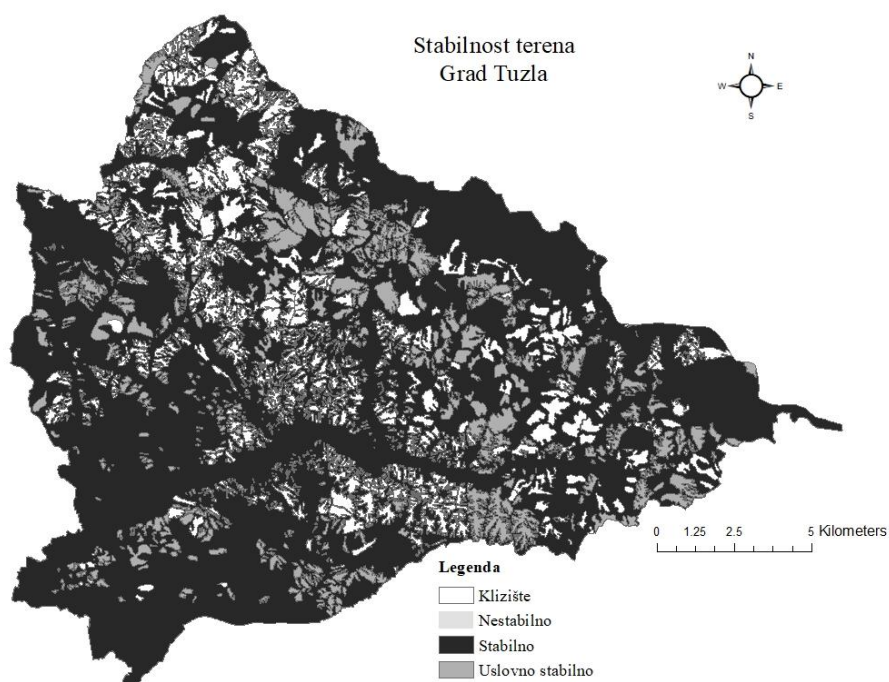
S obzirom na nagibe padina i dominantnu zastupljenost sedimentnih stijena (naročito klastičnih) prostor Grada Tuzla predisponiran je za razvoj padinskih procesa. Naročito su razvijeni procesi linijske erozije (stalni i povremeni tokovi), te se formiraju jaruge i vododerine (registrirano je oko 390 jaruga s ukupnom dužinom nešto manjom od 45.000 m). Osim linijske erozije, naročito aktivan proces na području Tuzle je proces klizanja. Zabilježeni su različiti tipovi klizišta kao posljedica razlika u matičnoj podlozi. U slabo litificiranim stijenama pojavljuju se veća spora i plitka klizišta, dok se na terenima s ugljenim slojevima i pratećim sedimentima javljaju velika i duboka klizišta, te nagli procesi klizanja.

Poljoprivredne površine na području Tuzle zauzimaju 9.327 ha ili 31,5% ukupne površine, a identifikovano je jedanaest tipova tala sa pripadajućim podtipovima iz razdjela Automorfni i Hidromorfni tala (Čustović i Ljuša, 2017).

U okviru poljoprivrednih površina najzastupljeniji su mješoviti sistemi obrade zemljišta (mješovite farme). Obrada zemljišta u najvećem broju slučajeva nije usklađena sa nagibom terena, tako da se često događa da se pod oranicama nalaze zemljišta koja se zbog visokog nagiba ne bi smjela obrađivati, jer svaka vrsta obrade smanjuje stabilnost tla i njegovu otpornost prema eroziji. Osim toga, oranje se umjesto po konturi, često vrši „uz i niz padinu“, što katastrofalno doprinosi akceleraciji erozijskih procesa.

Automorfna tla zauzimaju veći dio površine grada od 26.704,03 ha ili 90,24%. Nalaze se izvan domašaja poplavnih i podzemnih voda. Hidromorfna zemljišta su zastupljena tek na 3,83% teritorije ili 1.134,80 ha. Erodibilnost tla rezultira iz njegovih fizičkih, hemijskih i bioloških svojstava. Poseban uticaj na erodibilnost tla ima stabilnost strukturnih agregata, sadržaj organske materije, teksturni sastav, vodopropusnost, kapacitet za vodu, zbijenost i stepen okulturnjenosti tla. Nažalost, većina BiH zemljišta nosi obilježje nepovoljnih svojstava u odnosu na eroziju.

Prema podacima sa kojima raspolaže Kantonalni štab civilne zaštite Tuzla, koji su dobijeni snimanjem stanja na terenu na području Tuzlanskog kantona, trenutno je registrovano ukupno 1.479 klizišta i odrona, od čega je 478 aktivnih, a 1.001 klizište je u fazi mirovanja. Klizištima je zahvaćena površina od 896 ha. Najviše klizišta registrovano je na području Grada Tuzla-324 (Civilna zaštita, 2003). Prema najnovijim izvorima (maj 2014) na području grada registrirano je >1.350 klizišta i još oko 1.000 potencijalnih lokacija za pojavu novih klizišta. Iz navedenog se vidi kako broj klizišta svake godine raste što najbolje ukazuje na neadekvatno korištenje prostora.



Karta 1. Stabilnost terena u odnosu na pojavu klizišta

*Map 1. Stability of the terrain in relation to landslides appearance*

Izvor: Zavod za prostorno planiranje i urbanizam Tuzla

Iako je analizirano četrnaest tipova tala, potencijalna erozija prikazana je na primjeru najzastupljenijih tala brdsko-planinskog područja Tuzle.

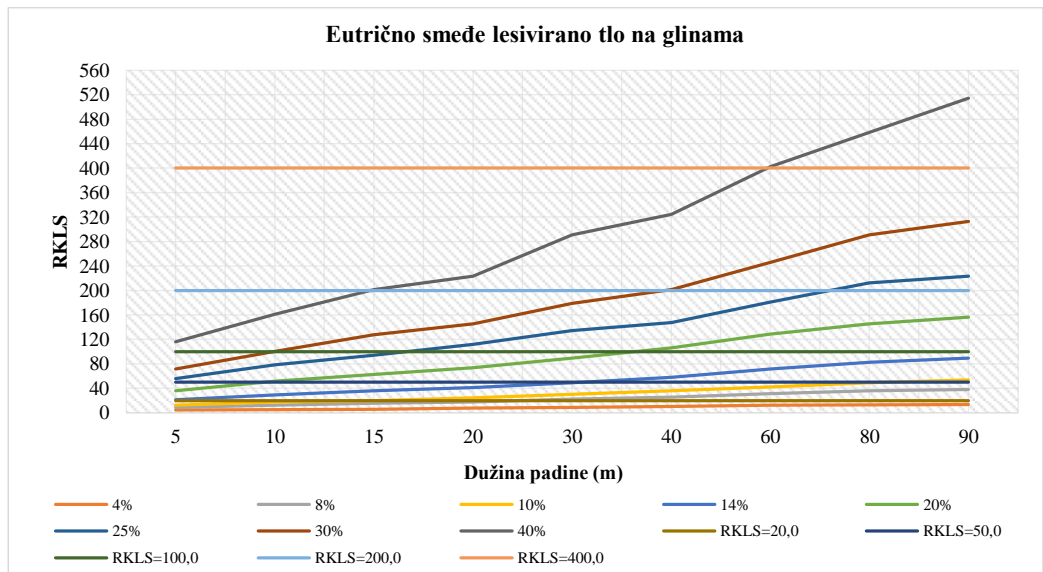
#### *Distrično smeđe tlo na pijescima i pješčarima*

Ovaj tip tla javlja se u južnom, jugozapadnom, zapadnom, sjeverozapadnom i sjevernom dijelu Tuzle i zauzima površinu od oko 4.900 ha. Zbog svojih prirodnih obilježja (dubine i infiltracionih svojstava) ova tla karakterizira izrazito niska

erodibilnost i smatraju se otpornima na eroziju na manjim nagibima do 15%. Rizik raste sa porastom nagiba i dužine padine, pri čemu obraslost i tip vegetacije igra veoma značajnu ulogu.

#### *Eutrično smeđe lesivirano tlo na glinama*

Ovaj tip tla na području Tuzle zauzima oko 4.450 ha uglavnom u jugozapadnom i zapadnom dijelu grada na područjima s nagibima do 30%. Kod ovog tipa tla visok rizik nastanka erozije s mogućim gubicima tla 100-200 t/ha/god može se javiti na nagibima većim od 20% uz dužinu padine veću od 40 m dužine, a može preći u ekstreman na nagibima većim od 30% uz veću dužinu padine i katastrofalan na najvišim nagibima uz veliku dužinu padine. S obzirom na područja u kojima se pojavljuju, rizik nastanka erozije na ovim tlima možemo ocijeniti kao umjeren do visok.



Grafikon 1. Eutrično smeđe lesivirano tlo na glinama-potencijalna erozija  
Graph 1. Eutric cambisol on clay-potential erosion

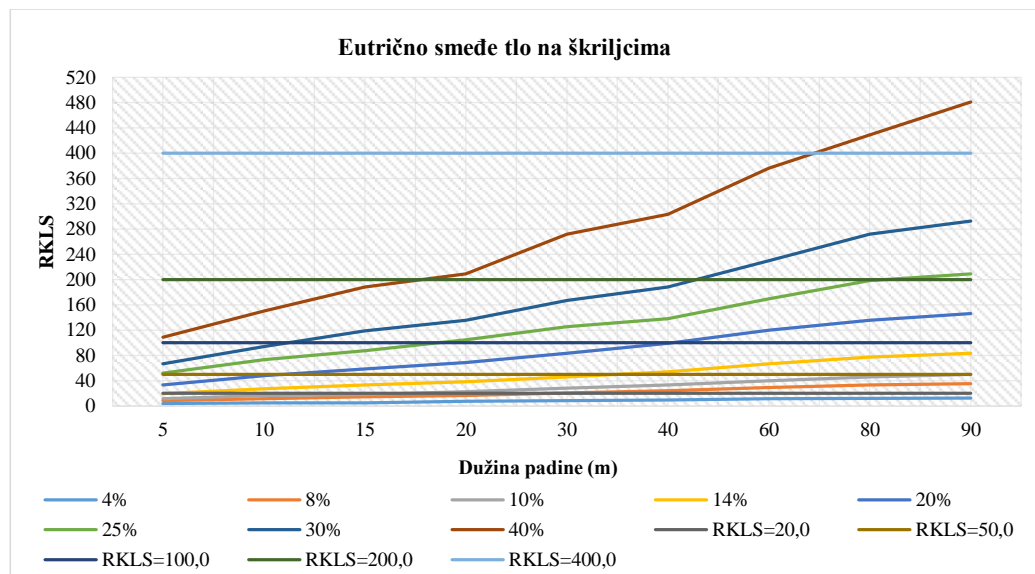
#### *Eutrična smeđa tla na laporima i krečnjacima (trošnim)*

Ovaj tip tla zauzima 4.350 ha površine uglavnom u sjevernom dijelu grada. Javlja se na terenima različitih nagiba (u istočnom dijelu to su padine i preko 60%). Općenito, visok rizik nastanka erozije na ovim tlima može se očekivati na nagibima većim od 25% uz dužinu padine veću od 50 m. S obzirom da se ova tla pojavljuju na terenima različitih nagiba, rizik nastanka erozije možemo ocijeniti kao umjeren do visok.

#### *Eutrično smeđe tlo na škriljcima*

Ovaj tip tla zauzima oko 3.600 ha površine u sjevernom, središnjem i sjeveroistočnom dijelu grada na terenima različitih nagiba (i do 60%). Visok rizik nastanka erozije na

ovim tlima može se očekivati na nagibima većim od 20% uz dužinu padine veću od 40 m. Na padinama nagiba većih od 30% i dužine iznad 40 m rizik prerasta u ekstreman, a na najvišim nagibima prelazi u katastrofalan na najdužim padinama. Rizik nastanka erozije za ovaj tip tla možemo ocijeniti kao visok do ekstreman.



Grafikon 2. Eutrično smeđe tlo na škriljcima-potencijalna erozija  
 Graph 2. Eutric cambisol on schist-potential erosion

#### *Lesivirano tipično tlo na glinenim supstratima*

Ovaj tip tla zastupljen je na 1.200 ha površine u sjevernom i sjeverozapadnom dijelu grada. Ovaj tip tla se pojavljuje na terenima različitih nagiba (jedan dio je i na padinama nagiba >40%). Visok rizik nastanka erozije na ovim tlima može se očekivati na nagibima većim od 20% uz dužinu padine veću od 40 m, a katastrofalan se može javiti na nagibima većim od 40% uz veću dužinu padine. S obzirom na nagibe na kojima se pojavljuju, rizik nastanka erozije za ovaj tip tla možemo ocijeniti kao visok.

#### *Smonica beskarbonatna*

Ovaj tip tla zastupljen je na više od 5.000 ha površine Tuzle, uglavnom u sjeverozapadnom i južnom-jugoistočnom dijelu na terenima značajnih nagiba. Visok rizik nastanka erozije na ovim tlima može se očekivati na nagibima većim od 20% uz dužinu padine veću od 70 m, a ekstreman na nagibima većim od 30% uz dužinu padine iznad 60 m. Zbog nagiba područja u kojima se ovaj tip tla pojavljuje, rizik nastanka erozije za ovaj tip tla možemo ocijeniti kao visok.



## ZAKLJUČAK

Tuzlu u reljefnom smislu karakterizira brežuljkasto-brdski reljef s brojnim usjećenim riječnim dolinama koje doprinose vertikalnoj raščlanjenosti reljefa. Prostor grada je izložen značajnom djelovanju padinskih procesa (linijska erozija i klizišta). U tom smislu tla grada su prirodno izložena procesima erozije različitog intenziteta. Posmatrajući analizirana tla u istim uslovima nagiba i dužine padine može se zaključiti:

- na padinama manjih nagiba (1%, 4%) potencijalna erozija za sva tla manja je od 20 t/ha/god što znači da je gubitak tla erozijom neznatan i to za sve dužine padina;
- padinama nagiba od 4% do 15% iznos potencijalne erozije je uglavnom do 50 t/ha/god što znači da je rizik od nastanka erozije mali. Iznimke se mogu javiti na većim nagibima uz veću dužinu padine (iznad 40 m) (tipovi Eutrično smeđe lesivirano na glinama, Eutrično smeđe karbonatno, Eutrično smeđe na škriljcima, Eutrično smeđe na glincima i glinama, Lesivirano tipično na glinenim supstratima, Smonica beskarbonatna);
- na nagibima od 15% do 25% na padinama dužine do 40 m rizik od nastanka erozije je umjeren dok na padinama veće dužine prelazi u visok rizik gdje su mogući gubici >100 t/ha/god. Kod nekoliko tipova rizik prelazi u visok već na nagibima većim od 20% uz dužinu padine veću od 40 m (Eutrično smeđe lesivirano tlo na glinama i Eutrično smeđe tlo na škriljcima) ili veću od 70 m (Eutrično smeđe karbonatno tlo, Eutrično smeđe tlo na glincima i glinama, Lesivirano tipično tlo na glinenim supstratima, Smonica beskarbonatna);
- rizik nastanka erozije na padinama nagiba >30% i dužim od 30 m uglavnom je visok, a na padinama nagiba >40% i uz dužinu veću od 30 metara prelazi u ekstreman (ekstreman se može javiti već i na padinama 30%, kao kod Eutričnog smeđeg tla na škriljcima i Smonice beskarbonatne, a može na 40% preći i u katastrofalan, kao kod Eutričnog smeđeg na škriljcima).

Zbog morfometrijskih karakteristika reljefa na području Tuzle rizik od nastanka erozije općenito je niži u južnom i jugozapadnom dijelu grada i raste prema sjeveru i sjeverozapadu, iako pravac pružanja riječnih dolina dijelom uslovljava odstupanja. Razlike postoje i zbog fizičkih, mehaničkih i hemijskih karakteristika pojedinih tipova tala.

## LITERATURA

Borrelli, P., Robinson, D., Fleischer, L., Lugato, E., Ballabio, C., Alewell, C., Meusburger, K., Modugno, S., Schütt, B., Ferro, V., Bagarello, V., Van Oost, K., Montanarella, L., Panagos, P. (2017): An assessment of the global impact of 21<sup>st</sup> century land use change on soil erosion. *Nature Communications* volume 8, Article number: 2013 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02142-7>

- Čustović, H., Ljuša, M. (2017): Studija upotrebne vrijednosti zemljišta za područje grada Tuzla. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Sarajevo.
- Gobin, A. i sar. (2003): Assessment and reporting on soil erosion: Background and workshop report. European Environment Agency, Copenhagen, <http://www.eea.eu.int>
- Kisić, I., Bašić, F., Mesić, M., Butorac, A. (2000): Procjena rizika od erozije na tlima Vinodolske kotline. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 65, No. 4, 2000 (199-211)
- Kohnke, H. i Bertrand, A. R. (1972): Konzervacija tla. Svjetlost, Sarajevo, 271 str.
- Pavićević, N. i Lujčić, R. (1967): Erozijska zemljišta, 277-280. U: Josifović, M. (ur.), Poljoprivredna enciklopedija 1. dio, JLZ, Zagreb
- Resulović, H., Čustović, H., Čengić, I. (2008): Sistematika tla zemljišta, Univerzitet u Sarajevu.
- Wischmeier, W. H., Johnson, C. B., Cross, B. V. (1971): A soil erodibility nomograph for farmland and construction sites. *J. of Soil and Water Conservation*, vol. 26/5, str. 189-194.
- Wischmeier, W. H., Smith D.D., Umland, R.E. (1958): Evaluation of factors in the Soil-Loss Equation. *Agric. Eng.* 39(8):458-462, 474.

## **POTENTIAL SOIL EROSION IN THE HILLY-MOUNTAINOUS REGION OF TUZLA**

### **Summary**

The Tuzla basin is one of the Dinaric basins; it belongs to the peri-Pannonian region and is situated at the contact zone between the Dinarides and the Pannonian Plain formed during the Oligocene as a result of intensive tectonic movements. This is an area of the Inner Dinarides, composed of Post-orogenic Neogene and Quaternary sediments of marine and freshwater origin which contain deposits of coal and igneous rocks. The altitudes raise going from the southwest to the northeast and range between 200 do 760 m. The area is principally of hilly and mountainous character, with a dominance of the 300-700 m altitude class which accounts for >75% of the city area. Predominant gradients of the terrain are 5-12° and 12-32°, which is typical of hilly-mountainous areas.

Due to the slope gradient and the dominant presence of sedimentary rocks, the area of Tuzla is predisposed for the development of slope erosion processes. Particularly developed are the processes of linear erosion and landslides.

Potential erosion was calculated in this paper for the most important types of soil in the hilly-mountainous area of Tuzla. Potential erosion shows what would happen, given the erosion driven by rainfall and soil properties, with a specific soil type on a slope of certain inclination and length. In calculating soil erosion the Universal Soil Loss Equation (USLE) was used. According to the criteria for assessing soil erodibility, it could be pointed out that most soil types of the Tuzla area are characterized by moderate erodibility which implies that, for the most part, these soils

are not resistant to erosion. Eleven of the fourteen analyzed soil types are characterized by erodibility of 0.1-0.3, i.e. these soil types are largely vulnerable to erosion at an inclination above 12°.

Key words: *USLE, potential erosion, erosion risk, soil*

## GENETSKA IDENTIFIKACIJA I SIMBIOZNA UČINKOVITOST SOJEVA *Rhizobium leguminosarum* IZOLIRANIH IZ RAZLIČITIH TIPOVA TALA HERCEGOVINE

Višnja Vasilj<sup>1</sup>, Mihaela Blažinkov<sup>2</sup>, Adrijana Filipović<sup>1</sup>, Zrinka Knezović<sup>1</sup>, Sanja Sikora<sup>3</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Predstjetvena bakterizacija leguminoza sa selekcioniranim visoko učinkovitim sojevima simbioznih fiksatora dušika ima značajan utjecaj za prinos i kvalitetu graška (*Pisum sativum* L.). Odabir najboljih autohtonih sojeva *R. Leguminozarum* je vrlo značajna, jer se sojevi razlikuju po svojoj simbioznoj učinkovitosti, kompetitivnosti i kompatibilnosti. Cilj istraživanja je utvrditi prisutnost autohtonih sojeva *Rhizobium leguminosarum* koji noduliraju grašak u tlima zapadne Hercegovine, te procijeniti njihovu nodulacijsku sposobnost i simbioznu učinkovitost. Za identifikaciju i procjenu genetske raznolikosti autohtonih izolata primijenjene su RAPD i ERIC-PCR metode. Za utvrđivanje nodulacijske sposobnosti i simbiozne učinkovitosti postavljeni su dvogodišnji poljski pokusi sa graškom koji je inokuliran sa deset autohtonih sojeva *R. leguminosarum* i jednim referentnim sojem *R. leguminosarum* 1001. Navedeni autohtoni sojevi su izolirani iz kvržica sorte graška Mali provansalac sa različitih lokaliteta Hercegovine. Tijekom istraživanja utvrđena je prisutnost autohtonih sojeva kvržičnih bakterija *R. leguminosarum* kao i značajna genetska raznolikost unutar prirodne populacija. Između istraživanih autohtonih sojeva je utvrđena razlika u nodulacijskoj sposobnosti i simbioznoj učinkovitosti u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu. Veća simbiozna učinkovitost i nodulacijska sposobnost u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* i kontrolu utvrđena je kod autohtonih sojeva *R. leguminosarum* (V1 i V13) izoliranih sa mikrolokaliteta Vihovići (Mostar) i mikrolokaliteta Osoj (Posušje).

Ključne riječi: *biološka fiksacija dušika, Rhizobium leguminosarum, genetska raznolikost, Pisum sativum, poljski pokusi*

---

<sup>1</sup> Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Biskupa Čule bb, 88000 Mostar, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup> Veleučilište u Slavanskom Brodu, Poljoprivredni odjel, Mile Budaka 1, 35000 Slavonski Brod, Hrvatska

<sup>3</sup> Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

Korespondencija: Visnja Vasilj, visnja.vasilj@aptf.sum.ba

## UVOD

U održivoj poljoprivredi jedan od glavnih zahtjeva za uspješnu biljnu proizvodnju je manji unos kemijskih sredstava, ali uz istovremenu brigu za okoliš kroz iskorištavanje prirodnih izvora dušika za postizanje veće razine prinosa. Posebno mjesto, u svezi s tim zahtjevima pripada simbiotnoj fiksaciji dušika i uzgoju različitih leguminoza, koje utječu na očuvanje plodnosti tla i prirodnih resursa (Redžepović *et al.*, 2006; 2007; Sikora *et al.*, 2008; Sudarić *et al.*, 2008; 2010). Agroekološko područje Hercegovine je kraško područje, koje je bogato podzemnim vodama, koje se koriste za piće. Kako bi se očuvali prirodni izvori podzemnih voda od onečišćenja prema novim zahtjevima održive poljoprivrede potrebno je smanjiti upotrebu dušičnih mineralnih gnojiva. Iz tog razloga za uspješnu održivu biljnu proizvodnju ukazala se i potreba za primjenu predstjetvene bakterizacije graška sa učinkovitim sojevima kvržičnih bakterija. Na području Hercegovine, vrtni konzumni grašak (*Pisum sativum* L.) ima određene gospodarske prednosti u odnosu na druge povrtne kulture koje se uzgajaju na ovom području. Prije svega, što je to prva vrlo rana povrtna kultura koja ima jednostavnu proizvodnju sa kraćom vegetacijom u odnosu na druge povrtne kulture. Prinos zrna je isti ili nešto veći od soje (Marohnić, 2006). Pokazalo se kroz istraživanja da je grašak dobar predusjev svim kulturama (Rapčan *et al.*, 2004), jer nakon uzgoja ostavlja tlo u dobrom stanju sa povoljnom količinom pristupačnog dušika. Postrne kulture iskoriste dušik u tlu kojeg grašak ostavi (više od 200 kg ha<sup>-1</sup>). Grašak kao predhodna kultura, navode Soon *et al.* (2001) ima učinak na mineralizaciju čistog dušika u iznosu od 51 kg ha<sup>-1</sup>.

Bakterija tla, *Rhizobium leguminosarum*, izuzetno je važna u poljoprivrednoj praksi zbog sposobnosti vezivanja atmosferskog dušika u simbiotnom odnosu sa graškom (Riah *et al.*, 2014). Značajno je naglasiti da ova vrsta kvržičnih bakterija može, također formirati kvržice i na drugim leguminozama uključujući bob (*Vicia faba* L.), leću (*Lens culinaris* Medik), grahoricu (*Vicia sativa* L.) i ukrasni grašak (*Lathyrus odoratus* L.) ali je i različito zastupljena u tlu ovisno o oklolišu i uvjetima tlo –usjev (Ruis-Diez *et al.*, 2012). Poznato je da se različiti sojevi *R. leguminosarum* međusobno znatno razlikuju po svojoj simbiotnoj učinkovitosti, kompetitivnosti i kompatibilnosti. Zbog toga je selekcija visoko učinkovitih sojeva od presudnog značaja u proizvodnji preparata za bakterizaciju (Sikora *et al.*, 2000). Međutim, glavna poteškoća pri uvođenju novih sojeva kvržičnih bakterija u određeni okoliš je kompeticija sa visoko adaptiranim autohtonim sojevima u tlu kao i sa nepovoljnim uvjetima okoliša. Kako u tlu mogu postojati i autohtoni infektivni sojevi koji ne fiksiraju dušika tako učinkovito, kao komercijalni sojevi inokuluma, njihova svojstva su uglavnom nepoznata, što može utjecati na nodulaciju leguminoza. Iz tog razloga da bi bakterizacija leguminoza u nekom okolišu bila uspješna potrebno je proučiti autohtonu populaciju kvržičnih bakterija na nekom području. Za uspješnu bakterizaciju potrebno je utvrditi njihovu genetsku raznolikost i simbiotnu učinkovitost, te izvršiti odabir najučinkovitijih sojeva *R. leguminosarum* na

istraživanim područjima, kako navode brojni autori (Sikora *et al.*, 2000; Mahdhi *et al.*, 2008; Abdel-Aziz *et al.*, 2008; Argaw *et al.*, 2017).

Identifikacija sojeva određene vrste kvržičnih bakterija je važna za bolje razumijevanje i uspješnije iskorištavanje prirodnog procesa biološke fiksacije atmosferskog dušika (Sikora *et al.*, 2000; Sikora i Redžepović, 2003; Germano *et al.*, 2006; Blažinkov *et al.*, 2007; Abdel-Aziz *et al.*, 2008; Sikora *et al.*, 2008). To se naročito odnosi na selekciju najkvalitetnijih sojeva za komercijalnu proizvodnju kao i kod proučavanja ekologije i kompeticijskih odnosa koji vladaju u prirodnim sredinama. U istraživanjima kod primjene bakterizacija leguminoza (Ruiz-Diez *et al.*, 2012) utvrđeno je kako inokulati kvržičnih bakterija zahtijevaju odabir simbioznih učinkovitih vrsta za svaku leguminozu u određenom području. Također, utvrđeno je da dugotrajnim uzgojem leguminoza na istom području povećava se mogućnost odabira visoko učinkovitih i prilagođenih vrsta koje se mogu koristiti kao inokulati (Santos *et al.*, 1999; Batista *et al.*, 2007; Argaw *et al.*, 2017). Obzirom na značaj proučavanja prirodne populacije *R. leguminosarum* i nedostatka takvih podataka za uvjete u Hercegovini, ovim istraživanjima započelo se sa izolacijom i identifikacijom autohtonih sojeva prikupljeni sa različitih lokaliteta, na kojima do sada nije primijenjena bakterizacija leguminoza. Glavni cilj ovih istraživanja je identifikacija autohtonih sojeva *R. leguminosarum* izoliranih sa područja Hercegovine, te procjena njihove simbiozne učinkovitosti kako bi se mogli selekcionirati najkvalitetniji sojevi za inokulaciju graška.

## MATERIJAL I METODE

### Izolacija i identifikacija autohtonih sojeva *R. leguminosarum*

Autohtoni sojevi *R. leguminosarum* izolirani su iz kvržica na korijenu graška u fazi pune cvatnje sa dvadeset različitih lokacija na području Hercegovine (tabela 1.) na kojem nikada nije primijenjena predstetvena bakterizacija sjemena graška. Za izolaciju autohtonih sojeva iz kvržica graška korištena je standardna procedura (V i n c e n t, 1970) i uzeti su uzorci tla (0-30 cm) za standardu kemijsku analizu tla. Ukupno je izolirano 15 izolata, oznaka V1, V3, V4, V6, V7, V8, V10, V12, V13, V14, V15, V16, V18, V20, koji su korišteni za dalju identifikaciju autohtonih sojeva *R. leguminosarum* kao i dva referentna soja *R. leguminosarum* 1001 i 1045 (Institute of Grassland and Environmental Research u Dyfedi tipski soj - 30132 (T) iz zbirke mikroorganizama DSMZ. Za identifikaciju srodnih bakterijskih sojeva korištene su RAPD i ERIC-PCR metode (de Bruijn, 1992; Sikora *et al.*, 1997; Hungria *et al.*, 2000; Sikora *et al.*, 2003; Germano *et al.*, 2006; Blažinkov *et al.*, 2007). Ukupna genomska DNA izolirana je korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju Nucleo Spin Tissue (Machery-Nagel).

Tabela 1. Porijeklo izolata *R. leguminosarum* (lokaliteti) i kemijska svojstva tla  
 Table 1. Origin of *R. leguminosarum* isolates (locations) and chemical properties of soil

Oznaka /ord. No.	Lokaliteti /locations	Soj /strain	pH reakcija tla /Soil pH reaction		Humus/organic matter %	Ukupni/total N %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg /100 g/ tla (soil)	K <sub>2</sub> O mg /100 g /tla (soil)
			H <sub>2</sub> O	1 M- KCl				
1	Vihovići*	V1*	7,43	7,09	7,8	0,42	9,0	23,5
2	Ljubuški	V2	7,53	7,01	5,7	0,31	18,0	15,3
3	Privalj	V3	6,99	6,47	8,0	0,48	18,6	> 40
4	Knešpolje	V4	7,41	7,11	3,4	0,21	6,9	12,8
5	Ljuti Dolac*	V5*	7,33	7,12	5,7	0,32	7,2	22,0
6	Čitluk grad*	V6*	7,34	7,19	2,7	0,15	9,2	32,0
7	Čitluk polje*	V7*	7,01	6,81	2,2	0,14	25,0	17,0
8	Sretnice	V8	7,37	7,29	2,3	0,15	16,3	29,0
9	Krivodol	V9	7,26	6,93	15,6	0,64	65,2	45,0
10	Kruševo *	V10*	7,26	6,93	15,6	0,64	65,2	45,0
11	Čitluk	V12	7,33	7,12	4,6	0,24	45,0	25,8
12	Osoj*	V13*	7,44	7,05	5,5	0,31	22,6	24,5
13	Osoj*	V14*	7,50	7,13	5,3	0,31	25,7	29,5
14	Osoj	V15	7,39	6,99	5,1	0,29	13,8	31,0
15	Posušje	V16	7,45	7,08	6,6	0,38	27,6	31,5
16	Posušje	V17	7,39	6,97	10,6	0,43	41,3	30,5
17	Posušje*	V18*	7,42	7,04	9,9	0,41	47,3	41,5
18	Bijeli brijeg*	V19*	7,40	6,93	9,3	0,40	36,4	29,5
19	Jasenica*	V20*	7,39	7,00	4,3	0,23	48,2	37,5
20	Miletina	V21	<b>6,07</b>	<b>5,24</b>	<b>2,0</b>	<b>0,13</b>	<b>37,6</b>	<b>20,5</b>

Za identifikaciju sojeva *R. leguminosarum* primjenom RAPD metode korištene su četiri oligonukleotidne početnice P1, P4, P15 i P16 (Sikora *et al.*, 2002), a za ERIC-PCR metodu korištene su ERIC1 i ERIC2 početnice po protokolu Blažinkov *et al.*, (2007). Amplificirani fragmenti DNA razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom na 6% poly (NAT) gelovima, (Blažinkov *et al.*, 2007). Amplificirani fragmenti prevedeni su u dvodimenzionalnu binarnu matricu i analizirani pomoću NTSYS-programa (verzija 1.8; Exeter Software, Setauket, N.Y).

### Procjena simbiotnih svojstava autohtonih sojeva *R. leguminosarum*

Nakon molekularne identifikacije autohtonih sojeva *R. leguminosarum* i određivanja varijabilnosti unutar prirodne populacije, sa izabranim sojevima postavljen je dvogodišnji poljski pokus (2009. i 2010.) na dvije lokacije. Cilj poljskog pokusa je

procjena simbiozne učinkovitosti autohtonih izolata i njihove kompatibilnosti sa graškom sorte Mali provansalac. U poljskim pokusima bilo je uključeno deset autohtonih izolata *R. leguminosarum* (V1, V5, V6, V7, V10, V13, V14, V18, V19, V20\*) izoliranih iz kvržica graška sa različitih lokaliteta Hercegovine (tabela 1, oznaka\*), kao i referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrola. Poljski pokus postavljen je po shemi slučajnog bloknoeg rasporeda u četiri repeticije. Odabrane lokacije za poljski pokus u 2009. godini bile su Vrapčići i Hodbina. Sjetva pokusa obavljena je ručno 19.3.2009. godine. Za 2010. godinu odabrane su lokacije Bijelo polje i Hodbina. Sjetva je obavljena također ručno 16.3.2010. na lokaciji Bijelo polje, dok je sjetva na lokaciji Hodbina, kasnila zbog dužeg kišnog perioda i obavljena je 27.3.2010. godine. Na svim pokusnim lokacijama uzeti su uzorci tla za kemijsku analizu prikazani u tablici 2.

Tabela 2. Kemijska svojstva tla na poljskim pokusima za 2009. i 2010.  
Table 2. Chemical properties of soils for field experiment years 2009 and 2010

godina /year	lokacije/ location	dubina tla /soil depth (cm)	pH reakcija tla/soil pH reaction		Humus/orga nic matter (%)	Ukupni/ total N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100 g tla (soil)	K <sub>2</sub> O mg/100 g tla (soil)
			H <sub>2</sub> O	1 M- KCl				
2009.	Vrapčići	0 - 25	8.25	7.01	6.02	0.33	58.3	<b>65.0</b>
2009.	Hodbina	0 - 27	8.02	6.51	2.76	0.13	21.8	<b>27.2</b>
2010.	Bijelo polje	0 - 30	7.53	6.92	1.00	0.21	56.3	<b>38.7</b>
2010.	<b>Hodbina</b>	<b>0 - 30</b>	<b>7.31</b>	<b>5.90</b>	<b>3.00</b>	<b>0.17</b>	<b>19.9</b>	<b>33.1</b>

Tijekom poljskog pokusa nodulacijska sposobnost istraživanih sojeva utvrđena je određivanjem broja kvržica po biljci (uzorci uzeti u fazi cvatnje sa svake osnovne parcele) i mase suhe tvari kvržica (g). Simbiozna učinkovitost istraživanih sojeva procijenjena je na osnovi sadržaja ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke i zrnu (%), te prinosa zrna graška (t ha<sup>-1</sup>). Određivanje sadržaja dušika u biljci i zrnu obavljeno je standardnom metodom po Kjeldahl-u. Rezultati su obrađeni analizom varijance (ANOVA) po statističkom paketu SPSS 13 (Statistical Package for the Sociol Science).

### Vremenske prilike tijekom poljskih pokusa

Na izabranim lokalitetima za poljske pokuse ne nalaze se službene meterološke postaje, pa su podaci o visini srednje dekadne i srednje mjesečne temperature zraka (°C) i mjesečne sume oborina (l m<sup>-2</sup>) preuzeti iz Baze službene meteorološke stanice Mostar i arhive Federalnog hidrometeorološkog zavoda Sarajevo (Tabela 3 i 4).



Tabela 3. Srednje dekadne i mjesečne temperature zraka ( $^{\circ}\text{C}$ ) za 2009. i 2010.  
 Table 3. Decade and monthly means of air temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ) for 2009 and 2010.

2009.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1. dekada	2,8	9,3	9,5	17,3	17,9	21,2	24,4	27,4	23,3	18,6	11,0	10,1
2. dekada	7,7	2,5	8,8	15,0	22,8	25,5	26,2	26,3	21,7	10,2	10,9	2,7
3. dekada	8,4	5,9	10,1	14,6	23,1	19,2	28,1	26,7	21,8	15,6	9,5	9,5
Srednja mjesečna	6,3	5,9	9,5	15,6	21,3	22,0	26,3	26,8	22,3	14,8	10,4	7,5

2010.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1. dekada	7,7	4,0	5,5	13,6	17,2	20,9	26,0	26,5	21,0	16,5	14,6	10,8
2. dekada	5,8	7,0	8,5	13,1	15,7	25,8	29,4	27,4	21,3	14,5	12,1	1,4
3. dekada	2,8	8,2	13,6	17,9	20,2	21,6	25,2	26,2	18,4	11,1	8,9	6,0
Srednja mjesečna	5,4	6,3	9,3	14,8	17,8	22,8	26,8	26,7	20,2	13,9	11,9	6,0

*Podatci: hidrometeorološka stanica Mostara i Federalni hidrometeorološki zavod Sarajevo /  
 data of hydrometeorological station of Mostar, Federal hydrometeorological institute of Sarajevo*

Tabela 4. Srednje dekadne i mjesečne količine oborina ( $\text{l m}^{-2}$ ) za 2009. i 2010.  
 Table 4. Decade and monthly means precipitation ( $\text{l m}^{-2}$ ) for 2009 and 2010

2009.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1. dekada	32,3	86,2	101,9	14,7	9,6	71,5	10,6	14,8	19,8	19,4	140,8	106,8
2. dekada	83,9	31,2	15,7	10,8	13,4	0,1	5,2	42,1	108,0	117,5	5,7	60,0
3. dekada	220,7	0,0	56,0	42,6	12,7	118,4	0,0	0,9	0,0	109,7	17,7	148,2
Mjesečna suma	336,9	117,4	173,6	68,1	35,7	190,0	15,8	57,8	127,8	246,6	164,2	315,0

2010.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1. dekada	212,2	96,4	104,5	16,4	34,7	44,1	25,0	21,5	28,3	105,6	66,8	112,4
2. dekada	26,3	154,8	58,6	174,0	93,4	7,4	0,0	0,0	39,4	57,5	104,6	62,5
3. dekada	20,8	122,2	11,8	3,1	11,7	47,4	2,1	28,5	167,8	85,9	217,1	125,3
Mjesečna suma	259,9	373,4	174,9	193,5	139,8	98,9	27,1	50,0	235,5	249,0	388,5	300,2

*Podatci: hidrometeorološka stanica Mostara i Federalni hidrometeorološki zavod Sarajevo /  
 data of hydrometeorological station of Mostar; Federal hydrometeorological institute of Sarajevo*

## REZULTATI I DISKUSIJA

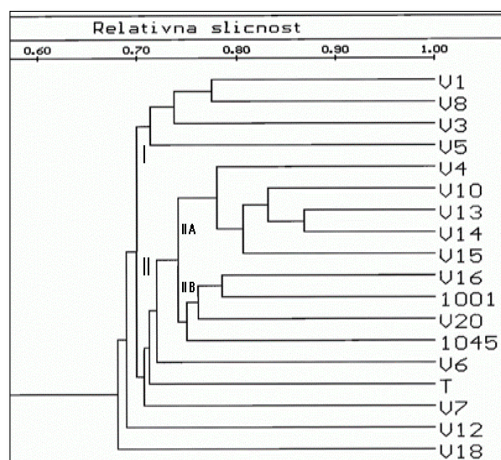
### Identifikacija autohtonih sojeva *R. leguminosarum*

U cilju identifikacije autohtonih sojeva *R. leguminosarum* korištene su dvije molekularne metode RAPD i ERIC-PCR (Hungria *et al.*, 2000; Sikora *et al.*, 2000; 2003; Moschetti *et al.*, 2005; Blažinkov *et al.*, 2007). Ukupna genomska DNA

izolirana je iz 15 autohtonih sojeva *R. leguminosarum*, dva referentna soja (1001 i 1045) i jednog tipskog soja (T). Primjenom obje metode dobiveni su karakteristični DNA profili za svaki istraživani soj. Utvrđeno je da autohtoni sojevi sa područja Hercegovine imaju različite genetičke otiske što ukazuje na značajnu varijabilnost unutar prirodnih populacija. Također utvrđene su i značajne razlike autohtonih sojeva u odnosu na referentne sojeve *R. leguminosarum* 1001 i 1045, kao i tipski soj T. Na osnovi RAPD profila, svi istraživani sojevi mogu se podijeliti u dvije glavne grupe (slika 1). Prva grupa obuhvaća manji broj sojeva (V1, V8, V3 i V5), a druga grupa obuhvaća većinu istraživanih sojeva, a sastoji se od dvije jasno diferencirane podgrupe u koje su uključeni i referentni sojevi (1001 i 1045). Tri izolata (V18, V12 i V7) značajno se razlikuju od ostalih analiziranih sojeva (relativna sličnost 0,72), kao i tipski soj (T). Navedeni rezultati upućuju da ova tri soja predstavljaju vrlo različitu i odvojenu skupinu kvržičnih bakterija.

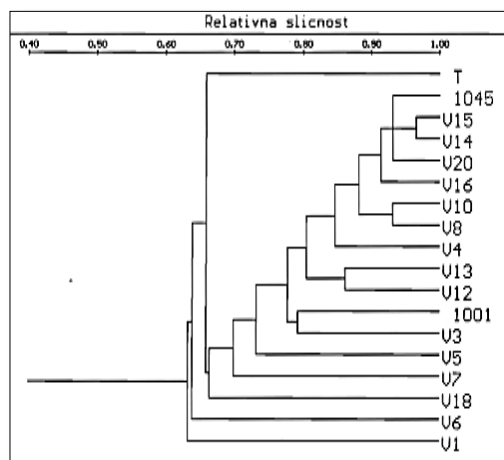
Primjenom ERIC-PCR metode, utvrđeno je da autohtoni sojevi imaju različite genetičke otiske što ukazuje na njihovu međusobnu varijabilnost (slika 2).

Primjenom ove metode utvrđeno je izdvajanje određenih autohtonih sojeva (V1, V6, V12, V18, V7) koji se značajno razlikuju u odnosu na sve istraživane sojeve.



Slika 1. Dendrogram sojeva *R. leguminosarum* dobiven na osnovi RAPD profila primjenom četiri različite početnice

Figure 1. Dendrogram of *R. leguminosarum* strains derived from RAPD fingerprints generated by using four different primers



Slika 2. Dendrogram *R. leguminosarum* sojeva dobiven na osnovi ERIC-PCR profila uz korištenje početnica ERIC1 i 2  
Figure 2. Dendrogram of *R. leguminosarum* strains derived from ERIC-PCR fingerprints generated by using ERIC 1 i 2

Osim toga utvrđena je značajna genetska varijabilnost unutar autohtone populacije *R. leguminosarum*, koja je izolirana sa istog područja (Osoja i Posušje) na većoj nadmorskoj visini u odnosu na druga područja, smještena na južnom dijelu agroekološkog područja Hercegovine. U ovom području sa većom nadmorskom visinom i hladnijom klimom (Osoj i Posušje) utvrđene su značajne genetske razlike između sojeva V18 i V13 u odnosu na sojeve V14, V15, V16, koji su izolirani sa istog područja (Osoj i Posušje). Također značajna genetska varijabilnost utvrđena je između sojeva V6, V7 i V12, koji su izolirani sa južnog dijela agroekološkog područja Hercegovine (lokaliteti oko Čitluka sa toplijom klimom).

Također, genetsku varijabilnosti unutar prirodnih populacija kvržičnih bakterija utvrđene su i u istraživanjima drugih autora, koji su izolirali sojeve na različitim lokalitetima, nadmorskim visinama i sa različitim klimatskim promjenama tog područja. Prikazani rezultati u ovom istraživanju su u suglasju sa rezultatima istraživanja genetske raznolikosti unutar prirodne populacije kvržičnih bakterija *Sinorhizobium meliloti* (Bradić *et al.*, 2003; Elboutahiri *et al.*, 2009), *Bradyrhizobium japonicum* (Sikora *et al.* 2002; Sikora i Redžepović, 2003), te *Rhizobium leguminosarum* (Blažinkov *et al.*, 2007; Abdel-Aziz *et al.*, 2008; Adiguzel *et al.*, 2010; Mulas *et al.*, 2011; Mothapo *et al.*, 2013).

### **Procjena simbiotne učinkovitosti sojeva *R. leguminosarum***

Tijekom dvogodišnjeg istraživanja 2009. (tabela 5) i 2010. (tabela 6) u svrhu procjene simbiotne učinkovitosti i nodulacijske sposobnosti postavljeni su poljski pokusi na dvije lokacije, a prije sjetve uzeti su uzorci tla za utvrđivanje kemijskih svojstava tla (tabela 2). U poljskim pokusima korišten je grašak (*Pisum sativum* L.) sorte Mali provansalac, primijenjena je predstetvena bakterizacija sjemena sa deset autohtonih izolata, izolirani na području Hercegovine (tabela 1), a korišten je jedan referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrola.

Prema mnogim istraživanjima primjenom učinkovitih i adaptiranih autohtonih sojeva simbiotnih fiksatora dušika u procesu predstetvene bakterizacije leguminoza može se osigurati bolja simbiotna učinkovitost i infektivnost, te veći prinosi kulture, što su utvrdili i drugi autori (Khurana i Dudeja, 1997; McKenzie *et al.*, 2001; Jarak *et al.*, 2007; Sikora *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Yadav i Verma, 2014; Mulas *et al.*, 2015; Rapčan *et al.*, 2017; Argaw *et al.*, 2017). Uspjeh predstetvene bakterizacije značajno ovisi o odabiru same sorte biljke domaćina i odgovarajuće kompatibilne populacije sojeva kvržičnih bakterija (interakcije soj x sorta). Pozitivni efekti koji se ogledaju u povećanju prinosa biljne mase i zrna, sadržaju dušika u biljci i zrnu uz navedene interakcija utvrdili su mnogi autori u svojim istraživanjima (Kiers *et al.*, 2007; Blažinkov *et al.*, 2007; Komesarović *et al.*, 2007; Sikora *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Mulas *et al.*, 2011; Mulas *et al.*, 2015; Rapčan *et al.*, 2017; Argaw *et al.*, 2017).

Tijekom poljskih pokusa (2009. i 2010.) utvrđene su statistički značajne razlike u broju kvržica po biljci ovisno o primijenjenim autohtonim sojeva za predstetvenu

bakterizaciju graška. Utvrđeno je da je većina autohtonih sojeva sposobna formirati signifikantno veći broj kvržica u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu.

Na lokaciji Vrapčići tijekom 2009. godine (tabela 5) signifikantno veći broj kvržica po biljci utvrđen je primjenom autohtonih soja V1 i V13 u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i na kontrolu. Tijekom 2009. godine na drugoj lokaciji Hodbina, primjenom autohtonog soja V5 utvrđeno je signifikatno veći broj kvržica u odnosu na referentni soj i kontrolu (tabela 5). Veća i bolja nodulacijska sposobnost autohtonih sojeva utvrđena je lokaciji Hodbine u odnosu na lokaciju Vrapčića. Rezultati nodulacije prilikom primjene autohtonih sojeva koji pokazuju veći broja kvržica na korijenu graška na lokaciji Hodbine u odnosu na lokaciju Vrapčića, povezan je sa utvrđenom manjom količinom dušika u tlu na lokaciji Hodbine u odnosu na lokaciju Vrapčići (tabela 2), jer količina dušika u tlu ima vrlo bitan utjecaj na sposobnost autohtonih sojeva na nodulaciju korjena graška (McKenzi *et al.*, 2001). Osjetljivosti autohtonih izolata na količinu i pristupačnost mineralnog dušika u tlu, prilikom primjene bakterizacije sa autohtonim sojevima na grašku utvrdili su i drugi istraživači, (Herdin *et al.*, 1989; McKenzie *et al.*, 2001; Argaw *et al.*, 2017), što je u skladu s provedenim istraživanjem.

Tabela 5. Broj kvržica po biljci, masa suhe tvari kvržica, sadržaj ukupnog dušika u biljci i zrnu i prinos zrna graška, poljski pokusi 2009.  
 Table 5. Nodule number per plant, nodule dry weight per plant, total nitrogen content in plants and seed, seed yield, field trials 2009

Lokacija/ Location	sojevi/strain R. <i>leguminosarum</i>	broj kvržica po biljci/ nodule number per plant	masa suhe tvari kvržica (g/biljci)/ nodule dry weight per plant	sadržaj ukupnog N u biljci (%) / total nitrogen content in plants	sadržaj ukupnog N u zrnu (%) total nitrogen content in seed	prinos zrna graška (t ha <sup>-1</sup> ) /seed yield
Vrapčići	no inoculation	9,48 c	0,023 b	1,95 e	2,37 c	1,36 e
	V1	68,09 a	0,108 a,b	3,97 a,b,c	4,13 a,b	4,63 a,b
	V5	47,72 a,b,c	0,085 a,b	3,15 c,d	4,16 a,b	2,04 c,d,e
	V6	28,92 a,b,c	0,078 a,b	3,53 a,b,c	3,96 a,b,c	2,07 c,d,e
	V7	54,99 a,b	0,035 b	3,31 b,c,d	3,96 a,b,c	1,78 d,e
	V10	31,80 a,b,c	0,053 b	3,26 b,c,d	3,52 a,b,c	2,87 c,d,e
	V13	66,28 a	0,168 a	4,56 a	4,64 a	5,22 a
	V14	55,48 a,b	0,063 b	2,84 c,d,e	3,19 a,b,c	3,08 c,d
	V18	34,29 a,b,c	0,068 b	3,41 b,c,d	3,58 a,b,c	2,66 c,d,e
	V19	49,40 a,b	0,100 a,b	3,61 a,b,c	3,73 a,b,c	3,49 b,c
	V20	50,82 a,b	0,068 b	4,32 a,b	4,55 a	2,46 c,d,e
	1001	18,83 b,c	0,028 b	2,36 d,e	2,76 b,c	1,73 d,e
LSD sojevi/ strains		P 1% = 34,70	P1% = 0,085	P1% = 1,02	P1% = 1,48	P1% = 1,36
Hodbina	no inoculation	11,03 c	0,033 e	2,05 d	2,94 b	1,62 b
	V1	68,52 a,b,c	0,128 b,c,d	4,60 a	4,94 a	4,88 a,b
	V5	104,95 a	0,178 b	4,07 a,b	4,28 a,b	5,64 a
	V6	25,63 c	0,080 d,e	2,66 c,d	2,93 b	2,89 a,b
	V7	47,33 a,b,c	0,045 e	3,46 a,b,c	3,93 a,b,c	3,34 a,b
	V10	54,57 a,b,c	0,043 e	2,90 b,c,d	3,18 b,c	2,93 a,b
	V13	89,66 a,b	0,263 a	3,21 b,c,d	4,07 a,b,c	5,44 a
	V14	28,29 c	0,063 d,e	3,57 a,b,c	3,98 a,b,c	2,91 a,b
	V18	93,54 a,b	0,165 b,c	3,87 a,b,c	4,14 a,b,c	4,65 a,b
	V19	43,05 b,c	0,090 c,d,e	3,43 a,b,c	3,56 b,c	2,55 a,b
	V20	61,29 a,b,c	0,083 d,e	3,43 a,b,c	3,84 a,b,c	2,48 a,b
	1001	27,83 c	0,025 e	2,79 b,c,d	3,18 b,c	1,94 b
LSD sojevi/ strains		P 1% = 54,17	P 1% = 0,071	P 1% = 1,19	P 1% = 1,11	P 1% = 2,85

Tijekom poljskih pokusa u 2010. godini na lokacijama Bijelog polja i Hodbine (tabela 6) utvrđen je veći broj kvržica primjenom autohtonih sojeva V1 i V5 u odnosu na referetni soj i kontrolu. Međutim, osim ovih autohtonih sojeva na lokaciji Bijelog polja, signifikatno veći broj kvržica utvrđen je primjenom autohtonog soja V14, a na

lokaciji Hodbine veći broj kvržica utvrđen je primjenom autohtonog soj V13 u odnosu na referetni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu (tabela 6).

Tabela 6. Broj kvržica po biljci, masa suhe tvari kvržica, sadržaj ukupnog dušika u biljci i zrnu i prinos zrna graška, poljski pokusi 2010.  
Table 6. Nodule number per plant, nodule dry weight per plant, total nitrogen content in plants and seed, seed yield, field trials 2010

Lokacija/ Location	sojevi/strain <i>R.</i> <i>leguminosarum</i>	broj kvržica po biljci/ <i>nodule</i> <i>number per</i> <i>plant</i>	masa suhe tvari kvržica (g/biljci)/ <i>nod</i> <i>ule dry</i> <i>weight per</i> <i>plant</i>	sadržaj ukupnog N u biljci (%)/ <i>total</i> <i>nitrogen</i> <i>content in</i> <i>plants</i>	sadržaj ukupnog N u zrnu (%)/ <i>total</i> <i>nitrogen</i> <i>content in</i> <i>seed</i>	prinos zrna graška (t/ha) /seed yield
Bijelo polje	no inoculation	13,47 d	0,060 b,c,d	2,30 d	2,44 e	0,89 g
	V1	73,47 a	0,120 a,b	4,13 a	4,59 a	6,04 a
	V5	68,91 a	0,123 a	2,48 d	3,34 b,c,d,e	4,93 a,b
	V6	22,71 c,d	0,058 c,d	2,63 c,d	2,98 d,e	2,98 d,e
	V7	31,53 b,c,d	0,048 d	2,30 d	2,81 d,e	2,66 e,f
	V10	28,95 b,c,d	0,033 d	2,67 b,c,d	3,01 d,e	3,59 c,d,e,f
	V13	63,43 a,b	0,120 a,b	3,60 a,b	3,97 a,b,c	3,85 b,c,d,e
	V14	71,83 a	0,145 a	3,52 a,b,c	4,07 a,b	5,90 a
	V18	30,51 b,c,d	0,050 d	2,33 d	3,52 b,c,d	2,41 f
	V19	57,75 a,b,c	0,113 a,b,c	2,92 b,c,d	3,93 a,b,c	4,04 b,c,d
	V20	53,77 a,b,c	0,093 a,b,c,d	4,16 a	4,24 a,b	4,57 b,c
	1001	30,86 b,c,d	0,045 d	2,39 d	3,11 c,d,e	2,49 f
LSD sojevi/ strains		P 1% =32,36	P 1% = 0,55	P 1% = 1,19	P 1% = 0,85	P 1% = 1,13
Hodbina	no inoculation	5,78 b	0,020 b	2,73 c,d,e	2,82 a,b	1,14 d
	V1	104,20 a	0,083 a,b	3,91 a	4,25 a	4,51 a
	V5	86,14 a	0,078 a,b	3,37 a,b,c,d	4,05 a,b	4,02 a,b
	V6	20,74 b	0,038 a,b	3,03 a,b,c,d	3,10 a,b	1,79 d
	V7	20,49 b	0,038 a,b	2,33 e	2,92 a,b	2,06 c,d
	V10	24,90 b	0,045 a,b	2,88 b,c,d,e	3,09 a,b	1,79 d
	V13	102,36 a	0,108 a	3,78 a,b	4,10 a,b	4,58 a
	V14	61,94 a,b	0,088 a,b	3,62 a,b,c	4,03 a,b	3,11 b,c
	V18	21,03 b	0,063 a,b	2,39 d,e	2,97 a,b	1,65 d
	V19	18,43 b	0,048 a,b	2,41 d,e	3,4 a,b	1,44 d
	V20	22,10 b	0,040 a,b	2,72 c,d,e	3,62 a,b	2,10 c,d
	1001	13,99 b	0,015 b	2,08 e	2,57 b	1,65 d
LSD sojevi/ strains		P 1% = 56,13	P 1% = 0,68	P 1% = 0,91	P 1% = 1,34	P 1% = 1,18

Signifikatne razlike u većem broju kvržica na korijenu graška koje su utvrđene tijekom 2010. godine između lokacija i izdvajanja pojedinih autohtonih sojeva mogu

biti pod utjecajem različitih rokova sjetve u 2010. godini. Zbog različitih rokova sjetve u 2010. godini po lokacijama, klimatske prilike su utjecale i na brzinu nicanja usjeva graška (Bidlack *et al.*, 2001), formiranja korjena što utječe i na nodulaciju korjena grašakakako navode Hwang *et al.* (2000); Jurišić *et al.* (2002); Rapčan *et al.* (2004). Prema istraživanju Debruck (2000) na masu i prinos graška utječu različiti rokovi sjetve, te su utvrđeni optimalni rokovi sjetve za grašak od sredine ožujka do početka travnja u toplijim staništima, dok je u hladnijim staništima optimalni rok sjetve do sredine travnja još prihvatljiv. U istraživanju je zaključeno da upravo različiti rokovi sjetve graška, utječu na brzinu nicanja i formiranja korijena. Zbog različitih rokova sjetve koja su se dogodila tijekom 2010. godine u odnosu na 2009. godinu i usporedbom rezultata u broju kvržica, utvrđene su različite nodulacijske sposobnosti od strane istraživanih autohtonih sojeva. Također, u interpretaciju dobivenih podataka uključene su klimatske promjene (tabela 2.) koje su se događale za vrijeme pokusa, a one su ukazale na manju količinu oborina u zadnjoj dekadi ožujka 2010. godine, u fenofazi klijanja graška, što je rezultiralo sporijim formiranjem korijena, a samim tim i na formiranje manjeg broja kvržica na korijenu graška (V6,V7,V10,V18, V20) i referentnog soja *R. leguminosarum* 1001 u odnosu na 2009. godinu (tablica 4). Klimatske promjene po sezonama (2009. i 2010.) koje su se događale u ključnim fazama rasta graška također su utvrdili i drugi autori u svojim istraživanjima na polju (Yoshioka *et al.*, 1990; Peoples *et al.*, 2001; Bidlack *et al.*, 2001; Argaw *et al.*, 2017), te su utvrdili osjetljivost biljke na količinu oborina u pojedinim fenofazama razvoja, a samim tim i na formiranje kvržica na korijenu, te kasnije njihov utjecaj na prinos graška.

Rezultati nodulacije dobiveni nakon primjene autohtonih sojeva na grašku u agroekološkom području Hercegovine u skladu su sa sličnim istraživanja (Toro *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 2004; Argaw *et al.*, 2017) koja potvrđuju pozitivan efekat na mjerena svojstva pračena u poljskim pokusima. Tijekom poljskih pokusa (2009-2010), na kontrolnoj varijanti utvrđen je određeni broj kvržica, što potvrđuje postojanje prirodne populacija na pokusnim poljima u tlu. Međutim, njihova sposobnost nodulacije i utjecaj na svojstva graška mjerena kroz poljske pokuse, nisu statistički značajna, u odnosu na sve istraživane autohtone sojeve (tabela 5 i 6). Prisutnosti prirodne populacije rizobija u tlu u kontrolnoj varijanti na pokusnim poljima i njihova slaba nodulacijska sposobnost, rezultat je istraživanja i brojnih drugih autora (Komesarović *et al.*, 2007; Sikora *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Argaw *et al.*, 2017).

Masa suhe tvari kvržica je parametar koji nam govori o infektivnosti soja, o njegovoj sposobnosti da izazove tvorbu nodula na korijenu graška. U 2009. godini, na lokacijama Vrapčići i Hodbina utvrđena je signifikatno veća masa suhe tvari kvržica primjenom autohtonog soja V13 u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu. Tijekom 2010. godini, na lokaciji Hodbine primjenom autohtonog soja V13 utvrđene su signifikatne razlike u masi suhe tvari kvržica u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu. Međutim na lokaciji Bijelo polje (2010. godine) značajno veća masa suhe tvari kvržica utvrđena je primjenom autohtonih sojeva V5 i

V14 u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu. Značajno povećanje mase suhe tvari kvržica graška uz primjenu inokulacije sa autohtonim sojevima kvržičnih bakterija i signifikatnim razlikama u masi kvržica u odnosu na kontrolu, utvrdili su također i drugi istraživači (Rice *et al.*, 2000; Argaw *et al.*, 2017).

U cilju procjene simbiozne učinkovitosti primijenjenih autohtonih sojeva izoliranih na području Hercegovine određen je i sadržaj ukupnog dušika u nadzemnom dijelu biljke i zrnu graška, kao i prinos graška.

Tijekom 2009. godini na lokacijama Vrapčići i Hodbina utvrđeni su različiti učinci autohtonih sojeva na sadržaj ukupnog dušika u biljci i zrnu ovisno o pojedinim lokacijama. Primjenom autohtonog soja V1 na lokaciji Hodbine utvrđene su signifikatne razlike u sadržaju ukupnog dušika u biljci i zrnu u odnosu na referentni soj i kontrolu. Na lokaciji Vrapčići signifikatne razlike u sadržaju dušika u biljci i zrnu utvrđene su primijenom autohtonog soja V13 u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu (tabela 5). Razlike koje su utvrđene u količini ukupnog dušika u biljci i zrnu u skladu su istraživanjima drugih istraživača kod primjene autotohnih sojeva na grašku (Rice *et al.*, 2004; Cong *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011; Argaw *et al.*, 2017) a zaključuju da je to i osobina samog soja. Također tijekom poljskih pokusa utvrđene su i signifikatne razlike u sadržaju dušika u biljci po sezonama, između autohtonih sojeva u odnosu na kontrolu. U poljskim pokusima tijekom 2010. godine na lokacijama Bijelo polje i Hodbina, utvrđene su statistički signifikatne razlika u sadržaju ukupnog dušika u biljci i zrnu primjenom autohtonog soja V1 u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001 i kontrolu (tabela 6). Razlike koje su utvrđene po sezonama 2009. i 2010. mogle bi se povezati sa slabim i neravnomjernim oborinama (tabela 4) koje izravno utječu na proizvodnju biomase (Ronner *et al.*, 2016), a sličan rezultat smanjenja akumulacije dušika su utvrdili kroz poljske pokuse i primjenu bakterizacije brojni istraživači (Serraj *et al.*, 1999; Peoples *et al.*, 2001; Rapčan *et al.*, 2017; Argaw *et al.*, 2017). Povezanost vodenog stresa u kasnim fazama cvjetanja graška snažnije utječe na fiksaciju dušika u biljci odnosu na ostale stadije rasta, jer je grašak puno toleratniji na sušu od boba i leće kada se radi o fiksaciji dušika (Toro *et al.*, 1998).

U cilju procjene simbiozne učinkovitosti istraživanih autohtonih sojeva određen je i prinos graška, koji je kao parametar bitan u komercijalnoj proizvodnji graška za prehranu ljudi. Tijekom poljskih pokusa 2009. i 2010. utvrđeno je povećanja prinosi graška primjenom predstjetvene bakterizacije graška sa istraživanim autohtonim sojevima u odnosu na kontrolu i referentni soj 1001 *R. leguminosarum*. U prvoj godini istraživanja 2009., na lokalitetu Vrapčići, bakterizacijom graška sa autohtonim sojem V13 utvrđen je signifikantno veći prinos (5,22 t ha<sup>-1</sup>) graška u odnosu na kontrolu (1,36 t ha<sup>-1</sup>) i referentni soj *R. leguminosarum* 1001 (1,73 t ha<sup>-1</sup>). Također i na lokaciji Hodbina tijekom 2009. utvrđen signifikantno veći prinos graška primjenom autohtonih soja V5 (5,64 t ha<sup>-1</sup>) i V13 (5,44 t ha<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu (1,62 t ha<sup>-1</sup>) i referentni soj *R. leguminosarum* 1001 (1,894 t ha<sup>-1</sup>).



U drugoj godini istraživanja 2010. signifikantno veći prinos graška utvrđen je na lokaciji Bijelo polje primjenom soja V1 (6,04 t ha<sup>-1</sup>) i V14 (5,90 t ha<sup>-1</sup>) u odnosu na referentni soj i kontrolu. Na lokalitetu Hodbine 2010. signifikantno veći prinos graška utvrđen je primjenom soj V1 (4,51 t ha<sup>-1</sup>) i V13 (4,58 t ha<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolu i referentni soj. Rezultati visokog prinosa graška koji su dobiveni kroz provedene poljske pokuse primjenom autohtonih sojeva na korijenu graška, pokazali su pozitivan efekt na mjerena svojstva, što je u skladu sa istraživanjima primjene bakterizacije u poljskim pokusima drugih autora (Khurana i Dudej, 1997; Ali *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Yadav i Verma, 2014; Mulas *et al.*, 2015; Rapčan *et al.*, 2017; Argaw *et al.*, 2017).

Signifikantno niži prinos graška (P=1%) utvrđen je u kontrolnoj varijanti u odnosu na sve istraživane autohtone sojeve tijekom poljskih pokusa. Također, treba naglasiti, da analizom svih parametara koji su dobiveni putem poljskih pokusa tijekom 2009. i 2010. godine, referentni soj *R. leguminosarum* 1001 ima ograničen genetski potencijal u odnosu na autohtone sojeve izolirane sa agroekološkog područja Hercegovine.

Rezultati istraživanja dobiveni temeljem promatranja povezanosti broja i mase kvržica na prinos graška, kao i sadržaj ukupnog dušika u biljci i zrnu je u skladu sa istraživanjima drugih autora (Ali *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011) koji su primjenjivali predstjetvenu bakterizaciju graška (*Pisum sativum* L.), sa izolatima soja *R. leguminosarum* na području Bangladeša i Kine.

## ZAKLJUČCI

Postavljanjem poljskog pokusa utvrđeno je da svi istraživani autohtoni sojevi u predjetvenoj bakterizaciji graška pokazuju pozitivan efekt na nodulaciju i prinos zrna graška sorte Mali provansalac. Istraživani autohtoni sojevi sposobniji su formirati veći broj kvržica i povećati prinos graška u odnosu na referentni soj *R. leguminosarum* 1001. Međutim, rokovi sjetve graška, slabe i neravnomjerne oborine u ključnim fenofazama rasta graška mogu utjecati na brzinu nicanja usjeva, formiranje korijena, na uspješnost nodulacije graška, pa tako i na prinos i akumulaciju dušika.

U cilju postizanja većih prinosa graška za komercijalnu proizvodnju i prehranu ljudi potrebno je nastaviti sa eksperimentalnim pokusima i potvrditi najbolje autohtone sojeve, kroz određene klimatske režime (temperature i oborine), rokove sjetve i tipove tla na različitim lokalitetima Hercegovine.

## LITERATURA

- Abdel-Aziz, R. A., Al-Barakah, F. N. Al-Asmary, H. M. (2008): Genetic identification and symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti* indigenous to Saudi Arabian soils. African Journal of Biotechnology Vol.7 (16), pp.2803-2809. ISSN 1684-5315. Academic Journals.
- Adiguzel, A., Ogutcu, H., Baris, O., Karadayi, M., Gulluce, M., Sahin, F. (2010): Isolation and Characterization of *Rhizobium* strains from wild vetch collected

- from high altitudes in Erzurum- Turkey. Romanian Biotechnological letters. Vol.15, No1. pp.5017-5024.
- Ali, M. E., Khanam, D. Bhuiyan, M. A. H., Khatun, M. R. Talukder, M. R. (2008): Effect of rhizobium inoculation to different varieties of gardenpea (*Pisum sativum* L.). J.Soil. Nature.28(1): pp.30-33.
- Argaw, A., Mnalku, A. (2017): Symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from major highland pulses on field pea (*Pisum sativum* L.) insoil with abundant rhizobial population. Annals of Agrarian Science (15) 410-419
- Batista, J. S. S., Hungria, M., Barcellos, F. G., Ferreira, M. C., Mendes, I. C. (2007): Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil, Microb. Ecol. (53) 270-284.
- Bidlack, J. E., Rao, S. C., Demezas, D. H., (2001): Nodulation, nitrogenase activity, and dryweight of chickpea and pigeon pea cultivars using different Bradyrhizobium strains, J. Plant Nutr. 24 (3) 549-560.
- Blažinkov, M., Sikora, S., Uher, D., Maćešić, D., Redžepović, S. (2007): Genotypic characterisation of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* field population in Croatia. Agriculturae Conspectus Scientificus, Vol 72:pp.153–158.
- Bradić, M., Sikora, S., Redžepović, S., Štafa, Z. (2003): Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous *Sinorhizobium meliloti* field population. Food technology and Biotechnology 41,(1):pp.69-75.
- Cong, P. T., Dung, T. D., Hien, T. M., Hien, N. T., Choudhury, A.T.M.A., Kecskes, M. L., Kennedy, I. R. (2009): Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilisation of urea-N and grain yield of paddy rice in Southern Vietnam, Eur. J. Soil Biol. (45) 52-61.
- De Bruijn, F. J. (1992): Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Cosensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates other soil bacteria. Appl Environ Microbiol 58:2180-2187
- Dedruck, J. (2000): Grašak ne podnosi suviše vlažno tlo, prijevod prof. Hodak, B., Gospodarski list 5., Zagreb, 55
- Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., Zaïd, E. Udupra, M. S. (2009): Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sultae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. African Journal of Biotechnology Vol.8(6), pp. 979-985.
- Germano, M. G., Menna, P., Mostasso, F. L., Hungria, M. (2006): RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobial* strains from 33 legume species. Int J Syst Evol Microbiol 56, pp.217-229.

- He, Y., Guo, L. Zhang H., Huang, G. (2011): Symbiotic effectiveness of pea-rhizobia associations and the implications for farming systems in the western Loess Plateau, China. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(18), pp.3540-3548.
- Herdin, A., Silsbury, J. H. (1989): Nodulation and early growth of faba bean (*Vicia faba* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) as affected by strain of Rhizobium, NO<sub>3</sub> supply, and growth temperature, *Aust. J. Agr. Res.* (40) 991-1001.
- Hungria, M., Andrade, de S. D., Chueire, de O. L. M. Probanza, A., Gutierrez – Manero J. F., Megias, M. (2000): Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: pp.1515-1528
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Chang, K. F., Howard, R. J., Tomas, A. G. (2000): Seeding date, temperature, and seed treatment affect pythium seedling blight of field pea, *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie* 22(4): 392-399
- Jarak, M., Čolo, J. Novković, M. (2007): Efekti inokulacije u proizvodnji graška. *Radovi poljoprivrednog-prehrambenog fakulteta u Sarajevu* God. LII, broj 58/2. pp.43-50
- Jurišić, M. (2002): Serijal-Uzgoj graška I-III, *Agroglas, Osijek*
- Khurana, A. L., Dudeja, S. S. (1997): Biological Nitrogen Fixation Technology for Pulses Production in India, *Indian Institute of Pulses Research, Kanpur, India*,
- Kiers, E. T., Hutton, M. G. Denison, R. F. (2007): Human selection and the relaxation of legume defenses against ineffective rhizobia. *P. Roy. Soc.* 274: pp.3119-3126.
- Komesarović, B., Redžepović, S., Blažinkov, M., Sudarić, A., Uher, D., Sikora S. (2007): Simbiotna učinkovitost selekcioniranih autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum*. *Mljekarstvo* 57, (4): pp.289–302.
- Mahdhi, M., Nzoue, A., de Lajudi, P., Mars, M. (2008): Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Progress in Natural Science* 18: pp.43-49.
- Marohnić, I. (2006): Grašak – buduće glavno bjelančevinasto krmivo Europe. *Krmiva* 48 (6), 363–368.
- McKenzie, R. H., Middleton, A. B., Solberg, E. D., DeMulder, J. Flore, N. Clayton, G. W. Bremer, E. (2001): Response of pea to rhizobia inoculation and starter nitrogen in Alberta, *Can. J. Plant Sci.* (81) 637-643
- Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M. Pepe., Defez, R. (2005): Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Syst Appl Microbiol* 28: pp.619-631
- Mothapo, N. V., Grossman, J. M., Maul, J. E., Shi, W., Isleib, T. (2013): Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. *Applied Soil Ecology* 64: 201-213.

- Mulas, D., García-Fraile, P. Carro, L., Ramírez-Bahena, M. H., Casquero, P., Valázquez, E., González-Andrés, F. (2011): Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 43.2283-2293.
- Mulas, D., Seco, V., Casquero, P. A., Velazquez, E., Gonzalez-Andres, F. (2015): Inoculation with indigenous Rhizobium strains increases yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in northern Spain, although its efficiency is affected by the tillage system, *Symbiosis* 67; 113-124.
- Peoples, M. B., Bowman, A. M. Gault, R. R. Herridge, D. F. McCallum, M. H. McCormick, K. M. Norton, R. M. Rochester I. J., Scammell, G. J., Schwenke, G. D. (2001): Factors regulating the contributions of fixed nitrogen by pasture and crop legumes to different farming systems of Eastern Australia, *Plant Soil* (228) 29-41.
- Rapčan, I., Jurišić, M., Grljušić, S., (2004): Reakcija graška (*Pisum sativum* spp. *Arvense* L.) na rok sjetve, sklop i gnojidbu dušikom na području Osijeka. *Agronomski glasnik*, 1-2, 33-45.
- Rapčan, I., Milaković, Z., Kanižaji Šarić, G., Šeput, J., Galić Subašić, D. (2017): Reaction of garden pea (*Pisum sativum* L.) to inoculation and nitrogen fertilization in Eastern Croatia. *Journal of Central European Agriculture*, 2017, 18(4), 889-901
- Redžepović, S., Čolo, J., Blažinkov, M., Poljak, M., Pecina, M., Sikora, S., Šeput, M. (2006): Effect of inoculation and growth regulator on soyabean yield and photosynthetic pigment content. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 71, (3): 75-80
- Redžepović, S., Sikora, S., Čolo, J., Blažinkov, M., Pecina, M. (2007): Influence of plant growth regulator and *rhizobial* inoculation on nodulation and soyabean nitrogen content. *Cereal Research Communication* 35,(2): 993-996.
- Riah, N., Bena, G., Djekoun, A., Heulin, K., de Lajudie, P., Laguerre, G. (2014): Genotypic and symbiotic diversity of Rhizobium populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria, *Syst. Appl. Microbiol.* 37. 368 - 375
- Rice, W. A., Clayton, G. W., Olsen, P. E., Lupwayi, N. Z. (2000): Rhizobial inoculant formulations and soil pH influence field pea nodulation and nitrogen fixation, *Can. J. Soil Sci.* (80) 395-400.
- Rice, W. A., Lupwayi, N. Z., Johnston, A. M., Lafond, G. P., Grant, C. A., Walley, F. (2004): Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: nodulation, N<sub>2</sub> fixation and nitrogen partitioning, *Can. J. Plant Sci.* (84) 79-88
- Ronner, E., Franke, A. C., Vanlauwe, B., Dianda, M., Edeh, E., Ukem, B., Bala, A. vanHeerwaarden, J., Giller, K. E. (2016): Understanding variability in

- soybean yield and response to P-fertilizer and rhizobium inoculants on farmers' fields in Northern Nigeria, *Field Crops Res.* (186) 133-145.
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Fernandez-Pascua, M. (2012): Selection of rhizobia from agronomic legumes grown in semiarid soils to be employed as bioinoculants, *Agron. J.* 104 550-559.
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., de Felipe, M. R., Fernandez-Pascual, M. (2012): Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties, *J. Basic Microbiol.* 52. 66-78.
- Santos, M. A., Vargas, M. A. T., Hungria, M. (1999): Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas, *FEMS Microbiol. Ecol.* 30 261-272.
- Serraj, R., Sinclair, T. R., Purcel, L. C. (1999): Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought, *J. Exp. Bot.* (50) 143-155
- Sikora, S., Redžepović S. (2003): Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. *Food Technology and Biotechnology* 41,(1): 61-67.
- Sikora, S., Blažinkov, M., Babić, K., Sudarić, A., Redžepović, S. (2008): Symbiotic nitrogen fixation and sustainable soybean production. *Cereal Research Communication Vol 36*, 1-4.
- Sikora, S., Redžepović, S., Bradić, M. (2000): Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates by RAPD and rep-PCR. *Microbiological Research* 157. Vol.(3):157-160.
- Sikora, S., Redžepović, S., Bradić, M. (2002): Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. *Microbiological Research* 157, 3, 213-219.
- Sikora, S., Redžepović, S., Pejić, I., Kozumplik, V. (1997): Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting *Journal of Applied.* Vol.82:527-531
- Soon, Y. K., Clayton, G. W. & Rice, W. A. (2001): Tillage and previous crop effects on dynamics of nitrogen in a wheat-soil system, *Agronomy Journal* 93 (4): 842-849.
- Sudarić, A., Vratarić, M., Duvnjak, T. (2008): Povezanost učinka bakterizacije i rodnosti genotipova soje. Zbornik radova 43. hrvatskog i 3. međunarodnog simpozija agronoma/Pospišil, Milan (ur.): Agronomski fakultet Zagreb. 295-298.
- Sudarić, A., Vratarić, M., Matoša, M., Duvnjak, T., Redžepović, S., Sikora, S. (2010): Učinak biološke fiksacije dušika na urod i kakvoću zrna različitih genotipova soje. Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma/Marić S.; Lončarić Z. (ur.): Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 514-518

- Toro, M., Azcon, R., Barea, J. M. (1998): The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of Rhizobium genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*, *New phytol.* (138) 265-273.
- Vincent, J. M. (1970): A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook No.15, London.
- Yadav, J. Verma, J. P. (2014): Effect of seed inoculation with indigenous Rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Eur. J. Soil Biol.* 63; 70-77.
- Yoshioka, K., Maruyama, Y. (1990): Characterization and symbiotic nitrogen fixation of Rhizobium that modulates Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*, L.), *Soil Sci. Plant Nutr.* 36 (1) 83-90.

## **GENETIC IDENTIFICATION AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF INDIGENOUS *Rhizobium leguminosarum* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT SOIL TYPES OF HERZEGOVINA**

### **Summary**

The application of highly efficient rhizobia is of great importance for successful inoculation and thereby the yield and quality of pea crops (*Pisum sativum* L.). Since rhizobial strains considerably differ in their symbiotic efficiency, competitiveness and compatibility with host plant, selection of appropriate strain has a key role in enhancing inoculant quality. The main aim of the present study was to determine the presence of indigenous rhizobia that nodulate peas in the soils of western Herzegovina and to estimate their nodulation ability and symbiotic efficiency. RAPD and ERIC-PCR methods were used for strain identification and evaluation of genetic diversity among indigenous rhizobia. In order to determine the nodulation ability and symbiotic efficiency of indigenous *R. leguminosarum* strains, two-year field trials were set up at different locations near Mostar. At various locations in western Herzegovina, the presence of indigenous *R. leguminosarum* strains was determined as well as the considerable level of genetic diversity within natural populations. In comparison with reference strain and uninoculated control, most of indigenous rhizobial strains showed significantly higher nodulation ability and symbiotic efficiency. The application of two indigenous strains (V1 and V13) isolated from soils in the area of Vihovići (Mostar) and Osoj (Posušje), resulted in the most abundant nodulation and the highest symbiotic efficiency. These results clearly confirm the importance of rhizobial strain selection in order to obtain the beneficial effects of pea inoculation.

**Key words:** *biological fixation, Rhizobium leguminosarum, genetic diversity, Pisum sativum, field experiment*

## EFFECTS OF ROAD SALINIZATION ON TOTAL NUMBER OF ACTINOMYCETES AND STREPTOMYCETES IN SARAJEVO FIELD

Belma Raščić<sup>1</sup>, Anesa Jerković-Mujkić<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Summary

Salinization is a harmful accumulation of salt in the soil and on its surface in an amount that is detrimental to the development and biodiversity of microorganisms. In this paper, the effect of road salinization during the winter on the total number of actinomycetes and streptomycetes in 1 g of soil was investigated. For the purposes of research, soil samples were collected in the Sarajevo field, at a distance of 1 m, 2 m and 3 m from the road and at a depth of 15 cm. The land is sampled at sites: Betanija, Pofalići, Socijalno, Otoka, and Dobrinja. Samples were collected on two occasions: in November 2017, before the road salinization and in February 2018, after the salinization. For each soil sample, a decimal dilution series was made. Recorded number of bacteria in the soil (CFU/g) was highly reduced after the road salinization compared to the number of CFU/g in the season before salinization. Unlike soil samples collected at a distance of 1 m, 2 m and 3 m from the road, the impact of salinization was not noticed on the control site at the distance of 20 m from the road.

Key words: *salinization, actinomycetes, streptomycetes, soil microbiology*

### INTRODUCTION

The soil contains a large number of microorganisms that make highly functional microbiocenoses adapted to the soil conditions and together with the flora and fauna give the soil the properties of a living organism (Jarak *et al.*, 2005). The main role of microorganisms in soil is the transformation of organic matter and the creation of humus, i.e. humification, then the mineralization of humus - dehumification, which leads to the creation of plant assimilates (Milaković, 2013). Microorganisms on the fertility of the soil affect directly the processes of extinction and mineralization of microorganisms, leaving the plant nutrients in the soil. The indirect activity involves the participation of microorganisms in the mineralization of plant and animal remains in the soil and the decomposition of heavily degradable minerals (Barea *et al.*, 2005). Soil microbiota has a strong influence on the pollutants that enter the land via car exhaust gases. Microorganisms can be pollutant destructors, but it is more common that pollutants destroy microbial succession, suppress the development of some microorganisms, and accelerate the development of some other microbial species that

---

<sup>1</sup> Department of biology, Faculty of science, University of Sarajevo  
Correspondence: [rascic.belma@gmail.com](mailto:rascic.belma@gmail.com)

would otherwise not develop, ultimately leading to a change of land ecosystem (Donkova & Kaloyanova, 2008). Besides the occurrence of exhaust gases, the traffic affects indirectly on soil microbiota. During the winter period, to improve road safety, deicing road salt was used. Natural salinization takes place during irrigation and saponification, while artificial salinization involves the direct intake of NaCl, CaCl<sub>2</sub>, and MgCl<sub>2</sub> into the soil during the roads salinization in the winter period. Despite all the positive effects that salinity has on traffic safety during the winter period, there are many negative effects, particularly those associated with increasing levels of chlorine and sodium in the environment. Salt transfer and its effects on land depend on various factors such as road type, soil type and texture, vegetation coverage. The most affected zone of land with the activity of salt is 5-10 m from the road. Salt effects are serious: the increase of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions affects the soil pH, its structure, permeability, osmotic potential, and air conditions. This leads to loss of soil stability, fertility and osmotic stress for vegetation, and pedofauna and soil microbiota (Hofman *et al.*, 2012).

Since the effects of road salting on the soil is poorly explored, the main objective of this study is to investigate the effects of road salting on the microbiota of the surrounding soil.

