

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Karolina Z. Sunjog

**EKOGENOTOKSIKOLOŠKA PROCENA
KVALITETA POVRŠINSKIH VODA
KOMET TESTOM NA RAZLIČITIM
TKIVIMA KLENA
(*Squalius cephalus* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Karolina Z. Sunjog

**ECOGENOTOXICOLOGICAL
EVALUATION OF SURFACE WATER
QUALITY WITH COMET ASSAY ON
DIFFERENT TISSUES OF
EUROPEAN CHUB
(*Squalius cephalus* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

Dr Branka Vuković-Gačić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Mirjana Lenhardt, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Komisija:

Dr Zoran Gačić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Dr Stoimir Kolarević, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane_____2016. godine

Želela bih da izrazim svoju duboku zahvalnost svojoj mentorki prof. dr Branki Vuković-Gačić, na stručnim savetima, nesebičnoj pomoći i utrošenom vremenu u realizaciji i izradi ove disertacije. Zahvaljujem Vam što ste učinili mogućim početak i razvoj moje naučne karijere i što ste svojim stručnim vođstvom pomogli njen napredak i omogućili da dođem tu gde jesam.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Mirjani Lenhardt na velikoj pomoći, korisnim i stručnim savetima tokom realizacije istraživanja i konačnoj izradi ove disertacije.

Dr Zoranu Gačiću želim da se zahvalim na stručnoj pomoći, sugestijama i konstruktivnim savetima i predlozima, koji su značajno doprineli samoj izradi i kvalitetu ove teze.

Dragim kolegama Stoimiru Kolareviću i Margareti Kračun-Kolarević dugujem veliku zahvalnost za nesebičnu pomoć u eksperimentalnom radu, koji se povremeno odigravao i tokom noći.

Dragoj kolegini Jovani Kostić želim da zahvalim pre svega na pruženoj pomoći i svim konstruktivnim savetima koji su pomogli u izradi ove disertacije.

Želela bih da se zahvalim dr Željki Višnjić-Jeftić, dr Stefanu Skoriću i dr Vesni Đikanović na pomoći tokom uzorkovanja i obrade materijala.

Svim članovima Odseka za prirodne resurse i životnu sredinu, Grupe za ihtiologiju i akvakulturu, dugujem zahvalnost za pruženu stručnu pomoć tokom ovih istraživanja, kao i za prijatan i kolegijalan odnos.

Veliko hvala Agenciji za zaštitu životne sredine Republike Srbije i Gradskom zavodu za javno zdravlje – Beograd za ustupljene podatke.

Profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju dr Jeleni Knežević-Vukčević, dr Slaviši Stankoviću, dr Tanji Berić, dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić-Ćulafić dugujem veliku zahvalnost pre svega na pruženom teorijskom i praktičnom znanju, kao i na kolegijalnom i prijateljskom odnosu tokom svakodnevnog rada.

Profesoru Karoly Heberger-u želim da izrazim zahvalnost za pomoć u statističkoj obradi dela rezultata, koji su značajno doprineli kvalitetu ove teze.

Profesoru Nebojši Vasiću želim da se zahvalim na ukazanoj pomoći i uspehu veze geologije i biologije.

Mojim dragim kolegama Bojani Vasiljević, Tamari Janakiev, Ivici Dimkiću i Ivanu Nikoliću zahvaljujem što svaki dan na poslu odiše prijatnom i prijateljskom atmosferom.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su u okviru nacionalnog projekta osnovnih istraživanja OI173045 „Ribe kao bioindikatori stanja kvaliteta otvorenih voda Srbije”, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Mojoj porodici dugujem veliku zahvalnost pre svega što su me naučili da shvatim koliko je obrazovanje važno u životu svakog čoveka i što su mi bezuslovno omogućili da ga steknem.

Mom dragom Aleksandru želim da se zahvalim na svom strpljenju, podršci i ljubavi koju mi je pružio. Mom najdražem sinu Ivi, koji daje smisao mom životu pa i ovom radu, obećavam da ću nadoknaditi svo uskraćeno vreme.

Ovaj rad posvećujem mojim dragima, baki Olgi i deda Miši

Ekogenotoksikološka procena kvaliteta površinskih voda komet testom na različitim tkivima klena (*Squalius cephalus* L.)

Rezime

Intenzivni procesi proizvodnje i oslobađanje velikog broja hemijskih agenasa, kao i metala u spoljašnju sredinu, najvećim delom u rečne tokove, dovela je do potrebe za primenom testova koji će detektovati njihov genotoksični potencijal. Mnogi akvatični organizmi, među kojima bitno mesto zauzimaju ribe, imaju sposobnost bioakumulacije genotoksičnih agenasa u tkivima, te se mogu koristiti kao bioindikator i u ekogenotoksikološkim studijama. RIBE se smatraju za jedne od značajnijih indikatora za procenu nivoa metala u slatkovodnim sistemima, jer su u vrhu lanca ishrane sa mogućnošću akumulacije visokih koncentracija pojedinih metala.

Procena genotoksičnosti površinskih voda vršena je na osnovu detekcije oštećenja DNK molekula alkalnim komet testom, testom elektroforeze pojedinačnih ćelija, (engl. *Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE), u krvi, jetri i škrgama klena (*Squalius cephalus* L.). Rangiranje parametara za procenu DNK oštećenja: dužina repa komete (TL), intenzitet repa komete (TI) i „Olive tail moment” (OTM), urađeno je metodom SRD (engl. *Sum of Ranking Differences*). Paralelno sa komet testom, u jetri i škrgama, pratila se i koncentracija metala i metaloida pomoću induktivno spregnute plazme – optičko emisijne spektrometrije (ICP - OES). Analiza metala i metaloida je urađena i u mišićima i gonadama istom metodom.

Procena ekološkog statusa površinskih voda određivala se na dve akumulacije, Garaši i Zlatar (Uvac) i dve reke, Peštan i Beljanica tokom 2011/2012 godine.

Procena kvaliteta vode određena je na osnovu fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara. Analizirano je 7 grupa mikroorganizama: ukupni koliformi, fekalni koliformi, fekalne enterokoke, aerobni mezofili, aerobni heterotrofi, heterotrofi i oligotrofi. Poreklo zagađenja dobijeno je na osnovu odnosa fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka F/E, a status samoprečišćavanja dobijen je iz odnosa heterotrofa i oligotrofa O/H. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) je korišćen kao pokazatelj odnosa različitih grupa mikroorganizama tokom višemesečnog monitoringa.

Osnovne procene kvaliteta vode, na osnovu analize fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara, izdvojile su akumulacije, Uvac i Garaši, u I klasu kvaliteta voda. Sa druge strane, analize vode sa Peštana i Beljanice su pokazale povećane koncentracije primarnih nutrijenata, i svih mikrobioloških bioindikatora, koje su uglavnom odgovarale III i IV klasi kvaliteta voda.

Najviše vrednosti oštećenja DNK molekula za sva tkiva su zabeležena na Peštanu i Beljanici. Kako je na ovim rekama uzorkovanje rađeno tokom cele godine, pokazan je i pad oštećenja za sva tri tkiva tokom leta. Oštećenje DNK na ćelijama krvi, jetre i škrge sa Garaša nisu bila značajno različita od oštećenja na istim tkivima sa Peštana i Beljanice. Niže oštećenje DNK molekula pokazala su tkiva jedinki uzorkovanih na Uvcu u poređenju sa ostala tri lokaliteta, Garaši, Peštan i Beljanica. Visok kvalitet vode akumulacije Uvac potvrđen je niskim vrednostima primarnih nutrijenata, mikrobioloških parametara i DNK oštećenja na tkivima klena.

Analiza akumulacije metala u različitim tkivima klena pokazala je visok stepen njihove diferencijacije, kao i značajne razlike u distribuciji elemenata u tkivima između ispitivanih lokaliteta. Analiza elemenata u tkivima klena sa Uvca pokazala je da je većina elemenata bila najniža u mišićima, dok su više vrednosti zabeležene u škragama (Ba, Hg, Mn, Mo, Sr) i jetri (B, Cr, Cu, Fe i Mo). Takođe, analiza elemenata u tkivima klena na Garašima je pokazala da je većina elemenata bila najniža u mišićima, dok su više vrednosti zabeležene u škragama (Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Sr i Zn), dok je jetra u najvišim koncentracijama akumulirala As, Cu i Mo.

Na osnovu PCA analize na obe reke Hg se izdvojila kao element koji je pokazao veći stepen akumulacije tokom jeseni. Na obe reke škrge su akumulirale veće koncentracije elemenata u odnosu na druga tkiva. Sa druge strane mišić je za većinu elemenata imao najniže vrednosti. Na Peštanu je jetra pokazala izraženiju sezonsku varijaciju u akumulaciji metala (Cr, Mn, Sr, Hg i Zn), dok su na Beljanici to bile škrge (Ba, Cu, Mo, Sr, Zn). Kanonijska diskriminantna analiza (CDA) je, u odnosu na ukupni sadržaj elemenata u tkivima, pokazala odvajanje škrge u odnosu na druga tkiva na obe reke.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genotoksikologija, Mikrobiologija

UDK broj: [579.68:574.64]+597.551.2:[57.088 : 577.113](043.3)

Ključne reči: ekogenotoksikologija, površinske vode, mikrobiološko zagađenje, metali i metalodi, oštećenja DNK molekula, klen, komet test, ICP-OES

Ecogenotoxicological evaluation of surface water quality with comet assay on different tissues of European chub (*Squalius cephalus* L.)

Abstract

Intensive production and release of a large number of chemical agents, as well as metals into the environment, mainly in river flows, has led to the need for tests which can determine their genotoxic potential. Many aquatic organisms, especially fish, have a potential for bioaccumulation of genotoxic agents in the tissues, and hence can be used as bioindicators in ecogenotoxicological studies. Fish are considered one of the most important indicators for assessing the levels of metals in freshwater systems, because they are at the top of the food chain with the ability to accumulate high concentrations of certain metals.

Assessment of surface water genotoxicity was carried out based on the detection of DNA damage with alkaline comet assay or single cell gel electrophoresis (SCGE) in the blood, liver and gills of chub (*Squalius cephalus* L.). Ranking of parameters for assessing the DNA damage: comet tail length (TL), the intensity of the tail of the comet (TI) and "Olive tail moment" (OTM), was done by the SRD (Sum of Ranking Differences) method. In parallel with the comet assay in liver and gills, inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP - OES) was used to follow the concentration of metals and metalloids. The same method was used for the analysis of metals and metalloids in the muscles and gonads.

Assessment of the ecological status of surface waters was conducted at two reservoirs, Garaši and Zlatar (Uvac), and two rivers Peštan and Beljanica, during the 2011/2012 year.

Water quality assessment is based on the physicochemical and microbiological parameters. Microbiological analysis included: total coliforms, fecal coliforms, fecal enterococci, aerobic mesophile, aerobic heterotrophs, heterotrophs and oligotrophs. The type of contamination was determined by the ratio of fecal coliforms and fecal enterococci F/E, and the status of self-purification is obtained from the ratio of heterotrophs and oligotrophs O/H. Integrated biomarker response (IBR) has been used

as an indicator of the relationship between different groups of microorganisms during the months of monitoring.

Basic water quality assessment, based on the analysis of physicochemical and microbiological parameters, classify the reservoirs, Uvac and Garaši as having class I water quality. On the other hand, the analysis of water from Pestan and Beljanica showed increased concentrations of primary nutrients and all microbial bioindicators, which are mainly suited to the III and IV class of water quality.

The highest values of DNA damage of all tissues were recorded at Pestan and Beljanica. As the sampling on these rivers was done throughout the year, during the summer a decrease of damage for all three tissues was observed. DNA damage of blood cells, liver and gills at Garasi were similar to the measured damage of the same tissues at Peštan and Beljanica. Tissue specimens collected at Uvac showed lower DNA damage when compared to the other three sites, Garasi, Peštan and Beljanica. High water quality at reservoir Uvac was confirmed by low values of the primary nutrients, microbiological parameters and DNA damage on chub tissues.

Analysis of heavy metal accumulation in different chub tissues showed a high level of differentiation, as well as significant differences in the distribution of elements in the tissues between the studied sites. Elemental analysis in chub tissues at Uvac showed that most of the elements had the lowest concentration in muscles, while higher values were recorded in the gills (Ba, Hg, Mn, Mo, and Sr) and liver (B, Cr, Cu, Fe, and Mo). The analysis of the elements in chub tissues at Garasi also showed that most of the elements had the lowest concentration in muscles, while higher values were recorded in the gills (Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Sr, and Zn), while the liver accumulated the highest concentrations of As, Cu and Mo.

Based on PCA analysis on both rivers Hg showed a greater degree of accumulation in the fall. On both rivers gills accumulated higher concentrations of elements compared to other tissues. On the other side muscle had the lowest values for the majority of elements. At Pestan the liver displayed a pronounced seasonal variation in the accumulation of metals (Cr, Mn, Sr, Zn, and Hg), while at Beljanica it was gills (Ba, Cu, Mo, Sr, and Zn). Canonical discriminant analysis (CDA) based on the total contents of the elements in the tissues showed a high degree of separation of gills from other tissues at both rivers.

Research field: Biology

Specific research field: Ecogenotoxicology, Microbiology

UDC No.: [579.68:574.64]+597.551.2:[57.088 : 577.113](043.3)

Key words: ecogenotoxicology, surface water, microbial contamination, metals and metalloids, DNA damage molecules, European chub, comet assay, ICP-OES

SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AAS - atomska apsorpciona spektroskopija

AM - aerobni mezofili

AO - akridin oranž

CDA – engl. Canonical Discriminant Analysis, kanonijska diskriminantna analiza

CFU - engl. Colony Forming Unit - broj jedinica koje formiraju kolonije

DMSO - dimetil sulfoksid

DTA - dekstrozni teluritni agar

EB - etidijum bromid

EDTA - engl. EthyleneDiamineTetraacetic Acid

EMB - engl. Eosine Metilene Blue

FC - fekalni koliformi

FE - fekalne enterokoke

H - heterotrofi

HBSS - engl. Hanks Balanced Saline Solution

IBR - engl. Integrated Biomarker Response – integrisani odgovor biomarkera

ICP-OES - engl. Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry, induktivno spregnuta plazma-optičko emisione spektrometrija

LMP - engl. Low Melting Point

MDK - Maksimalno Dozvoljena Koncentracija

NMP - engl. Normal Melting Point

O - oligotrofi

OTM - engl. Olive tail moment

PBS - engl. Phosphate Buffered Saline Solution

PCA – engl. Principal Component Analysis

SCE - engl. Sister Chromatide Exchange – razmena sestrinskih hromatida

SCGE - engl. Single Cell Gel Electrophoresis – elektroforeza pojedinačnih ćelija

SRD - engl. Sum of Ranking Differences

TC - totalni koliformi

TH - aerobni heterotrofi

TI - engl. Tail Intensity – intenzitet repa komete

TL - engl. Tail Length – dužina repa komete

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Testovi za detekciju DNK oštećenja	2
1.1.2. Komet test	2
1.2. Procena kvaliteta vodenih ekosistema	5
1.2.1. Mikroorganizmi kao bioindikatori kvaliteta vode	6
1.2.1.1. Integrisani odgovor biomarkera (IBR)	7
1.2.2. RIBE kao bioindikatori kvaliteta vode	8
1.3. Akumulacija metala u ribama	9
1.3.1. Maksimalno dozvoljene koncentracije	10
1.3.2. Esencijalni elementi	10
1.3.3. Neesencijalni elementi	10
1.3.4. Detekcija metala i elemenata u tragovima	13
1.4. Klen (<i>Squalius cephalus</i> L.)	13
1.5. Područje istraživanja	14
1.6. Mikrobiološka procena akumulacija, Zlatar (Uvac) i Garaši i reka, Peštan i Beljanica, sa ekogenotoksikološkim analizama na tkivima klana	16
2. CILJEVI	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Ispitivana područja	18
3.1.1. Uvac, Zlatarsko jezero	18
3.1.2. Garaši	20
3.1.3. Peštan i Beljanica	21
3.2. Materijal	23
3.2.1. Rastvori	23
3.2.2. Podloge i medijumi	25
3.3. Metode	27
3.3.1. Uzorkovanje vode za fizičko-hemijske i mikrobiološke analize	27

3.3.2. Mikrobiološke analize vode.....	31
3.3.2.1. Koliformne bakterije – metod membranska filtracija.....	31
3.3.2.2. Fekalne enterokoke – metod membranska filtracija.....	32
3.3.2.3. Aerobne mezofilne bakterije.....	33
3.3.2.4. Aerobni heterotrofi, heterotrofi i oligotrofi.....	33
3.3.2.5. Integrisani odgovor biomarkera.....	34
3.3.3. Uzorkovanje jedinki klena.....	34
3.3.4. Pravljenje suspenzije ćelija.....	36
3.3.5. Diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB).....	37
3.3.6. Elektroforeza pojedinačnih ćelija - komet test.....	37
3.3.7. Rangiranje parametara za procenu oštećenja DNK metodom SRD.....	38
3.3.8. Određivanje koncentracije metala i metaloida u tkivima metodom induktivno spregnute plazme-optičko emisije spektrometrije (ICP-OES).....	39
3.4. Statističke analize.....	40
4. REZULTATI.....	42
4.1. Uvac.....	43
4.1.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize.....	43
4.1.2. Analize oštećenja DNK molekula i koncentracije elemenata u tkivima.....	44
4.1.2.1. Oštećenje DNK molekula.....	44
4.1.2.2. Koncentracije metala i metaloida u tkivima.....	45
4.2. Garaši.....	47
4.2.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize.....	47
4.2.2. Analize oštećenja DNK molekula i koncentracije elemenata u tkivima.....	48
4.2.2.1. Oštećenje DNK molekula.....	48
4.2.2.2. Koncentracije metala i metaloida u tkivima.....	49
4.3. Peštan i Beljanica.....	50
4.3.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize.....	50
4.3.1.1 Integrisani odgovor biomarkera (IBR)	53
4.3.2. Analize oštećenja DNK molekula i koncentracije elemenata u tkivima.....	55
4.3.2.1. Oštećenje DNK molekula.....	55