## MATERIAL AND METHODS

For the purposes of research, soil samples were collected at a distance of 1 m, 2 m and 3 m from the road, and at a depth of 15 cm. The land is sampled from the following sites in Canton Sarajevo: Betanija, Pofalići, Socijalno, Otoka, and Dobrinja. As a control, sampled land is 20 m away from the road. Samples were collected on two occasions: in November 2017, before the road salinization and in February 2018, after the salinization. For each soil sample, a decimal dilution series was made, and the total number of actinomycetes and streptomycetes was determined at soil dilution of 1:10.000 and 1:100.000. Isolation of actinomycetes and streptomycetes was performed by culturing on selective media: Streptomyces agar and Glycerol yeast extract agar. Pour plate method was the method of choice for counting the number of colony-forming bacteria present in soil samples. Precisely 1 ml of inoculum from a soil dilution of 1:10.000 was added by pipette to the center of a Petri dish. 15 ml of cooled, but still molten, agar medium was then poured and the dish is rotated gently to ensure that the culture and medium are thoroughly mixed and the medium covers the plate evenly. The procedure was repeated for the same soil sample in dilution of 1:100.000. After the solidification of the agar, the plate is inverted and incubated at room temperature for three days, with a daily observation of microorganism growth. The procedure was repeated with soil samples collected after the road salinization. After the incubation period, the quantitative determination of streptomycetes and actinomycetes in soil was performed by counting the number of colony-forming bacteria and multiplying that number with dilution factor. All experiments were performed in triplicate and the mean value was calculated. For determining the



statistical significance of differences in the number of colonies on the nutrient medium during the period before road salinization and after road salinization for each site, Student's t-test for dependent samples was used. The following statistical tests were used to test the effect of the distance from the road to the number of bacterial colonies: Kruskal-Wallis test, ANOVA, Median test, and Multiple comparisons of mean ranks for all groups as post hoc Kruskal-Wallis test.

## RESULTS

The effects of road salinization on the survival ability of streptomycetes and actinomycetes in the soil were investigated. By analyzing soil samples collected before the road salinization, in the soil 1 m away from the road total number of streptomycetes was recorded in the range of  $25 \times 10^5$  CFU/g (site Pofalići) to  $132 \times 10^5$  CFU/g (site Socijalno) (Table 1). In the soil 2 m away from the road total number of the streptomycetes ranged from  $27 \times 10^5$  CFU/g (site Betanija) to  $196 \times 10^5$  CFU/g (site Socijalno) and 3 m away from the road  $36 \times 10^5$  CFU/g (site Dobrinja) to  $158 \times 10^5$  CFU/g (site Socijalno).

After the road salinization total number of streptomycetes in 1 g of soil at a distance of 1 m from the road ranged from  $10 \times 10^5$  CFU/g (site Socijalno) to  $41 \times 10^5$  CFU/g (site Betanija), as shown in Table 1. At the distance of 2 m from the road, the total number of streptomycetes ranged from  $13 \times 10^5$  CFU/g (site Betanija) to  $41 \times 10^5$  CFU/g (site Dobrinja) and 3 m from the road of  $7 \times 10^5$  CFU/g (sites Pofalići and Socijalno) to  $44 \times 10^5$  CFU/g (site Dobrinja).

Table 1. Total number of streptomycetes in 1g of soil before and after salinization

Site	Before salinization (CFU/gx10 <sup>5</sup> )			After salinization (CFU/gx10 <sup>5</sup> )		
	1 m	2 m	3 m	1 m	2 m	3 m
Betanija	99 ± 3,0	27 ± 3,51	118 ± 1,52	41 ± 1,52	13 ± 1,73	29 ± 2,00
Pofalići	25 ± 4,50	39 ± 3,51	60 ± 0,57	15 ± 2,51	24 ± 1,52	7 ± 0,57
Socijalno	132 ± 2,00	196 ± 4,00	158 ± 0,57	10 ± 0,57	15 ± 1,15	8 ± 1,00
Otoka	103 ± 2,51	105 ± 3,05	157 ± 2,64	35 ± 3,60	29 ± 4,04	37 ± 2,51
Dobrinja	69 ± 2,08	126 ± 2,08	36 ± 1,15	29 ± 2,08	41 ± 2,00	44 ± 2,00
<b>Control</b>		<b>298 ± 2,25</b>			<b>286 ± 1,72</b>	

Before the salinization total number of actinomycetes in 1 g of soil (Table 2) was the smallest at the site Otoka at all examined distances from the road. At a distance of 1 m from the road total number of actinomycetes was  $103 \times 10^5$  CFU/g, 2 m from the road  $105 \times 10^5$  CFU/g and 3 m from the road  $156 \times 10^5$  CFU/g. The largest number of actinomycetes in 1 g was found in the soil sampled at Dobrinja:  $294 \times 10^5$  CFU (distance 1 m),  $274 \times 10^5$  CFU (distance 2 m) and  $251 \times 10^5$  CFU (distance 3 m). From Table 2 it can be seen that the total number of actinomycetes was reduced after the road salinization so that the smallest number of actinomycetes in 1 g of soil is  $12 \times$

$10^5$  CFU (site Pofalići, distance 3 m), while the largest number of actinomycetes in 1 g soil was  $75 \times 10^5$  CFU (site Betanija, distance 1 m).

Table 2. Total number of actinomycetes in 1g of soil before and after salinization

Site	Before salinization (CFU/gx $10^5$ )			After salinization (CFU/gx $10^5$ )		
	1 m	2 m	3 m	1 m	2 m	3 m
Betanija	288 ± 4,50	183 ± 2,00	167 ± 1,15	75 ± 2,00	36 ± 2,08	41 ± 2,64
Pofalići	261 ± 2,00	173 ± 1,52	203 ± 0,57	44 ± 1,52	25 ± 1,15	12 ± 1,00
Socijalno	163 ± 2,08	161 ± 2,51	220 ± 0,57	19 ± 1,73	29 ± 4,00	16 ± 1,15
Otoka	103 ± 2,51	105 ± 3,00	156 ± 1,73	61 ± 2,00	44 ± 2,51	45 ± 0,57
Dobrinja	294 ± 3,00	274 ± 2,64	251 ± 1,00	16 ± 3,00	44 ± 0,57	72 ± 2,64
<b>Control</b>	<b>178 ± 2,16</b>			<b>167 ± 2,56</b>		

The recorded viable bacterial count in soil was reduced after road salinization compared to the period before winter salinization in all tested sites. Statistically significant differences in the total number of streptomycetes between the samples collected before and after the road salinization was found at the site Socijalno ( $p=0.006$ ) and in the site Otoka ( $p=0.016$ ), while in the other tested sites were not found at a level of significance of 5% (Betanija  $p=0.068$ , Pofalići  $p=0.097$  and Dobrinja  $p=0.141$ ). For the total number of actinomycetes,  $p$  values showed statistical significance between soil samples collected before and after road salinization at all sites: (Betanija  $p=0.012$ , Otoka  $p=0.037$ , Socijalno  $p=0.009$ , Pofalići  $p=0.005$  and Dobrinja  $p=0.009$ ). Samples collected 20 m from the road in the season before and after the salinization did not show statistical significance for the tested differences in the number of streptomycetes ( $p=0.0588$ ) and actinomycetes ( $p=0,558$ ). Using a Kruskal-Wallis test, ANOVA and Median test, and Multiple comparisons of mean ranks for all groups as post hoc Kruskal-Wallis test, no statistically significant difference between samples with different distances from the road were found.

## DISCUSSION

Constant soil exposure to anthropogenic impacts such as pollution endangers its health and ecosystem functioning by reducing biodiversity (Mukherjee *et al.*, 2014). In addition to soil contamination with exhaust gases of cars, waste disposal, fertilization, plowing and similar activities, quality of soil and its microbiota changes also due to soil salinization. Different concentrations and types of ions in salt solution in the soil can cause changes in the dispersion of clay fractions, degrading the original fraction of the soil.

Salt can adversely affect plants and microbial growth due to the destruction of soil structure. Stress due to high salt concentration may be harmful to sensitive microorganisms and may increase the activity of surviving microbial cells due to the imposed metabolic load due to activation of stress tolerance mechanisms

(Maganhotto & Francisconi, 2012). Increased salinity reduces the rate of ground respiration and soil microbial biomass (Pathak & Rao, 1998). The reason for the reduced size and activity of microbial communities when increasing salinity is the osmotic stress caused by higher salt concentration in soil solutions (Galinski, 1995; Oren, 1999). The toxicity of specific ions (e.g.  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) as well as unfavorable pH conditions can also inhibit microbial growth (Zahran, 1997; Rietz & Haynes, 2003). Despite the crucial importance of microorganisms for maintaining soil quality and fertility, there are very few published studies on the impact of road salt on microbial soil, and these are mainly focused on laboratory research, which has prompted us to undertake research in realistic conditions. On all examined sites, we found a decrease in the total number of bacteria after the road salinization compared to the total number of bacteria in the season before salinization, as confirmed by the literature references (Černohlavkova *et al.*, 2008) which show that significant reduction of microbial biomass and respiratory activity in the soil close to the road at increased level  $\text{Na}^+$  (up to 100 mg/kg) and 150 mg/kg  $\text{Cl}^-$  and pH (up to 8). The salt that falls on the road can be infiltrated into the soil after melting snow or due to rainfall. Different transport mechanisms allow the spread of salt from the road. The flowing water takes salt to either the drainage systems or directly into the groundwater. Airborne transport can transport salt at different distances before it reaches the ground or vegetation. Also, the distance of salt transport is affected by factors such as road and traffic characteristics, type and amount of rainfall, wind conditions (Blomqvist, 1999). The characteristics of winter seasonal automobile tires, which allow the spread of snow, ice as well as salt for road salinization at different distances, are also an inconsiderable factor (Demere, 2012). This is in favor of the fact that in our research we have established a regular distribution of the number of streptomycetes and actinomycetes CFUs to the distance from the road to certain sites, which is the result of the characteristics of the sites themselves. Since soil is sampled at sites in different parts of the Sarajevo field, the characteristics of roads and traffic, as well as the amount of rainfall, differ. The clear effect of the salt is detected at a distance of 1 m from the road, as well as at 2 m and 3 m, as confirmed by the literary allegations (Lundmark & Olofsson, 2007) that the effect of road salinization is mostly limited to a distance of 10 m from the road. Since the road salt causes soil microbial stress, it is expected that the population of microorganisms that cannot adapt to new environmental conditions reduces their number or dies. The survival structure of the microbial community will become relatively simple, and its diversity is relatively low (Ke *et al.*, 2013). These salt effects have been proven in our research, where total number reduction both streptomycetes and actinomycetes occurred.

## CONCLUSIONS

Based on the researches of the effects of the road salinization on soil microbiota, the following conclusions can be drawn:

- After the road salinization, the total number of streptomycetes in all sites decreased in the range from 38.47% to 92.43%, except for the site Dobrinja at a distance of 3 m from the road, where the total number of streptomycetes increased.
- Total number of actinomycetes in 1 g of soil was reduced after the period of road salinization in all 15 samples tested, and this reduction ranged from 41.35% to 94.56%.
- Student t-test for dependent samples showed that there was a statistically significant difference at the level of significance of 5% ( $p < 0.05$ ) between the number of CFU actinomycetes before and after salinization at all tested sites.

## REFERENCES

- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azco, R., Azco'n-Aguilar, C. (2005): Microbial co-operation in the rhizosphere, *Journal of Experimental Botany*, 56 (417):1761–1778.
- Blomqvist, G. (1999): Air-borne transport of de-icing salt and damage to pine and spruce trees in a roadside environment. Licentiate thesis TRITA-AMI-LIC 2044, Division of Land and Water Resources, Department of Civil and Environmental Engineering, Royal Institute of Technology, Stockholm.
- Černohlavkova, J., Hofman, J., Bartoš, T., Sanka, M., Anđel, P. (2008): Effects of road deicing salts on soil microorganisms. *Plant, Soil and Environment* 54 (11): 479-485.
- Demere, M. (2012): Know Your Tires: All -Season vs Summer. *Popular mechanics*. Taken from: <http://www.popularmechanics.com/cars/how-to/a7760/know-your-tires-all-season-vs-summer-9647443/>
- Donkova, R. & Kaloyanova, N. (eds) (2008): The Impact of Soil Pollutants on Soil Microbial Activity. In: Simeonov, L. & Sargsyan, V. *Soil Chemical Pollution, Risk Assessment, Remediation and Security*. Springer Netherlands. pp 73-93
- Galinski, E. A. (1995): Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 37: 273-328
- Hofman, J., Travničková, E., Anđel, P. (2012): Road salts effects on soil chemical and microbial properties at grassland and forest site in protected natural areas. *Plant, Soil and Environment* 58 (6): 282-288
- Jarak, M., Milošević N., Milić, V., Mrkovački N., Đurić, S., Marinković J. (2005): Mikrobiološka aktivnost – pokazatelj plodnosti i degradacije zemljišta, *Ekonomika poljoprivrede*, 4.

- Ke, C., Li, Z., Liang, Y., Tao, W., Du, Ma. (2013): Impacts of chloride de-icing salt on bulk soils, fungi, and bacterial populations surrounding the plant rhizosphere. *Applied Soil Ecology* 72:69-78.
- Lundmark, A. & Olofsson, B. (2007): Chloride Deposition and Distribution in Soils Along a Deiced Highway – Assessment Using Different Methods of Measurement. *Water, Air, and Soil Pollution* 182 (1):173-185.
- Maganhotto, C. M. & Francisconi, F. E. (2012): Effect of Salinity on Soil Microorganisms. In: Hernandez Soriano, M. C. (Ed.). *Soil Health and Land Use Management*. InTech.
- Milaković, Z. (2013): Interna skripta opće mikrobiologije, Poljoprivredni fakultet, Osijek.
- Mukherjee, S., Jouttonen, H., Siivonen, P., Lloret Quesada, C., Tuomi, P., Pulkkinen, P., Yrjala, K. (2014): Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *The ISME Journal* 8:2131-2142.
- Oren, A. (1999): Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:334-48.
- Pathak, H. & Rao, D. L. N. (1998): Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30:695-702.
- Rietz, D. N. & Haynes, R. J. (2003): Effect of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35:845-854.
- Zahran, H. H. (1997): Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils* 25:211-223.

## **EFEKTI SOLJENJA PROMETNICA NA UKUPAN BROJ AKTINOMICETA I STREPTOMICETA U SARAJEVSKOM POLJU**

### **Rezime**

Salinizacija je štetno akumuliranje soli u zemljištu i na njegovoj površini u količini koja je štetna za razvoj i biodiverzitet mikroorganizama. U ovom radu ispitivano je djelovanje soli na ukupan broj aktinomiceta i streptomiceta u 1 g zemljišta. Za potrebe istraživanja, uzorci zemljišta su prikupljeni u sarajevskom poljuna udaljenosti 1 m, 2 m i 3 m od ceste, na dubini od 15 cm. Zemljište je uzorkovano na lokalitetima Betanija, Pofalići, Socijalno, Otoka i Dobrinja. Uzorci su prikupljeni u dva navrata: u novembru, prije posipanja prometnica solju i u februaru, nakon salinizacije. Za svaki uzorak zemljišta napravljena su decimalna razblaženja.

Zabilježeni broj bakterija u tlu (CFU/g) nakon salinizacije bio je značajno reduciran u poređenju sa brojem CFU/g u sezoni prije salinizacije. Za razliku od uzoraka zemljišta prikupljenih sa udaljenosti 1 m, 2 m i 3 m od prometnice, utjecaj salinizacije nije primjećen na kontrolnom mjestu udaljenom 20 m od prometnice.

Ključne riječi: *salinizacija, aktinomicete, streptomicete, mikrobiologija zemljišta*

## PRVI NALAZ CRVENE PALMINE PIPE *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) U BOSNI I HERCEGOVINI

Ivan Ostojić<sup>1</sup>, Mladen Zovko<sup>1</sup>, Aida Kohnić<sup>2</sup>, Danijela Petrović<sup>1</sup>, Dragan Jurković<sup>1</sup>,  
Luka Bošnjak<sup>3</sup>

Originalni naučni rad – *Original scientific paper*

### Rezime

Crvena palmina pipa *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790 (Coleoptera: Curculionidae) je jedan od najvažnijih štetnika palmi. Podrijetlom je iz Azije gdje je široko rasprostranjena. Na području EPPO regije pojavila se 1992. godine u Egiptu, a u nama susjednoj Hrvatskoj 2011. godine. Na području Bosne i Hercegovine prisutna je od 2019. godine kada je prvi put utvrđena na području Čapljine i Neuma na palmi vrste *Phoenix canariensis*. Kako bi se utvrdila prisutnosti i proširenosti crvene palmine pipe, tijekom zime i proljeća 2019. godine provedeno je istraživanje na području Hercegovačko-neretvanske i Zapadnohercegovačke županije. Istraživanje je provedeno na 73 lokaliteta na kojima su vizualno pregledavane palme iz rodova *Phoenix*, *Washingtonia* i *Trachycarpus*, na prisutnost simptoma koji upućuju na zaraženost crvenom palminom pipom. Vizualnim pregledom palmi na području Čapljine simptomi oštećenja od palmine pipe (suhi listovi koji vise) bili su prisutni na četiri palme iz roda *Phoenix*. Pregledom palmi iz rodova *Phoenix* i *Trachycarpus* na području Neuma uočeni su simptomi na tri palme iz roda *Phoenix* koji upućuju na zaraženost crvenom palminom pipom. Simptomi oštećenja od palmine pipe nisu uočeni na vizualno pregledanim palmama u Zapadnohercegovačkoj županiji.

Ključne riječi: *crvena palmina pipa, Rhynchophorus ferrugineus, palme, prvi nalaz, Bosna i Hercegovina*

### UVOD

Crvena palmina pipa (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790) je jedan od najznačajnijih štetnika palmi. Potencijalni domaćini ovog štetnika su većina palmi (*Arecaceae*) koje rastu na našem području (*Phoenix canariensis*, *Trachycarpus fortunei* i *Washingtonia filifera*). Iako je poglavito štetnik palmi iz porodice *Arecaceae*, kao biljke domaćini crvene palmine pipe navode se sljedeće biljne vrste: *Areca catechu*, *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, *Caryota maxima*, *C. cumingii*, *Cocos nucifera*, *Corypha gebanga*, *C. elata*, *Elaeis guineensis*, *Livistona dicipens*, *L.*

<sup>1</sup> Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Faculty of Agriculture and Food Technology University of Mostar

<sup>2</sup> Dušica d.o.o. Čapljina

<sup>3</sup> Sjemenarna d.o.o. Široki Brijeg

Korespondencija: ivan.ostojic@sjemenarna.com

*chinensis*, *L. subglobosa*, *Metroxylon sagu*, *Oneosperms horrida*, *O. tigillaria*, *Oreodoxa regia*, *Phoenix canariensis*, *P. dactylifera*, *P. sylvestris*, *Sabal umbraculifera*, *Trachycarpus fortunei* i *Washingtonia* sp. Ovaj štetnik zabilježen je također na ratanu (*Calamus* sp.), posebice na vrsti *Calamus merillii* na Filipinima, a napada i vrstu *Agave americana* te šećernu trsku (*Saccharum officinarum*), (Masten Milek i Šimala, 2011; 2013). Crvena palmina pipa je podrijetlom iz jugoistočne Azije gdje ima status veoma značajnog štetnika nekoliko vrsta palmi, posebno kokosove palme (Murphy i Briscoe, 1999). Sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća počela se širiti prema zapadu. Na području EPPO regije pojavila se 1992. u Egiptu, a potom 1994. u Italiji i Španjolskoj. U Izraelu i Jordanu prisutna je od 1999. godine, u Turskoj od 2005. godine, na Cipru od 2006., kao i u Grčkoj i Francuskoj. U Maroku je utvrđena 2008. godine a u Gruziji i Sloveniji 2009. U Hrvatskoj je prvi put registrirana u kolovozu 2011. godine na lokalitetu Turanj u Zadarskoj županiji na palmi *Phoenix canariensis*. Iste godine registrirana je i u Solarisu kod Šibenika, također na palmama *P. canariensis* (Masten Milek i Šimala, 2011; 2013).

Rani napad crvene palmine pipe je teško uočiti, ali štete su karakteristične po pojavi oštećenja na listovima. Oštećeni listovi izgledaju kao da su rezani škarama, a što je posljedica ishrane ličinki na lišću dok je još bilo nerazvijeno. Simptomi koji upućuju na zaraženost palmi crvenom palminom pipom su i suhi listovi na potpuno zelenoj krošnji, koji odumiru zbog ishrane ličinki u njihovoj bazi. Kasnije, štete se pojavljuju u vidu rupa pri bazi palminih listova. Pri bazi oštećenih palminih listova moguće je osim ličinki naći i kukuljice te kokone pipe. Jasan znak prepoznavanja napadnutih palmi je simptom „kišobrana“ kada se stariji listovi objese te dolazi do venuća i žućenja, a sve to nalikuje na stresno stanje biljke uzrokovano sušom. U bazi srušenog stabla palme u unutrašnjosti se mogu vidjeti hodnici koje rade ličinke, uglavnom u gornjem dijelu, a mogu biti dugački i do 1 m. Ličinke i odrasle pipe mogu uništiti unutrašnjost stabla palme, bez vidljivih vanjskih znakova uginuća biljke. Glavne štete na palmama uglavnom čine ličinke bušeći hodnike, dok se odrasli hrane ubadajući rilom. Odrasli svojom ishranom prčinjaju sekundarne štete, jer se na mjestu uboda naseljavaju različite gljivice. Uslijed napada pipe stablo palme fiziološki slabi i postaje podložnije propadanju i urušavanju, što predstavlja potencijalnu opasnost za okolinu. Napad pipe na palmama iz roda *Phoenix* u većini slučajeva uzrokuje ugibanje biljke, bez obzira na njezinu visinu ili starost. Jedan od znakova napada crvene palmine pipe može biti i nakošeno palmino deblo (Abraham i sur., 1998; Masten Milek i Šimala, 2013). Imago crvene palmine pipe je duljine 20-40 mm. Duljina tijela odraslog mužjaka iznosi 19 – 42 mm, a širina 8–16 mm (Masten Milek i Šimala, 2013). Tijelo mužjaka crvene palmine pipe je izduženo ovalno, crvenkastosmeđe do crne boje. Gledano odozgo, rilo je prošireno od osnove do iza polovice pa onda suženo pri vrhu, ravno je i pokriveno kratkim, smeđim dlačicama na prednjoj polovici. Gledano sa strane, rilo je ravno, široko pri osnovi. Najčešće je glatko, no ponekad može imati lagana udubljenja. Boja rila mužjaka varira od crvenkastosmeđe do crne (Masten Milek i Šimala, 2013). Pokrilja su tamnocrvene do crne boje. Pokrilja mogu biti sjajna ili bez sjaja. Lagano su pokrivena dlačicama. Oblik i veličina crnih

pjega na prvom članku prsišta često variraju (OEPP/EPPO, 2007). Duljina tijela odrasle ženke crvene palmine pipe iznosi 26 – 40 mm, a širina 10 – 16 mm. Veličina, boja tijela i oznake na prvom članku prsišta (pronotum) vrlo su slični kao kod odraslog mužjaka (Masten Milek i Šimala, 2013). Na rilu ženke, za razliku od mužjaka, nema dlaka. Za razliku od mužjaka, rilo je u ženke dulje, tanje i valjkastije. Ženka nema dlake na bedrima prednjih nogu, a na goljenicama prednjih nogu dlake su mnogo kraće nego u mužjaka (OEPP/EPPO, 2007). Jaja crvene palmine pipe su bjelkasto žute boje, glatka, vrlo sjajna, valjkasta oblika sa zaobljenim vrhovima, blago sužena na prednjem dijelu, prosječne duljine 0,98–2,96 mm (Masten Milek i Šimala, 2013). Ličinka je izduljenog oblika, bez nogu, bjeličaste boje. Glava ličinke je crvenkastosmeđe do sjajno smeđe do crne boje. Tijelo ličinke je blago povijeno i sastoji se od 13 članaka. Posljednji razvojni stadij ličinke dug je 36 - 47 mm i širok 15 – 19 mm (Masten Milek i Šimala, 2013). Usni organ je dobro razvijen i jako hitiniziran. Kukuljica je smještena u kokonu kojeg ličinka pravi od biljnih vlakana. Veličina kokona je 5,0–9,5 cm x 2,5–4,0 cm. Kukuljica je dugačka oko 4 cm i široka oko 1,5 cm. U početku je blijedo žućkaste, a kasnije smeđe boje (Masten Milek i Šimala, 2011; 2013). Razvojni stadiji crvene palmine pipe prikazani su na slici broj 1.



Sl. 1. Kokon, ličinka, kukuljica i imago crvene palmine pipe (foto: Ostojić, I.)  
 Fig.1. Cocoon, larvae, pupa and adult of red palm weevil (photo: Ostojić, I.)

Odrasli oblici crvene palmine pipe nisu osobito dobri letači ali mogu letjeti na veće udaljenosti u potrazi za biljkama domaćinima. Ove kornjaše posebno privlače oštećene palme odnosno odumirući ili oštećeni dijelovi palmi, ali je moguće da i neoštećene palme budu napadnute. Na oštećenim palmama, mužjaci crvene palmine



pipe, izlučuju poseban feromon koji privlači ostale jedinke na okupljanje i grupiranje. Crvena palmina pipa razmnožava se spolnim putem. Nakon kopulacije ženka odlaže jaja na mjestima oštećenja na deblu ili na lisnim peteljka s gornje strane te na mjestima rana uzrokovanih hranjenjem kornjaša vrste *Oryctes rhinoceros*. Odlaganje jaja uglavnom je ograničeno na mekše dijelove palme. Nakon što odloži jaja ženka živi još 10 dana (Esteban Duran i sur., 1998). Nakon piljenja iz jaja, ličinke se ubušuju u peteljku lista i započinju se hraniti u unutrašnjosti palme. Ličinke mogu raditi hodnike samo u mekom tkivu, kao što su lisna rozeta, gornji dio debla ili baza lisnih peteljki. Također ličinke mogu raditi hodnike i u deblu mladih palmi, kao i u trulom tkivu ugibajući palmi. Na palmama do pet godina starosti, ličinke je moguće naći u deblu, peteljci ili u rozeti (Masten Milek i Šimala, 2011; 2013). Kako palme stare tako je ličinke uglavnom moguće naći u dijelovima debla blizu vegetacijskog vrha (rozeta). Na palmama starijim od 15 godina ličinke su uglavnom prisutne u deblu, u dijelu koji je oko 60–90 cm ispod rozete, zatim u rozeti te pri bazi lisnih peteljki. Dok se hrane, ličinke stvaraju masu koja ispunjava hodnike nastale hranjenjem, a sastoji se od sažvakanih biljnih vlakana i biljnog soka. Razvoj ličinke traje 36–78 dana (u prosjeku 55 dana). Pred kukuljenje ličinke formiraju ovalan kokon od suhih biljnih vlakana, smeđe boje. Kukuljenje se odvija u pravilu izvan debla, u kokonu koji se nalazi ispod kore debla, obično pri bazi palme ili u bazi peteljki listova. Stadij pretkukuljice traje tri dana, a stadij kukuljice 12–20 dana. Nakon izlaska iz kukuljice odrasli oblik ostaje u unutrašnjosti kokona 4–17 dana (u prosjeku osam dana). Odrasli, neovisno o spolu, žive 2–3 mjeseca. Potpuni razvoj crvene palmine pipe, od jaja do odraslog oblika, u Indiji traje u prosjeku 82 dana (Masten Milek i Šimala, 2013). Crvena palmina pipa u Egiptu ima tri generacije pri čemu je razvoj prve najkraći, razvoj druge nešto dulji, a razvoj treće generacije najdulji (El Ezaby, 1997). Prema istraživanjima, u Italiji i Španjolskoj crvena palmina pipa ima dvije generacije. Preklapajuće generacije, sa svim razvojnim stadijima, mogu biti prisutne u istom palminu stablu. U Španjolskoj vrhunac leta crvene palmine pipe odvija se u listopadu i početkom studenog. U pravilu odrasle pipe, prisutne u jednom stablu, neće se seliti na drugo sve dok imaju dovoljno hrane (Masten Milek i Šimala, 2013). Utvrđivanje prisutnosti crvene palmine pipe može se provoditi različitim metodama (vizualna metoda, hranidbeni i feromonski mamci, akustični detektori i infracrvene zrake). Vizualnim pregledima potrebno je utvrditi znakove napada crvene palmine pipe, budući su ličinke i imaga u unutrašnjosti i nemoguće ih je vidjeti. Vizualnim pregledima potrebno je obratiti pozornost na simptome kao što su izrezani dijelovi lišća, suhi list u zelenoj krošnji, simptom „kišobrana“. Utvrđivanje prisutnosti crvene palmine pipe moguće je primjenom hranidbenih mamaca. Šećerna trska se smatra najučinkovitijim hranidbenim mamcem. Osim šećerne trske vrlo učinkoviti hranidbeni mamci su ljuska kokosova oraha te list datulje (*Phoenix dactylifera*). Feromonskim mamcima je moguće pratiti populaciju odraslih pipa. Za masovni ulov i detekciju odraslih pipa koriste se agregacijski feromoni, koji sve jedinke populacije skupe u jedinstvenu grupu te ih dovedu do izvora hrane ili mjesta pogodnog za naseljavanje (Dražić i Kezić, 2000, cit. Masten Milek i Šimala, 2013). Danas se koriste

agregacijski feromonski mamci na osnovi ferrugineola, semiokemikalije kairomona koje privlače i muške i ženske jedinke crvene palmine pipe. Faleiro i Chellapan (1999) preporučuju primjenu ferrugineola zajedno s hranidbenim mamcem (šećerna trska) u svrhu povećanja ulova pipa. Istraživanjima koja su proveli Abraham i sur. (1999) utvrđeno je kako je hvatanje pipa učinkovito samo ako se seksualni mamac - feromon primijeni u kombinaciji s hranidbenim mamcem. Za maksimalan ulov pipa, trap je potrebno smjestiti u razini tla ili na visini od 2 m (Hallet i sur., 1999, cit. Masten Milek i Šimala, 2013). Davis Red Weevil Detector elektronički je instrument koji pojačava niskofrekventne zvukove, a u stanju je pojačati zvuk koji proizvode ličinke crvene palmine pipe tijekom ishrane. Osim toga u Italiji se kao metoda praćenja koriste termokamere i infracrvene zrake (Longo, 2008, cit. Masten Milek i Šimala, 2013). Suzbijanje crvene palmine pipe može se provoditi mehaničkim, fizikalnim, biotehničkim, biološkim i kemijskim mjerama zaštite. Mehaničke mjere podrazumijevaju uništavanje zaraženog biljnog materijala i tretmane zaštite rana –premazivanje rezova. Rezanje i uklanjanje zaraženih palmi potrebno je provoditi tijekom zimskog perioda kada nema aktivnosti odraslih pipa. Fizikalne metode podrazumijevaju primjenu sterilnih kukaca. Tretiranje mužjaka pipe starosti 1–2 dana u dozi od 15 Gy (1 gray je apsorpcija 1 džula energije u formi ionizirajuće radijacije po 1 kg tvari) rezultiralo 90 %-tnom sterilnošću bez štetnog učinka na preživljavanje (Rahalkar i sur., 1973). U biotehničke mjere suzbijanja crvene palmine pipe ubraja se primjena hranidbenih i feromonskih mamaca. Biološke mjere suzbijanje podrazumijevaju primjenu entomopatogenih nematoda i entomopatogenih gljiva kao što je *Beauveria bassiana*. Danas se najčešće u praksi primjenjuju entomopatogene nematode *Steinernema carpocapse*, što u kombinaciji s kemijskim pripravcima može dati dobre rezultate (Dembilio i sur., 2009). U Indiji su kao predatori crvene palmine pipe zabilježeni *Chelisoche moris*, *Platymeris loevicollis*, *Tetrapolypurus rhynchopori* i *Sarchophaga fuscicaudata*, dok je od parazitoida zabilježena *Scolia erratica*. U predatore crvene palmine pipe ubrajaju se i štakori te neke ptice (Longo, 2008, cit. Masten Milek i Šimala, 2013). Kemijske mjere suzbijanje crvene palmine pipe podrazumijevaju primjenu različitih kemijskih pripravaka na osnovi imidakloprida i klorpirifosa. U Kataloniji preventivno tretiranje obuhvaća tri tretiranja: 1. klorpirifos krajem ožujka, početkom travnja; 2. tretiranje imidaklopridom u srpnju; 3. tretiranje ponovno klorpirifosom krajem listopada, početkom studenog. Kurativno tretiranje sastoji se od pet kemijskih tretmana, naizmjenice primjenom klorpirifosa i imidakloprida, s time da se tretman započinje primjenom klorpirifosa. Vrlo je bitno istaknuti da se prskanje krošnje mora obavljati odozgo s količinom vode od 10 do 20 litara po biljci (ovisno o visini palme). Time se postižu najbolji rezultati i palme je moguće spasiti (Masten Milek i Šimala, 2013).

Crvena palmina pipa trenutno se nalazi na EPPO A2 listi štetnih organizama. Status ovog organizma nije reguliran u Bosni i Hercegovini - (Pravilnik o listama štetnih organizama, listama bilja, biljnih proizvoda i reguliranih objekata („Službeni glasnik BiH“ 48/13).

## MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje prisutnosti crvene palmine pipe na području Bosne i Hercegovine provedeno je od siječnja do travnja 2019. godine na području Hercegovačko-neretvanske županije (Mostar, Čitluk, Čapljina i Neum) te na području Zapadnohercegovačke županije (Ljubuški, Grude i Široki Brijeg). Posebna pažnja usmjerena je na Čapljinu i Neum obzirom da je u tim mjestima i utvrđena prisutnost pipe, a prilikom istraživanja posebno su pregledavane palme vrste *P. canariensis*. Istraživanja su provedena vizualnim pregledom palmi kako bi se uočila oštećenja koja upućuju na prisutnost pipa. Prilikom pregleda palmi posebna pozornost je usmjerena na oštećenja na listovima, pojavu suhih listova u zelenoj krošnji kao i na simptome „kišobrana“.

## REZULTATI I RASPRAVA

Prvi nalaz crvene palmine pipe u Bosni i Hercegovini zabilježen je u siječnju 2019. godini na području grada Čapljine (N 43.10494; E 17.70005) na dvije palme vrste *Phoenix canariensis* L. Iste godine u ožujku mjesecu pipa je pronađena i na području Neuma (E 42.9190; N 17.6193) također na palmi vrste *P. canariensis*. Detaljnim pregledima palmi vrste *P. canariensis* u Neumu i Čapljini uočeno je nekoliko palmi sa simptomima koji upućuju na prisutnost crvene palmine pipe.

U tabeli 1 dati su lokaliteti na području Hercegovačko-neretvanske županije na kojima su obavljani pregledi palmi na prisutnost simptoma crvene palmine pipe.

Tabela 1. Lokaliteti na području Hercegovačko-neretvanske županije na kojima su obavljani pregledi palmi

Table 1 Localities in Herzegovina-Neretva Canton where visual inspection of palm trees took place

Općina <i>Municipality</i>	Lokalitet <i>Locality</i>	Koordinate <i>Coordinates</i>	Vrsta palme <i>Palm species</i>	Prisutnost simptoma <i>Presence of symptoms</i>
Neum	Neum-magistrala	N 42.92685 E 17.61441	<i>Phoenix canariensis</i>	-
	Neum-riva	N 42.92876 E 17.60713	<i>Phoenix canariensis</i>	+
	Neum-riva	N 42.9192 E 17.6182	<i>Phoenix canariensis</i>	+
	Neum-riva	N 42.9190 E 17.6193	<i>Phoenix canariensis</i>	+
	Neum-riva	N 42.9188 E 17.6176	<i>Phoenix canariensis</i>	-
	Neum-		N 47.9264	<i>Phoenix</i>

	magistrala	N 17.6150	<i>canariensis</i>	
Čapljina	Čapljina-centar	N 431094 E 17.7000	<i>Phoenix canariensis</i>	+
	Čapljina - centar	N 43.1165 E 17. 6989	<i>Phoenix canariensis</i>	+
	Čapljina - centar	N 43.1161 E 17.7001	<i>Phoenix canariensis</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1128 E 17.7000	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1103 E 17.7018	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1135 E 17.7050	<i>Phoenix canariensis</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1138 E 17.7043	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1125 E 17.7046	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čapljina-centar	N 43.1138 E 17.7059	<i>Phoenix canariensis</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1094 E 17.7056	<i>Phoenix canariensis</i>	+
	Čapljina - centar	N 43.1093 E 17.7052	<i>Yucca sp.</i>	-
	Čapljina - centar	N 43.1103 E 17.7048	<i>Washingtonia filifera</i>	-
	Domanovići	N 43.1368 E 17.7786	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Trebižat	N 43.1348 E 17.6744	<i>Phoenix canariensis</i>	
	Trebižat	N 43.1198 E 17.6881	<i>Phoenix canariensis</i>	+
Trebižat	N 43.1187 E 17.6908	<i>Phoenix canariensis</i>	-	
Počitelj	N 43.1370 E 17.7318	<i>Trachycorus fortunei</i>	-	
Stolac	Crnići	N 43.1322 E 17.8509	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Rivine	N 43.1148 E 17.8918	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Stolac - centar	N 43.0824 E 17.9809	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Stolac - centar	N 43.0811 E 17.9513	<i>Trachycorus fortunei</i>	-

	Stolac - centar	N 43.0932 E 17.9592	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Stolac - centar	N 43.0833 E 17.9578	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
Čitluk	Blizanci	N 43.2093 E 17.7426	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Blizanci	N 43.2120 E 17.7396	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čitluk-centar	N 43.2263 E 17.7094	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čitluk centar	N 43.2270 E 17.6964	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Čitluk-centar	N 43.2285 E 17.7004	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
Mostar	Mostar-centar	N 43.3377 E 17.8069	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Mostar-Dum	N 43.3387 E 17.8037	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Mostar-Rondo	N 43.3419 E 17.8036	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Mostar-centar II	N 43.3514 E 17.8048	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Mostar-avenija	N 43.3490 E 17.8000	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Bijeli Brijeg	N 43.3464 E 17.7923	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Bijeli Brijeg	N 43.3457 E 17.7925	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Rodoč	N 43.3054 E 17.7896	<i>Phoenix canariensis</i>	-
	Mostar-Hotel Bevanda	N 43.3384 E 17.7963	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Mostar-Balinovac	N 43.3348 E 17.7959	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
Polog	N 43.3445 E 17.7013	<i>Trachycorus fortunei</i>	-	

Tijekom 2018. i 2019. godine na području Heregovačko-neretvanske županije istraživanje je obavljeno u dva grada i tri općine, odnosno palme su pregledane na 45 lokaliteta. U istraživanjima su pregledavane četiri vrste palmi *P. canariensis*, *T. fortunei*, *Yucca* sp. i *Washingtonia* sp. Simptomi prisutnosti palmine pipe zabilježeni su na palmama vrste *P. canariensis* u gradu Čapljini i općini Neum.

U Čapljini na četiri palme vrste *P. canariensis* uočeni su simptomi (obješeno suho lišće) koji upućuju na prisutnost crvene palmine pipe. Na palmama vrste *T. fortunei*, *Washingtonia* sp. i *Yucca* sp. nisu uočeni simptomi prisutnosti crvene palmine pipe.

Pregledom palmi vrste *P. canariensis* na lokalitetima općine Neum pronađene su tri palme sa simptomima (suhi obješeni listovi) i dvije palme sa simptomima („kišobran“) koji upućuju na prisutnost crvene palmine pipe. Na palmama vrste *T. fortunei* nisu primijećeni simptomi.

Pregledom palmi vrste *T. fortunei* na lokalitetima u gradu Mostaru, općini Čitluk i općini Stolac nisu uočeni simptomi koji upućuju na zaraženost palmi crvenom palminom pipom.

U tabli 2 dati su lokaliteti na području Zapadnohercegovačke županije na kojima su obavljani pregledi palmi na prisutnost simptoma crvene palmine pipe.

Tabela 2. Lokaliteti na području Zapadnohercegovačke županije na kojima su obavljani pregledi palmi

Table 2 Localities in West Herzegovina Canton where visual inspection of palm trees took place

Općina <i>Municipality</i>	Lokalitet <i>Locality</i>	Koordinate <i>Coordinates</i>	Vrsta palme <i>Palm species</i>	Prisutnost simptoma <i>Presence of symptoms</i>
Ljubuški	Grudsko vrilo	N 43.2634 E 17.4603	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Grudsko vrilo	N 43.2600 E 17.4587	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Grudsko vrilo	N 43.2541 E 17.4594	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Vitina	N 43.2381 E 17.4823	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Vitina	N 43.2288 E 17.4974	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Radišići	N 43.2164 E 17.5171	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Radišići	N 43.2114 E 17.5257	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Ljubuški-centar	N 43.2000 E 17.5451	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Ljubuški-centar	N 43.1975 E 17.5447	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Ljubuški-centar	N 43.1882 E 17.5436	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Ljubuški-kružni tok	N 43.1961 E 17.5534	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
Hrašljani	N 43.1887	<i>Trachycorus</i>	-	

		E 17.5772	<i>fortuei</i>	
Grude	Višnica	N 43.3660 E 17.4474	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Grude - centar	N 43.3671 E 17.4232	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Grude - centar	N 43.3687 E 17.4193	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Pocrte	N 43.3781 E 17.3933	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Vrućice	N 43.3839 E 17.3790	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Grude - centar	N 43.3716 E 17.4148	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Ružići	N 43.3409 E 17.4294	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
Široki Brijeg	Dobrič	N 43.3577 E 17.6797	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Knešpolje	N 43.3573 E 17.6789	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Knešpolje	N 43.3665 E 17.6466	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Knešpolje	N 43.3686 E 17.6281	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Lise	N 43.3757 E 17.6106	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Lise	N 43.3775 E 17.6054	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Široki Brijeg	N 43.3801 E 17.5964	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Trn	N 43.3801 E 17.5754	<i>Trachycorus fortunei</i>	-
	Trn	N 43.3797 E 17.5727	<i>Trachycorus fortunei</i>	-

Tijekom 2018. i 2019. godine na području Zapadnohercegovačke županije istraživanje je obavljeno u jednom gradu i dvije općine, odnosno palme su pregledane na 28 lokaliteta. U istraživanjima su pregledavane palme vrste *T. fortunei*. Simptomi prisutnosti palmine pipa nisu zabilježeni ni na jednoj palmi koja je pregledana u Zapadnohercegovačkoj županiji.

## ZAKLJUČCI

Na osnovu dvogodišnjih istraživanja prisutnosti i proširenosti crvene palmine pipe na području Bosne i Hercegovine mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Istraživanja su provedena na 73 lokaliteta koja pripadaju u tri grada, pet Općina odnosno dvije Županije
- Tijekom istraživanja crvena palmina pipa pronađena je na području grada Čapljine i općine Neum, na palmama vrste *Phoenix canariensis*
- Osim palmi iz roda *Phoenix* istraživanja su obuhvatila i palme iz rodova *Trachycarpus* i *Washingtonia*
- Na području grada Čapljine uočeni su simptomi na četiri palme iz roda *Phoenix* koji upućuju na zaraženost crvenom palminom pipom
- Pregledom palmi iz rodova *Phoenix* i *Trachycarpus* na području Neuma uočeni su simptomi na još tri palme iz roda *Phoenix* koji upućuju na zaraženost crvenom palminom pipom.

## LITERATURA

- Abraham, V. A., Al Shuaibi, M. A., Faleiro, J. R., Abuzuhairah, R. A., Vidyasagar, P. S. P. V. (1998): An integrated management approach for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv., a key pest of date palm in the Middle East. Sultan Qabus University Journal for Scientific Research, Agricultural Sciences 3, 77-84.
- Abraham, V. A., Nair, S. S., Nair, C. P. R. (1999): A comparative study on the efficacy of pheromone lures in trapping *Rhynchophorus ferrugineus* in coconut gardens. Indian Coconut Journal Cochin 30: 1–2
- Dembilio, O., Llacer, E., del MarMartinez de Altubec, M., A Jacasa, J. (2009): Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*, Society of chemical industry, (www.interscience. wiley.com) DOI 10.1002/ps.1882
- Dražić, M., Kezić, N. (2000): Feromoni pčela, Journal Central European Agriculture, Volume 1 (2000), No. 1 (1-8): 1-8
- El Ezaby, F. A. (1997): Injection as a method to control *Rhynchophorus ferrugineus*, Arab Jurnal of Plant Protection 15: 31-38.
- Esteban Duran, J., Yela, J. L., Beitia-Crespo, F., Jimenez-Alvarez, A. (1998): Biology of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) in the laboratory and field: life cycle, biological characteristics in its zone of introduction in Spain, biological methods of detection and possible control, Boletin de Sonidad Vegetal, 24 (4): 737–748.



- Faleiro, J. R., Chellapan, M. (1999): Attraction of *Rhynchophorus ferrugineus* to ferrugineol-based pheromone lures in coconut gardens, *Journal of Tropical Agriculture*, 37, 60–63.
- Hallett, R. H., Oehlschlager, A. C., Borden, J. H. (1999): Pheromone-trapping protocols for *Rhynchophorus ferrugineus*, *International Journal of Pest Management* 45: 231–237.
- Longo, S. (2008): Il Punteruolo rosso della Palma in Italia - morfologia, bio-etologia e protezione integrata, prezentacija na skupu Tavola rotonds sul Punteruolo rosso delle Palme, IAMB/CIHEAM, 19 Maggio 2008.
- Masten Milek, T., Šimala, M. (2011): Prvi nalaz *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) – crvene palmine pipe u Hrvatskoj. *Glasilo biljne zaštite*, sv. 11, br. 6, 397–406.
- Masten Milek, T., Šimala, M. (2013): Crvena palma pipa *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) i palmin drvotoč *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880), Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb
- Murphy, S. T., Briscoe, B. R. (1999): The red palm weevil as an alien invasive: biology and the prospects for biological control as a component of IPM. *Biocontrol News and Information* 20: 35N–36N
- OEPP/EPPO (2007): Diagnostics on *Rhynchophorus ferrugineus* PM 7/83, *Bulletin OEPP/EPPO*, Bulletin, 37: 571–579.
- Rahalkar, G. W., Harwalkar, M. R., Rananavare, H. D., Shantaram, K., Ayengar, A. R. G. (1973): Laboratory studies on radiation sterilization of *Rhynchophorus ferrugineus* males, *Journal of Plantation Crops*, 1: 141–145.

## **FIRST REPORT OF THE RED PALM WEEVIL *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) IN BOSNIA AND HERZEGOVINA**

### **Summary**

Red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790 (Coleoptera: Curculionidae) is one of the most important pest of the palm trees. Red palm weevil originates from Asia, where it is widespread. In the EPPO region, it appeared in 1992 in Egypt. The pest was registered in Croatia in 2011. In B&H, red palm weevil was first recorded on *Phoenix canariensis* in 2019 on the localities Čapljina and Neum (Herzegovina-Neretva Canton). A survey to determine the presence and distribution of the red palm weevil on palms in Bosnia and Herzegovina was done at the beginning of 2019. in two cantons, Herzegovina-Neretva and West Herzegovina. Visual inspections of potentially infested palm trees from genus *Phoenix*, *Trachycarpus* and *Washingtonia* was conducted at 73 sites. Trees were checked for symptoms. Symptoms in form of wilted and desiccated leaves were detected at four palm trees at municipality Čapljina and three palm trees at municipality Neum all from genus *Pheonix*. There were no visible symptoms on palm trees at Canton West Herzegovina.

**Key words:** *Red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus, palm trees, first report, Bosnia and Herzegovina*

## LISNA UŠ SMILJA *Macrosiphoniella helichrysi* Remaudière, 1952 (Hemiptera: Aphididae), NOVA VRSTA U FAUNI LISNIH UŠI U BOSNI I HERCEGOVINI

Ivan Ostojčić<sup>1</sup>, Mladen Zovko<sup>1</sup>, Danijela Petrović<sup>1</sup>, Dragan Jurković<sup>1</sup>, Luka Bošnjak<sup>2</sup>

Izvorni znanstveni rad – *Original scientific paper*

### Rezime

Posljednjih nekoliko godina, na području Hercegovine, primorsko smilje (*Helichrysum italicum*), postaje vrlo značajna poljoprivredna kultura, koja doživljava pravu ekspanziju. Intenzivno se podižu plantažni nasadi smilja, različitih površina, od jednog duluma do nekoliko desetaka hektara. Danas je na području Hercegovine oko 1500 ha pod smiljem. Obzirom da se radi o nasadima na velikim površinama, počeli su se javljati štetnici koji su na nekim lokalitetima prčinili i veće štete. Među značajnijim štetnicima smilja na području Hercegovine su i lisne uši.

Istraživanje prisutnosti i proširenosti lisnih uši iz roda *Macrosiphoniella* provedeno je tijekom 2017. i 2018. godine na području Zapadnohercegovačke i Hercegovačko-neretvanske županije, na 25 lokaliteta. Determinacijom prikupljenih uzoraka lisnih uši utvrđeno je da se radi o vrsti *Macrosiphoniella helichrysi* Remaudière, 1952. Tijekom 2017. godine lisna uš smilja utvrđena je na 21 lokalitetu, a najveća brojnost lisne uši smilja zabilježena je na lokalitetu Uzarići (Široki Brijeg) kada je od 100 pregledanih biljaka njih 63 bile zaražene ušima. U 2018. godini lisna uš smilja utvrđena je na 25 lokaliteta, a lokaliteti Općuš i Bašaga (Čitluk) te Sretnice i Miljkovići (Mostar) prednjačili su po broju zaraženih biljaka. Osim u proizvodnim nasadima, lisna uš smilja, utvrđena je i u zaštićenim objektima u kojima se proizvode presadnice smilja.

Ključne riječi: *Helichrysum italicum*, smilje, *Macrosiphoniella helichrysi*

### UVOD

Primorsko smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) je mediteranska biljna vrsta koja raste u sunčanim kamenjarima Dalmacije i Hercegovine i s ovih područja daje najkvalitetnije ulje. Posljednjih nekoliko godina, na području Hercegovine, započinje plantažni uzgoj primorskog smilja. Površine pod nasadima smilja su različite i kreću se od nekoliko stotina kvadrata pa sve do desetine hektara.

Veći nasadi uglavnom se podižu na površinama koje nastaju kultiviranjem krša, dok su oni manji uglavnom na tzv. obradivim površinama na kojima su se u prošlosti uzgajale različite poljoprivredne kulture (Ostojčić i sur., 2018).

<sup>1</sup> Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Faculty of Agriculture and Food Technology University of Mostar

<sup>2</sup> Sjemenarna d.o.o. Široki Brijeg

Korespondencija: ivan.ostojic@sjemenarna.com

Prema neslužbenim podacima Grupacije proizvođača i prerađivača smilja, do sada je u Hercegovini pod smiljem zasađeno oko 1500 ha. Najveći broj proizvođača je na području Stoca, Širokog Brijega, Posušja, Mostara, Gruda, Ljubuškog, Čitluka i Čapljine. Dugotrajnost smilja u plantažnom uzgoju je desetak godina. U drugoj godini nakon sadnje može se ostvariti prinos od oko 200 grama po biljci. U trećoj godini je prinos oko 300 grama, dok je u punoj rodnosti (od četvrte do osme godine uzgoja) prinos 400-500 grama. U zadnje dvije godine uzgoja prinos je niži i kreće se u rasponu od 200-300 grama (Džubur, 2017). Otkupna cijena svježeg ubranog smilja, u posljednje dvije godine postepeno opada, što je usporilo podizanje novih nasada smilja. Tijekom 2017. a posebno tijekom 2018. godine bilježi se smanjen interes za novim nasadima tako da je u ove dvije godine zabilježeno i krčenje već podignutih nasada.

Naglo širenje uzgoja jedne biljne vrste na nekom području, kao što je to trenutno slučaj sa smiljem na širem području Hercegovine, često prati i pojava različitih problema u proizvodnji među kojima značajno mjesto zauzima i pojava štetnika i uzročnika biljnih bolesti (Ostojić i sur., 2018). Obzirom da se radi o monokulturnim nasadima smilja, na velikim površinama, tijekom 2016., 2017. a posebno 2018. godine, počeli su se javljati štetnici koji su na nekim lokalitetima pričinili i veće štete. Tijekom 2016. i 2017. godine štete su uglavnom pričinjavale različite gusjenice, među kojima su posebno značajne štete činile gusjenice stričkova šarenjaka *Vanessa cardui* (Linnaeus, 1758). Osim gusjenica, u nasadima, bili su prisutni i drugi štetnici, uglavnom iz reda Coleoptera. U 2018. godini štete su bile izraženije nego prethodnih godina jer jedan dio proizvođača nije poduzimao nikakve mjere suzbijanja. Suzbijanje štetnika u nasadima smilja je dosta otežano obzirom da se proizvođači odlučuju na ekološku proizvodnju pa je i izbor pripravaka dosta ograničen.

Smilje napadaju štetnici od samog početka proizvodnje (presadnice) pa sve do pred samu žetvu. U istraživanjima štetnika smilja (*H. italicum*) na području Hercegovine (Ostojić i sur., 2016; Zovko i sur., 2016) navode desetak vrsta štetnika smilja: gusjenice sovica pozemljuše (*Agrotis* spp.), lisne uši, kalifornijski trips (*Frankliniella occidentalis* Pergande, 1895), srebreni listojed (*Phyllobius argentatus* L., 1758), smeđi listojed (*P. oblongus* L., 1758), gusjenice stričkova šarenjaka.

Problem sa štetnicima smilja izraženiji je na proizvodnim površinama. Sredinom i krajem travnja 2016. godine, od gusjenica stričkova šarenjaka, zabilježene su štete na mladim sadnicama smilja (*H. italicum*) kod plantažnog uzgoja na području Hercegovine. Štete su posebno bile izražene na sadnicama smilja koje su sađene u jesen 2015., te u proljeće 2016. godine. Na mladim sadnicama bilo je prisutno 2-3 gusjenice. Na nekoliko lokaliteta (Knešpolje, Uzarići i Potpolje) zabilježene su štete i na biljkama smilja starosti 3-4 godine na kojima je bilo prisutno i po tridesetak gusjenica. Na ovim lokalitetima štete su bile izražene u obliku oaza ili plješina s po desetak biljaka koje su bile jako oštećene, dok druge biljke uopće nisu bile napadnute (Beljo i sur., 2016).

Na lokalitetu Uzarići tijekom travnja 2015. godine zabilježene su ekonomski značajne štete na biljkama starosti četiri godine. Pojedine biljke bile su potpuno uništene od

gusjenica stričkova šarenjaka, a na pojedinim sadnicama je pronađeno preko 100 gusjenica ovog leptira (Ostojić i sur., 2016). Osim gusjenica stričkova šarenjak, veće štete u nasadima smilja na području Hercegovine, pričinjavaju i listojedi, među kojima veće značenje ima srebrni listojed. Tijekom svibnja i početkom lipnja 2016. godine, štetnik je u većoj brojnosti zabilježen na nekoliko lokaliteta u Širokom Brijegu (Gornji Gradac, Donji Gradac, Uzarići). Posebno su bili ugroženi nasadi u blizini šuma u kojima je po jednoj biljci smilja starosti jedne godine pronađeno i po desetak jedinki (Beljo i sur., 2016). Na lokalitetu Uzarići na pojedinim biljkama zabilježena je velika brojnost lisnih uši (Ostojić i sur., 2018).

Kao štetnike smilja (*H. arenaria*) na području Poljske (Wrzesińska i Sawilska, 2010) ističu stričkova šarenjaka. Od drugih štetnika iz reda Lepidoptera navode vrste *Bucculatrix gnaphaliella* (Treitschke, 1833), *Eublemma minutata* (Fabricius, 1794), *Pyrausta aerealis* (Hübner, 1793) i *Coleophora gnaphalii* (Zeller, 1839).

Značajniji štetnici presadnica smilja su lisne uši iz roda *Macrosiphoniella* koje mogu pričinjati velike štete (Ostojić i sur., 2016; 2018). Lisne uši iz ovog roda se javljaju i na sadnicama smilja u proizvodnim nasadima. U istraživanjima provedenim 2007. i 2008. godine (Wrzesińska i Sawilska, 2009) navode *Macrosiphoniella janckei* Börner kao lisnu uš koja se javlja na smilju (*Helichrysum arenaria* L.).

U istraživanjima faune lisnih uši na području regija Campania i Lazio (Italia), Barbagallo i Massimino Cocuzza (2014) kao vrstu koja dolazi na smilju (*H. italicum*) navode lisnu uš *Macrosiphoniella helichrysi* Remaudière 1952. Na području Srbije ova vrsta lisne uši prvi put je zabilježena 2016. godine na primorskom smilju koje je uzgajano uz okućnicu da bi ponovno 2018. godine pronađena na istim biljkama (Petrović-Obradović i sur., 2018). Rasprostranjena je u južnoj Europi, Turskoj, a unijeta je i u Južnu Afriku (Petrović-Obradović i sur., 2018). Na području Bosne i Hercegovine lisna uš smilja *Macrosiphoniella helichrysi* potvrđena je 2017. godine.

Lisna uš smilja *Macrosiphoniella helichrysi* je oligofagna vrsta koja se hrani na biljkama iz roda *Helichrysum*. To je monoecična vrsta koja tijekom godine ne mijenja biljku domaćina i vjerojatno ima anholociklički razvoj pošto njene spolne jedinice u svijetu do sada nisu pronađene (Petrović-Obradović i sur., 2018). Uš je dugačka 1,4 do 2,6 mm (Slika 1). Tijelo uši je sive boje pokriveno je voštanim prahom koji nedostaje na sredini dorzalne strane abdomena zbog čega se jasno vidi sjajna crna pjega (Petrović-Obradović i sur., 2018). Uš se hrani na vršnim dijelovima biljke, na mladim sočnim listovima i cvjetnim drškama.

## MATERIJAL I METODE RADA

Utvrđivanje prisutnosti i proširenosti lisne uši smilja *Macrosiphoniella helihrysi* na području Bosne i Hercegovine provedeno je tijekom 2017. i 2018. godine na području Zapadnohercegovačke i Hercegovačko-neretvanske županije, na 25 lokaliteta s nasadima smilja. Istraživanjima su obuhvaćeni nasadi smilja koji su podignuti na terenima nastalim kultiviranjem krša, ali i oni nasadi podignuti na obradivim površinama na kojima su se u prošlosti uzgajale različite poljoprivredne kulture.

Istraživanja prisutnosti i proširenosti lisne uši smilja (*M. helichrysi*) trajala su tijekom vegetacije (travanj-studeni), a u istraživanjima je korištena vizualna metoda. Nasadi smilja pregledavani su dva do tri puta mjesečno. Ovisno o veličini nasada, nasumično je odabirano 50-100 biljaka koje su detaljno pregledane na prisutnost lisnih uši. Osim nasada smilja, obavljani su pregledi i u proizvodnim objektima za proizvodnju presadnica smilja. Pronađene lisne uši smještane su u posebne bočice s alkoholom, koje su se čuvale u laboratoriju. Determinacija se obavljala u Zavodu za zaštitu bilja Agronomskog i prehrambeno-tehnološkog fakulteta, pregledom uzoraka pod binokularom, na osnovu morfoloških karakteristika, korištenjem relevantnih dijagnostičkih ključeva.



Sl. 1. Lisna uš smilja *Macrosiphoniella helichrysi* (foto: Zovko, M.)  
Fig. 1. The immortal aphid *Macrosiphoniella helichrysi* (photo: Zovko, M.)

## REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom istraživanja lisnih uši iz roda *Macrosiphoniella*, utvrđena je njihova prisutnost na većem broju lokaliteta na kojima se uzgaja smilje. Determinacijom prikupljenih uzoraka lisnih uši potvrđeno je da se radi o vrsti *Macrosiphoniella helichrysi*. Osim u proizvodnim nasadima smilja, uš je pronađena i u objektima u kojima se proizvode presadnice smilja. Lokaliteti na kojima je utvrđena prisutnost lisne uši smilja na području Zapadnohercegovačke županije tijekom 2017. i 2018. godine prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Lokaliteti na području Zapadnohercegovačke županije na kojima je utvrđena prisutnost lisne uši smilja tijekom 2017. i 2018. godine.

*Table 1 Sites in West Herzegovina Canton where M. helichrysi was recorded in 2017 - 2018.*

Općina <i>Municipality</i>	Lokalitet <i>Site</i>	Koordinate <i>Coordinates</i>	Godina istraživanja <i>Year of research</i>	
			2017.	2018.
Ljubuški	Mostarska vrata	43°12.847'N 17°34.564'E	+	+
	Cerno	43°11.904'N 17°36.348'E	+	+
	Crnopod	43°11.046'N 17°37.229'E	+	+
	Kravice	43°10.562'N 17°35.580'E	+	+
	Klobuk	43°18.370'N 17°26.073'E	-	+
Grude	Višnica	43°22.393'N 17°25.818'E	+	+
	Dužice	43°21.393'N 17°25.818'E	+	+
	Pogana vlaka	43°20.055'N 17°26.683'E	+	+
	Medovići	43°21.438'N 17°29.318'E	-	+
Široki Brijeg	Uzarići	43°19.322'N 17°38.289'E	+	+
	Donji Gradac	43°22.869'N 17°38.570'E	+	+
	Gornji Gradac	43°23.499'N 17°38.136'E	+	+
Posušje	Batin	43°27.315'N 17°20.537'E	+	+

Tijekom 2017. godine lisna uš smilja utvrđena je na 11 lokaliteta na području Zapadnohercegovačke županije. Najveća brojnost lisne uši smilja u toj godini zabilježena je na lokalitetu Uzarići (Široki Brijeg) kada je od 100 pregledanih biljaka njih 63 bilo zaraženo lisnim ušima. Na ostalim lokalitetima u 2017. godini nije zabilježena veća brojnost.

Tijekom 2018. godine lisna uš smilja utvrđena je na 13 lokaliteta. Na lokalitetima Mostarska vrata i Crnopod (Ljubuški) te lokalitetu Uzarići (Široki Brijeg) brojnost lisne uši bila je jako izražena.

Lokaliteti na kojima je utvrđena prisutnost lisne uši smilja (*M. halichrysi*) na području Hercegovačko-neretvanske županije dati su u tabeli 2.

Tabela 2. Lokaliteti na području Hercegovačko-neretvanske županije na kojima je utvrđena prisutnost lisne uši smilja tijekom 2017. i 2018. godine.

Table 2 Sites in Herzegovina-Neretva Canton where *M. halichrysi* was recorded in 2017 -2018.

Općina <i>Municipality</i>	Lokalitet <i>Site</i>	Koordinate <i>Coordinates</i>	Godina istraživanja <i>Year of research</i>	
			2017.	2018.
Mostar	Sretnice	43°16.550'N 17°43.142'E	+	+
	Miljkovići	43°18.824'N 17°46.570'E	+	+
	Polog	43°20.442'N 17°42.579'E	-	+
Stolac	Poprat	43°5.471'N 17°55.533'E	+	+
	Rivine	43°6.506'N 17°54.267'E	+	+
Čitluk	Potpolje	43°13.442'N 17°40.546'E	+	+
	Bašaga	43°13.375'N 17°40.596'E	+	+
	Blizanci	43°13.089'N 17°43.558'E	+	+
	Općuš	43°13.206'N 17°40.837'E	+	+
	Garišta	43°15.186'N 17°42.812'E	-	+
	Tepčići	43°12.333'N 17°46.274'E	+	+
Čapljina	Zvirovići	43°09.146'N 17°40.208'E	+	+

Tijekom 2017. godine lisna uš smilja utvrđena je na 10 lokaliteta na području Hercegovačko-neretvanske županije. Najveća brojnost lisne uši smilja u toj godini zabilježena je na lokalitetu Općuš (Čitluk) kada je od 100 pregledanih biljaka njih 52 bilo zaraženo lisnim ušima. Na ostalim lokalitetima u 2017. godini nije zabilježena veća brojnost osim na lokalitetu Bašaga gdje je utvrđena zaraza na 26 % biljaka.

Tijekom 2018. godine lisna uš smilja utvrđena je na 12 lokaliteta. Na lokalitetima Općuš i Bašaga (Čitluk) te lokalitetima Sretnice i Miljkovići (Mostar) brojnost lisne uši je bila značajnije izražena u odnosu na ostale lokalitete.



Osim u proizvodnim nasadima, istraživanje prisutnosti lisne uši smilja, provedeno je i u zaštićenim objektima u kojima se proizvode presadnice smilja.

Zaštićeni objekti u kojima su provedena istraživanja prisutnosti lisne uši smilja na presadnicama smilja dati su u tabeli 3.

Tabela 3. Zaštićeni objekti u kojima je utvrđena prisutnost lisne uši smilja na presadnicama smilja u 2017. i 2018.

*Table 3 Greenhouses where M. helichrysi was found on seedlings in 2017 and 2018*

Općina <i>Municipality</i>	Lokalitet <i>Site</i>	Koordinate <i>Coordinates</i>	Godina istraživanja <i>Year of research</i>	
			2017.	2018.
Čitluk	Bašaga	43°13.198' N 17°40.359' E	+	+
Čapljina	Čapljina grad	43°6.6880' N 17°42.698' E	+	+
	Višići	43°4.3420' N 17°42.791' E	+	+

U sva tri proizvodna objekta u kojima se obavlja proizvodnja presadnica smilja utvrđena je prisutnost lisne uši smilja u obje godine istraživanja. Najveća brojnost utvrđena je na lokalitetu Bašaga u 2017. godini.

## ZAKLJUČCI

Na osnovi dvogodišnjih istraživanja prisutnosti i proširenosti lisne uši smilja na području Hercegovine mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Istraživanja prisutnosti lisne uši smilja provedena su na 25 lokaliteta koja pripadaju u osam Općina odnosno dvije Županije.
- Istraživanja su provedena tijekom vegetacije (travanj-studenj), vizualnim pregledom biljaka.
- Tijekom 2017. godine lisna uš smilja utvrđena je na 21 lokalitetu, a u 2018. godini na 25 lokaliteta.
- Najveća brojnost lisne uši smilja utvrđena je na lokalitetu Uzarići (Široki Brijeg) u 2017. godini.
- Osim u proizvodnim nasadima smilja, lisna uš smilja utvrđena je i u zaštićenim objektima u kojima se obavlja proizvodnja presadnica smilja u obje godine istraživanja.
- Samo dalja istraživanja faune lisnih uši u nasadima smilja mogu dati jasniju sliku problematike ovih štetnika, koji čine štete u proizvodnji presadnica smilja ali i u proizvodnim nasadima.

## LITERATURA

- Barbagelo, S., Massimino Cocuzza, G. E. (2014): A survey of the Aphid fauna in the Italian regions of Latium and Campania, *Redia*, XCVII, 19-47.
- Beljo, J., Barbarić, M., Čagalj, M., Duranović, A., Filipović, A., Ivanković, M., Kohnić, A., Mandić, A., Leko, M., Prlić, M., Raič, M., Ostojić, I., Trkulja, V. (2016): Ekološka proizvodnja smilja i eteričnog ulja-dosadašnje spoznaje, *Algoritam* Zagreb.
- Džubur, A. (2017): Smilje *Helichrysum italicum* (Rot) G. Don., Univerzitet „Džemal Bijedić“, Agromediteranski fakultet, Mostar.
- Ostojić, I., Zovko, M., Petrović, D. (2016): Štetnici smilja (*Helichrysum italicum*) u plantažnim zasadima na području Hercegovine. *Zbornik sažetaka 13. Simpozij o zaštiti bilja u BiH*, Teslić, 15-17. 11. 2016., pp. 37-38.
- Ostojić, I., Zovko, M., Petrović, D., Bošnjak, L. (2018): Insect pests of immortelle [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don] in field production in the area of Herzegovina. *Fragm. Phytom.*, Vol. 32, No 1. 21-30.
- Petrović-Obradović, O., Smiljanić, D., Radonjić, A., Jovičić, I. (2018): Vaš smilja, *Macrosiphonilla helichrysi* (Hemiptera: Aphididae)- nova vrsta u fauni Srbije, 15. Savjetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 26-30.11. 2018., *Zbornik rezimea radova* st. 79.
- Wrzesińska, D., Sawilska, A., K. (2009): Occurrence of *Macrosiphoniella janckeii* Börner on dwarf everlast [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench], *Prog. Plant Prot.*, Vol. 49, 1: 161-165.
- Wrzesińska, D., Sawilska, A, K. (2010): Butterflies infesting dwarf everlast [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench]. *Prog. Plant Prot.*, Vol. 50, 3: 1322-1326.
- Zovko, M., Ostojić, I., Petrović, D. (2016): Važniji štetnici smilja (*Helichrysum italicum*) kod plantažnog uzgoja na području Hercegovine, *Zbornik rezimea radova 15. Simpozijum o zaštiti bilja, Zlatibor*, 28.11-02.12. 2016., pp. 30-31.

### **THE IMMORTELLE APHID *Macrosiphoniella helichrysi* Remaudière, 1952 (Hemiptera: Aphididae), A NEW SPECIES IN APHID FAUNA IN BOSNIA AND HERZEGOVINA**

#### **Summary**

In the last few years, immortelle (*Helichrysum italicum*) cultivation has experienced rapid expansion and become a very important agricultural species in the area of Herzegovina. Areas under immortelle are constantly increasing, and surfaces where immortelle is planted are ranging from 0.1 up to several tens of hectares. The total estimated area under immortelle in Herzegovina today is around 1500 hectares. A monoculture production system in a large area has resulted in appearing of some insect pests, causing significant damage at some sites. Among others, aphids are one

of the most significant pests of immortalé in Herzegovina. During two-year (2017-2018) presence of aphids from the genus *Macrosiphoniella* on immortalé was researched at 25 sites in the area of West Herzegovina and Herzegovina-Neretva Canton. Collected aphid has been identified as species *Macrosiphoniella helichrysi* Remaudière, 1952. In 2017, aphid *M. helichrysi* were recorded at 21 sites with most abundant population at site Uzarići (Municipality of Široki Brijeg). After visual inspection of 100 randomly chosen immortalé plants, at this site, 63 of them was infested with aphids. In 2018 aphid were recorded at all of 25 inspected sites, and the largest population of *M. helichrysi* was recorded at sites Općuš and Bašaga (Municipality of Čitluk) and Sretnice and Miljkovići (Municipality of Mostar). In addition to open field production, aphid *M. helichrysi* was also found on seedlings from greenhouses.

**Key words:** *Helichrysum italicum*, immortalé, *Macrosiphoniella helichrysi*

## PRVI NALAZ SMEDE MRAMORASTE STJENICE *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) U BOSNI I HERCEGOVINI

Mladen Zovko<sup>1</sup>, Ivan Ostojčić<sup>1</sup>, Dragan Jurković<sup>1</sup>, Nedžad Karić<sup>2</sup>

Izvorni znanstveni rad – *Original scientific paper*

### Rezime

Smeđa mramorasta stjenica *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) je invazivna polifagna vrsta porijeklom iz jugoistočne Azije. Štete pričinjavaju ličinke i odrasli ishranom na različitim ratarskim, povrtnim, voćnim i ukrasnim biljnim vrstama. U jesen 2018. godine vrsta je utvrđena na području Mostara što predstavlja prvi nalaz ove vrste na području Bosne i Hercegovine. Jedna odrasla jedinka smeđe mramoraste stjenice pronađena je u obiteljskoj kući u samom centru grada. Nekoliko tjedana poslije dvije odrasle jedinke su pronađene i na području Čitluka. Osim nalaza na području Hercegovine, jedan imago smeđe mramoraste stjenice uhvaćena je početkom prosinca 2018. godine na graničnom prijelazu između BiH i Hrvatske u blizini Bosanskog Šamca. Identifikacija vrste obavljena je na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru na osnovu morfoloških karakteristika imaga. Trenutna rasprostranjenost, morfološke i biološke odlike vrste, štetnost te mjere suzbijanja ukratko su opisane u ovom radu.

Ključne riječi: *smeđa mramorasta stjenica, Halyomorpha halys, prvi nalaz, invazivna vrsta, Bosna i Hercegovina*

### UVOD

Smeđa mramorasta stjenica *Halyomorpha halys* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) potječe iz Azije, a raširena je na području Kine, Japana, Tajvana i Južne Koreje (Xu i sur., 2013). U Sjevernoj Americi na području savezne države Pensilvanija vrsta je zabilježena 1996. godine (Hoebeke i Carter, 2003) te se veoma brzo proširila širom SAD-a i Kanade (Fogain i Graff, 2011). U Europi je prvi puta zabilježena na području Lihtenštajna 2004. (Arnold, 2009) te u Švicarskoj 2007. (Wermelinger i sur., 2008).

Brzo se proširila Europom te je do danas prisutnost ove stjenice potvrđena u Njemačkoj (Heckmann, 2012), Francuskoj (Callot i Brua, 2013), Italiji (Maistrello i sur., 2014), Grčkoj (Milonas i Partsinevelos, 2014), Mađarskoj (Vétek i sur., 2014), Rumunjskoj (Macavei i sur., 2015), Srbiji (Šeat, 2015), Austriji (Rabitsch i Friebe, 2015), Rusiji, Gruziji i Abhaziji (Gapon, 2016),

<sup>1</sup> Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Mostar, Faculty of Agriculture and Food Technology, University of Mostar

<sup>2</sup> Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of Sarajevo

Korespondencija: ivan.ostojic@sjemenarna.com

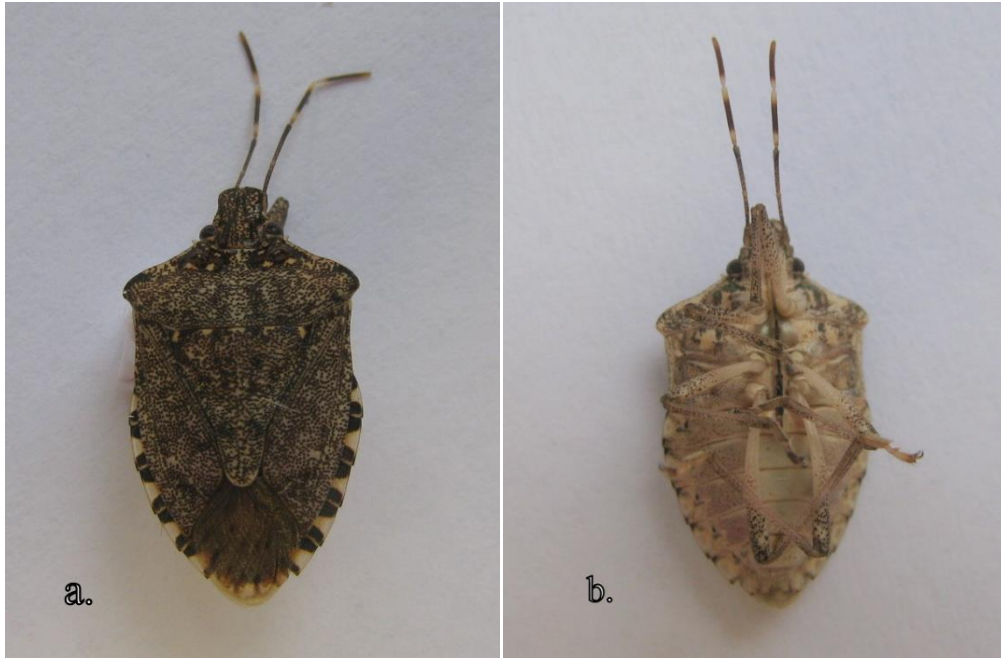
Španjolskoj (Dioli i sur., 2016), Bugarskoj (Simov, 2016), Slovačkoj (Hemala i Kment, 2017), Hrvatskoj (Šapina i Šerić Jelaska, 2018) i Sloveniji (Rot, 2018). Prezime odrasli oblici najčešće unutar kuća i drugih zatvorenih građevina, koje u proljeće od početka travnja pa do sredine lipnja napuštaju u potrazi za biljkama na kojima se hrane (Hoebeke i Carter, 2003; Gill i sur., 2010). Tijekom razvoja vrsta prolazi kroz stadije jaje, ličinka i odrasli oblik. Ženka odlaže jaja u skupinama od 20 do 30 jaja na naličje lista biljaka domaćina. Jaja su buretastog oblika, veličine 1,2 x 1,7 mm, svijetlo žute do svijetlo zelene boje. Na jajima se uočavaju tamnija hitinizirana mjesta u obliku slova T koja pucaju u trenutku izlaženja ličinki iz jaja (Hoebeke i Carter, 2003). Jedna ženka u prosjeku odloži od 124 do 253 jaja (Medal i sur., 2013). Ličinke se pojavljuju 4 do 7 dana nakon ovipozicije. Ličinke prolaze kroz pet razvojnih stadija, a sa svakim presvlačenjem sve više nalikuju potpuno razvijenim kukcima (Oštrec i Gotlin-Čuljak, 2005). Često je na biljkama domaćinima moguće istovremeno pronaći ličinke različitih stadija razvoja. Ličinke su ovalnog oblika, žućkasto-smeđe sa crvenim i crnim šarama. Ličinke zadnjeg stadija razvoja su tamnije. Ličinke je lako determinirati po bijelim oznakama na ticalima i tibijama sva tri para nogu te prisutnosti trnolikih izraštaja na glavi i tamno crvenim očima (Hoebeke i Carter, 2003; Medal i sur., 2013; Hemala i Kment, 2017). Ličinke prvog stadija veličine su 2,4 mm, a odrasle ličinke petog stadija veličine su 12 mm (Hoebeke i Carter, 2003). Prema Medal i sur. (2013) razvoj ličinke do odraslog oblika u laboratorijskim uvjetima traje od 33 do 55 dana. Odrasli oblici veličine su od 12 do 17 mm. Dorzalna strana imaga je žućkasto-smeđe boje prošarana sa tamnim do metalno-zelenkastim točkicama. Na rubovima zadka uočavaju se žućkaste pjege u sredini svakog segmenta. Ventralna strana imaga je žućkasta do žućkasto-smeđa sa rijetkim crnim točkicama. Ticala su u osnovi crna sa specifičnim rasporedom bijelih oznaka na bazalnom i vršnom dijelu četvrtog i petog članka (Slika 1). U subtropskim područjima Kine, Koreje i Japana *H. halys* ima 1–2 generacije godišnje, dok u tropskim južnim područjima Kine razvije 4–6 generacija (Lee i sur., 2013). Prema Bariselli i sur. (2016) vrsta na području središnje Italije (Emiglia Romagna) razvije dvije generacije tijekom godine. Smeđa mramorasta stjenica je izrazito polifagna vrsta. Napada brojne poljoprivredne i ukrasne biljne vrste iz različitih rodova (Leskey i sur., 2012). Vrsta pričinjava značajne štete na važnim poljoprivrednim kulturama poput soje (*Glycine max* (L.) Merr.), graha (*Phaseolus* spp.), kukuruza (*Zea mays* L.), rajčice (*Solanum lycopersicum* L.), paprike (*Capsicum* spp.), jabuke (*Malus domestica* Borkh.), kruške (*Pyrus communis* L.), breskve (*Prunus persica* (L.) Batsch), marelice (*P. armeniaca* L.), vinove loze (*Vitis* spp.), agruma (*Citrus* spp.) (Hamilton i sur., 2008; Wermelinger i sur., 2008; Hamilton, 2009). Štete pričinjavaju odrasli i ličinke sisanjem biljnih sokova iz skoro svih nadzemnih dijelova biljke. Odrasli se hrane sisanjem na plodovima dok ličinke sišu na plodovima, stabljici i listovima. Simptomi napada očituju se u vidu sitnih bjeličastih okruglih uboda, koji naknadno nekrotiziraju. Na plodovima povrtnih kultura, pored unutarnjih oštećenja tkiva, na mjestima sisanja uočavaju se izbljedjela spužvasta plitko ulegla područja. Plodovi se često deformiraju što znatno umanjuje njihovu tržišnu vrijednost.

U slučaju jakog napada, sisanjem na plodovima mogu uzrokovati otpadanje plodova (Hamilton, 2009). Pored direktnih šteta nastalih sisanjem, *H. halys* na dijelovima usnog ustroja može prenijeti patogene bakterije i kvasce poput vrste *Eremothecium coryli* (Peglion) Kurtzman, koje mogu uzrokovati naknadnu trulež plodova (Kuhar i sur., 2012). Štete pričinjava i na ukrasnim drvenastim kulturama poput *Euonymus europaea* L., *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Fraxinus* spp., *Acer* spp., *Sophora japonica* L., *Sorbus aucuparia* L., *Ulmus* spp., *Viburnum* spp., *Catalpa bignonioides* Walter, *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planchon, *Morus* spp., *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud., *Platanus* spp., *Rosa* spp., *Cornus sanguinea* L. i *Syringa* spp. (Hoebeke i Carter, 2003; Wermelinger i sur., 2008; Leskey i sur., 2012; Lee i sur., 2013; Vétek i sur., 2014). Krajem listopada odrasle jedinke stjenica sa poljoprivrednih kultura sele u urbana područja te često, u potrazi za mjestom gdje će prezimjeti, ulaze u stanove, kuće i druge objekte. Budući da su veoma aktivne tijekom toplih zimskih dana, svojom prisutnošću unutar stambenih objekata djeluju uznemirujuće na ljude. Osim toga, kada su uznemirene luče sekrete veoma neugodnog mirisa (Inkley, 2012). Iako rijetko, prisutnost stjenica unutar objekata može izazvati i alergijsku reakciju kod osjetljivih osoba (Mertz i sur., 2012). Kako bi se spriječio ulazak ovih kukaca u objekte, na mjesta prezimljenja, preporučuje se krajem ljeta i početkom jeseni postavljanje zaštitnih mreža na otvore objekata (Hamilton i sur., 2008). U Americi se kao paraziti *H. halys* navode vrste *Telenomus podisi* Ashmead i *Trissolcus halyomorphae* Yang (Hymenoptera: Scelionidae) (Wermelinger i sur., 2008; Fogain i Graff, 2011). Primjenom feromonskih i svjetlosnih lovki moguće je pratiti kretanje i brojnost populacije stjenice na nekom području (Adachi i sur., 2007; Nielsen i sur., 2013). Kao efikasni pripravci za kemijsko suzbijanje stjenice u svijetu se navode pripravci na osnovi djelatnih tvari iz skupina piretroidi i neonikotinoidi, međutim ove djelatne tvari imaju negativan utjecaj na korisne kukce i oprašivače. Osim toga stjenice su veoma pokretne te se često sele sa jedne biljke domaćina na drugu što uvelike otežava kemijske mjere suzbijanja (Leskey i sur., 2012). Cilj istraživanja je prikupljanjem stjenica iz različitih objekata, sa različitih lokaliteta, utvrditi prisutnost i raširenost smeđe mramoraste stjenice na području Bosne i Hercegovine. Osim toga, u radu su ukratko opisane morfološke i biološke odlike vrste *H. halys*, biljke domaćini, štetnost te mjere suzbijanja.