4.3.2.1.1. Rangiranje parametara za procenu oštećenja DNK metodom SRD.....	59
4.3.2.2. Koncentracije metala i metaloida u tkivima	60
4.4. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara.....	72
4.5. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida u tkivima.....	74
4.6. PCA analiza ispitivanih lokaliteta na osnovu genotoksičnosti i koncentracije elemenata u tkivima.....	78
5. DISKUSIJA.....	81
5.1. Analiza kvaliteta voda akumulacija, Uvac i Garaši.....	81
5.2. Analiza kvaliteta voda reka, Peštan i Beljanica.....	85
5.2.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize.....	85
5.2.2. Analiza oštećenja DNK molekula u tkivima klena.....	87
5.2.3. Analiza akumulacije metala i metaloida u tkivima klena.....	88
5.3. Tkivno-specifično oštećenje DNK molekula i akumulacija elemenata.....	90
5.4. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula , fizičko- hemijskih i mikrobioloških parametara.....	91
5.5. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida u tkivima.....	92
5.6. Poređenje lokaliteta na osnovu genotoksičnosti i akumulaciji metala i metaloida u tkivima klena.....	94
6. ZAKLJUČCI.....	96
7. LITERATURA.....	99
PRILOG.....	120

UVOD

1. UVOD

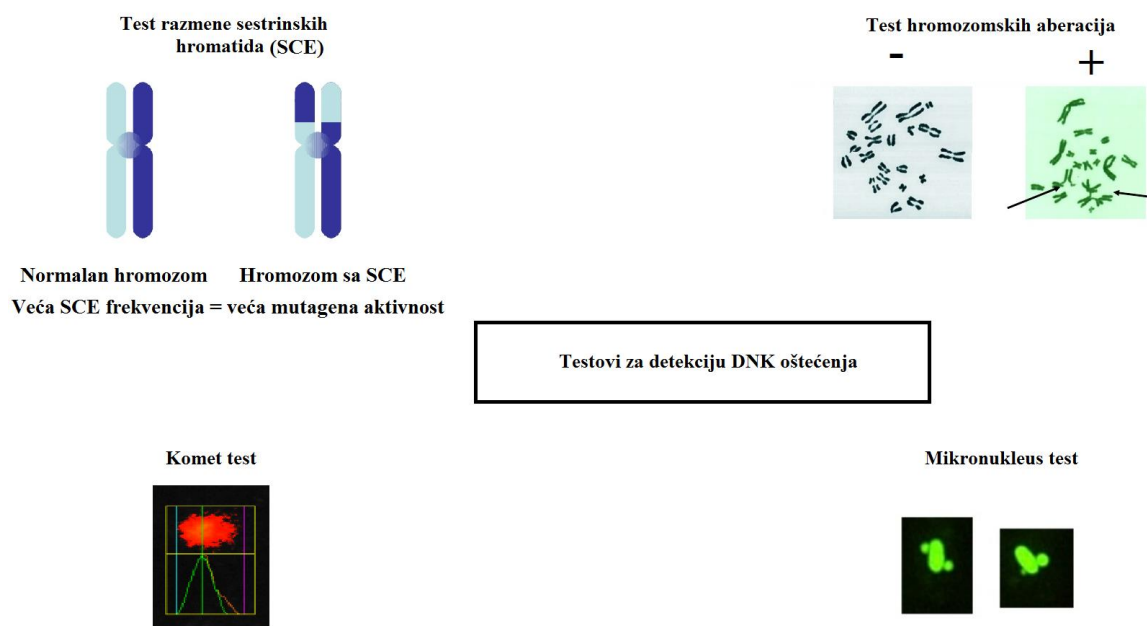
Intenzivni procesi proizvodnje i oslobađanje velikog broja hemijskih agenasa ili njihovih smeša u spoljašnju sredinu, najvećim delom u rečne tokove, dovela je do potrebe za primenom testova koji će detektovati njihov toksični i genotoksični potencijal (Osman et al., 2012). Veoma često hemijski agensi, pored toksičnog, imaju i genotoksični efekat, interaguju sa DNK molekulom i dovode do nastanka oštećenja i indukcije mutacija. Hemijski agensi uključuju mnogobrojne mutagene i kancerogene među kojima bitno mesto zauzimaju metali (Matsumoto et al., 2006, Pruski & Dixon, 2002, Lee & Steinert, 2003, Reinecke & Reinecke, 2004), policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), aromatični amini, aflatoksini, citostatici (Kirkland et al., 2008, Gačić et al., 2014).

U istraživanjima genotoksičnih efekata različitih supstanci koristi se veliki broj testova koji kao modele koriste ćelije i ćelijske linije različitih organizama i organizme na različitim nivoima evolutivnog razvoja (Lee & Steinert, 2003, Chaudhary et al., 2006, Li et al., 2010, Akpoilili, 2013, Azqueta & Collins, 2013). Procena genotoksičnosti može se pratiti kako u prirodnim uslovima (*in situ*), tako i u laboratorijskim uslovima (*ex situ*), kao i na molekularnom i hromozomskom nivou (Boettcher et al., 2010, Gačić et al., 2014).

Akvatični organizmi, poput školjki i riba, imaju sposobnost bioakumulacije genotoksičnih agenasa u mekim tkivima, te se mogu koristiti kao bioindikatori u ekogenotoksikološkim studijama (Kolarević et al., 2013, Sunjog et al., 2014). Sudeći po Okvirnoj direktivi o vodama (2000/60/EC) ribe predstavljaju jedan od najbitnijih elemenata procene ekološkog statusa vodnih tela. Međutim, u ovakvim procenama do sada je korišćeno samo nekoliko parametara, kao što su kvalitativni i kvantitativni sastav ihtiofaune i uzrasna struktura populacije riba (Lenhardt et al., 2015). Uključivanje procene genotoksičnosti u okviru monitoringa kod akvatičnih organizama je važno sa različitih aspekata: sa ekološke perspektive bitna je zaštita genetičkog diverziteta u prirodnim populacijama, do čijeg narušavanja može doći uvođenjem velikog broja mutacija u genski pul; detekcija genotoksičnih efekata u akvatičnim organizmima je potrebna zbog zaštite akvatičnih organizama i prevencije ulaska potencijalnih mutagena i kancerogena u lanac ishrane (Hauser et al., 2003).

1.1. Testovi za detekciju DNK oštećenja

Najčešće korišćeni testovi za procenu oštećenja na molekulu DNK su test hromozomskih aberacija, test razmene sestrinskih hromatida (SCE), mikronukleus test i komet test (Slika 1.1). Zajedničko za navedene testove je da se, pored korišćenja u okviru studije biomonitoringa za ispitivanje uticaja hazardnih agenasa, koriste i u ekogenotoksikologiji za procenu zagađenja životne sredine (Andem et al., 2013).

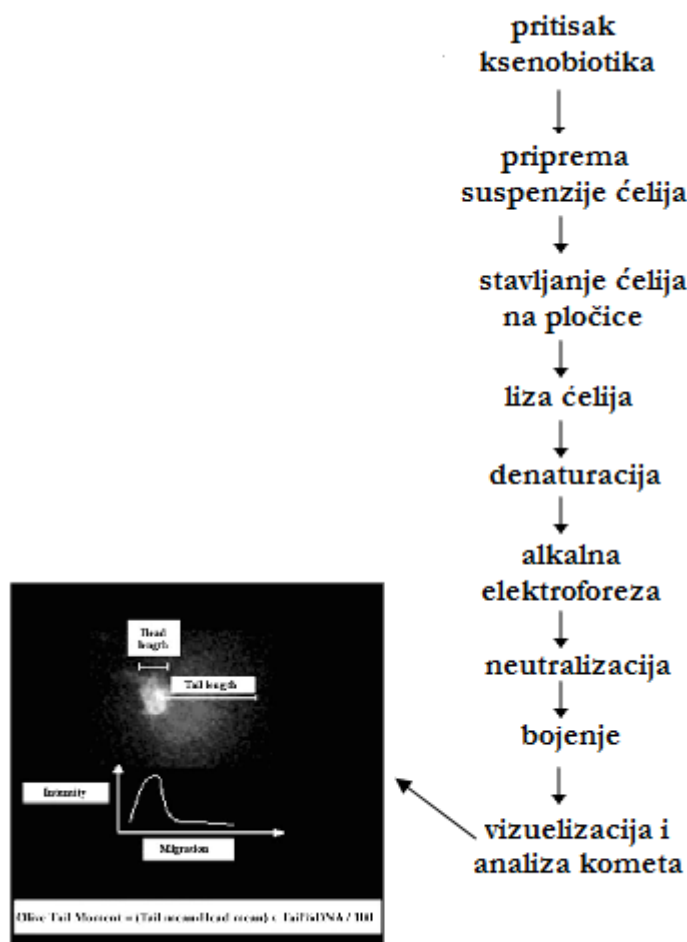


Slika 1.1. Testovi za detekciju DNK oštećenja (preuzeto sa:
<http://www.slideshare.net/medik.cz/ecology-practicals2> (gore levo),
<http://www.slideshare.net/MerckChemicals/safety-of-lc-materials7> (gore desno))

1.1. 2. Komet test

Komet test ili test elektroforeze pojedinačnih ćelija (engl. *Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE), je osetljiva i brza tehnika za detekciju DNK oštećenja u pojedinačnim ćelijama. Zasniva se na sposobnosti negativno naelektrisanih DNK fragmenata da se kreću kroz gel (agarozu), tokom elektroforeze, ka pozitivnoj elektrodi, pri čemu oštećena jedra izgledaju kao komete (Slika 1.2).

Ostling & Johanson (1984) su prvi razvili mikro gel elektroforetsku tehniku za detekciju DNK oštećenja na nivou pojedinačnih ćelija, a Singh (1988) je modifikovao za rad u alkalnim uslovima (pH 13), pa se pored dvolančanih detektuju i jednolančani prekidi, oksidativna oštećenja baza, alkalno labilna mesta, kao i mesta koja se repariraju. U ovom testu, nivo oštećenja DNK se određuje na osnovu oblika, veličine i količine DNK u okviru komete. Vizualizacija se vrši fluorescentnim agensima (etidijum bromid, akridin oranž) čiji se intenzitet meri pomoću fluorescentnog mikroskopa.



Slika 1.2. Procedura komet testa

Paralelno sa nekoliko tehničkih i proceduralnih dostignuća u cilju poboljšanja metode, istraživanja su išla i u pravcu pouzdanije kvantifikacije stepena oštećenja. Takva kvantifikacija uključuje vizuelne preglede (tj. fotografski, okular mikrometrom, ili nespecifičnim analizama slika) i upotrebu komercijalno dostupnih programa za

analizu slike. Specifični programski paketi olakšavaju i statističke analize, crtanje i dokumentaciju podataka (Kumaravel et al., 2009). Osim toga, automatizovani sistemi obezbeđuju prednost nad manuelnim, ne samo radi lakšeg korišćenja, već i zbog odsustva subjektivnosti posmatrača.

Za procenu oštećenja DNK molekula komet testom standardno se koriste 3 parametra: dužina repa komete (TL), intenzitet repa komete (TI) i momenat repa komete (OTM) (Çok et al., 2011, Vincent-Hubert et al., 2011, Morin et al., 2011). TI i OTM su ipak više zastupljeni parametri u proceni oštećenja kod riba i generalno u ekogenotoksikologiji (Sharma et al., 2007, Wirzinger et al., 2007, Pandey et al., 2011). Kumaravel i Jha (2006) preporučuju prikazivanje oba parametra (TI i OTM) zbog njihovih individualnih prednosti.

Dužina repa komete smatra se nezadovoljavajućim parametrom pre svega što u slučaju kada se intenzitet repa komete povećava dužina repa ne mora, što različitom stepenu oštećenja može dati istu vrednost (Collins, 2004). Bez obzira na ovaj nedostatak u senzitivnosti dužina repa komete se često koristila kao parametar u proceni oštećenja DNK kod riba (Pandurangi et al., 1995, Rajaguru et al., 2003, De Andrade et al., 2004, Alink et al., 2007). OTM je proizvod dva faktora: procenta DNK u repu komete (TI) i razdaljine između intenziteta centroida (centra gravitacije) glave i repa duž X ose komete. Navedena razdaljina umnogome zavisi od algoritama koji definišu centar gravitacije, a koji opet zavise od korišćenog softverskog paketa. Iako se OTM izdvaja kao statistički značajniji parametar (Kumaravel & Jha, 2006), poređenja rezultata između laboratorija su često teška za ovaj parametar (Rosenberger et al., 2011). Imajući ovo u vidu, TI se ipak preporučuje kao parametar za inter-laboratorijsko poređenje rezultata, najviše zbog svoje relativnosti (Speit & Hartmann et al., 1999, Burlinson et al., 2007, Collins et al., 2008).

SRD (engl. *Sum of Ranking Differences*) analiza omogućava procenu širokog spektra metoda pretežno u analitičkim i hemijskim studijama (Heberger, 2010, Heberger & Kollár-Hunek, 2011, Djakovic-Sekulic et al., 2011, Rocha et al., 2011, Balogh et al., 2012). Kako je SRD potpuno generalna metoda, predstavlja pogodan metod za istraživanje koji od ponuđenih parametara je najpouzdaniji za predstavljanje oštećenja DNK molekula. SRD odgovara principu parsinometrije; obezbeđuje lak način za rangiranje (npr. tehnike, modeli i metode) u jedinstven normalan raspored (Héberger,

2010). Metod na osnovu rangiranja je neparametrijski. SRD vrednosti mogu se koristiti za poređenje podataka koji potiču od normalne i ne normalne distribucije (Héberger, 2011). Vrednosti van opsega ne utiču bitno na rangiranje, tako da nema potrebe za distributivne pretpostavke. SRD metoda kao i druge studije procene parametra, izdvojile su TI i OTM kao najpouzdanije za procenu oštećenja DNK (Sunjog et al., 2013, Héberger et al., 2014, Rosenberger et al., 2011).

Oštećenje DNK molekula komet testom može se detektovati na svim ćelijama koje poseduju jedro uključujući ćelije u kulturi, krvne ćelije životinja i ljudi, suspenzije ćelija dobijenih iz mekih tkiva, ćelije hemolimfe mekušaca i insekata, biljne ćelije. Modifikacijom metode korišćenjem endonukleaza, test postaje specifičniji i senzitivniji, jer enzim uvodi prekide na mestima modifikacija DNK baza (oksidovani purini i pirimidini, dimeri pirimidina, alkilovane baze), pa se i ti fragmenti mogu detektovati kao oštećenja (Collins et al., 1993, Aniagu et al., 2006, Azqueta & Collins 2013). Zbog svoje jednostavnosti, visoke osetljivosti i ekonomičnosti veliki broj ekogenotoksikoloških studija baziran je na komet testu (De Andrade et al., 2004, Gustavino et al., 2005, Pandey et al., 2006, Frenzilli et al., 2009, Kolarević et al., 2013, Sunjog et al., 2014, Vuković-Gačić et al., 2014, Gačić et al., 2014).

1.2. Procena kvaliteta vodenih ekosistema

Kvalitet vodenih ekosistema može se procenjivati preko fizičkih, hemijskih i bioloških parametara. Biomonitoring se često svodi na merenje fizičkih i hemijskih parametara. Međutim, koncentracije koje su određene za granične vrednosti ovih polutanata se odnose na toksične vrednosti i obično se ne uzima u obzir rizik od hroničnog izlaganja nižim koncentracijama, odnosno kompleksnoj smeši ovih supstanci, koje potencijalno mogu proizvesti genotoksični efekat (Ohe et al., 2004). Biološki parametri, naspram fizičko-hemijskih, integrišu informacije tokom dužeg vremenskog perioda i bolje opisuju uslove vodenih ekosistema (Uherek & Pinto, 2014).

1.2.1. Mikroorganizmi kao bioindikatori kvaliteta vode

Mikrobiološka kontaminacija je važan problem koji utiče na kvalitet svih površinskih voda. Za procenu kvaliteta voda koristimo indikatorske organizme, najčešće za procenu nivoa fekalnog zagađenja: ukupne koliformne bakterije, fekalne koliformne bakterije, fekalne enterokoke. Ove grupe bakterija su indirektni pokazatelji stanja kvaliteta vode jer ukazuju na prisustvo patogenih bakterija, odnosno pojavu fekalnog zagađenja (Tallon et al., 2005). Takođe se pored ovih bioindikatora mogu koristiti i bioindikatori za procenu sadržaja organskog materijala poreklom iz poljoprivrede, industrije itd. Ovaj cilj se postiže praćenjem tri grupe bakterija: totalnih heterotrofa, aerobnih heterotrofa i oligotrofa. Navedeni bioindikatorski organizmi se koriste za procenu ekološkog statusa reka (Službeni glasnik RS, 74/2011).

Što se tiče parametara koji ukazuju na kvalitet vode sa sanitarnog aspekta, korisno je raspolagati ovim podacima jer nam oni ukazuju da li su neki recipijentni vodotoci u kontaktu sa fekalnim materijama i u kojoj meri, da li se radi o prolaznom ili permanentnom zagađenju kao i o izvoru zagađenja.