## MATERIJAL I METODE RADA

Tijekom studenog i prosinca 2018. godine te siječnja i veljače 2019. godine prikupljen je veliki broj stjenica, iz porodice Pentatomidae, iz različitih objekata (obiteljske kuće, stanovi, pomoćni objekti uz kuće i sl.). Stjenice su prikupljane sa nekoliko lokaliteta sa područja općine Žepče: Donja Papratnica (44°25'47"N; 17°59'18"E), Vinište (44°25'27"N; 18°07'12"E), Orahovica (44°25'05"N; 18°02'39"E), Šećin Han (44°25'15"N; 18°00'08"E), Ljubna (44°25'41"N; 18°00'10"E) i Bistrica (44°24'54"N; 18°04'49"E). U općini Čitluk istraživanje je provedeno na četiri lokaliteta: Potpolje (43°13'01"N; 17°40'46"E), Bašaga (43°13'24"N; 17°40'36"E), Blizanci (43°12'14"N;

17°44'51"E) i grad Čitluk (43°13'40"N; 17°41'35"E). Na području općine Ljubuški istraživanje je provedeno na lokalitetima Humac (43°11'11"N; 17°32'12"E) i Radišići (43°12'53"N; 17°31'24"E). Stjenice su prikupljane i sa nekoliko lokaliteta sa područja grada Mostara: Dum (43°20'23"N; 17°48'05"E), Balinovac (43°20'29"N; 17°47'52"E), Centar II (43°21'00"N; 17°48'18"E), Panjevina (43°20'03"N; 17°48'05"E) i Rodoč (43°18'45"N; 17°48'32"E). Stjenice su prikupljane rukom u plastične boce sa 70 %-tnim alkoholom. Na svakom uzetom uzorku naznačen je naziv lokaliteta, koordinate te datum prikupljanja uzorka. Osim stjenica prikupljenih sa navedenih lokaliteta sredinom prosinca 2018. godine na laboratorijsku identifikaciju dostavljen je uzorak 1 imaga stjenice na koju se sumnjalo da bi mogla pripadati vrsti *H. halys*. Uzorak je uzet od strane Federalnog fitosanitarnog inspektora sa graničnog prijelaza Bosanski Šamac. Pregled uzoraka i determinacija prikupljenih jedinki rađena je u laboratoriju za zaštitu bilja na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru. Determinacija je rađena na osnovu morfološki karakteristika odraslih jedinki (Hoebeke i Carter, 2003; Wyniger i Kment, 2010).



Sl. 1. Odrasli oblik vrste *H. halys*: a. dorzalno i b. ventralno (foto: Zovko, M.)  
Fig. 1 Adult form of species *H. halys*: a. dorsally and b. ventrally (photo: Zovko, M.)

## REZULTATI I RASPRAVA

Sredinom studenog 2018. godine odrasla jedinka smeđe mramoraste stjenice (*H. halys*) pronađena je unutar obiteljske kuće u samom središtu Mostara, na lokalitetu Dum (43°20'23" N; 17°48'05" E), što predstavlja prvi nalaz ove vrste na području

Bosne i Hercegovine. Na području Mostara vrsta je utvrđena i krajem siječnja 2019. godine kada je jedna odrasla jedinka stjenice slučajno pronađena u učionici na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu, lokalitet Balinovac. Osim pozitivnih nalaza u Mostaru, dva imaga smeđe mramoraste stjenice pronađena su krajem siječnja 2019. godine u obiteljskoj kući u gradu Čitluku. Pregledom uzorka sa graničnog prijelaza Bosanski Šamac potvrđeno je da se radi o vrsti *H. halys*. Jedinke prikupljene sa ostalih lokaliteta pripadale su vrstama *Rhaphigaster nebulosa* (Poda, 1761), *Dolycoris baccarum* (Linnaeus, 1758) i *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758). U tabeli 1 dati su podatci o lokalitetima na kojima je provedeno istraživanje te popis determiniranih vrsta. Lokaliteti na kojima je potvrđena prisutnost smeđe mramoraste stjenice prikazani su na karti (Slika 2).

Tabela 1. Lokaliteti na kojima je provedeno istraživanje te popis determiniranih vrsta  
 Table 1 Localities where research was conducted and list of determined species

Općina Municipality	Lokalitet Locality	Datum Date	Broj jedinki Number of specimens	Determinirana vrsta Species determined
Žepče (ZDŽ)	Donja Papratnica	Studeni 2018.- veljača 2019.	57	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
			7	<i>Dolycoris baccarum</i>
	Vinište	Studeni 2018.- veljača 2019.	11	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
	Orahovica	Studeni 2018.- veljača 2019.	22	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
	Ljubna	Studeni 2018.- veljača 2019.	31	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
			2	<i>Dolycoris baccarum</i>
	Bistrica	Studeni 2018.- veljača 2019.	15	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
Šećin Han	Studeni 2018.- veljača 2019.	18	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>	
Ljubuški (ZHŽ)	Radišići	Studeni 2018.- veljača 2019.	25	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
	Humac	Studeni 2018.- veljača 2019.	9	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
Čitluk (HNŽ)	Blizanci	Studeni 2018.- veljača 2019.	2	<i>Nezara viridula</i>
			27	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
	Bašaga	Studeni 2018.- veljača 2019.	33	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
	Grad Čitluk	Studeni 2018.- veljača 2019.	17	<i>Dolycoris baccarum</i>
			23.01. 2019.	2



	Potpolje	Studeni 2018.- veljača 2019.	37	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
Mostar (HNŽ)	Rodoč	Studeni 2018.- veljača 2019.	8	<i>Nezara viridula</i>
			4	<i>Dolycoris baccarum</i>
			11	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
	Grad Mostar - Dum	Studeni 2018.- veljača 2019.	15	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
			17.11. 2018.	1
	Grad Mostar - Balinovac	28.01. 2019.	1	<b><i>Halyomorpha halys</i></b>
	Grad Mostar - Centar II	Studeni 2018.- veljača 2019.	14	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
Grad Mostar - Panjevina	Studeni 2018.- veljača 2019.	9	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>	
Republika Srpska	Bosanski Šamac	11.12. 2018.	1	<i>Halyomorpha halys</i>



Sl. 2. Raširenost smeđe mramoraste stjenice *Halyomorpha halys* na području Bosne i Hercegovine

*Fig. 2 Current distribution of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in Bosnia and Herzegovina*

Budući da je vrsta ranije zabilježena na području susjednih zemalja, Srbije (Šeat, 2015) i Hrvatske (Šapina i Šerić Jelaska, 2018), sa kojima BiH ostvaruje značajnu trgovinsku razmjenu različitih biljnih kultura, za očekivati je bilo da ova vrsta bude pronađena i na području Bosne i Hercegovine. Većina prvih nalaza ove štetne vrste na području Europe zabilježena je u velikim urbanim područjima i glavnim gradovima [npr. u Ateni (Milonas i Partsinevelos, 2014), Budimpešti (Vétek i sur., 2014), Beču (Rabitsch i Friebe, 2015), Sofiji (Simov, 2016)], ne iznenađuje pronalazak vrste u Mostaru, najvećem gradu i prometnom središtu u Hercegovini. Zbog dobrih letačkih sposobnosti vrste (Wiman i sur., 2015) te

povoljnih klimatski uvjeta i velikog broja biljaka domaćina, za očekivati je u narednom periodu udomaćenje i širenje smeđe mramoraste stjenice na području Bosne i Hercegovine.

## ZAKLJUČCI

Smeđa mramorasta stjenica (*Halyomorpha halys*) invazivna je vrsta stjenice, porijeklom iz Azije. Na području BiH vrsta je prvi put zabilježena sredinom studenog 2018. godine na području grada Mostara. Naknadno je prisutnost vrste zabilježena i na području Čitluka te na graničnom prijelazu Bosanski Šamac. Do sada je na području BiH pronađeno samo pet imaga smeđe mramoraste stjenice. U svijetu su zabilježene značajne štete od *H. halys* na velikom broju poljoprivrednih i ukrasnih biljnih vrsta. Budući da se na području BiH uzgajaju brojne poljoprivredne kulture domaćini ove stjenice, pronalazak ove invazivne vrste predstavlja veliku opasnost za poljoprivrednu proizvodnju. Osim direktnih šteta na različitim biljnim vrstama, stjenica svojom prisutnošću u urbanim područjima djeluje uznemirujuće na čovjeka, posebno u slučaju velike brojnosti koje, kako bi prezimjele često ulaze u objekte koje je čovjek izgradio. Kako se radi o veoma pokretnoj vrsti za očekivati je nove nalaze ove vrste na drugim lokalitetima na području BiH.

## LITERATURA

- Adachi, I., Uchino, K., Mochizuki, F. (2007): Development of a pyramidal trap for monitoring fruit-piercing stink bugs baited with *Plautia crossota stali* (Hemiptera: Pentatomidae) aggregation pheromone. *Applied Entomology and Zoology* 42, 425–431.
- Arnold, K. (2009): *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), eine für die europäische Fauna neu nachgewiesene Wanzenart (Insecta: Heteroptera: Pentatomidae: Cappaeini). *Mitteilungen des Thüringer Entomologenverbandes*. 16 (1): 19.
- Bariselli, M., Bugiani, R., Maistrello, L. (2016): Distribution and damage caused by *Halyomorpha halys* in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46 (2): 332–334.
- Callot, H., Brua, C. (2013): *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), la Punaise diabolique, nouvelle espèce pour la faune de France (Hemiptera: Pentatomidae). *L'Entomologist*, 69 (2): 69-71.
- Dioli, P., Leo, P., Maistrello, L. (2016): Prime segnalazioni in Spagna e in Sardegna della specie aliena *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) e note sulla sua distribuzione in Europa (Hemiptera, Pentatomidae) *Revista gaditana de Entomología*, Volumen VII núm. 1: 539-548.
- Fogain, R., Graff, S. (2011): First records of the invasive pest, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae), in Ontario and Quebec. *J. Entomol. Soc. Ont.* 142: 45–48.

- Gapon, D. A. (2016): First records of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Heteroptera, Pentatomidae) in Russia, Abkhazia, and Georgia. *Entomological Review*, 96: 1086–1088.
- Gill, S., Klick, S., Kenney, S. (2010): Brown marmorated stink bug. IPM Pest Alert. University of Maryland Extension. 4 pp.
- Hamilton, C. G., Shearer, W. P., Nielsen, L. A. (2008): Brown Marmorated Stink Bug - A Non-native Insect in New Jersey. Rutgers, The State University of New Jersey, Fact Sheet FS002 New Brunswick, New Jersey (USA).
- Hamilton, C. G. (2009): Brown marmorated stink bug. *American Entomologist* 55, 19–20.
- Heckmann, R. (2012): Erster Nachweis von *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Heteroptera: Pentatomidae) für Deutschland. *Heteropteron*, 36: 17–18.
- Hemala, V., Kment, P. (2017): First record of *Halyomorpha halys* and mass occurrence of *Nezara viridula* in Slovakia. *Plant Protection Science*, 53 (4): 247–253.
- Hoebeke, E. R., Carter, M. E. (2003): *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae): a polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 105 (1): 225-237.
- Inkley, D. B. (2012): Characteristics of home invasion by the brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Entomological Science*, 47: 125–130.
- Kuhar, T., Kamminga, K., Whalen, J., Dively, G. P., Brust, G., Hooks, C. R. R., Hamilton, G., Herbert, D. (2012): The pest potential of brown marmorated stink bug on vegetable crops. *Plant Health Progress* . doi:10.1094/PHP-2012-0523-01-BR
- Lee, D.-H., Short, B. D., Joseph, S. V., Bergh, J. C., Leskey, T. C. (2013): Review of the biology, ecology, and management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in China, Japan, and the Republic of Korea. *Environmental Entomology*, 42: 627–640.
- Leskey, C. T., Hamilton, G. C., Nielsen, A. L., Polk, D. F., Rodriguez-Saona, C., Bergh, J. C. et al. (2012): Pest Status of the Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* in the USA. *Outlooks on Pest Management* 23, 218–226.
- Macavei, L. I., Băețan, R., Oltean, I., Florian, T., Varga, M., Costi, E., Maistrello, L. (2015): First detection of *Halyomorpha halys* Stål, a new invasive species with a high potential of damage on agricultural crops in Romania. *Lucrări Științifice*, 58: 105–108.
- Maistrello L., Dioli P., Vaccari G., Nannini R., Bortolotti P., Caruso S., Costi E., Montermini A., Casoli L., Bariselli, M. (2014): Primi rinvenimenti in Italia della cimice esotica *Halyomorpha halys*, una nuova minaccia per la frutticoltura. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, 1: 283–288.

- Medal, J., Smith, T., Santa Cruz, A. (2013): Biology of the Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in the Laboratory. Florida Entomologist, 96 (3): 1209-1212.
- Mertz, T. L., Jacobs, S. B., Craig, T. J., Ishmael, F. T. (2012): The brown marmorated stink bug as a new aeroallergen. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 130: 999–1001.
- Milonas, P. G., Partsinevelos, G. K. (2014): First report of brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) in Greece. EPPO Bull 44: 183 - 186.
- Nielsen, A. L., Holmstrom, K., Hamilton, G. C., Cambridge, J., Ingerson-Mahar, J. (2013): Use of black light traps to monitor the abundance and spread of the brown marmorated stink bug. J. Econ. Entomol . 106: 1495–1502.
- Oštrec, Lj., Gotlin-Čuljak, T. (2005): Opća entomologija, Zrinski d.d.
- Rabitsch, W., Friebe, G. J. (2015): From the west and from the east? First records of *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Hemiptera:Heteroptera: Pentatomidae) in Vorarlberg and Vienna, Austria. Beiträge zur Entomofaunistik, 16: 126–129.
- Rot, M., Devetak, M., Carlevaris, B., Žežlina, J., Žežlina, I. (2018): First record of Brown Marmorated Stink Bug (*Halyomorpha halys* (Stål, 1855)) (Hemiptera: Pentatomidae) in Slovenia. Acta Entomologica Slovenica, 26(1): 5-12.
- Simov, N. (2016): The invasive brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Heteroptera: Pentatomidae) already in Bulgaria. Ecologica Montenegrina, Vol. 9: 51-53.
- Šapina, I., Šerić Jelaska, L. (2018): First report of invasive brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) in Croatia. OEPP/EPPO, EPPO Bulletin 0, 1-6.
- Šeat, J. (2015): *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Heteroptera: Pentatomidae) a new invasive species in Serbia. Acta Entomologica Serbica, 20: 167-171.
- Vétek, G., Papp, V., Haltrich, A., Redei, D. (2014): First record of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae), in Hungary, with description of the genitalia of both sexes. Zootaxa 3780 (1): 194-200.
- Wermelinger, B., Wyniger, D., Forster, B. (2008): First records of an invasive bug in Europe: *Halyomorpha halys* Stål (Heteroptera: Pentatomidae), a new pest on woody ornamentals and fruit trees? Mitteilungen-Schweizerische Entomologische Gesellschaft. 81: 1–8.
- Wiman, N. G., Walton, V. M., Shearer, P. W., Rondon, S. I., Lee, J. C. (2015): Factors affecting flight capacity of brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Pest Science, 88, 37-47.
- Wyniger, D., Kment, P. (2010): Key for the separation of *Halyomorpha halys* (Stål) from similar-appearing pentatomids (Insecta: Heteroptera: Pentatomidae) occurring in Central Europe, with new Swiss records. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 83: 261–270.

Xu, J., Fonseca, M. D., Hamilton, C. G., Hoelmer, A. K., Nielsen, L. A. (2013): Tracing the origin of US brown marmorated stink bugs, *Halyomorpha halys*. *Biological Invasions* 16, 153–166.

**FIRST REPORT OF THE BROWN MARMORATED STINK BUG,  
*Halyomorpha halys* (Stål, 1855) IN BOSNIA AND HERZEGOVINA**

**Summary**

The brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) is an invasive, highly polyphagous species, native to Southeast Asia. Adults and larvae of *H. halys* feed on various plant species, including field crops, vegetables, fruit trees, and ornamentals. In the fall of 2018, the species were observed in Bosnia and Herzegovina for the first time, in the city of Mostar. A single specimen was caught inside the family house in the center of Mostar. A few weeks, two more adults were found in municipality of Čitluk. On December 2018, one adult species were caught on Bosnia and Herzegovina–Croatia border crossing near town Bosanski Šamac. Species identification was carried out at the Faculty of Agriculture and Food Technology University of Mostar. Identification was done by morphological characteristics of adults. The current distribution, morphology and biology of the species, harmfulness and control measures are briefly reviewed in this paper.

**Key words:** *brown marmorated stink bug, Halyomorpha halys, first report, invasive species, Bosnia and Herzegovina*

## CITOPATOLOŠKE PROMJENE NA UKRASNIM PETUNIJAMA IZAZVANE VIRUSOM MOZAIKA LUCERKE

Selma Pilić<sup>1</sup>, Anesa Jerković-Mujkić<sup>1</sup>, Sabina Dahija<sup>1</sup>, Renata Bešta-Gajević<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Petunije kao ukrasne biljke, cijenjene su zbog svojih estetskih svojstava i predstavljaju važan dio hortikulture. Viroze na ukrasnim biljkama značajno umanjuju njihovu dekorativnu vrijednost. Cilj ovog istraživanja je utvrditi citopatološke promjene i izvršiti procjenu stepena osjetljivosti odabranih sorti petunija na infekciju uzrokovanu virusom mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus* – AMV).

Virus je pribavljen od renomiranog proizvođača DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Njemačka) i umnožen u duhanu *Nicotiana tabacum* L. “White Burly” sa kojeg je mehaničkim putem prenešen na testirane sorte petunija: *Petunia nana compacta blu x hybrida* (ljubičasta), *Petunia nana compacta rossa x hybrida* (crvena), *Petunia nana compacta bianca x hybrida* (bijela), *Petunia nana compacta multicolor x hybrida* (višebojna) i *Petunia mix* (višebojna). Za mikroskopska istraživanja korištene su epidermalne trake inficiranih i kontrolnih biljaka, koje su bojene Azure A bojom prema metodi Christie & Edwardson (1986).

Biološka karakterizacija virusa mozaika lucerke izvršena je na osnovu karakterističnih simptoma koji su se pojavili nakon perioda inkubacije na test biljkama, a identifikacija virusa je potvrđena DAS-ELISA testom. Mikroskopskom opservacijom virusno inficiranih listova petunija uočeno je prisustvo amorfnih i kristaličnih inkluzija u epidermalnom tkivu. U epidermalnom tkivu zdravih biljaka, virusne inkluzije nisu uočene.

Na osnovu reakcije odabranih sorti petunija na infekciju virusom mozaika lucerke, može se zaključiti da je sorta *Petunia nana compacta rossa x hybrida* pokazala najveći stepen osjetljivosti, dok se sorta *Petunia nana compacta bianca x hybrida* pokazala kao najotpornija. U svrhu održivosti vitalnosti i dekorativnih vrijednosti ukrasnih biljaka, trebale bi se favorizovati sorte biljaka koje su otpornije na viruse.

Ključne riječi: *Alfalfa mosaic virus, dekorativne biljke, DAS-ELISA, virusne inkluzije*

### UVOD

Petunije su cijenjene ukrasne biljke zbog svojih dekorativnih svojstava te imaju veliki ekomonski i hortikulturalni značaj (Mitrofanova *et al.*, 2018). Biljni virusi mogu

---

<sup>1</sup> Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Zmaja od Bosne 33-35, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina  
Korespondencija: [selmam@hotmail.com](mailto:selmam@hotmail.com)

značajno smanjiti dekorativnu vrijednost ukrasnih biljaka (Sanchez – Cuevas & Nameth, 2002). Kako se većina ekonomski značajnih ukrasnih biljaka razmnožava vegetativno, virusna oboljenja su glavna prijetnja u proizvodnji takvih biljaka. Rizik od zaraze virusom u ukrasnim kulturama podignut je dodatnim faktorima kao što su uvođenje i uspostavljanje novih virusnih vektora i/ili novih vrsta virusa u proizvodna područja, unakrsni uzgoj novih potencijalno virusno inficiranih samoniklih biljaka, kulturne prakse u zatvorenim sistemima navodnjavanja i oplodnje itd. (Mitrofanova *et al.*, 2018). Virusni ukrasnih biljaka imaju različit raspon domaćina od kojih su mnogi općeprisutni npr. virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus* - CMV), virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus* - AMV, virus pjegavosti i venuća paradajza (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV) (Hamacher & Egelmann, 2008).

Virus mozaika lucerke tipični je predstavnik roda *Alfamovirus*, porodice Bromoviridae. Ova porodica obuhvata šest rodova: *Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilavirus*, *Oleavirus* (King *et al.*, 2012). AMV je prvi put otkriven 1931. godine od strane Weimera u SAD (Bos & Jaspars, 1971) kao uzročnik oboljenja ekonomski značajne bolesti lucerke i time su započela istraživanja ovog virusa na brojnim domaćinima (Bo1, 1999). Virus mozaika lucerke globalni je fitopatogen sa izuzetno velikim brojem biljnih domaćina (El-Abhar *et al.*, 2018). Virus mozaika lucerke inficira 697 biljnih vrsta iz 71 porodice (Edwardson & Christie, 1997), a svi njegovi domaćini pripadaju dikotiledonim biljkama, većinom iz porodice Solanaceae. AMV se uglavnom pojavljuje u umjerenim klimatskim uslovima, a glavni domaćin virusa mozaika lucerke je višegodišnja krmna biljka lucerka (*Medicago sativa* L.). Virus mozaika lucerke u prirodi se prenosi biljnim vašima na neperzistentan način. Postoji više od 14 vrsta biljnih vaši koje mogu da prenose ovaj virus, uključujući i vrste *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon pisum* i *A. kondoi*. Jedan od najznačajnijih načina prenošenja AMV je putem zaraženog sjemena. Značajan izvor inokuluma AMV predstavljaju zaražena lucerišta, kao bijela i crvena djetelina. Virus se lako prenosi sokom zaraženih biljaka, što je značajno za proizvodnju rasada, kada dolazi do fizičkog kontakta između zaraženih i zdravih biljaka usljed gustog sklopa (Stanković *et al.*, 2011; Bagi *et al.*, 2016; Karić *et al.*, 2016).

Prvi simptomi zaraze virusom mozaika lucerke se ispoljavaju na mladim listovima biljaka početkom vegetacije. To su obično hlorotične pjege koje se sa razvojem bolesti povećavaju i daju simptom mozaika ili šarenila lista. U rano zaraženih biljaka listovi se kovrdžaju i zaostaju u rastu. Posljedice virusne infekcije u konačnici se ogledaju u smanjenom prinosu zelene mase, ploda i sjemena zaražene biljke (Šutić, 1982).

Prisutnost i veliki broj različitih sojeva ovog virusa, značajno utiče na raznolikost u ispoljavanju simptoma oboljenja. Simptomatologija je često otežana i zbog miješanih infekcija sa dva ili više virusa. Čak i unutar izolata virusa sa istog domaćina postoji velika varijabilnost virusa u ispoljavanju simptoma na drugim biljkama (Bagi *et al.*, 2016). Prethodnim istraživanjima uočeno je da AMV na različitim domaćinima izaziva različite simptome i sa različitim intenzitetom ispoljavanja (Al-Shahwan, 2002; El-Abhar *et al.*, 2018). Najkarakterističnija citološka promjena u inficiranoj



ćeliji je pojava virusnih inkluzija ili uklopina, pri čemu je njihov oblik karakterističan za određeni virus, pa samim tim se mogu koristiti i kao dijagnostički karakter (Christie & Edwardson, 1977; Šutić, 1994; Ackermann *et al.*, 2001).

Cilj ovog istraživanja je utvrditi citopatološke promjene u inficiranim biljkama i izvršiti procjenu stepena osjetljivosti odabranih sorti petunija na infekciju uzrokovanu virusom mozaika lucerke.

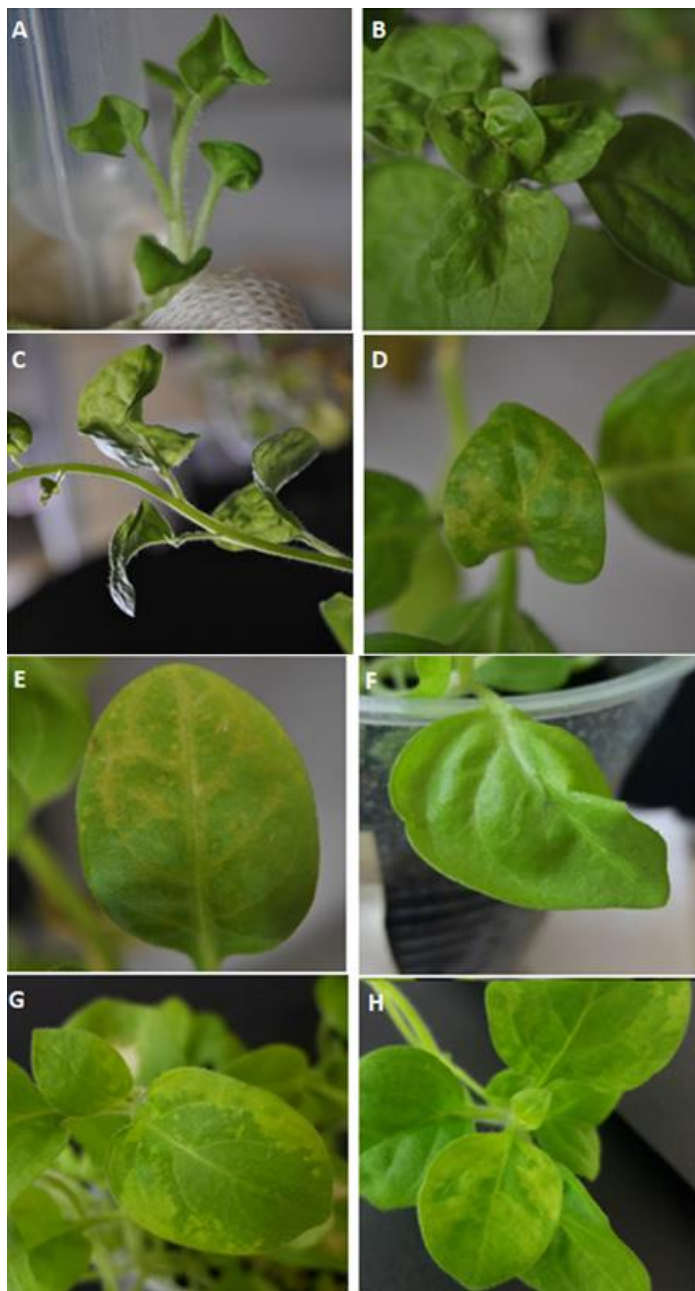
## MATERIJAL I METODE

Virus mozaika lucerke pribavljen je od renomiranog proizvođača DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Njemačka) i umnožen u duhanu *Nicotiana tabacum* L. 'White Burley' sa kojeg je mehaničkim putem uz pomoć 0,1 M fosfatnog pufera, pH 7,0 prenešen na testirane sorte petunija: *Petunia nana compacta blu x hybrida* (ljubičasta), *Petunia nana compacta rossa x hybrida* (crvena), *Petunia nana compacta bianca x hybrida* (bijela), *Petunia nana compacta multicolor x hybrida* (višebojna) i *Petunia mix* (višebojna). Istraživanje je obuhvatilo ukupno 30 biljaka (pet zaraženih i jedna kontrolna biljka za svaku sortu). Test biljke su uzgojene iz zdravog sjemenskog materijala proizvođača Semenarna Ljubljana, „Green Garden“ u kontrolisanim uslovima svjetlosti i temperature u laboratoriji za biljnu virologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Sarajevu. Pojava i razvoj simptoma te reakcija odabranih sorti petunija su svakodnevno posmatrani i zabilježeni fotografisanjem (CANON DIGITAL S3IS). Simptomatični listovi testirani su na prisutnost virusa mozaika lucerke primjenom imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) sa reagensima iz kompleta firme DSMZ i prema uputstvu proizvođača. Za mikroskopska istraživanja i detekciju virusnih inkluzija korištene su epidermalne trake inficiranih i kontrolnih biljaka, koje su bojene Azure A bojom prema metodi koju su opisali Christie & Edwardson (1986). Analiza trajnih mikroskopskih preparata vršena je mikroskopom BestScope BS-2035DA1 pod uvećanjem od 400x. Virusne inkluzije fotografisane su uz pomoć programa Scope Image 9.0.

## REZULTATI RADA

Biološka karakterizacija virusa mozaika lucerke izvršena je na osnovu karakterističnih simptoma na test biljkama koji su se pojavili nakon perioda inkubacije. Prvi simptomi infekcije na petunijama manifestovali su se u vidu izraženog šarenila na rubovima listova i hlorotičnih pjega koje su napredovanjem infekcije postajale sve izražajnije obuhvatajući čitave listove. Spajanjem hlorotičnih pjega nastajala su veća hlorotična polja na listovima. Također, na pojedinim listovima uočavao se žuto - zeleni mozaik.

Deformacija listova i uvijanje lisne plojke zapaženi su kod crvene petunije. Pored ovih simptoma napredovanjem infekcije dolazilo je do vidljivog prosvjetljavanja lisnih nerava. U kasnijoj fazi infekcije pojavljivali su se simptomi mješuravosti i kovrdžavosti lista, pri čemu su lijeva i desna strana lista bile asimetrične. Na svim testiranim sortama petunije infekcija je bila sistemična (Slika 1). DAS - ELISA test potvrdio je prisutnost AMV u inficiranim biljkama petunije, Rezultati seroloških testiranja očitovali su se vizuelno. Promjena boje na ploči je rezultat prisustva virusa za koji su vezana specifična antitijela konjugovana sa enzimom.



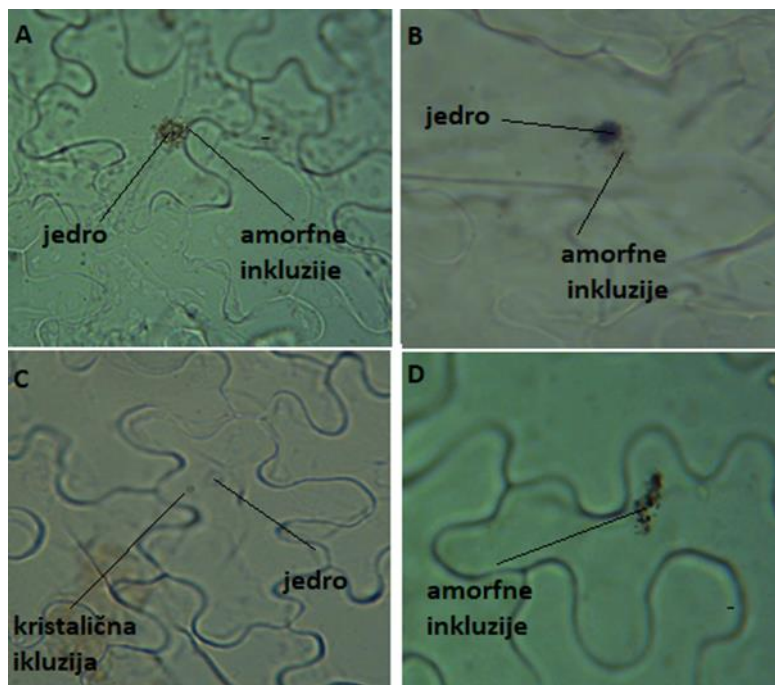
**Slika 1.** Ekspresija simptoma AMV infekcije na testiranim sortama petunija: A) Deformacija listova u razvoju - *Petunia mix*; B) Deformacija listova - *Petunia nana compacta rossa x hybrida*; C) Mješuravost listova - *Petunia nana compacta blu x hybrida*; D) Hlorotično šarenilo - *Petunia nana compacta blu x hybrida*; E) Hlorotično

šarenilo i prosvijetljenje lisnih nerava - *Petunia nana compacta bianca x hybrida*; F) Mjehuravost i kovrdžavost lista - *Petunia nana compacta multicolor x hybrida*; G, H) Hlorotično šarenilo i blagi mozaik listova - *Petunia nana compacta rossa x hybrida*.

**Figure 1.** Symptoms of AMV infection on tested petunia: A) Leaf deformation - *Petunia mix*; B) Leaf deformation - *Petunia nana compacta rossa x hybrida*; C) Deformation of leaves - *Petunia nana compacta blu x hybrida*; D) Chlorotic mottling - *Petunia nana compacta blu x hybrida*; E) Chlorotic mottling, and vein clearing - *Petunia nana compacta bianca x hybrida*; F) Curling and leaf deformation - *Petunia nana compacta multicolor x hybrida*; G, H) Chlorotic mottling and mild mosaic - *Petunia nana compacta rossa x hybrida*.

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju da su vanjski simptomi AMV infekcije bili najizraženiji na sorti *Petunia nana compacta rossa (hybrida)*. Simptomi nešto manjeg intenziteta očitovali su se na ljubičastoj petuniji, odnosno na sorti *Petunia nana compacta blu (hybrida)*, dok je najslabiji efekat virusne infekcije bio zapažen na bijeloj petuniji, odnosno sorti *Petunia nana compacta bianca (hybrida)*.

Mikroskopskom opservacijom epiderme zaraženih listova ispitivanih sorti petunija uočene su amorfne virusne inkluzije smještene oko jedra (Slika 2 A,B,D). Kristalične virusne inkluzije zapažene su samo u ćelijama epiderme lista *Petunia nana compacta blu x hybrida* i *Petunia nana compacta rossa x hybrida* (Slika 2 C). U posmatranom epidermalnom tkivu zdravih biljaka, virusne inkluzije nisu uočene. Mikroskopska analiza tkiva je pokazala da prisustvo inkluzija u ćelijama nije u nužnoj korelaciji s ekspresijom simptoma.



**Slika 2.** Svjetlosna mikroskopija epidermalnih ćelija AMV inficiranih petunija: A) Amorfne virusne inkluzije (*Petunia mix*); B) Amorfne inkluzije oko jedra (*Petunia nana compacta blu x hybrida*); C) Kristalična virusna inkluzija (*Petunia nana compacta rossa x hybrida*); D) Amorfne virusne inkluzije (*Petunia nana compacta multicolor x hybrida*); 400x

**Figure 2.** Light microscopic examination of epidermal strips of the leaves from AMV infected petunia: A) Amorphous virus inclusions (*Petunia mix*); B) Amorphous inclusions near nucleus (*Petunia nana compacta blu x hybrida*); C) Crystalline virus inclusion (*Petunia nana compacta rossa x hybrida*); D) Amorphous virus inclusions (*Petunia nana compacta multicolor x hybrida*); 400x

## DISKUSIJA

Prisutnost virusa mozaika lucerke na području Bosne i Hercegovine prvi put je zabilježena na djetelini *Trifolium pretense* L. i *Trifolium fragiferum* L. (Grbelja, 1974), na vrsti *Syringa vulgaris* L. (Jerković-Mujkić *et al.*, 2012), *Lamium maculatum* L. (Bešta & Jerković-Mujkić, 2011), *Chelidonium majus* L. (Bešta-Gajević *et al.*, 2012), *Potentilla reptans* L. (Bešta-Gajević *et al.*, 2014) i *Malva sylvestris* L. (Bešta-Gajević *et al.*, 2017).

Virus mozaika lucerke je fitopatogen koji je raširen u svijetu i može dovesti do nastajanja infekcije kod velikog broja biljaka. Kao prirodni domaćini ovog virusa navode se mnoge zeljaste i drvenaste, gajene i korovske biljne vrste (Karić *et al.*,

2016). U prirodi AMV pronađen je i kod hortikulturnih biljaka. Većina biljnih domaćina pripada porodicama Fabaceae, Solanaceae i Asteraceae (Jaspars & Bos, 1980; Stanković *et al.*, 2011).

Istraživanje različitih vrsta biljnih virusa na ukrasnim biljkama značajno je za učinkovitu detekciju i sprječavanje daljnjeg širenja infekcije. Petunije su zbog svojih dekorativnih svojstava veoma cijenjene u hortikulturi. Međutim, postoji veliki broj virusa koji mogu inficirati vrste roda *Petunia*, te se one često koriste i kao biljke indikatori za neka virusna oboljenja (Lane, 1992). Simptomi na virusno zaraženim petunijama su veoma varijabilni i zavise od uticaja spoljašnjih faktora, soja virusa, miješane infekcije sa drugim virusima, sorte petunija itd. (Lesemann, 1996). Simptomi virusnih oboljenja koji narušavaju dekorativnu vrijednost petunija su deformacija listova, gubitak boje i deformacija cvjetova, smanjenje broja cvjetova, svijetlo zelene pjege itd. (Sanchez - Cuevas & Nameth, 2002).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da AMV infekcija u ispitivanim sortama petunije uzrokuje morfološke i citološke promjene. Do sličnih rezultata došli su i brojni autori koji su ispitivali utjecaj AMV na drugim biljnim domaćinima (Veerisetty & Brakke, 1977; Al-Shahwan, 2002; Karić *et al.*, 2016; El-Abhar *et al.*, 2018). Budući da su petunije rasle u strogo kontrolisanim uvjetima sredine (temperature, svjetlosti, i vlažnosti), te su inokulisane istim virusom, intenzitet nastalih promjena može se pripisati stepenu osjetljivosti pojedinih sorti petunija na AMV infekciju. U prilog našeg istraživanja ide studija provedena od strane Sanchez - Cuevas & Nameth (2002).

U ovom istraživanju prvi simptomi infekcije su se pojavili nakon 15 dana od inokulacije. Sve sorte petunija reagovala su sistemskom infekcijom. Ispoljeni simptomi bili su karakteristični za alfamovirusnu infekciju, a isti su bili zapaženi i od strane drugih istraživača (Sanchez-Cuevas & Nameth, 2002; El-Abhar *et al.*, 2018). Rezultati seroloških DAS - ELISA testiranja potvrdili su prisutnost AMV u zaraženim biljkama. Na osnovu reakcije test biljaka na AMV infekciju zapažali smo da je sorta *Petunia nana compacta rossa (hybrida)* pokazala najveći stepen osjetljivosti, dok se *Petunia nana compacta bianca (hybrida)* pokazala kao najotpornija na alfamovirusnu infekciju.

U posljednje vrijeme velika pažnja se posvećuje proučavanju virusnih inkluzija, koje su jasan pokazatelj prisustva virusa u ćelijama domaćina. Formiranje inkluzija predstavlja najkarakterističniju promjenu u inficiranoj ćeliji (Ackermann *et al.*, 2001). S obzirom na to da je tip inkluzija karakterističan za svaku vrstu virusa, ove tvorevine se mogu koristiti za dijagnostiku virusnog oboljenja (Pilić *et al.*, 2015; Pilić *et al.*, 2017).

Za detekciju virusnih inkluzija korištene su epidermalne trake mlađih listova, iz razloga što mlađi listovi bolje pokazuju prisustvo virusnih inkluzija u ćelijama. Mikroskopskom analizom epidermalnih traka virusno inficiranih petunija uočena su dva tipa inkluzija: amorfne i kristalične virusne inkluzije. Ova dva tipa inkluzija zapažena su i od strane drugih autora tokom istraživanja AMV infekcije na drugim biljnim domaćinima (Edwardson & Christie, 1991; El-Abhar *et al.*, 2018).

Analizom virusnih inkluzija u ćelijama zaraženih biljaka zapaženo je da su unutrašnji simptomi infekcije bili također, najizraženiji kod sorte *Petunia nana compacta rossa (hybrida)* kod kojih su pored amorfnih virusnih inkluzija bile zapažene i kristalične virusne inkluzije. Kristalične virusne inkluzije zapažene su i epidermalnim ćelijama sorte *Petunia nana compacta blu (hybrida)*. Amorfnе virusne inkluzije uočene su u ćelijama epiderme svih virusno inficiranih sorti petunija.

S obzirom na nekontrolisani uvoz kako kultivisanih tako i hortikulturalnih biljaka postoji opravdana sumnja da te biljke mogu biti potencionalni izvori virusne zaraze za druge kako gajene tako i samonikle biljke. Zbog toga je potrebno poznavanje svih raspoloživih mjera, odnosno metoda za brzu i pouzdanu dijagnozu biljnih virusa (Krstić *et al.*, 2002). Jedan od pristupa u rješavanju ovog problema je poznavanje stepena osjetljivosti određenih ukrasnih biljaka na pojedine bolesti i štetnike, što je od izuzetne važnosti za njihov odabir u hortikulturi.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu reakcije odabranih sorti petunija na infekciju virusom mozaika lucerke može se zaključiti da je sorta *Petunia nana compacta rossa x hybrida* pokazala najveći stepen osjetljivosti, dok se sorta *Petunia nana compacta bianca x hybrida* pokazala kao najotpornija. Dobiveni rezultati ukazuju da virus mozaika lucerke narušava dekorativnu vrijednost petunija, te je potrebno da stručna javnost i proizvođači obrate posebnu pažnju na identifikaciju i karakterizaciju biljnih virusa na ukrasnim biljkama. Također, potrebno je pri uvozu i uzgoju ukrasnih petunija voditi računa o izboru otpornijih sorti na infekciju virusom mozaika lucerke kao što je sorta *Petunia nana compacta bianca (hybrida)*.

## LITERATURA

- Ackermann, W. H., Berthiaume, L., Tremblay, M. (2001): Viral pathogenesis in Diagrams. CRC Press, Boca Roton.
- Al-Shahwan, I. M. (2002): Alfalfa mosaic virus (AMV) on alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Saudi Arabia. *Assuit Journal of Agriculture Science*, Vol. 33, pp. 21-30.
- Bagi, F., Jasnić, S., Budakov, D. (2016): Viroze biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Bešta, R., Jerković-Mujkić, A. (2011): Detection of triple virus infection in *Lamium maculatum* L. in Sarajevo area. 19 th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Banja Vrujci, pp. 87.
- Bešta-Gajević, R., Jerković-Mujkić, A., Pilić, S. (2012): Detection of natural triple virus infection in *Chelidonium majus* L. 19. tagung der Austrian Society of plant Biology, Lienz, pp. 45.
- Bešta-Gajević, R., Jerković-Mujkić, A., Pilić, S. (2014): Nalaz miješane virusne infekcije na *Potentilla reptans* L. XI Simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, pp. 20.

- Bešta-Gajević, R., Jerković-Mujkić, A., Pilić, S. (2017): Prvi nalaz virusa mozaika lucerke na vrsti *Malva sylvestris* L. u Bosni i Hercegovini. 14. Simpozijum o zaštiti bilja u BiH sa međunarodnim učešćem, Mostar, pp. 88.
- Bol, J. F. (1999): Alfalfa mosaic virus and Ilarviruses: Involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *J. Gen. Virol.*, Vol. 80, pp. 1089-1102.
- Bos, L., Jaspars, E.M.J. (1971): Alfalfa mosaic virus. Description of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England, No. 46; pp. 4.
- Christie, R. G., Edwardson J. R. (1986): Light Microscopie Techniques for Detection of Plant Virus Inclusions. *Plant Dis.*, Vol. 70, pp. 273-279.
- Cristie, R. G., Edwardson J. R. (1977): Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusions. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Edwardson, R. J., Christie, R. G. (1991): Handbook of Viruses Infecting Legumes. CRC Press, Inc.
- El-Abhar, A. M., Elkady, A. M., Ghanem, M. K., Bosila, A. H. (2018): Identification, characterization and ultrastructure aspects of Alfalfa mosaic virus infecting potato (*Solanum tuberosum* L.) in Egypt. *Journal of Virological Sciences*, Vol. 3, pp. 68-77.
- El-Abhar, M. A., Elkady, M.A., Ghanem, K.M., Bosila, H.A. (2018): Identification, characterization and ultrastructure aspects of Alfalfa mosaic virus infecting potato (*Solanum tuberosum* L.) in Egypt. *J. of Virol. Sci.*, Vol. 3: 68- 77.
- Grbelja, J. (1974): Alfalfa Mosaic Virus on Clovers in Yugoslavia. *Acta Bot. Croat.*, Vol. 33, pp. 23-29.
- Hamacher, J., Engelmann, J. (2008): Plant Virus Diseases: Ornamental Plants. In book: Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, Edition: 1st Edition, Chapter: Plant virusdiseases: Ornamental plants, Publisher: Elsevier, Academic Press, Editors: B.W.H. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel, pp. 207-229.
- Jaspars, E. M. J., Bos, L. (1980): Alfalfa mosaic virus. Association of Applied Biologists Description of Plant Viruses, pp. 229.
- Jerković-Mujkić, A., Delić, O., Bešta, R. (2012): Biodiverzitet biljnih virusa urbanog zelenila Sarajeva. *Radovi ANUBIH, Knjiga 22, Sarajevo 2012. EBSCO*, pp. 111-121.
- Karić, N., Trkulja, V., Smajlović, E., Zovko, M., Radović, R., Slusarski, C., Bugiani, R. (2016): Smjernice za integralnu zaštitu paradajza, paprike i patlidžana na otvorenom polju. Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Uprava BiH za zaštitu zdravlja bilja, Sarajevo.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (2012): Viruses Taxonomy; Classification and Nomenclature of Viruses; Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, New York.

- Krstić, B., Vico, I., Dovas, C., Eythimiou, C., Katis, N.I., Berenji, J. (2002): Molekularna detekcija i delimična karakterizacija jugoslovenskih izolata virusa mozaika krastavca. Zbornik rezimea XII Simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, Srbija, pp. 74.
- Lane, L. C. (1992): A general method for detecting plant viruses. In: K. Maramorosch (ed.). Plant Diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain etiology. Westview Press, Boulder, Colo.
- Lesemann, D.E. (1996): Viruses recently detected in vegetatively propagated *Petunia*. Acta Hort, No. 432; pp. 88-94.
- Mitrofanova, I.V., Zakubanskiy, A.V., Mitrofanova, O.V. (2018): Viruses infecting main ornamental plants: an overview, Vol. 24, No. 2; pp. 95-102.
- Pilić, S., Jerković-Mujkić, A., Bešta-Gajević, R. (2017): Citopatološke promjene u inficiranim biljkama uzrokovane virusom mozaika krastavca izoliranim iz *Buddleia davidii* Franch. XIV Simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini. Društvo za zaštitu bilja u BiH, Mostar, pp. 87.
- Pilić, S., Jerković-Mujkić, A., Bešta-Gajević, R. (2015): Leaf anatomy changes in two pepper cultivars caused by CMV infection. XII Simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini. Društvo za zaštitu bilja u BiH, Mostar, pp. 95.
- Sanchez – Cuevas, M. C., Nameth, S. G. P. (2002): Virus-associated Diseases of Double *Petunia*: Frequency and Distribution in Ohio Greenhouses. Hort Science: Plant Pathology, Vol. 37, No. 3; pp. 543-546.
- Stanković, I., Vučurović, A., Bulajić, A., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2011): Prisustvo i molekularna karakterizacija virusa mozaika lucerke u usevu duvana u Srbiji. Pestic. Phytomed., Vol. 26, No. 3; pp. 229-243.
- Šutić, D. (1982): Viroze biljaka. Nolit, Beograd.
- Šutić, D. (1994): Biljni virusi. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Veerisetty, Y., Brakke, M. K. (1977): Alfalfa Latent Virus, a Naturally Occurring Carlavirus in Alfalfa. Plant Pathology, Vol. 67, pp. 1202-1206.

## **CYTOPATHOLOGICAL CHANGES INDUCED BY *ALFALFA MOSAIC VIRUS* INFECTION IN ORNAMENTAL *PETUNIA***

### **Summary**

*Petunias* are cultivated because of their ornamental flowers that are available in variety of colours and shapes. Due to high diversity of viruses that infect ornamental plants their decorative value and quality can be significantly reduced.

The aim of this study was comparative examination of *Alfalfa mosaic virus* (AMV) effects on some morphological and physiological characteristics in infected *petunia* cultivars.



*Alfalfa mosaic virus* was purchased from Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany. Virus was maintained and propagated in *Nicotiana tabacum* L. 'White Barley' plants. Viral inoculum prepared from AMV infected tobacco leaves was used to inoculate following test plants: *Petunia nana compacta blue x hybrida*, *Petunia nana compacta rossa x hybrida*, *Petunia nana compacta bianca x hybrida*, *Petunia nana compacta multicolor x hybrida* and *Petunia mix*.

Serological identification of virus in infected plants was made by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method. The presence of cytoplasmic virus inclusions was determined by light microscopic examination of epidermal strips of the leaves from infected plants according to Christie and Edwardson (1986). The crystalline inclusions were observed in epidermal cells of infected plants as well as amorphous inclusions. Based on the results we can conclude that AMV infected *Petunia nana compacta rossa x hybrida* showed the greatest degree of sensitivity while *Petunia compacta bianca x hybrida* was the most resistant to virus infection. We consider that knowledge of the sensitivity degree of different petunias cultivars to *Alfalfa mosaic virus* is of importance for their selection in ornamental production.

Keywords: *Alfalfa mosaic virus*, *ornamental plants*, *DAS-ELISA*, *inclusion bodies*

## KREIRANJE PROGNOZNOG MODELA ZA PLAMENJAČU KRASTAVCA U AGROEKOLOŠKIM USLOVIMA TUZLANSKOG KANTONA

Almira Konjić<sup>1</sup>, Mirsad Kurtović<sup>1</sup>, Fuad Gaši<sup>1</sup>, Jasmin Grahić<sup>1</sup>, Osman Musić<sup>1</sup>, Mirza Uzunović<sup>1</sup>, Sabrija Čadro<sup>1</sup>, Alen Mujčinović<sup>1</sup>, Arnela Okić<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Plamenjača krastavca, čiji je uzročnik pseudogljiva *Pseudoperonospora cubensis*, spada u ekonomski najznačajnija oboljenja krastavca. Programi zaštite krastavca od ovog oboljenja temelje se skoro isključivo na primjeni fungicida, što s obzirom na sve strožije kriterije tržišta može predstavljati dodatan problem za poljoprivredne proizvođače i otežati plasman proizvoda. Mogući način reduciranja upotrebe pesticida bez gubitka efikasnosti zaštite krastavca pri kontroli plamenjače je upotreba izvještajno-prognoznih sistema koji bi predvidjeli tok progresu oboljenja i omogućili pravovremenu aplikaciju fungicida. Jedan takav sistem je implementiran u Bosni i Hercegovini pod nazivom VIPS i ima za cilj unapređenje integralne zaštite i uvođenje informacijsko-komunikacijskih tehnologija u bosanskohercegovački poljoprivredni sektor. U sklopu ovog rada, kreiran je empirijski model za prognozu plamenjače krastavca baziran na podacima o relativnoj temperaturi zraka, periodu vlažnosti lista i njihovom međusobnom odnosu sa infekcijskim procesom patogena. Model je testiran na oglednom polju u *ex situ* uvjetima na području Tuzlanskog kantona u jednoj vegetacijskoj sezoni, primjenom različitih evaluacijskih metoda, te je ustanovljena podudarnost predviđanja rizika infekcije sa realnim uslovima u polju. Primjenom programskog alata „R“ su izvedeni parametri pomoću kojih je razvijen jednostavni prognozni model i kreiran algoritam prikladan za inkorporaciju u VIPS izvještajno-prognoznom sistemu. Prognozni model razvijen u sklopu ovog rada je neophodno dalje testirati.

Ključne riječi: *prognozni model, plamenjača krastavca, integralna zaštita biljaka, IC*

### UVOD

Plamenjača krastavca (*Pseudoperonospora cubensis*) se smatra najštetnijom bolesti u porodici *Cucurbitaceae* širom svijeta (Ojiambo *et al.*, 2015). Prilikom suzbijanja ovog patogena, kao i plamenjača uzrokovanih pseudogljivama uopšteno, poljoprivredni proizvođači susreću se s nizom problema (Gilles, 2004): i) mnogi varijeteti nisu u potpunosti rezistentni na plamenjače, ii) patogeni koji uzrokuju plamenjače imaju, veoma često, kratak period latencije nakon infekcije što dovodi do

<sup>1</sup> Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo  
Korespondencija: almira.konjic@gmail.com

progresije oboljenja tokom kratkog vremenskog perioda, iii) populacije patogena plamenjača mogu stvoriti rezistentnost na fungicide, iv) vlade i trgovački lanci su odredili ograničenja u broju tretiranja fungicidima tokom proizvodnje i rezidua fungicida na plodovima tokom berbe i v) broj registriranih fungicida je značajno smanjen. Kako bi ostvarili pristup tržištu, poljoprivredni proizvođači moraju da poštuju važeću legislativu, ali u isto vrijeme moraju i da obezbijede zaštitu svojih usjeva, što dodatno otežava odveć tešku poziciju poljoprivrednih proizvođača.

Efikasan način kontrole oboljenja plamenjače uz smanjenu upotrebu pesticida pronalazi se u prognoznim modelima baziranim na klimatskim parametrima (Lebeda & Cohen, 2011; Kim, Beresford, & Walter, 2014; Reis, Sônego, & Mendes, 2013). Glavni cilj ovakvih prognoznih modela je efikasna i održiva zaštita poljoprivrednih kultura i racionalizacija primjene pesticida, njihovom primjenom isključivo u momentima postojanja povoljnih uvjeta za infekciju (Gilles, 2004). Ovakvi i slični prognozni modeli, kao što su na primjer i modeli za praćenje potreba za navodnjavanjem (Čadro *et al.*, 2017) ili određivanja vremena sjetve/sadnje poljoprivrednih kultura, uklapaju se u osnovni koncept precizne poljoprivrede koja predstavlja primjenu prave mjere na pravom mjestu u pravo vrijeme (Gebbers & Adamchuk, 2010). Modeli koji se odnose na zaštitu poljoprivrednih kultura, vrlo često su bazirani na podacima tabelarnog prikaza koji opisuju interakciju pojedinačnih faktora poput vlažnosti lista, temperature zraka i njihovog međusobnog odnosa pri progresu infektivnog procesa patogena (Reis *et al.*, 2013). Trenutno, bosansko-hercegovački proizvođači pored izvještajno-prognoznih službi, imaju na raspolaganju web platformu VIPS (norv. *Varsling innen planteskadegjørere* – notifikacija o štetniku) koja je implementirana u sklopu HERD (Programme for Higher Education, Research and Development) projekta od strane Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu. Navedena platforma sadrži nekoliko prognoznih modela, pokrivajući najznačajnije bolesti voćarskih kultura, a nudi mogućnost proširenja na povrtlarske kulture.

Imajući u vidu potrebe tržišta, glavni cilj ovog rada je razvoj jedinstvenog empirijskog predikcijskog modela, baziranog na klimatskim parametrima neophodnim za ostvarivanje infekcije *P. cubensis* u agroekološkim uslovima Tuzlanskog kantona (TK).

## MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje se sastojalo iz dva dijela, pri čemu su u prvom dijelu određeni lokacija istraživanja i definisani klimatski parametri koji odgovaraju razvoju ispitivanog patogena. Drugi dio istraživanja se sastojao iz kreiranja prognoznog modela te evaluacije istog. U sklopu navedenog je izvršeno određivanje intenziteta infekcije, te su svi podaci statistički obrađeni.

## Lokacija istraživanja i klimatski parametri

Istraživanje je provedeno na plantaži krastavaca kornišona na području Topličkog polja (općina Živinice, Tuzlanski kanton). Plantaža s dvije proizvodne parcele nalazi se u vlasništvu Plant d.o.o. Tuzla, a rasprostire se na ukupnoj površini od 21 hektar. U svrhu realizacije planiranih aktivnosti u sklopu ovog istraživanja, na svaku parcelu je postavljena po jedna mini-meteorološka stanica iMETEOS IMT 200 (Pessl, Austrija) koja na satnom nivou mjeri temperaturu zraka (T), relativnu vlažnost zraka (RH), količinu padavina (P) i vlažnost lista.

## Kreiranje prognoznog modela

U sklopu ovog rada kreiran je testni model za predviđanje pojave infekcije. Ovaj model je nastao kombinacijom podataka iz Berlandove inkubacijske tabele (Maceljski *et al.*, 2004) i optimalnih temperatura neophodnih za ostvarenje infekcije uz dati period vlažnosti lista (Cohen, 1977) (prilog 1 i 2). U cilju prilagodavanja polaznog modela u VIPS prognozni sistem izvršeno je kreiranje algoritma za elektroničku obradu podataka. Tačnije, kreirana je formula pomoću koje se vrši usporedba opsega podataka iz prognozne tabele, s podacima koji su prikupljeni pomoću meteoroloških stanica u polju:

$$IF(OR(AND(B2 \geq 12; C2 \geq 13; C2 \leq 15); AND(B2 \geq 6; C2 \geq 15; C2 \leq 21); AND(B2 \geq 2; C2 \geq 21; C2 < 30))); "Infekcija" "Nema infekcije")$$

Kod navedenog algoritma, veličina B2 predstavlja zabilježeni period vlažnosti lista a C2 zabilježenu temperaturu za određeni dan. Kao povoljni uslovi za nastanak infekcija precizirani su sljedeći parametri: i) vlažnost lista u trajanju od 12 i više sati pri temperaturama 13-15 °C, ii) vlažnost lista u trajanju od 6 i više sati pri temperaturama 15-21 °C i iii) vlažnost lista u trajanju od 2 i više sati pri temperaturama 21-30 °C.

## Evaluacija modela

Evaluacija je izvršena u svrhu ispitivanja pouzdanosti kreiranog modela u prognoziranju pojave infekcije. Tačnije, ispitivano je da li se prognozirani momenat infekcije podudara sa stvarnim uslovima na određenoj parceli, te da li je po isteku inkubacijskog perioda došlo do pojave simptoma na biljkama. Monitoring je proveden u periodu povoljnih vremenskih uslova za infekciju, te nakon isteka perioda inkubacije. Biljni materijal koji je pokazivao simptome koji asociraju na infekciju patogenom *P. cubensis* je podvrgnut laboratorijskom istraživanju radi konačne dijagnoze. Dodatna provjera momenta nastanka infekcije je provedena pomoću Bait-testa primjenom biljaka krastavca uzgojenih u kontroliranim uslovima. U momentu pojave povoljnih uslova za infekciju, biljke su iznesene u polja gdje su zadržavane 24 sata. Nakon toga, vraćene su u kontrolirane uslove i praćene do pojave simptoma.

## **Intenzitet infekcije**

Utvrđivanje intenziteta zaraze vršeno je u svrhu analize rizika i procjene ekonomskih gubitaka uzrokovanih plamenjačom krastavca. Uzorci su prikupljeni krajem vegetacije, u septembru 2017. godine. Listovi su kategorisani u skupine 0-4 prema skali koju je predložio Numić (1996). Indeks oboljenja računat je prema McKinney-ovoj formuli (Numić, 1996).

## **Ispitivanje uticaja nezavisnih faktora na pojavu infekcije (Statistička obrada podataka i modela)**

Podaci dobijeni primjenom modela za prognozu plamenjače krastavca su obrađeni upotrebom programskog jezika za statističku obradu podataka "R". Period vlažnosti lista i temperatura zraka su identifikovane kao nezavisne varijable  $x_1$  i  $x_2$ , dok je kao zavisna varijabla  $y$  korištena potvrda o pojavi infekcije.

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

U sklopu rada, na bazi dobivenih meteoroloških podataka i dostupnih literaturnih navoda o razvojnim pragovima pseudogljive *Pseudoperonospora cubensis*, kreiran je prognozni model za plamenjaču krastavca i testiran u agroekološkim uslovima TK. Pomenuti model (tabela 1) je kreiran kombiniranjem prognoznih pragova za ostvarivanje infekcije koje su predložili Maceljski *et al.* (2004) i Cohen (1979) i potom testiran u *ex situ* uvjetima.

U vremenskom periodu od 2. augusta do 6. septembra, prikupljeni su podaci s meteoroloških stanica. Za ovo istraživanje su korišteni podaci o vlažnosti lista i temperaturama zraka koje su mjerene svakih sat vremena tokom dana. Isti podaci su upoređeni sa podacima iz prognozne tabele (tabela 1) pomoću algoritma za elektroničku obradu podataka. Navedeno je omogućavalo prognoziranje momenta infekcije na datom području u periodu ispitivanja modela.

Tabela 1. Parametri polaznog prognoznog modela

*Table 1. Parameters of initial forecasting model*

Temperatura zraka °C	Period vlažnosti lista (h)	Inkubacija (dani)
13	12	10
14	12	8
15	6	7
16	6	6
17	6	4
18	6	4
19	6	4
20	6	3
21	2	3
22	2	2
23	2	2
24	2	2
25	2	2
26	2	2
27	2	3
28	2	4
29	2	5
30	2	6

Shodno istraživanju koje su sproveli Lebeda i Cohen (2011), period prosušivanja lista od vlage minimalno 15 minuta, su označavani kao završetak jednog infekcijskog perioda, te se svaki naredni period vlažnosti posmatrao kao novi. Kao krajnji rezultat primjene formule dobivena je povratna informacija o prisustvu ili odsustvu povoljnih uslova za razvoj infekcije.

Modelom su obuhvaćeni i specifični uslovi za nastanak infekcije poput temperature zraka od 13 °C uz vlažnost lista koja traje duže od 12 sati. Iz tabele 2 je vidljivo da su se u nekoliko navrata pojavili povoljni vremenski uslovi za ostvarivanje infekcije tokom perioda ispitivanja. Ukupan broj zabilježenih infekcionih perioda tokom istraživnog perioda (6. 8. - 2. 9. 2017. godine) je 22. Poređenjem infekcijskih perioda koji su se desili u uslovima TK (tabela 2) s Cohenovim istraživanjem (1977), u kome su ispitivani uslovi temperature i perioda vlažnosti lista pri kojima dolazi do infekcije, može se zaključiti da postoji međusobna podudarnost između uslova u kojima se desila infekcija.

Tabela 2. Prikaz dijela infekcionih perioda koji su se desili na ispitivanom polju  
 Table 2. An overview of the part of the infectious periods that occurred on the test field

Datum	Vlažnost lista (h)	Temperatura zraka °C	Prognoza
06. aug	5,75	24,15	Infekcija
07. aug	15,92	20,48	Infekcija
08. aug	3,83	19,33	Nema Infekcije
09. aug	8,92	27,16	Infekcija
10. aug	8,83	28,03	Infekcija
11. aug	7,67	28,83	Infekcija
12. aug	6,00	20,82	Infekcija
	9,75	20,01	Infekcija
13. aug	16,00	17,10	Infekcija
14. aug	9,67	20,45	Infekcija
	3,00	20,63	Nema Infekcije
15. aug	7,83	19,68	Infekcija
16. aug	3,25	15,55	Nema Infekcije
17. aug	0,00	0,00	Nema Infekcije
18. aug	4,83	17,90	Nema Infekcije
19. aug	0,00	0,00	Nema Infekcije
20. aug	2,92	17,73	Nema Infekcije

## Evaluacija modela

Nakon završetka prvog predviđenog perioda za ostvarivanje infekcije (6. 8. i 7. 8. 2017) i odgovarajućeg inkubacijskog perioda za pojavu simptoma provedena su terenska opažanja i prikupljanje uzoraka. Na prikupljenim uzorcima lišća bile su jasno vidljive okrugle svjetlo-zelene ili žuto-smeđe pjege koje su listovima sa većim nivoom zaraze davale mozaičan izgled (slika 1). U laboratoriji je naknadno potvrđena infekcija sa *P. cubensis*. Pouzdanost modela je dodatno ispitivana pomoću test biljaka koje su izložene terenskim uslovima u periodu 1. 9 i 2. 9. 2017, kada je model predvidio infekciju. Po isteku 24-satnog perioda, test biljke su vraćene u zatvoreni prostor i redovno se pratio razvoj bolesti pri temperaturi od 23 °C. Nakon 4 dana inkubacije primjećeni su simptomi bolesti. Analizom uočenih simptoma na test biljkama potvrđeno je prisustvo infektivnog inokuluma na ispitivanom području, ali i inkubacijski period koji je patogenu neophodan za razvoj simptoma na biljkama.



Slika 1. Simptomi plamenjače na listovima krastavca

Foto: Konjić A.

*Photo 1. Symptoms of cucumber downy mildew on cucumber leaves*

*Foto: Konjić A.*

Pojavljivanje simptoma i utvrđivanje prisustva patogena u momentima predviđenih povoljnih uslova za infekciju potvrđuje pouzdanost modela.

### **Određivanje intenziteta infekcije**

Izračunati McKinney-evi indeksi oboljenja ukazuju na značajno obolijevanje biljaka i to, 54,69% za prvo i 81,25% za drugo polje. Rezultati ovih istraživanja se podudaraju sa tvrdnjama drugih autora u pogledu ekonomskog značaja plamenjače krastavca, tj. da bolest može uzrokovati značajne ekonomske gubitke ukoliko se ne vrši pravilno kontrolisanje bolesti (Cooper, 2012). Uzimajući u obzir činjenicu da se model, kreiran je širenja i smanjenje intenziteta infekcije. Pri tome se postiže racionalnija upotreba fitofarmaceutskih sredstava.

### **Ispitivanje utjecaja nezavisnih faktora na pojavu infekcije**

Ispitivanje utjecaja nezavisnih faktora na pojavu infekcije izvršeno je pomoću statističkog testa višestruke linearne regresije. Ovaj test je obrađen pomoću



programskog okruženja „R“, te su izračunate veličine prikazane u tabeli 3. Regresioni koeficijent za polje 1 iznosi  $\beta_0 = -1,218$ , a za polje 2  $\beta_0 = -1,717$ . Koeficijenti nezavisnih varijabli  $\beta_1$  i  $\beta_2$  predstavljaju linearni odnos faktora  $x_1$  i  $x_2$  u odnosu na zavisni faktor  $y$  pri čemu isti iznose  $\beta_1 = 0,06893$  i  $\beta_2 = 0,06548$  za polje 1, a za polje 2  $\beta_1 = 0,146$  i  $\beta_2 = 0,080$ . Uvrštavanjem dobivenih veličina u formulu:  $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$  pri čemu su kao nezavisni faktori  $x_1$  i  $x_2$  uzete izmjerene veličine temperature i vlažnosti zraka za svaki dan u ispitivanom periodu, dobivene su veličine nezavisnog faktora  $y$  za svaku od veličina.

Tabela 3. Utjecaj temperature zraka i vlažnosti lista na pojavu plamenjače krastavca u poljima 1 i 2

Table 3. Effect of air temperature and leaf wetness on occurrence of cucumber downy mildew in fields 1 and 2

<b>Polje 1</b>				
Pokazatelj	Procjena	Standardna greška	t veličina	Pr (> t )
Regresioni koeficijent	-1.21863	0.26479	-4.602	$8.87 \times 10^{-05}$ ***
Vlažnost lista	0.06893	0.01488	4.634	$8.15 \times 10^{-05}$ ***
Temperatura	0.06548	0.01310	4.997	$3.07 \times 10^{-05}$ ***
Nivo značajnosti	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '!' 0.1 '' 1
Rezidualna standardna greška	0.2891 na 27 stepeni slobode			
Multipli $R^2$	0.6977	Prilagođeni $R^2$	0.6753	
F-veličina	31.16 na 2 i 27 stepeni slobode	P veličina	$9.686 \times 10^{-8}$	
<b>Polje 2</b>				
Pokazatelj	Procjena	Standardna greška	t veličina	Pr (> t )
Regresioni koeficijent	-1.71719	0.36423	-4.715	0.000200 ***
Vlažnost lista	0.14655	0.02706	5.416	$4.63 \times 10^{-05}$ ***
Temperatura	0.08030	0.01834	4.379	0.000409 ***
Nivo značajnosti	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '!' 0.1 '' 1

<i>Rezidualna standardna greška</i>	0.2693 na 17 stepeni slobode		
<i>Multipli R<sup>2</sup></i>	0.7064	Prilagođeni R <sup>2</sup>	0.6719
<i>F-veličina</i>	20.45 na 2 i 17 stepeni slobode	P veličina	2.992 x 10 <sup>-5</sup>

Poređenjem izračunatih veličina nezavisnog faktora  $y$  sa periodima pojave infekcije, moguće je odrediti opsege faktora pri kojima se infekcija javlja. Na osnovu minimalne srednje veličine za period kada se desila infekcija i maksimalne srednje veličine za period kada se nije desila infekcija, određeno je koja dužina vlažnosti lista zapravo odgovara određenoj temperaturi za uspostavu infekcije. Na osnovu dobivenih veličina, izvorna prognozna tabela (*tabela 1*) je modificirana, pri čemu se izmjene odnose na promjene broja sati vlažnosti lista neophodnog za ostvarivanje infekcije (*tabela 4*). Ukoliko uporedimo podatke iz polazne prognozne i modificirane tabele, vidljivo je da su provedenim testiranjima preciznije određeni potrebni periodi vlažnosti lista pri temperaturama zraka od 15-18 °C, 21-22 °C te 26-30 °C. Za temperature iznad 26 °C, model pokazuje da je za uspješnu infekciju potrebna vlažnost lista u trajanju manjem od 2 h. Međutim, treba imati u vidu navode Lebeda i Cohen (2011) i Savory *et al.* (2011) koji ističu da je potrebna vlažnost lista u minimalnom trajanju od 2 h kako bi gljivica izvršila infekciju. Uzimajući u obzir navedeno, u modificiranoj prognoznoj tabeli (*tabela 4*) je za minimalni period vlažnosti lista zadržana veličina od 2 h.

Tabela 4. Parametri modificiranog prognoznog modela

*Table 4. Parameters of modified forecasting model*

Temperatura zraka °C	Period vlažnosti lista (h)	Inkubacija (dani)
13	12	10
14	12	8
15	10	7
16	9	6
17	8	4
18	7	4
19	6	4
20	6	3
21	4	3
22	3	2
23	2	2
24	2	2
25	2	2
26	2	2

27	2	3
28	2	4
29	2	5
30	2	6

Uočljivo je smanjenje predviđenih perioda infekcije u modificiranoj prognoznoj tabeli. Navedeno pruža dobru osnovu za dalja istraživanja, jer otvara niz novih pitanja. Dakle, modificirani prognozni model potrebno je ispitati i u stvarnim uslovima na terenu, te potvrditi njegovu pouzdanost na isti način na koji je provjerena pouzdanost polaznog prognoznog modela.

Izračunati koeficijenti korelacije za oba polja iznose  $0,6977$  i  $0,7064$ . Navedeno znači da korelacija faktora temperature i vlage u prosječno 70% slučajeva čini uzrok infekcije, što implicira da u 30% ostalih slučajeva uzrok infekcije može biti neki drugi faktor. Pri usporedbi s istraživanjem od Arauz *et al.* (2010) gdje koeficijenti korelacije temperature i vlažnosti lista za dva različita ispitivana modela iznose  $R^2 = 0,90$  i  $R^2 = 0,81$ , te  $R^2 = 0,87$  i  $R^2 = 0,78$ , uočljive su značajnije razlike. Naime niže veličine koeficijenta korelacije u provedenom istraživanju mogu biti objašnjene činjenicom da je istraživanje provedeno u sklopu ovog rada vršeno na otvorenom polju, dok je poređeno istraživanje vršeno u zatvorenom prostoru. Pri uzgoju ispitivanih biljaka na otvorenom polju vršena je upotreba folijarne ishrane i insekticida tokom vegetacije, koji su utjecali i na dužinu vlažnosti lista. Također prisustvo drugih oboljenja na ispitivanom polju tokom vegetacije moglo je utjecati na rezultate. No uprkos tome, dobivene veličine koeficijenata korelacije su pokazale visoke nivoe korelacije faktora koji utiču na infekciju.

## ZAKLJUČAK

Rezultat ovih istraživanja je kreirana prognozna tabela koja omogućava prognozu bolesti na osnovu podataka o temperaturi i dužini trajanja vlažnosti lista, kao neophodnim parametrima za razvoj plamenjače krastavca koju uzrokuje gljivica *Pseudoperonospora cubensis*. Izvorni prognozni model je testiran primjenom metode observacije simptoma u polju i test biljaka, te je utvrđena njegova pouzdanost u prognoziranju momenta infekcije. Budući da je statističkim testom višestruke linearne regresije potvrđen uticaj oba faktora (temperature i vlažnosti lista) na pojavu infekcije i određeni njihovi opsezi, izvorni model je modificiran prema dobivenim podacima.

Novi, modificirani prognozni model potrebno je dodatno testirati i potvrditi njegovu pouzdanost naspram izvornog modela, kao i njegovu mogućnost adaptacije u VIPS izvještajno-prognozni program.

## LITERATURA

Arauz, L. F., Neufeld, K. N., Lloyd, A. L., & Ojiambo P. S. (2010): Quantitative Models for Germination and Infection of *Pseudoperonospora cubensis* in

- Response to Temperature and Duration of Leaf Wetness. U: Quantitative Models for Germination and Infection of *Pseudoperonospora cubensis* in Response to Temperature and Duration of Leaf Wetness. Costa Rica: s.n.
- Cohen, Y. (1977): The combined effects of temperature, leaf wetness, and inoculum concentration on infection of cucumbers with *Pseudoperonospora cubensis*. U: Israel: s.n., pp. 1481-1484.
- Cooper, J. G. (2012): Effects of Integrating Cultivar Resistance and Reduced Fungicide Application for Control of Cucurbit Downy Mildew in Cucumber. U: Cucurbit Downy Mildew (*Pseudoperonospora cubensis*): Cucumber Resistance. Blacksburg: s.n., pp. 20-22.
- Čadro, S., Žurovec, J., Husić, S. (2017): Kalendar navodnjavanja mladog krompira u skladu sa aktuelnim vremenskim uslovima na području Hercegovine. Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta, Univerzitet u Sarajevu, LXII (67/1), 12.
- Gilles, T. (2004): Forecasting Downy Mildew Diseases. U: Spencer-Phillips P., Jeger M. (eds) Advances in Downy Mildew Research — Volume 2. Developments in Plant Pathology, vol 16. Springer, Dordrecht.
- Gebbers, R., & Adamchuk, V. I. (2010): Precision agriculture and food security. Science, 327 (5967), 828-831, doi: 10.1126/science.1183899.
- Kim, K. S., Beresford, R., Walter, M. (2013): Development of a Disease Risk Prediction Model for Downy Mildew (*Peronospora sparsa*) in Boysenberry. U: Phytopathology. 104. 10.1094/PHYTO-02-13-0058-R.
- Lebeda, A. & Cohen, Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) - biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. U: European Journal of Plant Pathology 129: 157. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9658-1>
- Maceljiski, M., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Barčić, I., Pagliarini, N., Oštrec, Lj., Barić, K., Čizmić, I. (2004): Plodovito povrće – Bolesti krastavaca, dinja i lubenica – Plamenjača krastavca. U: Štetočinje povrća. Čakovec: ZRINSKI d.d, pp. 285-287.
- Numić, R. (1996): Metode procjene intenziteta infekcije patogenima biljaka i štete koje prouzrokuju u visini prinosa i kvalitetu proizvoda. U: Fitopatologija-specijalni dio . Sarajevo: Studentska štamparija univerziteta.
- Ojiambo, P. S., Gent D. H., Quesada-Ocampo, L. M., Hausbeck, M. K., i Holmes, G. J. (2015): Epidemiology and Population Biology of *Pseudoperonospora cubensis*: A Model System for Management of Downy Mildews. Annual Review of Phytopathology, Tom. 53, pp. 223-246.
- Okić, A., Grahić, J., Kurtović, M., Konjić, A., Bajrić, M., Kanlić, K., Haseljić, S. i Gaši, F. (2015): First experiences on the open source technology platform VIPS in Bosnia and Herzegovina, Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences University of Sarajevo, 312-315.
- Pessl Instruments Austrija - *Disease Models*. [Na web stranici]. Dostupno na: <http://metos.at/home/disease-models/>, [Zadnji pristup 01. 10. 2018].

- Reis, E. M., Sônego, O. R., Mendes, C. S. (2013): Application and validation of a warning system for grapevine downy mildew control using fungicides. *Summa Phytopathologica*, v. 39, n.1, p.10-15, 2013.
- Savory, E., Granke, L., Quesada-Ocampo, L., Varbanova Herde, M. & Hausbeck, M., & Day, B. (2011): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular plant pathology*. 12. 217-26.

## **CREATING A CUCUMBER DOWNY MILDEW FORECASTING MODEL IN AGRO ECOLOGICAL CONDITIONS OF TUZLA CANTON**

### **Summary**

The Cucumber downy mildew, caused by pseudo fungus *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev is one of the economically most significant diseases. Current plant protection programs for this disease are based almost exclusively on the use of fungicides which, considering the ever stricter market criteria in regards to pesticide residue, can pose an additional problem to agricultural manufacturers, and further complicate market placement. A possible solution that could lead to reduced use of pesticides, without losing the efficiency of cucumber protection when controlling downy mildew, is through forecasting systems. Forecasting systems could predict disease progress and enable fungicide application in right time. One such system, named VIPS was implemented in Bosnia and Herzegovina (B&H), and its main goal is to improve integrated pest management as well as to introduce information and communication technologies (ICT) in B&H's agricultural sector. Within this research an empirical model for forecasting cucumber downy mildew was created, based on relative air temperature and leaf wetness data, as well as their mutual relationship with the pathogen infection process. The model was tested in field conditions in the area of Tuzla Canton during one vegetation season, where a few different evaluation methods were used. Through this, a correlation between infection risk prediction and the real field conditions was established. The parameters were processed via „R“ programming language, which helped create simplified prediction model and algorithm that is suitable for incorporation into the VIPS forecasting system. The forecasting model developed within this paper requires further tests.

**Key words:** *forecasting model, cucumber downy mildew, integrated pest management, ICT*

## **POLYMORPHISMS OF THE CAPRINE PRION PROTEIN (PrP) GENE IN THE GOAT POPULATION(S) IN BOSNIA AND HERZEGOVINA AND CROATIA**

Ervin Zecevic<sup>1</sup>, Admir Dokso<sup>1</sup>, Alma Rustempasic<sup>1</sup>, Suzana Djordjevic Milosevic<sup>2</sup>

*Original scientific paper*

### **Summary**

Transmissible spongiform encephalopathy (TSE) is a group of diseases that affects nervous system, and which leads to death. Scrapie is an infectious disease of sheep and goats that belongs to this TSE group and with always fatal outcome. The aim of this study was to investigate polymorphisms on twelve codons in exon 3 of the PrP gene (on chromosome 13) that have not so clear and significant effect on scrapie in goat (at codons 110, 138, 142, 143,146, 154, 194, 211, 215, 222, 240 and 242), The study was performed on the Bosnian and Croatian goat. Genomic DNA was isolated from venous blood and then a 628 bp long DNA fragment of exon 3 was amplified using the PCR method. The results from this study indicate the presence of sixteen different genotypes in Bosnian population and twelve genotypes in Croatian population.

**Key words:** *PrP, transmissible spongiform encephalopathy, scrapie, goat*

### **INTRODUCTION**

Scrapie is a prion-associated transmissible spongiform encephalopathy that occurs in sheep and goats. It has been found that genetics (PrP gene) are responsible for disease susceptibility and pathogenesis. The PrP gene in sheep, goat and cattle has been mapped to chromosome 13 (Iannuzzi *et al.*, 1998). Comparison of promoter regions and partial exon sequences of caprine and ovine PrP gene has led to the suggestion that the two gene structures are homologous. A further comparison of the PrP-coding sequences of sheep and goats revealed an extremely high level of genetic conservation between the two species. Thus, both PrP proteins have a deduced primary structure of 256 amino acids with a predicted 24 amino acid signal peptide and potential N-glycosylation sites at codons 189 and 200. Despite this high degree of similarity, amino acid alterations associated with changes in scrapie susceptibility do not appear to be identical for the two species (Goldmann *et al.*, 1996).

Whereas polymorphisms at codons 136, 154 and 171 have been correlated with alterations in scrapie susceptibility for sheep, only polymorphisms at codon 154

---

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture and Food Sciences University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup> Faculty of Applied Ecology "FUTURA". University Singidunum Belgrade, Republic of Serbia  
Corresponding Author [e.zecevic@pf.unsa.ba](mailto:e.zecevic@pf.unsa.ba)

(Billinis *et al.*, 2002) were found to be associated with modulation of scrapie susceptibility in goats as well. For goats, it appears that polymorphisms at codon 143 (Billinis *et al.*, 2002) also influence the animals risk for contracting scrapie. In general, the PrP gene is located in the promoter coding region, but in different areas in different species. Sequence of this gene was determined in 1998 and it was found high similarity in coding and non-coding sequences in sheep and humans what indicates that the two sequences are conserved in these two species (Lee *et al.*, 1998). In goats, the association of genetic variability of PrP with resistance or susceptibility to classical scrapie remains uncertain. Studies in the UK revealed high variability of PrP in goats (Goldmann *et al.*, 2004; 2008) and work in Italy suggested that the variant 222K had an association with scrapie resistance in Ionica breed goats (Vaccari *et al.*, 2006). Moreover, the variants 143R and 154H may give some protection against natural scrapie in Greek goats (Billinis *et al.*, 2002). A recent study in Cypriot goats suggested that the variants 146D and 146S may provide protection against scrapie (Papasavva – Stylianou *et al.*, 2007). In the same study, the presence of the homozygous wild type (WT) allele 146N was strongly associated with susceptibility to natural scrapie.

## MATERIALS AND METHODS

Research has been conducted on a two goat breeds: Croatian (Dalmatia – Croatia) and Bosnian (North Western part of Bosnia and Herzegovina). Blood samples were collected from 60 randomly chosen animals. Venous blood (approx. 3 ml) was taken from the jugular vein of each individual animals and collected in sterile 3 ml K3E BD Vacutainer tubes (BD Vacutainer System, Plymouth, UK) containing Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA), and then transported to the laboratory where they were stored at -300C until needed for DNA isolation. Genomic DNA was extracted from blood sample using Sigma's GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich Chemie, GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions. Concentration of extracted DNA was measured by spectrophotometer (Genova, JENWAY, UK), whereas the quality of DNA was checked by gel electrophoresis (at 120 V for 45 minutes) on 1% TBE-agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr).

The PrP gene fragment size of 628 bp from exon 3 was amplified using the following primers (4):

Forward 5' – CCGCTATCCACCTCAGGGA – 3'

Reverse 5' – TTGCCCTATCCTACTATGAGA – 3' (Gmür *et al.*, 2004).

Optimisation of PCR conditions by temperature gradient PCR was carried out by using iCycler thermal cycler (BIO-RAD, Germany). Thermocycling was performed by initial denaturation for 8 min at 950C, followed by 34 cycles of 1 min at 940C, 1 min at 640C annealing temperature and 1 min extension at 720C. A final extension was performed for 7 min at 720C. The amplification reactions were carried out in a total volume of 20 µl containing 4 µl of DNA, 1 µl of each primer (10 pmol/µl) and 10 µl

of ready-to-use GoTaq® Green master mix (Promega), in iCycler thermal cycler (BIO-RAD, Germany).

PCR products (20 µl) were analyzed by electrophoresis (at 80 V for 30 min) on a 0.8% agarose gels stained by ethidium bromide (EtBr). The visualization was performed in a UV transilluminator and the images were captured with a video documentation system (UVITEC). Amplified fragments of the appropriate size (628 bp) were cut directly from the gel and purified by Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up System kits following the supplier's instructions. Then, amplified products were sequenced by standard Sanger dideoxynucleotide method, using the same primers as for PCR reaction. Sequencing was performed on ABI PRISM® 3100 – Avant Genetic Analyzer.

The sequences were analyzed using BioEdit software, version 7.0.9.0. (Goldmann *et al.*, 2004) while the ClustalW program, version 2.2.10. (6) was used for multiple sequences alignment (Larkin *et al.*, 2007).

In this study, polymorphisms at loci (codons) 110, 138, 142, 143, 146, 154, 194, 211, 215, 222, 240 and 242 were investigated on the Bosnian and Croatian goats. The PROC Haplotype and PROC Allele procedures, implemented in SAS/Genetics 9.1.3. software package (SAS Institute Inc. 2008), were used for all calculations.

## RESULTS

### Bosnian population

Table 1 Genotype frequency Bosnian goats

Codon												Frequency	
110	138	142	143	146	154	194	211	215	222	240	242	(%)	n
TT	SS	TT	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	SS	PP	5.00	1
TT	SS	IT	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	KQ	SS	PP	10.00	2
TT	SS	IT	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	SS	PP	10.00	2
TT	SS <sup>1</sup>	IT	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	5.00	1
TT	SS <sup>1</sup>	IT	HH	NN	RR	TT	RR	RQ	QQ	PS	PP	5.00	1
TT	SS	II	HH	NN	HR	TT	RR	QQ	KQ	SS	PP	5.00	1
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	TT	RQ	RQ	QQ	PS	PP	5.00	1
TT	SS	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	KK	SS	PP	5.00	1
TT	SS	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	KQ	SS	PP	5.00	1
TT	SS <sup>1</sup>	IM	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	KQ	PS	PP	5.00	1
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	10.00	2
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	HP	5.00	1
TT	SS <sup>1</sup>	IM	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	5.00	1
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	IM	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PP	PP	5.00	1
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	IM	HH	NN	RR	TT	RR	RQ	QQ	PP	PP	10.00	2
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	IM	HH	DD	RR	TT	RR	QQ	QQ	PP	PP	5.00	1

Sixteen genotypes on investigated codons have been found in the Bosnian population of goat under the study (Table 1). Genotypes occurred at frequencies of 5% and 10%



The most frequent haplotypes were TSTHNRTRQQSP, TSIHNRTRQQSP, TSIHNRTRQKSP and TS1IHNRTRQQPP with frequencies 20.00%, 17.50%, 15.00%, 15.00% respectively.

Table 2. Polymorphism and frequency of SNPs for scrapie susceptible codons in Bosnian goat population

Codon	Allele	n	Frequency (%)
110	T <sub>110</sub> ACC	40	100.00
138	S <sub>138</sub> AGC	24	60.00
	S <sub>138</sub> AGT	16	40.00
142	T <sub>142</sub> ACA	8	20.00
	I <sub>142</sub> ATA	26	65.00
	M <sub>142</sub> ATG	6	15.00
143	H <sub>143</sub> CAT	40	100.00
146	N <sub>146</sub> AAT	38	95.00
	D <sub>146</sub> GAC	2	5.00
154	R <sub>154</sub> CGT	39	97.50
	R <sub>154</sub> CAT	1	2.50
194	T <sub>194</sub> ACC	40	100.00
211	Q <sub>211</sub> CAA	1	2.50
	R <sub>211</sub> CGA	39	97.50
215	Q <sub>215</sub> CAA	36	90.00
	R <sub>215</sub> CGA	4	10.00
222	Q <sub>220</sub> CAG	33	82.50
	K <sub>220</sub> AAG	7	17.50
240	P <sub>240</sub> CCC	16	40.00
	S <sub>240</sub> TCC	24	60.00
242	P <sub>242</sub> CCT	39	97.50
	H <sub>242</sub> CAT	1	2.50

In this study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in nine of twelve investigated codons.

The high frequency of polymorphism is observed on codons 138, 142, 222, and 240 of the PrP gene. At codon 138, a silent mutation is present, and no changes in the amino acid (serine). At codon 142, three amino acids were synthesized: threonine, isoleucine and methionine. Glutamine and lysine are synthesized on codon 222, and on codon 240 proline and serine (Table 2).

## Croatian goat population

Table 3. Genotype frequency Croatian goats

Codon												Frequency (%)	n
110	138	142	143	146	154	194	211	215	222	240	242		
TT	SS <sup>1</sup>	IM	HH	NN	RR	TT	RQ	QQ	KQ	PS	PP	4.55	1
TT	SS	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	SS	PP	9.09	2
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	31.82	7
TT	SS <sup>1</sup>	IM	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	4.55	1
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	4.55	1
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	PT	RR	QQ	QQ	PS	PP	4.55	1
TT	SS <sup>1</sup>	II	HH	DD	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	4.55	1
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	II	HH	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PP	PP	18.18	4
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	II	HR	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PP	PP	4.55	1
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	II	HR	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PS	PP	4.55	1
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	II	HR	DD	RR	TT	RR	QQ	QQ	PP	HP	4.55	1
TT	S <sup>1</sup> S <sup>1</sup>	II	RR	NN	RR	TT	RR	QQ	QQ	PP	PP	4.55	1

Twelve genotypes on investigated codons have been found in the Croatian population of goat under the study (Table 3). Most frequent genotype was TSIHNRTRQQPP/TS1IHNRRTRQQSP with frequency of 31.82%, next most frequent genotype was TS1IHNRRTRQQPP/TS1IHNRRTRQQPP.

The most frequent haplotypes were TSIHNRTRQQPP and TSIHNRTRQQSP with frequencies 38.64% and 29.55% respectively.

Table 4. Polymorphism and frequency of SNPs for scrapie susceptible codons in Croatian goat population

Codon	Allele	n	Frequency (%)
110	T <sub>110</sub> ACC	42	95.45
	P <sub>110</sub> CCC	2	4.55
138	S <sub>138</sub> AGC	16	36.36
	S <sub>138</sub> AGT	28	63.64
142	I <sub>142</sub> ATA	42	95.45
	M <sub>142</sub> ATG	2	4.55
143	H <sub>143</sub> CAT	40	90.91
	R <sub>143</sub> CGT	4	9.09
146	N <sub>146</sub> AAT	40	90.91
	D <sub>146</sub> GAT	4	9.09
154	R <sub>154</sub> CGT	44	100.00
194	T <sub>194</sub> ACC	43	97.73
	P <sub>194</sub> CCC	1	2.27
211	R <sub>211</sub> CGA	44	100.00
215	Q <sub>215</sub> CAA	44	100.00
222	Q <sub>222</sub> CAG	43	97.73
	K <sub>222</sub> AAG	1	2.27

240	P <sub>240</sub> CCC	27	61.36
	S <sub>240</sub> TCC	17	38.64
242	P <sub>242</sub> CCT	43	97.73
	H <sub>242</sub> CAT	1	2.27

In this study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in nine of twelve investigated codons.

The high frequency of polymorphism is observed on codon 138 (63.64%). At this codon, a silent mutation is present, and no changes in the amino acid (serine). At codon 242, is present polymorphism with amino acid change (proline – serine) (38.64%). Frequencies on the other codons with polymorphisms detected were 2.27 – 9.09%. (Table 4).

## DISCUSSION

This is the very first study conducted on goat populations in Bosnia and Herzegovina and Croatia regarding the genetic aspects of scrapie and PrP gene sequencing. In goats is not established classification PrP genotypes that might be resistant to scrapie. Different authors have reported a number of polymorphisms at different codons that may be responsible for resistance to the scrapie, or for susceptibility to it. In a study, it was investigated polymorphism on the sequence of the PrP gene, exon 3, on 110, 138, 142, 143, 146, 151, 154, 194, 211, 215, 222, 240 and 242 codons in domestic goat populations in the Bosnia and Herzegovina and Republic of Croatia.

Codon 110 - Three amino acids, threonine, proline and serine have been synthesized on this codon. The variant in which the proline was synthesized was found in the Croatian goat population. A silent mutation in the population of Bosnian goats was found when it comes to the synthesis of threonine ACC → ACT, while the proline variant was not found. None of these variants in the literature does not connect with the appearance or absence of scrapie in goats.

Codon 138 - On this codon, at investigated goat populations was found silent mutation of amino acid serine, AGC → AGT. This mutation was already presented in previous studies (Goldmann *et al.*, 1996), and does not relate to resistance to scrapie.

Codon 142 - Three amino acids are synthesized on this codon: isoleucine, methionine and threonine. In both populations, the polymorphism of this codon was found with presence of all three amino acids. The polymorphism of this codon was found in Cyprus in variant I142M, (Papasavva – Stylianou *et al.*, 2007). For now, this codon is not related to the scrapie occurrence.

Codon 143 - Two amino acids are synthesized on this codon: histidine and arginine. In the investigated populations, the frequency of alleles H143 was 90.91% (Croatian goat) and 100.00% (Bosnian goat). As for the H143 allele variant, it is a so-called "wild" allele and is therefore understandable that occurs in the high frequency given that both belong to the population of primitive indigenous breeds. This codon does not link up with the potential for the disease, although some authors state that variant

R143 could provide a certain level of protection against the disease (Billinis *et al.*, 2002). Allelic variant R143 is quite rare and so far has been found in the UK, Italy, Greece and the Netherlands (EFSA Journal 2009).

Codon 146 - On this codon, asparagine, aspartic acid and serine are synthesized. Two variants were found in the investigated populations: aspartic and aspartic acid synthesis. Their frequencies were: N146 95% in the population of Bosnian goats and N146 90.91% in the Croatian goat population. Variation D (aspartic acid) had a fairly low frequency D146 5.00% for Bosnian and D146 9.09% for Croatian population. This codon is associated with the occurrence of the disease, its variant N146 is susceptible to disease, while variants D and S are resistant (Billinis *et al.*, 2002; Papasavva – Stylianos *et al.*, 2007). Type N146 is considered as a wild type of allele and it was found that animals which are homozygotes to this allele are more susceptible to scrapie (Papasavva – Stylianos *et al.*, 2007).

Codon 154 - On this codon there are two allelic variants, R154 and H154. Both variants appear in the population of Bosnian goats with frequencies 97.50% (R154) and 2.50% (H154), while in the population of Croatian goat the frequency of the R154 variant was 100%. Type R154 is associated with resistance to Scrapie (Billinis *et al.* 2002).

Codon 194 - On this codon, two amino acids are synthesized threonine and proline. In the population from Bosnia and Herzegovina, frequency of T194 allele was 100.00%. In the population from Croatia the polymorphism was found in ratio T194 97.73% and P194 2.27%. This codon is not associated with the appearance of scrapie.

Codon 211 - At this codon can be two allelic variants R211 (arginine) and Q211 (glutamine). Variant Q211 is associated with resistance to Scrapie (Barillet *et al.*, 2009; Bouzalas *et al.*, 2010). The frequency of alleles in a population of Bosnian goat was R211 97.25% and Q211 2.50%. In the Croatian goat population, variant R211 was present at a frequency of 100%.

Codon 215 - The polymorphism of this codon has so far not been reported in the literature. In the investigated goat populations, two allelic variants were found arginine (R) and glutamine (Q). In the population of goat from Bosnia and Herzegovina, the allele Q215 frequency was 96.00%, while the frequency of allelic variant R215 was 4.00%. In the population of goats from Croatia the frequency of allele Q215 was 100.00%. The influence of polymorphism on this codon is not known when it comes to the occurrence scrapie.

Codon 222 - On this codon there are two allelic variants: glutamine Q222 and lysine K222. The variant K222 is associated with resistance to scrapie (10,11). The frequency of these alleles in the population of Bosnian Herzegovinian goat was Q222 82.50% and K222 17.50%, while the frequency in the Croatian goat population was Q222 97.73% and K222 2.27%

Codon 240 - At this codon there is a synthesis of two amino acids: proline and serine. Both allelic variants were found in both populations. in the Bosnian population of goats, the frequencies were P240 40.00% and S240 60.00%. In Croatian population of

goats, the frequencies were P240 61.36% and S240 38.64. The literature does not mention the association of polymorphisms in this codon with scrapie occurrence.

Codon 242 - The polymorphism of this codon has not been mentioned in the literature so far. In the investigated populations, the appearance of two allelic variants was found: proline and histidine. Frequencies in Bosnian goat population were P242 97.50% and H242 2.50%. in Croatian goat population frequencies were P242 97.73% and H242 2.27%. Polymorphisms on this codon are not connected with scrapie occurrence.

Similar investigation was conducted on Bosnian sheep population Pramenka breed Zecevic *et al.* (2015).

It is important to continue investigations and screening of other goat population in Bosnia and Herzegovina, as well as to involve larger number of codons that might have some effect on scrapie susceptibility. With aim to detect specific codons which are responsible for scrapie occurrence i.e. resistance.

## REFERENCES

- Barillet, F., Mariat, D., Amigues, Y., Faugeras - Caillat, H., Moazami – Goudarzi, K., Rupp, R., Babilliot, J.M., Lacroux, C., Lugan, S., Schelcher, F., Chartier, C., Corbiere, F., Andreoletti, O., Perrin – Chauvineau, C. (2009): Identification of seven haplotypes of the caprine PrP gene at codons 127, 142, 154, 211, 222 and 240 in French Alpine and Saanen breeds and their association with classical scrapie. *Journal of General Virology* 90: 769 – 776.
- Billinis, C., Panagiotidis, C. H., Psychas, V., Stamatis-Argyroudis, S., Nicolaou, A., Leontides, S., Papadopoulos, O., Sklaviadis, T. (2002): Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *Journal of General Virology* 83: 713–721.
- Bouzas, I. G., Dovas, C. I., Banos, G., Papanastasiopoulou, M., Kritas, S., Oeverman, A., Papakostaki, D., Evangelia, C., Papadopoulos, O., Seuberlich, T., Koptopoulos, G. (2010): Caprine PrP polymorphisms at codons 171, 211, 222 and 240 in a Greek herd and their association with classical scrapie. *Journal of General Virology* 91: 1629 – 1634.
- Gmür, A., Gaillard, C., Dolf, G. (2004): Characterization of the prion protein gene (PRNP) region in Swiss sheep breeds. *Journal of animal breeding and genetics* 121: 216-220
- Goldmann, W. (2008): PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary Research* 39: 30.
- Goldmann, W., Martin, T., Foster, J., Hughes, S., Smith, G., Hughes, K., Dawson, M., Hunter, N. (1996): Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *Journal of General Virology* 77: 2885-2891.
- Goldmann, W., Perucchini, M., Smith, A., Hunter, N. (2004): Genetic variability of the PrP gene in a goat herd in the UK; *Veterinary Record* 155: 177–178.

- Iannuzzi, L., Palomba, R., Di Meo, G. P., Perucatti, A., Ferrara, L. (1998): Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 81: 202–204.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-8.
- Lee, I. Y., Westaway, D., Smit, A. F. A. (1998): Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* 8: 1022 – 1037.
- Papasavva – Stylianou, P., Kleanthous, M., Toumazos, P., Mavrikiou, P., Loucaides, P. (2007): Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie. *The Veterinary Journal* 173: 459 – 462.
- SAS Institute Inc., SAS® 9.1.3 Foundation System Requirements for AIX®, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.
- Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on genetic TSE resistance in goats 2009. *The EFSA Journal* 995: 1 – 25.
- Vaccari, G., Di Bar, M. A., Morell, L., Nonno, R., Chiappini, B., Antonucci, G., Marcon, S., Esposito, E., Fazzi, P., Palazzini, N., Troiano, P., Petrella, A., Di Guardo, G., Agrimi, U. (2006): Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie; *Journal of General Virology* 87: 1395–1402.
- Zecevic, E., Dokso, A., Kazic, A., Brka, M. (2015): Polymorphisms of ovine prion protein (PrP) gene in Pramenka sheep breed population in Bosnia and Herzegovina. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*; 39: 537-542.

## **POLIMORFIZAM PRP GENA U POPULACIJAMA BOSANSKIH I HRVATSKIH KOZA**

### **Rezime**

Preosnovne spongioformne encefalopatije (PSE) su grupa bolesti koja zahvata nervni sistem sa smrtnim ishodom. Scrapie je zarazna bolest ovaca i koza koja pripada skupini PSE bolesti i uvijek sa fatalnim ishodom. Cilj ove studije bio je istražiti polimorfizme na dvanaest kodona exona 3 PrP gena (na kromosomu 13) za koje još uvijek nije dokazan značajan efekat za pojavu Scrapija kod koza. (kodoni 110, 138, 142, 143, 146, 154, 194, 211, 215, 222, 240 i 242). Istraživanje je provedeno na bosanskim i hrvatskim kozama. Genomska DNK je izolirana iz venske krvi, zatim je fragment DNK dužine 628 baaznih parova sa exona 3 umnožen korištenjem PCR

reakcije. Rezultati pokazuju prisutnost šesnaest različitih genotipova kod bosanskih koza i dvanaest genotipova u populaciji hrvatskih koza.

Ključne riječi: *PrP*, *prenosive spongioformne encefalopatije (PSE)*, *Scrapie*, *koza*

## PROMJENE SADRŽAJA HRANJIVIH MATERIJA TOKOM VEGETATIVNOG RAZVOJA LUCERKE IZ PRVOG OTKOSA

Senada Čengić-Džomba<sup>1</sup>, Emir Džomba<sup>1</sup>, Salko Muratović<sup>1</sup>, Dženan Hadžić<sup>1</sup>,  
Azra Škulj<sup>1</sup>, Berin Čanić<sup>1</sup>

Originalni naučni rad – *Original scientific paper*

### Rezime

Budući da su prinosi i parametri kvaliteta lucerke u inverznom odnosu, veoma važno pitanje u iskorištavanju lucerke je izbor najpovoljnijeg momenta košnje. Idealno, košnja bi trebala biti u fazi pupanja i početka cvjetanja, ali paraktično to ovisi od mnogih faktora uključujući i padavine, što može predstavljati značajan problem posebice u proljetnim mjesecima (prvi otkos) u kontinentalnim regionima. U cilju utvrđivanja promjene kvalitativnih parametara lucerke i njenog prinosa tokom vegetativnog razvoja biljaka na oglednom polju Butmir (Sarajevo), na postojećem usjevu lucerke je slučajnim izborom odabrano pet parcelica (ponavljanja). Uzorkovanje i mjerenje prinosa biomase je rađeno u fazi pupanja, fazi početka cvjetanja i fazi punog cvjetanja biljaka. Rezultati ukazuju na značajan pad sadržaja proteina (sa 19,74% u fazi pupanja na 13,08% u fazi punog cvjetanja). Sadržaj ADF i NDF su imali suprotan obrazac. Probavljivost i konzumacija suhe materije, te relativna vrijednost krmiva, su takođe opadale tokom razvoja lucerke pri čemu trend nije tako jasno izražen kao u slučaju sadržaja proteina. RFV od 141,04 u fazi pupanja do 123,0 u fazi punog cvjetanja je indikator relativno dobrog kvaliteta lucerke. Ukupan prinos suhe materije i sirovog proteina je rastao sa starenjem biljaka. Optimalno vrijeme iskorištavanja lucerke u cilju maksimiziranja i prinosa i kvaliteta je u fazi punog pupanja.

Ključne riječi: *lucerka, optimalna faza iskorištavanja, prinosi i parametri kvaliteta*

### UVOD

Visoka nutritivna vrijednost, otpornost i prilagođenost različitim klimatskim uslovima čine lucerku (*Medicago sativa* L.) jednom od najrasprostranjenijih krmnih kultura u svijetu. U ishrani domaćih životinja koristi se u različitim oblicima kao košena zelena masa ili paša, silaža, sjenaža i sijeno. Na tržištu se mogu naći i brašna i pelete dehidrirane lucerke sa standardiziranim sadržajem sirovog proteina (SP). Primjenom lucerke u ishrani preživara značajno se smanjuje potreba za skupljim proteinskim krmivima, što ima pozitivan efekat na ekonomske pokazatelje proizvodnje. Iako je kao

<sup>1</sup> Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu/Faculty of Agriculture and Food Sciences University of Sarajevo  
Corresponding author: s.cengic-dzomba@ppf.unsa.ba



krmivo prvenstveno prilagođena ishrani preživara, u ishrani nepreživara se također koristi.

Na hranjivu vrijednost lucerke pored pedoklimatskih faktora, sorte i primijenjene agrotehnike, najveći uticaj ima vrijeme košnje, odnosno stadij razvoja biljke i frekvencija košnje tokom vegetacione sezone. Generalno, mlade biljke karakteriše veći sadržaj proteina i vode, dok se starenjem udio suhe materije, NDF-a (vlakna topiva i neutralnom deterdžentskom rastvoru) i ADF-a (vlakna topiva i kiselom deterdžentskom rastvoru) povećava. Sadržaj proteina u lucerki najveću vrijednost dostiže u ranim fenofazama razvoja lucerke i kreće se iznad 212 g/kg suhe materije (SM), dok u fazi cvjetanja opada ispod 176 g/kg SM (Marković, 2014).

Sadržaj NDF-a i ADF-a u krmivima direktno utiče na konzumaciju, probavljivost i relativnu vrijednost krmiva (RFV). Visoke NDF i ADF vrijednosti utiču na smanjenje probavljivosti krmiva, kao i na smanjivanje vrijednosti RFV indeksa. Stoga, od hranjiva vrijednosti krmiva ovisi probavljivost i konzumaciju suhe materije. Sagledavanje kvaliteta krmiva, pri čemu se sadržaj sirovog proteina promoviše kao glavni (a ponekad i kao jedini) pokazatelj je manjkav jer ne uzima u obzir odrednice probavljive suhe materije (PSM) i konzumirane suhe materije (KSM). RFV je široko prihvaćen pokazatelj kvaliteta krmiva u zemljama Sjeverne Amerike (Moore i sar., 2002) koji probavljivost i konzumaciju suhe materija kombinira u jedan pokazatelj.

Prema Schroederu (2012) krmiva sa visokim RFV se koriste u obrocima preživara koji zahtjevaju visoke količine hranjivih materija kao što je slučaj sa obrocima mliječnih krava. Krmiva sa visokim vrijednostima RFV (140-160) ulaze u obroke krava u ranoj laktaciji. Krmiva sa nižim vrijednostima (100-130) se mogu primjenjivati pri uzgoju junica. Mliječne kategorije se mogu hraniti sa krmivima sa RFV vrijednošću do 160, jer prevelika vrijednost RFV nije ekonomski opravdana. Uobičajne preporuke o optimalnom vremenu košnje se odnose na vegetativnu fazu pupanja i početka cvjetanja lucerke (Stjepanović i sar., 2009), period kada se interpolacijom prinosa (kvantiteta) i sadržaja hranjivih materija (kvaliteta) osigurava zadovoljavajuća (ili optimalna) upotrebna vrijednost lucerke u ishrani preživara. U kontinentalnim klimatskim uslovima momenat iskorištavanja lucerke iz prvog otkosa je, u mnogim slučajevima, uslovljen rasporedom padavina. Nepovoljna distribucija padavina u mjesecima prvog otkosa lucerke u praktičnim uslovima diktira i uslovljava određeno pomjeranje optimalnog roka (faza početka cvjetanja) košnje lucerke. Stoga je cilj istraživanja utvrditi kretanje prinosa suhe materije i sadržaja važnijih hranjivih materija u lucerki prvog otkosa tokom različitih vegetativnih faza.

## MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje je provedeno na oglednom polju Butmir Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta u Sarajevu tokom maja i juna 2018. godine. Ogled je postavljen po randomiziranom blok sistemu u pet ponavljanja. Ispitivan je sadržaj sirovog proteina, NDF-a, ADF-a, prinos zelene mase i suhe materije. Površina probnih ploha iznosila je 1 m<sup>2</sup>. U istraživanju je korištena sorta Plato. Lucerka je košena ručno u prvom otkosu, u tri različite faze razvoja na visini od 5 cm. Prva košnja je obavljena je 08.05.2018. u fazi pupanja biljaka, druga košnja je obavljena 22.05. u fazi početka cvjetanja i treća košnja obavljena 11.06. u fazi punog cvjetanja lucerke.

Neposredno nakon košnje mjereno je prinos zelene mase što je poslužilo kao osnova utvrđivanja prinosa suhe materije i sirovog proteina po jedinice površine.

Uzimanje uzoraka, određivanje sadržaja vlage i suhe materije i analiza sadržaja sirovog proteina, NDF-a i ADF-a, urađeni su prema Pravilniku o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za provedbu službenih kontrola hrane za životinje (Službeni glasnik BiH br. 65, 2013). Nakon košnje uzorci su vagani i sušeni na temperaturi od 60<sup>0</sup>C do konstantne mase. Nakon sušenja uzorci su samljeveni na laboratorijskom mlinu i sušeni na 103<sup>0</sup>C do konstantne mase. Sadržaj grube i higroskopne vlage je utvrđen na osnovu razlika u masi uzorka prije i nakon sušenja. Sadržaj SM je utvrđen računskim putem na osnovu sadržaja grube i higroskopne vlage.

Sadržaj sirovog proteina je utvrđen Kjeldahl metodom pri čemu je korišten faktor 6,25 za preračun nitrogenu u sirovi protein.

Udio neutralnih deterdžentskih vlakana i kiselih deterdžentskih vlakana utvrđen je prema metodi Van Soesta i sar. (1991) kuhanjem uzoraka u neutralnom i kiselom deterdžentskim rastvorima.

Probavljiva suha materija, konzumirana suha materija krmiva i relativna vrijednost krmiva, utvrđeni su računskim putem prema Schroederu (2012) na osnovu utvrđenog sadržaja NDF-a. i ADF-a u lucerki:

$$\text{KSM} = 120 / (\% \text{NDF})$$

$$\text{PSM} = 88.9 - (0.779 * \text{ADF})$$

$$\text{RFV} = (\text{PSM}\% * \text{KSM})/1,29$$

Podaci su obrađeni analizom varijanse koristeći statistički softverski paket SPSS 17. Značajnost je urađena na nivou vjerovatnoće 95%. Značajnost razlika između prosječnih vrijednosti je testirana LSD testom.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja prikazani u Tabeli 1 pokazuju da je košnja lucerke u različitim stadijima razvoja značajno uticala na sve ispitivane kvalitativne parametre. Sadržaj suhe materije, značajno se povećavao od faze pupanja do faze punog cvjetanja, dok se sadržaj sirovog proteina značajno smanjivao. Suprotno prinosu, sadržaj sirovog proteina, u istom periodu, se smanjio sa 19,74% na 13,08%, odnosno najniži sadržaj

proteina utvrđen je u fazi punog cvjetanja. Opadanje sadržaja proteina, pa tako i kvaliteta, može se objasniti promjenom odnosa stabla i lišća tokom razvoja biljaka. Razvojem biljaka udio stabljike se povećava, dok udio lišća, kao nutritivno vrijednijeg dijela sa najvećim sadržajem proteina, opada (Ball i sar., 2001). Značaj udjela lišća i stabljike kao indikatora kvaliteta navode i Vintu i sar. (2012). Prema ovim autorima sadržaj proteina je dvostruko veći u lišću u odnosu na sadržaj proteina u stabljici. Sadržaj NDF i ADF je imao signifikantan rast komparirajući fazu pupanja i fazu punog cvjetanja biljke.

Tabela 1. Sadržaj hranjivih materija (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) u lucerki u različitim fenofazama prvog otkosa  
*Nutritive value (mean $\pm$ SD) of lucerne during first cut different phases of development*

Faza razvoja	SM, %	SP %	NDF, %	ADF, %
Pupanje	18,64 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	19,74 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	47,52 $\pm$ 2,34 <sup>a</sup>	34,62 $\pm$ 2,44 <sup>a</sup>
Početak cvjetanja	22,03 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>	15,44 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	50,94 $\pm$ 2,58 <sup>ab</sup>	37,47 $\pm$ 1,47 <sup>b</sup>
Puno cvjetanje	31,82 $\pm$ 2,55 <sup>c</sup>	13,08 $\pm$ 1,77 <sup>c</sup>	52,50 $\pm$ 5,97 <sup>b</sup>	37,58 $\pm$ 4,13 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Vrijednosti u istoj koloni označene različitim slovima se razlikuju na nivou vjerovatnoće od  $p < 0,05$

Marković (2014) navodi slične vrijednosti za sadržaj NDF-a u prvom otkosu kod američke populacije lucerke. Prema ovom autoru sadržaj NDF-a je u fazi pupanja iznosio 47,90%, u fazi početka cvjetanja 49,50% i u fazi punog cvjetanja 53,65%.

ADF frakcija koju čine celuloza i lignin koristi se kao indikator probavljivosti krmiva. Niže vrijednost (ispod 35%) su poželjne jer pokazuju bolju probavljivost suhe materije. Sadržaj ADF frakcije u ispitivanoj lucerki (Tabela 1) kretao se od 34,62% u fazi pupanja, do 37,58% u fazi punog cvjetanja. Dunhan (1998) navodi nešto niže vrijednosti ADF u fazi pupanja i početka cvjetanja (30% i 33%) te nešto veću vrijednost (41%) ADF u fazi punog cvjetanja lucerke.

Izbor pravog momenta košnje značajno utiče ne samo na hranjivu vrijednost lucerke već i na prinos zelene mase i suhe materije (Tabela 2). Košnja u mlađim fazama razvića biljaka osigurava bolji kvalitet krmiva ali niže prinose krme.

Tabela 2. Pregled kvalitativnih pokazatelja (srednja vrijednost  $\pm$  standardn devijacija) lucerke u različitim fenofazama prvog otkosa  
*Some quality parameters (mean $\pm$ SD) of lucerne during first cut different phases of development*

Faza razvoja	PSM, %	KSM,%	RFV	Prinos SM, t/ha	Prinos SP, kg/ha
Pupanje	65,24 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	141,04 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup>	4,55 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	894,50 <sup>a</sup> $\pm$ 152,7
Početak cvjetanja	63,30 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	2,69 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	132,16 $\pm$ 7,91 <sup>ab</sup>	5,75 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	884,84 <sup>b</sup> $\pm$ 35,45
Puno cvjetanje	62,79 $\pm$ 3,00 <sup>b</sup>	2,59 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	123,03 $\pm$ 11,71 <sup>b</sup>	6,95 $\pm$ 0,72 <sup>c</sup>	911,02 <sup>c</sup> $\pm$ 120,8

<sup>a,b,c</sup> Vrijednosti u istoj koloni označene različitim slovima se razlikuju na nivou vjerovatnoće od  $p < 0,05$

Prinos suhe materije ispitivane lucerke kretao se od 4,55 t/ha u fazi pupanja do 6,95 t/ha u fazi punog cvjetanja. Probavljivost suhe materije se od faze pupanja do faze punog cvjetanja značajno smanjila sa 65,24% na 62,79%. Prema Buxton i sar. (1985) probavljivosti hranjivih materija opada sa starošću lucerke, što se naročito odnosi na probavljivost hranjivih materija iz nižih dijelova stabljike. Razlog za lošiji kvalitet prve dvije trećine stabljike je nakupljanje vlaknastih frakcija u ovom dijelu stabljike kroz duži vremenski period, u odnosu na gornje mlade dijelove stabljike. Istraživanja Tomića (2016), također pokazuju da probavljivost suhe materije lucerke zavisi od sadržaja vlaknastih frakcija i da se kod mladih biljaka, u fazi prije pupanja, probavljivost kretala od 77 do 73%, u fazi pupanja od 75 do 68%, dok je u fazi početka cvjetanja probavljivost suhe materije bila najniža i kretala se od 60 do 58%. Istraživanja Wiersma i Wiederholt (2000) su pokazala da unatoč slabijoj hranjivoj vrijednosti nižih dijelova stabljike, proizvodnja mlijeka po jedinici površine je bila najveća kada je visina košnje bila najbliža tlu. Smanjivanjem visine košnje za 1 inch (2,54 cm) ukupna proizvodnja mlijeka po aciri se povećala za 900 lbs odnosno za oko 1000 kg/ha. Objašnjenje za povećanu proizvodnju mlijeka leži u većem ukupnom prinosu biomase. Visina košnje kod ispitivane lucerke iznosila je 5 cm što je značajno uticalo na ukupan prinos suhe materije.

Najveći prinos proteina ostvaren je u fazi punog cvjetanja i iznosio je 911,02 kg/ha, dok je u fazi pupanja bio značajno niži i iznosio 894,50 kg/ha. Iako je sadržaj proteina u fazi punog cvjetanja bio najniži, najveći prinos proteina po jedinici površine ostvaren u ovoj fazi razvoja, direktna je posljedica većeg prinosa suhe materije.

Starost biljaka u momentu košnje značajno utiče i na nivo konzumacije suhe materije. Starenjem biljaka sadržaj NDF frakcije se povećava što je osnovni razlog za izražen pad konzumacije suhe materije (Ball i sar., 2001).

Ocjenu kvaliteta silaže na osnovu sadržaja proteina, u novije vrijeme, sve više zamjenjuje ocjena na bazi indeksa relativne vrijednosti krmiva. Za izračunavanje ovog indeksa koriste se pokazatelji za probavljivost i konzumaciju suhe materije dobiveni na osnovu sadržaja NDF i ADF u krmivu. Ocjena kvaliteta lucerke na bazi RFV

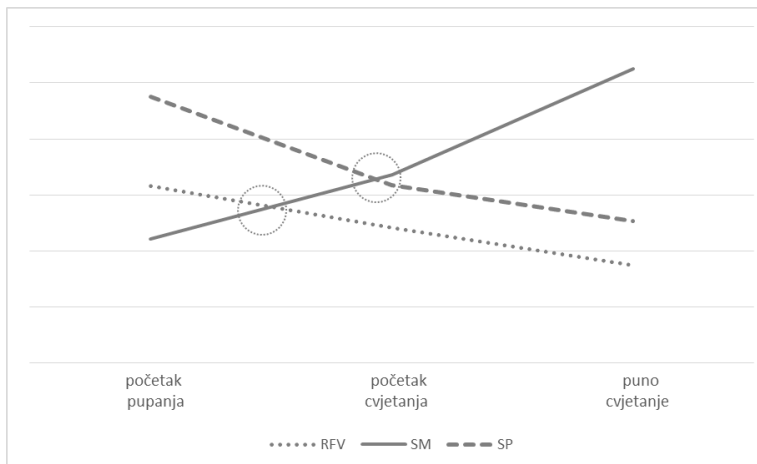
indeksa je opravdana, obzirom da je ovaj sistem razvijen upravo na leguminozama korištenim u ishrani muznih krava.

Tabela 3. Ocjena kvaliteta krmiva na osnovu PSM, KSM, i RFV-a (Taylor, 1995)  
*Feed quality on PSM, KSM and RFV basis*

Kvalitet krmiva	PSM (%)	KSM (%)	RFV
Vrhunski	> 65	> 3,0	> 151
1 (Vrlo dobar)	62 – 65	3,0 – 2,6	151 – 125
2 (Dobar)	58 – 61	2,5 – 2,3	124 – 103
3 (Osrednji)	56 – 57	2,2 – 2,0	102 – 87
4 (Slab)	53 – 55	1,9 – 1,8	86 – 75
5 (Vrlo slab)	< 53	< 1,8	< 75

Prema RFV indeksu (Tabela 3), koji je u fazi pupanja i početka cvjetanja iznosio 141,04 odnosno 132,16 kvalitet ispitivane lucerke se može ocjeniti kao vrlo dobar. U fazi punog cvjetanja dobiveni RFV indeks je bio niži (123,03) pa je u ovoj fazi kvalitet lucerke ocijenjen ocjenom dobar. Nešto slabiji kvalitet lucerke u fazi cvjetanja, direktna je posljedica značajno većeg sadržaja NDF i ADF u ovoj fazi u odnosu na sadržaj ovih frakcija u prethodne dvije fenofaze. RFV indeks je baziran na konzumaciji probavljive suhe materije lucerke u fazi punog cvjetanja uzimajući vrijednosti ADF od 41% i NDF od 53%. Nešto veće vrijednosti RFV indeksa iznose Dunham (1998); RFV od 164 za lucerku u fazi prije pupanja sa opadajućim trendom kako lucerka stari te Canobolat i sar. (2006) koji su utvrdili RFV od 145 za lucerku u fazi početka cvjetanja. S druge strane Karayilanli i Ayhan (2016) nalaze nešto niže vrijednost RFV rangirane od 132 u fazi pupanja do 111 u fazi punog cvjetanja lucerke.

Optimalno vrijeme košnje utvrđeno na osnovu relativne vrijednosti krmiva, s jedne strane i na osnovu sadržaja suhe materije i sirovog proteina sa druge strane, prikazano je na Grafikonu 1.



Grafikon 1. Prikaz optimalnog vremena košnje lucerke prema RFV i sadržaja sirovog proteina

Figure 1. Optimal harvesting time based on RFV and protein content of lucerne

Iz grafikona se može vidjeti da je prema RFV ocjeni kvaliteta lucerke, optimalno vrijeme za košnju sredina pupanja, dok se ocjenom kvaliteta na osnovu sadržaja proteina i suhe materije, optimalno vrijeme košnje pomjera na fazu početka cvjetanja.

## ZAKLJUČAK

Najpovoljniji momenat košenje lucerke iz prvog otkosa je u fazi pupanja biljke. Iako se prinos suhe materije i proteina povećava sa odmicanjem faza vegetativnog razvoja biljke, druge kvalitativne komponente lucerke (NDF, ADF, probavljiva suha materija, mogućnost konzumacija suhe materije) uslovljavaju značajan pad relativne vrijednosti krmiva nakon faze pupanja. Stoga bi vodilja pri izboru optimalnog momenta košnje lucerke trebala biti interpolacija krivih koje predstavljaju rast prinosa suhe materije i pad indeksa relativne vrijednosti krmiva. Tradicionalniji pristup pri izboru optimalnog momenta košnje zasnovan na ukupnom prinosu suhe materije i proteina, u ovom istraživanju promovira fazu početka cvjetanja kao period pravovremene košnje lucerke.

## LITERATURA

- Ball, D. M., Collins, M., Lacefield, G. G., Martin, N. P., Mertens, D. A., Olson, K. E., Putnam, D. H., Undersander, D. J. i Wolf, M. W. (2001): Understanding Forage Quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL.
- Buxton, D. R., Wedin, W. F., Marten, G. C. (1985): Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. *Crop Sci.* 25:273-279.
- Canbolat, O., Kamalak, A., Özkan, C. O., Erol, A., Sahin, M., Karakas E. and Özkose, E. (2006): Prediction of relative feed value of alfalfa hays harvested at different maturity stages using in vitro gas production. *Livestock Research for Rural Development.* 18, Article #27.
- Dunhan, J. R. (1998): Relative feed value measures forage quality. *Forage Facts.* No. 41.
- Karayilanli, E. and Ayhan V. (2016): Investigation of feed value of alfalfa (*Medicago sativa* L.) harvested in different maturity stages. *Legume Research*, 39 (2), 237-247 Print ISSN: 0250-5371 / Online ISSN: 0976-0571.
- Marković, J. P. (2014): Uticaj fenofaze razvića na zastupljenost lignina i hranjivu vrednost lucerke i crvene deteline. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Moore, J. E., Undersander, D. J. (2002): Relative Forage Quality: An Alternative to Relative Feed Value and Quality Index, 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, University of Florida, USA, p. 16.
- Schroeder, J. W. (2012): Quality Forage for Maximum Production and Return, NDSU, USA p. 10.
- Službeni glasnik BiH 65/2013. Pravilnik o metodama uzorkovanja i analičkim metodama za provedbu službenih kontrola hrane za životinje
- Stjepanović, M., Zimmer, R., Tucak, M., Bukvić, G., Popović, S., Štafa, Z. (2009): Sveučilišni udžbenik. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku i Poljoprivredni institut, Osijek.
- Taylor, R. W. (1995): Hay Sampling and Grading, University of Delaware, USA, p. 3.
- Tomić, D. (2016): Proizvodnja kvalitetne krme višegodišnjih leguminoza. Univerzitet u Kragujevcu. Agronomski fakultet u Čačku.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. (1991): Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10):3583-97.
- Vintu, V., Stavarache, M., Samuil, C., Munteanu, I. (2012): Chemical composition dynamics of alfalfa (*Medicago sativa* L.) at different plant growth stages. *Grassland Science in Europe*, Vol. 17., pp 394-396.
- Wiersma, D. W., Wiederhol, R. (2000): Alfalfa Cutting Height to Maximize Forage Yield and Quality Marshfield Agricultural Research Station and UWEX Clark County Extension University of Wisconsin.

## **CHANGE OF YIELD AND NUTRITIONAL QUALITY DURING VEGETATIVE PHASE OF LUCERNE IN THE FIRST CUT**

### **Summary**

Because of yield and quality parameters of Lucerne are inversely related very important issue for producers is choosing of appropriate harvesting time. Ideally, the cutting should be in the bud to early-bloom stage but practically it depends on many factors, including rainfall what could be great problem especially for first cut in continental regions. An experiment was conducted at Butmir (near to Sarajevo) to provide information about change of lucerne quality parameters during vegetative phase. The area was randomized split in five plots (replications) and samples were collected at early bud phase, phase of early blooming and late blooming phase. The results indicated statistically decreasing of crude protein content (from 19.74% in the bud phase to 13.08 % in late flower phase). ADF and NDF content showed opposite pattern. Dry matter digestibility and dry matter intake as well as relative feed values also decreased during different phases of lucerne development but not such clear as protein decreasing. RFV ranged from 141.04 to 123.0 in bud and late flower phase, respectively indicated relatively high lucerne quality. Total dry matter yield as well as protein yield were increased in line with lucerne maturity. Optimum cutting time to maximize both yield and quality was at late bud phase.

**Key words:** *Lucerne, optimum cutting phase, yield and quality parameters*



## BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE UZGOJNIH POPULACIJA POTOČNE PASTRMKE (*Salmo trutta* Lineaus, 1758) I NJIHOV UTJECAJ NA DIVLJE POPULACIJE U GORNJEM TOKU RIJEKE NERETVE

Samir Muhamedagić<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Potočna pastrmka (*Salmo trutta* Lineaus, 1758) je važan biološki resurs i dio našeg prirodnog nasljeđa. To je „kultna riba“ u sportsko-rekreativnom ribolovu i riblja vrsta od posebnog značaja za akvakulturu. Potočna pastrmka je rasprostranjena u svim vodama Bosne i Hercegovine, osim u ravničarskim tokovima rijeka. U ihtiološkim istraživanjima salmonidnih populacija gornjeg toka rijeke Neretve, provedenih u posljednji 20 godina, utvrđeno je da u ovom slivnom području, pored autohtone jadranske linije potočne pastrmke, egzistiraju i dvije strane, alohtone linije: dunavska i atlantska. Prisustvo ovih alohtonih linija potočne pastrmke u slivu rijeke Neretve rezultat je višedecenijskog poribljavanja ovih voda pastrmkom uzgojenom u ribogojilištima. Analizom molekularno-genetskih markera kontrolnog regiona mtDNK i nuklearnog genoma (LDH gen), uz primjenu biostatističkih testova, utvrđeno je da u ribogojilištima koja vrše poribljavanje rijeke Neretve i njenih protoka u značajnom obimu egzistiraju jedinke alohtonih linija potočne pastrmke i njihovih hibrida. Udio alohtonih jedinki u pojedinim ribogojilištima iznosio je i do 80% od ukupnog uzorka. Osnovni cilj ovog istraživanja bilo je utvrđivanje fenotipskih i genetskih karakteristika uzgojnih populacija potočne pastrmke u ribogojilištima u slivnom području rijeke Neretve.

Ključne riječi: *potočna pastrmka, uzgojna pastrmka, Neretva, poribljavanje.*

### UVOD

Evropska, evroazijska pastrmka ili potočna<sup>2</sup> pastrmka (*Salmo trutta* Lineaus, 1758) je najrasprostranjenija slatkovodna riba porijeklom iz palearktičke regije. Ona je izvorno rasprostranjena u Evropi, zapadnoj Aziji i sjevernoj Africi, ali je, zbog velikog socio-ekonomskog značaja, prenijeta na sve kontinente, osim Antartika (Lelek, 1987; Elliott, 1989, 1994; Laikre, 1999; Bernatchez, 2001; Behnke, 2002; Klemetsen i sar., 2003; Kottelat i Freyhof, 2007; McDowall, 2011). U Bosni i Hercegovini, potočna pastrmka je rasprostranjena u svim vodama

---

<sup>1</sup> Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet

<sup>2</sup> U Bosni i Hercegovini je odomaćen naziv potočna pastrmka, i kao takav će biti korišten u cijelom tekstu  
Korespondencija: s.muhamedagic@pf.unsa.ba

ernomorskog i jadranskog sliva, osim u nizijskim tokovima rijeka (Vuković, 1977; Sofradžija, 2009; Bogut i sar., 2006; Glamuzina i sar., 2013).

Potočna pastrmka se odlikuje visokim nivoom „fenotipske plastičnosti“, odnosno velikom morfološkom i ekološkom varijabilnošću, što se ispoljava kroz veliki broj populacija specifičnih morfoloških i ekoloških karakteristika. Zbog toga je ova vrsta, od uvođenja Linne-ove binomne taksonomske nomenklature do danas, opisana i klasificirana u preko 50 vrsta ili podvrsta (Elliott, 1994; Apostolidis i sar., 1996, 2008; Kottelat, 1997; Laikre, 1999; Behnke, 2002; Klemetsen i sar., 2003), a prema Dellingu i sar. (2000) u više od 100 taksona na nivou vrste.

Pored jasno ispoljenih razlika u morfološkim i ekološkim karakteristikama, potočna pastrmka ispoljava i visok nivo genetičke diferencijacije. Molekularno-genetske analize, provedene na velikom broju populacija pastrmke širom Evrope, pokazale su da ne postoje velike genetske razlike između populacija, ali da svaka populacija određenog geografskog područja ima svoj specifični genetski karakter (Bernatchez i sar., 1992; Hansen i Mensberg, 1996, 1998; Giuffra i sar., 1996; Bernatchez i Osinov, 1995; Hynes i sar., 1996; Apostolidis i sar., 1996, 1997; Machordom i sar., 1999, 2000; Weiss i sar., 2000; 2001; Bernatchez, 2001). Bernatchez i sar. (1992) su identifikovali pet visokodiferenciranih haplotipova, odnosno filogenetskih linija ili loza unutar *Salmo trutta* specijskog kompleksa: atlantsku (AT), dunavsku (DA) mediteransku (ME), jadransku (AD) i marmoratus (MA) liniju. Svaka od ovih linija je vezana za određeno geografsko područje, odnosno za velike riječne slivove u Evropi i ima iste ili slične morfološke karakteristike (Krieg i Guyomard, 1985; Bernatchez i sar., 1992; Giuffra i sar., 1996). Primjenom novih molekularno-genetičkih metoda, utvrđeno je postojanje još dvije filogenetske linije, Duero (DU) i Tigris (TI), dok je marmoratus linija izdvojena iz *S. trutta* kompleksa kao posebna vrsta (Susnik i sar., 2005; Vera i sar., 2010; Pustovrh i sar., 2011, 2014).

Ispitujući genetički diverzitet salmonida u gornjem toku rijeke Neretve, Razpet (2004, 2007) je utvrdio postojanje tri linije *S. trutta* kompleksa: autohtonu jadransku liniju i dvije alohtone, dunavsku i atlantsku liniju, te značajan broj hibrida između autohtone i alohtonih linija. Prisustvo jedinki alohtonih linija potočne pastrmke kao i hibridnih jedinki različitih haplotipova ustanovljene su i u brojnim pritokama u gornjem toku rijeke Neretve (Pojskić, 2005; Kalamujić, 2013). Prisustvo alohtone atlantske i dunavske linije potočne pastrmke u slivu rijeke Neretve rezultat je višedecenijskog poribljavanja ovih voda pastrmkom uzgojenom u ribogojilištima.

Stoga je osnovni cilj ovog istraživanja bilo utvrđivanje fenotipskih i genetskih karakteristika uzgojnih populacija potočne pastrmke u ribogojilištima u slivnom području rijeke Neretve, koja se u sklopu svojih djelatnosti bave i poribljavanjem otvorenih voda u ovom području.

## MATERIJAL I METODE

Za analizu i utvrđivanje morfoloških i genetskih karakteristika uzgojne potočne pastrmke, prikupljeno je po 20 uzoraka iz 5 ribogojilišta (ukupno 100 uzoraka) u kojima se uzgaja mlađ potočne pastrmke za potrebe poribljavanja Neretve i njenih pritoka. Prema Vukoviću i Ivanoviću (1971) i Bogutu i sar. (2006), na anestetiziranim jedinkama su izmjerene osnovne morfometrijske karakteristike: ukupna (apsolutna) i standardna dužina, dužina repne drške, visina tijela, dužina i visina glave, promjer oka i tjelesna masa. Dužinske mjere su uzimane ihtimetrom i nanometrom, preciznošću od 0,1 cm, a tjelesna masa elektronskom vagom preciznošću od 0,1 g. Za molekularno-genetsku analizu jedinkama je uzet uzorak tkiva vršnog dijela podrepnog peraja. Uzorci su pohranjeni u 5-mililitarske tubice, u 96%-tni etanol. Laboratorijska analiza i utvrđivanje genetske karakterizacije uzgojnih populacija potočne pastrmke obavljena je u Institutu za genetski inženjering Univerziteta u Sarajevu. Analizom promatranih regiona DNK (kontrolni region mtDNK i LDH region) izvršena je detekcija haplotipova prema evolutivnim linijama za svaku uzorkovanu jedinku, kao i procjena hibridizacije.

## REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Analizom kontrolnog regiona mtDNK i mikrosatelitskih markera nuklearnog genoma (LDH gen) utvrđena je apsolutna dominacija alohtonih jedinki u uzgojnim populacijama potočne pastrmke (tabela 1). U tri ribogojilišta ( $R_1$ ,  $R_2$  i  $R_4$ ) nije registrovan nijedan primjerak autohtone jadranske linije, uz 100%-tnu dominaciju alohtonih linija potočne pastrmke i njihovih hibrida. Najzastupljenija je atlantska (At) linija sa udjelom od 55% ( $R_2$ ) do 80% ( $R_1$  i  $R_4$ ). preostali udio (15-45%) ispitivanih jedinki u ovim ribogojilištima čine hibridi dunavske i atlantske linije, uz samo jedan primjerak hibrida jadranske i atlantske linije ( $R_1$ ). U preostala dva ribogojilišta utvrđeno je značajno prisustvo jedinki autohtone jadranske linije potočne pastrmke. U ribogojilištu  $R_5$  od 20 ispitivanih jedinki 19 jedinki je bilo autohtonog porijekla (95%) uz jedan primjerak hibrida jadranske i atlantske linije. U ribogojilištu  $R_3$  utvrđena su 3 hibrida, dok je udio jedinki autohtone jadranske linije iznosio 85%. U poređenju sa divljim populacijama potočne pastrmke iz gornjeg toka rijeke Neretve, postoji statistički značajna razlika u proporciji autohtonih jedinki potočne pastrmke između divljih i uzgojnih populacija ( $P < 0,000001$ ).

Tabela 1. Genetska analiza uzgojnih populacija potočne pastrmke

Table 1. Genetic analysis of farm populations of brown trout

Ribogojili šte Fishfarm	CR mtDNK i LDH gen					Odnos autohtonih-alohtonih jedinki Relationship of native-nonnative individuals		
	AD	DA	AT	AD/AT hybrid	DA/AT hybrid	Autohton Native	Alohtona Non-native	% udio alohtonih
R <sub>1</sub>	0	0	16	1	3	0	20	100
R <sub>2</sub>	0	0	11	0	9	0	20	100
R <sub>3</sub>	17	0	0	2	1	17	3	15
R <sub>4</sub>	0	0	16	0	4	0	20	100
R <sub>5</sub>	19	0	0	1	0	19	1	5

Potočna pastrmka ispoljava izrazitu fenotipsku plastičnost, te na različite ekološke uslove staništa i na njihove duže ili trajne promjene često reaguje stvaranjem specifičnih životnih formi, čak i u mikroregijama (Ferguson, 1989; Elliott, 1994). Iako fenotipske karakteristike nisu do kraja pouzdane, one vrlo često mogu biti distinktivni markeri, posebno kada se utvrđuje distinkcija između autohtonih i alohtonih populacija.

Tabela 2. Morfometrijske karakteristike uzgojnih populacija potočne pastrmke

Table 2. Morphometric characteristics of farm populations of brown trout

Morfometrijska karakteristika (cm) Morphometric characteristics (cm)	Uzgojna populacija (n=100) Farm populations (n=100)				
	Mean	Max.	Min.	SD	SE
Totalna dužina (TD) Total length (TL)	31,8	51,8	15,1	0,8	0,90
Standardna dužina (SD) Standard length (SD)	29,0	48,6	13,1	8,6	0,86
Visina tijela (VT) Body depth (BD)	8,1	90,0	2,1	8,6	0,86
Dužina glave (DG) Head length (HL)	6,2	10,6	3,1	1,8	0,18
Visina glave (VG) Head height (HH)	5,4	41,0	2,4	4,0	0,39
Dužina repnog stabla (DRS) caudal peduncle length (CPL)	4,8	7,8	2,1	1,2	0,12
Promjer oka (PO) Eye diameter (ED)	1,0	1,5	0,6	0,2	0,02
Tjelesna masa (TM) Body mass (BM)	444,2	1344,2	49,0	328,4	33,00

Tabela 3. Rezultati usporedbe morfometrijskih parametara uzgojnih populacija  
*Table 3. Results comparing the morphometric parameters of farm populations*

Marker	Aut. Nat.	n	Sred.vr. Mean	Std. dev.	Std. err.	t	P-vrijednost P-value
TD	0,00	60	35,4100	7,8253	1,0102	5,354	0,000
TL	1,00	36	26,4083	8,0640	1,3440		
SD	0,00	60	32,3833	7,7113	0,9955	5,241	0,000
SL	1,00	36	23,8972	7,6613	1,2769		
VT	0,00	60	9,7233	10,7560	1,3886	2,770	0,007
BD	1,00	36	5,7750	1,9312	0,3219		
DG	0,00	60	6,8750	1,5858	0,2047	4,582	0,000
HL	1,00	36	5,2639	1,7153	0,2859		
VG	0,00	60	6,2783	4,8135	0,6214	3,420	0,001
HH	1,00	36	4,0333	1,2705	0,2118		
DRS	0,00	60	5,2917	0,9713	0,1254	4,776	0,000
CPL	1,00	36	4,1417	1,2332	0,2055		
PO	0,00	60	1,0750	0,1612	0,02081	2,987	0,004
ED	1,00	36	0,9556	0,2049	0,03414		
TM	0,00	60	544,8067	325,4682	42,0178	4,003	0,000
TM	1,00	36	294,3250	278,1795	46,3633		

Rezultati t-testa pokazuju statistički značajnu razliku između autohtonih i alohtonih jedinki svih starosnih kategorija i to po svim promatranim parametrima. Zbog mogućeg utjecaja starosnih kategorija na rezultate procjene razlika promatranih markera, u analizama su jedinke grupisane u starosne kategorije (1+, 2+ i 3+). Jedinki starosnih kategorija 4+ i 5+ nije bilo dovoljno za komparacijske analize, pa su 4 primjerka isključena iz daljih analiza. Rezultati usporedbe promatranih morfometrijskih parametara prema pripadnosti autohtonim (1,00) i alohtonim skupinama (0,00) uzgojne populacije potočne pastrmke prikazani su u tabeli 3.

Za starosnu kategoriju 1+ (n=19), statistički značajna razlika između skupine autohtonih i alohtonih jedinki utvrđena je samo za visinu tijela (P=0,006) i tjelesnu masu (P=0,044). Za starosnu kategoriju 2+ (n=49), statistički značajna razlika između skupine autohtonih i alohtonih jedinki utvrđena je za morfometrijske parametre: totalna dužina (P=0,009), standardna dužina (P=0,016), visina tijela (P=0,002), dužina glave (P=0,016) i tjelesna masa (P=0,013). Za ostale parametre nije utvrđena statistički značajna razlika. Kod starosne kategorije 3+ (n=26), utvrđena je statistički značajna razlika za totalnu (P=0,011) i standardnu dužinu (P=0,025), te visinu glave (P=0,004).

Dobijeni rezultati navedenih analiza upućuju nas na zaključak da se značajnije razlike klasičnih morfometrijskih karakteristika između autohtonih i alohtonih skupina

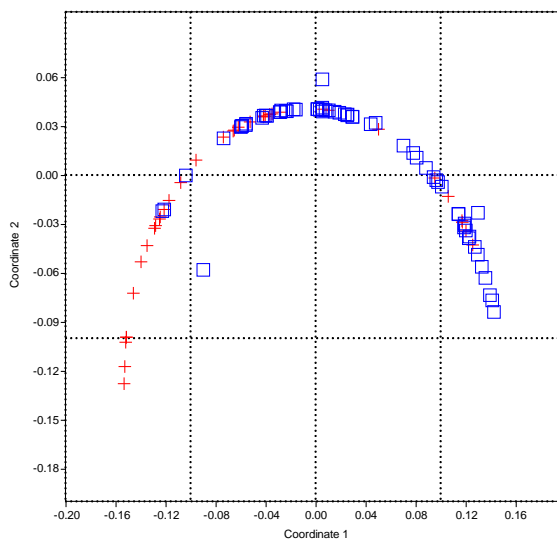
uzgojne potočne pastrmke pojavljuju tek u drugoj godini života, i da se za adekvatnije komparacije tih parametara između autohtone i alohtone uzgojne populacije mogu uzeti samo jedinke starosne kategorije 2+ i više.

Primjena MANOVA testa na jedinkama uzgojnih populacija svrstanih u grupe autohtonih i alohtonih jedinki ukazuje na statistički značajnu razliku (Wilks lambda = 0,7114;  $F=4,615$ ;  $P<0,0001$ ) između dvije navedene skupine kada se posmatra svih osam morfometrijskih osobina zajedno (TD, SD, VT, DG, VG, DRS, PO i TM). Navedeni rezultat je potvrdila i NPMANOVA, koja pokazuje statistički značajne razlike ( $F=19,88$ ;  $P<0,0001$ ) između promatranih skupina autohtonih i alohtonih jedinki. SIMPER (*Similarity Percentage*) test ukazuje da najveći doprinos diferencijaciji između uzgojnih autohtonih i alohtonih skupina daje TM – 90,78%, TD – 3,20%, SD – 3,01%, VT – 1,1%, itd.

Tabela 4. Rezultati usporedbe morfometrijskih parametara starosne dobi 1+, 2+ i 3+  
Table 4. Results comparing the morphometric parameters of age 1+, 2+ and 3+

Dob Age	Marker	Aut. Nat.	N	Sred.vr. Mean	Std. dev.	Std. err.	t	P-vrijednost P-value
1+	TD	0,00	2	25,3000	1,8385	1,3000	3,785	0,096
	TL	1,00	17	19,8353	2,5891	0,6280		
	SD	0,00	2	22,8500	1,9092	1,3500	3,495	0,115
	SL	1,00	17	17,6824	2,4858	0,6029		
	VT	0,00	2	5,6000	0,2828	0,2000	4,475	0,006
	BD	1,00	17	4,2000	0,9918	0,2406		
	DG	0,00	2	4,6000	0,2828	0,2000	2,650	0,150
	HL	1,00	17	4,0059	0,4175	0,1013		
	VG	0,00	2	3,5500	0,2121	0,1500	2,451	0,141
	HH	1,00	17	3,1176	0,3828	0,09285		
	DRS	0,00	2	3,7000	0,2828	0,2000	2,451	0,141
	CPL	1,00	17	3,1235	0,5106	0,1238		
	PO	0,00	2	0,9500	0,07071	0,05000	2,289	0,191
	ED	1,00	17	0,8235	0,09,701	0,02353		
	TM	0,00	2	171,7000	33,3754	23,6000	2,180	0,044
	TM	1,00	17	103,5706	42,2823	10,2550		

	TD	0,00	36	30,7167	3,6163	0,6027		
	TL	1,00	13	28,2077	2,4161	0,6701	2,784	0,009
	SD	0,00	36	27,7917	3,4766	0,5794		
	SL	1,00	13	25,6000	2,2996	0,6378	2,543	0,016
	VT	0,00	36	7,3222	1,3451	0,2242		
	BD	1,00	13	6,3615	0,6305	0,1749	3,379	0,002
	DG	0,00	36	6,0222	0,9743	0,1624		
	HL	1,00	13	5,4077	0,6409	0,1778	2,552	0,016
2+	VG	0,00	36	5,8778	6,0867	1,0145		
	HH	1,00	13	4,1077	0,3378	0,09369	1,737	0,091
	DRS	0,00	36	4,8528	0,6474	0,1079		
	CPL	1,00	13	4,5615	0,4407	0,1222	1,786	0,084
	PO	0,00	36	1,0028	0,1298	0,02163		
	ED	1,00	13	0,9615	0,1121	0,03109	1,089	0,287
	TM	0,00	36	369,2000	151,4607	25,2435		
	TM	1,00	13	281,8846	79,1226	21,9447	2,610	0,013
	TD	0,00	22	44,0091	5,0123	1,0686		
	TL	1,00	4	40,1000	1,6472	0,8236	2,897	0,011
	SD	0,00	22	40,7636	5,3267	1,1357		
	SL	1,00	4	36,5500	2,2884	1,1442	2,614	0,025
	VT	0,00	22	14,0273	17,0620	3,6376		
	BD	1,00	4	8,9500	0,2887	0,1443	1,395	0,178
	DG	0,00	22	8,4773	1,0249	0,2185		
	HL	1,00	4	8,5500	1,2042	0,6021	-0,114	0,915
3+	VG	0,00	22	7,1818	1,2281	0,2618		
	HH	1,00	4	6,0500	0,4203	0,2102	3,371	0,004
	DRS	0,00	22	6,1545	0,7726	0,1647		
	CPL	1,00	4	5,8500	0,9000	0,4500	0,636	0,561
	PO	0,00	22	1,2045	0,1290	0,02751		
	ED	1,00	4	1,3250	0,1500	0,07500	-1,508	0,209
	TM	0,00	22	866,0818	291,6662	62,1834		
	TM	1,00	4	814,9250	89,3024	44,6512	0,668	0,513



Grafikon 1. Rezultati *non-metric MDS* jedinki uzgojnih populacija svrstanih u skupinu autohtonih (+) i alohtonih (□)

*Graph 1. Results of non-metric MDS individuals of farm populations classified into native and non-native groups*

Primjena *non-metric MDS* (grafikon 1) ukazuje na jasnu distinkciju autohtonih jedinki uzgojnih populacija od alohtonih jedinki iste skupine. Ovakvi rezultati, potvrđuju rezultate dobijene primjenom t-testa, koji su ukazivali da je čak i u slučaju stratifikacije prema starosnoj kategoriji, zabilježena značajna razlika između autohtonih i alohtonih jedinki potočne pastrmke u uzgojnim populacijama.

## DISKUSIJA

Da bi se ublažili ili sanirali negativni utjecaji antropogenih aktivnosti na riblji fond, odnosno da bi se spriječio dalji pad divljih populacija i osigurala njihova dugoročna održivost, širom svijeta su donijeti odgovarajući uzgojni programi. U okviru ovih programa, poribljavanje ribolovnih voda ribom uzgojenom u ribogojilištima, propisano je kao jedna od najvažnija mjera. Poribljavanje kopnenih voda različitim vrstama riba uzgojenih u ribogojilištima uobičajena je praksa više od jednog stoljeća u mnogim zemljama u svijetu (Cox, 1994; Welcomme i Bartly, 1998; Laikre, 1999; Allendorf i sar., 2001; Einum i Fleming, 2001; Brown i Day, 2002; Araki i sar., 2009; Kostow, 2009). Poribljavanje, kao mjera zaštite, očuvanja i unaprjeđenja ribljeg fonda u vodama Bosne i Hercegovine, zakonska je obaveza udruženja sportskih ribolovaca, koja upravljaju ribolovnim vodama (Zakon o slatkovodnom ribarstvu F BiH, 2004; Zakon o ribarstvu RS, 2002). Smatra se da se u ribolovne vode u Bosni i Hercegovini godišnje pusti između 400.000 i 500.000 komada uzgojene potočne pastrmke.



Međutim, danas su, u najvećem broju zemalja, takvi uzgojni programi obustavljeni, jer je utvrđeno da poribljavanje, odnosno unošenje uzgojne ribe u otvorene vode, štetno djeluje na divlje populacije salmonida. Negativni utjecaji poribljavanja u ekstremnim se slučajevima ispoljavaju u gubitku genetičkog integriteta. Gubitak genetskog integriteta i jedinstvenog genofonda autohtonih populacija, koji se ispoljava kroz procese hibridizacije i introgresije stanih gena, predstavlja ozbiljnu prijetnju opstanku lokalnih, divljih populacija. Za razliku od ekoloških promjena, koje u velikom broju slučajeva mogu biti privremenog i prolaznog karaktera, promjene u genetičkoj strukturi populacija mogu imati trajni i ireverzibilni karakter (Allendorf i Waples, 1996; Hindar i sar., 1991b; Hansen, 2002; Hansen i Loeschcke, 1994; Laikre i Ryman, 1996; Laikre, 1999; Ferguson, 2006; Nilsson i sar., 2008).

U istraživanjima koja su provedena u periodu od 1999 do 2001. godine (projekat Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu i Biotehničkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani), utvrđeno je da populaciju potočne pastrmke (*Salmo trutta*) u gornjem toku Neretve čine četiri filogenetske linije: dvije autohtone (AdN - neretvanska i AD - jadranska linija) i dvije strane, alohtone (DA - dunavska i AT - atlantska). Procentualni udio ovih linija na pojedinim lokacijama jako varira, i u korelaciji je sa intenzitetom poribljavanja uzgojnom pastrmkom. Genetski „najčistija“ populacija ove pastrmke registrovana je na najudaljenijem području uzvodno od Glavatičeva, na lokalitetu Ocrkavlje. Na ovom lokalitetu utvrđeno je prisustvo samo autohtonih genetskih varijanti, Ad i AdN. Razlog izostanka alohtonih linija može se obrazložiti činjenicom da ovo područje, zbog nepristupačnosti terena, nikad nije poribljavano, i da se uzgojna pastrmka, koja je unošena nizvodno od ovog lokaliteta, uglavnom zadržala na mjestima poribljavanja. U području naselja Glavatičevo, gdje se vrše redovna godišnja poribljavanja, registrovano je prisustvo svih genetskih varijanti koje su utvrđene u ovim istraživanjima. Polovinu ihtipopulacije, oko 50%, činile su autohtone linije pastrmke, dok su alohtone linije bile zastupljene u udjelu od 12% (dunavska linija) i 6% (atlantska linija). Značajan udio ihtipopulacije na lokalitetu Glavatičevo činili su hibridi potočne pastrmke sa glavaticom mekousnom pastrmkom.

U molekularno-genetskim istraživanjima, koja su paralelno provedena sa istraživanjem uzgojnih populacija potočne pastrmke, na 4 lokaliteta u gornjem toku rijeke Neretve (Gacko - lokalitet Krupac, Kalinovic - lokalitet Ulog i Konjic - lokaliteti Glavatičevo i Konjic), utvrđeno je prisustvo hibrida alohtone atlantske linije ove pastrmke. Na svim lokalitetima udio hibrida atlantske i jadranske linije iznosio je 10%. Uzimajući u obzir činjenicu da 100%-tni udio u uzgojnim populacijama potočne pastrmke na većem broju ribogojilišta, koja vrše poribljavanje ribolovnih voda, čine alohtone atlantska i dunavska linija i njihovi hibridi, i njihovo prisustvo na svim lokalitetima u gornjem toku rijeke Neretve, možemo konstatovati da je uzgojna potočna pastrmka dovela do narušavanja prirodne ravnoteže autohtonih populacijama i opadanja brojnosti tih populacija.

## ZAKLJUČAK

Ova istraživanja su pokazala da u ribogojilištima, koja vrše poribljavanje ribolovnih voda u gornjem toku rijeke Neretve, dominira alohtona, atlantska linija potočne pastrmke i njeni hibridi. Na tri od pet istraživanih ribogojilišta udio alohtonih linija u uzgojnoj populaciji iznosio je 100%. Poribljavanje ribolovnih voda takvim primjercima riba u mnogome je doprinijeo eroziji genetičkog integriteta autohtone jadranske linije potočne pastrmke, ali i drugih autohtonih salmonida (glavatrice i mekousne pastrmke), i narušavanju biološke raznolikosti u gornjem toku rijeke Neretve.

Stoga, da bi se spriječio dalji pad genetskog integriteta i gubitak jedinstvenog genofonda potočne pastrmke iz gornjeg toka rijeke Neretve, mora se prekinuti svaki oblik poribljavanja rijeke Neretve i njenih pritoka i pristupiti planskom i zakonski kontrolisanom uzgoju mlađi autohtone potočne pastrmke, zasnovanom na naučno-stručnim studijama.

## LITERATURA

- Allendorf, F. W. and Waples, R. S. (1996): Conservation genetics of salmonid fishes. In Avise J. C. and Hamrick J. L. (eds.): Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman and Hall, New York. 238-280 pp.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., Wenburg, J. K. (2001): The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613-622.
- Apostolidis, A., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. (1996): Genetic divergence and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. *Heredity* 76 : 551-560.
- Apostolidis, A. P., Madeira, M. J., Hansen, M. M., Machordom, A. (2008): Genetic structure and demographic history of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the southern Balkans. *Freshwater Biology* 53: 1555-1566.
- Araki, H., Cooper, B., Blouin, M. S. (2009): Carry-over effect of captive breeding reduces reproductive fitness of wild-born descendants in the wild. *Biology Letters* 5: 621-624.
- Behnke, R. J. (2002): Trout and Salmon of North America. The Free Press, New York. 360 pp.
- Bernatchez, L. (2001): The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55(2): 351-379.
- Bernatchez, L., Osinov, A. (1995): Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology* 4: 285-298.

- Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. (1992): DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161-173.
- Bogut, I., Novoselić, D., Pavličević, J. (2006): *Biologija riba*. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Mostaru. 620 pp.
- Brown, C., Day, R. L. (2002): The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries* 3: 79-94.
- Cowx, I. G. (1994): Stocking strategies. *Fisheries Management and Ecology* 1: 15-30.
- Delling, B., Crivelli, A. J., Rubin, J. F., Berrebi, P. (2000): Morphological variation in hybrids between *Salmo marmoratus* and alien *Salmo* species in the Volarja stream, Soca River basin, Slovenia. *Journal of Fish Biology* 57: 1199-1212.
- Einum, S., Fleming, I. A. (2001): Implications of stocking: ecological interactions between wild and released salmonids. *Nordic Journal of Freshwater Research* 75: 56-70.
- Elliott, J. M. (1989): Wild brown trout *Salmo trutta*: an important national and international resource. *Freshwater Biology* 21: 1-5.
- Elliott, J. M. (1994): *Quantitative Ecology and the Brown Trout*. Oxford University Press, Oxford. 286 pp.
- Ferguson, A. (1989): Genetic differences among Brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biology* 21: 35-46.
- Ferguson, A. (2006): Genetic Impacts of Stocking on Indigenous Brown Trout Populations. Science Report: SC040071/SR. Environment Agency, Bristol. 96 pp.
- Giuffra, E., Guyomard, R., Forneris, G. (1996): Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian Brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology* 5: 207-220.
- Glamuzina, B., Pavličević, J., Tutman, P., Glamuzina, L., Bogut, I., Dulčić, J. (2013): *Ribe Neretve*. Udruga Centar za zaštitu i promicanje endemičnih i autohtonih ribljih vrsta, CEAV, Mostar i Modro zelena zadruga branitelja Metković. 263 pp.
- Hansen, M. M. (2002): Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: An approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology* 11: 1003-1015.
- Hansen, M. M., Mensberg, K.L. D. (1998): Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity* 81: 493-504.
- Hansen, M. M., Mensberg, K. L. D. (1996): Founder effects and genetic population structure of brown trout (*Salmo trutta*) in a Danish river system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 2229-2237.

- Hansen, M. M., Loeschcke, V. (1994): Effects of releasing hatchery-reared brown trout to wild trout populations. In Loeschcke V., Tomiuk J. and Jain S. K. (eds.). Conservation Genetics. Birkhäuser Verlag, Basel. 273-289 pp.
- Hindar, K., Ryman, N., Utter, F. (1991): Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 48: 945-957.
- Hynes, R. A., Ferguson, A., McCann, M. A. (1996): Variation in mitochondrial DNA and post-glacial colonization of north western Europe by brown trout. Journal of Fish Biology 48: 54-67.
- Kalamujić, B. (2013): Genetički diverzitet recentnih populacija *Salmo trutta* L. rijeke Neretve u odnosu na rekonstruisani simulacioni model početnog stanja. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet u Sarajevu, Sarajevo.
- Klemetsen, A., Amundsen, P-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., Mortensen, E. (2003): Atlantic salmon *Salmo salar* L., Brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. Ecology of Freshwater Fish 12: 1-59.
- Kostow, K. (2009): Factors that contribute to the ecological risks of salmon and steelhead hatchery programs and some mitigating strategies. Reviews in Fish Biology and Fisheries 19: 9-31.
- Kottelat, M. (1997): European Freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. Biologia, Sectia Zoology 52(5): 1-271.
- Kottelat, M., Freyhof, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 646 pp.
- Krieg, F., Guyomard, R. (1985): Population genetics of French brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. Genetics, Selection, Evolution 17: 225-242.
- Laikre, L. (ed). (1999): Conservation Genetic Management of Brown Trout (*Salmo Trutta*) in Europe: Report by the Concerted Action on Identification, Management and Exploitation of Genetic Resources in the Brown Trout (*Salmo trutta*) ("TroutConcert"; EU FAIR CT97-3882). Danish Institute for Fisheries Research, Silkeborg. 91 pp.
- Laikre, L., Ryman, N. (1996): Effects on intraspecific biodiversity from harvesting and enhancing natural populations. Ambio 25: 504-509.
- Lelek, A. (1987): The Freshwater Fishes of Europe. Volume 9: Threatened Fishes of Europe. AULA-Verlag, Wiesbaden. 343 pp.
- Machordom, A., García-Marín, J. L., Sanz, N., Almodóvar, A., Pla, C. (1999): Allozyme diversity in brown trout (*Salmo trutta*) from Central Spain: Genetic consequences of restocking. Freshwater Biology 41: 707-717.
- Machordom, A., Suárez, J., Almodóvar, A., Bautista, J. M. (2000): Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Spanish brown trout (*Salmo trutta*) populations. Molecular Ecology, 9: 1325-1338.

- McDowall, R. M. (2011): Animal Dispersal Ability. In Simberloff D. and Rejmánek M. (eds.): Encyclopedia of biological invasions. University of California Press, Ltd. London. 154-159 pp.
- Nilsson, J., Östergren, J., Lundqvist, H., Carlsson, U. (2008): Genetic assessment of Atlantic salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta* stocking in a Baltic Sea river. *Journal of Fish Biology* 73: 1201-1215.
- Pojškić, N. (2005): Polimorfizam mikrosatelitnih markera nuklearnog genoma u bh. populacijama salmonida. Doktorska teza. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu. Sarajevo.
- Pustovrh G., Snoj A., Sušnik Bajec S. (2014): Molecular phylogeny of *Salmo* of the western Balkans, based upon multiple nuclear loci. *Genetics Selection Evolution* 46: 7. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-7>.
- Pustovrh, G., Snoj, A., Sušnik Bajec, S. (2011): A set of SNPs enabling identification of trouts and their hybrids in *Salmo* genus. *Conservation Genet Resour* 3: 147-150.
- Razpet, A. (2004): Genetska raznolikost salmonidov v porečju Neretve. Magistarski rad. Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana. 69 pp.
- Razpet, A., Sušnik, S., Jug, T., Snoj, A. (2007): Genetic variation among trout in the River Neretva basin, Bosnia and Herzegovina. *Journal of Fish Biology* 70: 94-110.
- Sofradžija, A. (2009): Slatkovodne ribe Bosne i Hercegovine. Vijeće Kongresa bošnjačkih intelektualaca. Sarajevo. 355 pp.
- Sušnik, S, Schoffmann, J., Weiss, S. (2005): Genetic verification of native brown trout from the Persian Gulf (Catak Cay River, Tigris Basin). *Journal of Fish Biology* 67: 879-884.
- Vera, M., Cortey, M., Sanz, N., Garcia-Marin, J.-L. (2010): Maintenance of an endemic lineage of brown trout (*Salmo trutta*) within the Duero river basin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48: 181-187.
- Vuković, T. (1977): Ribe Bosne i Hercegovine. IGKRO „Svjetlost“ - OOUR Zavod za udžbenike. Sarajevo. 205 pp.
- Vuković, T., Ivanović, B. (1971): Slatkovodne ribe Jugoslavije. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo, 268 pp.
- Weiss, S., Antunes, A., Schlötterer, C., Alexandrino, P. (2000): Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9: 691-698.
- Weiss, S., Schlötterer, C., Waidbacher, H., Jungwirth, M. (2001): Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish - by man or nature. *Molecular Ecology* 10: 1241-1246.
- Welcomme, R. L., Bartly, D. M. (1998): An evaluation of present techniques for the enhancement of fisheries. In Petr T. (ed.): Inland fishery enhancements. Papers presented at the FAO/DFID Expert Consultation on Inland Fishery

Enhancements. Dhaka, Bangladesh, 7–11 April 1997. FAO Fisheries Technical Paper. No. 374. FAO, Rome. 463 pp.

**BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FARM POPULATIONS OF BROWN TROUT (*Salmo trutta* Lineaus, 1758) AND THEIR IMPACT ON THE WILD POPULATIONS IN THE UPPER STREAM OF THE NERETVA RIVER**

**Summary**

Brown trout (*Salmo trutta* Lineaus, 1758) is an important biological resource and part of our natural heritage. It is a "cult fish" in sport-recreational fishing and fish species of particular importance to aquaculture. Brown trout is widespread in all waters of Bosnia and Herzegovina, except in the lowland flow of the river. In the ichthyological researches of the salmonid populations of the upper part of the Neretva river, carried out in the last 20 years, it has been determined that in this basin exist the indigenous Adriatic lineage of brown trout and two non-native, allochthonous lineages: the Danubian and the Atlantic lineage. The presence of these allochthonous lineages of brown trout in the Neretva river basin is the result of the decennial restocking of these waters by trout breeding in fish farms. The analysis of molecular markers of genetic control region of mtDNA and nuclear genome (LDH gene) and applying biostatistical tests, it was found in significant proportions that in the fish farms exist specimens of allochthonous lineages of brown trout, and their hybrids. The share of allochthonous specimens in certain fish farms was up to 80% of the total sample. The main objective of this study was to determine the phenotypic and genetic characteristics of farm populations of brown trout in fish farms in the Neretva River basin.

*Key words: brown trout, farm trout, the Neretva river, restocking*

## SASTAV IHTIOPOPULACIJE GORNJEG TOKA RIJEKE NERETVE, POLA VIJEKA NAKON IZGRADNJE PRVE BRANE

Samir Muhamedagić<sup>1</sup> Jerko Pavličević<sup>2</sup>, Nebojša Savić<sup>3</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Gornji tok rijeke Neretve je nakon formiranja jablaničke akumulacije smanjen za oko 30 km, pa se današnji pojam gornji tok Neretve odnosi na dio vodotoka od njenog izvorišta do ušća rijeke Trešanice, odnosno do gradske zone Konjic. Istraživanja provedena 2017. i 2018. godine pokazuju pad brojnosti populacija ili potpuni nestanak nekih autohtonih i pojavu nekoliko alohtonih vrsta riba u ovom dijelu slivnog područja Neretve, u odnosu na stanje prije izgradnje brana. Iako salmonide još uvijek čine najveći udio ihtiopopulacije gornjeg toka rijeke Neretve (46.7%), njihova je brojnost značajno smanjena. Najveći pad brojnosti populacija utvrđen je kod endemičnih vrsta. Neretvanska mekousna pastrmka, koja je u istraživanjima provedenim 1983. godine, činila 15,4% ukupne ihtiopopulacije gornje Neretve, danas je zastupljena s 4.2%. Još veći pad brojnosti populacije pokazuje glavatica, koja čini samo 0.2% ukupne ihtiopopulacije. U ovim istraživanjima, kao i u nekim ranijim (2003, 2011), nije registrovan nijedan primjerak bijelog klana i strugača, pa se može konstatovati da su ove autohtone cirinidne vrste nestale iz voda gornje Neretve. Njihovo mjesto zauzele su neke alohtone ciprinidne vrste. Značajan udio u ukupnoj ihtiopopulaciji zauzima lipljen (16.3%), koji je takođe strana, alohtona vrsta.

Ključne riječi: *Neretva, gornji tok, ihtiopopulacija.*

### UVOD

Rijeka Neretva (antički naziv *Narenta*) najveća je i vodom najbogatija pritoka Jadranskog mora. Zajedno s rijekama Po, Rona, Nil, Ebro i dr., Neretva spada u grupu od 10 najvećih rijeka Mediterana, čiji doticaj čini oko polovine doticaja slatke vode u Sredozemno more. Ukupna dužina Neretve iznosi oko 225 km i najvećim dijelom svog toka (oko 204 km) pripada Bosni i Hercegovini. Ukupna dužina stalne površinske riječne mreže u slivu Neretve iznosi oko 1.948 km, sa srednjim padom korita od 10‰. Značajan dio njene riječne mreže predstavljaju podzemni tokovi.

Po hidropotencijalu, s prosječnim godišnjim proticajem od 38,1 m<sup>3</sup>/s, jedna je od najvodonosnijih rijeka u Bosni i Hercegovini (Grupa autora, 1994; Ludwig i

<sup>1</sup> Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet

<sup>2</sup> Sveučilište u Mostaru, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet

<sup>3</sup> Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet

Korespondencija: s.muhamedagic@ppf.unsa.ba

sar., 2009; Skoulikidis i sar, 2009; Drešković i Đug, 2010; Grupa autora, 2012).

Rijeka Neretva, sa svojim brojnim pritokama, predstavlja centralno stanište bioraznolikosti i endemizma ihtiofaune jadranskog sliva (Razpet i sar. 2007). Na osnovu ihtioloških istraživanja i relevantnih literaturnih radova (Vuković i Ivanović, 1971; Vuković, 1977; Bogut i sar., 2006; Sofradžija, 2009; Glamuzina i sar., 2013) može se konstatovati da slivno područje rijeke Neretve u Bosni i Hercegovini nastanjuje 68 vrsta riba iz 23 porodice. Od ovog ukupnog broja ribljih vrsta, 54 vrste su slatkovodne i čine stalnu ihtiopopulaciju sliva, dok preostalih 14 vrsta pripada morskoj ihtiofauni, i samo povremeno ulaze u donji tok rijeke Neretve. Rijeka Neretva, kao i cijeli jadranski sliv, odlikuje se bogatstvom endemskih formi različitog taksonomskog ranga. Od 16 endemskih vrsta riba koje žive u slivu rijeke Neretve na području Bosne i Hercegovine 3 vrste pripadaju porodici *Salmonidae*: mekousna pastrmka (*Salmo obtusirostris*), glavatica (*Salmo marmoratus*) i zubatak (*Salmo dentex*), 11 vrsta pripada porodici *Cyprinidae*: strugač (*Squalius svallize*), podustva (*Chondrostoma knerii*), plotica (*Rutilus basak*), peškelj (*Scardinius plotizza*), neretvanska uklija (*Alburnus neretvae*), makal (*Squalius microlepis*), prikanac (*Phoxinellus pseudalepidotus*), dabarska gaovica (*Telestes dabar*), gatačka gaovica (*Telestes metohiensis*), imotska gaovica (*Delminichthys adspersus*) i popovska gaovica (*Delminichthys ghetaldii*), te 2 vrste pripadaju porodici *Cobitidae*: neretvanski vijun (*Cobitis narentana*) i hercegovački vijun (*Cobitis herzegoviensis*). Na žalost, u vode sliva rijeke Neretve, uključujući i Boračko jezero, Hutovo blato i hidroakumulacije, unijete su i 32 strane, alohtone vrsta riba (Škrijelj, 2002; Grupa autora, 2003; Sofradžija, 2009; Grupa autora, 2011; Glamuzina i sar., 2013, Šukalo i sar., 2018; Vukić i sar., 2019).