Ukupni koliformi predstavljaju heterogenu grupu bakterija po poreklu tj. mogu biti poreklom od fekalnog zagađenja, obzirom da predstavljaju normalnu floru gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja, kao i poreklom iz prirodne sredine, najčešće zemljište (Le Chevallier, 1990, Camperet et al., 1991, Szewzyket al., 1994,). Ukupni koliformi se klasično definišu kao sve fakultativno anaerobne, gramnegativne, nesporulišuće, oksidaza negativne, štapićaste bakterije koje fermentišu laktozu uz produkciju gasa tokom 48 h na 35°C ili kao članovi familije enterobakterija koje poseduju enzim β -galaktozidazu (APHA, 1998). Uključuju vrstu *Escherichia coli* i srodne vrste, koje normalno obitavaju u debelom crevu, kao što su vrste rodova *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella*. Izlučuju se fekalijama iz organizma, dospevaju u komunalne otpadne vode, a preko otpadnih voda i u prirodne vode. Ukoliko fekalije potiču iz obolelog čoveka ili životinje, u njima će biti prisutne i patogene bakterije, koje uzrokuju crevne infekcije i druga oboljenja.

Fekalni ili termotolerantni koliformi mogu da se izoluju na 44°C i pored enzima β -D galaktozidaze poseduju i enzim β -D glukoronidazu. Termotolerantni koliformi obuhvataju vrste rodova *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*. Analizom

humanog i animalnog fecesa je pokazano da je udeo vrste *E. coli* oko 94 – 97 %, što je izdvaja kao najpouzdaniju vrstu za procenu fekalnog zagađenja (Tallon et al., 2005). Smatra se da nalaz termotolerantnih fekalnih koliforma ukazuje sa sigurnošću na nedavna fekalna zagađenja sredine, zbog njihove nemogućnosti dužeg opstanka u vodi.

Fekalne enterokoke su grampozitivne fakultativno anaerobne bakterije koje ne formiraju spore i otporne su na visoke koncentracije žučnih soli, natrijum azida i telurita. Prisustvo fekalnih enterokoka (glavni predstavnici - *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*) takođe ukazuje na prisustvo fekalnog zagađenja. Iako su u poređenju po brojnosti u fecesu ljudi malobrojnije od fekalnih koliforma, *Enterococcus* u vodi preživljava duže i smatra se boljim indikatorom prisustva fekalne kontaminacije vode u odnosu na fekalne koliformne bakterije (Tallon et al., 2005). Pored *E. coli*, intestinalne enterokoke predstavljaju najbolje indikatore sanitarnog rizika voda (Edberg et al., 2000, Kay et al., 2004).

Aerobne mezofilne bakterije su grupa takođe potencijalnih patogena, koje se rade u okviru analize vode za piće (Službeni list SRJ, 42/98 i 44/99).

Ekološki aspekt ispitivanja statusa voda ukazuje pre svega na opterećenost voda organskim jedinjenjima i sposobnost autopurifikacije tih voda. Pored broja oligotrofa i heterotrofa, koji pokazuju opterećenost vode organskim materijalom, može se izvesti i indeks odnosa oligotrofa i heterotrofa (O/H), koji ako je preko 1 ukazuje na zadovoljavajući status samoprečišćavanja reke, a ako je preko 10 ukazuje na dobru sposobnost samoprečišćavanja (Službeni glasnik RS, 74/2011).

1.2.1.1. Integrisani odgovor biomarkera (IBR)

Integrisani odgovor biomarkera (engl. „*Integrated biomarker response*“, IBR) je metoda koja kombinuje odgovore biomarkera u generalni “stres indeks” i samim tim pokazuje njihov zajednički uticaj i olakšava njihovu interpretaciju. Baterija biomarkera se često koristi u proceni efekata hemijske kontaminacije i detekcije odgovora na sredinski stres. IBR se izražava preko poligonalnih polja, koja se predstavljaju kao površine dobijene od različitih IBR vrednosti za dati biomarker/parametar, i preko kojih se mogu porediti lokacije i/ili meseci uzorkovanja.

Mikrobiološki bioindikatori su često korišćeni pokazatelji stanja vode pod uticajem polutanata i opšteg sredinskog stresa vodenih ekosistema. IBR metodom se u ovom slučaju integrišu odgovori mikrobioloških bioindikatora, sa ciljem boljeg sagledavanja uzajamnog odnosa mikrobioloških indikatora tokom sezona uzorkovanja. Treba naglasiti da iako se IBR u dosadašnjim radovima koristio za analizu zajedničkog uticaja biomarkera (Beliaeff & Burgeot, 2002, Damiens et al., 2007) u ovom slučaju se koristi za analizu bioindikatora.

1.2.2. Ribe kao bioindikatori kvaliteta vode

Svest o potencijalnim opasnostima zagađujućih materija u vodenoj sredini je podstakla veliko interesovanje o korišćenju riba kao bioindikatora (Obiakor et al., 2012). Ribe su veoma senzitivni bioindikatori promene kvaliteta voda i mogu ukazati na potencijalne opasnosti hemijskih agenasa koji u sve većem broju i obimu neprekidno dospevaju u površinske vode (Al-Sabti et al., 1995). Kako ribe imaju sličan odgovor na mutagene supstance kao i viši organizmi, tj. brz odgovor na niske koncentracije mutagena (Obiakor, 2012), rezultati dobijeni u ovim studijama mogu biti od velike koristi za procenu genotoksičnosti za čoveka.

Procena oštećenja DNK se može izvesti u laboratorijskim uslovima, odnosno, izlaganjem riba bilo pojedinačnim genotoksičnim agensima ili kompleksnim smešama. Mnogo realnija procena se ipak dobija na jedinkama u prirodnim uslovima iz zagađenog okruženja u poređenju sa jedinkama iste vrste poreklom sa referentnog lokaliteta (De Flora et al., 1993).

Ribe su blisko vezane za uvođenje komet testa u ekogenotoksikologiju jer su bile među prvim animalnim modelima na kojima se, radi procene genotoksičnosti vode, radila ova metoda (Pandurangi et al. 1995, Sunjog et al., 2012, 2014, de Lapuente et al., 2015). Kako se u komet testu generalno mogu koristiti skoro svi tipovi eukariotskih ćelija pa se i kod riba u dosadašnjim istraživanjima koristilo više tkiva i ćelija za procenu oštećenja DNK molekula. Veliki broj istraživanja je pokazao da DNK oštećenje može biti tkivno i ćelijski specifično (Abd-Allah et al., 1999, Cotellet & Féraud, 1999, Vincent-Hubert et al., 2011, Sunjog et al., 2014, de Lapuente et al., 2015). Studije procene genotoksičnosti rađene su najčešće na eritrocitima, jetri i škrgama, *in vivo* i *in*

vitro (Cotelle & Ferard, 1999). Krv je bez sumnje najčešće korišćeno tkivo u komet testu na ribama, pre svega zbog lakog uzorkovanja kao i zbog već dostupne ćelijske suspenzije. Uprkos tome i druga tkiva kao što su jetra, škrge, bubrezi i creva su često korišćena (Cotelle & Ferard, 1999, de Lapuente et al., 2015).

Međutim, uprkos više od 300 publikovanih radova u kojima je korišćen komet test za detekciju DNK oštećenja u različitim ćelijama riba (de Lapuente et al., 2015), još uvek nema standardizovanog protokola, što uveliko otežava poređenje rezultata između laboratorija.

1.3. Akumulacija metala u ribama

Zagađenje akvatičnih sistema metalima globalni je problem zbog njihove perzistentnosti, toksičnosti i potencijala za akumulaciju (MacFarlane & Burchett, 2000, Censi et al., 2006). Studije analiza metala u rekama, jezerima, ribama i sedimentu (Özmen et al., 2004, Begüm et al., 2005, Fernandes et al., 2008, Öztürk et al., 2008, Pote et al., 2008, Praveena et al., 2008) u centru su pažnje poslednjih decenija, pri čemu se kontaminacija sredine metalima povećava iz godine u godinu (Majer et al., 2002). Samim tim su i analize citotoksičnosti metala dobile posebnu pažnju uzimajući u obzir njihovu mutagenost i potencijal da produkuju tumore u eksperimentalnim organizmima kao i ljudima koji su njima izloženi (Garcia-Rodríguez et al., 2001).

Ribe se smatraju za jedne od značajnijih indikatora za procenu nivoa metala u slatkovodnim sistemima (Rashed, 2001), obično jer su u vrhu lanca ishrane sa mogućnošću akumulacije visokih koncentracija pojedinih metala (Yilmaz et al., 2007). Teške metale mogu uneti putem hrane ili apsorbovati preko škrge i kože (Skorić et al., 2012). Nakon apsorpcije metali pokazuju tkivno specifičnu akumulaciju (Višnjić-Jeftić et al. 2010, Jarić et al., 2011, Lenhardt et al., 2015). Tako bakar pokazuje afinitet za jetru, dok se cink koncentruje u gonadama jer u njima ima važnu metaboličku ulogu. Kadmijum se primarno akumulira u bubrezima i jetri, ali može dostići i značajne koncentracije u škragama, crevima i slezini. Jetra generalno akumulira visoke koncentracije metala, koje su često u proporciji sa koncentracijama u vodi, i smatra se dobrim biomarkerom zagađenja vode. Iako mišići tipično akumuliraju niske i često minimalne koncentracije elemenata, oni često predstavljaju glavni fokus toksikoloških

istraživanja, kako su oni glavni deo ribe koji se koristi u ishrani ljudi (Karadede & Ünlü, 2000, Dalman et al., 2006). Pored nabrojanih tkiva često se kao biomarkeri za akumulaciju metala koriste i želudac, creva, slezina, gonade i mozak (Rashed, 2001, Jarić et al., 2011, Jovičić et al., 2015).

1.3.1. Maksimalno dozvoljene koncentracije

U proceni rizika po ljudsko zdravlje posebna pažnja se posvećuje komercijalnim i jestivim vrstama (Begüm et al., 2005). Zakonom je bilo potrebno regulisati i ustanoviti tzv. maksimalnu dozvoljenu koncentraciju (MDK), koja predstavlja maksimalnu dozvoljenu koncentraciju pojedinačne zagađujuće materije ili grupe zagađujućih materija u medijumima životne sredine, kao i u hrani. Nacionalna regulativa Republike Srbije (Službeni glasnik RS, 28/2011) je usklađena sa međunarodnom regulativom oko dozvoljenih koncentracija pojedinih metala kao što su Cd, Hg i Pb (Official Journal of the European Communities 2001) u mesu (mišiću) ribe.

1.3.2. Esencijalni elementi

Elementi kao što su kobalt, bakar, hrom, gvožđe, magnezijum, mangan, molibden, selen i cink predstavljaju grupu esencijalnih metala neophodnih za pravilno odvijanje mnogih biohemijskih i fizioloških funkcija, kao komponente mnogih ključnih enzima. Bakar je kofaktor za nekoliko oksidativnih enzima uključujući katalaze, suproksid dismutaze, citohrom c oksidaze, itd. Treba imati u vidu da i esencijalni metali u određenim koncentracijama mogu imati toksičan efekat za neke metale, kao što su hrom i bakar, jako je tanka granica između koncentracija potrebnih za normalno odvijanje biohemijskih procesa i njihovog toksičnog dejstva (Tchounwou et al., 2012).

1.3.3. Neesencijalni elementi

Elementi kao što su aluminijum, arsen, barijum, kadmijum, olovo, litijum, živa, nikel, stroncijum i drugi nemaju biološki određene funkcije i smatraju se neesencijalnim elementima (Tchounwou et al., 2012). Iz navedene grupe izdvajaju se arsen, kadmijum, hrom, olovo i živa, koji važe za toksične, mutagene i kancerogene agense. Mnoge

studije su pokazale da proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i oksidativni stres igraju ključnu ulogu u toksičnosti i kancerogenosti metala kao što su arsen (Tchounwou et al., 2004, Yedjou & Tchounwou, 2007), kadmijum (Tchounwou et al., 2001), hrom (Patlolla & Tchounwou, 2006), olovo (Yedjou & Tchounwou, 2008) i živa (Bernhoft et al., 2012). Zbog visokog stepena toksičnosti, ovih pet elemenata rangirani su među prioritetnim metalima koji su od velikog značaja za javno zdravlje. Spadaju u takozvane sistematske toksikante koji mogu dovesti do višestrukog oštećenja organa, čak i na nižim nivoima izloženosti. Prema podacima Agencije SAD za zaštitu životne sredine (US, EPA) i Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC), ovi metali se takođe klasifikuju kao "poznati" ili "verovatni" ljudski kancerogeni na osnovu epidemioloških i eksperimentalnih studija koje pokazuju vezu između izloženosti i učestalosti pojave kancera kod ljudi i životinja (Tchounwou, 2012).

Arsen (As) se u prirodi može naći u neorganskom i organskom obliku. Najčešći neorganski oblici arsena su trovalentni meta arseniti i petovalentni arsenati. U površinskim vodama arsen se nalazi u obliku As (5+) dok se u anaerobnijim uslovima nalazi u formi As (3+), obliku koji je više toksičan. As može dovesti do indukcije oštećenja DNK u multiplim test sistemima kako *in vivo* tako i *in vitro* (Chang, 1987, Dong & Luo, 1994, Kato et al., 1994, Hartmann & Speit, 1994, Basu et al., 2001). Ima dokaza da indukuje pojavu jednolančanih prekida (Dong & Luo, 1994), inhibiciju sinteze DNK (Chang, 1987) kao i inhibiciju reparacije DNK (Hartmann & Speit, 1994). Pokazano je da kod riba izaziva histopatološke promene na jetri, žučnoj kesi i bubrezima (Pedlar et al. 2002, Roy & Bhattacharya, 2006).

Kadmijum (Cd) se u prirodi nalazi kao prirodni činilac sedimenta. Remobilizacijom iz sedimenta pod uticajem različitih hemijskih i bioloških faktora dolazi do njegove disperzije u okolinu (Wang et al., 2010). Njegovo mutageno, kancerogeno i citotoksično dejstvo je intenzivno istraživano na mnogim biološkim modelima, najviše na sisarima (Bruce & Heddle, 1979, Felten, 1978, Degraeve, 1981). Genotoksičnost Cd je pokazana u više studija na ribama, preko povećane incidence mikronukleusa u eritrocitima u tretmanu (Chandra & Khuda-Bukhsh, 2004, Mahrous et al., 2015).

Hrom (Cr) je prirodno prisutan element u zemljinoj kori. Najčešće se javlja u dva oksidativna stanja Cr (III) i koja su veoma različita u naelektrisanju, fizičko-hemijskim osobinama, kao i u hemijskoj i biohemijskoj reaktivnosti. Oblik Cr (III) esencijalan je za funkcionisanje živih organizama i ograničava nepovoljne efekte metabolizma glukoze i lipida (Goyer, 2001). Najčešće se otpušta u heksvalentnom stanju, Cr (VI), kao toksični industrijski polutanat, klasifikovan kao humani kancerogen (IARC, 1990, U.S. EPA, 1992, ATSDR, 2012). Studije sa Cr (VI) su pokazale citotoksičnost kao i sposobost indukcije prekida i fragmentacije DNK molekula kod pacova (Patlolla et al., 2009). Takođe je pokazana i mogućnost hroma da indukuje biohemijske, genotoksične i histopatološke promene na jetri i bubrezima riba (Velma & Tchounwou, 2010).

Olovo (Pb) je prirodno prisutan element u malim količinama u zemljinoj kori. Jedan od glavnih mehanizama preko kojih Pb ispoljava svoje toksično dejstvo je njegova interakcija sa mnogim proteinima i enzimima, koje dovode do inhibicije biohemijskih procesa (ATSDR, 1999). Takođe je pokazano da svoje toksično dejstvo najčešće ispoljava preko formacije ROS-ova (Hermes-Lima et al., 1991). Izlaganje olovu dovodi do indukcije mutageneze i razmene sestrinskih hromatida. *In vitro* i *in vivo* studije su ukazale da indukuje oštećenje DNK molekula indirektno kroz inhibiciju DNK sinteze i reparacije, oksidativnog stresa i interakcije sa DNK-vezujućim proteinima, kao i tumor supresornim genima (Tchounwou et al., 2012). Eksperimentalne studije su ukazale na potencijalnu kancerogenost gde je tretmanom kod pacova dovodio do pojave tumora (Waalkes et al., 1995). Kod riba je uočena pojava inhibicije spermatogeneze (Yamaguchi et al., 2007) i promene na eritrocitima (Oliveira Ribeiro et al., 2006). Takođe su histopatološkim analizama potvrđene promena na jetri i bubrezima riba pot uticajem Pb (Rabitto et al., 2005).

Živa (Hg) se u prirodi nalazi u tri forme, kao metalni element (elementarna živa, Hg^0), u neorganskom obliku u vidu soli (Hg^{1+} , Hg^{2+}) i organskom obliku (metil-živa, etil-živa, fenil-živa), gde svaki od oblika poseduje jedinstven profil toksičnosti (Clarkson et al., 2003). Metil-živa je najčešći organski oblik koji se nalazi u prirodi, i nastaje kao rezultat metilacije mikroorganizama u vodi i zemljištu (Dopp et al., 2004). Veza između izlaganja živi i kancerogeneze je veoma kontraverzna. Naime, neke studije su pokazale njen genotoksični potencijal, dok neke nisu našle vezu između izloženosti

živi i oštećenju DNK molekula (Crespo-López et al., 2009). U studijama u kojima se implicira uloga žive kao genotoksičnog agensa, oksidativni stres se navodi kao glavni mehanizam oštećenja DNK molekula u ćelijama, direktno ili preko interakcije ROS-ova sa proteinima uključenim u DNK reparaciju, deobno vreteno i segregaciju hromozoma (Valko et al., 2006). Istraživanja toksičnosti žive na ribama su pokazala histopatološka oštećenja na jetri, škragama i gastrointestinalnom tkivu (Giari et al. 2008).

1.3.4. Detekcija metala i elemenata u tragovima

Dve najznačajnije tehnike za analizu metala i elemenata u tragovima su atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) i induktivno spregnuta plazma-optičko emisijska spektrometrija (ICP-OES). Obe metode imaju svoje prednosti i mane, sa tim da je ICP-OES ima bolje limite detekcije i kako obezbeđuje mnogo brže procesovanje uzoraka favorit je u ekotoksikološkim studijama koje su često bazirane na analizi velikog broja uzoraka (Lenhardt et al., 2015).

Kod ICP-OES metode uzorak se uvodi u izvor plazme gde isparava i razgrađuje se na slobodne atome i jone, pri čemu se dodatna energija troši u cilju pobuđivanja slobodnih atoma i jona u visoko energetska stanja. Pobuđena stanja su nestabilna tako da atom ili atomski jon gubi energiju, bilo preko sudara (termalna razmena energije) sa drugim česticama sistema ili uz pomoć energetskog prelaza na niže energetske nivoe (radijativna razmena energije). Svaki od prisutnih elemenata u plazmi se karakteriše talasnom dužinom emisije linije. Detekcija zračenja određene talasne dužine se primenjuje za kvalitativnu analizu, a izmereni intenzitet se koristi za kvantitativnu analizu uzorka (Velimirović, 2013).

1.4. Klen (*Squalius cephalus* L.)

Klen (Familia: Cyprinidae, *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758)) (Slika 1.3.) je vrsta koja je široko rasprostranjena u Evropi u slatkim i braktičnim vodama. Ima je u malim rekama kao i u većim tokovima i jezerima. Klen se mresti od aprila do juna (Podrug & Raspor, 2009). Juvenilni primerci se hrane pretežno fitoplanktonom i zooplanktonom, dok se adultne jedinke hrane pretežno ribom (Ünver & Erkakan, 2011,

www.fishbase.org). Naseljava i čiste i zagađene vode pa tako nudi mogućnost poređenja različitih vodenih tokova.



Slika 1.3. Klen (*Squalius cephalus*)

Zbog svoje dostupnosti i senzitivnosti korišćena je u biomonitoringu voda u Evropi i proceni zagađenja preko različitih ćelijskih i molekularnih biomarkera (Devaux et al.1998, Larno et al. 2001, Winter et al. 2004, 2005, Dragunet et al. 2007, Krca et al. 2007, Pavlica et al., 2011, Sunjog et al. 2014). U okviru ovih studija najčešće su rađene procene genotoksičnosti na eritrocitima klena *in vivo* i *in vitro* (Devaux et al.1998, Larno et al. 2001, Winter et al. 2004, 2005, Pavlica et al., 2011, Sunjog et al. 2014).

1.5. Područje istraživanja

Kao kontrolni lokalitet je izabrana akumulacija Zlatar koja je nastala pregrađivanjem reke Uvac. Zlatarsko jezero leži na prostorima koji su izgrađeni od trijaskih i jurskih tvorevina, a u manjoj meri i od miocenskih jezerskih sedimenata (Ćirić et al., 1977, Ćirić, 1977). Takođe, najveći deo drenažnog sistema reke Uvac je na tim tvorevinama. Jurskim tvorevinama pripada dijabaz-rožnačka formacija kao melanž koji je u petrološkom smislu izgrađen od glinaca i peščara sa olistolitima laporovitih krečnjaka sa rožnacima, rožnaca, dijabaza, spilita i gabrova. Trijas je u najvećoj meri

izgrađen od različitih vrsta krečnjaka pored kojih su prisutni glinci i laporci. Deo drenažnog sistema zahvata i nearšćlanjeni permo-trijas koji je od konglomerata i pešcara. Visoki sadržaji hroma i nikla u savremenim sedimentima reke Uvac, a time i Zlatarskog jezera, vezani su za prinos materijala sa bazičnih magmatskih stena (spiliti, dijabazi i gabrovi) iz dijabaz-rožnačke formacije.

Akumulacija Garaši je veštačka akumulacija koja se koristi kao vodozahvat, pa je samim tim ograničen antropogeni uticaj. Savremeni sedimenti u veštačkom jezeru Garaši hrane se sa tri geološka kompleksa. To su granitoid Bukulje, termokontaktne izmenjene sedimentne stene gornje krede (filiti, sitnozrni gnajsevi, muskovit-biotitski škriljci i mermeri) i miocenski sedimenti Belanovičkog jezerskog basena (Filipović et al., 1971a, Filipović et al., 1971b). Svaki od ovih kompleksa ima svoju petrologiju i svoj geohemijski zapis. Geohemijske osobenosti granitoida i metamorfita se mogu smatrati relativno jednostavnim jer ih određuje mineralogija dominantnih stena, a to su graniti i filiti. Geohemija jezerskih sedimenata Belanovičkog basena je složenija jer je određuju najmlađi klastični sedimenti miocena koji su nastali prinosom materijala sa mnogo šireg prostora. Geološki resursi sa kojih su hranjeni ovi sedimenti su pored granitoida i metamorfita Bukulje i sedimenti krede kao i veoma složen vulkanski kompleks planine Rudnik.

Peštan i Beljanica su desne pritoke reke Kolubare. Obe reke su pored već postojećeg uticaja komunalnih voda i spiranja sa obradivih površina i pod intenzivnim uticajem rudarskog basena "Kolubara". Geološki resursi sa kojih se hrane Peštan i Beljanica su petrološki dosta heterogeni. Desna obala je od pliocenskih i starije kvartarnih naslaga. Leva obala mnogo kompleksnija. Tu su otkrivene paleozojske stene, miocenski sedimenti, kiseli vulkaniti kao i miocenski granitoid Brajkovca (Filipović et al., 1976, Filipović & Rodin, 1976). Dakle, aluvijoni ovih reka su određeni upravo ovakvim petrološkim sastavom, odnosno stepenom mešanja različitog petrološkog materijala, a sedimenti u aluvijonu su njihova rezultanta. Obzirom da su ispitivani sedimenti uzeti iz donjeg dela aluvijona na njemu je i snažan uticaj Kolubare kao reke. Povišeni sadržaj nikla i hroma na ovom području je posledica prinosa materijala sa krednih klastičnih stena, a koje su dobrim delom hranjene sa ultrabazičnih stena. Ultrabaziti su primarni nosioci upravo hroma, nikla i kobalta.

1.6. Mikrobiološka procena akumulacija, Zlatar (Uvac) i Garaši i reka, Peštan i Beljanica, sa ekogenotoksikološkim analizama na tkivima klena

Procena ekološkog statusa površinskih voda određivala se na dve akumulacije, Garaši i Zlatar (Uvac), i dve reke, Peštan i Beljanica tokom 2011/2012 godine. Pošto je akumulacija Zlatar (Uvac) zaštićeno prirodno dobro jedinke klena sa ovog lokaliteta su korišćene kao kontrolna populacija.

Procena kvaliteta vode određena je na osnovu fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara. Analizirano je 7 grupa mikroorganizama: ukupni koliformi, fekalni koliformi, fekalne enterokoke, aerobni mezofili, aerobni heterotrofi, heterotrofi i oligotrofi. Poreklo zagađenja se dobija na osnovu odnosa fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka F/E. Status samoprečišćavanja dobijen je iz odnosa heterotrofa i oligotrofa O/H. Integrirani odgovor biomarkera (IBR) je korišćen kao pokazatelj odnosa različitih grupa mikroorganizama tokom višemesečnog monitoringa.

Procena genotoksičnosti površinskih voda preko detekcije oštećenja DNK molekula rađena je alkalnim komet testom u krvi, jetri i škragama jedinki klena. Rangiranje parametara za procenu oštećenja, DNK intenziteta repa komete (TI) i „Olive tail moment” (OTM), urađeno je metodom „SRD - sum of ranking differences”.

Paralelno sa komet testom, u jetri i škragama, pratila se i koncentracija metala i metaloida uz pomoć induktivno spregnute plazme – optičko emisijne spektrometrije (ICP - OES). Analiza metala i metaloida istom metodom je urađena i u mišićima i gonadama.

CILJEVI

2. CILJEVI

Ribe su često korišćeni model-organizmi u ekogenotoksikološkim procenama zagađenja vodenih ekosistema, pre svega zbog osetljivosti prema niskim koncentracijama mutagena, tako i zbog sposobnosti akumulacije teških metala i metaloida u tkivima. Kako predstavljaju bitnu kariku u lancima ishrane u prirodi, kao i zbog uloge u ljudskoj ishrani, nezaobilazan su deo ekološkog monitoringa.

Procena ekološkog statusa površinskih voda, dve akumulacije, Garaši i Zlatar (Uvac) i dve reke, Peštan i Beljanica uključila je:

- Procenu kvaliteta vode sa fizičko-hemijskog i mikrobiološkog aspekta.
- Analizu mikrobioloških parametara metodom odgovora integrisanih biomarkera (IBR).
- Detekciju oštećenja DNK molekula alkalnim komet testom na ćelijama krvi, jetre i škrge kod klana.
- Rangiranje parametara za procenu oštećenja DNK molekula SRD metodom.
- Korelaciju između nivoa oštećenja DNK molekula, fizičko – hemijskih i mikrobioloških parametara.
- Određivanje koncentracije metala i metaloida u jetri, škrgamma, mišiću i gonadama klana.
- Korelaciju između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida u tkivima.
- Uporednu analizu ispitivanih lokaliteta na osnovu genotoksičnosti i koncentracije metala i metaloida u tkivima.

MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitivana područja

3.1.1. Uvac, Zlatarsko jezero

Specijalni rezervat prirode "Uvac" obuhvata područje doline reke Uvac i delove dolina njenih pritoka. Uvac raspolaže značajnim hidroenergetskim potencijalom, pa su na njegovom toku izgrađene tri hidroelektrane zbog kojih su stvorena tri veštačka jezera: „Uvac“ (Sjeničko jezero), „Zlatar“ (jezero Kokin Brod) i „Radoinja“ (Radoinjsko Jezero).

Deo klisure reke Uvac prvi put je zaštićen 1971. godine kao Specijalni rezervat prirode sa površinom od 267 ha. 1995. godine zaštita je proširena na površinu od 2,717 ha, dok je „Uredbom o izmenama i dopunama Uredbe o zaštiti Specijalnog rezervata prirode „Uvac“ (Službeni glasnik RS, 25/06), određena zaštitna zona čime su u zaštićeno prirodno dobro uključene sve vode sliva Uvca uzvodno od profila brane akumulacije „Radoinja“ pa je rezervat proširen na sadašnjih 7,543 ha. Glavni razlozi za izmenu Uredbe su obezbeđenje integralne zaštite područja, koje predstavlja jedinstvenu prirodnu i funkcionalnu celinu, kao i dizanje na viši stepen organizacije upravljanja ovim zaštićenim prirodnim dobrom. Zaštićeno područje odlikuje se visokom stopom biodiverziteta, uz istaknuto prisustvo retkih i ugroženih vrsta od nacionalnog i međunarodnog značaja. Pored toga što predstavlja važnu komponentu opšteg diverziteta, ihtiofauna ovog područja je istovremeno i značajan prirodni resurs (Ekološka i ribarstvena istraživanja voda na području Specijalnog rezervata prirode „Uvac“, 2008, www.uvac.org.rs).

Zlatarsko jezero je nastalo izgradnjom hidroelektrane „Kokin Brod“, koja je počela sa radom 1962. godine (Slika 3.1) . Nadmorska visina jezera je 880 metara. Prosečan godišnji doticaj Uvca je 12, 45 m³/s, a površina sliva jezera je 1057 km². U basenu jezera akumulirano je 250 miliona kubnih metara vode. Površina Zlatarskog jezera je 7, 25 km², a maksimalna dubina dostiže 75 metara. Tokom godine amplituda vodostaja može dostići do 45 m (Ekološka i ribarstvena istraživanja voda na području Specijalnog rezervata prirode „Uvac“, 2008).



Slika 3.1. Zlatarsko jezero sa hidroelektranom „Kokin Brod“ (preuzeto sa sajta <http://www.dlhe.rs>)

Riblje naselje koje se danas sreće u akumulaciji je nastalo uglavnom na bazi vrsta koje su ishodno naseljavale reku Uvac gde je akumulacija i napravljena, a višekratnim poribljavanjima u jezero su uneti zlatovčica, šaran, babuška, smuđ i sunčica. Unete vrste su se dobro prilagodile u akumulaciji. U tabelama ispod se daje pregled ribljih vrsta koje naseljavaju akumulaciju sa naznakom koje vrste su introdukovane, a koje su autohtone (Tabela 3.1), kao i kvalitativan i kvantitativan sastav riba u uzorku (Tabela 3.2) (podaci za Tabelu 3.1 i 3.2 su preuzete iz izveštaja projekta: Ekološka i ribarstvena istraživanja voda na području Specijalnog rezervata prirode „Uvac“, 2008).

Tabela 3.1. Pregled ribljih vrsta u akumulaciji Zlatar, Uvac

Vrsta ribe	Status
<i>Hucho hucho</i>	autohtona
<i>Salmo trutta</i>	autohtona
<i>Chondrostoma nasus</i>	autohtona
<i>Salvelinus alpinus</i>	introdukovana
<i>Rutilus pigus</i>	autohtona
<i>Barbus barbus</i>	autohtona
<i>Squalius cephalus</i>	autohtona
<i>Alburnus alburnus</i>	autohtona
<i>Cyprinus carpio</i>	introdukovana
<i>Carassius gibelio</i>	introdukovana

<i>Lepomis gibbosus</i>	introdukovana
<i>Stizostedion lucioperca</i>	introdukovana
UKUPNO:	12 vrsta

Tabela 3.2. Kvalitativan i kvantitativan sastav naselja riba u uzorku u akumulaciji Zlatar, Uvac

Vrsta ribe	Abundanca (%)
<i>Salvelinus alpinus</i>	3,7
<i>Barbus barbus</i>	1,8
<i>Chondrostoma nasus</i>	1,9
<i>Squalius cephalus</i>	40,8
<i>Rutilus pigus</i>	3,7
<i>Stizostedion lucioperca</i>	1,8
<i>Lepomis gibbosus</i>	14,8
<i>Alburnus alburnus</i>	31,5
UKUPNO	100

3.1.2. Garaši

Akumulaciono jezero Garaši nastalo je 1976. godine podizanjem 400 m duge zemljane brane, kojom je izgrađen vodozahvat sliva reke Bukulje i njene četiri pritoke (Slika 3.2). Površina jezera je 300 hektara i prosečne dubine od 6 do 8 metara. Najveća dubina kod brane je skoro 40 metara. Jezero je prvi put poribljeno šaranom 1978. godine, dok se sistemsko poribljavanje vršilo u periodu od 1981. do 2008. godine, kada je uredbom nadležnog ministarstva zabranjeno poribljavanje šarana u vodna tela koja služe za vodosnabdevanje. Na jezeru nije dozvoljena upotreba čamaca, s obzirom da se koristi kao vodozahvat za vodosnabdevanje Arandjelovca i okolnih, manjih mesta. Ipak, oko jezera se nalazi poljoprivredno obradivo zemljište zbog kojeg se povećava mogućnost dospevanja različitih hemijskih agenasa i pesticida u vodu (Slika 3). Prema podacima dobijenim uzorkovanjem naselja riba, Garaše naseljava 9 vrsta riba iz 4 familije (Tabela 3.3) (preuzeto iz Izveštaja o ihtiološkim ispitivanjima na akumulaciji “Garaši”, 2006).



Slika 3. 2. Akumulacija “Garaši” (levo i desno), desno- pogled sa vodotornja na desni deo jezera (crvenom strelicom su označene poljoprivredne površine uz akumulaciju). Preuzeto iz Izveštaja o ihtiološkim ispitivanjima na akumulaciji “Garaši”, 2006.

Tabela 3.3. Kvalitativan i kvantitativan sastav naselja riba u uzorku u akumulaciji Garaši

Vrsta ribe	Abundanca (%)
<i>Stizostedion lucioperca</i>	5,6
<i>Perca fluviatilis</i>	12,4
<i>Gymnocephalus cernuus</i>	0,6
<i>Squalius cephalus</i>	5,6
<i>Abramis brama</i>	4,5
<i>Rutilus rutilus</i>	67,7
<i>Alburnus alburnus</i>	1,8
<i>Lepomis gibbosus</i>	0,6
<i>Ameiurus melas</i>	1,2
UKUPNO:	100

3.1.3. Peštan i Beljanica

Peštan i Beljanica su desne pritoke reke Kolubare. Najveći deo teritorije sliva reka se nalazi u okviru Kolubarskog basena lignita sa površinskim kopovima uglja,

deponijama pepela, termoelektranama i nizom postrojenja za proizvodnju i preradu uglja i električne energije. Procesi eksploatacije, obrade i prerade lignita u Kolubari su doveli do promena u svim podsistemima životne sredine, i direktno ili indirektno utiču na vode koje pripadaju Kolubarskom slivu (Živanović & Novković, 2013).

Riblji fond Kolubarskog sliva je predstavljen uglavnom ciprinidnim vrstama: klen (*Squalius cephalus*), krkuš (Gobio gobio), skobalj (*Chondrostoma nasus*), belica (*Leucaspis delineates*), pijor (*Phoxinus phoxinus*), mrena (*Barbus barbus*), dvoprugasta uklija (*Alburnoides bipunctatus*) i drugim (Simonović et al., 2006).

Reka Peštan (Slika 3.3) izvire ispod planine Bukulje i posle toka od 33 km uliva se u Kolubaru kao njena desna pritoka kod sela Vreoci. Najveći deo toka reke Peštan nalazi se u Kolubarskom basenu koji je pod konstantnim pritiscima kopova uglja. Zapravo je i ovo bio razlog velikih promena hidrografske mreže ovog regiona. U prvoj fazi ovih radova tok Kolubare je prebačen u korito Peštana 1959/1960, kada je tok reke Peštan skraćen za 24km. Navedeni radovi su doveli do deformacije rečnog korita. Pre pomeranja i skraćivanja toka, Peštan se ulivao u Kolubaru severnije kod grada Obrenovca. Radi proširivanja područja površinskih kopova radovi novog izmeštanja hidrografske mreže su ponovo urađeni 1977. Međutim, 1978. i 1979. obimne poplave koje su nastupile izlivanjem reke Peštan, dovele su do poremećaja rečnog korita. U cilju otvaranja novih polja za eksploataciju lignita, tokom 1999. i 2000. god. urađen je projekat regulacije Kolubare i Peštana, gde je tok Kolubare pomeren zapadno. Nakon ove faze, na osnovu dinamike otvaranja novih površinskih kopova pomeranje reke Kolubare biće urađeno u još dve faze, kao i jedna faza pomeranja reke Peštan (Živanović & Novković, 2013).