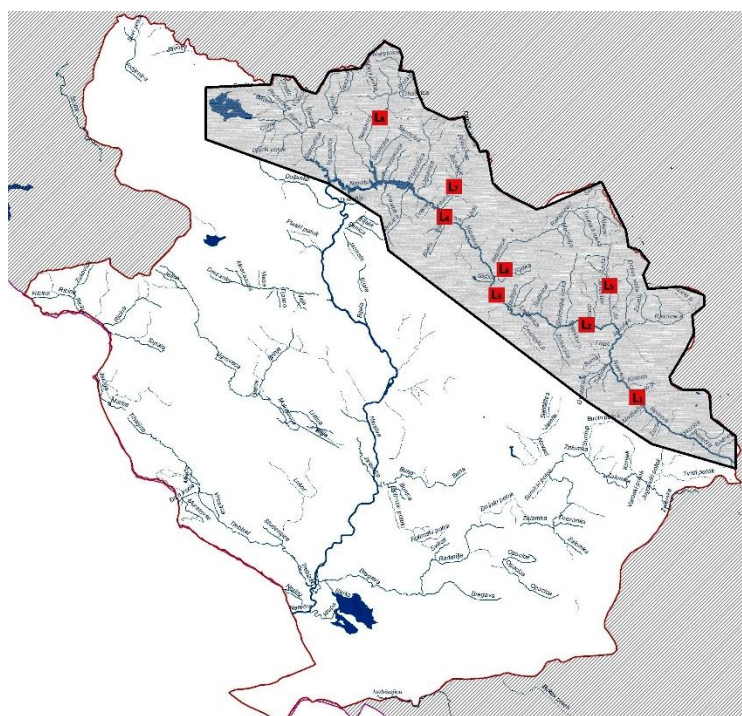
Zbog različitih antropogenih utjecaja, jedan dio gornjeg i skoro cijeli srednji tok rijeke Neretve potpuno su modificirani. Na mjestu gdje je nekada dubokim kanjonom tekla Neretva, izgrađene su četiri velike brane i formirane hidroakumulacije ili vještačka jezera: Jablaničko, Grabovica, Salakovac i Mostar. Prva i najveća brana na Neretvi (80 m) izgrađena je 1955. godine, u tjesnacu između Tovarnice (888 m) i Carskog vrha (828 m), 5 km uzvodno od Jablanice. Akumulacija Jablaničkog jezera dopire sve do centra Konjica, čime je gornji tok rijeke Neretve skraćen za oko 30 km (Škrijelj, 2002; Grupa autora, 2003; Drešković i Đug, 2010).

Izgradnjom prve brane na Neretvi prekinuti su migratorni putevi riba i potpuno promjenjene ekološke karakteristike srednjeg toka. Prije izgradnje brane, glavatica i mekousna pastrmka su u sezoni mrijesta, prirodno migrirale uzvodno, od Čapljinice do Glavatičeva, pa i dalje do Krupačkih stijena i slapa Treskavac, u blizini Uloga (Kosorić, 1969, 1989; Kosorić i Vuković 1971; Škrijelj 2002). Osnovni cilj ovog istraživanja je utvrđivanje kvalitativno-kvantitativnog sastava populacija riba u gornjem toku rijeke Neretve i njegova usporedba sa sastavom populacija riba prije izgradnje velikih brana na rijeci Neretvi.



## MATERIJAL I METODE

Terenska istraživanja su provedena u različitim vremenskim terminima, u periodu od 15. maja 2017. godine do 1. oktobra 2018. godine, i obuhvatila su cijelo područje gornjeg toka Neretve. Budući da gornji tok predstavlja prostorno veliko i vodom bogato područje i ujedno najduži dio toka rijeke Neretve (oko 85 km), za procjenu strukture ribljih populacija u ovom području su odabrani reprezentativni lokaliteti na svakih 20-25 km Neretve, te veće pritoke (slika 1). U ova istraživanja nisu uključena prirodna jezera (Uloško, Boračko i druga manja jezera), jer se smatra da izgradnja brana na Neretvi nije u većoj mjeri mogla utjecati na ihtiofaunu ovih jezera.



### LOKALITETI

#### Neretva:

- L<sub>1</sub> - Krupac
- L<sub>2</sub> - Ocrkavlje
- L<sub>3</sub> - Glavatičevo
- L<sub>4</sub> - Konjic

#### Pritoke Neretve:

- L<sub>5</sub> - Ljuta
- L<sub>6</sub> - Rakitnica
- L<sub>7</sub> - Trešanica
- L<sub>8</sub> - Neretvica

Slika 1. Geografski prikaz gornjrg toka rijeke Neretve sa lokalitetima uzorkovanja  
*Figure 1. Geographical overview of the upper stream of the Neretva river with sampling sites*

Na Neretvi su uzorci riba prupljani na 1000 m a na prirokama na 100 m dužine toka na svakom lokalitetu. Uzorci riba su prikupljeni pomoću profesionalnih elektroagregata (elektroribolov), jačine 3.0 i 15.0 kW. Nakon izlova, ribe su anestetizirane i uzete su im osnovne mjere: ukupna dužina i tjelesna masa. Dužina je mjerena ihtiommetrom, s

preciznošću od 0,1 cm, a tjelesna masa elektronskom vagom preciznošću od 0,1 g. Većina ulovljenih jedinki je fotografisana. Po završetku uzorkovanja i oporavku od anestezije, sve ribe su vraćene u vodu, na mjestu na kojem su i ulovljene. Sistematska determinacija riba vršena je prema V u k o v i ć i I v a n o v i ć (1971), B o g u t i sar. (2006) i K o t t e l a t i F r e y h o f (2007).

## REZULTATI I DISKUSIJA

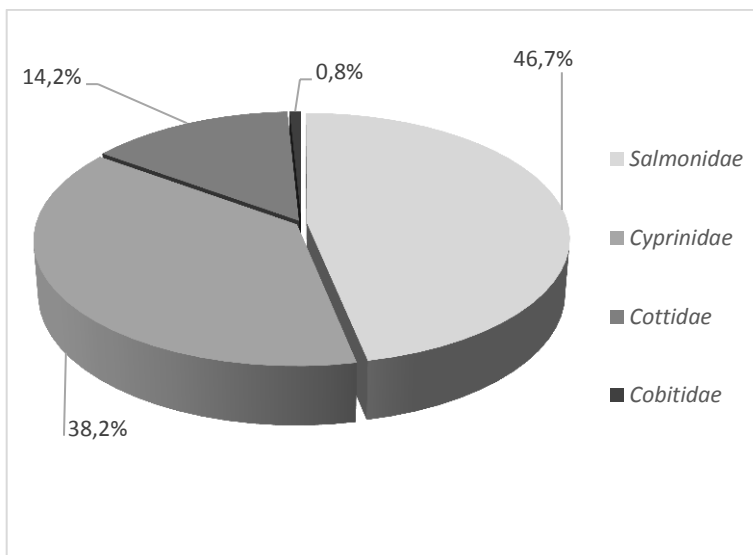
Na rasprostranjenost i zastupljenost pojedinih populacija riba u rijeci Neretvi prvenstveno utiču klimatski i orografski faktori (temperatura vode, brzina protoka, vrsta riječne podloge, nagib korita, i dr.). U gornjem toku Neretve porodica *Salmonidae* čini najveći udio ihtiofaune (69.9%) i zastupljena je sa četiri vrste: potočna pastrmka (*Salmo trutta*), neretvanska mekousna (*Salmo obtusirostris*), glavatica (*Salmo marmoratus*) i lipljen (*Thymallus thymallus*). Šest šaranskih vrsta riba (*Cyprinidae*): klen (*Squalius cephalus*), gagica (*Phoxinus phoxinus*), pliska (*Alburnoides bipunctatus*), bjelica (*Leucaspius delineatus*), krkuša (*Gobio obtusirostris*) i pijurica (*Phoxinellus alepidotus*) učestvuju sa 19.1% u ukupnoj ihtipopulaciji. Peš (*Cottus gobio*) iz porodice *Cottidae* čini 10.6% a neretvanski vijun iz porodice *Cobitidae* 0.4% ukupne ihtipopulacije u gornjem toku rijeke Neretve (tabela 1).

Tabela 1. Kvantitativno-kvalitativni sastav ihtipopulacija u gornjem toku Neretve  
Table 1. The quantitative and qualitative composition of the population in the upper stream of the Neretva river

Vrsta ribe	Vodotok							
	Neretva				Pritoke			
	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>6</sub>	L <sub>7</sub>	L <sub>8</sub>
Potočna pastrmka ( <i>Salmo trutta</i> )	155	88	138	119	65	46	98	121
Mekousna pastrmka ( <i>Salmo obtusirostris</i> )	-	-	31	8	-	-	-	-
Glavatica ( <i>Salmo marmoratus</i> )	-	-	2	-	-	-	-	-
Lipljen ( <i>Thymallus thymallus</i> )	-	11	74	67	-	4	-	-
Klen ( <i>Squalius cephalus</i> )	-	-	10	-	-	-	-	-
Gagica ( <i>Phoxinus phoxinus</i> )	41	53	77	-	-	18	-	32
Pliska ( <i>Alburnoides bipunctatus</i> )	-	-	-	68	-	-	-	-
Bjelica ( <i>Leucaspius delineatus</i> )	-	-	-	70	-	-	-	-
Krkuša ( <i>Gobio obtusirostris</i> )	-	-	4	-	-	-	-	-

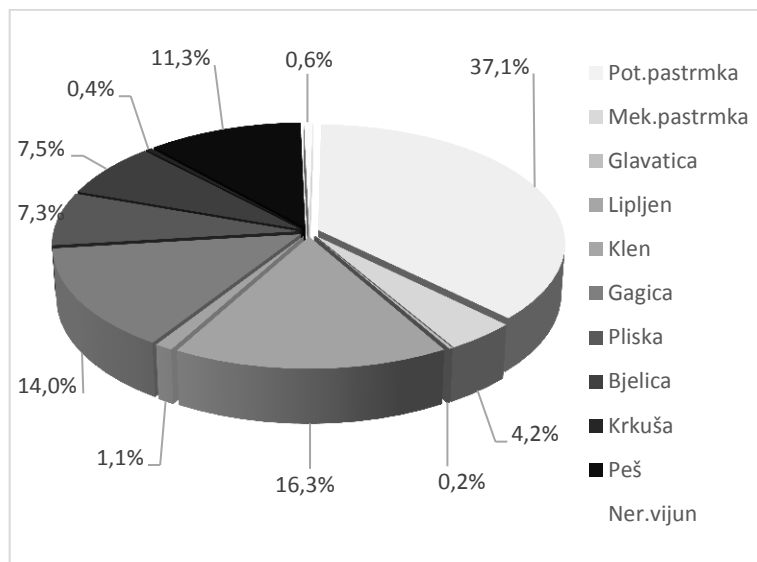
Pijurica ( <i>Phoxinellus alepidotus</i> )	-	-	-	-	-	-	-	2
Peš ( <i>Cottus gobio</i> )	26	32	28	45	-	24	-	-
Neretvanski vijun ( <i>Cobitis narentana</i> )	-	-	-	6	-	-	-	-

U izvorišnom dijelu Neretve, na lokalitetu L<sub>1</sub> (Krupac, općina Kalinovik) utvrđeno je postojanje tri vrste riba: potočne pastrmke, gagice i peša, tako da se ovo područje može smatrati tipičnim pastrmkskim reonom. Potočna pastrmka je dominantna vrsta i čini oko 70% od ukupne ihtiopopulacije. Velika zastupljenost potočne pastrmke i izostanak drugih salmonidnih vrsta riba (mekousne pastrmke i glavatice) u ovom području, uslovljena je postojanjem vodopada - slapa Treskavac (8 m), u blizini selja Ljusići, kraj Uloga. Ovaj slap je nepremostiva prepreka za uzvodne migracije riba (Kačanski i sar., 1977; Kosorić i sar., 1983, 1989). Imajući u vidu da je ovo područje vrlo rijetko poribljavano i da su rezultati genetskih istraživanja pokazali da je ovdje isključivo zastupljena potočna pastrmka jadranske linije (Pojskić, 2005; Kalamujić, 2013; Muhamedagić, 2014), izvorišno područje rijeke Neretve se može smatrati posljednjim rezervatom ove autohtona vrste.



Grafikon 1. Zastupljenost porodica riba u gornjem toku Neretve  
 Graph 1. The presence of fish families in the upper stream of the Neretva River

U preostalom dijelu gornjeg toka Neretve, od slapa Treskavac do jablaničke vodene akumulacije, lokaliteti L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> i L<sub>4</sub> registrovane je 11 vrsta riba: četiri vrste iz porodice *Salmonidae* (glavatica, lipljen, potočna i mekousna pastrmka), 5 vrsta iz porodice *Cyprinidae* (klen, gagica, pliska, bjelica i krkuš) i po jedna vrsta iz porodice *Cottidae* (peš) i *Cobitidae* (neretvanski vijun) (grafikon 1 i 2).

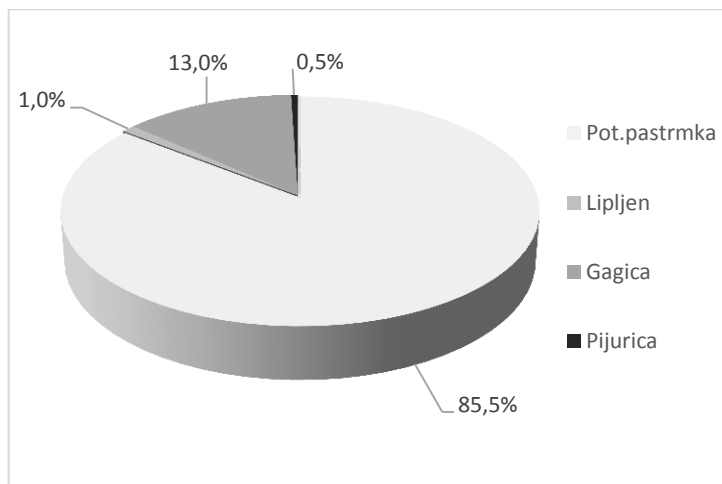


Grafikon 2. Zastupljenost vrsta riba u gornjem toku Neretve

*Graph 2. The presence of the fish species in the upper stream of the Neretva River*

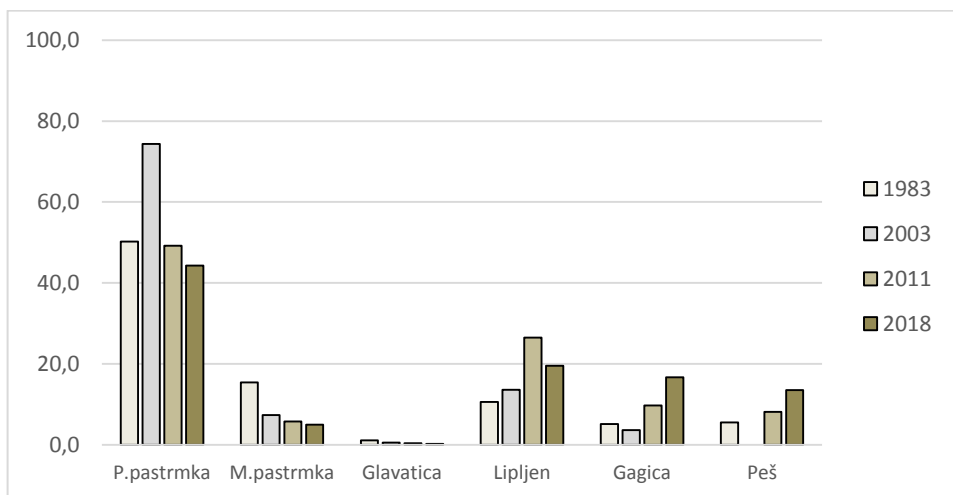
Salmonidne vrste riba čine skoro polovinu (46.7%) ihtiopopulacije gornjeg toka rijeke Neretve (isključujući izvorišni dio), od kojih je najbrojnija potočna pastrmka sa udjelom od 37.1%. Značajan udio u ukupnoj ihtiopopulaciji zauzima lipljen (16.3%), dok su preostale dvije salmonide, mekousna pastrmka i glavatica, zastupljene u znatno manjem obimu, 4.2% i 0.2%. Od ciprinidnih vrsta riba najzastupljenija je gagica (14.0%), dok su manjim populacijama zastupljene pliska (7.3%) i bjelica (7.5%). Značajan udio ukupne ihtiopopulacije u gornjem toku rijeke Neretve čini peš (11.3%) iz porodice *Cottidae*.

U svim ispitivanim pritokama Neretve registrovana je apsolutna dominantnost potočne pastrmke. Potočna pastrmka čini 85.5% od ukupne ihtiopopulacije ovih pritoka. U rijeci Ljutoj potočna pastrmka je jedina registrovana vrsta. Od salmonidnih vrsta riba u pritokama je jedino registrovan lipljen, u donjem toku rijeke Rakitnice (1.0%). Značajan udio ukupne ihtiopopulacije ispitivanih pritoka čini gagica (13.0%), koja je registrovana u Rakitnici i Neretvici. U Neretvici je registrovana i endemična vrsta riba, pijurica, koja čini 0.5% ukupne ihtiopopulacije pritoka Neretve (grafikon 3).



Grafikon 3. Zastupljenost vrsta riba u pritokama Neretve  
*Graph 3. The presence of fish species in tributaries of the Neretva River*

Od polovine prošlog vijeka, ihtiopopulacije gornjeg toka rijeke Neretve pod snažnim su pritiskom različitih antropogenih faktora, koji su negativno uticali na populacije brojnih vrsta riba i izazvale kontinuirane i trajne promjene biološkog diverziteta u ovom slivnom području. Devastirajućim uticajima, koji se ispoljavaju kroz smanjenje brojnosti populacija, pa čak i potpuni nestanak, posebno su izložene neke izuzetno značajne salmonidne vrste riba, kao što su glavatica, neretvanska mekousna i neretvanska potočna pastrmka (Kosorić, 1989; Škrijelj, 2002).



Grafikon 4. Procentualni udio nekih vrsta riba u gornjem toku Neretve (1983-2018)  
*Graph 4. Percentage share of some fish species in the upper stream Neretva River (1983-2018)*

Prije izgradnje brana na Neretvi, glavatica je normalno migrirala tokom mrijesta, uzvodno od Čapljine do Glavatičeva, pa i dalje do Krupačkih stijena i slapa Treskavac (Kosorić i Vuković, 1971). Pretvaranjem gotovo cijelog srednjeg toka Neretve u vodene akumulacije, glavatici je onemogućen pristup bilo kojoj pritoci Neretve i ostvarivanje bar minimalnih uslova za prirodni mrijest, što je dovelo do snažnog i brzog pada populacije glavatice (Kosorić, 1969, 1989; Kosorić i Vuković, 1971). U ovim istraživanjima glavatica čini samo 0.2% od ukupne ihtiopopulacije rijeke Neretve i može se smatrati ribljom vrstom pred nestankom iz ovih voda. Nažalost, prema statusu IUCN crvene liste, glavatica ne spada u ugrožene vrste i klasificira se kao vrsta sa najmanjim stepenom zabrinutosti (Freyhof i Brooks, 2011).

Populacija neretvanske mekousne pastrmke bila je prije izgradnje brana vrlo brojna u gotovo cijelom području toka Neretve, od Krupačkih stijena, ispod Uloga, skoro do ušća u more. Populacija je bila relativno brojna i u nekim pritokama Neretve: Ljuta, Rama, Buna i Trebižat (Vuković, 1977; Kosorić, 1989; Sofradžija, 2009). Drastične promjene životnih uslova u vodenom ekosistemu, nastale nakon formiranja akumulacija na Neretvi i rijeci Rami i neprilagođenost neretvanske mekousne jezerskim uslovima života, dovele su do njenog potpunog nestanka u slivu srednjeg toka Neretve (Kosorić i sar., 1971; Vuković i Sofradžija, 1987, Kosorić, 1989). U gornjem toku Neretve populacija mekousne snažno je degradirana. U istraživanjima strukture ihtiopopulacija gornjeg toka Neretve njena se populacija rapidno smanjuje: 15,4% (Kosorić i sar., 1983), 7,3% (grupa autora, 2003) i 4,4% (grupa autora, 2011). U ovim istraživanjima mekousna pastrmka čini svega 4,2% od ukupne ihtiopopulacije, što je nedovoljno za njen prirodni oporavak. Slične rezultate ugroženosti mekousne pastrmke u cijelom slivu Neretve, od izvora do ušća, iznose i Glamuzina i sar. (2018). Od 1996. godine, mekousna pastrmka se klasificira kao ugrožena vrsta na IUCN crvenoj listi (Crivelli, 2006; IUCN 2013), a naši rezultati predstavljaju osnovu da se klasifikacija ugroženosti poveća.

Ova istraživanja, kao i prethodna istraživanja u posljednjih 20 godina (grupa autora, 2003, 2011) pokazala su da su u gornjem toku rijeke Neretve potpuno nestali bijeli klen (*Squalius squalus*) i strugač, strugač (*Squalius svallize*), koji su prema Vuković i sar. (1983) činili značajan udio u ukupnoj ihtiopopulaciji gornjeg toka rijeke Neretve. Nestanak autohtonih vrsta riba ukazuje na značajne promjene vodenih ekosistema gornje Neretve uslijed antropogenih aktivnosti i recentnih klimatskih promjena.

## ZAKLJUČAK

Gornji tok rijeke Neretve je, nakon izgradnje velikih brana i presjecanja migratornih puteva riba tokom migracija, u značajnoj mjeri devastiran, a u pojedinom dijelovima

toka potpuno uništen i izmjenjen. Ova istraživanja su pokazala da su populacije salmonidnih vrsta riba u stalnom opadanju brojnosti, posebno populacije endemičnih vrsta, mekousne pastrmke i glavatiće. Iz ovih voda potpuno su nestale endemične vrste jadranskog sliva, bijeli klen i strugač. Dalja destrukcija gornjeg toka rijeke Neretve i nebriga o postojećim populacijama, u vrlo bliskoj budućnosti mogla bi uzrokovati potpuni nestanak endemičnih salmonidnih vrsta riba.

## LITERATURA

- Bogut, I., Novoselić, D., Pavličević, J. (2006): Biologija riba. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Mostaru. 620 pp.
- Crivelli, A. J. (2006): *Salmo obtusirostris*. In IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 28 April 2013.
- Drešković, N., Đug, S. (2010): Potamološke karakteristike rijeke Neretve. Zbornik radova: Prvi međunarodni simpozij ribarstva i ribolovnog turizma, Konjic 23-24. jun 2010. Centar za ribarstvo, Konjic. 9-27 pp.
- Freyhof, J., Brooks, E. (2011): European Red List of Freshwater Fishes. Publications Office of the European Union, Luxembourg. 61 pp.
- Glamuzina, B., Pavličević, J., Tutman, P., Glamuzina, L., Bogut, I., Dulčić, J. (2013): Ribe Neretve. Udruga Centar za zaštitu i promicanje endemičnih i autohtonih ribljih vrsta, CEAV, Mostar i Modro zelena zadruga branitelja Metković. 263 pp.
- Glamuzina, B., Stanić-Koštroman, S., Matic-Skoko, S., Glamuzina, L., Muhamedagić, S., Rozić, I., Weiss, S., Pavličević, J. (2018): Recent status and life history traits of endangered soft-mouth trout, *Salmo obtusirostris* in the River Neretva catchment (Bosnia and Herzegovina) as a consequence of river alteration. *Journal of Applied Ichthyology*, 34: 1160-1168.
- Grupa autora. (2012): Strategija upravljanja vodama Federacije Bosne i Hercegovine 2010-2022. Zavod za vodoprivredu d.d. Sarajevo i Zavod za vodoprivredu d.o.o. Mostar, Sarajevo. 298 pp.
- Grupa autora (2011): Ribarska osnova za dio ribolovnog područja - ribolovna zona Konjic. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu i Prirodno-matematički fakultet Sarajevo, Sarajevo. 322 pp.
- Grupa autora (2003): Ribarstveno-gospodarska osnova za područje Konjica, Jablanice i Mostara. Prirodno-matematički fakultet Sarajevo, Sarajevo. 373 pp.
- Grupa autora (1994): Okvirna vodoprivredna osnova Bosne i Hercegovine. Javno vodoprivredno preduzeće „Vodoprivreda Bosne i Hercegovine“ Sarajevo i Zavod za vodoprivredu Sarajevo. 282 pp.
- Kaćanski, D., Kosorić, Đ., Čepić, V. (1977): O ishrani nekih ribljih vrsta u slivu reke Neretve (od Uloga do Mostara). *Ichthyologia* Vol.9, No.1: 31-45.

- Kalamujić, B. (2013): Genetički diverzitet recentnih populacija *Salmo trutta* L. rijeke Neretve u odnosu na rekonstruisani simulacioni model početnog stanja. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet u Sarajevu, Sarajevo.
- Kosorić, Đ. (1989): Endemske vrste riba i njihova zaštita u slivu Neretve. Zbornik radova sa savjetovanja o ribarstvu na hidroakumulacijama. Mostar, juni 1989. 129-132 pp.
- Kosorić, Đ. (1969): Neki podaci o rasprostranjenju i migracijama neretvanske glavatice (*Salmo marmoratus* Cuv.) u slivu Neretve. Glasnik Zemaljskog muzeja, Sarajevo 8: 79-82.
- Kosorić, Đ., Vuković, T. 1971. O mriješćenju glavatice *Salmo marmoratus* Cuvier (Pisces, Salmonidae) u slivu Neretve. Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu, Vol. XXIV: 111-115.
- Kosorić, Đ., Vuković, T., Guzina, N., Kapetanović, N., Mikavica, D. (1989): Ihtiofauna rijeke Neretve i njene promjene posljedično izgradnji hidroelektrana. Zbornik radova sa savjetovanja o ribarstvu na hidroakumulacijama. Mostar, juni 1989. 133-138 pp.
- Kosorić, Đ., Vuković, T., Kapetanović, N., Guzina, N., Mikavica, D. (1983): Sastav naselja ribe rijeke Neretve u SR Bosni i Hercegovini. Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu, Vol. 36: 117-128.
- Kottelat, M., Freyhof, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 646 pp.
- Ludwig, W., Dumont, E., Meybeck, M., Heussner, S. (2009): River discharges of water and nutrients to the Mediterranean and Black Sea: Major drivers for ecosystem changes during past and future decades? Progress in Oceanography 80: 199-217.
- Muhamedagić, S. (2014): Karakterizacija uzgojnih populacija potočne pastrmke (*Salmo trutta*, Linnaeus 1758) iz gornjeg toka Neretve. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu. Doktorska disertacija. 154 pp.
- Pojškić, N. (2005): Polimorfizam mikrosatelitnih markera nuklearnog genoma u bh. populacijama salmonida. Doktorska teza. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu. Sarajevo.
- Razpet, A., Sušnik, S., Jug, T., Snoj, A. (2007): Genetic variation among trout in the River Neretva basin, Bosnia and Herzegovina. Journal of Fish Biology 70: 94-110.
- Sofradžija, A. (2009): Slatkovodne ribe Bosne i Hercegovine. Vijeće Kongresa bošnjačkih intelektualaca. Sarajevo. 355 pp.
- Skoulikidis, T.N., Economou, N.A., Gritzalis, C.K. and Zogoris, S. (2009): Rivers of the Balkans. In: Rivers of Europe. Academic Press, London. 421-466 pp.
- Škrijelj, R. (2002): Populacije riba neretvanskih jezera: ihtiološka monografija. Prirodno-matematički fakultet Sarajevo. Sarajevo. 137 pp.
- Šukalo, G., Dmitrović, D., Golub, D. (2018): First record of the weatherfish *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758) from the Adriatic Sea catchment area in Bosnia and Herzegovina. Ecologica Montenegrina, 18: 126–128.



- Vukić, J., Eliášová, K., Marić, D., Šanda, R. (2019): Occurrence of alien spiralin (*Alburnoides* sp.) in the Neretva river basin. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 420: 15.
- Vuković, T. (1977): *Ribe Bosne i Hercegovine*. IGKRO „Svjetlost“ - OOUR Zavod za udžbenike. Sarajevo. 205 pp.
- Vuković, T., Ivanović, B. (1971): *Slatkovodne ribe Jugoslavije*. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo, 268 pp.

## **COMPOSITION OF ICHTHYOPOPULATIONS IN THE UPPER STREAM OF THE NERETVA RIVER, HALF A CENTURY AFTER THE CONSTRUCTION OF THE FIRST DAM**

### **Summary**

After the formation of the Jablanica reservoir, the upper stream of the Neretva River has been reduced for about 30 km, so today's term the upper stream refers to a part of the watercourse from Neretva source to the mouth of the Trešanica river, near of the Konjic town. Studies conducted in 2017 and 2018 show a decline population size or complete disappearance some native fish species and the appearance of several non-native fish species in this part of the Neretva catchment area, compared to the state before the dam construction. Although salmonids still account for the largest share of the ichthyopopulation of the upper stream of the Neretva River (46.7%), their number is significantly reduced. The largest decline in populations was found in endemic species. The Neretva soft-mouth trout, which in the research conducted in 1983, represented 15.4% of the total population of the upper Neretva, is present today with 4.2%. An even greater decline in population size shows marble trout, which accounts for only 0.2% of the total ichthyopopulations. In these, as in some previous studies (2003,2011), no specimens of white chub and adriatic chub have been recorded, so it is possible to conclude that these native species disappeared from these waters. Their place occupied some non-native cyprinid species. A significant share of the total ichthyopopulations occupies grayling (16.3%), who is also alien species.

**Key words:** *the Neretva river, upper stream, fish population.*

## PRVI PODATAK O GRAVIDNOJ DRHTULJI ŠARULJI, *Torpedo marmorata* (Risso, 1810) U BOSNI I HERCEGOVINI: MORFOLOŠKE I BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE

Adla Kahrić<sup>1</sup>, Andrej Gajić<sup>2</sup>, Samir Muhamedagić<sup>3</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Drhtulja šarulja (*Torpedo marmorata* Risso, 1810) nastanjuje marinska i brakična staništa u vodama Istočnog Atlantika, uključujući i vode Jadranskog mora. Gravidna ženka drhtulje šarulje, ukupne dužine 370 mm i težine 1230 g, uzorkovana je u Neumskom zalivu, 2016. godine. Morfometrijske analize uzorka uključivale su ukupno 30 različitih karaktera, što predstavlja najveći broj publiciranih mjerenih egzomorfoloških odlika za posmatranu vrstu. Analizama je utvrđena blaga asimetričnost jajnika ženke, pri čemu je desni jajnik bio nešto veći (80 mm dužine i 65 mm širine). U jajnicima je registrovano deset neravnomjerno raspoređenih embriona. Veći, desni jajnik nosio je šest embriona. Iako neravnomjerno raspoređeni, embrioni nisu pokazivali različitost u stepenu razvoja i imali su gotovo identičnu dužinu tijela.

Ključne riječi: *drhtulja šarulja, gravidnost, embrion, električni organi.*

### UVOD

Drhtulja šarulja, *Torpedo marmorata* (Risso, 1810) (slika 1-2), široko je rasprostranjena u vodama istočnog Atlantika, od obala Škotske i Danske do Rta dobre nade u Južnoj Africi. Takođe je rasprostranjena i u priobalnim vodama Sredozemnog mora, uključujući i Jadransko more (Jardas, 1997; Notarbartolo di Sciara i sar., 2009; Froese i Pauly, 2019). Nastanjuje kako marinska, tako i braktična staništa, i obitava primarno na kontinentalnom šelfu, počevši od same obale, na vrlo raznolikim tipovima dna. Sporadično se susreće i na većim dubinama, do 370 m (Capape i Desoutter, 1990; Michael, 1993; Møller, 1995).

Adultne jedinke u prosjeku rastu između 39 i 49 cm ukupne dužine tijela, premda su zabilježeni primjerci i do 100 cm dužine, sa preko 3 kg težine (Reiner, 1996; Gajić, 2019). Kompletno tijelo je glatko, dok dermalne dentikule u potpunosti izostaju. Pektoralna peraja poprimaju gotovo kružni oblik i zauzimaju više od pola ukupne dužine tijela. Na ventralnoj strani uočavaju se parni električni organi. Pomenuti su u stanju da produciraju električna pražnjenja do 200 volti, EOD frekvencije do 600 Hz i koriste se kako u lovu plijena, tako i u odbrani od predatora (Reiner, 1996; Gajić,

<sup>1</sup> Association for animal inventory and protection; Ilijaš, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup> Center for marine and freshwater biology Sharklab ADRIA, 27 "Chris", Triq il-Kappella Tal-Lunzjata, Is-Salina, In-Naxxar NXR 6031, Malta

<sup>3</sup> Centar za akvakulturu i ribarstvo, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Sarajevo

2019). Šarulja je ovoviviparna i rađa mlade nakon 9 do 12 mjeseci gravidnosti. Veličina legla je široko varijabilna, od 3 do 32 mladunca (Abdel-Aziz, 1994; Dulvy i Reynolds, 1997; Consalvo i sar., 2007).



Slika 1-2: Juvenilna, tek okoćena, jedinka drhtulje šarulje u vodama Neumskog zaliva (lijevo, foto: A. Gajić) i adulta ženka unutar Neumskog zaliva (desno, foto: A. Kahrić)

*Figure 1-2: Juvenile, newborn individual of marbled electric ray in the waters of the Neum bay (left, photo: A. Gajić) and adult female inside Neum bay (right, photo: A. Kahrić)*

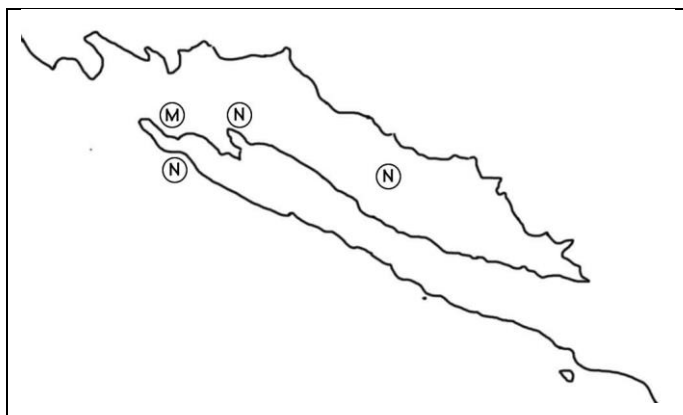
Akvatorij Bosne i Hercegovine predstavljen je mikrolokalitetom unutar Malostonskog zaliva (južni dio istočne Jadranske obale), definisan sa Neumskim zalivom i vanjskom linijom poluotoka Klek sa otocima Veliki i Mali Školj. Sa maksimalnom dubinom od 27,5 metara odlikuje se primarno muljevito-pjeskovitim sedimentom sa sporadičnim naznakama solidnih stijena ili pak livada posidonije, koje se u skorije vrijeme javljaju na vrhu poluotoka Klek. Reljef dna unutar Neumskog zaliva poprima oblik bazena sa laganim padinama i zaravnjenim dnom. Infralitoralna zona odlikuje se prisustvom oblutaka i hridina koje leže na pjeskovitoj bazi, dok se na dubinama od 15(17) m javlja muljeviti pa čak i glinoviti tip sedimenta (Kahrić i Gajić, 2015). Istraživanja hrskavičastih riba unutar akvatorija Bosne i Hercegovine, sistematski i kontinuirano vrše se od septembra 2011. godine. Pomenuta istraživanja rezultirala su popisom predstavnika posmatrane klase, sa bazičnim biološko-ekološkim karakteristikama populacija. Aktuelni pregled konstatovanih vrsta broji sedam vrsta selahija i pet vrsta baotida (Gajić i Lelo, 2011, 2012, 2014; Kahrić i Gajić, 2015; Gajić, 2019).

Iako postoje brojni radovi o drhtulji šarulji, koji primarno obrađuju funkcionalne i molekularno-biološke aspekte električnih organa, ne postoji dovoljno podataka o reprodukciji i opisu samih embriona unutar mediteranskih populacija. Ovaj rad donosi prvi podatak o nalazu gravidne ženke vrste *Torpedo marmorata* Risso, 1810 unutar

akvatorija Bosne i Hercegovine, sa detaljnim morfološkim opisom adultne ženke i embriona, ali pruža i osvrt na rasprostranjenost iste unutar akvatorija, te analizira potencijalne antropogene pritiske.

## MATERIJAL I METODE

Gravidna ženka drhtulje šarulje uzorkovana je mrežom stajacicom 10. jula 2016. godine, na unutrašnjoj strani poluotoka Klek (M) u zoni Neumskog zaliva (slika 3).



Slika 3. Lokaliteti uzorkovanja  
*Figure 3. Sampling locations*

Po izvlačenju, jedinka je držana 24 sata u rashladnoj komori nakon čega je pristupljeno odbudkciji. Standardnim odbudkcionim metodama izvršena je disekcija abdominalnog regiona uz pažljivo uklanjanja mišićnog zida i pripadajućih ovojnica praćeno izolacijom pojedinih organa. Ukupno je 30 morfometrijskih karaktera mjereno prema uputama Sharklab International (2015-2016). Dentalna garnitura je pažljivo analizirana, bez disekcije viličnog sistema, sa akcentom na funkcionalnu tipizaciju zuba prema Gajić (2015). Mukozni sekret iz nazalnih šupljina, usne duplje i škržnih proreza izolovan je i testiran na prisustvo ekto- i endoparazita. Genitalni sistem je pažljivo podvezan na samom početku ovidukta i na završetku uterusa, te je izolovan. Po izolaciji usljedilo je mjerenje svakog jajnika, te izolacija embriona. Ukupna dužina (TL) svih uzoraka izmjerena je do najbližeg milimetra (mm) i odmjerena do najbližeg grama. Indeks tjelesne mase (BMI) za adultnu ženku i reprezentativne embrione izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\text{BMI} \left( \frac{\text{g}}{\text{mm}^2} \right) = \frac{\text{ukupna težina tijela (TW) u gramima}}{\text{ukupna dužina tijela (TL) u milimetrima}}$$

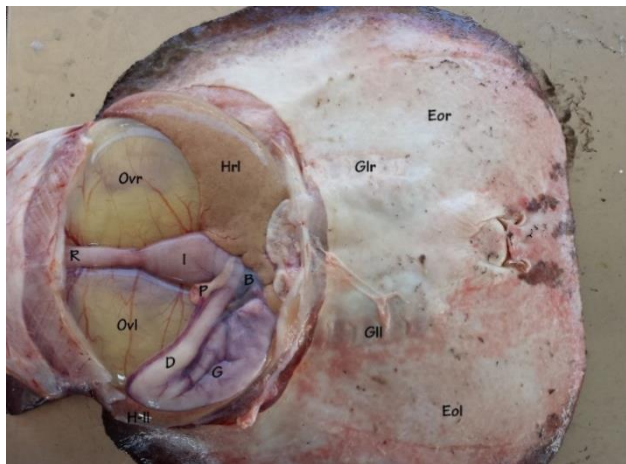
Podaci dobiveni analizama poređeni su sa dostupnim literaturnim podacima za ispitivanu vrstu, ali i druge vrste roda *Torpedo* Houttuyn, 1764, unutar Jadranskog i

Mediterranskog mora. Po završetku morfometrijskih analiza i disekcije, jedinka je zaleđena i pohranjena u ihtiološku kolekciju Sharklab ADRIA, kako bi bila dostupna za edukacione svrhe ali i buduća istraživanja. Pet reprezentativnih embriona zajedno sa vitelusnim mješkom fiskirano je u 96% etilalkoholu i pohranjeno unutar ihtiološke kolekcije Sharklab ADRIA.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Gravidna ženka, vidno napuhanog abdomena, vrste *Torpedo marmorata* Risso, 1810 zabilježena je na unutrašnjoj strani poluotoka Klek (Neumski zaliv) 10. jula 2016. godine. Uzorkovana jedinka identifikovana je pomoću bazičnih morfometrijskih karaktera prema identifikacionom ključu Šoljan (1965) i Gajić (2019). Ukupna dužina tijela iznosila je 370 mm, a ukupna težina 1230 g. Vrijednost BMI indeksa iznosila je 3.324 g/mm<sup>2</sup>.

Detaljnom opservacijom i palpacijom nisu utvrđene patološke promjene na koži, lokomotornim organima i muskulaturi. Ispitivanje mukoznog sadržaja izolovanog iz nosnih otvora, usne šupljine i škržnih proreza nije otkrilo prisustvo parazitskih nametnika. Tokom disekcije abdominalnog regiona, uključujući i dio digestivne cijevi, nije utvrđeno prisustvo makroskopskih endoparazita. Jetra je bila posjedljena u dva režnja vrlo kompakta, pravilne teksture bez patoloških promijena. Žučna kesa bila je ispunjena žuči, dok je sam prostor režnja unutar koga je ležala imao blago žućkasto-zelenkastu obojenost. Slezena i pankreas bili su normalnog oblika, pravilne obojenosti i bez vidljivih promjena.



Slika 4: Disekcija gravidne ženke *Torpedo marmorata* Riso, 1810 ventralna strana: Eor (električni organ, desni režanj), Eol (električni organ, lijevi režanj), Glr (desni set škrge), Gll (lijevi set škrge), Hrl (jetra, lijevi režanj), G (želudac), B (*vesica fellea*), D (*duodenum*), P (gušterača), I (*ileum*), R (*rectum*), Ovr (desni jajnik), Ovl (lijevi jajnik).  
foto A. Gajić.

*Figure 4: Dissection of gravid female Torpedo marmorata Riso, 1810 ventral side: Eor (electrical organ, right lobe), Eol (electrical organ, left lobe), Glr (right set of gills), Gll (left set of gills), Hrl (liver, left lobe), G (stomach), B (vesica fellea), D (duodenum), P (pancreas), I (ileum), R (rectum), Ovr (right ovary), Ovl (left ovary). photo A. Gajić.*

Unutar želuca bile su vrlo izražene želučane ruge, dok nije bilo naznaka skorog hranjenja. Ipak, disekcija ileuma ukazala je na određenu količinu dijelomično svarenih crvolikih organizama bez mogućnosti pravilne identifikacije. Ovarijumi su bili iznimno veliki i ovalnog oblika, vidno zauzimajući najveći dio abdominalne šupljine (slika 4).

Morfometrijske analize uključile su ukupno 30 različitih karaktera, što predstavlja najveći broj publiciranih mjerenih egzomorfoloških odlika za posmatranu vrstu u svijetu (tabela 1). Za svaki karakter izražena je vrijednost u milimetrima kao i procenat od ukupne tjelesne dužine - što može poslužiti svim budućim analizama za komparaciju. Mogućnost konstatovanja graviditeta putem prostog pregleda ribe zasigurno može pomoći u podizanju svijesti lokalnih ali i komercijalnih ribolovaca i pridonjeti očuvanju novih naraštaja, što će se zasigurno pozitivno odraziti na same populacije.

Tabela 1: Morfometrijske karakteristike gravidne ženke drhtulje šarulje prije disekcije  
*Tab.1: Morphometric characteristics of gravid female of marbled electric ray before dissection*

Morfometrijska osobina <i>Morphometric characteristic</i>	mm	% TL
Totalna dužina tijela <i>Total body length</i>	370	100
Totalna širina tijela <i>Total body width</i>	235	63.51
Udaljenost od vrha gubice do početka očiju <i>Distance from the tip of the snout to the beginning of the eyes</i>	35	9.73
Udaljenost između očiju <i>Distance between eyes</i>	21	5.68
Udaljenost između očiju i spirakuluma <i>Distance between the eyes and spiraculum</i>	9	2.43
Najveća udaljenost između spirakuluma <i>Maximum distance between spiraculum</i>	27	7.23
Udaljenost od vrha gubice do nazalnog otvora <i>Distance from the tip of the snout to the nasal opening</i>	27	7.23
Udaljenost između nazalnih otvora <i>Distance between nasal openings</i>	17	4.59

Udaljenost između nazalnih otvora i početka usta <i>Distance between nasal openings and the beginning of mouth</i>	5	1.35
Maksimalna širina usnog otvora <i>Maximum width of the mouth opening</i>	43	11.62
Maksimalna dužina usnog otvora <i>Maximum length of the mouth opening</i>	30	8.10
Udaljenost od vrha gubica do prvog škržnog otvora <i>Distance from the tip of the snout to the first gill opening</i>	185	50
Udaljenost između susjednih škržnih pukotina <i>Distance between adjacent gill cracks</i>	11	2.97
Ukupna dužina od prvog do petog škržnog luka <i>Total length of the first to fifth gill arc</i>	45	12.16
Maksimalna udaljenost lijevih i desnih škržnih proreza <i>Maximum distance the left and right gill slits</i>	60	16.22
Maksimalna dužina pektoralne peraje <i>Maximum length of pectoral fin</i>	210	56.76
Maksimalna širina pektoralne peraje <i>Maximum width of pectoral fin</i>	90	24.32
Maksimalna dužina trbušne peraje <i>Maximum length of abdominal fin</i>	95	25.66
Maksimalna širina trbušne peraje <i>Maximum width of abdominal fin</i>	50	13.51
Dužina centralne grbe <i>Length of the central hump</i>	100	27.03
Maksimalna dužina abdomena <i>Maximum length of the abdomen</i>	130	35.14
Maksimalna širina abdomena <i>Maximum width of the abdomen</i>	143	38.65
Dužina kaudalnog regiona <i>Length of the caudal region</i>	135	36.49
Maksimalna širina kaudalnog regiona <i>Maximum width of the caudal region</i>	30	8.10
Dužina repne peraje <i>Length of the tail fin</i>	50	13.51
Širina repne peraje <i>Width of the tail fin</i>	37	10
Dužina prve dorzalne peraje <i>Length of first dorsal fin</i>	21	5.68
Širina prve dorzalne peraje <i>Width of first dorsal fin</i>	33	8.92
Dužina druge dorzalne peraje <i>Length of second dorsal fin</i>	20	5.41

Širina druge dorzalne peraje <i>Width of second dorsal fin</i>	25	6.76
---	----	------

Posmatrana jedinka posjedovala je oba funkcionalna jajnika (*ovarium*), koji su direktno komunicirali sa izvodnim kanalima (*oviducti*), a koje dalje pridržava nabor potrbušice (*mesotubarium*). Analizama utvrđena je blaga asimetričnost u ukupnim dimenzijama, dok je unutar jajnika bilo prisutno deset neravnomjerno raspoređenih embriona. Desni ovarijum mjerio je 80 mm dužine sa 65 mm širine, dok je netom manji lijevi ovarijum mjerio 73 mm dužine sa 57 mm širine. Sami ovarijumi su bili vrećasti, napuhani i ispunjeni histotroph (uterine milk) – tečnošću produciranom od majke i vrlo vjerovatno obogaćenom sluzi, mastima i proteinima koje će kasnije služiti za dodatnu ishranu embriona, što je u skladu sa navodima Dulvy i Reynolds (1997). Dok je veći desni ovarijum sadržavao šest embriona, unutra lijevog je bilo prisutno četiri embriona. Ovi podaci su u skladu sa navodima Quignard i Capape (1974) koji navode da vrste *T. marmorata* Risso, 1810 i *T. torpedo* (L.) posjeduju asimetričnosti u abdominal viscera, obzirom na činjenicu da je desni dio genitalnog trakta razvijeniji u odnosu na lijevi. Zidovi ovarijuma bili su vidno prokrvljeni sa manje od deset (vidljiva četiri sa jedne strane) vrlo razgranatih krvnih sudova. Ispod desnog režnja jetre, koji je dijelom pokrivao i ovarijum, nalazilo se nekoliko atrofiranih oocita žute boje i sporadično nepravilnog oblika, te vrlo malog prečnika. Iako su ovarijumu zauzimali veliku većinu abdominalne šupljine sa gusto zbijenim organima ipak je unutar digestivne cijevi uočen ostatak skorašnjeg plijena što ukazuje da drhtulja ne ulazi u non-feeding period prisutan kod pojedinih vrsta hrskavičastih riba, koje vjerovatno usljed nedostatka prostora u abdominalnoj šupljini tokom graviditeta ne konzumiraju plijen.

Embrioni nisu pokazivali različitosti u stepenu razvoja, što potvrđuje gotovo identična dužina samih embiona, a obzirom na dijelom prozirnu kožu lateralnih rubova abdomena, moguća je bila i opservacija različitih organa u razvoju. Detaljne opservacione analize nisu utvrdile malformacije u razvoju. Količina absorbiranog vitelusa bila je gotovo jednaka u svih deset embriona, čemu svjedoči i mjereni dijametar samog mješka. Svaki embrion razvio je morfološke karaktere dijelom nalik na roditeljske, sa određenim razlikama. Pektoralna peraja bila su spojena sa gubicom, koja je bila vrlo izdužena i obla. Lateralno na spoju pektoralnih peraja sa kranijalnim regionom bile su prisutne vrlo krupne oči (koje su posnatanlno pozicionirane na dorzalnoj strani daleko od lateralnog oboda). Kaudalni region mjerio je gotovo pola ukupne dužine tijela embriona, u odnosu na 36.49 % tijela postnatalno. Lateralno su se mogle uočiti naznake razvoja električnih organa, što je u skladu sa Mellinger i sar. (1978). Prosječna dužina embriona iznosila je  $3.2 \pm 2$  mm, što je 8.65 % od ukupne tjelesne dužine posmatrane ženke i 41.83 % od prosječne ukupne dužine ovarijuma (76.5 mm). Svaki embrion bio je, putem pupkovine, prikačen za vitelusni mješak blijedo žute boje, prečnika  $50 \pm 2$  mm (što je 13.51% ukupne tjelesne dužine i 65.36% prosječne dužine ovarijuma).





Slika 5-6: Embrioni zajedno sa vitelusnim mješkom izolovani iz gravidne ženke u uporedbi sa abdominalnom dupljom (gore), makro prikaz embriona sa vanjskim škrgama, vidljivim unutrašnjim organima i vitelusnim mješkom (dole), foto: A. Gajić.

*Figure 5-6: Embryos with embryonic mucus isolated from gravid females in comparison to abdominal cavity (top), macro view of embryos with external gills, visible internal organs and vitellus bladder (bottom), photo: A. Gajić.*

Uzimajući u obzir dužinu novorođenih jedinki od  $120 \pm 20$  mm (Mellinger, 1971) i period gestacije u trajanju od 9 do 12 mjeseci (Abdel-Aziz, 1994; Consalvo i sar., 2007) možemo zaključiti da se analizirana jedinka nalazila pred kraj prve trećine gestacionog ciklusa, tačnije oko pet do šest mjeseci prije koćenja. Pomenuta činjenica ukazuje na to, da bi se analizirana ženka kotila krajem decembra i početkom januara, odnosno, da se parenje odvijalo u periodu od januara do marta. Consalvo i sar. (2007), kao i Abdel-Aziz (1994), navode da se parenje odvijalo od novembra do januara, što se tek djelimično slaže sa podacima u našem radu.

## ZAKLJUČAK

Kod drhtulje šarulje, ulovljene u Neumskom zalivu, utvrđena je gravidnost, koja je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja u drugim područjima njene rasprostranjenosti: neravnomjerna raspoređenost embriona u blago asimetričnim jajnicima. Iako je utvrđena neravnomjerna raspoređenost embriona, svih deset embrina (šest iz desnog i četiri iz lijevog janika) bilo je istog stepena razvoja. Detaljne opservacione analize nisu utvrdile malformacije u razvoju. Prosječna dužina embriona iznosila je  $3.2 \pm 2$  mm, što je 41.83% od prosječne ukupne dužine ovarijuma (76.5 mm). Na osnovu ove prosječne dužine embriona može se zaključiti da se gravidna ženka drhtulje šarulje iz Neumskog zaliva nalazila na kraju prve trećine gestacionog ciklusa, odnosno pet do šest mjeseci pred koćenje. To se poklapa sa vremenskim periodom kraj decembra-početak januara, što se djelimično slaže sa dobijenim rezultatima ranijih istraživanja (novembar-decembar).

## ZAHVALNICA

Istraživanja su vršena u sklopu projekta „Establishing the first MPAs in Bosnia: Protecting the highly endangered habitats and spawning sites of skates and rays in the Neum bay“ u potpunosti finansiranog od strane Waitt Foundation, putem ROC Grant projekta.

## LITERATURA

- Abdel-Aziz, S. H. (1994): Observations on the biology of the common torpedo (*Torpedo torpedo*, Linnaeus, 1758) and marbled electric ray (*Torpedo marmorata*, Risso, 1810) from Egyptian Mediterranean waters". *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 45 (4): 693–704
- Capapé, C., Desoutter, M. (1990): Dasyatidae. Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic, 1, 59-63.
- Consalvo, I., Scacco, U., Romanelli, M., & Vacchi, M. (2007): Comparative study on the reproductive biology of *Torpedo torpedo* (Linnaeus, 1758) and *T. marmorata* (Risso, 1810) in the central Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, vol. 71 (2), pp. 213–222.
- Dulvy, N. K., Reynolds, J. D. (1997): Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and maternal inputs in sharks and rays. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1386), 1309-1315.
- Froese, R., Pauly D. (Editors). (2019): FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (02/2019).
- Gajić, A., Lelo, S. (2012): Supplemented systematics review of cartilaginous fish of Bosnia and Herzegovina. In: S. Lelo (ed.) Fauna of Bosnia and Herzegovina Biosystematical review, 7th Amended edition.

- Gajić, A. (2015): *Teeth and jaws of the Adriatic sea sharks*. Illustrated by Marc Dando. Center for environmental sustainable development, Sarajevo.
- Gajić, A. (2019): *Sharks, skates and rays of the eastern Adriatic sea*. Center for marine and freshwater biology Sharklab ADRIA, Sarajevo.
- Gajić, A., Lelo, S. (2011): Assessment of degree of exploration of cartilaginous fish (Chondrichthyes Huxley, 1880) in Bosnia and Herzegovina. International conference "Structure and dynamics of ecosystems Dinarides - status, possibilities and prospects". Academy of Sciences and Arts of Bosnia and Herzegovina. Book of Abstract; str. 18-19.
- Gajić, A., Lelo, S. (2014): Assessment of degree of exploration of the cartilaginous fish (Chondrichthyes Huxley, 1880) in the aquatorium of Bosnia and Herzegovina. *Supplements to Fauna of Bosna and Herzegovina*, Vol. 10, pp. 59-67.
- Jardas, I. (1997): Ribe i glavonošci Jadranskog mora. IP „Svjetlost“ d.d., Sarajevo.
- Kahrić, A., Gajić, A. (2015): Review of biodiversity of skates and rays (Elasmobranchii: Batoidea) of Neum bay. *Supplements to Fauna of Bosnia and Herzegovina*, 11, 99-105.
- Mellinger, J. (1971): Croissance et reproduction de la Torpille (*Torpedo marmorata*). I. Introduction, écologie, croissance générale et dimorphisme sexuel. Cycle. Fécondité. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, vol. 105, pp. 165-218.
- Mellinger, J., Belbenoit, P., Ravaille, M., Szabo, T. (1978): Electric organ development in *Torpedo marmorata*, Chondrichthyes. *Developmental Biology*, vol. 67, pp. 167-188.
- Michael, S. W. (1993): Reef sharks and rays of the world. A guide to their identification, behavior, and ecology. Sea Challengers, Monterey, California. 107 p.
- Møller, P. R. (1995): *Electric fishes: history and behavior*. Chapman & Hall, London. 584 p.
- Notarbartolo di Sciara, G., Serena, F., Ungaro, N., Ferretti, F., Pheeha, S., Human, B. (2009): *Torpedo marmorata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T161328A5398909.
- Quignard, J. P., Capapé, C. (1974): Recherches sur la biologie d un Sélacien du golfe de Tunis, *Torpedo torpedo* Linné, 1758 (Ecologie, sexualité, reproduction). Bulletin de l'Institut océanographique de Monaco. *Pêche Salammbô*, 3(1): 4.
- Reiner, F. (1996): Catálogo dos peixes do arquipélago de Cabo Verde. Publ. Avuls. Inst. Port. Invest. Mar. 2:339 p.
- Šoljan, T. (1965): Ribe Jadrana. Zavod Za Izdavanje Udžebnika, Socijalističke Republike Srbije.

**FIRST OBSERVED GRAVID MARBLED ELECTRIC RAY, *Torpedo marmorata* (Risso, 1810), IN BOSNIA AND HERZEGOVINA: MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS**

**Summary**

Marbled electric ray (*Torpedo marmorata* Risso, 1810) inhabits marine and brackish habitats in the waters of the East Atlantic, including the waters of the Adriatic sea. The gravid female of marbled electric ray, total length 370 mm and weight 1230 g, was sampled in Neum Bay, 2016. Morphometric analyzes of the sample included a total of 30 different characters, representing the largest number of published measured exomorphological traits for the observed species. Analysis showed mild asymmetry of the ovaries of the female, with the right ovary being slightly larger (80 mm in length and 65 mm in width). In ovaries were registered ten unevenly distributed embryos. The bigger, right ovary had six embryos. Although unevenly distributed, the embryos did not show differences in the degree of development and had almost the same body length.

Key words: *marbled electric ray, gestation, embryo, electric organs.*

## EFEKAT FIZIČKO-HEMIJSKIH FAKTORA NA DISTRIBUCIJU VODENIH CVJETOVA U MAKROZOOBENTOSU CRNE RIJEKE

Aldijana Mušović<sup>1</sup>, Rifat Škrijelj<sup>1</sup>, Sadbera Trožić-Borovac<sup>1</sup>, Senad Šljuka<sup>1</sup>, Mahir Gajević<sup>1</sup>

Originalni naučni rad – *Original scientific paper*

### Rezime

Preimaginalni stadiji vodenih cvjetova predstavljaju brojčano i ekološki vrlo značajnu komponentu zoocenoza slatkovodnih ekosistema širom svijeta. Uzorkovanje je izvršeno u periodu od jula 2009. do jula 2010. godine na pet lokaliteta Crne rijeke općine Trnovo. Na terenu su mjereni nadmorska visina, temperatura vode, te koncentracija i saturacija kisika. Cilj ovog rada bio je uticaj odabranih okolinskih faktora na distribuciju vodenih cvjetova u makrozoobentosu Crne rijeke (koristeći Kanoničku analizu korespondencije) i primjenjivost ove metode na istraživanja ovog tipa. Ordinacijski dijagrami dobiveni kanoničkom analizom korespondencije za sve sezone pokazali su mali uticaj nadmorske visine i ispitivanih fizičko-hemijskih parametara na sastav i distribuciju vrsta iz reda Ephemeroptera, kao i to da ni jedan mjereni parametar nije limitirajući za larve ovog reda makrozoobentosa Crne rijeke.

Ključne riječi: *Kanonička analiza korespondencije (CCA), Ephemeroptera, Crna rijeka*

### UVOD

Vrste vodenih cvjetova - reda Ephemeroptera Hyatt i Arms, 1891 (Insecta Linnaeus, 1758) su stara grupa krilatih insekata sa nizom primitivnih karakteristika. Naseljavaju sve predjele Zemlje, izuzev nekih ostrva i Antarktika (Zabrc, 2003). Do danas je opisano oko 3000 vrsta reda Ephemeroptera svrstanih u 42 familije i preko 400 rodova (Barber–James i sar., 2008). U Evropi se procjenjuje da živi oko 300 vrsta (Studemann i sar., 1992). Period intenzivnog istraživanja ovih insekata u bosanskohercegovačkim vodama traje od početka sedamdesetih godina prošlog vijeka do danas (Trožić-Borovac, 2005), što je rezultiralo poznavanjem 20 rodova i 58 vrsta ovog reda iz devet porodica.

Embrionalno razviće provode u vodama, pa njihovi preimaginalni stadiji (larve, subimaga) nastanjuju makrozoobentos slatkovodnih ekosistema.

Radi se o izuzetno osjetljivim vrstama, posebno kad je u pitanju temperatura, količina kiseonika i organsko zagađenje (Roback, 1974). Ovo su i osnovni razlozi za

---

<sup>1</sup> Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu  
Korespondencija: aldijana\_bec@yahoo.de

korištenje ove skupine, tačnije njihovih preimaginalnih stadija, kao značajnih indikatora kvaliteta vode (Marshal, 1980).

Područje istraživanja obuhvata prostor koji se nalazi u jugoistočnom dijelu Kantona Sarajevo, na teritoriji općine Trnovo (FBiH). Crna rijeka, desna pritoka rijeke Željeznice, izvire ispod obronaka Trebevića i Jahorine na nadmorskoj visini od oko 1200 m, dok je ušće na 785 m nadmorske visine. Ukupna dužina toka ove rijeke iznosi 15 700 m.

Kanonička analiza korespondencije (CCA) predstavlja vizuelni prikaz preferencije vrsta prema različitim mikrostaništima (ekološkim nišama) prikazan kroz ordinacijski dijagram (Palmer, 1993; Mc Cune i Grace, 2002). Kanonička analiza korespondencije temelji se na metodi ponderiranih srednjih vrijednosti okolišnih faktora indikatorskih vrsta koje predlažu hidrobiolozi, kao što su Gause (1930), Ellenberg (1948) i Gauch (1982) i široko se primjenjuje u biološkoj ocjeni kvaliteta vode (Pantle & Buck, 1955; Zelinka & Marvan, 1961; Sladeček, 1986). Ova metoda se aplicira za istodobnu analizu velikog broja vrsta i okolišnih varijabli. CCA pruža opći okvir za procjenu i statistička ispitivanja utjecaja okolišnih varijabli i drugih nezavisnih varijabli na biološke zajednice, čak i ako su učinci skriveni iza drugih velikih izvora varijacija.

Osnovni cilj ovog rada je određivanje uticaja odabranih okolinskih faktora na distribuciju vodenih cvjetova u makrozoobentosu Crne rijeke koristeći CCA analizu, te ocjena primjenjivosti metode na istraživanja ovog tipa.

## MATERIJAL I METODE

Mjerenje fizičko-hemijskih parametara i uzorkovanje makrozoobentosa obavljeno je četiri puta tokom obje godine uzorkovanja (29. juli i 09. Oktobar 2009. i 29. april i 29. juli). Istraživanja su izvršena na pet lokaliteta Crne rijeke (L1 - ušće Crne rijeke u Željeznicu, L2 - hidrološka mjerna stanica Podtiljeg, L3 - nizvodno od naselja Delijaš, L4 - uzvodno od naselja Delijaš i L5 - naselje Balbašići). Fizičko-hemijski parametri vode (količina kisika, zasićenje kisikom i temperatura) mjereni su prilikom uzorkovanja makrozoobentosa pomoću multi-set aparata oksimetar Bruker 3040. Određena je nadmorska visina lokaliteta pomoću GPS uređaja «Garmin».

Tokom istraživanja uzorkovan je makrozoobentos Crne rijeke sa ciljem izdvajanja i identifikacije preimaginalnih stadija vodenih cvjetova. Za prikupljanje i fiksaciju uzoraka korištena je AQEM metoda koja se temelji na metodologiji razvijenoj od strane Barbour i sar. (1999). Ova metoda se usredotočuje na multihabitat shemu uzorkovanja dizajniranu za uzorkovanje velikih staništa proporcionalno prema njihovoj prisutnosti u zoni u kojoj se vrši uzorkovanje. Za prikupljanje uzoraka korištena je mreža za uzorkovanje. Materijal je fiksiran na terenu sa 4% formaldehidom, potom u Laboratoriji za ekologiju životinja Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu separiran prosijavanjem kroz mrežu promjera okaca od 500  $\mu\text{m}$ , te fiksiran u 70% etanolu. Identifikacija jedinki reda Ephemeroptera

vršena je do najnižih mogućih sistematskih kategorija prema autorima: Belifiore, 1983; Elliot i sar., 1988; Studemann i sar. 1992 i Bauernfeind, 1994. Ujednačenosti za sve indekse definisane su kao odnos uočene raznolikosti, prema maksimalno dobivenoj raznolikosti. U radu je korištena vrlo jednostavna mjera ujednačenosti, koja se izračunava prema formuli (Pielou, 1969):

$$E = H' / \ln S$$

gdje je:  $E$  = ujednačenost (engl. evenness, equitability) vrsta u uzorku,  
 $H'$  = Shannon-Weaver indeks raznolikosti vrsta u uzorku, a  
 $S$  = broj vrsta u uzorku.

Od dvije zajednice sa istim brojem vrsta raznovrsnija je ona u kojoj su vrste zastupljene svojim jedinkama podjednako obilno (Pielou, 1974). Za izračunavanje navedenih indeksa korišten je programski paket *STATISTICA*. Isti program korišten je i za multivarijantne statističke analize rezultata ovog istraživanja. Hijerarhijsko grupisanje uzoraka Ephemeroptera po sličnosti/udaljenosti testirano je Bray-Curtis klaster analizom (Bray i Curtis, 1957), unutar koje se metoda povezivanja po prosjeku grupa (*group average linkage method*) koristila za formiranje klastera ili grupa najbližijih uzoraka.

Za kanoničku analizu korespondencije (CCA - Canonical Correspondence Analysis) (ter Braak, 1986, 1994, 2002) koje predstavljaju korelacijske matrice između broja jedinki (gustoće) pojedinih vrsta Ephemeroptera (zavisna varijabla) i vrijednosti faktora sredine (nezavisne varijable) rezultata ovog istraživanja korišten je programski paket *Multi Variate Statistical Package 3.1 (MVSP)*. Vrijednosti broja jedinki vodenih cvjetova su logaritamski transformirane [ $\log(x+1)$ ] prije svih analiza. Vrijednosti varijabli okoliša su prije CCA analize standardizirane centriranjem prema srednjoj vrijednosti. Rezultati dobiveni ovom analizom su prikazani u obliku korelacijskog biplota/joint plot, u kojem su korelacije s ordinacijskim osima zavisne i nezavisne varijable ispisane zajedno. Faktori sredine analizirani u ovom radu su nadmorska visina, temperatura, koncentracija i saturacija kisika. Analiza je sprovedena u odnosu na kvlitativno-kvantitativni sastav preimaginalnih stadija vodenih cvjetova u svim sezonama.

## REZULTATI

Konstatirana je visoka raznovrsnost vodenih cvjetova u našoj studiji. Tokom četiri sezone uzorkovanja na pet lokaliteta Crne rijeke ukupno je registrirano 26 vrsta iz šest porodica reda Ephemeroptera. Najveći broj jedinki zabilježen je u drugoj sezoni/seriji uzorkovanja (jesenji aspekt - 09.10.2010. godine) kada je registrovano 1423 jedinke, a najmanji na proljeće 29.04. 2010. godine – 580 jedinki. Najbrojnija je bila porodica Baetidae, potom Heptageniidae, Ephemerellidae i Leptophlebiidae. Neidentifikovane vrste roda *Baetis* bile su ubjedljivo najviše zastupljenje, 1203 jedinke (34%). Vrste

*Baetis rhodani*, *Baetis alpinus*, *Baetis sp.* i *Rhithrogena semicolorata* konstatovane su na svim istraživanim lokalitetima (Tab. 1).

Tabela 1. Kvalitativno-kvantitativni sastav vodenih cvjetova u različitim sezonama uzorkovanja

Table 1. Qualitative and quantitative composition of mayflies during different sampling seasons

Vrsta	29. 07. '09.	09. 10. '09.	29. 04. '10.	29. 07. '10.
<i>Baetis rhodani</i>	222	245	76	172
<i>Baetis alpinus</i>	39	26	10	44
<i>Baetis fuscatus</i>	0	4	0	2
<i>Baetis buceratus</i>	8	11	2	2
<i>Baetis scambus</i>	17	6	0	0
<i>Baetis muticus</i>	7	8	45	1
<i>Baetis sp.</i>	497	277	63	497
<i>Centroptilum luteolum</i>	0	1	0	0
<i>Cloeon dipterum</i>	1	1	5	1
<i>Caenis sp.</i>	1	0	0	0
<i>Seratella ignita</i>	104	1	4	41
<i>Ephemerella mucronata</i>	16	0	2	9
<i>Ephemera danica</i>	0	0	1	0
<i>Ecdyonurus venosus</i>	49	2	2	10
<i>Ecdyonurus helveticus</i> –Gr.	22	6	1	3
<i>Ecdyonurus sp.</i>	1	0	0	0
<i>Epeorus sylvicola</i>	5	315	17	0
<i>Epeorus sp.</i>	1	167	0	0
<i>Heptagenia sulphurea</i>	8	45	10	2
<i>Heptagenia longicauda</i>	2	2	6	6
<i>Heptagenia sp.</i>	1	20	18	1
<i>Rhithrogena semicolorata</i>	62	237	288	53
<i>Rhithrogena sp.</i>	3	41	27	15
<i>Habrophlebia fusca</i>	2	1	2	1
<i>Habrophlebia lauta</i>	0	0	1	0
<i>Paraleptophlebia submarginata</i>	0	7	0	0

Najveća vrijednost mjere ujednačenosti iznosila je 0,788 dobijena na lokalitetu 4 - 09.10.2009 godine, a najmanja 0,366 dobijena na trećem lokalitetu 29.07.2010. godine (Tab. 2)

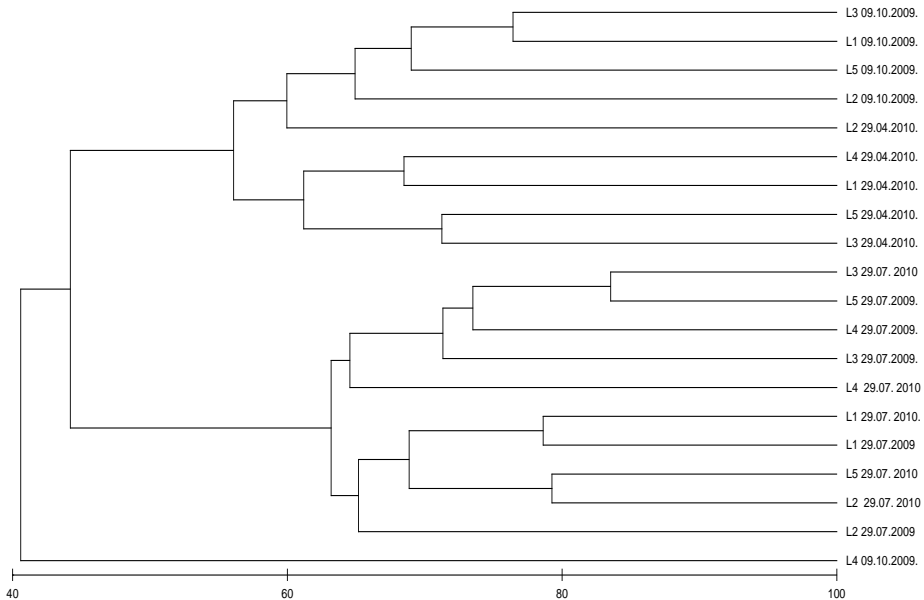


Tabela 2. Vrijednosti mjere ujednačenosti na nivou vrsta reda Ephemeroptera iz uzoraka zoobentosa Crne rijeke u periodu od jula 2009.- jula 2010.

Table 2. Values of the evenness of the species of Ephemeroptera from samples of zoobenthos from Crna rijeka river in the period from July 2009- July 2010

	L1	L2	L3	L4	L5
29.07.2009.	0,671	0,783	0,721	0,592	0,441
09.10.2009.	0,780	0,725	0,688	0,788	0,723
29.04.2010.	0,565	0,802	0,604	0,620	0,748
29.07.2010.	0,741	0,777	0,366	0,585	0,664

Bray-Curtis analiza pokazala je hijerarhijsko grupisanje uzoraka (lokaliteta) u svim sezonama (Graf. 1). Uzorci su velikom većinom odvojeni u dvije skupine po sezonama: proljetno-jesenja i ljetna. Hijerarhijsko grupisanje najpravičnije je na većini lokaliteta 09.10.2009. godine, što pokazuje najveću sličnost u sastavu lokaliteta ove sezone, dok je u proljetnom aspektu suprotan rezultat. Potrebno je istaći lokalitet 4 iz 09.10.2009. godine koji se prema ovoj analizi izdvaja od svih ostalih lokaliteta, gdje je izračunata i najveća mjera ujednačenosti.



Grafik 1. Rezultati dobijeni Bray-Curtis klaster analizom grupisanja uzoraka  
*Graf 1. Results obtained by Bray-Curtis cluster analysis*

Najmanja nadmorska visina (785 m) izmjerena je na lokalitetu ušća Crne rijeke (L1), a najveća (1100 m) na Crnoj rijeci u mjestu Balbašići (L5). Usljed činjenice da lokaliteti

nisu međusobno značajno udaljeni nadmorska visina se stoga nije pokazala kao ograničavajući faktor u distribuciji i raznovrsnosti vodenih cvjetova.

Izmjerene vrijednosti (temperatura vode, saturacija i koncentracija kisika) za sve parametre su relativno ujednačene, temperatura je varirala od 10,2 °C u oktobru 2009. godine (L1) do 12,5 °C u aprilu 2010. godine (L3), a koncentracija kisika je prema izmjerenim vrijednostima bila u rasponu od 8,1 do 9,9 mg/l (Tab. 3 i 4).

Tabela 3. Vrijednosti faktora sredine na istraživanim lokalitetima u ljetnjoj i jesenjoj sezoni 2009. godine

Table 3. Values of environmental factors at investigated sites in the summer and autumn season of 2009

Faktori sredine	29. 07. 2009.					09. 10. 2009.				
	L1	L2	L3	L4	L5	L1	L2	L3	L4	L5
Temperatura (°C)	11,4	11,6	11,3	12,1	11,9	10,2	10,5	11	10,8	10,6
Koncentracija O <sub>2</sub> (mg/l)	8,5	8,6	8,9	8,7	9,1	8,8	8,7	8,4	8,5	9
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	86	84	88	86	85	91	88	85	86	89

Tabela 4. Tabelarni prikaz vrijednosti faktora sredine na istraživanim lokalitetima u proljetnjoj i ljetnjoj sezoni 2010. godine

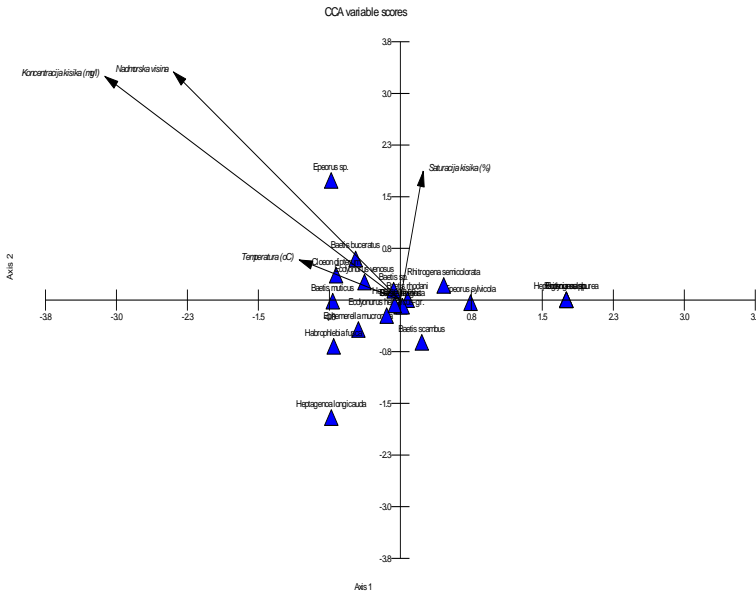
Table 4. Values of environmental factors at investigated sites in the spring and summer season of 2010

Faktori sredine	29. 04. 2010.					29. 07. 2010.				
	L1	L2	L3	L4	L5	L1	L2	L3	L4	L5
Temperatura (°C)	12,4	12,4	12,5	12,4	11,9	11,3	11,5	12	11,3	11,4
Koncentracija O <sub>2</sub> (mg/l)	9,6	9,6	9,9	8,9	9,2	8,6	8,6	8,4	8,4	8,1
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	98	101	104	94	92	88	86	86	86	84

Kanonička analiza korespondencije (CCA) između gustine pojedinih vrsta reda Ephemeroptera i faktora okoline rezultirala je ordinacijskim dijagramima, u kojima su okolinske varijable prikazane pravicima (vektorima) čija dužina i smjer pokazuju u kakvoj su međusobnoj zavisnosti (teer Braak & Verdonschot, 1995). Pozitivna korelacija očituje se u približno jednakoj dužini vektora i istom smjeru, a negativna u njihovom suprotnom smjeru i različitoj dužini. Prikazani su zasebni ordinacijski CCA dijagrami za svaku sezonu uzorkovanja (Sl. 1-4).

Ordinacijski dijagram za prvu seriju uzorkovanja pokazuje koncentraciju kiseonika i nadmorsku visinu kao najvažnije faktore sredine (između ose 1 i 2) i ova dva faktora su u pozitivnoj korelaciji (i smjerom i dužinom). Sljedeći faktor po važnosti je saturacija kisika koja je zbog jednog aspekta (smjer vektora) u negativnoj korelaciji sa prethodnim parametrima. Najmanji utjecaj na distribuciju preimaginalnih stadija vrsta reda Ephemeroptera imala je temperatura (na osi 1, vrijednost oko -1,4) (Sl. 1). Najbrojnije vrste su koncentrisane oko 0 CCA osa dijagrama. Primjećeno je odvajanje

dvije vrste roda *Heptagenia*, kao i *Epeorus sylvicola* jednim dijelom. Dosta izdvojene od ostalih su i jedinke *Epeorus sp.*

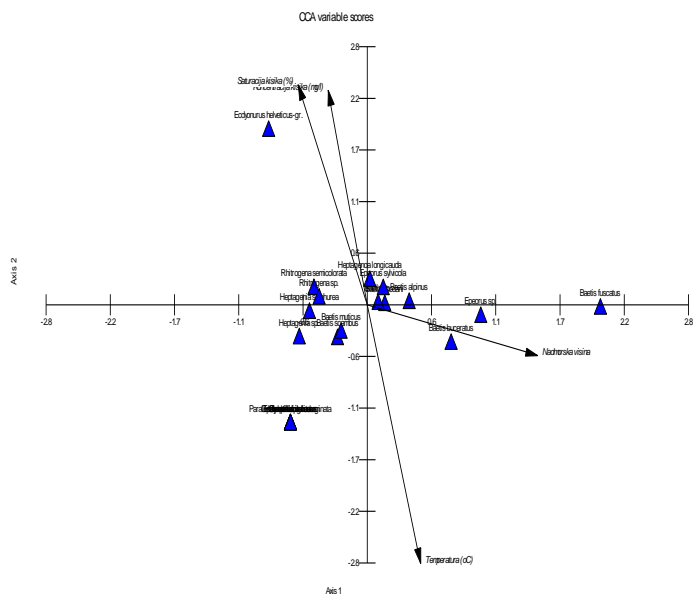


Slika 1. Ordinacijski dijagram kanoničke analiza korespondencije (CCA) između gustoće pojedinih vrsta vodenih cvjetova i faktora okoline u uzorcima od 29. 07. 2009. godine s prikazom istraživanih vrsta

Figure 1. Ordinary diagram of canonical analysis of correspondence (CCA) between density of mayflies species and environmental factors in samples of 29th July 2009 with the presentation of the investigated species

Kao najvažniji faktor sredine 09.10.2010. godine bila je temperatura, potom saturacija i koncentracija kisika koje se vektorski gotovo poklapaju u ovoj sezoni, dakle u pozitivnoj su korelaciji, dosta su blizu pozitivnom dijelu ose 1 (vrijednost malo iznad 2), a ne korespondiraju s druga dva faktora, gdje je vektor koji pokazuje uticaj temperature u potpuno drugom smjeru (u negativnom dijelu ose 1, vrijednost CCA varijable -2,8). U odnosu na većinu vrsta koje su se u ovoj kombinaciji analiziranih parametara koncentrirale blizu jedna druge, kao i presjeka osa dijagrama, izdvajaju se vrste *Baetis buceratus*, *Baetis fuscatus* i *Epeorus sp.*, koje i prema ovoj analizi, a i prema broju vrsta po lokalitetima pokazuju uslovljenost nadmorskom visinom. Također se izdvajaju i jedinke vrste *Ecdyonurus helveticus*-Gr., koje su prema ovoj analizi najosjetljivije na koncentraciju kisika, a javljaju se samo na jednom lokalitetu manje nadmorske visine. Vrste familije Leptophlebiidae se izdvajaju i preklapaju, što je očekivano jer se javljaju samo na jednom lokalitetu sa niskom koncentracijom kiseonika i saturacije. Isto tako, vrste ove porodice prema ovoj analizi i ostalim

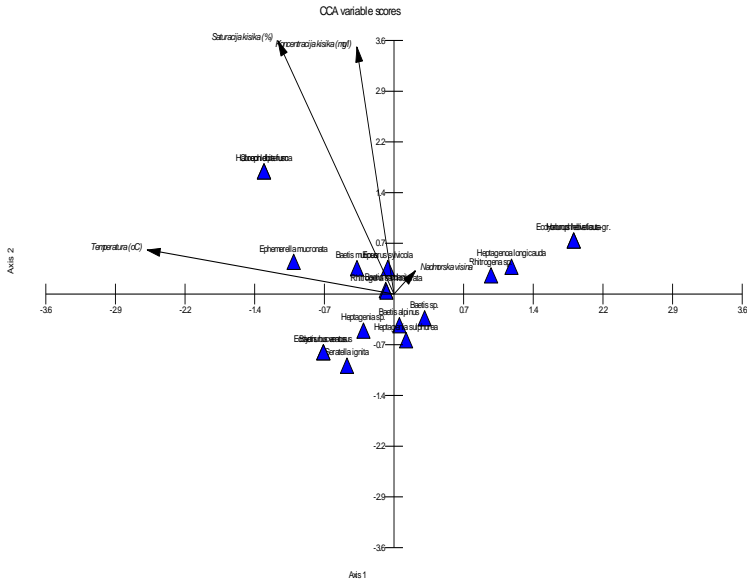
rezultatima dosta su ovisne o temperaturi, jer su nađene samo na lokalitetu gdje su zabilježene veće vrijednosti (slika 2).



Slika 2. Ordinacijski dijagram kanoničke analiza korespondencije (CCA) između gustoće pojedinih vrsta vodenih cvjetova i faktora okoline u uzorcima od 09.10.2009. godine s prikazom istraživanih vrsta

Figure 2. Ordinary diagram of canonical analysis of correspondence (CCA) between density of mayflies species and environmental factors in samples of 9th October 2009 with the presentation of the investigated species

Rezultati *Canonical Correspondence Analysis* za treću seriju uzorkovanja prikazani su na slici 3. Posmatrajući koncentraciju i saturaciju kiseonika stanje je gotovo identično kao u prethodnoj sezoni. Temperatura je ovdje „manje značajan” faktor nego u jesen, a broj vrsta je pokazao manje variranje u odnosu na nadmorsku visinu. Ono što je indikativno i drugačije od analiza u ostalim sezonama istraživanja je to da su se gotovo sve vrste grupisale veoma blizu jedna druge.