Slika 3.3. Reka Peštan (levo) i Kolubarski kopovi (desno, preuzeto sa sajta

<http://www.vaseljenska.com/wp-content/uploads/2012/08/kolubara-300x160.jpg>)

Reka Beljanica (Slika 3.4) je desna pritoka reke Kolubare. Sa svojim pritokama pokriva sliv površine 290 km², sa ukupnom dužinom toka od 29 km. Za tok Beljanice je karakteristično da čak 84% vode ispari, 5% ide u sastav podzemnih tokova, a samo 11% čini sam površinski tok. Takva priroda toka uslovljena je malim visinskim razlikama i geološkim karakteristikama tla. Zbog toga sliv Beljanice spada u bujične, kišno-snežne tokove sa veoma promenljivim protokom i uticajem bujica na reljef dna korita. Većina pritoka, osim glavnih izvora, čine periodske tokove, sa velikim sušnim periodima. Glavni izvor zagađenja su netretirane komunalne otpadne i industrijske vode, kao i procedne vode iz deponija (preuzeto sa sajta www.leskovackolubarski.rs).



Slika 3.4. Reka Beljanica

3.2. Materijal

3.2.1. Rastvori

Rastvor I - za lizu (pH=10)

NaCl „Carlo Erba Reagents” (Milano, Italy).....	146,6 g
EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	37,2 g
Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	1,21 g
dH ₂ O.....	1000 mL
Triton X-100 “Sigma” (St. Louis, MO, USA)	

Nakon podešavanja pH dodaje se 1% Triton X-100 i snažno se promeša.

Rastvor II - za denaturaciju i elektroforezu (pH=13)

10 M NaOH "Superlab" (Belgrade, Serbia).....30mL
0,2 M EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....5 mL
dH₂O.....965 mL

Ne podešavati pH.

10 M NaOH

NaOH " Superlab" (Belgrade, Serbia).....200 g
dH₂O.....do 500 mL

0,2 M EDTA

EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....37,2 g
dH₂O.....500 mL

Rasvor III - za neutralizaciju (pH=7,5)

Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....48,44 g
dH₂O.....,.....1000 mL

Nakon podešavanja pH rastvor čuvati u frižideru.

1xPBS

Dulbecco's PBS (10x) „PAA Laboratories“ (Austria).....100 mL
sterilna dH₂O.....900 mL

1% NMP za prvi sloj

NMP „Eurobio“ (France).....1 g
dH₂O.....99 mL

1% NMP za drugi sloj

NMP „Eurobio“ (France).....1 g
1xPBS.....99 mL

1% LMP

LMP „Bio-Rad Laboratories“ (CA, USA).....1 g
1xPBS.....99 mL

Heparin

5000 IU heparin natrijuma u 1mL (Galenika, Srbija)

Ulje karanfilića

Eterično ulje 100% (Probotanic, Srbija)

Etidijum bromid-primarni stok

10 mg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

Arkidin oranž-primarni stok

10 mg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)

Akridin oranž/etidijum bromid

Akridin oranž-primarni stok.....10 µL
Etidijum bromid-primarni stok.....10 µL
dH₂O.....980 µL

Azotna kiselina

65% Merck suprapure (Merck KGaA of Darmstadt, Germany)

Vodonik-peroksid

30% Merck suprapure (Merck KGaA of Darmstadt, Germany)

3.2.2. Podloge i medijumi

Eosin Methylene Blue Agar „HIMEDIA“ Mumbai, India

Pepton.....10 g
K₂HPO₄.....2 g

Laktoza.....	5 g
Sukroza.....	5 g
Eozin-Y.....	0,4 g
Metilensko plavo.....	0,065 g
Agar.....	13,5 g
dH ₂ O.....	1000 mL
Autoklavirati (20 min, 121°C, 1 bar)	

MacConkey agar „Torlak“ Srbija

Pepton-4.....	20 g
Žučne soli.....	1,5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	13,5 g
Neutral crveno.....	0,03 g
Kristal violet.....	0,001 g
dH ₂ O.....	1000 mL
Autoklavirati (20 min, 121°C, 1 bar)	

Dekstrozni teluritni agar „Torlak“ Srbija

Pepton1.....	10.g
Mesni ekstrakt.....	10 g
Ekstrakt kvasca.....	3 g
Dekstroza.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	20 g
dH ₂ O.....	1000 mL
Nakon autoklaviranja (20 min, 121 °C, 1 bar) ohladiti podlogu do 60°C i dodati 5 mL kalijum telurita (8 mg/mL)	

Hranljivi medijum

Govedi ekstrakt.....	3g
Pepton.....	5g

Agar.....15g
dH₂O.....1000 mL
Autoklavirati (20 min, 121°C, 1 bar)

Hranljivi medijum (1/10)

Govedi ekstrakt.....0,3g
Pepton.....0,5g
Agar.....15g
dH₂O.....1000 mL
Autoklavirati (20 min, 121°C, 1 bar)

3.3. Metode

3.3.1. Uzorkovanje vode za fizičko-hemijske i mikrobiološke analize

Za potrebe fizičko-hemijskih i mikrobioloških analiza na Uvcu voda je uzorkovana tokom septembra i oktobra 2011. godine. U septembru je uzorkovanje radila Agencija za zaštitu životne sredine, od koje su naknadno preuzeti podaci za fizičko-hemijske analize. Uzorkovanje u septembru je rađeno na tri tačke: kod brane (A) na dubinama 50, 2000, 4000 cm, na sredini jezera (B) na dubinama 50, 1900, 3800 cm i na početku jezera (V) na dubinama 50, 220, 450 cm. Uzorkovanje za mikrobiološke analize u oktobru je rađeno kod brane (A) na dubini od 50 cm. Klase kvaliteta vode su određene prema fizičko-hemijskim i mikrobiološkim parametrima Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima, ali i prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera (Tabele 3.4, 3.5).

Tabela 3.4. Granice između različitih klasa kvaliteta vode na osnovu Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima

Parametar	Jedinice	Granice između klasa ekološkog potencijala		
		II-III	III-IV	IV-V
HEMIJSKI I FIZIČKO-HEMIJSKI PARAMETRI OCENE EKOLOŠKOG POTENCIJALA ¹				
pH vrednost		6,5-8,5	6,5 - 8,5	<6,5 ; >8,5
Rastvoreni kiseonik	mg l ⁻¹	7,0	5,0	4,0
BPK ₅	mg l ⁻¹	4,5	6,0	20,0
Ukupni organski ugljenik (TOC)	mg l ⁻¹	5,0	7,0	23,0
Amonijum jon (NH ₄ - N)	mg l ⁻¹	0,10	0,80	1,00
Nitrati (NO ₃ -N)	mg l ⁻¹	3,0	6,0	15,0
Ortofosfati (PO ₄ -P)	mg l ⁻¹	0,10	0,20	0,50
Ukupni rastvoreni fosfor (P)	mg l ⁻¹	0,20	0,40	1,0
Hloridi	mg l ⁻¹	50	100	
MIKROBIOLOŠKI PARAMETRI OCENE EKOLOŠKOG POTENCIJALA				
ukupni koliformi	broj/100 ml	10000	100000	1000000
fekalni koliformi	broj/100 ml	1000	10000	100000
fekalne enterokoke	broj/100 ml	400	4000	40000
odnos oligotrofnih i heterotrofnih bakterija - OB/HB		1		

Za potrebe fizičko-hemijskih i mikrobioloških analiza na Garašima je voda uzorkovana tokom avgusta i novembra 2011. godine. U avgustu je uzorkovanje radila Agencije za zaštitu životne sredine, od koje su naknadno preuzeti podaci za fizičko-hemijske analize. Uzorkovanje u avgustu je rađeno na tri tačke: kod brane (A) na dubinama 50, 1000, 2000 cm, na sredini jezera (B) na dubinama 50, 700, 1400 cm i na početku jezera (V) na dubinama 50, 200, 400 cm. Uzorkovanje za mikrobiološke analize u novembru je rađeno kod brane (A) na dubini od 50 cm. Klase kvaliteta vode su određene prema fizičko-hemijskim i mikrobiološkim parametrima Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima, ali i prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera (Tabele 3.4, 3.5).

Tabela 3.5. Granice između različitih klasa kvaliteta vode na osnovu Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za jezera

Parametar	Jedinice	Granice između klasa ekološkog statusa			
		I-II	II-III	III-IV	IV-V
HEMIJSKI I FIZIČKO-HEMIJSKI PARAMETRI OCENE EKOLOŠKOG STATUSA ¹					
pH vrednost		6,5 - 8,5	6,5 - 8,5	6,5 -8,5	<6,5; >8,5
Rastvoreni kiseonik	mg l ⁻¹	8,5 ²	7,0	5,0	4,0
BPK ₅	mg l ⁻¹	1,5	5,0	6,0	20,0
Ukupni organski ugljenik (TOC)	mg l ⁻¹	2,0	6,0	7,0	23,0
Amonijum jon (NH ₄ - N)	mg l ⁻¹	0,05	0,1	0,8	1,0
Nitrati (NO ₃ -N)	mg l ⁻¹	1,50	3,00	6,00	15,00
Ortofosfati (PO ₄ -P)	mg l ⁻¹	0,02	0,1	0,2	0,5
Ukupni rastvoreni fosfor (P)	mg l ⁻¹	0,05	0,2	0,4	1,0
Hloridi	mg l ⁻¹	50	100		
MIKROBIOLOŠKI PARAMETRI OCENE EKOLOŠKOG STATUSA					
fekalni koliformi	broj / 100	<1000	1000	10000	100000
fekalne enterokoke	broj / 100	<400	400	4000	40000
odnos oligotrofnih i heterotrofnih		<1	1		
broj aerobnih heterotrofa (metoda Kohl)	broj / 1 ml	<10000	10000	100000	750000

Za potrebe fizičko-hemijskih i mikrobioloških analiza na Peštanu i Beljanici uzorkovanje je vršeno od septembra 2011. do septembra 2012. godine (Tabela 3.6). U okviru datuma prikazanih u tabeli su rađena i uzorkovanja za fizičko-hemijske analize koje su preuzete od Agencije za zaštitu životne sredine kao i Gradskog Zavoda za javno zdravlje, Beograd. Klasa kvaliteta vode je određena prema fizičko-hemijskim i mikrobiološkim parametrima Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za male i srednje vodotoke, nadmorske visine do 500 m (Tabela 3.7). Na Peštanu je voda uzorkovana 13 puta tokom 10 meseci, od čega 2 puta u novembru i decembru 2011. kao i septembru 2012 godine. Na Beljanici je voda uzorkovana 12 puta tokom 10 meseci, od čega dva puta u maju i septembru 2012 godine.

Tabela 3.6. Datumi uzorkovanja vode

Peštan	Beljanica
datum uzorkovanja vode	
02.09.2011. ^b	14.10.2011. ^a
14.10.2011. ^{ab}	30.11.2011. ^a
08.11.2011. ^b	27.12.2011. ^{ab}
30.11.2011. ^a	24.02.2012. ^{ab}
08.12.2011. ^b	30.03.2012. ^{ab}
27.12.2011. ^{ab}	24.04.2012. ^{ab}
30.03.2012. ^{ab}	14.05.2012. ^b
24.04.2012. ^{ab}	24.05.2012. ^{ab}
21.05.2012. ^b	16.07.2012. ^b
13.07.2012. ^b	27.08.2012. ^{ab}
27.08.2012. ^{ab}	12.09.2012. ^b
12.09.2012. ^b	28.09.2012. ^{ab}
28.09.2012. ^{ab}	

^a uzorkovano za mikrobiološke analize, ^b uzorkovano za fizičko-hemijske analize

Tabela 3.7. Granice između različitih klasa kvaliteta vode na Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za male i srednje vodotoke, nadmorske visine do 500 m

Parametar	Jedinice	Granice između klasa ekološkog statusa			
		I-II	II-III	III-IV	IV-V
HEMIJSKI I FIZIČKO-HEMIJSKI PARAMETRI OCENE EKOLOŠKOG STATUSA ¹					
pH vrednost		6,5 - 8,5	6,5 - 8,5	6,5 - 8,5	<6,5 ; >8,5
Rastvoreni kiseonik	mg l ⁻¹	8,5	7,0	5,0	4,0
BPK ₅	mg l ⁻¹	1,5	5,0	6,0	20,0
Ukupni organski ugljenik (TOC)	mg l ⁻¹	2,0	6,0	7,0	23,0
Amonijum jon (NH ₄ - N)	mg l ⁻¹	0,05	0,1	0,8	1,0
Nitrati (NO ₃ -N)	mg l ⁻¹	1,50	3,00	6,00	15,00
Ortofosfati (PO ₄ -P)	mg l ⁻¹	0,02	0,1	0,2	0,5
Ukupni rastvoreni fosfor (P)	mg l ⁻¹	0,05	0,2	0,4	1,0
Hloridi	mg l ⁻¹	50	100		
MIKROBIOLOŠKI PARAMETRI OCENE EKOLOŠKOG STATUSA					
ukupni koliformi	broj / 100 ml	500	10000	100000	1000000
fekalni koliformi	broj / 100 ml	100	1000	10000	100000
fekalne enterokoke	broj / 100 ml	40	400	4000	40000
odnos oligotrofnih i heterotrofnih bakterija - OB/HB		10	1		
broj aerobnih heterotrofa (metoda Kohl)	broj / 1 ml	500	10000	100000	750000

Klase graničnih vrednosti mikrobiološkog zagađenja određene su za ispitivana vodna tela i preko bakterioloških parametara prema Kohlu (1975) (Tabela 3.8).

Tabela 3. 8. Klase graničnih vrednosti mikrobiološkog zagađenja reka procenjene preko bakterioloških parametara prema Kohlu (1975), Kavka & Poetsch (2002) i imajući u vidu EU sanitarne kvalitete o vodama 2006/7 / EEZ

	Klasa	I	II	III	IV	V
	Zagađenje	nisko	umereno	kritično	jako	prekomerno
Ukupne koliformne bakterije	100mL	≤ 500	> 500 -10 000	> 10 000 -100 000	> 100000 -1000 000	> 1 000 000
Fekalne koliformne bakterije	100mL	≤ 100	> 100 -1000	> 1 000 -10 000	> 10 000 -100 1000	>100 000
Fekalne enterokoke	100mL	≤ 40	> 40 -400	> 400 -4 000	> 4 00 -40 000	>40 000
Aerobni heterotrofi	1mL	≤ 500	> 500 -10 000	> 10 000 -100 000	> 100000 -750000	>750000

3.3.2. Mikrobiološke analize vode

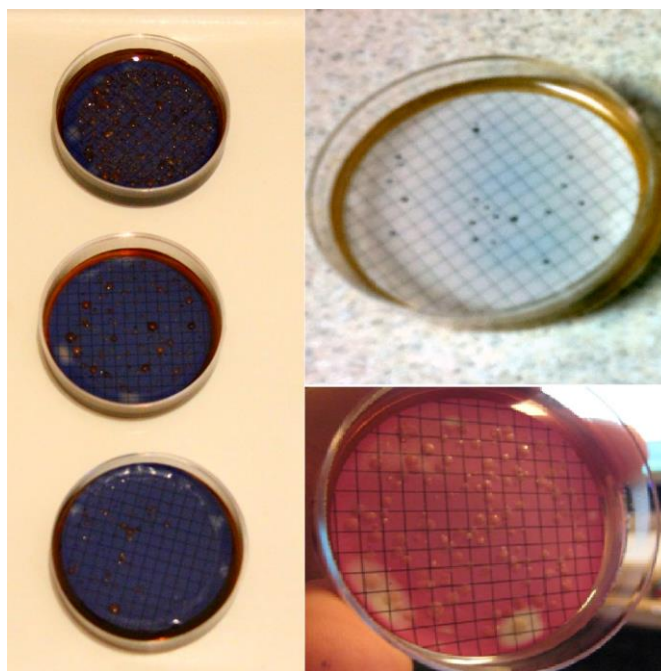
U okviru sanitarnog pregleda pratile su se četiri grupe bakterija i to: ukupne koliformne bakterije, fekalne koliformne bakterije, fekalne enterokoke, aerobne mezofilne bakterije. Koliformne bakterije, i fekalne enterokoke su izolovane metodom membranske filtracije (Službeni glasnik, 33/87), dok je grupa aerobnih mezofila izolovana nanošenjem uzorka vode na čvrstu hranljivu podlogu (Službeni glasnik, 42/98 i 44/99).

U okviru ekološkog pregleda pratile su se tri grupe bakterija: aerobni heterotrofi (indikator organskog zagađenja), heterotrofi (indikator organskog zagađenja) i oligotrofi (naseljavaju sredine sa vrlo niskim koncentracijama organskih materija) (Službeni glasnik, 74/2011).

3.3.2.1. Koliformne bakterije – metod membranska filtracija

Uzorak od 100 mL vode, odnosno odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru, filtriran je kroz celuložno-nitratne filtre dijametra pora 0,45 µm. Prilikom izolacije ukupnih koliformnih bakterija, filteri su postavljani na podlogu EMB

agar (engl. *Eosine Metilene Blue*, LabM) i inkubirani 24 h na 37 °C. Kolonije modrih boja su smatrane pozitivnim rezultatom (Slika 3.5). Za izolaciju fekalnih koliformnih bakterija, filteri su postavljeni na podlogu MacConkey agar (Torlak) i inkubirani 24 h na 44 °C. Kolonije tamno ružičaste boje su smatrane pozitivnim rezultatom (Slika 3.5).



Slika 3.5. Kolonije ukupnih koliformnih bakterija na EMB podlozi (levo), fekalnih koliforma na MacConkey podlozi (dole desno) i fekalnih enterokoka na DTA podlozi (gore desno).

3.3.2.2. Fekalne enterokoke – metod membranska filtracija

Uzorak od 100 mL vode, odnosno odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru, filtriran je kroz celulozno-nitratne filtre dijametra pora 0,2 µm. Filtri su postavljeni na podlogu DTA (dekstrozni teluritni agar, Torlak) i inkubirani 24 h na 37°C. Na crnim kolonijama, izraslim nakon inkubacije, kao potvrdni test rađen je katalaza test, prelivanjem kolonija 3% rastvorom vodonik peroksida. Crne, katalaza negativne kolonije su smatrane pozitivnim rezultatom (Slika 3.5).

Odnos fekalnih koliformnih bakterija i fekalnih enterokoka F/E ukazuje na poreklo zagađenja, tačnije ako je ispod 2 može se reći da poreklo nije antropogeno već od prisustva životinja, dok indeks preko 4 ukazuje na antropogeni uticaj (Geldreich & Kenner et al., 1969, Kapetanović et al., 2010).

3.3.2.3. Aerobne mezofilne bakterije

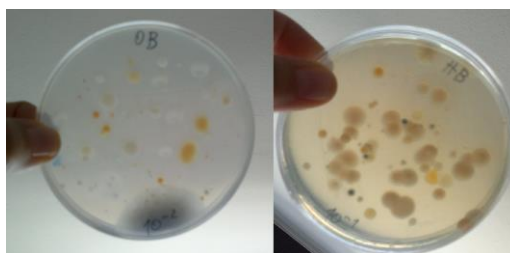
Aerobne mezofilne bakterije su grupa bakterija koje se koriste kao indikator ispravnosti vode za piće. Pokazatelj su prisustva potencijalno patogenih vrsta. Aerobne mezofilne bakterije su kultivisane na čvrstoj hranljivoj podlozi utrljavanjem 0,1 mL odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru na čvrstu hranljivu podlogu i inkubacijom 24 h na temperaturi od 37°C.

U 1 mL vode dozvoljeno je 300 CFU (engl. „*Colony Forming Units*”) u prirodnim vodama otvorenih izvorišta (Službeni glasnik, 42/98 i 44/99).

3.3.2.4. Aerobni heterotrofi, heterotrofi i oligotrofi

Aerobni heterotrofi, heterotrofi i oligotrofi su indikatori kvaliteta vode sa aspekta njenog organskog zagađenja. Aerobni heterotrofi se gaje na čvrstoj hranljivoj podlozi utrljavanjem 0,1 mL odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru na čvrstu hranljivu podlogu i inkubacijom od 5 - 7 dana na temperaturi od 22 - 26 °C. Heterotrofi se gaje prelivanjem 1 mL odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru sa hranljivom podlogom i inkubacijom na temperaturi od 22 °C (Slika 3.6). Oligotrofi naseljavaju sredine sa vrlo niskim koncentracijama organskih materija, a mogu se nalaziti i u sredinama sa višim koncentracijama tih materija. Indikatori su voda koja su manje opterećene materijama organske prirode. Oligotrofi se gaje prelivanjem 1 mL odgovarajućeg razblaženja vode u fiziološkom rastvoru sa hranljivom podlogom (1/10) i inkubacijom 5 - 7 dana na temperaturi od 22 - 26 °C (Slika 3.6).

Odnos heterotrofa i oligotrofa daje indeks O/H, koji ako je preko 1 ukazuje na zadovoljavajući status samoprečišćavanja reke, a ako je preko 10 ukazuje na dobru sposobnost samoprečišćavanja.



Slika 3.6. Kolonije oligotrofnih (levo) i heterotrofnih (desno) bakterija na čvrstim hranljivim podlogama

3.3.2.5. Integrisani odgovor biomarkera

Integrisani odgovor biomarkera (engl. *Integrated biomarker response*, IBR) je metoda koja sažima odgovore biomarkera, u ovom slučaju mikrobioloških parametara, i olakšava njihovu interpretaciju (Beliaeff & Burgeot, 2002). Preciznije rečeno, integrisani odgovor biomarkera se izražava preko poligonalnih polja, koja se predstavljaju kao površine dobijene od različitih IBR vrednosti za dati parametar, i preko kojih se mogu porediti lokacije i/ili meseci uzorkovanja.

Kako su uzorkovanja za mikrobiološke analize na Peštanu i Beljanici rađena tokom više meseci (na Peštanu tokom sedam meseci, a na Beljanici tokom devet meseci) IBR metoda je imala za cilj bolje sagledavanje odnosa mikrobioloških parametara tokom sezona na obe reke.

Obrada podataka (Damien et al., 2007):

Standardizacija podataka

$$1. A = (X_i - \text{mean } X) / S$$

A -standardizovana vrednost biomarkera

X_i -srednja vrednost biomarkera za svaki mesec

X- srednja vrednost biomarkera za sve mesece

S – SD za svaki biomarker

2. Izabrana je minimalna vrednost, min, za svaki biomarker

3. Vrednost $B = A + |\text{min}|$, gde je $B \geq 0$, a $|\text{min}|$ je apsolutna vrednost

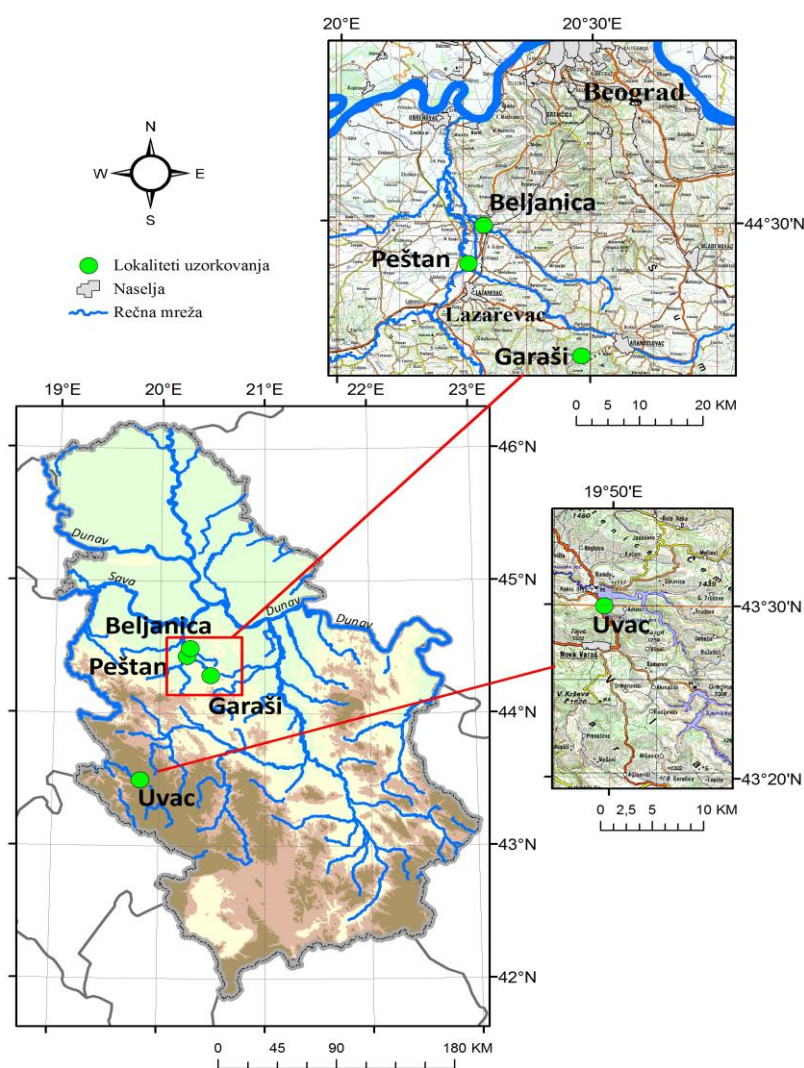
4. Odgovarajuća IBR vrednost je $\{(B_1 \times B_2) / 2\} + \{(B_2 \times B_3) / 2\} + \dots + \{(B_{n-1} \times B_n) / 2\} + \{(B_n \times B_1) / 2\}$.

3.3.3. Uzorkovanje jedinki klana

Uzorkovanje je vršeno na četiri lokacije koje se nalaze u Srbiji, na akumulacijama Uvac "Zlatar" (N43°29'56.9" E19°49'27.3") i Garaši (N 44°17'29.71" E 20°28'54.74"), kao i na rekama Peštan (N44°26'05.26" E20°15'22.95") i Beljanica

(N44°29'40.67" E20°17'07.88") (Slika 3.7). Izlovljavanje jedinki klena na akumulacijama Zlatar i Garaši vršeno je pomoću seta stajaćih dubinskih ribarskih mreža dužine 10-30 m sa promerom okca od 10 do 80 mm, dok je na rekama Peštan i Beljanica izlovljavanje vršeno elektro-ribolovnim aparatom ELEMAX SHX 2000 (SAWAFUJI, 1,2 kW, 6 A).

Ukupno je analizirana 81 jedinka klena od čega 11 jedinki sa Uvca, 5 jedinki sa Garaša, 28 jedinki sa Peštana i 37 jedinki sa Beljanice (Tabela 3.9). Svim uzorkovanim primercima izmerene su totalna (TL) i standardna (SL) dužina tela (cm), kao i ukupna masa tela (g) (Tabele 4, 6, 8 i 14, Prilog) Sve uzorkovane jedinke su korišćene za analizu komet testom dok su za određivanje koncentracije metala u tkivima korišćene sve jedinke sem jedinki sa Uvca iz maja.



Slika 3.7. Mapa lokaliteta

Tabela 3.9. Broj uzorkovanih jedinki klena

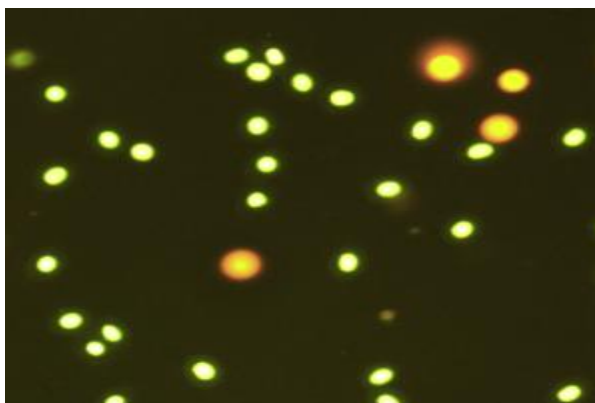
	Peštan Beljanica		Uvac		Garaši	
datum uzorkovanja	broj jedinki		datum uzorkovanja	broj jedinki	datum uzorkovanja	broj jedinki
14. 10. 2011.	4	3	17. 05. 2011.	4	4. 11. 2011.	5
30. 11. 2011.	3	4	24. 10. 2011.	7		
27. 12. 2011.	3	4				
24. 02. 2012.		5				
30. 03. 2012.	4	3				
24. 04. 2012.	3	4				
24. 05. 2012.		4				
12. 07. 2012.	4	4				
27. 08. 2012.	4	3				
28. 09. 2012.	3	3				

3.3.4. Pravljenje suspenzije ćelija

Pre uzimanja krvi i disekcije, ribe su anestetizirane uljem karanfilića. Krv je uzimana špricom direktno iz srca u mikrotube sa 0,5 mL hladog rastvora heparin-PBS-a (engl. „*Phosphate Buffered Saline*”) rastvora za prevenciju zgrušavanja. Uzorci jetre, škrge, mišića i gonada su brzo uklonjeni, isprani destilovanom vodom i čuvani na -20°C pre analiza metala. Jetra i škrge su posebno odvojeni i za komet test tako da je svaki organ isečen i iseckan u 0,2 mL HBSS (engl. „*Hanks Balanced Saline Solution*”) u Petrijevoj šolji pri tom koristeći dva čista skalpela. Iseckano tkivo je prebačeno u epruvete sa 2,5 mL HBSS i 0,3 mL tripsina (fin. konc. 0,05 %) i inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon dodavanja 10 mL HBSS suspenzija ćelija je propuštena kroz 40 µm iglu šprica da bi se dobile pojedinačne ćelije. Posle centrifugiranja (800 g × 10 min), supernatant je odbačen i talog je pažljivo resuspendovan u 0,5 mL HBSS. Pre početka Komet testa procenjena je vijabilnost eritrocita i ćelija jetri i škrge rastvorom akridin-oranž/etidijum bromid.

3.3.5. Diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)

U 20 μL suspenzije ćelija, dodaje se 2 μL pripremljene AO/EB boje. Nakon mešanja nastavkom automatske pipete, suspenzija se nanosi na mikroskopsku pločicu i prekriva pokrovnim staklom. Ćelije se posmatraju na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria), pod uvećanjem 400 $\times$, sa filterom za ekscitaciju (pobuđivanje) od 510 - 560 nm i emisiju od 590 nm. Bojenje se zasniva na proveru integriteta membrane: ukoliko je membrana intaktna (neoštećena) samo će boja AO difundovati u ćeliju i bojiti jedro zelenom fluorescencijom. Ukoliko je integritet membrane narušen i EB će difundovati u ćeliju i prekriti signal, te će jedra emitovati narandžastu ili crvenu fluorescenciju (Slika 3.8). Ćelije sa crvenim ili narandžastim jedrom se smatraju mrtvima, dok se ćelije sa zelenim jedrom smatraju živima (Squier & Cohen, 2001).

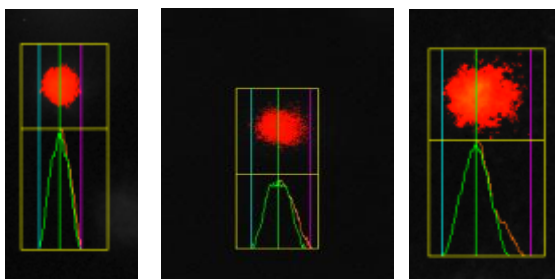


Slika 3.8. AO/EB diferencijalno bojenje eritrocita riba

3.3.6. Elektroforeza pojedinačnih ćelija - komet test

Primenjena je alkalna verzija komet testa po protokolu Singh i sar. (1988) uz male modifikacije. Čitava procedura se obavlja pod žutim svetlom. Prethodno očišćene (odmašćene) mikroskopske pločice se potapaju u 1% rastvor agaroze normalne tačke topljenja (engl. „*Normal Melting Point*” - NMP) i suše na sobnoj temperaturi 24 h. Na pločicu se potom, na dva mesta, nanosi po 80 μL 1% NMP agaroze i prekriva pokrovnim staklom, kako bi se agarozna ravnomerno rasporedila po pločici. Pločice se stavljaju na 5 min na 4°C, kako bi se agarozna stegla. Od pripremljene suspenzije ćelija, 30 μL se meša sa 70 μL agaroze niske tačke topljenja (engl. „*Low Melting Point*“ -

LMP). Potom se skidaju pokrovna stakla i na pločice se nanosi 70 μ L 1% LMP agaroze sa ćelijama. Da bi se agarozna ravnomerno rasporedila, prekriva se pokrovnim staklom. Pločice se opet stavljaju na 5 min na 4°C. Nakon skidanja pokrovnih stakala, pločice se na 1 h potapaju u hladan rastvor za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5% Triton X-100, pH = 10). Pločice se zatim poređaju u kadu za elektroforezu i potope u hladan rastvor za denaturaciju i elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH = 13). Pločice se prvo inkubiraju 20 min bez struje kako bi došlo do denaturacije. Nakon denaturacije, narednih 20 min vrši se elektroforeza (0,6 - 0,75 V/cm, 300 mA, Power supplier 503, APELEX) u istom rastvoru koji je korišćen za denaturaciju. Nakon elektroforeze, pločice se potapaju na 15 min u hladan rastvor za neutralizaciju (0,4 M Tris, pH = 7,5). Za bojenje pločica koristi se EB (2 μ g/mL). Na svaki gel se nanese po 20 μ L rastvora boje i pokrije pokrovnim staklom. Pločice se posmatraju na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria). Za analizu pločica, koristi se softver Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Na svakoj pločici analizira se uzorak od 50 kometa (Slika 3.9). Nivo oštećenja praćen je putem parametara TL, (engl. „*Tail Length*“) dužina repa, TI, (engl. „*Tail Intensity*“) intenzitet repa i OTM, momenat repa komete (engl. „*Olive tail moment*“).



Slika 3.9. „Komete“ eritrocita (levo), ćelija jetre (sredina) i škrge (desno)

3.3.7. Rangiranje parametara za procenu oštećenja DNK metodom SRD

SRD (engl. *Sum Of Ranking Differences*) metoda je imala za cilj rangiranje parametara genotoksičnosti (Sunjog et al., 2013). Podaci su raspoređeni u formu matriksa sa objektima (u našem slučaju 34 jedinke klena) i varijablama, tačnije 9 različitih metoda za procenu genotoksičnosti, odnosno tri parametra (TL) (l), TI (i), OTM (m)) i tri vrste ćelija (krv (e), jetra (l) i škrge (g)). Rankovi metoda sadrže 3 slova:

„r”-rank, zatim oznaku ćelije (e, l, g) i konačno oznaku parametra genotoksičnosti (l, i, m). Najočiglednije je bilo koristiti proseke od svih parametara genotoksičnosti kao referencu rankiranja. Nakon rankiranja, svaki metod dobija SRD vrednost. Što je za određeni metod SRD vrednost bliža nuli (rank je bliži referentnoj vrednosti) taj metod je bolji u smislu da može zameniti ostale. Blizina SRD vrednosti za određene metode pokazuje da se oni ponašaju slično i obrnuto.