Vektor skalira 0.57

Slika 3. Ordinacijski dijagram kanoničke analiza korespondencije (CCA) između gustoće pojedinih vrsta vodenih cvjetova i faktora okoline u uzorcima od 29.04.2010. godine s prikazom istraživanih vrsta

Figure 3. Ordinary diagram of canonical analysis of correspondence (CCA) between density of mayflies species and environmental factors in samples of 29th April 2010 with the presentation of the investigated species

Dijagram koji pokazuje distribuciju preimaginalnih stadija vodenih cvjetova u posljednjoj sezoni istraživanja značajno se razlikuje od ostalih. Svi analizirani parametri pokazuju približno jednak uticaj i značajnost, osim vektora koji prikazuje koncentraciju kisika. Saturacija kisika je u negativnoj korelaciji sa jednako značajnim parametrima, nadmorskom visinom i temperaturom. Vrste su dosta „raspršene“, uz standardno izdvajanje manje zastupljenih i poklapanje pojedinih (slika 4).



koji utiču na bogatstvo vrsta i sastav makrozoobentoskih zajednica (Olenin, 1997; Zettler i sar., 2000; Laine, 2003). Prema Allan (1995) nadmorska visina je jedan od najbitnijih faktora koji utiče na rasprostranjenje vodenih makroinvertebrata, jer zapravo daje informaciju o više parametara u korelaciji: brzina vode, tip dna i temperatura. Prema istom autoru, red Ephemeroptera dominira između 200-800 metara nadmorske visine. Evropski vodotoci u načelu pokazuju opadanje diverziteta živog svijeta sa porastom nadmorske visine što se objašnjava pojavama geografske izolacije i kolonizacije, te nestajanja vrsta tokom ledenog doba (Briittain i Milner, 2001). Međutim, ovo nije slučaj u potpunosti kada je u pitanju naša studija. Naime, osim činjenice da su svi lokaliteti smješteni na relativno velikoj nadmorskoj visini te generalno registrovana velika brojnost i raznovrsnost vodenih cvjetova, porastom nadmorske visine povećava se brojnost većine vrsta (što se vidi iz kvantitativne analize, kao i izračunavanjem različitih indeksa diverziteta). Podaci o lokalitetima 4 i 5 koji su smješteni znad 900 m nadmorske visine potvrđuju navedeno (izuzev petog lokaliteta zadnjeg uzorkovanja). Uticaj ovog faktora, kao i tempertaure, koncentracije i saturacije kiseonika vidi se i na osnovu dijagrama/biplota kanoničke analize korespondencije. Sa porastom nadmorske visine povećava se broj predstavnika dominirajućih porodica Baetidae i Heptageniidae, a jedino se uočava smanjenje broja jedinki porodice Ephemerellidae.

Na osnovu CCA analize u svim sezonama može se zaključiti da su najvažniji faktori, generalno posmatrano, koncentracija i saturacija kiseonika, sa naglaskom da to nije slučaj u svim sezonama. Na osnovi svih rezultata studije ova analiza je potvrdila da ni jedan mjereni parametar nije limitirajući kada su u pitanju larve vodenih cvjetova zoobentosa Crne rijeke, a gradacija njihove značajnosti kao i višesmjernе korelacije dosta zavise od sezone uzorkovanja, te jasno zavise i jedna od druge (npr. temperatura od nadmorske visine). Kanonička analiza korespondencije (CCA) je „izdvojila“ više i manje značajne parametre, te pokazala u kakvom su odnosu između sebe (pozitivna ili negativna korelacija).

U prilog rezultatima CCA analize idu i rezultati mjere ujednačenosti i Bray-Curtis cluster analize, prema kojima se izdvaja lokalitet 4 iz 09.10.2009. godine. Dakle, ovo je lokalitet sa drugačijim sastavom i distribucijom vrsta vodenih cvjetova, iako su vrijednosti izmjerenih fizičko-hemijskih parametara povoljni, tj. u prosjeku istih na ostalim lokalitetima. Shodno tome, kao što su i rezultati CCA analize pokazali, to nisu faktori koji su negativno uticali na sastav efemeroptera, kako na ovom lokalitetu, tako i na ostalim.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu analize fizičko-hemijskih parametara tokom istraživanja može se zaključiti da nema većih variranja vrijednosti mjerenih parametara, te da se na longitudinalnom profilu ispitivane tekućice mijenjaju sezonski. Ispitivani faktori su u direktnoj korelaciji sa brojem i raznovrsnošću Ephemeroptera kao veoma značajnih indikatora stanja tekućica.

Ordinacijski dijagrami dobiveni kanoničkom analizom korespondencije za sve sezone pokazali su mali utjecaj nadmorske visine i ispitivanih fizičko-hemijskih parametara na sastav i distribuciju vrsta iz reda Ephemeroptera. Navedena analiza potvrdila je da ni jedan mjereni parametar nije limitirajući kada su u pitanju preimaginalni stadiji vodenih cvjetova zoobentosa Crne rijeke i njihova distribucija. Stepenn uticaja faktora i višesmjernne korelacije uveliko zavise od sezone uzorkovanja, te jasno zavise i jedna od druge.

Ovim radom potvrđena je primjenjivost CCA analize na ovakvu vrstu istraživanja, kao i njenu značajnost, kako zbog vizualizacije uticaja spoljnih faktora na distribuciju organizama, tako i zbog same dopune rezultata preglednim prikazom višesmjernih korelacija faktora sredine i makroinvertebrata.

## LITERATURA

- Allan, D. J. (1995): Stream Ecology – Structure and function of running waters. Chapman & Hall (London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras), 1-388 pp.
- Aqem (2002): Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to asses European streams using benthic macroinvertebrates, devolped for the pupose of the Water Framework Directive. Contract No: EVKI-CT1999-00027.
- Barber-James, H., Gattolliat, J. L., Sartori, M., Hubbard, M. (2008): Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 339-350.
- Barbour, M. T., Gerritsen, B., Snyder, D., Stribling, J. B. (1999): Rapid Bioassessment Protocols for Use in Wedable Streams and Rivers. Peryphyton, Nenthic Macroinvertebrates, and Fish. Second edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington.
- Bauernfeind, E. (1994): Bestimmungsschlüssel für die Osterreichischen Eintagsfliegen (Insecta, Ephemeroptera), 2. Teil. Bundesanstalt für Wassergute des Bundesministerimus für Land und Forstwirtschaft, Wien, 92.
- Belifiore, C. (1983): *Ephemerotteri (Ephemeroptera), Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*. Consiglio Nazionale delle Richersche, Roma.
- Bray, J. R., Curtiss, J. T. (1957): An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4): 325-349.
- Brittain, J. E., Milner, A. M. (2001): Ecology of glacial-fed rivers: current status and concepts. *Freshw. Biol.* 46: 1571-1578.
- Elliot, J. M., Humpresch, U. H., Macan, T. T. (1988): *Larvae of the British Ephemeroptera: a key with ecological notes*. Ambleside, Freshwater Biological Association, 49: 145.



- Ellenberg, H. (1948): Unkrautgesellschaften als Mass ft~r den Sguregrad, die Verdichtung und andere Eigenschaften des Ackerbodens. Ber. Landtech. 4:130-146.
- Gauch, H. G. (1982): Multivariate analysis in community ecology. Cambridge University Press, Cambridge, 298 pp.
- Gause, G. E. (1930): Studies on the ecology of the Orthoptera. Ecology 11:307-325.
- Gogina, M., Glockzin, M., Zettler, M.I. (2010): Distribution of benthic macrofaunal communities in the western Baltic Sea with regard to near-bottom environmental parameters. 1. Causal analysis. Journal of Marine Systems, 79: 112–123.
- Hefti, D., Tomka, I. (1991): Mayfly communities in a prealpine stream system of Switzerland. Aquatic Scineces 53/1. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Laine, A. O. (2003): Distribution of soft-bottom macrofauna in the deep open Baltic Sea in relation to environmental variability. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 57: 87–97.
- Marshall, K. E. (1980): Online computer retrieval of information on Ephemeroptera: a comparison of defferent sources. In J.F.-Flannagan and K.E. Marshall (eds.), Advances in Ephemeroptera biology. New York: Planum Press., pp: 467-489.
- McCune, B., Grace, J. B. (2002): Analysis of ecological communities. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon.
- Olenin, S. (1997): Benthic zonation of the Eastern Gotland Basin. Netherlands Journal of Aquatic Ecology, 30 (4): 265–282.
- Palmer, M. W. (1993): Putting things in even better order: the advataages of canonical correspondence analysis. Ecology, 74: 2215-2230.
- Pantle, R. and H. Buck (1955): Die biologische 121berwachung der GewSsser und die Darstellung der Ergebnisse. Gas- und Wasserfach, 96:604.
- Pielou, E. C. (1969): An Introduction to Mathematical Ecology. John Wiley and Sons, New York.
- Pielou, E. C. (1974): Population Community Ecology: Principles and Methods. Gordon and Breach Science Publisher, New York.
- Roback, S. S. (1974): Insects (Atrthropoda: Insecta). In C.W.Hart Jr. and S.L.H. Fuller (eds.), Pollution Ecology of Freshwater Invertebrate. New York: Academic Press, pp: 33-370.
- Rousi, H., Peltonen, H., Mattila, J., Bäck, S., Bonsdorff, E. (2011): Impact of physical environmental charactersistics on the distribution of benthic fauna in the northern Baltic Sea. Boreal Env. Res., 16: 521-533.
- Sladeczek, V. E. (1986): Diatoms as indicators of organic pollution. Acta hydrochim, hydrobiol. 14:555 - 566.
- Studemann, D., Landolt, P., Sartori, M., Hefti, D., Tomka, I. (1992): Ephemeroptera, Insecta Helvetica, Fauna 9. (ed. Societe entomologique Suisse), Freiburg, pp: 174.

- ter Braak, C. J. F., Šmilauer, P. (2002): CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca NY, USA.
- ter Braak, C. J. F., Verdonschot, P. E. M. (1995): Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences* 57/3: 255-289.
- ter Braak, C. J. F. (1994): Canonical community ordination. Part I: Basic theory and linear methods. *Ecoscience*, 1:127-140.
- ter Braak, C. J. E. (1986): Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67:1167-1179.
- Trožić-Borovac, S. (2005): Biodiverzitet vodenih cvjetova (Insecta: Ephemeroptera) u BiH i njihov značaj u ocjeni kvaliteta vode. *Voda i mi*, 41: 60-67.
- Zelinka, M. and E. Marvan (1961): Zur Prfizisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fliessender Gewfisser. *Arch. Hydrobiol.* 57:389-407.
- Zettler, M. L., Bönsch, R., Gosselck, F. (2000): Das Makrozoobenthos der Mecklenburger Bucht - rezent und im historischem Vergleich. *Meereswissenschaftliche Berichte*, 42: 1-144.
- Zabric, D. (2003): Enodnevnicke-Ephemeroptera. In: *Živalstvo Slovenije*. Sket B., Gogala M., Kuštor V. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 276-280.

## **IMPACT OF PHYSICAL AND CHEMICAL ENVIROMENTAL CHARACTERISTICS ON THE DISTRIBUTION OF MAYFLIES IN BENTHIC FAUNA FROM THE CRNA RIJEKA RIVER**

### **Summary**

Preimaginal stages (larvae) of mayflies represent numerically and ecologically very important component of freshwater ecosystems, mainly streams of all sizes around the world. Material used in this study was sampled during the period from July 2009 until July 2010 at five sites in the Crna rijeka river (Trnovo). Along with collecting samples of mayflies, it was measured altitude, water temperature, oxygen concentration and oxygen saturation. The aim of this study was to show effects of environmental factors on distribution of mayflies from macrozoobenthos of Crna rijeka river using Canonical correspondence analysis (CCA) and aplication of this method on this kind of research. Ordinating diagrams obtained by canonical correspondence analysis for all seasons showed little effect of altitude and other investigated enviromental factors on composition and distribution of species of order Ephemeroptera. They also showed that measured parameters are not limiting factors for mayflies larvae in zoobenthos of the Crna rijeka river.

**Key words:** *Canonical correspondence analysis (CCA), Ephemeroptera, Crna rijeka river*

## **PRIOBALNA VEGETACIJA KAO HIDROMORFOLOŠKI PARAMETAR UPRAVLJANJA VODENIM EKOSISTEMIMA (RIJEKA ŽELJEZNICA)**

Sabina Trakić<sup>1</sup>, Adil Homoraš<sup>2</sup>, Velida Durmić<sup>1</sup>, Sadbera Trožić-Borovac<sup>1</sup>,  
Samir Đug<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### **Rezime**

U radu je analizirana vegetacija priobalnog pojasa rijeke Željeznice u kontekstu propozicija Okvirne Direktive o vodama. Struktura biljnih zajednica je sagledana metodologijom ciriško-montpelješke škole (Braun-Blanquet, 1964), a kao mjera odstupanja od klimatogenih zajednica na istraživanim lokalitetima korištene su indikatorske vrijednosti biljaka prema stepenu degradacije ekosistema (Lakušić *et al.*, 1987). Indikatorske vrijednosti su definisane na osnovu fitocenološke pripadnosti vrsta (Oberdorfer, 1979). Recentno stanje vegetacije u priobalnom pojasu Željeznice je korelirano sa intenzitetom antropogenog pritiska u zoni aktivnog djelovanja vodotoka.

Ključne riječi: *Okvirna Direktiva o vodama, ekološki status, klimatogena vegetacija*

### **UVOD**

Vegetacija priobalnog pojasa tekućica predstavlja biološki procesor smješten u tranzicijskoj zoni između kopna i vode (Bonacci, 2003) koji determinira dinamiku hidrološkog ciklusa, osigurava heterogenost supstrata i pomaže u održavanju konstante temperature vode (Vannote *et al.*, 1980). S obzirom da povećava hidrauličku hrapavost i otpor protoku, priobalna vegetacija pogoduje rasipanju kinetičke energije poplavnih hidrograma te na taj način ublažava efekte naglih promjena u vodostaju. Prema Okvirnoj Direktivi o vodama (ODV) (EC 2000/60), kvalitet površinskih voda se procjenjuje na osnovu ekološkog statusa vodotoka koji se determinira primjenom bioloških i hidromorfoloških elemenata kvaliteta vode, te fizičko-hemijskih parametara. Hidromorfološki elementi kvaliteta (Annex V) su obuhvaćeni kategorijama koje se odnose na hidrološki režim vodotoka, longitudinalni kontinuitet toka i morfološke uslove (Tab. 1). Kategorija morfoloških uslova uključuje elemente stanja obala i vegetacije koja izgrađuje priobalni pojas, te se na osnovu komparativne analize recentnog i klimatogenog karaktera vegetacije procjenjuje stanje hidromorfoloških parametara vodotoka.

---

<sup>1</sup> Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za biologiju

<sup>2</sup> Student

Korespondencija: strakic@email.com

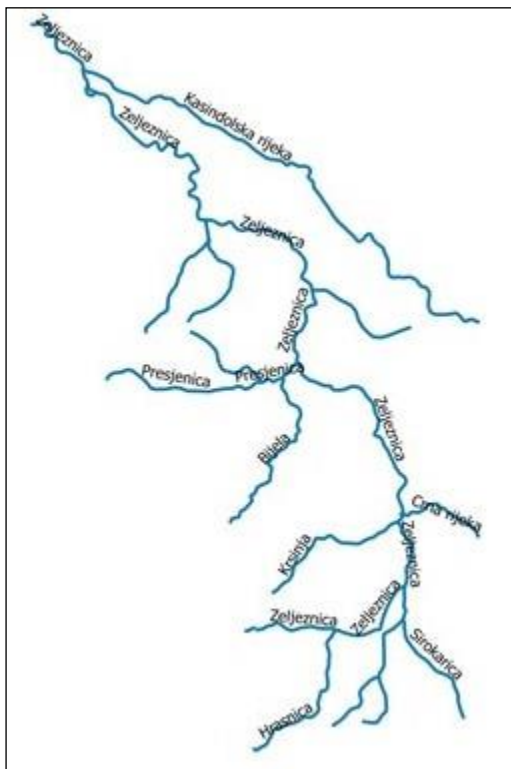
Hidromorfološki parametri su okosnica za biološke elemente kvaliteta vode (Vaughan *et al.*, 2009; Elošegi *et al.*, 2010) jer direktno utječu na specijski diverzitet (Elošegi *et al.*, 2010) i metabolizam ekosistema tekućice (Elošegi *et Sabater*, 2013). U evropskim državama, metodologija za procjenu hidromorfoloških karakteristika vodotoka je datira iz perioda prije donošenja ODV (Jähnig *et al.*, 2009). Danas je u primjeni veći broj metoda za procjenu fizičkih osobina staništa u priobalnom pojasu tekućica, kao što su LAWA u Njemačkoj, QBR u Španiji, HEM u Češkoj te RHS u Poljskoj (Wiatkowski *et Tomczyk*, 2018).

Tabela 1. Kategorije i osobine koje se koriste u procjeni hidromorfološkog kvaliteta rijeka prema standardu EN 14614 (CEN 2004) i klasifikacijom osobina prema EN 15843 (CEN 2010) (preuzeto iz Hajdukiewicz *et al.*, 2017)

Kategorija	Osobine	Glavne/dodatne osobine
Geometrija korita	Tlocrt korita	Glavne
	Presjek i longitudinalni profil	Glavne
Substrat	Vještački/prirodni substrat u koritu	Glavne
	Stepen modificiranosti substrata	Dodatne
Makrofitska vegetacija i organski ostaci u koritu	Akvatična i vegetacija na sprudovima unutar aktivne riječne zone	Dodatne
	Organski materijal (lišće, stabla..)	Dodatne
Erozija/svojtva depozicije	Prisustvo erozionih i depozicionih oblika u koritu	Dodatne
Protok	Modifikacija prirodne hidraulike protoka sa inženjerskim strukturama	Glavne
	Modifikacija prirodnog režima protoka	Glavne
Longitudinalni riječni kontinuitet	Utjecaj inženjerskih struktura na longitudinalni riječni kontinuitet – transport sedimenta i migracije biota	Glavne
<b>Obale i priobalna vegetacija</b>		
Struktura obale	Modifikacija riječnih obala	Glavne
Zona priobalne vegetacije	Vegetacija i korištenje zemljišta u priobalnom pojasu	Glavne
<b>Plavno područje</b>		
Korištenje zemljišta i povezane osobine u riječnim koridorima	Korištenje zemljišta u riječnom koridoru/plavnom području	Glavne
	Prisustvo ostataka kanala, riječnih rukavaca i močvara u plavnom području	Glavne
Bočna povezanost i prohodnost kanala	Stepen bočne povezanosti rijeke i plavnog područja i kontinuitet plavnog područja duž rijeke	Glavne
	Ograničenja lateralnog kretanja u kanalima	Glavne

## Područje istraživanja

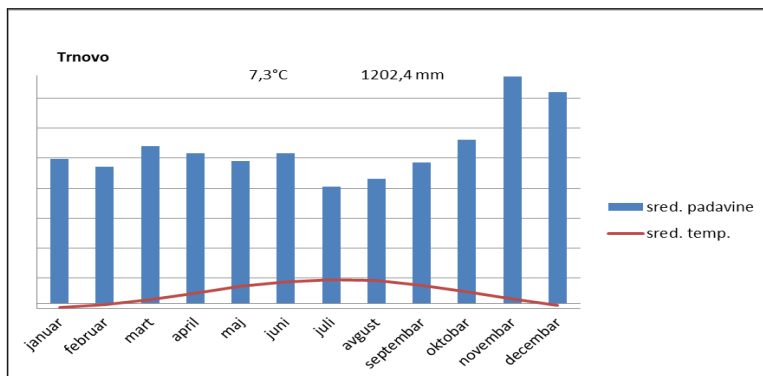
Podsliv Željeznice u hidrografskom pogledu pripada slivu rijeke Bosne. Tok Željeznice se formira od brojnih karstnih izvora na istočnim padinama Treskavice na nadmorskoj visini od 986 m. Veći dio slivnog područja je planinskog karaktera (Sl. 1), ali je zbog razvijene podzemne karstifikacije otežano utvrđivanje tačne granice slivnog područja (Vasić, 1972).



Slika 1. Slivno područje rijeke Željeznice  
*Figure 1. Watershed area of Željeznica river*

Geološki, gornji dio toka rijeke Željeznice pripada paleozoiku jugoistočne Bosne, dok se u dolini Crne Rijeke, na prostoru između Stupara i Hamzića, te na ušću Crne Rijeke u Željeznicu, javljaju filitični tabličasti škriljci (Vasić, 1972). Željeznica nosi relativno velike količine vode, uslijed čega je na ulasku u Sarajevsko polje napravila prostrane aluvijalne ravnice, ispunjene šljunkovitim materijalom (Vasić, 1972). U podslivu Željeznice ističu se dvije geomorfološke cjeline. Visočiji dio podsliva je tipično planinski, dok je niži ravničarskog karaktera. U planinskom dijelu razvijeni su različiti oblici fluvio-glacijalnog reljefa. Poslije ušća Bijele i Crne Rijeke, dolina Željeznice ima oblik sutjeske sa stjenovitim obalama. U ovom sektoru ona je bujičnog karaktera, kao i njene pritoke Bijela i Crna Rijeka. Tek nizvodno od Krupačkih Stijena Željeznica poprima karakter ravničarske rijeke i teče širokom dolinom malih padova

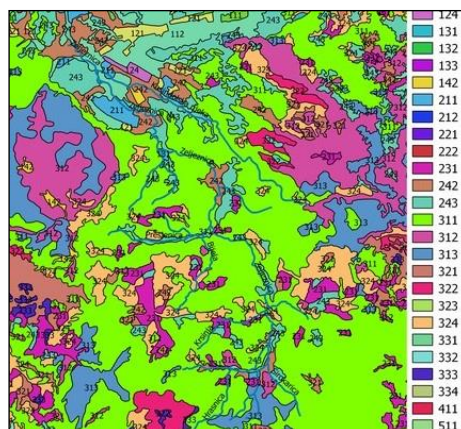
(Vasić, 1972). Na obroncima okolnih planina se intenzivno kondenziraju vlažne mediteranske zračne mase, što rezultira velikom količinom padavina na ovom prostoru (Vasić, 1972). Prosječna godišnja količina padavina u podslivu Željeznice iznosi 1202,4 mm, a srednja godišnja temperatura je  $+7,3^{\circ}\text{C}$  (Graf. 1).



Grafikon 1. Klimadijagram za meteorološku stanicu Trnovo (1963-1989)

*Graph 1. Climate diagram for Weather station Trnovo (1963-1989)*

Prema Corine Land Cover (CLC) klasifikaciji, u slivu rijeke Željeznice dominiraju lišćarsko-listopadne šume (311) i poljoprivredne površine sa značajnim udjelom prirodne vegetacije (243). Od ostalih tipova vegetacijskog pokriva, zastupljeni su: kompleksna kultivacija sa gustom zbijenim malim parcelama jednogodišnjih usjeva (242), četinarske šume (312), tranzicijska šuma/šikara, degradacijski stadijumi (324), nenavodnjavano poljoprivredno zemljište, rasadnici, povrtnjaci (211) i pašnjaci (231).



Slika 2. Vegetacijski pokrov u slivu rijeke Željeznice (CLC)

*Figure 2. Vegetation cover in the watershed of Željeznica river (CLC)*

## MATERIJAL I METODE RADA

Analizirano je 14 lokaliteta (Tab. 2) na longitudinalnom profilu rijeke Željeznice primjenom metodologije fitocenološkog snimka (u Prilogu Tab. 3) (Braun-Blanquet, 1964). Terenske opservacije su izvršene u ljetnjem i jesenjem aspektu. Tokom terenskih istraživanja je prikupljen biljni materijal, koji je herbariziran i determiniran prema ključevima za identifikaciju vaskularnih vrsta biljaka: Domac, 1989; Javorka et Csapody, 1979. Sintaksonomski status asocijacija je dat prema *Prodromus phytocoenosum Jugoslaviae* (1986). Na osnovu fitocenološke pripadnosti za vrste (Oberdorfer, 1979), utvrđena je indikatorska vrijednost biljaka u odnosu na stepen degradacije ekosistema (Pavlović-Muratspahić, 1995; Redžić, 1988) te su napravljeni spektri indikatorskih vrijednosti za područje krenona, ritrona i potamona. Prema Lakušić *et al.* (1987), vrste koje su karakteristične za klimatogenu vegetaciju označene su kao indikatori primarnih ekosistema (P), vrste koje karakterišu degradacione stadijume klimatogene vegetacije, sa izmjenom strukture između 33-66%, označavaju indikatore sekundarnih ekosistema (S), dok vrste koje su karakteristične za vegetacijske tipove čija je struktura u odnosu na klimatogenu vegetaciju izmjenjena više od 66% su indikatori tercijernih ekosistema (T). Spektar indikatorskih vrijednosti biljaka u odnosu na stepen degradacije ekosistema je interpretiran kao mjera antropogenog pritiska na priobalnu vegetaciju. Klimatske prilike na istraživanom području su sagledane na osnovu podataka sa meteorološke stanice Trnovo za period 1963-1989, konstruisanjem klimadijagrama po Walteru (1973).

Tabela 2. Pregled istraživanih lokaliteta sa osnovnim abiotičkim podacima

Snim. broj	Lokalitet	Nadmorska visina (m)	Nagib (°)	Ekspozicija	Geološka podloga	Tip zemljišta	Pokrovnost (%)
1	Izvor(d.obala)	986	10	W/NW	KB	HC	95/30
2	Izvor(l.obala)	986	30	E	KB	HC	30/70
3	Kod pećine	970	5	N	KB	HC	70/30
4	Vodenica	965	5	N	KV	Fluvisol	40/60
5	Kazani	896	10	E	AN	Fluvisol	75/30
6	Kanjon	548	30	NE/E	KB	Fluvisol	45/70
7	Butmir 1	538	5	SW	AN	Fluvisol	85
8	Butmir 2	539	Ravno	Ravno	AN	Fluvisol	30/70
9	Terme 1	508	Ravno	Ravno	AN	Glejno	90
10	Terme 2	508	Ravno	Ravno	AN	Glejno	95
11	Iliđa	506	ravno	ravno	betonirano	Glejno	60
12	Prije ušća 1	504	5	NE	AN	Fluvisol	90
13	Prije ušća 2	504	5	NE	AN	Fluvisol	80
14	Prije ušća 3	504	5	NE	AN	Fluvisol	80

KB –karbonatni blokovi; KV – karbonatne valutice; AN –aluvijalni nanosi; HC – hidrogena crnica

## REZULTATI I DISKUSIJA

Na izvorištu rijeke Željeznice klimatogena je vegetacija montanih bukovih šuma na krečnjačkim blokovima (Sl. 3).



Slika 3. Izvorište Željeznice (Foto: I. Marković)  
Figure 3. Spring of Željeznica river (Photo: I. Marković)

Matični supstrat je karbonat, dok je zemljište tipa hidrogene crnice. Supstrat je gusto obrastao mahovinama amfifitnog karaktera, kao što su *Marchantia polymorpha* L., *Plagiomnium undulatum* (Hedw.) T.J. Kopp., *Mnium punctatum* Hedw.. U spratu zeljastih biljaka dominiraju sciofite: *Asarum europaeum* L., *Mercurialis perennis* L., *Oxalis acetosella* L., *Veronica montana* L., *Sanicula europaea* L., *Aremonia agrimonioides* (L.) Neck. i *Asperula odorata* L.. U segmentima gdje dolazi do račvanja toka veliku abundancu imaju vrste: *Chrysosplenium alternifolium* L., *Orchis maculata* L. i *Cardamine trifolia* L.. U spratu drveća dominira *Fagus sylvatica* L., dok sprat šiblja odlikuje visok specijski diverzitet, sa vrstama: *Coryllus avellana* L., *Evonymus latifolia* (L.) Mill., *E. verrucosa* Scop., *Rhamnus fallax* Boiss., *Daphne mezereum* L., *Lonicera xylosteum* L., *Rubus hirtus* W.K., *Abies alba* Mill..

Na nadmorskoj visini od 896 m, kod mjesta Turovi, razvijena je prostrana fluvio-glacijalna terasa te matični supstrat predstavljaju uglavnom šljunčani nanosi na kojima je razvijeno zemljište tipa fluvisol. Priobalna vegetacija ovog segmenta krenona se nalazi pod snažnim utjecajem bujičnih tokova rijeke Željeznice koji nastaju nakon topljenja snijega. U proljeće velike količine hladne vode se spuštaju iz izvorišta noseći sa sobom svježje nanose sedimenta, usljed čega klimatogenu vegetaciju predstavljaju pionirske zajednice sa rakitom i uskolisnom vrbom (*Salicetum elaeagni* Moor 1958). U strukturi zajednice dominiraju vrste *Salix incana* Flugge ex Wild i *Salix purpurea* L., dok je sprat zeljastih biljaka oskudan i slučajnog karaktera. Vrste roda *Salix* igraju značajnu ulogu u kontekstu očuvanja hidromorfoloških karakteristika vodotoka, jer zahvaljujući savitljivosti njihovih grana i razvijenosti korijenovog sistema doprinose stabilizaciji obala i prevenciji erozije.



U području ritrona Željeznice, na nadmorskoj visini od 550 m, klimatogena je vegetacija sa sivom johom i grabom (*Carpino betuli-Alnetum incanae* Dinić 1983). U strukturi analizirane sastojine sprat drveća izgrađuju vrste: *Alnus incana* (L.) Moench, *Carpinus betulus* L., *Acer pseudoplatanus* L. *Salix alba* L. i *Cornus sanguinea* L.. U spratu šiblja su zastupljene vrste: *A. incana* (L.) Moench, *A. glutinosa* L., *Tilia cordata* Mill., *Acer campestre* L. i *Rubus ceasius* L.. Prisustvo vrste *Alnus glutinosa* L. u spratu šiblja indicira ekološki kontinuitet zajednice *Carpino betuli-Alnetum incanae* sa zajednicama crne johe u priobalnom pojasu ravničarskih rijeka (*Alnetum glutinosae-incanae* Br.-Bl. 1915). U spratu zeljastih biljaka veliku abundancu imaju vrste: *Petasites albus* (L.) Gärtn., *Aegopodium podagraria* L., *Scutellaria altissima* L. i *Hordeum europaeum* (L.) All..

Nakon ulaska Željeznice u Sarajevsko polje, priobalni pojas izgrađuju zajednice higrofilnih livada. Analizirana je fitocenoza *Junco-Deschampsietum caespitosae* Petković 1981 koja je nastala degradacijom klimatogene vegetacije sa bijelom vrbom (*Salicetum albae* Issler 1926), čiji se ostaci pojavljuju sa malom abundancom u spratu šiblja. U florističkom sastavu zajednice su konstatovane vrste: *Deschampsia caespitosa* (L.) P. Beauv., *Juncus effusus* L., *Carex hirta* L., *Agrostis alba* L. i *Equisetum arvense* L..

U donjem dijelu toka rijeke Željeznice, uslijed intenzivnog antropogenog pritiska u obliku nitrifikacije vodotoka, zastupljene su zajednice vlažnih nitrificiranih smetlišta klase *Bidentetea tripartiti*. U strukturi analizirane fitocenoze su zabilježene vrste: *Polygonum persicaria* A. Gray, *Barbarea vulgaris* W.T. Aiton., *Alliaria officinalis* (M. Bieb.) Cavara & Grande., *Calystegia sepium* (L.) R. Br., te invazivne vrste biljaka *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. & A. ray. i *Helianthus tuberosus* L.

U rejonu Ilidže, priobalni pojas Željeznice je antropogeno izmjenjen izgradnjom betonskih potpornih zidova. Ipak, u uslovima sniženog vodostaja, u priobalju se razvijaju karakteristične zajednice sveze *Nanocyperion flavescens*.

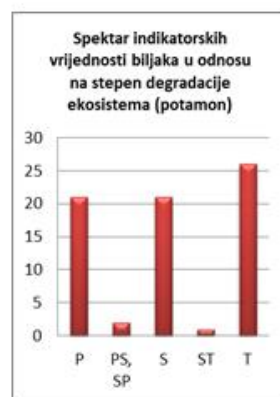
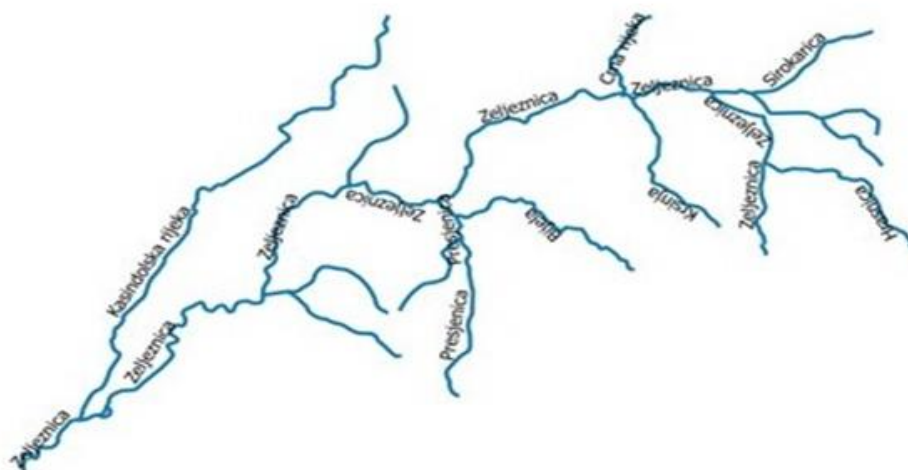
U strukturi fitocenoze dominiraju vrste: *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult., *Glyceria aquatica* (Hartm.) Holmb., *Alisma plantago-aquatica* L., *Carex distans* L., *Lythrum salicaria* L., *Mentha aquatica* L..

Na mjestima gdje tok Željeznice formira široke meandre, na kojima se akumulira frakcija pelala i razvija dublje zemljište, razvijena je vegetacija šaševa koja alternira sa flotantnom vegetacijom mrijesnjaka. Zemljište je hidromorfno (glej), odnosno subakvalnog tipa (gitja) za flotantnu vegetaciju. U strukturi fitocenoze *Sparganio-Glycerietum fluitantis* Br.-Bl. 1925 najveću abundancu imaju vrste: *Glyceria aquatica* (Hartm.) Holmb., *Typha latifolia* L., *Veronica anagallis-aquatica* L., *Agrostis alba* L. Zajednica se razvija na mjestima sporog toka rijeke Željeznice, što je rezultat malog nagiba korita i usporenog protoka vode.

Zajednice sa bijelom vrbom (*Salicetum albae* Issler 1926) su klimatogene u dolinama velikih ravničarskih rijeka, što odgovara karakteru Željeznice u krajnjim segmentima potamona. U strukturi fitocenoze *Salicetum albae* edifikatorska vrsta je *Salix alba* L., dok u spratu zeljastih biljaka dominiraju: *Deschampsia caespitosa* (L.) P. Beauv.,

*Equisetum arvense* L., *Mentha longifolia* (L.) Huds., *Festuca pratensis* Huds. i *Dactylis glomerata* L. Zajednice sa bijelom vrbom alterniraju sa zajednicama nitrificiranih livada (*Agrostietalia stoloniferae*), koje se razvijaju na degradiranim staništima bijele vrbe. U strukturi fitocenozе reda *Agrostietalia stoloniferae*, koja je analizirana u donjem toku Željeznice, dominiraju vrste: *Agrostis alba* L., *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult., *Lythrum salicaria* L., *Bidens tripartita* L., *Dactylis glomerata* L., *Festuca arundinacea* Schreb., *Artemisia vulgaris* L., *Urtica dioica* L., *Rorippa sylvestris* L. te invazivna vrsta *Reynoutria japonica* Houtt..

Istraživanjem je zabilježeno 186 biljnih vrsta koje ulaze u sastav priobalne vegetacije rijeke Željeznice, od kojih 91 indikator primarnih (P), 38 sekundarnih (S), 37 tercijernih (T) te 20 indikatora sekundarno-primarnih (SP), primarno-sekundarnih (PS) i/ili sekundarno-tercijernih (ST) ekosistema.



Grafikon 2. Pregled udjela indikatorskih vrsta biljaka prema zonaciji toka  
Graph 2. Overview of proportion for indicator plant species per stream's zonation

Komparativnom analizom udjela indikatorskih vrsta u strukturi analiziranih biljnih zajednica priobalnog pojasa rijeke Željeznice (Graf. 2), konstatovano je da udio indikatora primarnih ekosistema opada od krenona prema ritronu, sa nešto većom vrijednošću u zoni potamona, zbog zastupljenosti močvarnih vrsta biljaka. U kontekstu evaluiranja stanja klimatogene vegetacije kao hidromorfološkog parametra vodotoka, najveći značaj imaju indikatori tercijernih i sekundarnih ekosistema. Pomenuti indikatori jasno dominiraju u zoni potamona koja je u cijelosti izmjenjena ljudskim aktivnostima (urbanizacija, saobraćajna infrastruktura, regulacija vodotoka, poljoprivreda). Općenito od izvorišta prema ušću rijeke Željeznice, prisutan je antropogeni pritisak različitog intenziteta i oblika, što se reflektira kroz pojavu indikatora tercijernih i sekundarnih ekosistema u zoni ritrona, pa čak i krenona. Na većem broju lokaliteta navedenih zona zabilježena je ekstrakcija šljunka, čime se u potpunosti narušavaju prirodne hidromorfološke karakteristike rijeke Željeznice. Prema CLC mapi istraživanog područja, čitavom dužinom toka su zastupljene poljoprivredne površine, uslijed čega je priobalna vegetacije reducirana na uzak pojas koji ne može osigurati opstojnost hidromorfoloških karakteristika vodotoka. Analiza strukture i dinamike priobalne vegetacije Željeznice je pokazala visok stupanj degradacije klimatogenih ekosistema. Tako je u Sarajevskom polju, korito Željeznice uglavnom betonirano, čime je narušena prirodna dinamika razmjene između podzemnih voda i glavnine toka. Uslijed toga su nestale klimatogene zajednice sa johom i bijelom vrbom, čiji su fragmenti analizirani neposredno prije ušća Željeznice. U florističkom sastavu pomenutih zajednica dominiraju indikatori degradacije ekosistema. Nažalost, protekle godine su betonirani i dijelovi krenona Željeznice, čime su narušene ne samo njene hidromorfološke karakteristike, već i prirodne vrijednosti (lokalitet Kazani).

U panevropskim razmjerama, intenzivno korištenje zemljišta predstavlja pokretač ekološkog propadanja lotičkih sistema (Stoate *et al.*, 2001), što uzrokuje različite oblike pritisaka na nivou lokaliteta, u obliku povećanog opterećenja nutrijentima i pesticidima, strukturnim modifikacijama i hidrološkim promjenama (Dahm *et al.*, 2013). Generalno, deforestacija u cilju razvoja poljoprivrede je identificirana kao osnovni pokretač procesa erozije i siltacije, koji smanjuju vertikalnu povezanost tekućice uzrokujući anoksiju u hiporeiku (Elosegi *et al.*, 2010). U kontekstu integrisanog upravljanja tekućicama naročito je značajna longitudinalna povezanost, koja kontroliše dotok vode i sedimenta u nizvodnim riječnim segmentima, a predstavlja primarno hidromorfološku karakteristiku (Elosegi *et al.*, 2010). Pored toga, i lateralna povezanost između korita i okolne zone plavljenja igra značajnu ulogu u definisanju mjera za adekvatno upravljanje tekućicama (Elosegi *et al.*, 2010), jer hidraulična povezanost između riječnog korita i plitkog akvifera podzemnih voda može da se prostire na značajnu lateralnu udaljenost u obalnom pojasu (Standford *et al.*, 1988). Naprijed navedeno je određeno stepenom očuvanosti klimatogene vegetacije priobalnog pojasa, koji se procjenjuje na osnovu analize strukture i dinamike biljnih zajednica, sa posebnim osvrtom na indikatore degradacije.

## ZAKLJUČAK

S obzirom da određuju ekološki integritet vodotoka, ekološki status i hidromorfološki parametri se zajedno primjenjuju u integrisanom upravljanju vodama (Weiß *et al.*, 2008), pri čemu se priobalna vegetacija etablirala kao najupečatljiviji pokazatelj odstupanja od referentnih uslova tekućica. Istraživanje na longitudinalnom transektu rijeke Željeznice je potvrdilo značaj i primjenjivost navedene vegetacije kao indikatora očuvanosti hidromorfoloških karakteristika vodotoka. Imajući u vidu potencijal vodnih resursa u Bosni i Hercegovini koji predstavlja njenu komparativnu prednost u odnosu na druge države u regiji, neophodno je, u skladu sa preporukama ODV-a, koristiti priobalnu vegetaciju kao hidromorfološki parametar u procjeni kvaliteta vodotoka te, u kombinaciji sa biološkim elementima kvaliteta vode, osigurati integrisano upravljanje vodama.

## LITERATURA

- Bonacci, O. (2001): Uticaj priobalne vegetacije na hidrološke procese. Hrvatska vodoprivreda, Zagreb, 10 (103): 24-29.
- Braun-Blanquet, J. (1964): Pflanzensoziozoologie. Springer Verlag, Wien.
- CEN (2004): Water quality — guidance standard for assessing the hydromorphological features of rivers, EN 14614. CEN, Brussels, p 21
- CEN (2010): Water quality — guidance standard on determining the degree of modification of river hydromorphology, EN 15843. CEN, Brussels, p 24.
- Dahm, V., Hering, D., Nemitz, D., Graf, W., Schmidt-Kloiber, A., Leitner, P., Melcher, A., Feld, Ch.K. (2013): Effects of physico-chemistry, land use and hydromorphology on three riverine organism groups: a comparative analysis with monitoring data from Germany and Austria. Hydrobiologia, 704: 389-415.
- Domac, R. (1989): Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Školska knjiga, Zagreb.
- Elosegi, A., Díez, J., Mutz, M. (2010): Effects of hydromorphological integrity on biodiversity and functioning of river ecosystems. Hydrobiologia 657:199–215.
- Elosegi, A., Sabater, S. (2013): Effects of hydromorphological impacts on river ecosystem functioning: a review and suggestions for assessing ecological impacts. Hydrobiologia 712:129-143.
- European Commission 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off J Eur Commun L 324 (43):1–72.
- Hajdukiewicz, H., Wyzga, B., Zawiejska, J., Amirowicz, A., Oglecki, P., Radecki-Pawlik, A. (2017): Assessment of river hydromorphological quality for restoration purposes: an example of the application of RHQ method to a Polish Carpathian river. Acta Geophys. 65:423–440.
- Javorka, S., Csapody, V. (1979) : Ikonographie der Flora des sudlichen mittel Europa.

Budapest: Akademiai Kiado.

- Jähnig, S. C., Lorenz, A. W., Hering, D. (2009): Habitat mosaics and macroinvertebrates—Does channel form determine community composition?. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 19: 157–169.
- Lakušić, R., Dizdarević M., Grgić, P., Muratspahić, D., Kutleša, L., Sijarić, R., Obratil, S., Živadinović, J., Mikšić, S., Cvijović, M., Šoljan, D., Pavlović, B., Redžić, S., Gligorijević-Danon, Z., Omerović, S. (1987): Indikatori stanja životne sredine. Bilten Društve ekologa BiH, Serija A – Ekološke monografije, 3: 1-140.
- Oberdorfer, E. (1979): Pflanzensozioologische Exkursionsflora, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Pavlović-Muratspahić, D. (1995): Biljne vrste i njihove zajednice kao indikatori degradiranosti ekosistema u zoni klimatogene vegetacije hrasta kitnjaka i običnog graba (*Quercus-Carpinetum illyricum* Ht. et al. 1974). Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac: 311 pp.
- Redžić, S. (1988): Šumske fitocenoze i njihova staništa u uslovima totalnih sječa. *Godišnjak Biol. inst. Univ. Vol. 41 (Posebno izdanje)*: 260 pp.
- Standford, J. A., Ward, J. V. (1988): The hyporheic habitat of river ecosystems. *Nature* 335: 64–66.
- Stoate, C., Boatman, N. D., Borralho, R. J., Carvalho, C. R., de Snoo, G. R, Eden, P. (2001): Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* 63: 337–365.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., Cushing, C. E. (1980): The River Continuum Concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 130-137.
- Vasić, J. (1972): Potamološke karakteristike rijeke Željeznice, Diplomski rad – Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo.
- Walter, H. (1973): *Vegetation of the earth and ecological systems of the geobiosphere*. Springer-Verlag, New York, USA. 274 pp.
- Vaughan, I. P., Diamond, M., Gurnell, A. M., Hall, K. A., Jenkins, A., Milner N. J., Naylor, L. A., Sear, D. A., Woodward, G., Ormerod, S. (2009): Integrating ecology with hydromorphology: a priority for river science and management. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 19:113–125.
- Wiatkowski, M., Tomczyk, P. (2018): Comparative Assessment of the Hydromorphological Status of the Rivers Odra, Bystrzyca, and Ślęza Using the RHS, LAWA, QBR, and HEM Methods above and below the Hydropower Plants. *Water*, 10, 855 pp.16
- Zupančić, et al. 1(986): *Prodromus Phytocoenosum Jugoslaviae*. Bribir-Ilok.

## **RIPARIAN VEGETATION AS A HYDROMORPHOLOGICAL PARAMETERS FOR THE MANAGEMENT OF AQUATIC ECOSYSTEMS (ŽELJEZNICA RIVER)**

### **Summary**

The paper analyzes the riparian vegetation of Željeznica river in the context of the Water Framework Directive (WFD) requirements. The structure of phytocoenoses is determined by the methodology of Zürich-Montpelier's School (Braun-Blanquet, 1964), whereas the indicator values of plants in respect to degradation of ecosystems were used as a measure of deviation of climax communities in the investigated localities (Lakušić *et al.*, 1987). The indicator values were defined according to the phytocoenological belonging of plants (Oberdofer, 1979). The contemporary state of riparian vegetation of Željeznica river was co-related with intensity of anthropogenous impact in the belt of active watercourse actions.

*Key words: Water Framework Directive, ecological status, climax vegetation*

## PRILOG

Tabela 3. Sintetska fitocenološka tabela za istraživane biljne zajednice

Indi k. vrij ed.	Snimak br.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Floristički sastav:														
	Sprat drveća do 40m														
P	<i>Fagus sylvatica</i> L.		3.4- 4.4		3.3										
	<b>Sprat drveća do 15m</b>														
P	<i>Fagus sylvatica</i> L.		2.2		2.3										
P	<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.		1.2	2.2											
P	<i>Fraxinus ornus</i> L.			1.2											
P	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.			+1	1.2										
	<b>Sprat drveća do 8m</b>														
P	<i>Salix eleagnos</i> Scop.	2.2													
P	<i>Salix fragilis</i> L.	1.2													
P	<i>Sorbus aria</i> (L.) Cr.	1.1													
P	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	1.1					1.2								
P	<i>Acer campestre</i> L.						+1								
P	<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.	+2													
P	<i>Fagus sylvatica</i> L.	+1													
P	<i>Carpinus betulus</i> L.						1.2- 2.2								
P	<i>Salix alba</i> L.						1.1	1, 2							1.2
SP	<i>Cornus sanguinea</i> L.						1.2								
P	<i>Alnus incana</i> (L.) Willd.						3.3								
PS	<i>Sambucus nigra</i> L.						1.2								
SP	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.						1.2								
PS	<i>Populus tremula</i> L.														+1
	<b>Sprat šiblja do 3m</b>														
P	<i>Salix alba</i> L.							+ .2	+2- 1.2				2.2	1.2	
P	<i>Salix eleagnos</i> Scop.	3.4				3.3									
P	<i>Salix fragilis</i> L.	1.2				+2									
P	<i>Salix purpurea</i> L.					1.2		+ .3	+2						
P	<i>Corylus avellana</i> L.	+2	+2	+1	+2	+1									
PS	<i>Salix caprea</i> L.	+1													
P	<i>Citrus nigricans</i> L.	+2													
P	<i>Clematis vitalba</i> L.	1.2	+2	+1											
P	<i>Evonymus latifolius</i> (L.) Mill.	+1	1.2		+2										
P	<i>Rhamnus fallax</i> Boiss.	1.2	1.2		+1	+2- 1.2									
P	<i>Evonymus verrucosus</i> Scop.		+2- 1.2	2.2											
P	<i>Fraxinus ornus</i> L.		+1	1.1											
SP	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.		+1	1.1											
PS	<i>Sambucus nigra</i> L.		+1		1.1										
P	<i>Fagus sylvatica</i> L.		1.1	+1	+2										
P	<i>Hedera helix</i> L.						1.2								
P	<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.		1.2	1.2											
P	<i>Abies alba</i> Mill.		+1		+1- 1.1										

P	<i>Daphne mezereum</i> L.		+1		+1														
P	<i>Tilia cordata</i> Mill.									+2									
P	<i>Alnus incana</i> (L.) Willd.									1.2- 2.2									
SP	<i>Rhamnus cathartica</i> L.			+2															
SP	<i>Cornus sanguinea</i> L.							+2	1.2	.1									
P	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gärtn.								1.2		+2								+1
P	<i>Acer campestre</i> L.								1.2										
ST	<i>Rubus caesius</i> L.								2.3	1. 2								+2	
T	<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.																		2.2
PS	<i>Populus tremula</i> L.									.1								1.2	
SP	<i>Rosa canina</i> L.							+2											
P	<i>Fraxinus excelsior</i> L.																		
T	<i>Robinia pseudacacia</i> L.																		
P	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.								1.1										+1
P	<i>Rubus hirtus</i> W. K.								1.2										
P	<i>Lonicera xylosteum</i> L.								+2										
	<b>Sprat zeljastih biljaka</b>																		
P	<i>Petasites albus</i> (L.) Gärtn.	2.2						+2		1.3- 2.3									
T	<i>Chaerophyllum aromaticum</i> L.	2.3					2.3												
SP	<i>Cicerbita alpina</i> (L.) Wallr.	1.2					+1												
P	<i>Knautia dinarica</i> (Murb.) Borb.	+2	1.2																
S	<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.	2.2							+2										+2
S	<i>Geranium phaeum</i> L.	+2																	
S	<i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) Beauv.	1.2							1.2										
T	<i>Lamium maculatum</i> L.	1.2	1.2				+2	+2- 1.2											
P	<i>Festuca sylvatica</i> (Poll.) Vill.	+2							+2- 1.2										
T	<i>Aegopodium podagraria</i> L.	+2					1.1						2.2						
S	<i>Veronica chamaedrys</i> L.	+1	+2																
P	<i>Hieracium murorum</i> L.	+1	1.2				+1	+2	+2										
SP, T	<i>Fragaria vesca</i> L.	+2																	
PS, P	<i>Helleborus odoratus</i> W.K.	+1						+1											
P, T	<i>Stachys silvatica</i> L.	1.2																	
T	<i>Geranium robertianum</i> L.	1.1	1.1					+1											
T	<i>Urtica dioica</i> L.	+1																	+1
P	<i>Arabis alpina</i> L.	+2	+2																
P	<i>Hordeum europaeum</i> (L.) All.	+2- 1.2							1.2- 2.2				1.2						
P	<i>Veronica urticifolia</i> Jacq.	+2- 1.2					+2		+2										
T	<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	+2- .1.2											2.2						
SP	<i>Solidago virgaurea</i> L.	1.1																	
P	<i>Poa nemoralis</i> L.	+2																	
SP	<i>Doronicum columnae</i> Ten.	+2-					+2	+2											



Probalna vegetacija kao hidromorfološki parametar upravljanja vodenim ekosistemima (rijeka Željeznica)  
*Riparian vegetation as a hydromorphological parameters for the management of aquatic ecosystems (Željeznica river)*

		1.2																		
P	<i>Asarum europaeum</i> L.	+2	3.3		1.2															
S, T	<i>Alchemilla silvestris</i> Schm.	+1																		
P	<i>Mercurialis perennis</i> L.	+1	1.2	+1	1.1															
P, SP	<i>Heracleum orsinii</i> Guss.	1.2	+1																	
P	<i>Polypodium vulgare</i> L.	+2	2.2	+2- 1.2	1.2															
T	<i>Erigeron canadensis</i> L.	+1																		
P, T	<i>Scrophularia alata</i> Gilib.	+1																		
PS	<i>Telekia speciosa</i> (Schreb.) Baumg.	+2																		
P	<i>Euphorbia amygdaloides</i> L.	+2		+2- 1.2																
P	<i>Equisetum silvaticum</i> L.	1.1																		
P	<i>Pulmonaria officinalis</i> L.		2.2																	
T	<i>Mycelis muralis</i> (L.) Rchb.		+1	+1	+1				+1											
P	<i>Athyrium filix femina</i> (L.) Roth.		2.2		2.2															
P	<i>Oxalis acetosella</i> L.		1.3		+3- 1.3															
S, SP	<i>Veratrum album</i> L.		+1																	
P	<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Rich.		1.2		2.2															
P	<i>Epipactis latifolia</i> (L.) Druce		1.1	+1																
P	<i>Polystichum setiferum</i> (Forsk.) Woynar.		+2		+2															
P	<i>Veronica montana</i> L.		1.2		1.2															
P	<i>Melica uniflora</i> Retz.		+2																	
P	<i>Saxifraga rotundifolia</i> L.		1.2	1.2	1.2															
S	<i>Viola hirta</i> L.		+2	+1																
P	<i>Asplenium trichomanes</i> L.		1.2	2.3																
T	<i>Galium cruciata</i> (L.) Scop.		+1																	
P	<i>Potentilla micrantha</i> Ram.		+1	1.2																
P	<i>Arenonia agrimonioides</i> (L.) Neck.		+1	1.1	1.1															
P	<i>Brachypodium silvaticum</i> (Huds.) R.S.		1.2	1.2					1. 2										+2- 1.2	
S, P	<i>Ajuga reptans</i> L.		+2																	
P	<i>Sanicula europaea</i> L.		1.2	+2	+2															
P	<i>Asperula odorata</i> L.		+2- 1.2		+2- 1.2															
S	<i>Peucedanum oreoselinum</i> (L.) Mch.		+1	+1																
P	<i>Ceterach officinarum</i> DC.		+2	2.2																
T	<i>Epilobium montanum</i> L.		+1																	
S	<i>Angelica silvestris</i> L.		+1					+1												
P	<i>Scutellaria altissima</i> L.		+2						2.2											
P	<i>Moehringia muscosa</i> L.		+3																	
P	<i>Asplenium viride</i> Huds.		+2																	
P	<i>Mnium undulatum</i> Hedw.		1.2																	
P	<i>Marchantia polymorpha</i> L.		+3																	
P	<i>Salvia glutinosa</i> L.		+2	1.2																
P	<i>Circea alpina</i> L.		+1																	
P	<i>Iris bosniaca</i> (Beck) Dörf.			+2																
S, SP	<i>Hieracium prenanthoides</i> Vill.			+1																

P	<i>Carex humilis</i> Leys.			+2															
P	<i>Calamintha grandiflora</i> (L.) Mch.			+2															
P	<i>Poa cenisia</i> All.			2.2															
P	<i>Arabis turrita</i> L.			1.1															
S	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.			+2															
	<i>Digitalis grandiflora</i> Mill.			+1															
P	<i>Lathyrus vernus</i> (L.) Bernh.			+1															
P	<i>Actaea spicata</i> L.			+1	1.1														
P	<i>Sesleria autumnalis</i> (Scop.) Fr. Schultz			3.3															
S	<i>Scabiosa ochroleuca</i> L.			+2															
T	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.					1.2				+									+2
P	<i>Equisetum fluviatile</i> L.					1.1	+1												
S	<i>Briza media</i> L.					+1													
S	<i>Lotus corniculatus</i> L.					+1													
T	<i>Tussilago farfara</i> L.					+1	1.2												+2
S	<i>Anthriscus silvester</i> (L.) Hoffm.					+1													
S	<i>Centaurea jacea</i> L.					+2													
P	<i>Parnassia palustris</i> L.					+1													
S	<i>Agrostis capillaris</i> L.					+2													
S	<i>Carex hirta</i> L.					1.2				+2									+1
T	<i>Ranunculus repens</i> L.					+2													
S	<i>Vicia cracca</i> L.					+1													+1
P, S, T	<i>Juncus articulatus</i> L.					+2													+2
T	<i>Inula britannica</i> L.					+1													
T	<i>Polygonum persicaria</i> L.					+1	+1			+									
T	<i>Fagopyrum convolvulus</i> (L.) H. Gross.					+2													
T	<i>Impatiens glandulifera</i> Royle					1.2													
S	<i>Lythrum salicaria</i> L.					+2	.1	+1		+	.1	+1							+2
T	<i>Rorippa silvestris</i> (L.) Bess.					1.2													+2-1.2
P, S	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> L.					+1													+2
T	<i>Convolvulus arvensis</i> L.									+	.1								+1
T	<i>Barbarea vulgaris</i> R. Br.									+	.2								+1
T, P	<i>Calystegia sepium</i> (L.) R. Br.									1.	2	+1							+1
T	<i>Equisetum arvense</i> L.									+	.1	1.1	1.	2					1.1
T	<i>Helianthus tuberosus</i> L.									1.	2								+1
T	<i>Echinocystis lobata</i> (Michx.) Torr. & A. Gray									+	.2								
S, T	<i>Lolium perenne</i> L.									+	.2								+1
T	<i>Pastinaca sativa</i> L.									+	.1								
T	<i>Alliaria officinalis</i> Andr.									+	.2								



	Schulz.																
P	<i>Viola riviniana</i> Rchb.				+2												
P, S	<i>Orchis maculata</i> L.				1.1												
P	<i>Cardamine flexuosa</i> With.				+1												
P	<i>Phyllitis scolopendrium</i> (L.) Newm.				+2												
P	<i>Euphorbia carniolica</i> Jacq.				+2												

## ANALIZA PRISUSTVA AFLATOKSINA $M_1$ U SIROVOM KRAVLJEM MLIJEKU SA OTKUPNOG PODRUČJA MLJEKARE MILKOS D.D. SARAJEVO

Ahmed Busuladžić<sup>1</sup>, Zlatan Sarić<sup>2</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Istraživanje je zasnovano na ispitivanju prisustva i količine aflatoksina  $M_1$  (AFM<sub>1</sub>) u sirovom mlijeku, te utvrđivanju hemijskih i higijenskih parametara svježeg sirovog kravljeg mlijeka na otkupnom području mljekare Milkos d.d. Sarajevo. Cilj rada je bio utvrditi međusobnu povezanost vrijednosti hemijskih i higijenskih parametara sirovog mlijeka sa koncentracijom AFM<sub>1</sub> u ispitivanim uzorcima. Uzorci za ispitivanje su uzeti sa 13 različitih otkupnih mjesta u BiH. Od ukupno 153 analizirana uzorka u periodu od godinu dana (decembar 2013. - novembar 2014.) detektovana su tri uzorka sa koncentracijom AFM<sub>1</sub> iznad limita propisanih zakonskom regulativom u BiH. Prema rezultatima analiza hemijskih i higijenskih parametara sirovog kravljeg mlijeka pokazalo se da je prosječan sadržaj proteina u analiziranim uzorcima bio iznad 2,80 %, te prosječan sadržaj mliječne masti iznad 3,20%. Utvrđeno je da prosječna vrijednost sadržaja bezmasne suhe materije (BSM) u deset ispitivanih područja, od ukupno 13 analiziranih, ne zadovoljava najnižu dozvoljenu vrijednost koju propisuje Pravilnik o sirovom mlijeku BiH (2011). Prosječna vrijednost broja somatskih stanica ispitivanih uzorka bila je iznad 400.000/mL odnosno iznad 100.000/mL za ukupan broj mikroorganizama, izuzev kod mlijeka sa veće farme na području Kalesije gdje je utvrđen kvalitet mlijeka ekstra klase. Pearsonovim koeficijentom korelacije nije utvrđena statistički značajna povezanost vrijednosti AFM<sub>1</sub> i hemijskih i higijenskih parametara sirovog mlijeka.

Ključne riječi: *mlijeko, aflatoksin  $M_1$ , hemijski sastav, higijenska ispravnost*

### UVOD

Nauka je već odavno ustanovila da gljive (uključujući kvasce i plijesni) pripadaju organizmima koji izazivaju kvarenja namirnica i hrane za životinje. Međutim, o njihovom toksičnom djelovanju na više organizme ništa se pouzdano nije znalo do prije pet decenija. Nakon uginuća približno 100.000 mladih purana, pačića i fazana od nepoznate bolesti na farmama u južnoj i jugoistočnoj Engleskoj 1960. godine, nazvane "X" bolest purana, Sargeant i Evans (1979) su otkrili da je za uginuće navedenih

<sup>1</sup> KJKP „Vodovod i Kanalizacija“ d.o.o. Sarajevo, Jaroslava Čermija 8, 71000 Sarajevo, BiH

<sup>2</sup> Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

\* Izvod iz magistarskog rada,

Korespondencija: ahmedb2206@yahoo.com

ptica bila odgovorna plijesan *Aspergillus flavus*. Toksin koji je u ovom slučaju otkriven nazvan je *aflatoksin* (Steyn, 1980; van Egmond, 1994; Mc Lean i Dutton, 1995; Duraković *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2012; Eaton i Groopman, 1994).

Aflatoksini su heterociklična jedinjenja koja primarno proizvode uglavnom dvije vrste filamentoznih gljivica: *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Masoero *et al.*, 2007; Gallo *et al.* 2008; Al-Fakih, 2014). Studije su pokazale da neki sojevi *A. nominus* i *A. tamarii* također imaju sposobnost proizvoditi aflatoksine, od kojih je *A. nominus* fenotipski slična *A. flavus*. Riječ aflatoksin je nastala od početnih slogova imena plijesni *A. flavus*; A (rod *Aspergillus*), FLA (vrsta *flavus*) i TOKSIN, što znači otrov (latinski „toxicum“) (Feddern *et al.*, 2013). *A. flavus* proizvodi aflatoksine B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) i B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) i ciklopiazoničnu kiselinu, dok *A. parasiticus* AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, aflatoksine G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) i G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), ali ne i ciklopiazoničnu kiselinu. *A. nominus* proizvodi aflatoksine B i G skupine (Duraković i Duraković, 2000; Deshpande, 2002; W H O, 2002). Do sada je identificirano 18 aflatoksina među kojima je po svojoj toksičnosti i zastupljenosti najznačajniji AFB<sub>1</sub>, dok su ostali aflatoksini (AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub>) manje toksični ili se javljaju u prirodi samo kao produkti metabolizma (AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, aflatoksin P<sub>1</sub> – AFP<sub>1</sub>, aflatoksin Q<sub>1</sub> – AFQ<sub>1</sub>, aflatoksikol) (Miličević *et al.*, 2014). Aflatoksin B<sub>1</sub> najsnažniji je kancerogen, a svrstani prema opadajućoj kancerogenosti slijede aflatoksini G<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> pa B<sub>2</sub> (citirano prema Duraković i Duraković, 2000). Aflatoksin M<sub>1</sub> je hepatokancerogeni metabolit dobiven hidrosilacijom AFB<sub>1</sub>. Izvorno je otkriven u mlijeku ljudi i životinja hranjenih pljesnivim žitaricama koje su sadržavale AFB<sub>1</sub>. Označen je kao 4-hidroksi metabolit aflatoksina B<sub>1</sub> poznat i kao „mliječni toksin“ ili aflatoksin M<sub>1</sub>

(Holzapfel i Steyn, 1966; Galvano *et al.*, 1996; Bilandžić *et al.*, 2013; Yitbarek i Tamir, 2013). Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificirala je AFB<sub>1</sub> u prvu klasu kancerogenih agenasa. Evaluacijom kancerogenih svojstava mikotoksina IARC je aflatoksine općenito svrstala u Grupu 1 kancerogenih jedinjenja. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je klasificirao aflatoksine kao jedinjenja za koja ne postoji tolerantni dnevni unos (TDI), te su maksimalno dozvoljene količine (MDK) u hrani postavljene po principu ALARA (eng. as low as reasonably achievable - onoliko nisko koliko je razumno moguće) (Miličević *et al.*, 2014).

Bolesti uzrokovane aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze. Aflatoksini su akutno i hronično toksični za ljude i životinje, uzrokuju akutna oštećenja jetre, cirozu jetre, indukciju tumora i teratogene efekte (Pitt, 2000; Chang *et al.*, 2014). Pored navedenog, aflatoksini imaju imunosupresivno i mutageno djelovanje, uzrokuju usporavanje ili zastoj u rastu, i pri akutnom unosu visokih koncentracija, smrt (Mc Lean i Dutton, 1995; Al-Fakih, 2014). Najveći stepen akumulacije aflatoksina odvija se u tkivima u kojima se vrši njegova biotransformacija; jetra i bubregi (Sinovec i Resanović, 2005). Dokazana je uloga AFB<sub>1</sub> u razvoju primarnog

karcinoma jetre (PLC) kod ljudi. Veza između pojave PLC i izloženosti ljudi aflatoksinima jasno je dokazana kod individua oboljelih od hepatitis B (HBV) i/ili C virusa (HCV) u dijelovima Afrike i Azije (Miličević *et al.*, 2014). Aflatoksin je pronađen u tlu, biljkama i životinjama, svim vrstama orašastog voća, naročito kikirikiju i orahu, zatim u soji, riži, kukuruzu, tjestenini, mlijeku i mliječnim proizvodima, sušenom voću i jestivom ulju (Pitt, 2000; Deshpande, 2002; Srebočan i Srebočan, 2009; Dhanasekaran *et al.*, 2011). U cilju smanjenja faktora rizika od kontaminacije aflatoksinima, za žitarice prije žetve, potrebno je planirati odabir sorti koje su otporne na plijesni, uključujući adekvatnu zaštitu od insekata i praćenje parametara kao što su: temperatura, relativna vlažnost, sadržaj vode, kvalitet i vrsta tla. U toku žetve potrebno je obratiti pažnju na sušenje i pročišćavanje, te nakon žetve obezbjediti pravilno uskladištenje, suzbijanje rasta plijesni i dekontaminaciju (fizičke, hemijske i biološke metode; adsorbensi, fiksatori mikotoksina) (Delaš, 2010; Mitak *et al.*, 2013).

Nakon afere sa povećanim koncentracijama  $AFM_1$  u sterilnom mlijeku u 2013. godini u BiH i zemljama susjedstva, te nakon uzburkavanja javnog mnijenja cijele regije, cilj istraživanja je bio ispitati prisustvo i utvrditi količinu aflatoksina  $M_1$  u sirovom mlijeku srednje i sjeveroistočne Bosne sa 13 različitih otkupnih mjesta mljekare Milkos d.d. Sarajevo, te testirati međusobnu povezanost vrijednosti hemijskih i higijenskih parametara sirovog mlijeka sa koncentracijom aflatoksina  $M_1$  u ispitivanim uzorcima.

## MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanja su urađena u periodu od 27.12.2013. do 21.11.2014. godine u internom laboratoriju mljekare Milkos d.d. Sarajevo i na Odjeljenju za kontrolu namirnica i hrane za životinje JU Veterinarskog zavoda Tuzlanskog kantona u Tuzli.

Za analiziranje prisustva  $AFM_1$  uzeta su ukupno 153 uzorka svježeg sirovog kravljeg mlijeka i urađen je isti broj analiza. Uzorci su uzimani jednom mjesečno na 13 otkupnih mjesta mljekare Milkos d.d. Sarajevo u toku jedne kalendarske godine (SO Ilijaš-Breza, OZZ „Adrija“ Travnik, SO Vitez-Novu Travnik, OZE Ekonomija Kiseljak, SO Kalesija, farma Spreča, SC Sokolac, KJP PD Butmir, SO Tarčin-Trnovo, SO Ilijaš, SC Sokolac-Pale, OZZ Moštre-Visoko i ZZ Tarčin). Uzorci su uzimani direktno iz cisterni za sirovo mlijeko prilikom prijema na prijemnoj rampi mljekare u odgovarajućoj plastičnoj ambalaži u količini od 500 mL i čuvani do početka analiziranja u laboratoriji pri temperaturi od +4 °C. Kvantitativna detekcija aflatoksina  $M_1$  u uzorcima svježeg sirovog kravljeg mlijeka izvođena je ELISA metodom (enzyme-linked immunosorbent assay) u internom laboratoriju mljekare neposredno nakon prikupljanja svih uzoraka (2-3 dana).

Na sabirnim uzorcima mlijeka određivan je broj somatskih ćelija (SC) fluoro-opto-elektronskom metodom (BAS EN ISO 13366-2-2010, Fossomatic<sup>TM</sup>FC 6000), ukupan broj bakterija (UBB) epifluorescentnom protočnom citometrijom (BAS EN ISO 21187:2005, BactoScan<sup>TM</sup>FC 50H) i hemijski sastav mlijeka metodom infracrvene spektrofotometrije (BAS ISO 9622:2008, MilkoScan<sup>TM</sup>FT 6000). Uzeto je 309 uzoraka sirovog mlijeka u toku perioda ispitivanja i urađeno ukupno 2.025 analiza.

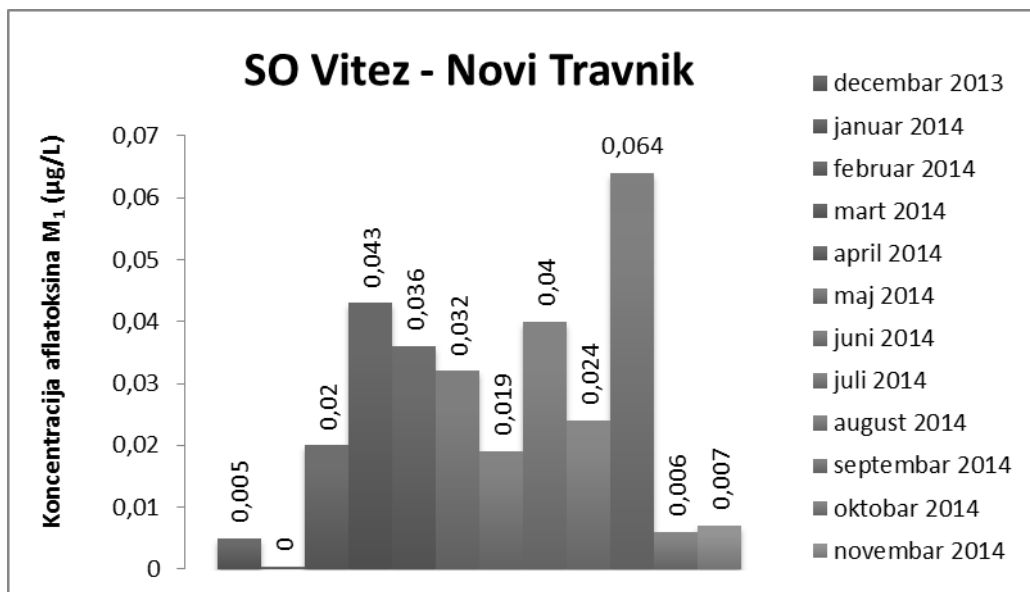
Matematičko-statistička analiza podataka odnosila se na izračunavanje osnovnih parametara deskriptivne statistike, analizu varijanse (ANOVA) i test najmanje značajne razlike (LSD-test). Međusobna povezanost vrijednosti hemijskih i higijenskih parametara kvaliteta sirovog mlijeka i vrijednosti aflatoksina M<sub>1</sub> u ispitivanim uzorcima je testirana primjenom Pearson-ovog koeficijenta korelacije. Za izračunavanje osnovnih parametara deskriptivne statistike i Pearson-ovog koeficijenta korelacije korišten je program Microsoft Excel 2010.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Od ukupnog broja analiziranih uzoraka u periodu od godinu dana detektovana su tri uzorka sa koncentracijom AFM<sub>1</sub> izvan propisa zakonske regulative u BiH. Otkupna područja u kojima su zabilježene koncentracije AFM<sub>1</sub> iznad 0,050 µg/L su SO Vitez – Novi Travnik, SO Kalesija i KJP PD Butmir.

Prosječna vrijednost AFM<sub>1</sub> kod samostalnog otkupa SO Vitez - Novi Travnik za analizirani vremenski period iznosila je 0,025 µg/L. Najviša izmjerena vrijednost od 0,064 µg/L, zabilježena u mjesecu septembru 2014. godine bila je iznad MDK propisane aktuelnom BiH zakonskom regulativom (*grafikon 1*). Na farmi Ovnak, najvećoj farmi ovog otkupa, samostalno se pripremaju koncentracije za obrok muznih krava i sirovinaska služba mljekare Milkos nije imala uvida u kvalitet ishrane muznih krava u datom mjesecu niti je uopće snabdijevala koncentratom navedenu farmu. Pretpostavka je da se u tom periodu na ovoj farmi za ishranu muznih krava koristio kukuruz sumnjivog porijekla koji se prije upotrebe nije testirao na prisustvo AFB<sub>1</sub>.

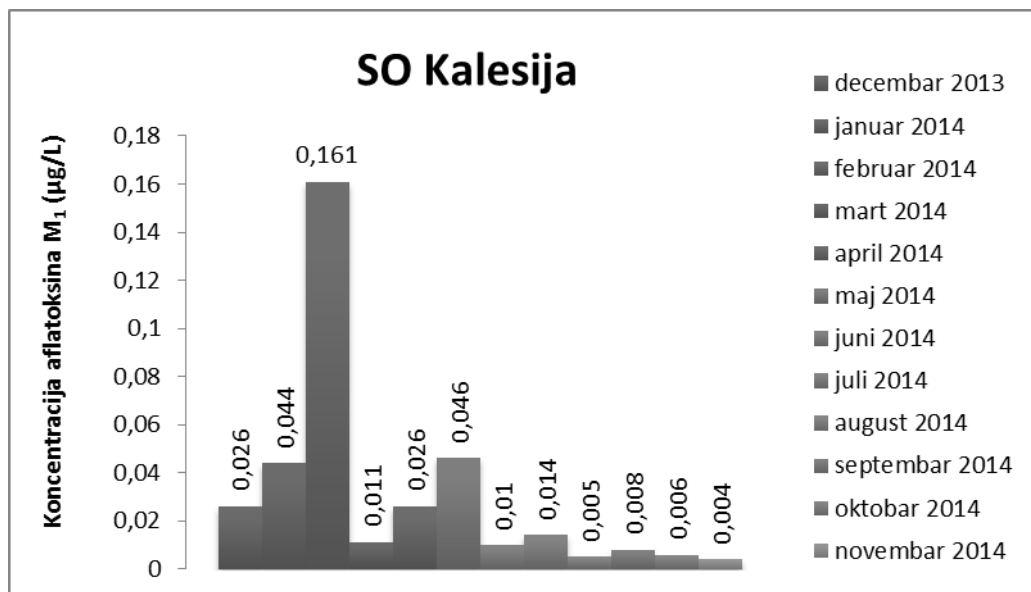




Grafikon 1. Izmjerene koncentracije AFM<sub>1</sub> na SO Vitez-Novu Travnik u vremenskom periodu od godinu dana

*Graph 1. Measured concentrations of AFM<sub>1</sub> at SO Vitez-Novu Travnik for the period of a year*

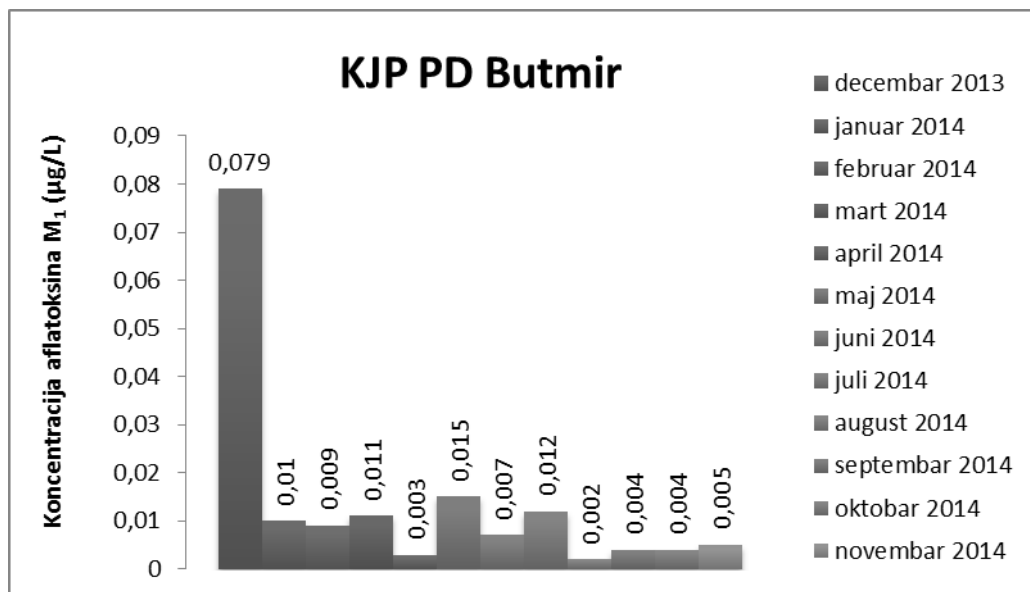
Na SO Kalesija izmjerena je najviša koncentracija u februaru 2014. godine od 0,161 µg/L što je ujedno i najviša zabilježena koncentracija u ovom istraživanju uzimajući u obzir sve analizirane otkupne stanice sirovog mlijeka.



Grafikon 2. Izmjerene koncentracije AFM<sub>1</sub> na SO Kalesija u vremenskom periodu od godinu dana

*Graph 2. Measured concentrations of AFM<sub>1</sub> at SO Kalesija for the period of a year*

U mjesecima januaru i maju 2014. godine izmjerene koncentracije AFM<sub>1</sub> od 0,044 µg/L odnosno 0,046 µg/L su bile vrlo blizu prekoračenja MDK. Prosječna vrijednost AFM<sub>1</sub> od 0,030 µg/L za analizirani vremenski period je relativno visoka (*grafikon 2.*). U SO Kalesija se u ishrani muznih krava, osim silažnog kukuruza i sijena upotrebljavao koncentrat koji se na ovom utkupu samostalno pripremao. Mljekara Milkos d.d. nije snabdijevala SO Kalesiju sa koncentratom i nije imala potpuni nadzor nad kvalitetom ishrane muznih grla gdje se očigledno nabavljao kukuruz sumnjivog porijekla.



Grafikon 3. Izmjerene koncentracije AFM<sub>1</sub> na KJP PD Butmir u vremenskom periodu od godinu dana

*Graph 3. Measured concentrations of AFM<sub>1</sub> at KJP PD Butmir for the period of a year*

Najviša koncentracija AFM<sub>1</sub> na KJP PD Butmir zabilježena je u mjesecu decembru 2013. godine i iznosila je 0,079 µg/L. Mlijeko krava sa KJP PD Butmir je imao prosječnu vrijednost AFM<sub>1</sub> za analizirani vremenski period od 0,013 µg/L. Ostale vrijednosti AFM<sub>1</sub> u analiziranim uzorcima mlijeka na KJP PD Butmir u 2014. godini su bile u skladu sa zakonskom regulativom. Na KJP PD Butmir za ishranu muznih krava uglavnom se koristi kukuruzna silaža (nekada i travna), koncentrat i sijeno. KJP PD Butmir koncentrat kupuje od mljekare Milkos od 04.11.2013. godine (potpuna krmna smjesa za muzne krave GKM-2 sa 18 % sirovih proteina). Svaka pošiljka isporučenog koncentrata se analizira na prisustvo AFB<sub>1</sub> u internoj laboratoriji mljekare Milkos d.d. Međutim, iako se kontrolirani koncentrat kontinuirano isporučuje ovoj farmi, ipak nije utvrđen uzrok povišene koncentracije AFM<sub>1</sub> u mjesecu decembru 2013. godine. Pretpostavka je da su se muzna grla u datom mjesecu hranila zalihama koncentrata koje su bile kontaminirane AFB<sub>1</sub>, ako se uzme u obzir da su analizirani uzorci sirovog mlijeka u narednim mjesecima bili u skladu sa zakonskim propisima.

Analize hemijskih i higijenskih parametara sirovog kravljeg mlijeka su pokazale da je prosječan sadržaj proteina u analiziranim uzorcima bio iznad 2,80%, te prosječan sadržaj mliječne masti iznad 3,20%. Utvrđeno je da prosječna vrijednost bezmasne suhe tvari u deset ispitivanih područja, od ukupno 13 analiziranih, ne zadovoljava najnižu dozvoljenu vrijednost koju propisuje Pravilnik o sirovom mlijeku BiH (2011),

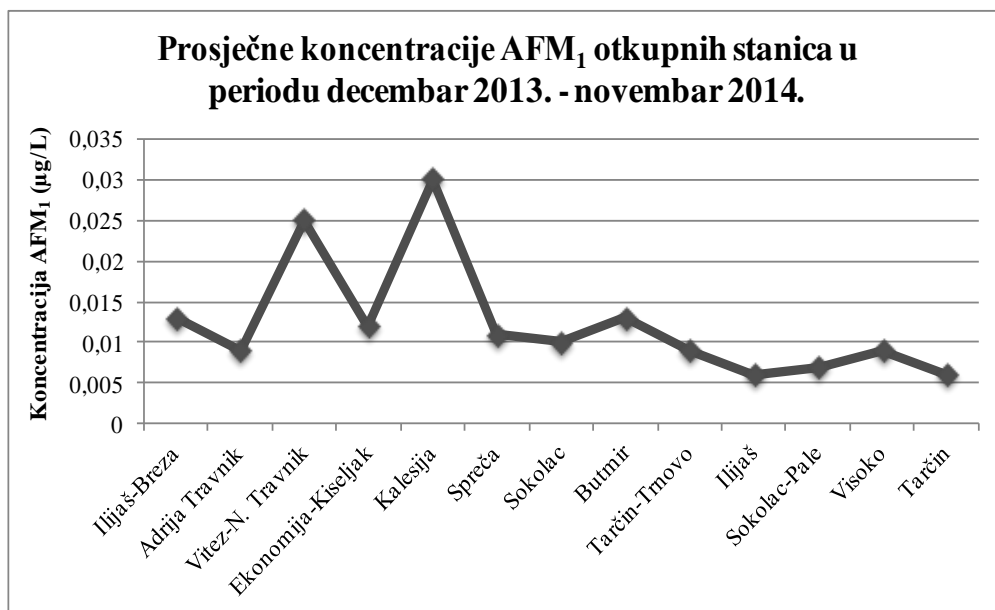
osim kod mlijeka krava SO Ilijaš-Breza, SO Vitez-Novi Travnik i farma Spreča. Prosječna vrijednost broja somatskih stanica ispitivanih uzoraka bila je iznad 400.000/mL odnosno iznad 100.000/mL za ukupan broj mikroorganizama, izuzev kod mlijeka sa veće farme na području Kalesije gdje je utvrđen kvalitet mlijeka ekstra klase.

Pearson-ovim koeficijentom korelacije je testirana međusobna povezanost prosječnih vrijednosti aflatoksina  $M_1$  i hemijskih i higijenskih parametara svih analiziranih otkupnih stanica zajedno u periodu od decembra 2013. do novembra 2014. U *tabeli 1.* prikazane su dobijene vrijednosti korelacije  $AFM_1$  i hemijskih i higijenskih parametara sirovog kravljeg mlijeka ispitivanih stanica. Korelacija između  $AFM_1$  i higijenskih parametara mlijeka (UBB,  $SC$ ) je negativna i neznatna, kao i  $AFM_1$  i proteina. Također, korelacija između  $AFM_1$  i laktoze, odnosno  $AFM_1$  i mliječne masti, ukupne suhe materije (USM) i BSM je neznatna i pozitivna.

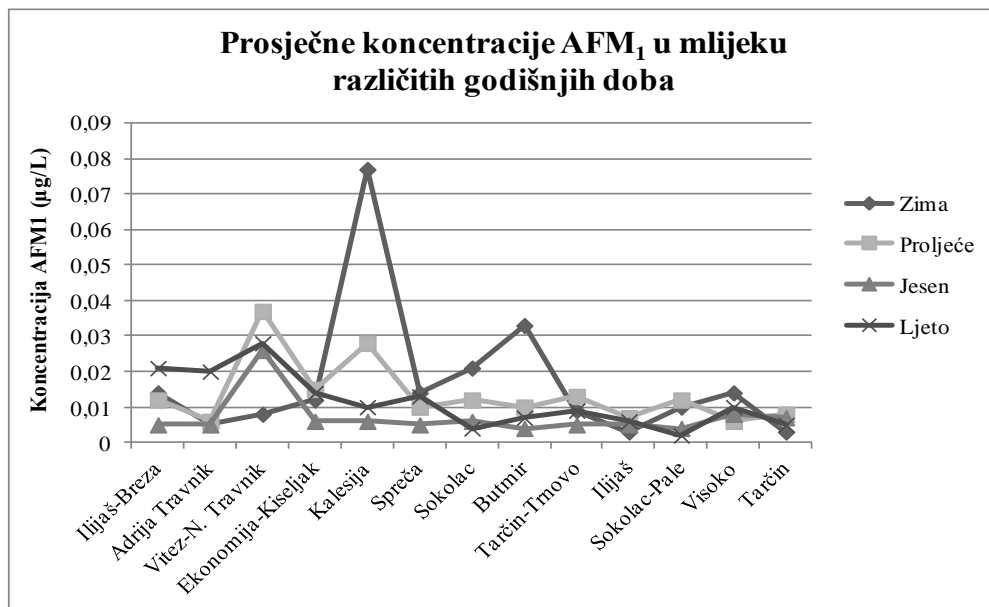
Tabela 1. Pearsonov koeficijent korelacije između koncentracije AFM<sub>1</sub> i hemijskih i higijenskih parametara sirovog mlijeka  
otkupnih stanica

*Table 1. Pearson's correlation coefficient between AFM<sub>1</sub> and chemical and hygienic parameters of raw milk from the all  
purchase areas*

STANICE	AFM <sub>1</sub>	MAST %	PROTEIN %	LAKTOZA %	USM %	BSM %	SČx 1.000/mL	UBB x 1.000/mL
SO Ilijaš-Breza	0,013	3,89	3,35	4,46	12,45	8,54	428,25	592,58
OZZ Adrija Travnik	0,009	3,34	3,12	4,24	11,47	8,07	462,42	2.618,25
SO Vitez-Novi Travnik	0,025	3,89	3,27	4,57	12,46	8,56	474,33	528,00
OZE Ekonomija Kiseljak	0,012	3,75	3,14	4,37	12,00	8,22	556,91	1.375,33
SO Kalesija	0,030	3,62	3,16	4,26	11,81	8,14	562,42	2.411,25
Farma Spreča	0,011	3,80	3,26	4,62	12,41	8,59	281,75	38,83
SC Sokolac	0,010	3,62	3,20	4,24	11,82	8,16	800,67	2.417,08
KJP PD Butmir	0,013	3,84	3,18	4,41	12,17	8,31	539,08	133,75
SO Tarčin-Trnovo	0,009	3,79	3,28	4,44	12,27	8,45	451,42	911,92
SO Ilijaš	0,006	3,71	3,22	4,44	12,12	8,38	632,33	1.657,50
SC Sokolac-Pale	0,007	3,66	3,21	4,32	11,95	8,25	709,75	1.358,08
OZZ Moštre-Visoko	0,009	3,62	3,22	4,34	11,95	8,29	480,90	2.537,00
ZZ Tarčin	0,006	3,92	3,29	4,30	12,27	8,31	505,58	1.176,92
<b>Pearsonov koeficijent korelacije „r“</b>		<b>0,09</b>	<b>-0,11</b>	<b>0,12</b>	<b>0,06</b>	<b>0,04</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,02</b>



Grafikon 4. Prosječne koncentracije AFM<sub>1</sub> (µg/L)  
u mlijeku pojedinačnih otkupnih stanica u periodu decembar 2013. – novembar 2014.  
*Graph 4. Average Concentrations of AFM<sub>1</sub> (µg/L) in milk from single purchase areas  
in the period between december 2013 – november 2014*



Grafikon 5. Prosječne koncentracije AFM<sub>1</sub> (µg/L) u mlijeku pojedinačnih otkupnih stanica u različitim godišnjim dobima  
Graph 5. Average concentrations of AFM<sub>1</sub> (µg/L) in milk from single purchase areas for different period of year

Pearsonov koeficijent korelacije je dokazao da je povezanost analiziranih varijabli, AFM<sub>1</sub> i hemijskih i higijenskih parametara otkupnih stanica mlijeka, neznatna ili da gotovo uopće ne postoji, te da uzročno posljedičnu vezu vrijednosti AFM<sub>1</sub> i hemijskih i higijenskih parametara mlijeka nije potrebno dodatno naučno dokazivati. Pearsonovim koeficijentom korelacije nije utvrđena statistički značajna povezanost vrijednosti AFM<sub>1</sub> i hemijskih i higijenskih parametara sirovog mlijeka, te prema tome promjene vrijednosti jedne varijable nemaju uticaja na promjene vrijednosti druge varijable (tabela 1.).

Analizom varijanse testirana je razlika u vrijednostima koncentracije AFM<sub>1</sub> sirovog mlijeka između otkupnih stanica u periodu decembar 2013. – novembar 2014. Rezultati analize uz nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$  su pokazali da je  $F_{emp} > F_{tab}$  i da se aritmetičke sredine populacija iz kojih su uzeti uzorci razlikuju signifikantno. Dakle, razlike u prosječnim koncentracijama AFM<sub>1</sub> svih analiziranih otkupnih stanica, u periodu ispitivanja, bile su statistički značajne. Na grafikonu 4. su prikazane prosječne koncentracije AFM<sub>1</sub> (µg/L) u mlijeku pojedinačnih otkupnih stanica u periodu decembar 2013. – novembar 2014. Najviše prosječne vrijednosti AFM<sub>1</sub> evidentirane

su na samostalnom otkupu SO Vitez - Novi Travnik (0,025  $\mu\text{g/L}$ ), odnosno na SO Kalesija 0,030  $\mu\text{g/L}$ .

Analizom varijanse se također pokušalo utvrditi da li postoje razlike u vrijednostima koncentracije AFM<sub>1</sub> kod otkupnih stanica između zime, proljeća, ljeta i jeseni, odnosno da li su te razlike statistički značajne. Prema rezultatima dobijenim ispitivanjem svih otkupnih stanica za analizirana godišnja doba jesen, zimu, ljeto i proljeće uz nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$ , pokazalo se da je  $F_{\text{emp}} > F_{\text{tab}}$ . U ovom slučaju se prihvatila alternativna hipoteza kojom se potvrđuje da nisu sve aritmetičke sredine populacija iz kojih su uzeti uzorci jednake, odnosno aritmetičke sredine analiziranih populacija razlikuju se signifikantno. Dakle, prosječne koncentracije AFM<sub>1</sub> svih analiziranih otkupnih stanica statistički su značajne, te se može konstatovati da su koncentracije AFM<sub>1</sub> između 4 godišnja doba značajno varirale. Testom najmanje značajne razlike (LSD test) utvrđena je visoko statistički značajna razlika između grupe I (zima) i grupe III (jesen), uz nivo značajnosti  $\alpha = 0,05$ . Prosječna koncentracija AFM<sub>1</sub> za grupu I iznosila je 0,017  $\mu\text{g/L}$  odnosno za grupu III 0,007  $\mu\text{g/L}$ . Na *grafikonu 5.* su prezentirane prosječne koncentracije AFM<sub>1</sub> ( $\mu\text{g/L}$ ) u mlijeku pojedinačnih otkupnih stanica u različitim godišnjim dobima. Na SO Kalesija su izmjerene najviše koncentracije AFM<sub>1</sub> u zimskom periodu uzimajući u obzir sve analizirane stanice i različita godišnja doba.

## ZAKLJUČAK

Od 153 ukupno analizirana uzorka na prisustvo AFM<sub>1</sub> detektovana su tri uzorka sa koncentracijom AFM<sub>1</sub> iznad MDK vrijednosti. Jedan od razloga malog broja pozitivnih uzoraka je taj da otkup mljekare Milkos d.d. pokriva uglavnom visinske predjele BiH na kojima se tradicionalno u ishrani muznih krava koriste sjeno i sjenaža, a drugi razlog je činjenica da veće farme strogo kontrolišu kvalitet ishrane muznih krava.

Prema rezultatima analiza hemijskih i higijenskih parametara svježeg sirovog kravljeg mlijeka sa otkupnog područja mljekare Milkos d.d. pokazalo se da je prosječan sadržaj proteina i mliječne masti u analiziranim uzorcima bio u skladu sa Pravilnikom o sirovom mlijeku BiH (2011). Međutim, prosječne izmjerene vrijednosti BSM, za analizirani period, nisu bile usklađene sa zakonskom regulativom kod većine otkupnih stanica. Utvrđeno je da od 13 analiziranih, ukupno 10 otkupnih stanica ne zadovoljava najnižu dozvoljenu vrijednost BSM koje propisuje Pravilnik (2011). Isto tako, prosječne vrijednosti broja somatskih ćelija/mL mlijeka i ukupnog broja bakterija/mL mlijeka u svim ispitivanim otkupnim stanicama (izuzev farme Spreča) bio je iznad maksimalno dozvoljenih vrijednosti. Kod farme Spreča je utvrđen kvalitet mlijeka E klase.

Analiziranje međusobne povezanosti vrijednosti hemijskih i higijenskih parametara sirovog kravljeg mlijeka sa koncentracijom aflatoksina M<sub>1</sub> u ispitivanim uzorcima



izvršeno je primjenom Pearson-ovog koeficijenta korelacije. Prema rezultatima koji su dobijeni statističkim izračunavanjem utvrđeno je da je povezanost analiziranih varijabli neznatna ili da gotovo uopće ne postoji, te da uzročno posljedičnu vezu vrijednosti AFM<sub>1</sub> i hemijskih i higijenskih parametara mlijeka nije potrebno dodatno naučno dokazivati. Prema tome, može se zaključiti da značajna korelacija AFM<sub>1</sub> i vrijednosti hemijskih i higijenskih parametara u analiziranom mlijeku otkupnih stanica nije statistički utvrđena.

Zimski period je imao najvišu prosječnu koncentraciju AFM<sub>1</sub> uzimajući u obzir prosječne vrijednosti svih godišnjih doba, kao i najviše pojedinačne izmjerene koncentracije AFM<sub>1</sub>. Viša prosječna koncentracija AFM<sub>1</sub> tokom zimskog perioda je indikator da su skladišni uvjeti koncentrata za ishranu muznih krava pogodovali razvijanju plijesni i sintezi mikotoksina.

Provedenim istraživanjem se dobila ukupna slika kvaliteta sirovog kravljeg mlijeka sa otkupnih područja mljekare Milkos u toku 12 mjeseci. Na otkupnim područjima gdje su se samostalno pripremali koncentрати za obrok muznih krava mljekara Milkos nije imala uvida u kvalitetu ishrane, odnosno nije snabdijevala koncentratom date otkupe. Evidentno je da se za ishranu muznih krava koristio kukuruz sumnjivog porijekla koji se prije upotrebe nije testirao na prisustvo AFB<sub>1</sub>. S druge strane, pretpostavka je da se na KJP PD Butmir u decembru 2013. koristila zaliha koncentrata kontaminiranog aflatoksinom B<sub>1</sub>, a koji nije ispručen od strane mljekare Milkos. Kako bi se kvaliteta ishrane muznih krava dalje unaprijedila potrebno je napraviti plan edukacije farmera o načinu skladištenja i postupanja sa hranom za životinje i isti sprovesti u djelo, s ciljem smanjenja potencijalnog razvoja plijesni na najmanju moguću mjeru.

## LITERATURA

- Al-Fakih, A. A. (2014): Overview on the Fungal Metabolites Involved in Mycopathy. *Open Journal of Medical Microbiology*, 4, 38-63.
- BAS EN ISO 13366-2 (2008): Mlijeko – Brojanje somatskih ćelija – Dio 2: Vodič za rad fluoro-opto-elektronskih brojača, (EN ISO 13366–2:2006, ITD).
- BAS ISO 9622 (2008): Punomasno mlijeko–Određivanje sadržaja mliječne masti, bjelančevina i laktoze - Uputstvo za rad sa mid – infrared instrumentima (ISO 9622 : 1999, ITD).
- BAS EN ISO 21187 (2007): Mlijeko - Kvantitativno određivanje bakteriološkog kvaliteta - Vodič za uspostavljanje veze između rezultata rutinskih metoda i rezultata ustaljenih metoda i njihove verifikacije.
- BAS EN ISO 5764 (2010): Mlijeko – Određivanje tačke mržnjenja – Thermistor krioskop metoda.
- Bilandžić, N., Varenina, I., Đurđica, B., Sedak, M., Đokić, M., Solomun-Kolanović, B., Cvetnić, Ž. (2013): Aflatoksin M<sub>1</sub> u mlijeku i mliječnim proizvodima. *Veterinarska stanica* 44 (3), 195-203.

- Chang, P.-K., Horn, B. W., Abe, K., Gomi, K. (2014): *Aspergillus*. U: Batt C.A., Tortorello M.-L. eds., 2nd ed. *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego: Academic Press. Vol 1, 77-83.
- Delaš, F. (2010): Mikrobni toksini. U: Šarkanj B., Kipčić D., Vasić-Rački Đ., Delaš F., Galić K., Katalenić M., Dimitrov N., Klapac T. *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Izd. Osijek: Hrvatska agencija za hranu (HAH), 31-48.
- Dhanasekaran, D., Shanmugapriyavan, S., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. (2011): Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. U: Guevara-Gonzalez R.G. Ed. *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. Rijeka: InTech, 221-255.
- Deshpande, S. S. (2002): *Handbook of Food Toxicology*. Ed. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Duraković, S., Duraković, L. (2000): *Specijalna mikrobiologija*. Izd. Zagreb: Durieux.
- Duraković, S., Frane, D., Duraković, L. (2002): *Moderna mikrobiologija namirnica*. Izd. Zagreb: Kugler.
- Eaton, D. L., Groopman, J.D. eds. (1994): *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. San Diego, CA, Academic Press, INC.
- Gallo, A., Moschini, M., Masoero, F. (2008): Aflatoxins absorption in the gastrointestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Ital.J.Anim.Sci.* Vol. 7, 53-63.
- Galvano, F., Galofaro, V., Galvano, G. (1996): Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products: A worldwide review. *Journal of Food Protection* Vol. 59, No 10, 1079-1090.
- Holzappel, C. W., Steyn, P. S. (1966): Isolation and structure of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>. *Tetrahedron Letters* No. 25, 2799-2803.
- Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., Diaz, D. (2007): Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1:9, 1344–1350.
- McLean, M., Dutton, M. F. (1995): Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology Therapeutics* 65 (2), 163-192.
- Medeiros, F. H. V., Martins, S. J., Zucchi, T. D., Melo, I. S., Batista, L. R., Machado, J. C. (2012): Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciência e Agrotecnologia* 36 (5), 483-497.
- Milićević, D., Nedeljković-Trailović, J., Mašić, Z. (2014): Mikotoksini u lancu ishrane – analiza rizika i značaj za javno zdravstvo. *Tehnologija mesa* 55 (1), 22–38.
- Mitak, M., Bilandžić, N., Pleadin, J. (2013): Aflatoksini od krmiva do mlijeka. *Veterinarska stanica* 44 (5), 363-369.
- Pitt, J. I. (2000): Toxicogenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56 (1), 184-192.
- Sargeant, K, Evans, C. G. T. (1979): *Potential hazards in the industrial use of microorganisms*. Brussels: Directorate General for Research in Science and Education, Commission of the European Communities.

- Sinovec, Z., Resanović, R. (2005): Mikotoksini u hrani za životinje - rizik po zdravlje ljudi. Tehnologija mesa 46 (1-2), 39-44.
- Srebočan, V., Srebočan, E. (2009): Veterinarska toksikologija. 2. Izd. Zagreb: Medicinska naklada.
- Steyn, P. S. ed. (1980): The Biosynthesis of Mycotoxins: A Study in Secondary Metabolism. New York: Academic Press, Inc.
- van Egmond, H. P. (1994): Aflatoxins in Milk. U: Eaton D.L. and Groopman J.D. Ed. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. San Diego, CA, Academic Press, INC, 365-379.
- WHO, (2002): Evaluation of certain mycotoxins in food (Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva: WHO Technical Report Series, No. 906, 14.
- Yitbarek, M. B., Tamir, B. (2013): Mycotoxines and/or Aflatoxines in Milk and Milk Products: Review. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS), Volume 4, No 1, 1-32.

## **THE DETECTION OF AFLATOXIN M<sub>1</sub> QUANTITY IN RAW MILK FROM THE PURCHASE AREA OF DAIRY MILKOS D.D. SARAJEVO**

### **Summary**

The research was carried out in order to examine the presence and levels of aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) in raw milk and determination of the chemical and hygienic parameters of raw cow's milk from the purchase area of dairy Milkos d.d. Sarajevo. The aim of this study was to determine the interconnection between the values of chemical and hygienic parameters in raw milk with the concentration of AFM<sub>1</sub> in tested samples. The samples were taken from 13 different purchase areas in BiH. In a period of one year (December 2013 - November 2014) three of 153 analyzed samples had a concentration of AFM<sub>1</sub> outside the legal regulation of BiH. According to the results of chemical and hygienic parameters of raw cow's milk, the average protein content in the examined samples was above 2,80 % and average milk fat content was above 3,20 %. It was determined that the average value of solids-non-fat content in ten analyzed areas, considering 13 tested areas, did not satisfy the lowest allowed value stated by Regulations on fresh raw milk quality in BiH (2011). The average values of somatic cell count in all tested ransom areas were above 400.000/mL and total bacterial count above 100.000/mL, except in the milk from larger farm in region Kalesija where the quality of extra class milk was determined. Pearson's correlation coefficient did not confirm a statistically significant correlation between the AFM<sub>1</sub> values and the chemical and hygienic parameters of raw milk.

**Key words:** *raw milk, aflatoxin M<sub>1</sub>, chemical composition, hygienic quality*

## UTJECAJ TEHNOLOŠKIH PARAMETARA NA ODRŽIVOST *Enterococcus faecium* U SVJEŽEM SIRU

Tijana Brčina<sup>1</sup>, Milica Vilušić<sup>1</sup>, Snježana Hodžić<sup>2</sup>, Amel Selimović<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

U ovom radu je proizveden svježi probiotički sir koji je tijekom 14 dana skladištenja sadržavao visoku koncentraciju vijabilnih stanica soja *Enterococcus faecium* EF1 (od  $10^6$  do  $10^9$  CFU/g). Navedena koncentracija predstavlja tehnološki minimum za probiotičke mliječne proizvode. Uzorci svježeg sira su proizvedeni od UHT mlijeka (0,9% m.m.) i kombinacije UHT mlijeka i sojinog napitka u različitim udjelima (10% i 15%). Fermentacija mlijeka je provedena na 25°C do postizanja pH 4,6. Cilj rada je bio ispitati utjecaj udjela sojinog napitka i procesa termalizacije gruš (60°C/3 min) na preživljavanje probiotičkog soja *Enterococcus faecium* EF1 kao samostalne probiotičke kulture ili u kombinaciji sa komercijalnom mješovitom kulturom laktokoka *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (1:1), sa ili bez dodatka prebiotika i na funkcionalna svojstva sira tijekom skladištenja. Na osnovu rezultata utvrđeno je da proces termalizacije gruš (60°C/3 min), negativno utječe na preživljavanje *Enterococcus faecium*. Kombinacija mikrobnih starter kultura je doprinijela kraćem vremenu fermentacije, dok je prebiotički pripravak Orafi<sup>®</sup>Synergy1 imao pozitivan utjecaj na rast i preživljavanje *Enterococcus faecium* u svježem siru tijekom skladištenja.

Ključne riječi: *Enterococcus faecium*, probiotički proizvod, sojin napitak, termalizacija, prebiotik

### UVOD

Bakterije mliječne kiseline su sastavni dio mnogih mliječnih proizvoda i uključene su u niz različitih biokemijskih procesa poput koagulacije proteina mlijeka, zakiseljavanje (acidifikacija), proizvodnje ekzopolisaharida, tvorbe tvari arome i osiguranje zdravstvenih svojstava (Golić i sur., 2013; Topisirović i sur., 2006). Zbog toga se *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp. najčešće koriste kao probiotički mikroorganizmi, ali i druge bakterije kao što je *Enterococcus* spp. (Tamime i sur., 2005). Terapijska djelovanja enterokoka se manifestiraju kroz probiotičku aktivnost, uključujući održavanje normalne crijevne mikroflore, a time i smanjenje gastrointestinalnih poremećaja, smanjenje netolerancije na laktozu, sniženje

---

<sup>1</sup> Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Faculty of Technology, University of Tuzla

<sup>2</sup> Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Tuzli, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Tuzla

Korespondencija: tijana.brcina@untz.ba

razine kolesterola, antikancerogenu aktivnost, korisno djelovanje imunološkog sustava i poboljšavanje nutritivne vrijednosti namirnica (Moreno i sur., 2006). Istraživanje koje su proveli Sarantinopoulos i sur. (2002) naglašava tehnološki značaj upotrebe sojeva *Enterococcus faecium* i predlaže upotrebu kao pomoćne starter kulture u proizvodnji sira. U Argentini, sprovedena studija sa 122 soja *E. faecium* pokazala je visok potencijal primjene ove netradicionalne starter kulture u proizvodnji domaćeg sira Tafi (Saavedra i sur., 2003). Upotreba soje kao sastojka u hrani dobiva na značajnosti bilo zbog njene zdravstvene vrijednosti ili zbog nekonzumiranja namirnica animalnog porijekla (Božanić, 2006). Soja je bogat izvor fitokemikalija, a mnogi od tih spojeva imaju važne pozitivne učinke na zdravlje ljudi i životinja (Mastrodi Salgado i Donado-Pestana, 2011). Funkcionalnost hrane može polaziti sa stajališta njenih hranjivih sastojaka, cjelovite namirnice ili dijetalnih svojstava (Tapsell, 2009). Upotreba alternativnih sastojaka kao što je sojin napitak nudi mogućnost smanjenog sadržaja laktoze u jogurtu (Zanhi i Jideani, 2012). Soin napitak (jednako kao i kravlje mlijeko) je izuzetno pogodan supstrat za rast bakterija mliječne kiseline, a posebno za rast bifidobakterija (Chou i Hou, 2000; Shimakawa i sur., 2003). Zbog sličnosti sa kravljim mlijekom, sojin napitak se može koristiti kao alternativa kravljem u proizvodnji mekih sireva (Li i sur., 2013; Liong i sur., 2009; Rinaldoni i sur., 2014). Sadrži otprilike isti postotak proteina kao i kravlje mlijeko. Soini proteini sadrže sve aminokiseline potrebne za ljudski organizam osim metionina i cisteina, a vrlo su bogati lizinom (kao i proteini sirutke). Oligosaharidi soje pripadaju i skupini prebiotika, a prema studiji koju su proveli Martinez - Villaluenga i sur. (2012) primijenjen je soj *Enterococcus faecium* primarno izoliran iz sirovog sojinog napitka u proizvodnji fementiranog sojinog napitka. Pomenuti napitak je imao koristan učinak u preventivnoj terapiji kardiovaskularnih bolesti. Soin napitak se može koristiti sam ili u kombinaciji sa različitim vrstama mlijeka za proizvodnju sireva. Metwalli i sur. (1982) su uradili modifikaciju postupka proizvodnje Domiati sira iz mješavine sojinog i punomasnog mlijeka. Njihovi rezultati su pokazali neke bitne razlike u svojstvima sira, kao posljedica korištenja sojinog napitka, osobito u sadržaju vlage, topivog nitrogena i titracijske kiselosti, a sojin napitak je najviše utjecao na okus, koji se poboljšao tijekom zrenja. Autori ovog rada su konstatalirali da sojin napitak aktivira mliječnu kiselinu koju produciraju bakterije, kao i proteoličke enzime prisutne u siru. Mješavina sojinog napitka i kravljeg mlijeka je korištena i za proizvodnju kiselnog sira (grčki jogurt) i može se smatrati funkcionalnom hranom zbog udjela proteina biljnog i animalnog porijekla sa visokom biološkom vrijednošću (Lee i sur., 2015). Prebiotici su kategorija nutritivnih komponenata koje su zajedno grupirane i ne nužno slične strukture, ali sa sposobnošću da pospješuju rast korisnih (probiotičkih) crijevnih bakterija (Gustaw i sur., 2011). Dnevna doza prebiotika ne određuje učinak prebiotika. Najpoznatijim prebionicima se smatraju fruktooligosaharidi (FOS) i inulin (Buriti i sur., 2007, Cardarelli i sur., 2007). Inulin selektivno promovira rast i aktivnost korisnih bakterija, uglavnom bifidobakterija, potiskuje štetne bakterije (klostridije) i tako ostvaruje „prebiotički“ efekat (Gibson i Roberfroid, 1995;

Shanahan, 2000). Osim blagotvornih učinaka na zdravlje, inulin ima i zanimljiva tehnološka svojstva kao niskokalorično sladilo, zamjena za masti i sposobnost da modificira strukturu (Tunland i Meyer, 2002). Aryana i sur. (2007) su ispitali utjecaj dužine lanca inulina na rast *Lactobacillus acidophilus* u jogurtu, pri čemu su primjetili da je dužina lanca inulina imala pozitivan učinak na brojnost sojeva roda *Lactobacillus*. Uzorci jogurta sa inulinom dužeg lanca su pokazali i manju sinerezu i bolju teksturu. Dodatak 5% inulina u svježi sir Kashar sa niskim udjelom masti poboljšao je teksturu i senzorska svojstva (Koca i Metin, 2004). U ovoj studiji, sirevi sa niskim udjelom masti sa inulinom i punomasni sir nisu bili tako tvrdi ili ljepljivi kao posni sir i imali su bolju topljivost. Modzelewska-Kapituła i sur. (2007) su ispitali utjecaj inulina i potencijalnog probiotika *Lactobacillus plantarum* 14 na mikrobiološki i senzorski kvalitet mekog sira, čak i nakon skladištenja u trajanju od 45 dana. Prema njima, prisustvo inulina u siru je imalo pozitivan utjecaj na senzorska svojstva kao i na brojnost probiotičkih bakterija ( $p < 0,05$ ).

## MATERIJALI I METODE

Svježi probiotički sir je proizveden u laboratoriju za Prehrambenu tehnologiju na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Tuzli. Za proizvodnju svježeg probiotičkog sira korišteno je UHT mlijeko sa 0,9% m.m. proizvođača „Meggle“ samo i u kombinaciji sa 10% i 15% sojinog napitka proizvođača „Alpro“. Za izravnu inokulaciju u mlijeko za proizvodnju sira korištene su liofizirane (FD-DVS, Frozen dried Direct Vat Set) starter kulture (Sacco Clerici, Italija):

1. Lyofast EF1, koju čine bakterije *Enterococcus faecium* (stepen inokulacije  $2,5 \times 10^6$  CFU/ml mlijeka u uzorcima A1-A6 i B1-B6)
2. Lyofast MWO 030 : Lyofast EF1 = 1:1 (*Enterococcus faecium* EF1, stepšem inokulacije  $1,25 \times 10^6$  CFU/ml mlijeka u uzorcima C1-C6 i D1-D6).

Inače, Lyofast MWO 030 se sastoji od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Kao prebiotik je korišten Orafti® Synergy1 (BENEO-Orafti, Belgija), inulin u prahu koji je dobijen iz cikorije, sa posebnom distribucijom stupnja polimerizacije (DP-degree of polymerisation). Orafty Synergy1 je kombinacija molekula inulina iz cikorije, određene dužine lanca, obogaćen određenom frakcijom oligofruktoze koji je proizveden djelomičnom enzimskom hidrolizom inulina porijeklom iz cikorije. Orafti® Synergy1 je sastojak hrane koji u svom sastavu sadrži inulin, oligofruktozu, fruktozu, glukozu i saharozu.

Svježi probiotički sirevi su proizvedeni od UHT mlijeka (0,9% m.m.) i kombinacije UHT mlijeka (0,9% m.m.) sa 10% sojinog napitka (uzorci A2, A5, B2, B5, C2, C5, D2 i D5) i 15% sojinog napitka (uzorci A3, A6, B3, B6, C3, C6, D3 i D6). Uzorci mlijeka su zagrijani na temperaturu inokulacije i naciepljeni sa starter kulturama u koncentracijama prema specifikaciji proizvođača. Fermentacija je provedena na 25°C do postizanja pH 4,6, odnosno do nastanka čvrstog gruša. Gruš je zatim izrezan na kockice veličine 2 cm. Uzorci sirnog gruša A1-A3, B1-B3, C1-C3 i D1-D3 su nakon

rezanja gruša podvrgnuti cijedenju u platnenim većicama na sobnoj temperaturi, dok su uzorci A4-A6, B4-B6, C4-C6, D4-D6 prvo podvrgnuti procesu termalizacije (60°C/3 min). U uzorke B1-B6 i D1-D6 nakon cijedenja je dodat probiotički supstrat Orafti® Synergy1 (2,5g/100g sira).

Oznake uzoraka, udio UHT mlijeka i sojinog napitka, vrsta mikrobnog kulture, uvjeti termalizacije, dodatak Orafti® Synergy1 u proizvodnji svježeg probiotičkog sira pregledno su dati u tablici 1.

Tablica 1. Uzorci probiotičkog svježeg sira

Table 1. Samples of probiotic fresh cheese

Uzorak sira	UHT mlijeko (vol udio, %)	Sojin napitak (vol udio, %)	Starter kultura	Termalizacija 60°C/3 min	Orafti® Synergy1 2,5g/100g sira
A1	100	-		-	-
A2	90	10		-	-
A3	85	15		-	-
A4	100	-		+	-
A5	90	10	Lyofast EF1	+	-
A6	85	15		+	-
B1	100	-		-	+
B2	90	10		-	+
B3	85	15		-	+
B4	100	-		+	+
B5	90	10	+	+	
B6	85	15	+	+	
C1	100	-		-	-
C2	90	10	Lyofast MWO 030:Lyofast EF1 =1:1	-	-
C3	85	15		-	-
C4	100	-		+	-
C5	90	10		+	-
C6	85	15		+	-
D1	100	-		-	+
D2	90	10	-	+	
D3	85	15	-	+	
D4	100	-	+	+	
D5	90	10	+	+	
D6	85	15	+	+	

### Mikrobiološka analiza

Određivanje broja bakterija *Enterococcus faecium* izvršeno je, prema Anon (2003), Domig i sur. (2003) te Downes i Ito (2001), zasijavanjem na selektivnoj CATC (Citate-Azide-Tween-Carbonate Agar) podlozi za enterokoke (Sifin, Njemačka).

Ukupan broj naraslih enterokoka na selektivnoj CATC podlozi određen je brojanjem pojedinačnih kolonija u razrjeđenju na kojima je broj poraslih kolonija bio između 20 i 200. Inače, raspon vrijednost odgovara statistički relevantnom području za određivanje broja mikroorganizama koji formiraju kolonije (CFU/ ml ili g). Broj enterokoka u 1 ml, odnosno 1 g sira određen je po formuli:

$$CFU = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{volumen inokuluma(ml)} * \text{faktor razrjedjenja}}$$

Mikrobiološka analiza uzoraka probiotičkog svježeg sira je rađena 1. i 14. dan nakon proizvodnje i skladištenja na temperaturi +4°C.

### Statistička analiza

Statistička analiza je urađena upotrebom SPSS softvera (verzija 22). T test je korišten za testiranje značajnosti razlika između aritmetičkih sredina proizvedenih uzoraka. Duncan test je korišten da bi se odredilo koje razlike između tretmana su statistički značajne ( $p < 0,05$ ).

## REZULTATI I DISKUSIJA

Ukupan broj živih probiotičkih mikroorganizama *Enterococcus faecium* u proizvedenim uzorcima netermaliziranog i termaliziranog svježeg sira je prikazan u tablicama 2 i 3. T test je prikazan u tablicama 4-5.

Tablica 2. Ukupan broj *Enterococcus faecium* (CFU/g) u netermaliziranim uzorcima svježeg sira tijekom skladištenja

Table 2. CFU/g of *Enterococcus faecium* in not termalized samples of fresh cheese during storage

Uzorak	Dani skladištenja	
	1 dan	14 dan
A1	1,05x10 <sup>9(1)</sup>	5,55x10 <sup>8(1)</sup>
A2	2,37x 10 <sup>9(2)</sup>	1,02x10 <sup>8(1)</sup>
A3	3,10x10 <sup>9(5)</sup>	2,96x10 <sup>9(3)</sup>
B1	2,84x10 <sup>9(4)</sup>	5,40x10 <sup>8(1)</sup>
B2	2,93x10 <sup>9(4)</sup>	2,71x10 <sup>9(3)</sup>
B3	2,63x10 <sup>9(3)</sup>	1,39x10 <sup>9(2)</sup>
C1	2,55x10 <sup>8(2)</sup>	1,27x10 <sup>7(1)</sup>
C2	2,62x10 <sup>8(2)</sup>	1,43 x10 <sup>8(4)</sup>
C3	2,80x10 <sup>8(2)</sup>	1,00x10 <sup>8(3)</sup>
D1	1,80x10 <sup>8(1)</sup>	2,00x10 <sup>7(2)</sup>
D2	2,99x10 <sup>8(3)</sup>	1,02x10 <sup>8(3)</sup>
D3	3,00x10 <sup>8(3)</sup>	1,56x10 <sup>8(5)</sup>



<sup>1,2,3,4,5</sup>- Srednje vrijednosti u istom stupcu, s različitim superskriptom, statistički su signifikanti ( $p < 0,05$ )

Tablica 3. Ukupan broj *Enterococcus faecium* (CFU/g) u termaliziranim uzorcima svježeg sira

Table 3. CFU/g of *Enterococcus faecium* in termalized samples of fresh cheese during storage

Uzorak	Dani skladištenja	
	1 dan	14 dan
A4	$4,35 \times 10^{7(1)}$	$3,10 \times 10^{7(1)}$
A5	$2,80 \times 10^{8(2)}$	$6,00 \times 10^{8(3)}$
A6	$1,83 \times 10^{9(4)}$	$1,07 \times 10^{9(4)}$
B4	$1,07 \times 10^{9(3)}$	$3,30 \times 10^{8(2)}$
B5	$2,11 \times 10^{9(2)}$	$1,02 \times 10^{9(4)}$
B6	$2,80 \times 10^{9(6)}$	$1,54 \times 10^{9(5)}$
C4	$9,00 \times 10^{7(1)}$	$1,20 \times 10^{7(1)}$
C5	$1,08 \times 10^{8(1)}$	$4,40 \times 10^{7(3)}$
C6	$1,80 \times 10^{8(3)}$	$1,20 \times 10^{8(5)}$
D4	$1,34 \times 10^{8(2)}$	$2,10 \times 10^{7(2)}$
D5	$2,80 \times 10^{8(4)}$	$1,18 \times 10^{8(5)}$
D6	$2,90 \times 10^{8(4)}$	$1,10 \times 10^{8(4)}$

<sup>1,2,3,4,5</sup>- Srednje vrijednosti u istom stupcu, s različitim superskriptom, statistički su signifikanti ( $p < 0,05$ )

*Enterococcus faecium* je bakterijska vrsta koja se smatra sastavnim dijelom flore probavnog trakta ljudi i životinja. Jedan od osnovnih problema sa probiotičkim bakterijama je što se ne zadržavaju dovoljno dugo u crijevima. Razlog zbog kojeg se probiotici, koji sadrže *Enterococcus faecium*, smatraju efikasnim je njegova sposobnost zadržavanja u crijevima. U uzorcima netermaliziranog svježeg sira broj živih probiotičkih bakterija se kretao od  $1,80 \times 10^8$  do  $3,1 \times 10^9$  CFU/g, dok je u uzorcima termaliziranog sira bio od  $1,34 \times 10^7$  do  $2,8 \times 10^9$  CFU/g.

Prema Šušković i sur. (2009), svi proizvedeni uzorci zadovoljavali su tehnološki zahtjev za probiotičke sojeve, odnosno imali su visoku razinu broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu od  $10^6$  do  $10^8$  CFU/g.

Promatrajući dobijene rezultate, ukupan broj živih *Enterococcus faecium* u uzorcima netermaliziranog svježeg sira bio je veći u odnosu na uzorke termaliziranog svježeg sira.

Tijekom skladištenja u trajanju od 14 dana broj živih enterokoka u svim uzorcima je opadao, ali je i dalje bio u granicama tehnološkog zahtjeva za probiotički proizvod. Pri proizvodnji uzoraka netermaliziranog i termaliziranog sira korištene su različite koncentracije *Enterococcus faecium*, tj. *Enterococcus faecium* EF1 za inokulaciju kao mono starter kultura (koncentracija *Enterococcus faecium* za inokulaciju je bila

2,5x10<sup>6</sup> CFU/mL) i u kombinaciji sa Lyofast MWO 030 u omjeru 1:1, gdje je koncentracija *Enterococcus faecium* za inokulacija je bila 1,25x10<sup>6</sup> CFU/mL.

Tablica 4. Testiranje statistički značajne razlike aritmetičkih sredina termaliziranih i nermaliziranih uzoraka sira

Table 4. Testing statistically significant differences arithmetic meanings between thermalized and not thermalized cheese samples

Starter kultura	Dani sklad.	Parovi	Sr. vrijednost	St. devijacija	St. greška	p – nivo sign.
Lyofast EF1	1	1 - 2	-1,1310·10 <sup>8</sup>	7,9399·10 <sup>8</sup>	3,2414·10 <sup>8</sup>	0,017
	14	1 - 2	-6,1100·10 <sup>8</sup>	9,7749·10 <sup>8</sup>	3,9905·10 <sup>8</sup>	0,186
LyofastMWO 030:LyofastE1	1	1 - 2	-8,2333·10 <sup>7</sup>	6,7594·10 <sup>7</sup>	2,7595·10 <sup>7</sup>	0,031
	14	1 - 2	-1,8116·10 <sup>7</sup>	4,6054·10 <sup>7</sup>	1,8801·10 <sup>7</sup>	0,380

1-termalizirani uzorci; 2-ne termalizirani uzorci

Tablica 5. Testiranje statistički značajne razlike aritmetičkih sredina između uzorka sira sa dvije različite koncentracije *Enterococcus faecium*

Table 5. Testing statistically significant differences arithmetic meanings between cheese samples with two different concentration *Enterococcus faecium*

	Dani sklad.	Parovi	Sr. vrijednost	St. devijacija	St. greška	p – nivo sign.
Netermalizirani uzorci sira	1	1 - 2	2,22400·10 <sup>9</sup>	7,4534·10 <sup>8</sup>	3,0428·10 <sup>8</sup>	0,001
	14	1 - 2	1,28722·10 <sup>9</sup>	1,1940·10 <sup>9</sup>	4,8746·10 <sup>8</sup>	0,046
Termalizirani uzorci sira	1	1 - 2	1,17525·10 <sup>9</sup>	9,9920·10 <sup>8</sup>	4,07924·10 <sup>8</sup>	0,035
	14	1 - 2	6,94333·10 <sup>8</sup>	5,0465·10 <sup>8</sup>	2,05070·10 <sup>8</sup>	0,020

1 - Lyofast EF1; 2- Lyofast MWO 030:Lyofast EF1 = 1:1

Tablica 4 pokazuje da postoji statistički značajna razlika aritmetičkih sredina termaliziranih i nermaliziranih uzoraka sira za 1. dan skladištenja ( $p < 0,05$ ). Kod svih proizvedenih uzoraka svježeg sira (tablica 5), tijekom čitavog perioda skladištenja, postoji statistički značajna razlika aritmetičkih sredina ( $p < 0,05$ ). Svi uzorci svježeg sira posjedovali su potrebni probiotički minimum živih bakterija.

Tijekom proizvodnje sira, korišten je i sojin napitak u kombinaciji sa kravljim mlijekom, u udjelima 10% i 15% na ukupnu količinu mlijeka. Zamjena dijela proteina animalnog porijekla sa biljnim proteinima imala je utjecaja na ukupan broj probiotičkih bakterija u svježem siru, ali nije bila statistički značajna. Sojin napitak predstavlja dobru podlogu za rast i razvoj *Enterococcus faecium* kao probiotičke bakterije. To može biti posljedica sposobnosti *Enterococcus faecium* da proizvodi kiselinu iz galaktoze, koja je produkt hidrolize rafinoze (Tamang, 2010), što upućuje na mogućnost upotrebe *Enterococcus faecium* za fermentaciju sojinog napitka. Oligosaharidi pripadaju skupini prebiotika i kao takvi potiču rast i razmnožavanje

bifidobakterija u debelom crijevu te imaju blagotvoran učinak na njegovo zdravstveno stanje kao i na prevenciju razvoja karcinoma (Božanić, 2006). Od netopljivih ugljikohidrata u soji su još prisutni celuloza, hemiceluloza te pektin. Ugljikohidrati soje spadaju u kategoriju dijetetskih vlakana (Liu, 1997). Smatra se da unos vlakana stimulira imunološki sustav, smanjuje rizik od raka te pomaže u održanju zdravlja. Sojini netopljivi ugljikohidrati usporavaju apsorpciju glukoze u krvotok, odnosno pridonose niskom glikemijskom indeksu soje i njezinih proizvoda što ih čini namirnicama povoljnim i za osobe koje boluju od šećerne bolesti (Anderson i sur., 1999). Probiotički soj *Enterococcus faecium* je kombiniran sa prebiotičkim supstratom, kako bi se dobio i pojačao simbiotički učinak. Evidentno je da je tijekom skladištenja došlo do smanjenja broja *Enterococcus faecium* u svim uzorcima probiotičkog svježeg sira, ali se zadržao probiotički minimum u svim uzorcima sira. Duncanov test je pokazao statistički značajne razlike u odnosu na broj probiotičkih bakterija u uzorcima svježih sireva. Kod uzoraka netermaliziranih svježih sireva skupine C i D (tablica 2.) koji su proizvedeni sa kombinacijom startera Lyofast MWO 030 i Lyofast EF1, uzorci sa dodatkom inulina su se pokazali boljim u pogledu broja *Enterococcus faecium*, kao probiotičkog mikroorganizma. Termalizirani uzorci (tablica 3) sira sa dodatkom inulina bili su 14. dan bolji od uzoraka sira bez prebiotika. Na osnovu rezultata, može se reći da je prebiotički supstrat Orafit® Synergy1 jako dobra „hrana“ za *Enterococcus faecium*. Kod netermaliziranih sireva (tablica 2.), učinak prebiotičkog supstrata je izraženiji kod uzoraka koji su proizvedeni sa kombinacijom starter kultura Lyofast MWO 030 i Lyofast EF1 u omjeru 1:1. Ovaj učinak je još izraženiji kod termaliziranih sireva (tablica 3.) i to kod svih uzoraka, bez obzira da li se prilikom fermentacije koristio jedna starter kultura ili kombinacija. Svaki uzorak sira sa dodatkom inulina pokazao se boljim od svog prethodnika, tj, od uzoraka bez inulina. Ujedno inulin je potpomogao održanju probiotičkog minimuma tijekom skladištenja. Ovaj proizvod je korišten u kliničkom ispitivanju koji je pokazao da dnevni unos od 8 g značajno povećava apsorpciju kalcija kod ljudi. Evidentan je i pozitivan utjecaj sojinog napitka, kao prebiotika, pri proizvodnji ovakog tipa svježeg sira, što je potvrđeno i Duncan-ovim testom. Sojin napitak imao je pozitivan utjecaj na probiotičke bakterije (Liong i sur., 2009, Lee i sur., 2015). Veći udjel sojinog napitka, kao supstrata, pozitivno je djelovao na rast i razvoj probiotičkog soja *Enterococcus faecium*. Svi proizvedeni uzorci svježeg sira su sadržavali više od  $10^7$  CFU/g *Enterococcus faecium* tijekom skladištenja. Stoga bi probiotički učinak svježeg sira mogao biti predviđen održavanjem soja *Enterococcus faecium* tijekom skladištenja.

## ZAKLJUČAK

Primjenom odabranog tehnološkog procesa opisanog u radu proizveden je probiotički svježi sir upotrebom UHT mlijeka i kombinacijom UHT mlijeka i sojinog napitka, dvije koncentracije probiotičkog mikroorganizma *Enterococcus faecium*, dvije vrste mikrobnih starter kultura Lyofast EF1 i Lyofast MWO 030:Lyofast EF1=1:1. U

uzorcima netermaliziranog svježeg sira broj živih probiotičkih bakterija se kretao od  $1,05 \times 10^9$  do  $4,1 \times 10^9$  CFU/g, dok je u uzorcima termaliziranog sira bio od  $1,34 \times 10^7$  do  $2,8 \times 10^9$  CFU/g. Tijekom skladištenja u trajanju od 14 dana broj živih enterokoka u svim uzorcima je opadao, ali je i dalje bio u granicama tehnološkog zahtjeva za probiotički proizvod. Utjecaj koncentracije *Enterococcus faecium* je statistički značajan tijekom skladištenja ( $p < 0,05$ ). Svi uzorci posjeduju potreban probiotički minimum živih bakterija. Zamjena dijela proteina animalnog sa proteinima biljnog porijekla imala je utjecaja na ukupan broj probiotičkih bakterija u svježem siru. Dobiveni rezultati pokazali su da oligosaharidi iz sojinog napitka, pokazuju visok potencijal rasta i za *Enterococcus faecium*. Dodatak prebiotika Orafti®Synergy1 u grušu, imao je pozitivan utjecaj na rast i razmnožavanje probiotičkog mikroorganizma *Enterococcus faecium*. Također, prebiotik je potpomogao održanju probiotičkog minimuma tijekom skladištenja.

## LITERATURA

- Anderson, J. J. B., Anthony, M., Messina, M., Garner, S. C. (1999): Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutrition Research Reviews*, 12(1): 75-116.
- Anon. (2003): Citrate azide tween carbonate (CATC) agar. *Progres in Industrial Microbiology*, 37: 443-445.
- Aryana, K. J., Plauche, S., Rao, R. M., McGrew, P., Shah, N. P. (2007): Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 72(3): 79-84.
- Božanić, R. (2006): Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo*, 56(3): 233-254.
- Buriti, F. C. A., Cardarelli, H. R., Filisetti, T. M. C. C., Saad, S. M. I. (2007): Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 104(4): 1605-1610.
- Cardarelli, H. R., Saad, S. M. I., Gibson, G. R., Vulevic, J. (2007): Functional petisuisse cheese: measure of the prebiotic effect. *Anaerobe*, 13(5-6): 200-207.
- Chou, C. C., Hou, J. W. (2000): Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2-3): 113-121.
- Domig, K. J., Mayer, H. K., Kneifel W. (2003): Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3): 147-164.
- Downes, F. P., Ito, K. (2001): Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed., American Public Health Association, Washington.

- Gibson, G., Roberfroid, M. B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Golić, N., Cadež, N., Terzić-Vidojević, A., Suranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Sušković, J., Raspor, P., Topisirović, L. (2013): Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2): 294-300.
- Gustaw, W., Kordowska-Wiater, M., Koziół, J. (2011): The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(4): 455-466.
- Koca, N., Metin, M. (2004): Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(4): 365-373.
- Lee, N.-K., Mok, B. M., Jeewanthi, R. K. C., Yoh Chang Yoon, Y.C., Hyun-Dong Paik, H. D. (2015): Physicochemical and Microbiological Properties of Yogurt-cheese Manufactured with Ultrafiltrated Cow's Milk and Soy Milk Blends. *Korean Journal of Food Science Animal Resource*, 35(2): 205-210.
- Li G., Xia Y., Zhou L., Xie J. (2013): Evaluation of the rheological, textural, microstructural and sensory properties of soy cheese spreads. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4): 429-439.
- Liong M. T., Easa A. M., Lim P. T., Kang J. Y. (2009): Survival, growth characteristics and bioactive potential of *Lactobacillus acidophilus* in a soy-based cream cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8): 1382-1391.
- Liu, K. (1997): *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*, International Thomson Publishing, New York.
- Martinez-Villaluenga, C., Torino, M. I, Martín, V., Arroyo, R., Garcia-Mora, P., Estrella Pedrola, I., Vidal-Valverde, C., Rodriguez, J.M., Frias, J. (2012): Multifunctional properties of soy milk fermented by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41): 10235-44.
- Mastrodi Salgado, J., Donaldo-Pestana, C. M. (2011): Soy as a Functional Food. In: *Soybean and Nutrition*. Ed: El-Shemy, H., ISBN 978-953-307-536-5, InTech, <https://www.intechopen.com/books/soybean-and-nutrition/soy-as-a-functional-food>
- Metwalli, N. H., Shalabi, S. I., Zahran, A. S., El-Demerdash, O. (1982): The use soybean milk in soft cheese making II. Organoleptical and chemical properties of Domiati cheese made from mixture of soybean milk and whole milk. *International Journal of Food Science Technology*, 17(3): 297-305.
- Modzelewska-Kapituła, M., Kłębukowska, L., Kornacki, K. (2007): Influence of inulin and potentially probiotic *Lactobacillus plantarium* strain on

- microbiological quality and sensory properties of soft cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57: 143-146.
- Moreno, M. R. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006): The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1): 1-24.
- Rinaldoni A. N., Palatnik D. R., Zaritzky N., Campderrós M. E. (2014): Soft cheese-like product development enriched with soy protein concentrates. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1): 139-147.
- Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., de Valdez, G. F. (2003): Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3): 241-245.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulous, G., Tsakalidou, E. (2002): Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2): 93-105.
- Shanahan, F. (2000): Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V: mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278(2): 191-196.
- Shimakawa, Y., Matsubara, S., Yuki, N., Ikeda, M., Ishikawa, F. (2003): Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2): 131-136.
- Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009): Probiotički koncept-probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 4(3-4): 77-84.
- Tamang, J. P. (2010): *Himalayan Fermented Food: Microbiology, Nutrition and Ethnic Values*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Tamime, A. Y., Saarela, M., Korslund Søndergaard, A., Mistry, V. V., Shah, N. P. (2005): Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-Organisms in Dairy Products. In: *Probiotic Dairy Products*, Blackwell Publishing, Oxford, 39-72.
- Tapsell, L. C. (2009): Nutrients, foods and diets: Challenging functional food development. *Australian Journal of Dairy Technology*, 64(1): 5-7.
- Topisirović, L., Kojić, M., Fira, D., Golić, N., Strahinić, I., Lozo, J. (2006): Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3): 230-235.
- Tungland, B. C., Meyer, D. (2002): Non digestible oligo-and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3): 90-109.

Zanhi, N. K., Jideani, I. A. (2012): Physico-chemical and sensory qualities of soy and milk solids fortified low fat yoghurt. *African Journal of Agriculture Research*, 7(38): 5336-5343.

## **INFLUENCE OF PRODUCTION PARAMETERS ON SUSTAINABILITY OF THE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* IN FRESH CHEESE**

### **Summary**

In this work, fresh probiotic cheese were produced which during the 14 days of storage, contained a high concentration of viable cells of *Enterococcus faecium* strain (from  $10^6$  to  $10^9$  CFU/g). This concentration represents the technological minimum for probiotic dairy products. Fresh cheese samples were produced from UHT milk (0.9% f.m.) and combination UHT milk (0.9% f.m.) and soya drink of different proportions (10% and 15%). Fermentation of milk was carried out at 25°C to reach a pH of 4.6. The aim of this study was to examine the effect of the soybean share and the thermalization process (60°C/3 min) on the survival of the probiotic strain of *Enterococcus faecium* EF1 as a single probiotic culture or in combination with the commercial mixed culture of lactococcal *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (1:1), with or without the addition of prebiotics to the functional properties of the cheese during storage. Based on the results, the thermalization process (60°C/3 min) has been shown to negatively influence the time of fermentation. The combination of microbial starter cultures contributed to shorter fermentation times, while the prebiotic preparation Orafti@Synergy1 has a positive effect on the growth and survival of *Enterococcus faecium* in fresh cheese during storage.

Key words: *Enterococcus faecium*, probiotic product, soy drink, thermalization, prebiotic

## FIZIČKO-HEMIJSKA I SENZORNA SVOJSTVA PILEĆIH PLJESKAVICA SA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA NaCl

Sabina Operta<sup>1</sup>, Ibrahim Ganjgo<sup>1</sup>

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

### Rezime

Cilj rada bio je ispitati fizičko-hemijska i senzorna svojstva pilećih pljeskavica s različitim koncentracijama dodate soli (0,9; 1,2%; 1,5%).

Dobijeni rezultati su pokazali da su postojale značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u sadržaju masti, NaCl-a, pH i  $b^*$  vrijednosti između tri varijante svježih, kao i između tri varijante prženih pilećih pljeskavica. Sadržaj vode svježih i prženih pljeskavica bio je ujednačen bez značajnih razlika ( $p > 0,05$ ). Nisu postojale značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u sadržaju proteina,  $L^*$  i  $b^*$  vrijednost svježih pljeskavica, kao i značajne razlike u sadržaju pepela prženih pilećih pljeskavica. Tokom prženja došlo je do povećanja sadržaja proteina, pepela, NaCl-a, porasta pH i  $b^*$  vrijednosti, te smanjenja  $L^*$  vrijednosti kod svih varijanti pilećih pljeskavica. Postupak prženja izazvao je povećanje  $a^*$  vrijednosti kod pilećih pljeskavica s 0,9% i 1,2% soli, a smanjenje kod pilećih pljeskavica s 1,5% soli. Pileće pljeskavice s 1,5% soli imale su značajno veći ( $p < 0,05$ ) prinos prženjem i stepen zadržavanja vode u odnosu na varijantu s 0,9% soli, ali ne u odnosu na varijantu s 1,2% soli. Sve varijante pilećih pljeskavica značajno su se razlikovale ( $p < 0,05$ ) u stepenu zadržavanja masti, ali ne i u smanjenje prečnika tokom prženja ( $p > 0,05$ ). Postojale su značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u ocjenama senzornih svojstava između tri varijante pilećih pljeskavica, izuzev okusa i teksture. Pileće pljeskavice s 1,2% dobile su najviše ocjene za vanjski izgled i boju, a pileće pljeskavice s 1,5% soli za teksturu, okus, aromu i ukupan dojam. Generalno gledajući, pileće pljeskavice s 1,2% i 1,5% soli su bile prihvatljivije za većinu ispitivanih svojstva u odnosu na pileće pljeskavice s 0,9% dodate soli.

Ključne riječi: *pileće pljeskavice, koncentracija NaCl, svojstva kvaliteta*

### UVOD

Burger ili hamburger je jedan od najpopularnijih oblikovanih mesnih proizvoda koji se najčešće proizvodi od govedeg mesa. Pljeskavica se smatra produžetkom burgera, jer sadrži više dodataka, te se naziva i „siromašnim burgerom“ (Operta, 2016). Pored govedeg burgera i pljeskavica, koji drži primat u proizvodnji, sve više se proizvode burgeri i pljeskavice od pilećeg mesa.

<sup>1</sup> Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu: Zmaja od Bosne, Sarajevo, Bosna i Hercegovina  
Korespondencija: Sabina Operta, s.operta@ppf.unsa.ba



U proizvodnji pilećih pljeskavica mogu se upotrijebiti različiti dijelovi pilećeg trupa: batak, karabatak, s kožom ili bez kože, kao i emulzije pilećih kožica, mehanički otkoštено pileće meso (MOM) i dr. Prema Anonimus (2013) pljeskavica je poluproizvod dobiven oblikovanjem raznih vrsta usitnjenog svježeg mesa domaćih papkara i dodatnih sastojaka koji može da sadrži do 10% usitnjenog crnog luka, sadržaj ukupnih proteina mora biti veći od 14%, a sadržaj proteina vezivnog tkiva u ukupnim proteinima mesa ne smije biti veći od 10%. Na kvalitet pilećih pljeskavica utiču mnogi činioci: odabir i kvalitet sirovine i sastojaka, način toplotne obrade, gubitak težine tokom toplotne obrade, itd. Glavni dodatak u proizvodnji pilećih pljeskavica je NaCl (kuhinjska so). NaCl ima značajne uloge u mesnom proizvodu kao što su: pružanje slanog okusa, potpomaganje ekstrakcije solubilnih proteina, doprinos vezivanju i zadržavanju vode, uticaj na teksturu, pružanje stabilnosti i konzervacije (Desmond, 2006; Yogesh i dr., 2013). Kuhinjska so (NaCl) je izvor iona natrija i hlora, koji sudjeluju u brojnim fiziološkim procesima u ljudskom organizmu. Prekomjerni unos kuhinjske soli povezan je prvenstveno s pojavom arterijske hipertenzije i povećanim rizikom od bolesti srca i krvnih sudova. Stoga je prisustvo soli u mesnim proizvodima predmet stalne rasprave iz zdravstvenih razloga (Desmond, 2006). U svojim istraživanjima Carvalho i dr. (2015) su ispitali kvalitet govedih burgera sa smanjenim sadržajem natrija za 25% i 50%, te dobili rezultate koji su pokazali da burgeri s manjim sadržajem natrija za 25%, imaju manje masnu i slanu aromu, a veći osjet na aromu začina u odnosu na kontrolne uzorke. Pored soli u pileće pljeskavice dodaju se dodaci koji imaju ulogu da zadrže vodu poput fosfata i natrij bikarbonata. Petracci i dr. (2012) su očili da su marinade koje su sadržavale kombinaciju natrij bikarbonata i soli imale bolji prinos proizvoda, što je posljedica učinka alkalizacije i povećanja pH vrijednosti, a time i većeg zadržavanja vode u području oko miofibrila. Tokom toplotne obrade pilećih pljeskavica dolazi do gubitka težine i promjena fizikalno-hemijskih svojstava koje nastaju usljed isparavanja vode i otapanja masti (Alakali i dr., 2010). Na zadržavanje vode u pilećim pljeskavicama pored soli, fosfata i natrij bikarbonata, veliki uticaj ima i sadržaj proteina koji imaju ulogu da vežu vodu i oblažu čestice masti. Barbut (2002) navodi da tokom toplotne obrade mesnih proizvoda, proteini mesa koaguliraju, čime se obezbjeđuju zadržavanje vode i čestica masnoće. Nkrumah i Akwetey (2018) navode da kapacitet zadržavanja vode zavisi prvenstveno od denaturacije/agregacije aktina i miozina. Na zadržavanje vode utiče i pH vrijednost. Prema navodima Lawrie i Ledward (2006) niska pH vrijednost mesnih proizvoda povezuje se s niskim kapacitetom držanja vode. Pileće pljeskavice podvrgavaju se raznim vidovima toplotne obrade (roštiljanje, prženje, pečenje) pri čemu dolazi do promjena u koncentraciji hemijskim materija. Karakteristike toplotne obrade kao što su: prinos, stepen zadržavanja vode i masti i smanjenje prečnika su najvažniji faktori za prehrambenu industriju u predviđanju promjena proizvoda tokom toplotne obrade (Serdaroğlu i dr., 2017). Denaturacija proteina, oslobađanje vode i masti iz proizvoda su glavni uzroci smanjenja prečnika proizvoda tokom toplotne obrade (Soltanizadeh i Ghiasi – Esfahani, 2014). Boja mesnog proizvoda je jedan od

najvažnijih atributa kvaliteta. Tokom toplotne obrade dolazi do promjena boje mesnih proizvoda usljed formiranja smeđeg pigmenta.

Cilj ovog rada bio je ispitati uticaj različitih koncentracija NaCl-a na fizička, hemijska i senzorna svojstva različitih varijanti pilećih pljeskavica prije i poslije prženja.

## MATERIJAL I METODE RADA

### Proizvodnja pilećih pljeskavica

Osnovna sirovina za proizvodnju pilećih pljeskavica bile su pileće noge (batak s karabatkom) s kožicom. Prvo su kosti pilećih nogu ručno iskoštene. Ukupno je iskošteno 9 kg mesa. Iskošteno meso zajedno sa kožicom usitnjeno je na električnom uređaju za usitnjavanje na promjer 4,5 mm. Usitnjena masa prebačena je u mješalicu gdje su dodati: crveni luk (1,00%), bijeli luk (0,20%), crni, usitnjeni biber (0,15%), natrij bikarbonat (0,20%) i malo vode. Nakon kratkotrajnog miješanja smjesa je podijeljena na tri varijante (po 3,00 kg). U svaku varijantu dodata je različita koncentracija soli, kako slijedi: 0,9% (PP1), 1,20% (PP2) i 1,5% (PP3). Nastavljeno je pojedinačno miješanje za svaku varijantu, do momenta kada se dobio blagi stepen povezanosti i sjaja smjese. Nakon miješanja, smjesa je u plastičnim posudama, pokrivenim folijom pohranjena u frižider narednih 24 sata na temperaturu do 4 °C. Poslije odležavanja, od smjese pomoću dlanova ruku, prvo su oblikovane loptice, prosječne mase 120 g - 125 g, koje su potom stavljane u plastični kalup za oblikovanje pljeskavica. Nakon oblikovanja pljeskavice u kalupu, pljeskavice su pakovane u foliju i stavljene na hlađenje u frižider pri temperaturi do 4 °C, do analiza.

### Metode rada

Analize fizičko-hemijskih svojstava pilećih pljeskavica rađene su na svježim i na prženim pljeskavicama od tri do pet ponavljanja u zavisnosti od ispitivanog svojstva. Na svježim i na prženim pljeskavicama određena su/mjerena sljedeća fizičko-hemijska svojstva: sadržaj vode, masti, proteina, pepela, NaCl-a, težina, prečnik, pH vrijednost i vrijednosti boje (CIE L \* a \* b \*), dok je senzorna analiza (vanjski izgled, boja, tekstura, okus, aroma i ukupan dojam) rađena samo na prženim pljeskavicama. Pljeskavice su pržene na tavi sa malo suncokretovog ulja. Uzorci pljeskavica prženi su 7-8 minuta (prvo s jedne, a potom s druge strane), do momenta dok se u centru proizvoda postigla temperatura od  $72 \pm 1$  °C. Uzorci su nakon prženja stavljani na papirne ubruse radi cijedenja od masnoće. Za hemijske analize uzorci su prethodno pripremljeni usitnjavanjem na promjer 3-4 mm. Potom su homogenizirani u trajanju od 45 – 50 sekundi. Određivanje sadržaja vlage rađeno je po metodi BAS ISO 1442 (2007), sadržaj ukupne masti po BAS ISO 1443 (2007) a sadržaj azota po BAS ISO 937 (2007) metodi. Sadržaj azota pomnožen je sa faktorom 6,25, na osnovu čega se izračunao sadržaj ukupnih proteina. Sadržaj pepela određen je po metodi BAS ISO 936 (2007) a sadržaj NaCl-a modifikovanom metodom po Mohru. Parametri boje (CIE L \* a \* b \*) pilećih pljeskavica mjereni su pomoću Minolta CR-400 kolorimetra (Konica Minolta, Inc., Osaka, Japan). Prije korištenja kolorimetar je standardiziran

korištenjem bijele pločice s iluminantom D65/10°, standard posmatrača s 8 mm ulaza/područja gledanja. Mjerenje pH-vrijednosti rađeno je pomoću kalibriranog pH metra (Eutech Instruments; Holandija) opremljenog ubodnom staklenom elektrodom. Težina pilećih pljeskavica mjerena je digitalnom vagom (Libela, Celje) s tačnošću 0,01 g, a prečnik pljeskavica pomoću cantimetra. Na osnovu težine (g) i prečnika (cm) pilećih pljeskavica prije i poslije toplotne obrade, izračunati su sljedeći parametri:

(1)

$$\text{Prinos prženjem (\%)} = \frac{\text{Težina prženih pljeskavica}}{\text{Težina svježih pljeskavica}} \times 100$$

(Modifikovano prema El-Magoli i dr., 1996)

(2)

$$\text{Stepen zadržavanja vode (\%)} = \frac{\text{Težina prženih pljeskavica} \times \% \text{ vode prženih pljeskavica}}{\text{Težina svježih pljeskavica} \times \% \text{ vode svježih pljeskavica}} \times 100$$

(Modifikovano prema El-Magoli i dr., 1996)

(3)

$$\text{Stepen zadržavanja masti (\%)} = \frac{\text{Težina prženih pljeskavica} \times \% \text{ masti prženih pljeskavica}}{\text{Težina svježih pljeskavica} \times \% \text{ masti svježih pljeskavica}} \times 100$$

(Modifikovano prema Murphy i dr., 1975)

(4)

$$\text{Smanjenje prečnika (\%)} = \frac{\text{Prečnik svježih pljeskavica} - \text{prečnik prženih pljeskavica}}{\text{Prečnik svježih pljeskavica}} \times 100$$

(Modifikovano prema Modi i dr., 2004)

Ocjenjivanje prihvatljivosti senzornih svojstava prženih pljeskavica proveo je panel od osam ocjenjivača. Ocjenjivanje je obavljeno u prostoru za senzorno ocjenjivanje (dovoljno provjetrenom, osvijetljenom, bez stranih mirisa i buke sa optimalnom temperaturom vazduha od 22 °C) u Tehnološkoj laboratoriji Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu. Od senzornih svojstava ocjenjivani su: vanjski izgled, boja, tekstura, okus, aroma i ukupni dojam. Za ocjenjivanje senzornog kvaliteta pilećih pljeskavica korištena je 5 - bodovna skala prihvatljivosti (1- loše; 2 – zadovoljava; 3 – prihvatljivo; 4 – dobro; 5 - izvrsno). Nakon toplotne obrade, cijele pljeskavice, te narezani ujednačeni komadići pilećih pljeskavica, posloženi su na plastične tanjire koji su prethodno numerisani slučajno odabranim trocifrenim šiframa. Cijela pljeskavica služila je za lakše ocjenjivanje vanjskog izgleda i boje pljeskavice. Pri senzornom ocjenjivanju ocjenjivačima je bila na raspolaganju voda i hljeb radi neutralizacije arome i okusa prethodno konzumiranog uzorka. Statistička obrada podataka (jednofaktorijalna analiza varijanse, Tukey test), rađena je pomoću statističkog programa SPSS verzija 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## REZULTATI I DISKUSIJA

U tabeli 1. predstavljeni su rezultati hemijskog sastava svježih i prženih pilećih pljeskavica. Sadržaj vode svježih pilećih pljeskavica kretao se u rasponu od 64,67% do 66,05%, a nakon prženja od 61,92% do 63,61%. Nisu postojale značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u sadržaju vode između različitih varijanti svježih kao i između različitih varijanti prženih pljeskavica. Sadržaj masti kod svježih pilećih pljeskavica kretao se u rasponu od 9,39% do 11,95%, a u prženim od 6,91% do 9,42%. Sadržaj masti bio je značajno veći ( $p < 0,05$ ) kod pljeskavica s 1,5% dodate soli u odnosu na ostale dvije varijante, kako prije tako i poslije prženja. Analiza varijanse je pokazala da između različitih varijanti svježih pilećih pljeskavica nije bilo značajnih razlika ( $p > 0,05$ ) u sadržaju proteina. No, nakon prženja, pileće pljeskavice s 1,5% dodate soli imale su značajno manji ( $p < 0,05$ ) sadržaj proteina u odnosu na pljeskavice s 0,9% soli. Sadržaj pepela i soli (NaCl) značajno se razlikovao ( $p < 0,05$ ) između različitih varijanti svježih, kao i između različitih varijanti prženih pilećih pljeskavica, ali je to bilo u skladu sa dodatim količinama soli u recepture.

Tokom prženja došlo je do gubitka vode i masti kod svih varijanti pilećih pljeskavica. Najveći gubitak vode (2,90%) tokom prženja imale su pljeskavice s 0,9% soli, a najmanji pljeskavice s 1,2% soli (2,44%). Najmanje masti tokom prženja izgubile su pileće pljeskavice s 1,2% soli. Usljed gubitka vode i masti, ostale materije (proteini, pepeo i NaCl) su se koncentrirale, tj. njihov sadržaj se povećao. Prženjem je došlo do povećanja sadržaja soli (od 1,01% do 1,52% na 1,43% do 1,88%) kod svih varijanti pilećih pljeskavica usljed gubitka vode i masti, te koncentriranja suhe materije u proizvodu.

Ispitivanja su pokazala da se sadržaj vode, proteina, masti i pepela kretao u granicama koje navode Serdaroğlu i dr. (2017), Kumar i dr. (2013), Ramadhan i dr. (2011, 2012), Rosli i dr. (2011) i Ozer i Saricoban (2010) za svježe (voda = 46,72% - 69,37%; proteini = 11,08% - 20,71%; mast = 7,79% - 20,54%, pepeo = 1,11% - 3,07%) kao i za pržene pileće pljeskavice (voda = 46,40% - 61,23%; proteini = 21,62% - 25,47%; mast = 10,80% - 15,80%; pepeo = 1,88% - 3,77%). Gubitak vode tokom prženja je normalna pojava, a dešava se zbog denaturacije proteina, prilikom čega se istiskuje slobodna voda. So povoljno utiče na sposobnost vezivanja vode (Barbut, 2002), što znači da su pljeskavice sa više dodate soli (1,2%; 1,5%) zadržale više vode tokom prženja. Značajne razlike u sadržaju masti između različitih varijanti pilećih pljeskavica prije i poslije prženja javile su se kao posljedica neujednačenog sadržaja masti u recepturi. S obzirom na poznatu činjenicu, da pileća masnoća ima nisku tačku topljenja, očekivano je da tokom prženja dolazi do otapanja i izdvajanja masti. No, veoma je važno, da taj gubitak bude što manji. Na gubitak masnoće tokom prženja utiču mnogi faktori poput: sadržaja proteina, promjer usitnjenih čestica, dodavanje aditiva, soli i slično. Pošto se masnoća (pileća kožica) nije posebno, već zajedno usitnjavala sa mišićnim tkivom tokom proizvodnje ispitivanih pilećih pljeskavica, vjerovatno je to imalo uticaj na gubitak masti tokom prženja. Sadržaj

proteina u svježim pilećim pljeskavicama zadovoljavao je uslove koje propisuje pravilnik (Anonimus, 2013) u pogledu ovoga parametra (minimalno 14%).

Tabela 1. Hemijska svojstva svježih i prženih pilećih pljeskavica  
*Table 1. Chemical properties of raw and fried chicken patty*

Svježe pljeskavice ( <i>Raw patties</i> ) %					
Varijante ( <i>Variants</i> )	Voda ( <i>Moisture</i> )	Mast ( <i>Fat</i> )	Proteini ( <i>Protein</i> )	Pepeo ( <i>Ash</i> )	NaCl
PP1	65,78±0,20	9,44 <sup>b</sup> ±0,37	16,01±0,05	2,02 <sup>b</sup> ±0,05	1,01 <sup>c</sup> ±0,02
PP2	66,05±0,90	9,39 <sup>b</sup> ±0,10	15,94±0,59	2,08 <sup>b</sup> ±0,02	1,19 <sup>b</sup> ±0,03
PP3	64,67±1,09	11,95 <sup>a</sup> ±0,09	15,17±0,27	2,26 <sup>a</sup> ±0,10	1,52 <sup>a</sup> ±0,10
Pržene pljeskavice ( <i>Fried patties</i> ) %					
Varijante ( <i>Variants</i> )	Voda ( <i>Moisture</i> )	Mast ( <i>Fat</i> )	Proteini ( <i>Protein</i> )	Pepeo ( <i>Ash</i> )	NaCl
PP1	62,88±1,29	6,91 <sup>b</sup> ±0,11	21,93 <sup>a</sup> ±0,76	2,79±0,13	1,43 <sup>c</sup> ±0,08
PP2	63,61±0,75	7,28 <sup>b</sup> ±0,04	21,36 <sup>ab</sup> ±0,41	2,57±0,13	1,55 <sup>b</sup> ±0,02
PP3	61,92±0,60	9,42 <sup>a</sup> ±0,35	19,91 <sup>b</sup> ±0,98	2,79±0,02	1,88 <sup>a</sup> ±0,01

<sup>a, b, c</sup> – Srednje vrijednosti u istoj koloni označene s malim slovima značajno se razlikuju (jednofaktorska analiza varijanse, Takey test,  $p=0,05$ ). PP1 – Pileća pljeskavica s 0,9% NaCl; PP2 – Pileća pljeskavica s 1,2% NaCl; PP3 – Pileća pljeskavica s 1,5% NaCl.

<sup>a, b, c</sup> – Means with the different letter in the same column are significantly different (one-way ANOVA, Takey test,  $p=0.05$ ). PP1 – Chicken patties with 0.9% NaCl; PP2 – Chicken patties with 1.2% NaCl; PP3 – Chicken patties with 1.5% NaCl.

U tabeli 2. predstavljeni su rezultati mjerenja parametara prženja. Analiza varijanse je pokazala da su postojale statistički značajne razlike ( $p<0,05$ ) u prinosu prženjem, stepenu zadržavanja vode i masti, ali ne i u smanjenju prečnika ( $p>0,05$ ) ispitivanih pilećih pljeskavica. Tukey test je pokazao da su pileće pljeskavice sa 1,5% soli imale značajno veću ( $p<0,05$ ) prosječnu vrijednost prinosa prženjem i stepen zadržavanja vode u odnosu na pileće pljeskavice s 0,9% soli. Stepen zadržavanja masti se značajno razlikovao ( $p<0,05$ ) između tri varijante pilećih pljeskavica.

Rezultati ispitivanja (tabela 2) su pokazali da što je sadržaj soli u pilećim pljeskavicama bio veći, bio je veći prinos prženjem, stepen zadržavanja vode i masti. U ispitivanjima Serdaroğlu i dr. (2017) parametri tokom toplotne obrade: smanjenje prečnika pilećih pljeskavica (9,52%), prinos kuhanjem (63,12%), stepen zadržavanja vode i masti (37,83%; 42,62%) su bili niži nego u ispitivanim pljeskavicama. Rosli i

dr. (2011) su dobili za pileće pljeskavice sličan prinos prženjem (73,70%), manji stepen zadržavanja vode (58,73%) i smanjenje prečnika (11,61%), ali i veći stepen zadržavanja masti (70,34%) u odnosu na rezultate ovih istraživanja. Petracci i dr. (2012) oučili su da su marinade u koje je dodata kombinacija natrij bikarbonata i soli imale bolji prinos proizvoda. Također, Sheard i Tali (2004) navode da za zadržavanje vode u proizvodu bitnu ulogu ima natrij bikarbonat (soda bikarbona) jer se tokom toplotne obrade izdvaja ugljen dioksid usljed čega se stvaraju rupice u kojima se fizički zadržava voda. S obzirom da se u ispitivane pljeskavice dodao natrij bikarbonat, vjerovatno je on zajedno s NaCl-om, zaslužan za stvaranje rupica i zadržavanje vode u ispitivanim pljeskavicama kao u naprijed navedenim isitivanjima. Smanjenje prečnika pilećih pljeskavica zavisilo je od sadržaja soli, tj. prečnik pljeskavica koje su sadržavale više NaCl-a se više smanjio. Soltanizadeh i Ghiasi – Esfahani (2014) navode da su denaturacija proteina, oslobađanje vode i masti iz proizvoda glavni uzroci smanjenja prečnika proizvoda tokom toplotne obrade, što je vjerovatno uzrok smanjenju prečnika ispitivanih pljeskavica.

Tabela 2. Parametri prženja pilećih pljeskavica  
*Table 2. Frying parameters for chicken patties*

Varijante (Variants)	Prinos prženjem <i>Frying Yield</i> (%)	Stepen zadržavanja vode <i>Moisture Retention (%)</i>	Stepen zadržavanja masti <i>Fat Retention</i> (%)	Smanjenje prečnika <i>Diameter Retention (%)</i>
PP1	69,25 <sup>b</sup> ±0,82	66,21 <sup>b</sup> ±1,99	50,76 <sup>c</sup> ±2,03	16,50±3,79
PP2	73,17 <sup>ab</sup> ±0,81	70,47 <sup>ab</sup> ±1,44	56,75 <sup>b</sup> ±0,18	17,55±1,39
PP3	76,32 <sup>a</sup> ±2,99	73,07 <sup>a</sup> ±2,01	60,11 <sup>a</sup> ±1,09	17,67±5,13

<sup>a, b, c</sup> – Srednje vrijednosti u istoj koloni označene s malim slovima značajno se razlikuju (jednofaktorska analiza varijanse, Takey test,  $p=0,05$ ). PP1 – Pileća pljeskavica s 0,9% NaCl; PP2 – Pileća pljeskavica s 1,2% NaCl; PP3 – Pileća pljeskavica s 1,5% NaCl.

<sup>a, b, c</sup> – Means with the different letter in the same column are significantly different (one-way ANOVA, Takey test,  $p=0.05$ ). PP1 – Chicken patties with 0.9% NaCl; PP2 – Chicken patties with 1.2% NaCl; PP3 – Chicken patties with 1.5% NaCl.

U tabeli 3. su predstavljeni rezultati za pH vrijednost pilećih pljeskavica, gdje se vidi da se pH vrijednost svježih pilećih pljeskavica kretala u rasponu od 6,51 do 6,72, a prženih od 6,61 do 6,81. Značajno nižu ( $p<0,05$ ) pH vrijednost imale su pljeskavice s 0,9% soli, u odnosu na ostale dvije varijante pilećih pljeskavica kako prije tako i poslije prženja. L\* vrijednost svježih pilećih pljeskavica (tabela 3) povećavala se s povećanjem sadržajem soli, ali nije bilo značajnih razlika ( $p>0,05$ ) između različitih

varijanti svježih pilećih pljeskavica. Kod prženih pljeskavica značajno veću ( $p < 0,05$ )  $L^*$  vrijednost imale su pileće pljeskavice s 1,5% soli u odnosu na pileće pljeskavice s 1,2% soli. Kod svježih pilećih pljeskavica  $a^*$  vrijednost boje (tabela 3) se kretala u rasponu od 4,27 do 5,60, a prženih od 4,53 do 8,73. Između različitih varijanti pilećih pljeskavica prije prženja nije bilo značajnih razlika ( $p > 0,05$ ) u  $a^*$  vrijednosti boje. Nakon prženja postojale su značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u  $a^*$  vrijednosti između svih varijanti pilećih pljeskavica. Vrijednost  $b^*$  svježih pilećih pljeskavica (tabela 3), kretala se u rasponu od 14,97 do 18,14, a prženih od 21,99 do 25,84. Vrijednost  $b^*$  bila je značajno veća ( $p < 0,05$ ) kod svježih pilećih pljeskavica s 1,5% soli u odnosu na svježe pileće pljeskavice s manje dodate soli (0,9%; 1,2%). Pržene pileće pljeskavice s 1,2% soli imale su značajno veće ( $p < 0,05$ )  $b^*$  vrijednosti u odnosu na ostale dvije varijante.

Tokom prženja došlo je do porasta pH vrijednosti kod pilećih pljeskavica s 0,9% i 1,2% soli. pH vrijednost pilećih pljeskavica s 1,5% soli ostala je gotovo ista. Tokom prženja došlo je do smanjenja  $L^*$  vrijednosti boje kod svih varijanti pilećih pljeskavica. Vrijednost  $a^*$  tokom prženja se povećala kod pilećih pljeskavica s 0,9% i 1,2% soli, ali se kod pilećih pljeskavica s 1,5% soli smanjila. Tokom prženja kod svih ispitivanih uzoraka pilećih pljeskavica došlo je do porasta  $b^*$  vrijednosti, a naročito kod pilećih pljeskavica s 1,2% soli.

Ispitivanja su pokazala da se pH vrijednost svježih i prženih pilećih pljeskavica nalazi u rasponu koji navode

pH vrijednost ispitivanih svježih ( 6,51 – 6,72) i prženih pilećih pljeskavica (6,61 – 6,81) bila je veća od raspona pH vrijednosti koje navode Serdaroğlu i dr. (2017), Kumar i dr. (2013), Ramadhan i dr. (2011, 2012), Rosli i dr. (2011) i Ozer i Saricoban (2010) za svježe (6,02 – 6,25) i za pržene pileće pljeskavice (6,21 – 6,23). To je vjerovatno rezultat dodavanja natrij bikarbonata (sode bikarbone). Natrij bikarbonat posjeduje veliki puferski kapacitet i jonsku snagu za zadržavanje vode ali i podizanje pH vrijednosti. Sindelar i dr. (2003) su naveli da se pH vrijednost marinirane svinjetine povećala nakon kuhanja zbog dodavanja kombinacije natrij bikarbonata i polifosfata. U ispitivanjima Akbari – Adergani i dr. (2018) Kubideh kebab s četiri različita nivoa natrij bikarbonata (od 0,25 do 2,0 g/kg) imao je visoke pH vrijednosti bikarbonatnih jona i nizak gubitak kuhanjem na različitim temperaturama, što se može povezati i sa ovim istraživanjima. Također, povećanje pH vrijednosti može se povezati sa početkom razgradnje proteina (Sohail i dr., 2013).

Tokom prženja došlo je do smanjenja  $L^*$  vrijednosti boje kod svih varijanti pilećih pljeskavica, odnosno pod uticajem prženja sve varijante pilećih pljeskavica su dobile tamniju boju površine (tabela 3). Na smanjenje  $L^*$  vrijednosti tokom prženja utiče denaturacija mioglobina, a također i neki drugi činioci (crni biber, crni luk) kako navode Serdaroğlu i dr. (2017). S obzirom da su crni luk i crni biber bili dodati u recepturu pilećih pljeskavica, vjerovatno su oni pored denaturacije mioglobina tokom prženja, uticali na smanjenje  $L^*$  vrijednosti. Ozer i Saricoban (2010) su dobili gotovo iste rezultate za  $L^*$  vrijednost boje (47,97) svježe zamrznute pileće pljeskavice proizvedene od mehanički otkoštenog mesa s dodatkom različitih antioksidanata, kao

što je bila  $L^*$  vrijednost boje (47,21) kod prženih pilećih s 0,9% soli. Serdaroğlu i dr. (2017) ispitivali su boju toplotno obrađenih pilećih pljeskavica i dobili slične rezultate za  $L^*$  vrijednost (44,27-45,07), veće vrijednosti za  $a^*$  (12,25 – 14,30) i manje za  $b^*$  vrijednosti boje (10,76 – 10,98) u odnosu na rezultate ovih istraživanja. Sve vrijednosti boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) ispitivanih pljeskavica su se nalazile u rasponu koji za toplotno obrađene pljeskavice ( $L^* = 38,80 – 63,96$ ;  $a^* = 0,75 – 9,08$  i  $b^* = 18,51 – 31,24$ ) navode Ramadhan i dr. (2011; 2012).

Vrijednost  $a^*$  boje se povećala tokom prženja pilećih pljeskavica s 0,9% i 1,2% soli, ali kod pilećih pljeskavica s 1,5% soli ona se smanjila. Prema navodima Ozer i Saricoban (2010) smanjenje  $a^*$  vrijednosti izaziva oksidacija oksimioglobina u metmioglobin, ali i pad pH vrijednosti. S obzirom da se kod pilećih pljeskavica s 1,5% soli, pH vrijednost malo smanjila ili bila gotovo ista (6,68; 6,67), to smanjenje je vjerovatno uticalo na smanjenje  $a^*$  vrijednosti boje. Također, Sohaib i dr. (2013) navode da se smanjenje  $a^*$  vrijednosti može povezati s prelaženje crvene u smeđu usljed stvaranja metmioglobina.