3.3.8. Određivanje koncentracije metala i metaloida u tkivima metodom induktivno spregnute plazme-optičko emisije spektrometrije (ICP-OES)

Za analizu metala su korišćene škrge, jetra, gonade i mišić (dorzalni). Nakon disekcije i ispiranja destilovanom vodom, tkiva su čuvana na -20°C. Pred liofilizaciju (Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrator, GAMMA 1-16 LSC, Germany) uzorcima je izmerena vlažna masa. Nakon završene liofilizacije masa uzoraka je varirala od 0,2 do 0,4 g suve mase. Uzorci određene mase su potom procesuirani u mikrotalasnoj peći (speedwaveTM MWS-3+, Bergof Products + Instruments GmbH, Eningem, Germany). Tokom procesa digestije, korišćena je smeša od 65% HNO₃ (6 mL, Merck suprapure) i 30% H₂O₂ (4 mL, Merck suprapure). Proces digestije je sproveden sa temperaturnim programom za razlaganje uzoraka hrane, sa opsegom od 100 do 170°C. Posle hlađenja do sobne temperature, digestovani uzorci su razređeni destilovanom vodom do ukupne zapremine od 25 mL. Detekcija metala i metaloida je vršena uz pomoć induktivno spregnute plazme – optičko emisije spektrometrije (ICP-OES, Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germany, Slika 3.10).

Ispitivano je 14 elemenata na sledećim talasnim dužinama: Al- 396,152 nm, As- 234,984 nm, B-249,773 nm, Ba- 230,424 nm, Cr- 425,435 nm, Cu-324,754 nm, Fe- 259,941 nm, Hg- 194,227 nm, Mn- 260,569 nm, Mo- 281,615 nm, Ni- 231,604 nm, Pb- 220,353 nm, Sr-460,733 nm, Zn- 213,856 nm.

Kvalitet analitičkog procesa je kontrolisan analizom referentnog materijala goveđe jetre (BCR-185R) i tkiva lišaja (IAEA-336 Lichen).

Koncentracija elemenata je izražena na µg/g suve mase tkiva za svaku jedinku pojedinačno. Na osnovu ove koncentracije moguće je izraziti i koncentraciju na vlažnu

masu tkiva radi određivanja MDK (Maksimalno Dozvoljena Koncentracija). Prema regulativi Evropske komisije (1881/2006/EC), maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) za Pb, Cd, i Hg u ribljem mesu jesu 0,3, 0,05, 0,5 - 1 µg po gramu sveže mase. Prema regulativi Republike Srbije, MDK za As, Pb, Cd i Hg u svežem mesu ribe jesu su 2, 0, 3, 0,05, 0,5 - 1 µg po gramu (Službeni glasnik, 28/2011).



Slika 3.10. Instrument sa induktivno spregnutom plazmom - optičko emisionom spektrometrijom (ICP-OES, Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germany).

3.4. Statističke analize

Distribucija svih varijabli je analizirana Kolmogorov-Smirnov testom normalnosti distribucije. Kada su rezultati testa ukazali na odsustvo normalne distribucije, poređenja su vršena primenom neparametrijskih statističkih metoda, a kada podaci nisu značajno odstupali od normalne raspodele podaci su testirani parametrijskim testovima. Ako su u istom setu podataka za poređenje bila prisutna oba tipa raspodele, dalja testiranja su vršena sa testom za koji je većina podataka bila primerena.

Korelacija između fizičko-hemijskih, mikrobioloških i parametara genotoksičnosti je rađena Pearson-ovim testom. Odnosi koncentracija različitih elemenata unutar istog tkiva, kao i njihovo poređenje sa parametrima genotoksičnosti analizirani su Pearson-ovim testom za većinu lokaliteta, sem kada je usled odsustva normalne raspodele korišćen Spearman-ov test.

Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) korišćena je da bi se sumirale varijacije podataka u uzorku pomoću nekorelišućih komponenti (svaka komponenta je posebna linearna kombinacija originalnih promenljivih), sa ciljem da se proceni diferencijacija između analiziranih ribljih tkiva (na osnovu koncentracije elemenata i oštećenja DNK molekula). U rezultatima su približno prikazane grupacije jedinki unutar podprostora manje dimenzije. Podaci o koncentracijama elemenata kao i vrednosti oštećenja DNK u svakom tkivu predstavljaju ulazne promenljive za analizu glavnih komponenta.

Tkiva su takođe bila upoređena i putem kanonijske diskriminantne analize (engl. *Canonical Discriminant Analysis*, CDA) radi određivanja stepena odvajanja četiri analizirana tkiva u odnosu na nivoe akumulacije elemenata. Kao ulazni podaci za analizu su korišćene osnovne vrednosti elemenata u svakom tkivu.

Za prag značajnosti kod svih testova je određena vrednost $p < 0.05$.

Statističke analize su rađene u programu STATISTICA v. 7.0 (StatSoft, Inc.).

REZULTATI

4. REZULTATI

Analiza oštećenja DNK molekula akvatičnih organizama široko je prihvaćena kao pogodna metoda za procenu kontaminacije vodenih ekosistema. U ovom radu praćeno je oštećenje molekula DNK alkalnim komet testom kod klana u krvi, jetri i škrgama. Rezultati su prikazani pomoću dva parametra TI i OTM. Jedinke klana su uzorkovane iz dve akumulacije, Garaši i Zlatar (Uvac), i dve reke, Peštan i Beljanica.

Paralelno sa komet testom, u jetri i škrgama, praćena je i koncentracija metala i metaloida uz pomoć induktivno spregnute plazme – optičko emisione spektrometrije (ICP - OES). Analiza metala i metaloida istom metodom urađena je i u mišićima i gonadama.

Procena kvaliteta vode određena je na osnovu fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara. Analizirano je 7 grupa mikroorganizama: ukupni koliformi, fekalni koliformi, fekalne enterokoke, aerobni mezofili, aerobni heterotrofi, heterotrofi i oligotrofi. Poreklo zagađenja je određeno na osnovu odnosa fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka F/E. Status samoprečišćavanja dat je iz odnosa heterotrofa i oligotrofa O/H.

Rangiranje parametara za procenu oštećenja DNK urađeno je metodom „SRD - sum of ranking differences”. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) je korišćen kao pokazatelj odnosa različitih grupa mikroorganizama tokom višemesečnog monitoringa.

Specijalni rezervat prirode "Uvac", akumulacija Zlatar, je zaštićeno prirodno dobro od izuzetnog značaja i izabrano je za kontrolni lokalitet pa su jedinke klana sa Uvca korišćene kao kontrolna populacija. Akumulacija Garaši je veštačka akumulacija koja se koristi kao vodozahvat, pa je samim tim ograničen antropogeni uticaj. Pritoke reke Kolubare, Peštan i Beljanica, su pored već postojećeg uticaja komunalnih voda i spiranja sa obradivih površina i pod intenzivnim uticajem rudarskog basena "Kolubara".

4.1. Uvac

4.1.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize

Rezultati fizičko-hemijske analize vode (Tabela 4.1) pokazuju da su koncentracije primarnih nutrijenata odgovarale II/III klasi kvaliteta vode prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima, dok su prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera odgovarale I klasi kvaliteta vode. Takođe prema broju ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka kao i aerobnih heterotrofa (Tabela 4.2) Uvac je u kategoriji II/III klase voda prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima, dok je u I klasi voda prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera. Broj aerobnih mezofila ne prelazi granicu dozvoljenu za otvorena izvorišta. Indeks O/H ukazuje na zadovoljavajući status samoprečišćavanja vodnog tela (Tabela 4.2). Prema klasifikaciji po Kohlu (1975) Uvac je u I klasi vode po svim parametrima.

Tabela 4.1. Fizičko-hemijski parametri sa Uvca

	Jed.	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	V-1	V-2	V-3
Datum uzorkovanja	d.m.g.	15.09.2011.			14.09.2011.					
Dubina uzorkovanja	cm	50	2000	4000	50	1900	3800	50	220	450
Temperatura vode	°C	22,2	14,4	7,8	22,3	10,6	8,1	20,5	20,7	16,8
Rastvoreni kiseonik	mg/L	9	7,4	4,8	9,5	6,7	4,9	10,2	10	9,7
Zasićenost vode kiseonikom	%	104	73	40	111	60	41	114	113	101
Koncentracija H ⁺ jona	pH	8,5	8	7,8	8,6	7,7	7,6	8,8	8,7	8,4
Amonijum (NH ₄ -N)	mg/L	0,05	0,06	0,07	0,04	0,06	0,08	0,04	0,07	0,09
Nitriti (NO ₂ -N)	mg/L	<0.002	0,002	0,004	0,003	0,003	0,005	0,002	0,002	0,002
Nitrati (NO ₃ -N)	mg/L	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,4	0,1	0,1	0,2
Ukupni fosfor (P)	mg/L	0,014	0,018	0,018	0,011	0,024	0,02	0,007	0,005	0,02

Mesto uzorkovanja: kod brane (A), na sredini jezera (B) i na početku jezera (V)

Tabela 4.2. Mikrobiološki parametri sa Uvca

broj bakterija	100 mL	ukupni koliformi	48
		fekalni koliformi	16
		fekalne enterokoke	0
	1 mL	aerobni mezofili	30
		aerobni heterotrofi	165
		oligotrofi	119
		heterotrofi	21
	indeksi	F/E	*
		O/H	5,67

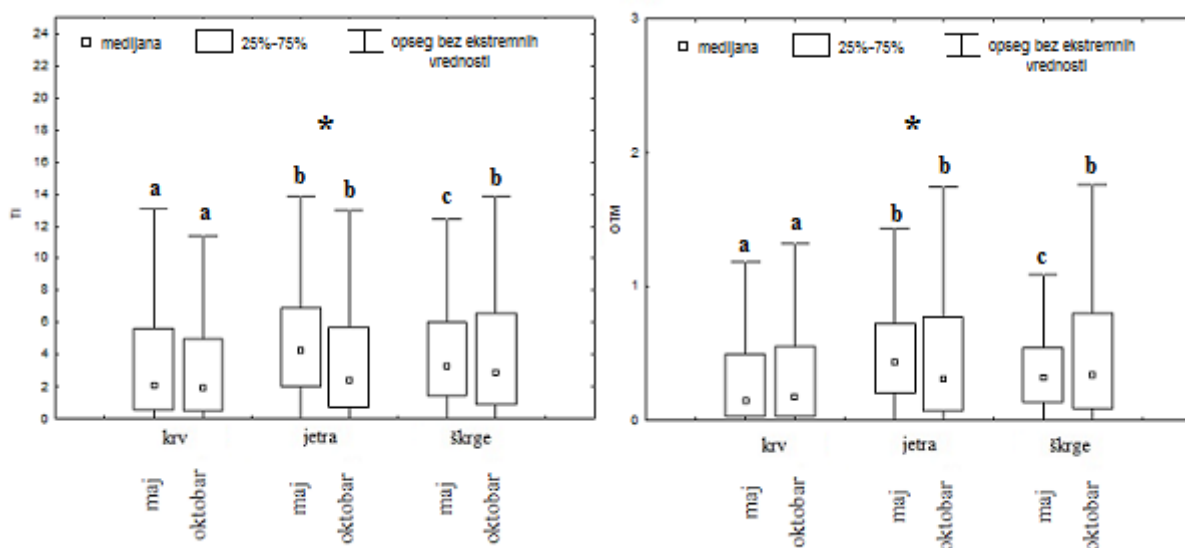
* ne može se izračunati jer nema fekalnih enterokoka

4.1.2. Analize oštećenja DNK molekula i koncentracije elemenata u tkivima

Oštećenje DNK molekula u tkivima klena praćeno je kod 11 jedinki uzorkovanih 2011. godine, 4 u maju (prosečna dužina $25,7 \pm 12,08$ cm i prosečna težina $326,25 \pm 347,34$ g) i 7 u oktobru (prosečna dužina $22,86 \pm 2,14$ cm i prosečna težina $119,53 \pm 25,64$ g). Za analizu oštećenja DNK molekula korišćene su sve jedinke (11), dok su za analizu metala i metaloida korišćene jedinke iz oktobra (7).

4.1.2.1. Oštećenje DNK molekula

Oštećenje DNK molekula praćeno je na krvi, jetri i škragama, a rezultati su prikazani preko TI i OTM (Slika 4.1). Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mesec maj su: za krv TI $3,82 \pm 0,81$; OTM $0,31 \pm 0,08$, za jetru TI $5,01 \pm 1,08$; OTM $0,50 \pm 0,05$, i za škrge TI $4,61 \pm 2,25$, OTM $0,38 \pm 0,09$. Srednja vrednost sa standardnom devijacijom za mesec oktobar su: za krv TI $3,24 \pm 0,75$; OTM $0,33 \pm 0,06$, za jetru TI $3,74 \pm 0,81$; OTM $0,49 \pm 0,15$, i za škrge TI $4,34 \pm 1,30$, OTM $0,56 \pm 0,20$.



Slika 4.1. Oštećenje molekula DNK (TI, OTM), Uvac
a, b i c – razlike između krvi, jetre i škrge u okviru meseca uzorkovanja
različito slovo-statistički značajna razlika (Mann-Whitney U test)
*statistički značajne razlike između meseci uzorkovanja u okviru tkiva

Kada se porede dobijeni rezultati oštećenja DNK iz maja sa rezultatima iz oktobra ne dobija se značajna razlika ni za jedno tkivo ni za jedan od parametara (TI, OTM). Kada se porede tkiva u okviru meseca uzorkovanja, ni u maju ni u oktobru nije dobijena statistička značajnost za TI, dok je za OTM dobijena razlika u maju između krvi i jetre, a u oktobru između krvi i jetre, kao i između krvi i škrge (Slika 4.1.).

4.1.2.2. Koncentracije metala i metaloida u tkivima

Analiza 13 metala i metaloida kod 7 jediniki klana iz oktobra 2011. godine sa Uvca rađena je u 4 tkiva: jetra, mišić, škrge i gonade. Srednje vrednosti koncentracija elemenata su prikazane u Tabeli 4.3. Vrednosti elemenata za pojedinačne jedinice date su u Prilogu (Tabela 5).

Tabela 4.3. Srednje vrednosti koncentracija metala i metaloida u mišiću, škragama, gonadama i jetri

Uvac	mišić	škrge	gonade	jetra
Al	2,46 ± 3,33	1,78 ± 2,06	0,40 ± 0,79	0,55 ± 0,47
As	1,86 ± 0,79	3,2 ± 2,99	3,22 ± 0,96	1,61 ± 1,22
B	0,18 ± 0,16	0,65 ± 0,34	0,24 ± 0,09	1,47 ± 0,94
Ba	0,48 ± 0,16	5,75 ± 1,29	2,26 ± 1,06	0,7 ± 0,54
Cd	ND	ND	ND	0,2±0,07
Cr	0,02±0,02	0,21±0,23	0,02±0,01	0,64±0,9
Cu	2,17 ± 0,56	0,68 ± 0,55	1,45 ± 0,55	31,17 ± 23,57
Fe	21,35 ± 5,23	103,91 ± 40,54	72,52 ± 34,30	495,39 ± 365,87
Hg	0,77 ± 0,55	1,32*	1,17 ± 0,03	ND
Mn	0,58 ± 0,07	11,24 ± 2,96	0,77 ± 0,38	4,19 ± 1,17
Mo	0,06 ± 0,09	0,27 ± 0,37	0,05 ± 0,03	1,19 ± 0,43
Sr	1,04 ± 0,51	56,2 ± 8,76	0,42 ± 0,54	0,23**
Zn	59,78 ± 18,58	340,02 ± 91,59	365,58 ± 152,22	113,39 ± 36,31

Koncentracije su izražene u µg/g suve težine (srednja vrednost ± SD); ND – ispod granice detekcije

*detektovano u jednoj jedinki

** detektovano u dve jedinke

Koncentracije većine metala i metaloida bile su najniže u mišićima (sa izuzetkom Al, koji je bio najviši u mišićima) dok su Ba, Mn i Sr bili najviši u škragama, Ar, Hg i Zn u gonadama, a B, Cr, Cu, Fe i Mo u jetri.

Kako su MDK vrednosti u Regulativi Republike Srbije kao i u Evropskoj regulativi (Materijal i metode, 3.3.8.) u ribljem mesu iskazane kao µg/g vlažne mase za Pb, Cd, Hg, As dodatno su koncentracije za navedene elemente iskazane kao µg/g vlažne mase za mišić (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Koncentracije elemenata u mišiću (izražene u $\mu\text{g/g}$ vlažne mase) u uzorcima klena sa Uvca
ND – ispod granice detekcije

	Cd	Pb	Hg	As
srednja vrednost $\pm$ SD	ND	ND	$0,18 \pm 0,13$	$0,43 \pm 0,19$

Koncentracija elemenata ne prelazi maksimalno dozvoljene koncentracije propisane za riblje meso, odnosno mišić.

4.2. Garaši

4.2.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize

Rezultati fizičko-hemijske analize vode (Tabela 4.5) pokazuju da su koncentracije primarnih nutrijenata odgovarale II/III klasi kvaliteta vode prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima, dok su prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera odgovarale I-III klasi kvaliteta vode. Ovde se takođe, kao i za Uvac, vidi razlika u klasama u odnosu na Pravilnik koji se koristi, ali su te razlike značajno manje nego one koje su uočene za Uvac.