Tabela 3. pH vrijednost i vrijednosti boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) svježih i prženih pljeskavica  
*Table 3. pH value and colour ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) of raw and fried chicken patties*

Svježe pljeskavice ( <i>Raw patties</i> )				
Varijante ( <i>Variants</i> )	pH	$L^*$	$a^*$	$b^*$
PP1	6,51 <sup>b</sup> ±0,01	56,24±2,92	5,60±0,60	15,98 <sup>b</sup> ±0,23
PP2	6,72 <sup>a</sup> ±0,01	57,53±0,94	4,27±0,69	14,97 <sup>b</sup> ±0,04
PP3	6,68 <sup>a</sup> ±0,06	58,41±0,76	5,38±1,57	18,14 <sup>a</sup> ±0,76
Pržene pljeskavice ( <i>Fried patties</i> )				
Varijante ( <i>Variants</i> )	pH	$L^*$	$a^*$	$b^*$
PP1	6,61 <sup>c</sup> ±0,01	47,21 <sup>ab</sup> ±0,74	5,81 <sup>b</sup> ±0,01	22,05 <sup>b</sup> ±0,41
PP2	6,81 <sup>a</sup> ±0,01	45,24 <sup>b</sup> ±2,30	8,73 <sup>a</sup> ±0,64	25,84 <sup>a</sup> ±0,19
PP3	6,67 <sup>b</sup> ±0,03	50,34 <sup>a</sup> ±0,10	4,53 <sup>c</sup> ±0,55	21,99 <sup>b</sup> ±0,03

<sup>a, b, c</sup> – Srednje vrijednosti u istoj koloni označene s malim slovima značajno se razlikuju (jednofaktorska analiza varijanse, Takey test,  $p=0,05$ ). PP1 – Pileća pljeskavica s 0,9% NaCl; PP2 – Pileća pljeskavica s 1,2% NaCl; PP3 – Pileća pljeskavica s 1,5% NaCl.

<sup>a, b, c</sup> – Means with the different letter in the same column are significantly different (one-way ANOVA, Takey test,  $p=0.05$ ). PP1 – Chicken patties with 0.9% NaCl; PP2 – Chicken patties with 1.2% NaCl; PP3 – Chicken patties with 1.5% NaCl.



Rezultati ocjene senzornog kvaliteta prženih pilećih pljeskavica predstavljeni su tabelom 4. Pileće pljeskavice s 1,2% soli značajno su bolje ( $p < 0,05$ ) ocijenjene za vanjski izgled u odnosu na pileće pljeskavice s 1,5% soli, kao i za boju u odnosu na ostale dvije varijante (0,9%; 1,5%). Pileće pljeskavice s 1,2 % i 1,5% soli značajno su bolje ( $p < 0,05$ ) ocijenjene za teksturu u odnosu na pileće pljeskavice s 0,9% soli. Aroma pilećih pljeskavica s 1,5% soli bila je značajno bolje ( $p < 0,05$ ) ocijenjena u odnosu na pileće pljeskavice s 1,2% soli. Iako nije bilo značajnih razlika ( $p > 0,05$ ) u ocjenama okusa i ukupnog dojma između različitih varijanti, pileće pljeskavice s 1,5% soli imale su bolje ocjene za ova svojstva u odnosu na druge.

Tabela 4. Senzorna svojstva prženih pilećih pljeskavica  
*Table 4. Sensory properties of fried chicken patties*

Varijante (Variants)	Vanjski izgled (Appearance)	Boja (Colour)	Tekstura (Texture)	Okus (Taste)	Aroma (Flavour)	Ukupan dojam (Overall acceptability)
PP1	3,94 <sup>ab</sup> ±0,19	3,69 <sup>b</sup> ±0,19	3,56 <sup>b</sup> ±0,18	3,25±0,37	3,31 <sup>ab</sup> ±0,07	3,63±0,25
PP2	4,25 <sup>a</sup> ±0,13	4,25 <sup>a</sup> ±0,01	3,75 <sup>a</sup> ±0,12	3,25±0,01	3,25 <sup>b</sup> ±0,01	3,75±0,13
PP3	3,81 <sup>b</sup> ±0,18	3,69 <sup>b</sup> ±0,31	3,94 <sup>a</sup> ±0,06	3,63±0,13	3,56 <sup>a</sup> ±0,19	3,94±0,06

<sup>a, b</sup> – Srednje vrijednosti u istoj koloni označene s malim slovima značajno se razlikuju (jednofaktorska analiza varijanse, Takey test,  $p=0,05$ ). PP1 – Pileća pljeskavica s 0,9% NaCl; PP2 – Pileća pljeskavica s 1,2% NaCl; PP3 – Pileća pljeskavica s 1,5% NaCl.

<sup>a, b</sup> – Means with the different letter in the same column are significantly different (one-way ANOVA, Takey test,  $p=0.05$ ). PP1 – Chicken patties with 0.9% NaCl; PP2 – Chicken patties with 1.2% NaCl; PP3 – Chicken patties with 1.5% NaCl.

Senzorna svojstva pilećih pljeskavica ocijenjena su ocjenama „prihvatljivo“ i „dobro“. Vanjski izgled i boja najbolje su ocijenjeni kod pilećih pljeskavica s 1,2% soli. To se može povezati s promjenama vrijednosti boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) koje su bile najizraženije tokom prženja kod ove varijante pilećih pljeskavica. Naročito se to može reći za  $a^*$  (s 4,27 na 8,73) i  $b^*$  (s 14,97 na 25,84) parametre boje. Tekstura, okus, aroma i ukupan dojam su najbolje ocijenjeni kod pilećih pljeskavica s 1,5% soli. So poboljšava okus i teksturu (Barbut, 2002), što je dokaz da su pileće pljeskavice s više dodate soli imale prihvatljiviju teksturu i okus (slanost). Slične rezultate dobili su Ramadhan i dr. (2012), gdje su svojstva teksture bila bolje ocijenjena od okusa pilećih burgera.

Također, Ali i Rasool (2007) su za imali bolje ocijenjenu teksturu za pileću pljeskavicu od arome i okusa, što je slično rezultatima ovih istraživanja.

## ZAKLJUČAK

Pileće pljeskavice s 0,9% soli su imale najveći gubitak vode, najmanji prinos prženjem, najmanji stepen zadržavanja vode i masti tokom prženja, ali i najniže pH i  $L^*$  vrijednosti. Pileće pljeskavice s 1,2% soli su imale najmanji gubitak vode i masti i najveći porast  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti tokom prženja, te najveću pH vrijednost. Pileće pljeskavice s 1,5% soli su imale najbolji prinos i najveću sposobnost zadržavanja vode i masti tokom prženja, te najveće  $L^*$  vrijednosti boje. Na osnovu naprijed iznesenog može se zaključiti da su na gubitak vode i masti, parametre prženjem, te parametre boje imali uticaj sadržaj soli i pH vrijednost. S povećanjem sadržaja soli u pilećim pljeskavicama, tokom prženja, povećava se prinos, sposobnost zadržavanja vode i masti i  $L^*$  vrijednost. Sa povećanjem pH vrijednosti, tokom prženja, smanjuje se gubitak vode i masti, te povećava  $a^*$  i  $b^*$  vrijednost boje. Dodatak natrij bikarbonata zajedno sa NaCl-om može se povezati sa visokom pH vrijednosti. Senzorni kvalitet ispitivanih pilećih pljeskavica nije bio „izvrstan“ već se kretao od „prihvatljivog“ do „dobrog“ što je posljedica pojave vidljivih komadića i jake arome na crveni luk. Generalno gledajući, pileće pljeskavice s 1,2% i 1,5% soli su bile prihvatljivije za većinu ispitivanih svojstva u odnosu na pileće pljeskavice s 0,9% dodate soli.

## LITERATURA

- Akbari-Adergani, B., Sallakb, N., Jahed-Khanikib, G., Rastkarib, N., Sadigharab, P. (2018): Effect of sodium bicarbonate residue on some characteristics of processed meat products *Foods and Raw Materials*, vol. 6, no. 2.
- Alakali, J. S., Irtwange, S.V., Mzer, M.T. (2010): Quality evaluation of beef patties formulated with bambara groundnut (*Vigna subterranean L.*) seed flour. *Meat Sci.* 85:215–223.
- Ali, Sh.W., Rasool, G. (2007): Chemical and sensory characteristics of frozen stored Chicken patties fried in different vegetable oils. *Pak. J. Agri. Sci.* Vol 44 (2). 337-340.
- Anonimus. (2013): Pravilnik o usitnjenom mesu, poluproizvodima i proizvodima od mesa, Službeni glasnik BiH broj 82.
- Barbut, S. (2002): Poultry products-formulations and gelation, In: *Poultry products processing. An industry guide*, pp. 467-511. CRC Press, New York.
- BAS ISO metode. (2007): Meso i mesni proizvodi (određivanje sadržaja vode, 1442:2007; određivanje sadržaja ukupne masti, 1443:2007; određivanje sadržaja azota; 937:2007; određivanje sadržaja pepela 936: 2007). Institut za standardizaciju Bosna i Hercegovina.
- Carvalho, C. B., Madrona, G. S., Cestari, L. A., Guerrero, A., Evelázio de Souza, N., do Prado, I. N. (2015): Sensory profile of beef burger with reduced sodium

- content. Article in *Acta Scientiarum Technology*. Maringá, v. 37, n. 2, p. 301-305.
- Desmond, E. (2006): Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science* 74, 188-109.
- El-Magoli, S., Laroia, S. Hansen, P. (1996): Flavor and texture characteristics of low fat ground beef patties formulated with whey protein concentrate. *Meat Science* 42(2): 179-193.
- Kumar, P. S, A, Kumar, S., Kaur, M., Bhardwaj, D. (2013): Physico-chemical and sensory characteristics of chicken (*Vanraja* spp.) patties substituted with rabbit meat. *Journal of Meat Science and Technology*. Vol 1. Issue 3. Pages 98-101.
- Lawrie, R. A., Ledward, D.A. (2006): *Meat Science*, Seventh edition, Cambridge: Woodhead publishing series in Food Science and Technology, Pp 337.
- Modi, V., Mahendrakar, N., Narasimha Rao, D., Sachindra, N. (2004): Quality of buffalo meat burger containing legume flours as binders. *Meat Sci.* 66, 143-149.
- Murphy, E. W., Criner, P. E., Gray, B. C. (1975): Comparisons of methods for calculating retention of nutrients in cooked foods. *J. Agri. Food Chem.* 23(6), 1153–1157.
- Nkrumah, T., Akwetey, W.Y. (2018): Physico-chemical and Sensory Properties of Frankfurter-type Fish Sausage. *American Journal of Food Science and Technology*, 2018, Vol. 6, No. 3, 118-122.
- Operta, S. (2016): Tehnologija proizvoda od mesa peradi. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo.
- Ozer, O., Saricoban, C. (2010): The Effects of Butylated Hydroxyanisole, Ascorbic Acid, and  $\alpha$ -Tocopherol on some Quality Characteristics of Mechanically Deboned Chicken Patty during Freeze Storage. *Czech J. Food Sci.* Vol 28. No 2: 150-160.
- Petracci, M., Laghi, L., Rocculi, P., Rimini, S., Panarese, V., Cremonini, M.A., Cavani, C. (2012): The use of sodium bicarbonate for marination of broiler breast meat. *Poultry Science* 91:526-534.
- Ramadhan, K., Huda, N., Ahmad, R. (2011): Physicochemical characteristics and sensory properties of selected Malaysian commercial chicken burgers. *International Food Research Journal* 18(4): 1349-1357.
- Ramadhan, K., Huda, N., Ahmad, R. (2012): Physicochemical and sensory characteristics of burger made from duck surimi-like material. *Poultry Science*. 91:2316-2323.
- Rosli, W.I.W., Nurhanan, A.R., Solihah, M.A., Mohsin, S.S.J. (2011): Cornsilk (*Zea mays* Hairs) Improves Nutrient, Physical Traits and Unaffected Sensory Properties of Chicken Patties. *Sains Malaysiana* 40(10)(2011): 1165–1172.
- Serdaroğlu, M., Nacak, B., Karabıyıkoglu, M. (2017): Effects of Beef Fat Replacement with Gelled Emulsion Prepared with Olive Oil on Quality Parameters of Chicken Patties. *Korean J. Food Sci. An.* 37(3): 376-384.

- Sheard, P.R., Tali, A. (2004): Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. *Meat Science*, 2004, vol. 68, no. 2, pp. 305–311.
- Sindelar, J.J., Prochask, F., Britt, J. (2003): Strategies to eliminate atypical flavours and aromas in sow loins. Optimization of sodium tripolyphosphate, sodium bicarbonate, and injection level. *Meat Science*, 2003, vol. 65, no. 4.
- Sohaib, M., Anjum, F.M., Khan, M.I., Arshad, M.S., Yasin, M., Shahid, M. (2013): Effect of  $\alpha$ -Lipoic Acid and  $\alpha$ -Tocopherol Acetate Enriched Broiler Diet on Oxidative Stability and Quality of Broiler Leg Meat and Meat Products. *J Food Process Technol. Volume 4 • Issue 7*.
- Soltanizadeh, N. Ghiasi-Esfahani, H. (2014): Qualitative improvement of low meat beef burger using Aloe vera. *Meat Sci.* 99, 75-80.
- Yogesh, K., Ahmad, T., Manpreet, G., Mangesh, K., Das, P. (2013): Characteristics of chicken nuggets as affected by added fat and variable salt contents. *J Food Sci Technol (January–February 2013)* 50(1):191–196.

## **PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF CHICKEN PATTIES WITH DIFFERENT NaCl CONCENTRATIONS**

### **Summary**

The aim of this paper was to examine the physicochemical and sensory properties of chicken patties with different concentrations of added salt (0.9; 1.2%; 1.5%). The results obtained showed that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) in the content of fat, NaCl, pH and  $b^*$  values between the three varieties of raw, and between the three varieties of fried chicken patties. The water content of raw and fried patties was uniform without significant differences ( $p > 0.05$ ). There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in protein content,  $L^*$  and  $b^*$  value of raw patties, nor in ash content of fried chicken patties. During frying, there was an increase in protein, ash content, NaCl, pH and  $b^*$  values, as well as a decrease in  $L^*$  value for all varieties of chicken patties. The frying procedure caused an increase in  $a^*$  value in chicken patties with 0.9% and 1.2% salt, and a decrease in chicken patties with 1.5% salt. Chicken patties with 1.5% salt had a significantly higher ( $p < 0.05$ ) yield of frying and water retention compared to the 0.9% salt variant, but not in relation to the variant with 1.2% of salt. All varieties of chicken patties differed significantly ( $p < 0.05$ ) in the fat retention degree, but not in the reduction of the diameter during frying ( $p > 0.05$ ). There were significant differences ( $p < 0.05$ ) in the estimates of the sensory properties between the three varieties of chicken patties, except for taste and texture. Chicken patties with 1.2% received the highest grades for appearance and color, and chicken patties with 1.5% salt for texture, taste, aroma and overall impression. In general, chicken patties with 1.2% and 1.5% salt was more acceptable for most of the tested properties compared to chicken patties with 0.9% added salt.

**Key words:** *Chicken patties, NaCl concentrations, quality properties*

## EKSPERIMENTALNI UZORCI U BIOLOŠKO-POLJOPRIVREDNIM ISTRAŽIVANJIMA

Đurađ Hajder<sup>1</sup>, Mirsad Kurtović<sup>2</sup>, Nikola Mičić<sup>1</sup>

Pregledni rad – *Review paper*

### Rezime

Pitanje uzoraka u biološko-poljoprivrednim biometričkim analizama primjene tretmana sa kojima se nastoje projektovati (proizvesti indukovanim efektom tretmana) novi osnovni skupovi koji predstavljaju nove tehnološke postupke ili novu primjenu znanja, traži značajna metodološka određenja. Osnovno otvoreno pitanje odnosi se na determinaciju, odnosno izbor biometričkih jedinica sa određenim karakteristikama koje na projektovani način reaguju na primjenjeni tretman, ali i na njihov status i zastupljenost u baznom osnovnom skupu – osnovnom skupu iz kojega se uzorkuju eksperimentalne biometričke jedinice posmatranja za primjenu tretmana. U različitim biološko-poljoprivrednim biometričkim analizama (inferencijalne statističke procedure) uzorci najčešće nisu reprezentativna ocjena baznog osnovnog skupa, pa se metodološko definisanje primjenjenih tretmana i njihova primjena u praksi moraju jasno odrediti prema baznom osnovnom skupu. U protivnom, primjenjeni tretmani na dijelu populacije koji reprezentativno predstavlja bazni osnovni skup neće proizvesti projekovani efekat (eksperimentalno dokazani rezultat određenog istraživanja), čime rezultati takvih eksperimenata u praksi postaju apsurdni. U ovom radu, dat je pregled metodoloških pristupa definisanju osnovnih skupova i uzoraka, koji se nastoje primjeniti u biološko-poljoprivrednim biometričkim analizama.

### UVOD

Saglasno uopštenim konstatacijama statističke literature, uzorci moraju da reprezentativno predstavljaju osnovni skup. Međutim, u inferencijalnoj statističkoj analizi, uzorci služe kao ocjena osnovnog skupa, pa je otvoreno pitanje, a može se reći i paradoks, tvrditi da uzorak treba da reprezentativno predstavlja osnovni skup, koji se pritom ocjenjuje tim istim uzorkom, jer nam osnovni skup nije poznat?

Pitanje uzoraka i osnovnog skupa posebno se problematizuje u biološko-poljoprivrednim istraživanjima, kada se na osnovu uzoraka primjenom određenih tretmana nastoje projektovati novi osnovni skupovi [skupovi biljaka sa visokom produktivnošću pri definisanom tretmanu (ili indukovanim heterozisom), skupovi životinja sa indukovanim + (plus) varijantama itd.].

---

<sup>1</sup> Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, BiH / University of Banja Luka, Faculty of Agriculture, BiH.

<sup>2</sup> Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, BiH / Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of Sarajevo, BiH.

Korespondencija: m.kurtovic@ppf.unsa.ba

U ovom radu dat je pregled otvorenih pitanja i logičko–matematičke argumentacije, o uzorcima koji se moraju definisati prije primjene tretmana sa kojima se nastoje projektovati novi osnovni skupovi sa + (plus) varijantama, ili novim svojstvima, nezavisno od osnovnog skupa (baznog osnovnog skupa) iz koga se uzimaju eksperimentalne biometričke jedinice posmatranja. Naime, ako se primjena tretmana izvede na uzorcima koji nisu reprezentativni za bazni osnovni skup, dobijeni efekti tretmana koji treba da predstavljaju nove osnovne skupove, neće se ponoviti (izostaće projektovani efekat) ako se isti tretmani primjene na uzorcima koji su sada reprezentativni za bazni osnovni skup.

### **Pitanje određenja pojma skupa u kontekstu logičko–matematičke argumentacije i uzorkovanja u biometričkim istraživanjima**

Sve definicije uzoraka u statističkoj literaturi vezane su za osnovni skup iz koga se uzorci uzimaju. Pritom, definicija tog osnovnog skupa je uopštena kao matematički pojam, tj. pod skupom se podrazumijeva bilo koja kolekcija objekata koji imaju barem jednu zajedničku karakteristiku. Međutim, pojam skupa se u matematici ne definiše egzaktno, iz niza razloga. Jedan od razloga je “Raselov paradoks” u određenju skupa svih skupova koji ne sadrže sami sebe.

Dodatni razlog je činjenica da je skup vještačka kategorija, a ne nešto što se u prirodi javlja *a priori*. Drugim riječima, skup je antropogena, subjektivna kategorija i kao takva podložna raznim neslaganjima i nerazumijevanju i u biološko–poljoprivrednim istraživanjima.

Formiranje skupa podrazumijeva prije svega misaoni proces razgraničenja različitih objekata i pojava u prirodi. Međutim, tim procesom se ne isključuje rizik pogrešnog formiranja skupa, usljed nepoznavanja određene pojave, nepoznavanja granica između skupova i njihove interakcije, kao i usljed odsustva ispravnog odabira broja elemenata koje treba uključiti u jedan skup. Dodatne teškoće predstavljaju i ostali faktori formiranja skupova, poput vremenskih i prostornih ograničenja (jedan element ulazi ili izlazi iz skupa u određenom trenutku ili na određenom mjestu) te velikog broja elemenata skupa, čije je karakteristike potrebno ispitati.

U ovom kontekstu, naročito je bitna analiza kardinalnosti jednog skupa. Kardinalni broj skupa predstavlja broj elemenata tog skupa. U skladu sa ovom definicijom, razlikuju se konačni skupovi i beskonačni skupovi. U biometričkim istraživanjima, razmatranje klasifikacije skupova ima naročit značaj.

Konačni skupovi su skupovi za koje se može odrediti konačan broj elemenata (utvrđen broj, koji nakon prebrojavanja ne može dalje da se smanjuje ili povećava) i oni se dijele na prebrojive i neprebrojive skupove.

Konačni prebrojivi skupovi su obično manji skupovi, za koje se može relativno brzo i lako izračunati ukupan broj elemenata koje sadrže. U poljoprivredi, primjer ovog skupa je skup sorti ozime pšenice na lokaciji  $L_1$  u 2017. godini (uslov je da se u toku 2017. godine ne mijenja sortiment), skup stabala u voćnjaku na lokaciji  $L_2$  u 2018. godini (uslov je da se ne dodaju ili odstranjuju stabla u 2018. godini) ili skup životinja na farmi lokacije  $L_3$  u 2019. godini (uslov je da ne uginu nijedna jedinka). U slučaju da se dogodi neka od nepredviđenih okolnosti, taj skup je potrebno ponovo definisati i/ili detaljnije objasniti u pogledu pojmovnog, prostornog i vremenskog okvira.

Tematika konačnih neprebrojivih skupova u poljoprivredi je vezana za terminološka, finansijska, vremenska i generalno numerička pitanja. Drugim riječima, to su skupovi, za koje je utvrđivanje ukupnog broja njihovih elemenata limitirano nedostatkom informacija o tom skupu, nedostatkom finansijskih sredstava za prikupljanje i analizu svih elemenata skupa, nedostatkom vremena za takve operacije ili je broj elemenata tog skupa prevelik da bi se uopšte pristupilo definisanju i analizi skupa tj. svih njegovih elemenata pojedinačno.

Dakle, konačni neprebrojivi skupovi su teoretski prebrojivi, ali nas navedeni faktori sprječavaju u procesu definisanja skupa, prikupljanja podataka o pojedinačnim elementima skupa, kao i analize i interpretacije karakteristika datog skupa na osnovu svih elemenata koji pripadaju tom skupu.

Ovi skupovi u suštini nastaju proširenjem domena pojmovnog, prostornog i vremenskog okvira skupa, tako da bi primjeri ovakvih skupova u poljoprivredi bili: skup svih zrna ozime pšenice na lokaciji  $L_1$  (ili na 10 određenih lokacija) u 2017. godini (ili u periodu 2017–2019), skup svih stabala kruške u voćnjacima u Bosni i Hercegovini u 2018 (ili u periodu 2000–2018) ili skup svih pilića na farmama u Bosni i Hercegovini.

Beskonačni skupovi su skupovi koji imaju beskonačan broj elemenata, a klasičan primjer je skup prirodnih brojeva (određenom broju elemenata uvijek se dodaje novi broj pa je nemoguće izračunati ukupan broj elemenata tog skupa). Pitanje beskonačnih skupova nije sporno u matematici, ali, u ovom kontekstu postoji izvjesna distinkcija između matematike i biologije (ili matematike i poljoprivrede). Naime, biološka istraživanja većinom se baziraju na životu i biću tj. jedinki kao nedjeljivoj cjelini (mikroorganizam, biljka, životinja, čovjek) ili karakteristikama te jedinke (broj listova po biljci, broj zrna u klasu i sl.) pa je pojam beskonačnog skupa ovdje neprimjenjiv ili se u graničnom slučaju poistovjećuje sa konačnim neprebrojivim skupom. Stoga, posmatrajući jedinku kao odvojenu cjelinu, u biologiji se većinom susrećemo sa imenovanim brojevima (Mičić i sar., 2014a) a samim tim i sa konačnim skupovima.



## Logički i biometrički pristup u skladu sa definicijom skupa

U biometričkim istraživanjima, skup se definiše i kao osnovni skup ili populacija. Karakteristike tog skupa, a prije svega njegova kardinalnost, određuje i biometrički (logičko–matematički) pristup istraživanju. Ukoliko su definisani i prikupljeni svi elementi nekog osnovnog skupa, koristi se deskriptivna biometrička analiza (Vasilj, 2000; Mičić i Bosančić, 2013; Mičić i sar., 2014a; Lovrić i sar., 2017). Jasno je da se ovdje radi o konačnim i prebrojivim osnovnim skupovima. Međutim, ukoliko je skup konačan i prebrojiv ali previše velik, ili neprebrojiv, za dalju analizu uzima se samo dio elemenata tog skupa, koji zajedničkim imenom naziva „uzorak“. U ovom slučaju, radi se o inferencijalnoj biometričkoj analizi. Veza pomenuta dva biometrička pristupa sa logičkim pristupom je sasvim jasna, pa se kod deskriptivne biometričke analize većinom koristi deduktivna a kod inferencijalne biometričke analize induktivna logika (Dubić, 1970; Borojević, 1974; Koen i Nejgel, 1982; Prodanović i Mičić, 1996; Mičić i sar., 2009).

Problem u biološkim i poljoprivrednim istraživanjima obično predstavlja činjenica da se ta istraživanja najčešće sprovode na konačnim ali neprebrojivim skupovima. Stoga, najčešći biometrički pristup je inferencijalna analiza a logički pristup indukcija.

Dakle, u praktičnim istraživanjima u poljoprivredi nije se u mogućnosti ispitati sve elemente nekog skupa (ovo je moguće samo teoretski), već se pristupa metodi uzorka.

Kada je u pitanju uzorak, kao dio osnovnog skupa, najvažnija karakteristika koju uzorak treba ispunjavati je da bude reprezentativan. Uzorak se smatra reprezentativnim ako dobro predstavlja populaciju tj. ako sadrži sve tipične varijante populacije iz koje je uzet (Vasilj, 2000), ili ako svojim osobinama vjerno odslikava osobine (ili strukturu) skupa iz kojeg je izabran (Lovrić i sar., 2017). Prema Stanković i sar. (2002), uzorak je reprezentativan ako dovoljno dobro predstavlja ispitivano obilježje  $X$ . Međutim, ovdje se dolazi do logičkog paradoksa, jer ako bi se znale sve tipične varijante populacije ili struktura osnovnog skupa ili sva obilježja skupa (što je *praktično* nemoguće kod konačnih neprebrojivih skupova) uzorak nam ne bi ni trebao, a kod konačnih prebrojivih populacija moglo bi se umjesto uzorka koristiti osnovni skup. Takođe, s obzirom da je uzorak samo manji ili veći dio osnovnog skupa, on nikada nije savršeno reprezentativan, a da bi se to desilo uzorak bi morao imati isti broj elemenata kao osnovni skup tj. svi elementi osnovnog skupa bili identični uzorku.

Bez obzira na date činjenice, postoje principi uzorkovanja i biometrički pokazatelji, koji nam ukazuju na stepen reprezentativnosti uzorka.

Osnovni princip uzorkovanja u cilju postizanja što veće reprezentativnosti uzorka je slučajni izbor elemenata iz osnovnog skupa u uzorak, a slučajni izbor znači da svaki

element osnovnog skupa ima istu vjerovatnoću izbora u uzorak. Jasno je da slučajnost izbora (pa i reprezentativnost uzorka) može da se postigne samo kod konačnih prebrojivih skupova, jer kod neprebrojivih skupova, u realnom svijetu, nismo u mogućnosti doći do informacije o ukupnom broju elemenata u skupu. Takođe, dodatnu teškoću predstavlja činjenica da, u poljoprivrednim naukama, vjerovatnoća često ima *a posteriori* karakter, za razliku od matematičke *a priori* vjerovatnoće (Hastie *et al.*, 2009; Mičić, Hajder i Kurtović, 2016).

Veličina uzorka (broj elemenata izabranih u uzorak) direktno je proporcionalna veličini osnovnog skupa i varijabilnosti elemenata tog skupa<sup>3</sup>. U skladu sa tim, na reprezentativnost uzorka kod nekih biometričkih testova, poput *t*-testa ili analize varijanse, ukazaće mjera disperzije koja se zove koeficijent varijacije, a koja predstavlja količnik standardne devijacije i aritmetičke sredine tj. procentualno učešće standardne devijacije u aritmetičkoj sredini ispitivanih podataka (Mičić, 2011; Mičić i Bosančić, 2012; Mičić, 2013). Na osnovu toga, ukoliko je koeficijent varijacije u intervalu od 5 % do 30 % može se reći da biometričke jedinice posmatranja u osnovnom skupu, ali i one izabrane u uzorak, predstavljaju centralnu tendenciju, ali pitanje njihove reprezentativnosti ostaje otvoreno.

Naime, ako posmatramo hipotetički osnovni skup od 30 jedinki sa svojstvom Q (Tabela 1), i njegove parametre uporedimo sa uzorcima uzetim iz tog skupa (Tabela 2), može se vidjeti da postoje određene razlike u srednjim vrijednostima osnovnog skupa i uzoraka.

Tabela 1. Parametri osnovnog skupa biometričkih jedinica sa svojstvom Q.

Aritmetička sredina baznog osnovnog skupa	Standardna devijacija baznog osnovnog skupa	Standardna greška u baznom osnovnom skupu	Koeficijent varijacije u baznom osnovnom skupu
$\mu = 30,66$	$\sigma = 5,62$	$\sigma_x = 1,02$	$Vk = 13,31$

Tabela 2. Eksperimentalni uzorci uzeti iz osnovnog skupa biometričkih jedinica sa svojstvom Q datih u tabeli 1.

Br.	Uzorak I $x_{1,i}$	Br.	Uzorak II $x_{1,2i}$	Br.	Uzorak III $x_{1,3i}$
1.	21	1.	30	1.	32
2.	23	2.	31	2.	36
3.	25	3.	35	3.	38
4.	23	4.	32	4.	34
5.	24	5.	31	5.	38

<sup>3</sup> Za procjenu osnovnih skupova sa većim brojem elemenata i sa većom varijabilnošću elemenata, potrebni su i veći uzorci.

6.	22	6.	33	6.	35
7.	24	7.	30	7.	37
8.	22	8.	36	8.	35
9.	26	9.	32	9.	37
10.	26	10.	34	10.	38

<i>Uzorci</i>	<i>Uzorak I</i>	<i>Uzorak II</i>	<i>Uzorak III</i>
$\bar{X}$	23,60	32,40	36,00
$S$	1,71	2,07	2,00
$S_{\bar{X}}$	0,54	0,65	0,63
$V_k$	7,26	6,37	5,56

Pregledom podataka u tabelama, na osnovu varijacija u osnovnom skupu i varijacija u uzorcima vidi se da sve srednje vrednosti predstavljaju centralne tendencije ( $5\% < \bar{X} < 30\%$ ) statističke serije iz koje su izračunate.

Međutim kada se izvrši testiranje statističke značajnosti razlika između centralnih tendencija osnovnog skupa i uzoraka (Tabela 3), dolazi se do više otvorenih pitanja.

Tabela 3.  $t$ -test značajnosti razlika centralnih tendencija svojstva Q uzoraka i osnovnog skupa iz koga su uzeti uzorci ( $\bar{X}_0$ ).

<i>Aritmetičke sredine</i>	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}_3$
$\bar{X}_0$	6,088**	1,432 <sup>nz</sup>	4,433**
$\bar{X}_3$	17,856**	4,353**	
$\bar{X}_2$	10,369**		

- $t$ -test pokazuje da samo uzorak II nema statistički značajnu razliku u odnosu na centralnu tendenciju osnovnog skupa, odakle treba da se zaključi da je samo uzorak II reprezentativan predstavnik posmatranog osnovnog skupa;
- $t$ -test pokazuje i da se eksperimentalni uzorci međusobno statistički visokoznačajno razlikuju ( $I \neq II \neq III$ ).

### Probabilistički i neprobabilistički uzorci

S obzirom na slučajnost izbora elemenata iz osnovnog skupa u uzorak, razlikuju se slučajni (probabilistički) i neslučajni (neprobabilistički) uzorci. Od slučajnih (probabilističkih) uzoraka, najznačajniji su prost slučajan uzorak i kontrolisani slučajan uzorak. Kontrolisani slučajan uzorak može biti: stratifikovani uzorak, klaster uzorak, sistematski uzorak i višestapni uzorak.

Uzorkovanje putem prostog slučajnog uzorka znači da svaki element osnovnog skupa ima jednaku vjerovatnoću da bude izabran u uzorak (Weiss, 2012; Rosner, 2016). Procedura uzorkovanja podrazumijeva dvije etape: prvu etapu čini klasifikacija i popis svih elemenata nekog skupa (od 1 do N) prema određenom kriterijumu (početno slovo naziva sorte, redni broj ili šifra gazdinstva i sl.), a drugu etapu čini slučajno uzorkovanje određenog broja elemenata, putem tablice slučajnih brojeva ili softvera za generisanje slučajnih brojeva, čime nastaje *slučajni uzorak*. I ovdje se podrazumijeva činjenica da se posjeduje informacija o svim elementima nekog skupa, tj. da je u pitanju slučajno uzorkovanje iz konačnog i prebrojivog skupa.

Od neslučajnih (neprobabilističkih) uzoraka, najznačajniji su pogodni uzorak, subjektivni uzorak i kvota uzorak, a karakteriše ih nepoznavanje vjerovatnoće izbora elemenata u uzorak. *Pogodni uzorak* čine elementi koji su uključeni u uzorak zbog svoje pogodnosti, prosječnosti, dostupnosti ili lakoće prikupljanja. U ovom načinu uzorkovanja jako je važno ekspertsko znanje jer istraživač ciljano bira najprikladnije elemente za uključivanje u uzorak. *Subjektivni uzorak* nastaje prikupljanjem elemenata u uzorak od strane istraživača, pri čemu se elementi za uključivanje u uzorak biraju na osnovu subjektivne procjene istraživača.

Nedostatak ovog načina uzorkovanja je pristrasnost u fazi odabira elemenata i nemogućnost objektivne komparacije dvije ili više subjektivnih procjena različitih istraživača. Kvota uzorkovanje se sprovodi u dvije faze. U prvoj fazi vrši se podjela osnovnog skupa na podskupove (stratume), prema određenoj karakteristici. U drugoj fazi vrši se neslučajni izbor elemenata iz stratuma, do momenta ispunjavanja kvote tj. definisanog opsega uzorka (broja elemenata u uzorku), pri čemu se spajanjem ovih elemenata dobija *kvota uzorak*.

### **Ekspertski uzorci u biološkim i poljoprivrednim istraživanjima**

Posebnu vrstu uzoraka čine ekspertski uzorci (eng. *purposive sampling, judgemental sampling*), koji nastaju izborom elemenata za koje stručnjak u određenoj oblasti smatra da su „tipični“ za osnovni skup (Lavrakas 2008; Given *et al.*, 2008; Umihanić i sar., 2013). Najčešće je to izbor samo onih individua koje imaju određenu karakteristiku<sup>4</sup>. Ovo je metod uzorkovanja u kojoj prevashodni značaj ima znanje istraživača i kvalitet njegove ocjene u pogledu elemenata koje treba uključiti u uzorak. Ekspertski uzorak najčešće se koristi kada postoji vremensko ograničenje za formiranje uzorka ili kada je osnovni skup veoma mali tj. kada postoji ograničeni broj individua sa poželjnom karakteristikom. Metodološki, ekspertski uzorci imaju sličnosti sa neprobabilističkim uzorcima, poput pogodnog ili subjektivnog uzorka. Međutim, ekspert ima priliku da u jednoj od faza uzorkovanja primjeni slučajan izbor,

<sup>4</sup> Ukoliko ispitujeemo uticaj različitih količina kompleksnog NPK đubriva na rast i razvoj biljke, u uzorak uzimamo samo biljke đubrene NPK đubrivom. Ukoliko ispitujeemo stavove potrošača o kvalitetu određenog brenda, u ispitivanje možemo uključiti samo one individue koje su probale taj brend, inače se ne bi radilo o stavu potrošača tog brenda.

u cilju povećanja reprezentativnosti uzorka. Pritom, ostaje otvoreno pitanje koliko ispitanici sa datom karakteristikom učestvuju u strukturi populacije.

Karakter eksperatskih uzoraka značajan je za razmatranje eksperimentalnih uzoraka u biološkim i poljoprivrednim naukama. Kao što je navedeno, u skladu sa kardinalnošću osnovnog skupa razlikuju se i dva biometrička pristupa istraživanju: deskriptivni i inferencijalni. Inferencijalni biometrički pristup bazira se na uzorcima i podrazumijeva procjenu parametara osnovnog skupa na osnovu analize uzorka ili projektovanje novih, hipotetičkih osnovnih skupova (Mičić i sar., 2014a).

### **Eksperimentalni uzorci i hipotetički osnovni skupovi**

Značajan dio praktičnih istraživanja u poljoprivredi čine analize brojnih morfoloških, biohemijskih i fizioloških karakteristika biometričkih jedinica posmatranja (visina biljke, dužina klasa, masa 1000 zrna, prinos zrna, % proteina, skroba ili ulja u zrnu, boja egzokarpa ploda, čvrstoća, oblik i ukus ploda, sadržaj fenola, flavonoida, hormona, toksina i teških metala u biljnom mateijalu, broj somatskih ćelija u mlijeku, % mliječne masti, sadržaj  $\omega$ -3-masnih kiselina u animalnim proizvodima itd.).

Ova istraživanja često u sebi sadrže plan različitih tretmana kojima se pokušava postići očuvanje, smanjenje ili povećanje određene karakteristike, u odnosu na kontrolu (odsustvo datog tretmana ili standardno stanje ispitivane biometričke jedinice posmatranja).

Korektno sprovođenje ovih istraživanja u poljoprivrednim naukama, kao preduslov nameće poštovanje sljedećeg algoritma rada:

- 1) definisanje baznog osnovnog skupa i njegovih karakteristika;
- 2) definisanje plana eksperimenta;
- 3) uzorkovanje elemenata iz baznog osnovnog skupa;
- 4) sprovođenje tretmana na odabranim uzorcima;
- 5) projektovanje novih, hipotetičkih osnovnih skupova, usljed efekta tretmana;
- 6) komparacija baznog i hipotetičkog osnovnog skupa.

U praksi, definisanje osnovnog skupa svodi se na relativizaciju njegovog značenja, tako da osnovni skup za istraživača može predstavljati svaka grupa svih jedinki sa karakteristikom značajnom za ispitivanje i/ili odgovarajući tretman. U svakom slučaju, kardinalnost osnovnog skupa, kao i varijabilnost elemenata osnovnog skupa, od naročito su značaja za ova istraživanja.

Nakon što je ciljna grupa elemenata definisana, pristupa se izradi plana eksperimenta, koji sadrži analizu osobina biometričkih jedinica posmatranja, analizu vrste i

karakteristika *eksperimentalnog dizajna* i biometričkog testa za analizu i interpretaciju rezultata, kao i plan faza istraživanja.

Od naročitog značaja za razmatranje eksperimentalnih uzoraka je dizajn eksperimenta, koji u sebi sadrži dizajn tretmana i raspored eksperimentalnih jedinica (Bailey, 2008; Mičić, 2011). Dizajn tretmana podrazumijeva definisanje faktora u eksperimentu i njihovih modaliteta, a raspored eksperimentalnih jedinica podrazumijeva tri osnovna principa: njihovu repeticiju (ponavljanje), randomizaciju (slučajni raspored) i uvođenje blokova (Mičić i sar., 2015).

Ova tri principa zapravo su analogni nekim principima uzorkovanja tj. repeticija predstavlja ponavljanje nekih elemenata uzorka, randomizacija predstavlja slučajni razmještaj eksperimentalnih jedinica, a vrši se uz pomoć istih metoda kao kod prostog slučajnog uzorka, dok blokovima možemo smatrati stratume, koji su međusobno maksimalno heterogeni, pri čemu svaki blok (stratum) u sebi sadrži maksimalno homogene elemente (ponavljanja), u cilju izdvajanja dijela varijacije iz eksperimentalne pogreške (varijacije unutar tretmana), nastale pod uticajem heterogenosti klimatskih, edafskih ili orografskih faktora na oglednom polju.

Međutim, uzorkovanje elemenata iz baznog osnovnog skupa, kao treći korak u ovom algoritmu, uzrok je brojnih neslaganja i grešaka u istraživačkom radu.

Uzmimo za primjer potpuno slučajni blok sistem kao prilično čest dizajn eksperimenta i analizu varijanse, kao osnovni biometrički pristup za analizu rezultata ovog eksperimenta. To znači da je u ovom eksperimentu primjenjena repeticija i randomizacija eksperimentalnih jedinica, te da po jedna repeticija svakog od modaliteta faktora čini jedan blok. U ukupnoj varijaciji ovog eksperimenta razlikuju se varijacija između tretmana (objašnjena varijacija), varijacija unutar tretmana (neobjašnjena varijacija, eksperimentalna pogreška) i varijacija između blokova (indukovana varijacija).

Osnovni metodološki pristup u sistemu kontrola – tretmani u analizi varijanse čine dva koraka. Prvi korak je homogenizacija (ujednačavanje) svih faktora koji mogu uticati na dato istraživanje, a nisu definisani kao tretman u datom eksperimentu. Npr., u ogledima u ratarstvu, to znači da ako kao tretman u eksperimentu definišemo samo đubrenje biljaka, tada genotip, datum sjetve, sjetvena norma, navodnjavanje, zaštita itd. moraju biti iste za kontrolu i sve modalitete tretmana (ili sve tretmane i njihove modalitete ako se radi o ogledu sa više od jednog faktora). U ovom slučaju genotip, datum sjetve itd. su *fiksni faktori* u eksperimentu. Drugi korak u ovom pristupu jeste heterogenizacija faktora tretmana, koji je u ovom slučaju *varijabilan faktor* u eksperimentu. Ova heterogenizacija podrazumijeva definisanje modaliteta varijabilnog faktora i njihovu ekvidistantnu gradaciju (varijabilan faktor je đubrenje, a modaliteti

ovog faktora su 50 kg/ha, 100 kg/ha, 150 kg/ha, 200 kg/ha KAN-a i sl.). Ovdje, kontrolni skup biljaka neće se đubriti KAN-om, a imaće se 4 modaliteta đubrenja.

Homogenizacija fiksnih faktora u eksperimentu i heterogenizacija varijabilnih faktora u eksperimentu ima za cilj pravilnu ocjenu primjenjenih tretmana. Konkretno, razlike koje se jave između aritmetičkih sredina kontrole i tretmana mogu se pripisati samo varijabilnim faktorima, jer su fiksni faktori bili isti za svih pet varijanti. Ovo bi bila idealna situacija, s obzirom da u većini eksperimenata imamo faktore (čiji karakter je najčešće agro–ekološki) koje ne možemo kontrolisati, pa se javlja i varijacija unutar tretmana (između ponavljanja).

Ovdje se može postaviti nekoliko metodološki otvorenih pitanja: kako odabrati elemente (jedinke) iz baznog osnovnog skupa? Da li će se primjeniti slučajni ili neslučajni izbor? Da li nam je cilj maksimalno ujednačiti elemente u svrhu pravilne ocjene primjenjenih tretmana ili nam je cilj reprezentativnost uzorka? Takođe, kod eksperimentalnih uzoraka, može se doći do određenih generalizacija. Ove generalizacije mogu se kretati u dva pravca: 1) dolaženje do zaključka da će svaka slična primjena tretmana izazvati isti efekat kod selektivno odabranih jedinki ili 2) dolaženje do zaključka da će svaka slična primjena tretmana izazvati isti efekat kod osnovnog skupa u prirodi.

Jasno je da selektivnim odabirom elemenata tj. odabirom samo onih elemenata iz osnovnog skupa koji imaju prosječne, najlošije ili najbolje karakteristike vršimo neslučajan izbor, pa se ti eksperimentalni uzorci po svom pristupu približavaju pogodnom i ekspertskom uzorku. Na taj način, npr. odabirom najboljih jedinki, intenzivira se efekat tretmana, u odnosu na neke elemente iz baznog osnovnog skupa, ali u isto vrijeme se zanemaruje varijacija tog skupa.

Ovo je česta praksa u eksperimentalnom radu, međutim, na ovaj način generalizovati se može samo za selektivno odabrane jedinke, ali ne i za bazni osnovni skup, jer uzorak nije reprezentativan.

Znajući da se svaki uzorak uzima prvenstveno zbog karakterizacije osnovnog skupa, a ne zbog zaključivanja o uzorku, nameće se potreba da uzorak bude reprezentativan, što se omogućava slučajnim izborom elemenata iz osnovnog skupa u uzorak, na taj način obuhvatajući većinu varijacije u osnovnom skupu. Ovaj pristup omogućava generalizacije na nivou osnovnog skupa, a što je i poenta brojnih metodoloških pristupa i biometričkih mjera i testova u naučno–istraživačkom radu. Biometriku, kao i statistiku, najčešće zanima populacija a ne pojedinačni slučajevi (podaci).

Ipak, slučajnim izborom elemenata u svaku od varijanti eksperimenta (kontrola – tretmani) dobiće se nehomogeni elementi u okviru varijanti, pa će zaključivanje o

razlikama koje se javе između aritmetičkih sredina kontrole i tretmana biti i pod uticajem dodatne varijacije (jedne vrste varijacije unutar tretmana).

Efekat tretmana proizvodi (ne računajući kontrolu) nove osnovne skupove, hipotetičkog tipa, a to su skupovi koji sadrže sve elemente na koje je tretman uticao ili može potencijalno (hipotetički) uticati svaki put kada se primjeni taj tretman (varijabilni faktor).

Na kraju, u skladu sa datim algoritmom rada, samo ukoliko je izbor elemenata iz baznog osnovnog skupa bio slučajnog tipa, može se izvršiti komparacija elemenata hipotetičkog i baznog osnovnog skupa (koji u ovom slučaju služi kao kontrolni skup). Na nižem nivou, ova komparacija biće slična komparaciji aritmetičkih sredina kontrole i tretmana u jednom eksperimentu, koja se vrši testovima višestrukih upoređenja (Dunn-ov test, Tuckey-ev test, LSD-test, Duncan-ov test, Dunnett-ov test, Scheffe-ov test itd.) nakon utvrđivanja značajnog Fišerovog koeficijenta, jer su elementi kontrole (pod uslovom da su odabrani slučajno) umnogome slični elementima baznog osnovnog skupa.

Ako sada, na bazi prethodnih istraživanja na posmatranim uzorcima sa svojstvom Q (Tabela 1), primjenimo tretman  $\Psi$ , sa očekivanim efektom, koji se realizuje saglasno datoj funkciji:  $y_i = 2,5 \cdot x_i^{0,85}$ , očekivani efekti biće potpuno različiti (Tabele 4–6).

Tabela 4. Parametri baznog osnovnog skupa sa svojstvom Q datog u Tabeli 1, poslije primjene tretmana  $\Psi$ .

Aritmetička sredina baznog osnovnog skupa	Standardna devijacija baznog osnovnog skupa	Standardna greška u baznom osnovnom skupu	Koeficijent varijacije u baznom osnovnom skupu
$\mu = 47,12$	$\sigma = 7,83$	$\sigma_x = 1,43$	$V_k = 16,61$

Tabela 5. Efekti tretmana  $\Psi$  posmatrani izdvojeno na uzorcima iz osnovnog skupa biometričkih jedinica sa svojstvom Q.

Br.	Uzorak I $x_{1,i}$	Br.	Uzorak II $x_{1,2i}$	Br.	Uzorak III $x_{1,3i}$
1.	33,26	1.	42,58	1.	47,00
2.	36,86	2.	46,88	2.	56,74
3.	39,40	3.	51,57	3.	55,07
4.	37,65	4.	45,00	4.	54,38
5.	38,13	5.	48,79	5.	56,14
6.	35,33	6.	49,19	6.	54,57
7.	38,02	7.	46,58	7.	53,88



8.	36,57	8.	52,34	8.	59,33
9.	40,65	9.	50,00	9.	54,91
10.	41,33	10.	54,38	10.	57,07
<i>Uzorci</i>	<i>Uzorak I</i>	<i>Uzorak II</i>	<i>Uzorak III</i>		
$\bar{X}$	37,72	48,73	54,91		
$S$	2,41	3,57	3,22		
$S_{\bar{X}}$	0,76	1,13	1,02		
$V_k$	6,40	7,32	5,86		

Tabela 6. *t*-test značajnosti razlika centralnih tendencija svojstva Q uzoraka i osnovnog skupa iz koga su uzeti uzorci, poslije primjenjenog tretmana  $\Psi$ .

<i>Aritmetičke sredine</i>	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}_3$
$\bar{X}_0$	5,803**	0,884 <sup>nz</sup>	4,441**
$\bar{X}_3$	13,520**	4,069**	
$\bar{X}_2$	8,660**		

Saglasno uopštenim konstatacijama statističke literature, uzorci moraju da reprezentativno predstavljaju osnovni skup, što u datim eksperimentalnim uzorcima nije slučaj, pa se otvara pitanje metodološkog pristupa u definisanju eksperimentalnih uzoraka (Mičić i sar., 2014b; Mičić i sar., 2015).

Naime, već je pomenuto da se određena istraživanja na biološkom materijalu temelje na selektivnom izboru jedinki u eksperimentalne uzorke, a rezultati se tumače sa aspekta osnovnog skupa, koji *de facto* nije ni analiziran.

Na primjer, istraživanje rasta i razvoja sadnica ili podloga voćaka, uvijek podrazumijeva selektivni pristup, koji se u naučnim radovima tumači kao "tretman je primjenjen na ujednačenom biljnom materijalu". U zasadima voćaka, za primjenu različitih formulacija đubriva, uzimaju se stabla ujednačena po porastu, a *de facto* se vrši selektivni izbor stabala sa gotovo identičnim dijametrom debla od 10 cm iznad spojnog mesta. Isto tako, u istraživanjima uticaja prebiotika, hormona i različitih smješa na porast životinja, u metodama rada se navodi da je uzeto po deset mladunaca od 5 kg telesne mase. Odgovori primjenjenih tretmana u ovakvom eksperimentu neće se ponoviti kada se primjene na osnovni skup odakle su uzeti eksperimentalni uzorci. Ovi nonsensi se mogu isključiti vraćanjem metodološkog pristupa na početak, dakle na konstataciju da uzorci moraju biti reprezentativni za osnovni skup iz kojeg su uzeti.

Međutim, ako je eksperimentalno dokazana činjenica da selektivnim izborom jedinki u ovim istraživanjima, dobijamo visokoznačajno veće efekte tretmana, prethodno opisani nonsensi mogu se izbjeći uvođenjem definicije eksperimentalnih uzoraka na drugačiji način od uopštene definicije uzorka saglasno opštoj statističkoj literaturi. Za otvaranje ovog pitanja postoji dobar primjer u ratarstvu. Naime, dorada sjemena za sjetvu podrazumijeva selektivno izdvajanje sjemena određenih svojstava iz particije sjemena, a koja u osnovi predstavlja osnovni skup za određenu biljnu vrstu i sortu u jednom vegetacionom periodu.

Dakle, ako konstatujemo da na selektivno izabranim jedinkama imamo odgovarajuće efekte, odnosno da na eksperimentalnim uzorcima, koji nisu reprezentativni za osnovni skup iz koga se iste uzimaju, imamo određene efekte koji u osnovi predstavljaju značajno poboljšanje, onda je u tom slučaju potrebno primjeniti i odgovarajući metodološki pristup i logičko–matematičku argumentaciju rezultata, kako bi se izbjegla pogrešna uopštavanja i nonsensi prema opštoj statističkoj literaturi.

## ZAKLJUČAK

U skladu sa kardinalnošću osnovnog skupa (broj elemenata u osnovnom skupu) potrebno je planirati i metodološki pristup u biološko–poljoprivrednim istraživanjima, a koji u kontekstu biometrike podrazumijeva deskriptivni i inferencijalni pristup. Osnovu inferencijalnog pristupa, koji je u praksi zastupljeniji, čini odabir određenog broja elemenata iz osnovnog skupa, koji zajedno čine uzorak.

Osnovni preduslov za inferencijalne biometričke analize, logički zasnovane na principu indukcije, predstavlja reprezentativnost uzorka, koja se ostvaruje neselektivnim (slučajnim) izborom elemenata iz osnovnog skupa u uzorak te pravilnim obuhvatanjem ukupne varijacije osnovnog skupa.

Posebnu vrstu uzoraka u biološko–poljoprivrednim istraživanjima predstavljaju eksperimentalni uzorci, čiji metodološki fundament čini algoritam rada predstavljen u ovom istraživanju. Međutim, u praksi se često sreće selektivni izbor biometričkih jedinica posmatranja, na kojima će se primjeniti određeni tretman, čime se pogrešno naglašava efekat tretmana, ne vodeći računa o reprezentativnosti uzorka i varijaciji osnovnog skupa, pa težnja za statistički značajnim efektom tretmana za posljedicu ima nemogućnost generalizacija istog efekta na nivou populacije.

Stoga, nameće se potreba metodološki ispravnog pristupa u definisanju i analizi eksperimentalnih uzoraka i projektovanih (hipotetičkih) osnovnih skupova, tj. njihove pojmovne, prostorne i vremenske karakterizacije. To između ostalog podrazumijeva i karakterizaciju biometričkih jedinica posmatranja, kao dijela populacije koja na utvrđeni način reaguje na primjenu tretmana i proizvodi novi skup sa projektovanim svojstvom (realizacija genetskog potencijala određene kategorije sjemena, realizacija

rodnog potencijala različitih kategorija rodnog drveta kategorisanog prema mjestu porijekla i skeletnim nosačima tog rodnog drveta).

## LITERATURA

- Bailey, R.A. (2008): Design of Comparative Experiments. Cambridge University Press: UK. p. 1-330. ISBN-13 978-0-511-39340-2
- Borojević, S. (1974): Metodologija eksperimentalnog naučnog rada. Budućnost: Zrenjanin. Radnički univerzitet "Radivoj Čipranov". Novi Sad;
- Dubić, S. (1970): Uvođenje u naučni rad. Minerva: Subotica. Zavod za izdavanje udžbenika. Sarajevo. 131 str.;
- Given, L.M. (2008): The Sage encyclopedia of qualitative research methods. p. 1-1014. Thousand Oaks California: SAGE Publications. ISBN 978-1-4129-4163-1;
- Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J. (2009): The Elements of Statistical Learning. Springer: Springer Series in Statistics. Second Edition, p. 1-745.
- Koen, M., Nejgel, E. (1982): Uvod u logiku i naučni metod. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva: Beograd. Četvrto izdanje. 470 str.;
- Lavrakas, P.J. (2008): Encyclopedia of survey research methods. Thousand Oaks, California: SAGE Publications. DOI: <http://dx.doi.org/10.4135/9781412963947>. Print ISBN: 9781412918084;
- Lohr, S.L. (2010): Sampling: design and analysis. Cengage Learning. Brooks/Cole: Boston: MA, USA. Second Edition. p. 1-596. ISBN-13: 978-0-495-10527-5;
- Lovrić, M., Komić, J., Stević, S. (2017): Statistička analiza - metodi i primjena. Banjaluka: Grafid. JU Narodna i univerzitetska biblioteka Republike Srpske. II izdanje, 603 str. ISBN 978-99976-27-08-7;
- Mićić, N. (2011): Eksperimentalna biometrika. Laktaši: Grafomark. Univerzitet u Banjoj Luci. Poljoprivredni fakultet i Naučno voćarsko društvo Republike Srpske. ISBN 978-99938-93-18-9. 318 str.;
- Mićić, N. (2013): Elementarna biometrika. Laktaši: Grafomark. Institut za genetičke resurse i Hortikulturno naučno društvo Bosne i Hercegovine. ISBN 978-99955-783-1-2. 231 str.;
- Mićić, N. (2016): Elementarna biometrika. Laktaši: Grafomark. Hortikulturno naučno društvo Bosne i Hercegovine. ISBN 978-99955-783-2-9. Drugo izdanje. 241 str.;
- Mićić, N., Bosančić, B. (2012): Varijabilitet i koeficijenti varijacije u biološkim i poljoprivrednim istraživanjima. Agroznanje, 13(3): 331-342. DOI: 10.7251/AGRSR1203331M;
- Mićić, N., Bosančić, B. (2013): Zamke deskriptivnog i inferencijalnog statističkog pristupa u biološkim i poljoprivrednim naukama. Agroznanje, 14(4): 617-630. DOI: 10.7251/AGRSR1304617M;
- Mićić, N., Đurić, G., Kurtović, M. (2015): Neposredno i posredno uzročno–posledične veze u biometričkim istraživanjima, Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu. god. LX, broj 65/2: 37-47;

- Mičić, N., Đurić, G., Kurtović, M., Knezović, Z. (2014a): Biometrika kao metoda naučnog istraživanja u biološkim i poljoprivrednim naukama. Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, god. LIX, broj 64/2: 169-177;
- Mičić, N., Đurić, G., Važić, B. (2009): Biometrika i eksperimentalna statistika. *Agroznanje*. 10(3): 5-16;
- Mičić, N., Hajder Đ., Kurtović, M. (2016): Fuzzy logic and logical-mathematical argumentation in biometrical methods and inferences. Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, god. LXI, broj 66/2: 219–235, <https://ppf.unsa.ba/casopis.php>
- Mičić, N., Kurtović, M., Knezović, Z., Bosančić, B. (2014b): Cilj istraživanja i logičko–matematička argumentacija rezultata biometričkih analiza. Radovi Poljoprivredno–prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, god. LIX, broj 64/2: 151-160;
- Prodanović, T., Mičić, N. (1996): Naučno istraživanje – metode, procedura, jezik i stil. Agronomski fakultet Čačak i Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija. ISBN 86-82107-11-2, 152 str.;
- Rosner, B. (2016): Fundamentals of biostatistics. Cengage Learning. Boston: MA, USA. Eighth Edition. p. 1-927. ISBN: 978-1-305-26892-0;
- Stanković, J., Ralević, N.R., Ljubanović-Ralević, I. (2002): Statistika sa primenom u poljoprivredi. Beograd: Mladost biro., III izdanje, 475 str.
- Umihanić, B., Fazlović, S., Alić, M., Brdarević, F. (2013): Menadžment kvaliteta i poslovne izvrsnosti. Udruženje za poslovnu izvrsnost. Harfograf: Tuzla. 403 str.;
- Vasilj, Đ. (2000): Biometrika i eksperimentisanje u bilinogojstvu. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu. Hrvatsko agronomsko društvo. Graphic art: Zagreb. ISBN 953-6485-12-5. 320 str.;
- Weiss, N.A. (2012): *Introductory statistics*. Addison-Wesley. p. 1-759. ISBN 978-0-321-69122-4.

## **EXPERIMENTAL SAMPLES IN A BIOLOGICAL-AGRICULTURAL RESEARCH**

### **Summary**

The issue of samples in biological-agricultural biometrical analysis of the application of treatments aiming to project (produce by an induced treatment effect) new population, representing new technological procedures or new application of knowledge, requires significant methodological determinations. The most important open question relates to the detection, i.e. selection of biometrical units with certain characteristics that tend to respond to the applied treatment and also to their status and representation in the basic population - the population from which the experimental biometrical units of observation are being sampled for the treatment application. In biological-agricultural biometrical analysis (inferential statistical procedures) samples

are not usually a representative evaluation of the population, so the methodological definition of the applied treatments and their practical application must be clearly determined according to the basic population. Otherwise, applied treatments on a part of the population that is representative to the basic population will not produce the projected effect (experimentally proven result of a particular study), making practical results of such experiments become absurd. In this research, an overview of the methodological approaches to the definition of population and samples tend to be applied in biological and agricultural biometrical analysis, is presented.

## Index autora / Authors' index

### B

Bešta-Gajević Renata	79
Blažinkov Mihaela	20
Bošnjak Luka	46, 59
Brčina Tijana	204*
Busuladžić Ahmed	189*

### C

Čadro Sabrija	90
Čanić Berin	112
Čengić-Džomba Senada	112*
Čustović Hamid	9

### D

Dahija Sabina	79
Dokso Admir	102
Durmić Velida	171
Đorđević Milošević Suzana	102
Đug Samir	171
Džomba Emir	112

### F

Filipović Adrijana	20
--------------------	----

### G

Gajević Mahir	157
Gajić Andrej	146
Ganjgo Ibrahim	216
Gaši Fuad	90
Grahić Jasmin	90

### H

Hadžić Dženan	112
Hajder Đurađ	230*
Hodžić Snježana	204
Homoraš Adil	171

### J

Jerković-Mujkić Anesa	39,79
Jurković Dragan	46, 59, 68

**K**

Kahrić Adla	146*
Karić Nedžad	68
Knezović Zrinka	20
Kohnić Aida	46
Konjić Almira	90*
Kurtović Mirsad	90,230

**L**

Ljuša Melisa	9*
--------------	----

**M**

Mićić Nikola	230
Misilo Marija	9
Muhamedagić Samir	121*, 135*, 146
Mujčinović Alen	90
Muratović Salko	112
Musić Osman	90
Mušović Aldijana	157*

**O**

Okić Arnela	90
Ostojić Ivan	46*, 59*, 68
Operta Sabina	216*

**P**

Pavličević Jerko	135
Petrović Danijela	46, 59
Pilić Selma	79*

**R**

Raščić Belma	39*
Rustempašić Alma	102

**S**

Sarić Zlatan	189
Savić Nebojša	135
Selimović Amel	204
Šikora Sanja	20

**Š**

Šljuka Senad	157
Škrijelj Rifat	157

Škulj Azra	112
<b>T</b>	
Trakić Sabina	171*
Trožić-Borovac Sadbera	157, 171
<b>U</b>	
Uzunović Mirza	90
<b>V</b>	
Vasilj Višnja	20*
Vilušić Milica	204
<b>Z</b>	
Zečević Ervin	102*
Zovko Mladen	46, 59, 68*



## IN MEMORIAM

### Akademik prof. dr Taib Šarić (1934-2019)



Akademik profesor Taib Šarić je rođen 1934. godine u Čapljini. Diplomirao je, magistrirao i doktorirao iz agronomije na Univerzitetu u Sarajevu. Studirao je postmagistarski studij u SAD (Kansas State University i Bucknell University, Pennsylvania) i postdoktorski studij u Holandiji (Wageningen Agric. Univ.). Radio je dvije godine naučne projekte iz južnih ratarskih kultura u Indiji (Indian Agric. Res. Institute, New Delhi). Profesor je emeritus na Poljoprivredno-prehrambenom fakultetu u Sarajevu na kojem je izvodio nastavu iz više postdiplomskih kurseva, najviše iz herbologije. Objavio je preko 100 naučnih i oko 600 stručnih radova iz oblasti ratarstva, agroekologije, herbologije i zaštite okoliša, koji su predmet njegovih istraživanja tokom pet decenija rada. Učestvovao je u obrazovanju 44 generacije studenata agronomije. Objavio je 25 knjiga (sa ponovljenim izdanjima 43 knjige) iz navedenih oblasti - univerzitetske i srednjoškolske udžbenike i priručnike za praksu. Njegov udžbenik *Opšte ratarstvo* (4 izdanja) korišten je na većem broju poljoprivrednih fakulteta u bivšoj Jugoslaviji, a njegov *Atlas korova* (5 izdanja), sa nomenklaturom na devet jezika, korišten je i koristi se u tridesetak zemalja svijeta.

Godine 1977. osnovao je na Poljoprivrednom fakultetu u Sarajevu opštejugoslovenski postdiplomski studij iz herbologije, prvi takav u Evropi. Na njemu su predavali i predavači iz Švajcarske, Italije, Hrvatske, Srbije i Makedonije.

Izlagao je naučne referate na međunarodnim simpozijima i kongresima u Upsali, Moskvi, Varšavi, Lajpcigu, Brnu, Bratislavi, Keszthelyu (Mađarska), Poznanju, Brajtonu, Gentu, Visakapatnama (Indija), Sidneju itd. Bio je jedan od osnivača Jugoslovenskog društva za proučavanje i suzbijanje korova (u Sarajevu, 1973) i više godina njegov predsjednik. Jedan je od osnivača European Weed Research Society (EWRS, Pariz, 1975) i dugo vremena član raznih njegovih organa (Scientific Committee, Educational Committee, National Representative of Yugoslavia i Bosnia and Herzegovina). Od svih osnivača EWRS, najduže je bio aktivan u njemu (30 godina). Predsjedavao je evropskim simpozijima o korovima u Upsali, Parizu i Lisabonu.

Kao gost indijske vlade, 1975. godine držao je plenarni referat na Indijskom kongresu nauke, Sektor za poljoprivredu, o metodama unapređenja ratarske proizvodnje. Tada je držao predavanja na postdiplomskim studijama na poljoprivrednim univerzitetima u New Delhiju, Hajderabadu i Bengaluru. Bio je inostrani recenzent u više disertacija branjenih na stranim univerzitetima. Takođe je bio član komisija za izbor redovnih profesora na stranim univerzitetima. Tokom tri decenije bio je glavni i odgovorni urednik tri časopisa iz poljoprivrede. Poseban doprinos je dao naučnom časopisu “*Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta*”. Pokrenuo je i skoro 20 godina bio glavni urednik međunarodnog naučnog časopisa *Herbologia*. Za naučni rad i stručnu publicistiku dobio je nagradu “Veselin Masleša”. Dva puta je nominiran za laureata World Food Prize (neformalna Nobelova nagrada za hranu i poljoprivredu). Član je Akademije nauka i umjetnosti BiH.

Akademik profesor Taib Šarić je dao izuzetno velik doprinos razvoju nauke o korovima i njihovom suzbijanju u bivšoj SFRJ, a posebice u Bosni i Hercegovini, koju su još prvih decenija prošlog vijeka, započeli Komša i Vasković. Kao jedan od vodećih evropskih naučnika iz područja herbologije, akademik prof. Šarić je u posljednjih pedesetak godina proučavao sa raznih aspekata korovsku floru u našoj zemlji, kao i pojedine načine suzbijanja korova. To se posebno odnosi na proučavanje primjene herbicida, što je činilo osnovu za njihovu primjenu u praksi. Objavio je veliki broj naučnih i stručnih radova iz ove oblasti u našoj zemlji i inostranstvu, putem kongresa, simpozija, savjetovanja i saopštenja. Posebno veliki doprinos za nauku i praksu su prve objavljene knjige iz ove oblasti, kao što je knjiga “Korovi i njihovo uništavanje herbicidima”, koja je doživjela sedam izdanja, zatim “Atlas korova” u boji, koji je štampan u pet izdanja, sa nomenklaturom korova na devet jezika, zbog čega je korišten u više zemalja svijeta, kao i niz drugih knjiga koje su navedene u biografiji. Prije 30 godina na Poljoprivrednom fakultetu u Sarajevu osnovan je prvi u Evropi postdiplomski studij iz Herbologije pod rukovodstvom akademika profesora Šarića. Na njemu se obrazovalo sedam generacija herbologa, kojima su predavali, pored naših profesora, i nastavnici iz Zagreba, Beograda, Skoplja, Švicarske i Italije. Na Fakultetu je odbranjeno više magistarskih i doktorskih teza iz herbologije pod njegovim mentorstvom. Tako se na izvjestan način stvarala i razvijala bosanskohercegovačka herbološka škola, čiji je tvorac i dugogodišnji prvi čovjek bio i ostao akademik prof. dr Taib Šarić. Ne bez razloga, Jugoslovensko društvo za proučavanje i suzbijanje korova osnovano je upravo u Sarajevu 1971. godine, u istoj sali Poljoprivrednog fakulteta u kojoj je tih dana održan Međunarodni simpozij o korovima. Akademik Taib Šarić je bio jedan od osnivača tog društva, više godina njegov predsjednik, a bio je jedan od osnivača i Evropskog društva za proučavanja korova (European Weed Research Society) i dugo godina član njegovog predsjedništva. Bio je predsjednik Organizacionog odbora više jugoslovenskih kongresa i BiH simpozija o korovima na kojima je često izlagao plenarne referate. Profesor Šarić je bio pozivan i na druge naučne skupove širom zemlje i inostranstva, najčešće sa glavnim uvodnim referatima. Prof. dr. Taib Šarić je jedan od najcitiranih naučnika iz BiH, pa i šire.

Profesorova aktivnost i rad u struci nije prestajala ni za vrijeme agresije na BiH (1992-1996). Pod kišom granata i borbom za goli život, i nakon gubitka kćerke Jasne, koja je bila najveće blago porodice Šarić, profesor svoju snagu i borbu za istinu i pravdu pretače u nekoliko izuzetno vrijednih udžbenika i knjiga. Za oskudnu poljoprivrednu literaturu profesor objavljuje prvu knjigu „Specijalno ratarstvo” u Bosni i Hercegovini. Već odmah nakon rata 1997. godine pod njegovim rukovodstvom počinje ponovo sa radom Herbološko društvo BiH, a 2000. godine u Tuzli je održano prvo savjetovanje o korovima, a iste godine u junu izlazi i prvi broj našeg časopisa o korovima i njihovom suzbijanju *Herbologia*, čiji je osnivač i glavni i odgovorni urednik do danas.

Prof. Šarić je rukovodio izradom na desetine doktorskih disertacija i magistarskih teza iz oblasti herbologije i ratarstva, kako u BiH, tako i šire.

Iz ovog kratkog pregleda se vidi da je akademik profesor Šarić jedna od najistaknutijih ličnosti ne samo u našoj zemlji već i u inostranstvu. Njegova naučna djela, studije, udžbenici, knjige, monografije, naučni, stručni i pedagoški rad su ogroman doprinos svjetskoj i domaćoj nauci i praksi. Svoje znanje i dugogodišnje iskustvo nije čuvao za sebe, već je s ljubavlju i nesebičnim, otvorenim, prijateljskim načinom prenosio na svoje saradnike, kolege, studente i obične ljude željne više znanja o ovoj oblasti. Naravno, vrijednost koja ostaje za sva vremena i generacije koje dolaze su njegova djela pretočena u pisanu riječ putem raznih publikacija, su ogroman doprinos za baštinu Bosne i Hercegovine.

Bio je izuzetan čovjek, fantastičan i omiljen predavač, izuzetno cijenjen i poštovan od strane kolega i studenata.

Poštovani profesore, akademiče Šariću, hvala Vam u ime svih znanih i nezvanih, za Vašu veliku nesebičnu pomoć svima nama, kako u naučnom, stručnom, tako i u svakom drugom vidu usavršavanja i napredovanja.

Prof. dr Ševal Muminović

## UPUTSTVO ZA OBJAVLJIVANJE RADOVA

Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu (Radovi) su godišnjak u kojem se objavljuju naučni, izuzetno i stručni radovi, te izvodi iz doktorskih i magistarskih teza odbranih na Poljoprivredno-prehrambenom fakultetu Univerziteta u Sarajevu (Fakultet).

Radovi imaju karakter naučnog časopisa i kao takvi podliježu propozicijama za takve publikacije. Od broja 52 Radovi su indeksirani kod CAB Publishing - UK.

Članci za objavljivanje se klasificiraju, po preporuci UNESCO-a, u ove kategorije: naučni radovi, prethodna saopštenja, pregledni i stručni radovi. Autori predlažu kategoriju za svoje članke, recenzenti preporučuju, a konačnu odluku o kategorizaciji donosi Redakcija Radova. Naučni radovi sadrže rezultate izvornih istraživanja. Njihov sadržaj treba da bude izložen tako da se eksperiment može reprodukovati i provjeriti tačnost analiza i zaključaka. Prethodna saopštenja sadrže one značajne naučne rezultate, koji zahtijevaju hitno objavljivanje. Ova istraživanja mogu biti vremenski kraća od uobičajenih. Pregledni radovi sadrže pregled neke problematike na osnovu već publikovanih tekstova, koja se u pregledu analizira i diskutuje. Stručni radovi su korisni prilozi iz područja struke, koji ne predstavljaju izvorna istraživanja.

Članci se pišu na bosanskom, srpskom, hrvatskom ili engleskom jeziku. Na početku rada treba pisati naziv rada (velikim slovima) na maternjem i na engleskom jeziku, a nakon toga ime (imena) autora. Naziv radne organizacije autora upisuje se u fusnotu (Ariel 7). Ispod imena autora obavezno se upisuje i kategorija rada.

U časopisu se publikuju radovi iz oblasti: poljoprivredna biljna proizvodnja, animalna proizvodnja, prehrambene tehnologije i održivi razvoj agrosektora i ruralnih područja. Poželjno je da članci naučnog karaktera imaju uobičajenu strukturu naučnog rada i to: rezime (na bosanskom, srpskom i hrvatskom), uvod, pregled literature (može se dati i u uvodu), materijal i metode rada, rezultati istraživanja, diskusija (može biti objedinjeno sa rezultatima istraživanja), zaključci, literatura, summary na engleskom jeziku. Rezime i summary na našim jezicima i engleskom jeziku mogu imati maksimalno 200 riječi, uz obavezno upisivanje ključnih riječi. U spisku literature daju se samo autori i radovi koji se spominju u tekstu. Imena autora u tekstu pišu se spaciorirano (sa razmakom). Latinska imena biljaka, životinja i mikroorganizama treba (osim imena autora) pisati kurzivom. Tabele, grafikoni i slike moraju imati svoj naziv, a ako ih je više i broj. Broj i naziv tabele pišu se u istom redu, iznad tabele, dok se broj i naziv grafikona, crteža i slika pišu ispod tih priloga. U tabelama, grafikonima i slikama naslove, zaglavlja i objašnjenja poželjno je dati i na stranom jeziku. Grafikone i crteže treba raditi isključivo u crno-bijeloj tehnici. Tabele uokviriti linijama debljine 1/2 pt, bez sjenčenja pojedinih ćelija, ili redova i kolona. Slike i grafički prikazi treba da budu besprijekorne izrade radi kvalitetne reprodukcije u knjizi.

Radovi, po pravilu, ne treba da budu duži (sa priložima) od 12 kucanih stranica. Izvodi iz magistarskih teza mogu biti dugi do 15, a iz doktorata do 25 kucanih stranica.

Za sadržaj članka odgovara autor. Članci se prije objavljivanja po "double blind" principu recenziraju od strane dva nezavisna recenzenta. Redakcija, uz konsultovanje sa autorima, zadržava pravo manjih redaktorskih i jezičkih korektura u člancima.

Autor dostavlja Redakciji rukopis putem e-maila uređen prema uputstvima za pisanje radova. Prilikom slanja radova Redakciji obavezno je naznačiti kontakt adresu i e-mail adresu u posebnom dokumentu.

Svi prispjeli rukopisi će biti podvrgnuti inicijalnoj provjeri u pogledu zadovoljenja kriterija oblasti iz kojih časopis objavljuje radove i tehničke pripreme rukopisa u skladu sa uputstvima autorima.

Podneseni rukopis nakon inicijalne provjere od strane Redakcije može biti odbijen bez recenzija, ako uredništvo ocijeni da nije u skladu s pravilima časopisa. Autoru će u roku od 20 dana biti upućena informacija o inicijalnom prihvatanju rada ili razlozima za njegovo neprihvatanje.

Po završetku postupka recenziranja koji, u pravilu, ne bi trebao trajati duže od tri mjeseca Redakcija, na osnovu konačnih preporuka recenzenata, donosi odluku o objavljivanju, odnosno neobjavljivanju rada. O svojoj odluci Redakcija informiše autora, uz informaciju o broju i terminu izlaska časopisa u kojem će rad prihvaćen za objavljivanje biti štampan.

Elektronsku verziju rada treba pripremiti u Wordu u formatu stranica 170 x 240 mm, sa sljedećim veličinama margina: gornja i donja 2,2 cm, lijeva 2,0 cm, a desna 1,5 cm, te formatirati parne i neparne stranice. Isključivo koristiti font Times New Roman, veličina 11, dok za fusnote treba koristiti font Arial, veličina 7. Tekst treba da je obostrano poravnat. Nazive poglavlja u radu treba pisati velikim slovima, boldirano i sa srednjim poravnanjem, te jednim redom razmaka od teksta.

Prilikom formatiranja članka ne treba uređivati zaglavlje i podnožje članka (Header and Footer) niti numerisati stranice.

Autorima kojima engleski jezik nije maternji, strogo se preporučuje da obezbijede profesionalnu korekturu teksta koji će biti recenziran. Prilikom pisanja na engleskom jeziku treba koristiti jasne engleske izraze bez žargona i izbjegavati duge rečenice. Strogo se preporučuje da autor prije slanja rukopisa izvrši provjeru teksta na engleskom jeziku koristeći opciju „spelling and grammar“. Prihvatljivi su i britanski i američki „spelling“, ali on mora biti konzistentan u cijelom tekstu rada na engleskom jeziku.

Prije pisanja članaka za Radove, poželjno je da autori pogledaju formu radova već objavljenih u jednom od zadnjih brojeva ili da na web stranici: [www.ppf.unsa.ba](http://www.ppf.unsa.ba), pronađu uputstva sa primjerom pravilno uređenog članka.

Pridržavajući se ovih uputstava, autori ne samo da olakšavaju posao Redakciji, nego i doprinose da njihovi radovi budu pregledniji i kvalitetniji. Više informacija, autori mogu dobiti obraćanjem Redakciji na e-mail: [radovi@ppf.unsa.ba](mailto:radovi@ppf.unsa.ba). Odštampani Radovi se dopremaju u biblioteku Fakulteta, odakle se vrši slanje Radova u AGRIS i CAB Publishing – UK u pisanoj i elektronskoj verziji, odnosno svaki objavljeni broj Radova posebno u PDF i Word formatu. Biblioteka vrši korespondenciju i razmjenu

Radova s drugim institucijama u zemlji i inostranstvu, te šalje sveske Radova autorima i koautorima.

Redakcija

## INSTRUCTION FOR PUBLISHING PAPERS

“Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu” (“Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences of University of Sarajevo), hereinafter: “Radovi” (the “Works”) is an almanac in which (original) scientific papers, exceptionally professional papers, and also some excerpts from doctoral/PhD or master theses defended at the Faculty of Agriculture and Food Sciences (the Faculty) of University of Sarajevo (Univerzitet u Sarajevu) are published.

“Radovi” (the “Works”) has a character of scientific magazine and, as such, is subject to the propositions for such publications. Since its issue no. 52, “Radovi” (the “Works”) has been indexed at CAB Publishing - UK.

Articles for publishing are classified, according to the recommendation by the UNESCO, into these categories: (original) scientific papers, previous statements, (scientific) review and professional papers. The authors propose the category for their articles, critics recommend it and final decision on their categorisation is made by the Editorial Board of the “Radovi” (the “Works”). (Original) Scientific papers contain results of authentic researches. Their content should be presented in such a manner that an experiment may reproduce and verify accuracy of the analyses and conclusions. Previous statements contain those significant scientific results that require urgent publishing. These researches can be shorter in time than the usual ones. (Scientific) Review papers contain an outline of certain problems on the basis of previously published texts that are analysed and discussed about in the review. Professional papers are useful articles/works from the professional domain that do not present authentic researches.

Articles are written in one of the three official languages of BiH (Bosnian/Serbian/Croatian) or English. The title of the paper should be written at the beginning of the paper (in capital letters) in one’s mother tongue and in English and after that the author’s name (authors’ names). The author’s working organisation name is written in the footnote (Ariel 7). It is mandatory to write out the category of the paper below the author’s name as well.

Papers from the areas of: agricultural plant production, animal production, food technologies and sustainable development of agro-sector and rural areas are published in the journal.

It is desirable that articles of scientific character have common structure of a scientific paper, namely: summary in one of the three official languages of BiH (Bosnian/Serbian/Croatian), introduction, references (may be given in the introduction, too), material and methods, results of research, discussion (may be integrated with results of research), conclusions, bibliography and summary in English. Summary in one of the three official languages of BiH (Bosnian/Serbian/Croatian), and summary in English respectively may have maximum 200 words, with mandatory enlisting of the key words. In the list of bibliography, only authors and papers that are mentioned in the text are given. The authors’ names in the text are written with expanded spacing. Latin names of plants, animals and micro-

organisms should be written in italics. Tables, graphs and pictures must have their title and also if they are numerous, their number. The number and the title of the table are written in the same row above the table while the number and the title of the graph, drawing and pictures are written below them. It is desirable to give titles, headings and explanations in the tables, graphs and pictures in the foreign language, too. Graphs and drawings should be done exclusively in black-and-white technique. Tables should be framed in lines of thickness of 1/2 pt, without shading of individual cells or rows and columns. Pictures and graphic illustrations should be done impeccably in order to be top-quality reproduced in the book.

Papers, as a rule, should not be longer than 12 typed pages (with appendices). Excerpts from master theses may be even up to 15 pages, and from doctoral/PhD theses up to 25 typed pages.

The author is responsible for the contents of the article. Prior to their publishing, articles are reviewed under "*double blind*" principle by two independent reviewers. The Editorial Board, in consultations with the authors, reserves the right to minor editorial and linguistic corrections in the articles.

The author submits one's manuscript to the Editorial Board by the means of e-mail edited according to the instructions for writing papers. On the occasion of sending papers to the Editorial Board it is obligatory to indicate the contact address and e-mail address in a separate document.

All the submitted manuscripts shall be subject to initial check in terms of meeting the criteria of the field which the magazine publishes papers from as well as technical preparation of the manuscript in accordance with the instruction to the authors.

Upon the initial check by the Editor, the submitted manuscript may be rejected without review if the Editor evaluates it is not in accordance with the journal's rules. Within the term of 20 days, the notification shall be sent to the author about either initial acceptance of the paper or reasons for its rejection.

Upon completion of the reviewing procedure which, as a rule, should not last longer than three months, the Editorial Board, on the basis of final recommendations by reviewers, makes decision on publishing the pertinent paper or not. The Editorial Board then informs the author about their decision, in addition to the information on the issue and term of the article publishing which the paper accepted for publishing is going to be published in.

Electronic version of the paper should be prepared in Word, in page format of 170 x 240 mm, with the following size of margins: the upper and lower ones of 2,2 cm, the left one of 2,0 cm and the right one of 1,5 cm and then the even and odd pages formatted. The font of Times New Roman, size 11, is to be exclusively used, while for footnotes the font of Arial, size 7 should be used. The text should be aligned on both sides. The title of chapters in the paper should be written in capital letters, bold and with medium alignment as well as with one row of space from the text.

While formatting the article, neither header and footer nor page numbering should be arranged.



Authors whose mother tongue is not English are strongly recommended to provide professional corrections to the text that is going to be reviewed. While writing in English, clear English phrases without jargon should be used and long sentences should be avoided. Prior to sending the manuscript, it is strongly recommended for the author to carry out checking the text in English by using the option of “spelling and grammar“. Both British and American spelling is acceptable but it must be consistent throughout the text of the paper in English.

Before writing articles for the “Radovi” (the “Works”), it is desirable that authors have a look at the form of papers having already been published in one of the recent issues or to find the instruction with an example of properly arranged article on the web site: [www.ppf.unsa.ba](http://www.ppf.unsa.ba).

By adhering to these instructions, authors not only facilitate the job for the Editorial staff but also contribute to their papers to be presented better and in a more qualitative manner. Authors can get more information by contacting the Editorial Board at the e-mail: [radovi@ppf.unsa.ba](mailto:radovi@ppf.unsa.ba)

Printed copies of the “Radovi” (the “Works”) are delivered to the Faculty’s Library where the “Radovi” (the “Works”), that is, each published issue of the “Radovi” (the “Works”) is sent from, to AGRIS and CAB Publishing – UK, both in written and electronic version, separately in PDF and Word format. The Library carries out the correspondence and exchange of the “Radovi” (the “Works”) with other institutions in the country and abroad as well as sends volumes of the “Radovi” (the “Works”) to the authors and co-authors.

Editorial Board