Tabela 4.5. Fizičko-hemijski parametri sa Garaša

	Jed.	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	V-1	V-2	V-3
Datum uzorkovanja	d.m.g.	31.08.2011.								
Dubina uzorkovanja	cm	50	1000	2000	50	700	1400	50	200	400
Temperatura vode	°C	24	19,6	19,6	23,9	20,6	12,8	24,8	23,2	22,6
Rastvoreni kiseonik	mg/L	7,9	3,9	2,2	7,6	4,2	2,5	7,9	7,6	7,3
Zasićenost vode kiseonikom	%	94	42	24	91	47	24	96	91	85
Koncentracija H^+ jona	pH	7,9	7,3	7,2	8,3	7,7	7,6	8,2	8,3	8,1
Amonijum ($\text{NH}_4\text{-N}$)	mg/L	0,18	0,12	0,11	0,1	0,14	0,21	0,08	0,08	0,09
Nitriti ($\text{NO}_2\text{-N}$)	mg/L	0,002	0,004	0,005	0,002	0,01	0,015	0,002	0,003	0,004
Nitrati ($\text{NO}_3\text{-N}$)	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
Ukupni fosfor (P)	mg/L	0,011	0,021	0,013	0,012	0,017	0,019	0,01	0,018	0,024

Mesto uzorkovanja: kod brane (A), na sredini jezera (B) i na početku jezera (V)

Prema broju ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka Garaši spadaju u kategoriju voda I klase. Broj aerobnih mezofila ne prelazi granicu dozvoljenu za otvorena izvorišta. Indeks F/E pokazuje da zagađenje nije antropogenog porekla, dok indeks O/H ukazuje na zadovoljavajući status samoprečišćavanja vodnog tela (Tabela 4.6). Prema klasifikaciji po Kohlu (1975) Garaši su za većinu parametara u I klasi, sem za ukupne koliforme, prema kojima su u II klasi.

Tabela 4.6. Mikrobiološki parametri sa Garaša

broj bakterija	100 mL	ukupni koliformi	2230
		fekalni koliformi	0
		fekalne enterokoke	7
	1 mL	aerobni mezofili	30
		aerobni heterotrofi	275
		oligotrofi	112
		heterotrofi	29
	indeksi	F/E	*
O/H		3,86	

* ne može se izračunati jer nema fekalnih koliforma

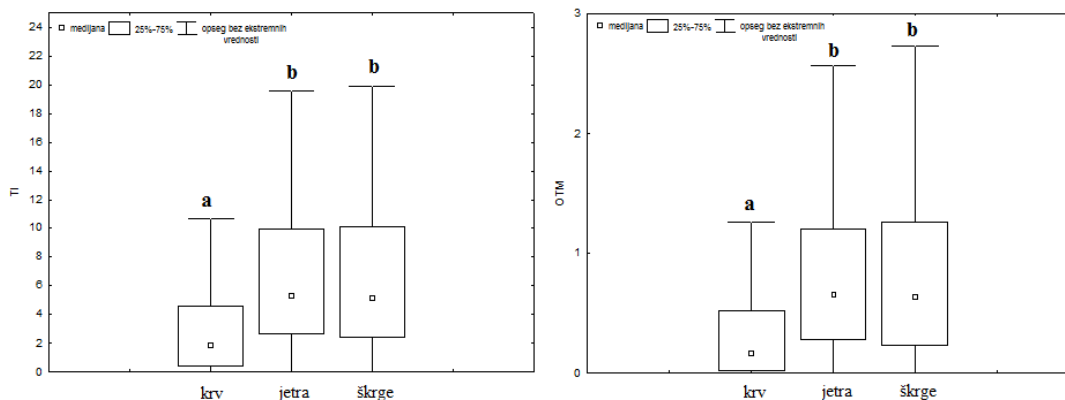
4.2.2. Analize oštećenja DNK molekula i koncentracije elemenata u tkivima

Oštećenje DNK molekula u tkivima klena praćeno je kod 5 jedinki uzorkovanih u novembru 2011. godine (prosečna dužina $37,72 \pm 3,53$ cm i prosečna težina $643,80 \pm 227,65$ g). Za analizu oštećenja DNK molekula i analizu metala i metaloida korišćene su sve jedinke.

4.2.2.1. Oštećenje DNK molekula

Oštećenje DNK molekula praćeno je na krvi, jetri i škrigama, a rezultati su prikazani preko TI i OTM (Slika 4.2). Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom su: za krv TI $3,40 \pm 1,13$; OTM $0,36 \pm 0,14$, za jetru TI $6,77 \pm 1,42$; OTM $0,82 \pm 0,19$, i za škrge TI $6,79 \pm 1,37$; OTM $0,83 \pm 0,20$. Vrednosti oba parametra (TI i OTM) su značajno niže za krv u poređenju sa vrednostima za jetru i škrge. Jetra i škrge su dale sličan odgovor bez značajne razlike u oštećenju. Poredeći vrednosti TI i OTM sa

vrednostima dobijenim na Uvcu, krv je dala slične vrednosti koje nisu značajno različite, dok su vrednosti za jetru i škrge više u odnosu na vrednosti dobijene sa Uvca i značajno su različite.



Slika 4.2. Oštećenje molekula DNK (TI, OTM), Garaši
a i b – statistički značajne razlike između krvi, jetre i škrge
različito slovo - statistički značajna razlika (Mann-Whitney U test)

4.2.2.2. Koncentracije metala i metaloida u tkivima

Analiza 12 metala i metaloida kod 5 jedinki klena iz novembra 2011. godine sa Garaša rađena je u 4 tkiva: jetra, mišić, škrge i gonade. Srednje vrednosti koncentracija elemenata su prikazane u Tabeli 4.7. Vrednosti elemenata za pojedinačne jedinke date su u Prilogu (Tabela 7).

U tkivima sa Garaša zapažamo da su najviše koncentracije većine metala i metaloida nađene u škrnama, sa izuzetkom Hg koja je bila najviša u mišićima, dok su As, Cu i Mo bili najviši u jetri.

Tabela 4.7. Koncentracije metala i metaloida u mišiću, škrnama, gonadama i jetri klena, Garaši

Garaši	mišić	škrge	gonade	jetra
Al	0,08 ± 0,03	146,76 ± 248,29	0,14 ± 0,18	6,22 ± 13,78
As	0,5 ± 0,28	ND	ND	0,61 ± 0,32
B	ND	1,61**	0,14 ± 0,06	0,19**
Ba	0,03 ± 0,01	7,13 ± 2,43	0,02 ± 0,00	ND
Cr	0,02 ± 0,01	0,23 ± 0,32	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,07

Rezultati

Cu	1,31 ± 0,62	1,29 ± 0,66	6,01 ± 1,03	10,51 ± 5,82
Fe	7,6 ± 5,23	255,43 ± 326,18	53,26 ± 18,15	44,24 ± 34,36
Hg	1,95 ± 0,42	1,33*	0,91 ± 0,06	1,35 ± 0,17
Mn	0,31 ± 0,09	40,64 ± 38,44	26,20 ± 7,34	2,07 ± 0,49
Mo	0,04 ± 0,02	0,14 ± 0,10	0,14 ± 0,03	0,27 ± 0,14
Sr	0,23 ± 0,07	50,66 ± 12,3	0,48 ± 0,06	0,11 ± 0,06
Zn	16,62 ± 10,43	266,14 ± 43,32	98,44 ± 18,14	29,63 ± 4,87

Koncentracije izražene u µg/g suve težine u uzorcima klena (srednja vrednost ± SD); ND – ispod granice detekcije *detektovano u jednoj jedinki, ** detektovano u dve jedinke

Koncentracije elemenata za Cd, Pb, Hg, As iskazane kao µg/g vlažne mase su prikazane za mišić radi poređenja sa MDK vrednostima (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Koncentracije elemenata u mišiću (izražene u µg/g vlažne težine) u uzorcima klena sa Garaša, ND – ispod granice detekcije

	Cd	Pb	Hg	As
srednja vrednost ± SD	ND	ND	0,52 ± 0,09	0,14 ± 0,08

označeno crveno - koncentracije prelaze MDK

Koncentracija Hg u mišiću je u okviru granice maksimalno dozvoljenih koncentracija u ribljem mesu, sa obzirom na to da je granica 0,5 - 1 µg/g vlažne mase, u zavisnosti od vrste ribe.

4.3. Peštan i Beljanica

4.3.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize

Rezultati fizičko-hemijske analize vode potvrđuju povećane koncentracije primarnih nutrijenata, koje uglavnom odgovaraju III i IV klasi kvaliteta voda (Tabela 4.9). Rastvoreni kiseonik varira od I do V kategorije na obe reke, gde su najniže vrednosti zabeležene u julu i septembru kada su i temperature vode bile najviše. pH vrednost odgovara vrednostima za III i IV klasu ekološkog statusa. Amonijum je na Beljanici tokom sezone varirao od II do IV klase, sa najvišim vrednostima u martu (pet

puta veće od dozvoljenih), dok je na Peštanu takođe bio najviši u martu (tri puta veće od dozvoljenih) i tokom sezone se kretao u opsegu od I do IV kategorije. Nitrati su na Beljanici varirali od I do III kategorije, a bili najviši u maju, dok su na Peštanu varirali od I do IV kategorije sa najvišim vrednostima u novembru (dva puta veće od dozvoljenih). Ukupni fosfor je na obe reke varirao od II do IV klase.

Tabela 4.9. Fizičko-hemijski parametri a) Peštan i b) Beljanica

a)

Peštan	Jed.	2011.					2012.						
Datum uzorkovanja	d.m.	02.09.	14.10.	08.11.	08.12.	27.12.	30.3.	24.04.	21.05.	13.07.	27.08.	12.09.	28.09.
Temperatura vode	°C	24,90	13,40	13,00	4,30	3,90	12,10	18,80	16,70	24,90	23,10	19,30	22,60
Rastvoreni kiseonik	mg/L	7,90	10,50	11,00	11,00	12,51	12,83	7,47	7,29	6,30	6,62	5,90	8,90
Zasićenost vode kiseonikom	%	96,00	101,00	106,00	87,00	93,40	119,80	83,20	82,00	77,00	78,00	68,00	102,20
Koncentracija H ⁺ jona	pH	8,00	8,10	8,40	8,10	7,85	7,32	9,20	8,10	7,90		8,20	
Konduktivitet	mg/L						381,60	436,00	580,00	670,00	541,00	750,00	483,00
Amonijum (NH ₄ -N)	mg/L	0,10	0,04	0,80	0,92		0,98	0,61	<0,05	<0,05		0,14	0,47
Nitriti (NO ₂ -N)	mg/L	0,01	0,01	0,02	0,31		0,07	0,13	0,04	0,02		0,01	0,04
Nitrati (NO ₃ -N)	mg/L	0,10	0,40	6,00	1,80		1,34	1,38	1,40	<0,5		0,60	0,12
Ukupni fosfor (P)	mg/L	0,20	1,80						0,12	0,08		0,15	
Fosfati (PO ₄)	mg/L	–					1,09	0,26					0,29

b)

Beljanica	Jed.	2011.	2012.										
Datum uzorkovanja	d.m.	27.12.	24.02.	30.03.	24.04.	14.05.	24.05.	16.07.	27.08.	12.09.	28.09.		
Temperatura vode	°C	4,50	2,20	11,30	20,20	12,20	17,06	22,50	25,20	18,40	22,30		
Rastvoreni kiseonik	mg/L	10,72	8,11	10,71	9,48	6,10	7,73	3,00	5,34	2,44	8,48		
Zasićenost vode kiseonikom	%	81,20	58,80	98,30	105,60	57,00	81,50	36,00	64,90	28,00	100,80		
Koncentracija H ⁺ jona	pH	6,69	6,67	8,46		8,00		8,00		7,80			
Konduktivitet	mg/L		345,80	421,00	409,00	650,00	462,00	590,00	620,00	630,00	543,00		
Amonijum (NH ₄ -N)	mg/L		1,32	1,62	0,87	0,87	1,28	0,12		0,12	0,34		
Nitriti (NO ₂ -N)	mg/L		0,08	0,20	0,07	0,15	0,47	<0,002		0,07	0,17		
Nitrati (NO ₃ -N)	mg/L		1,30	2,78	2,80	1,00	4,27	<0,5		1,40	1,64		
Ukupni fosfor (P)	mg/L					0,22		0,38		0,12			
Fosfati (PO ₄)	mg/L		0,90	<0,2	0,45		0,57				0,83		

Za analize mikrobioloških parametara na Peštanu voda je uzorkovana tokom 7 meseci, a na Beljanici je uzorkovana tokom 9 meseci (Tabela 3.6 - Materijal i metode).

Rezultati

Prema broju ukupnih i fekalnih koliforma, fekalnih enterokoka kao i aerobnih mezofila kvalitet reka Peštan i Beljanica je tokom godine varirao od I - III klase voda (Tabela 4.10). U martu je na obe reke bio najveći broj ukupnih koliforma. Fekalni koliformi su bili najbrojniji u martu i aprilu na Peštanu, a u februaru, martu i aprilu na Beljanici. Broj aerobnih mezofila bio je najveći tokom marta na Peštanu, a tokom februara i avgusta na Beljanici. Indeks F/E je bio > 4 u 9 od 15 uzoraka sa obe reke, što generalno ukazuje na antropogeno poreklo zagađenja tokom svih uzorkovanih meseci. Indeks O/H je u većini uzoraka (u 9 od 14) bio < 1 , što ukazuje na lošu sposobnost samoprečišćavanja reka Peštan i Beljanica. Prema klasifikaciji po Kohlu (1975) i Peštan i Beljanica su se kretale od I do III klase.

Tabela 4.10. Mikrobiološki parametri na a) Peštanu i b) Beljanici

a)

Peštan 2011/2012	broj bakterija u 100 mL			broj bakterija u 1 mL			
	ukupni koliformi	fekalni koliformi	fekalne enterokoke	aerobni mezofili	aerobni heterotrofi	oligotrofi	heterotrofi
oktobar	20000	2350	110	*	4200	780	1768
novembar	11280	480	170	300	430	1032	408
decembar	7600	240	80	360	1140	866	1034
mart	53600	5300	2100	2000	7000	2100	3600
april	10480	8760	80	*	7400	3480	2184
avgust	3640	570	30	900	200	70	150
septembar	890	730	70	2400	7400	*	1540

* uzorci nisu bili brojivi

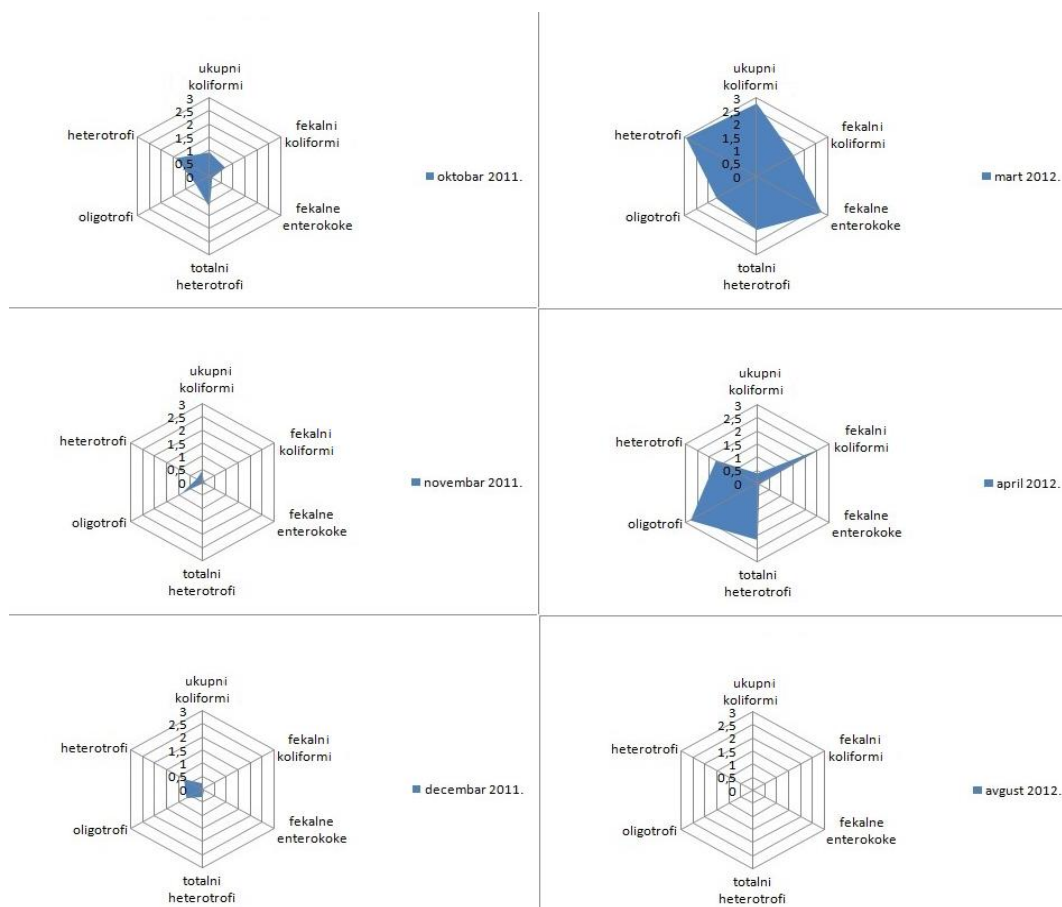
b)

Beljanica 2011/2012	broj bakterija u 100 mL			broj bakterija u 1 mL			
	ukupni koliformi	fekalni koliformi	fekalne enterokoke	aerobni mezofili	aerobni heterotrofi	oligotrofi	heterotrofi
oktobar	20000	41	11	500	590	43	464
novembar	20000	628	596	280	400	972	176
decembar	388	36	1	85	2015	582	1204
februar	10400	8600	280	2700	25000	3140	3750
mart	91200	8600	0	*	3000	4900	5000
april	7040	7600	10	*	4280	2544	828
maj	4440	60	50	2000	10300	4580	6110
avgust	6280	1280	10	3100	9300	3970	3150
septembar	790	710	10	1000	10800	*	2460

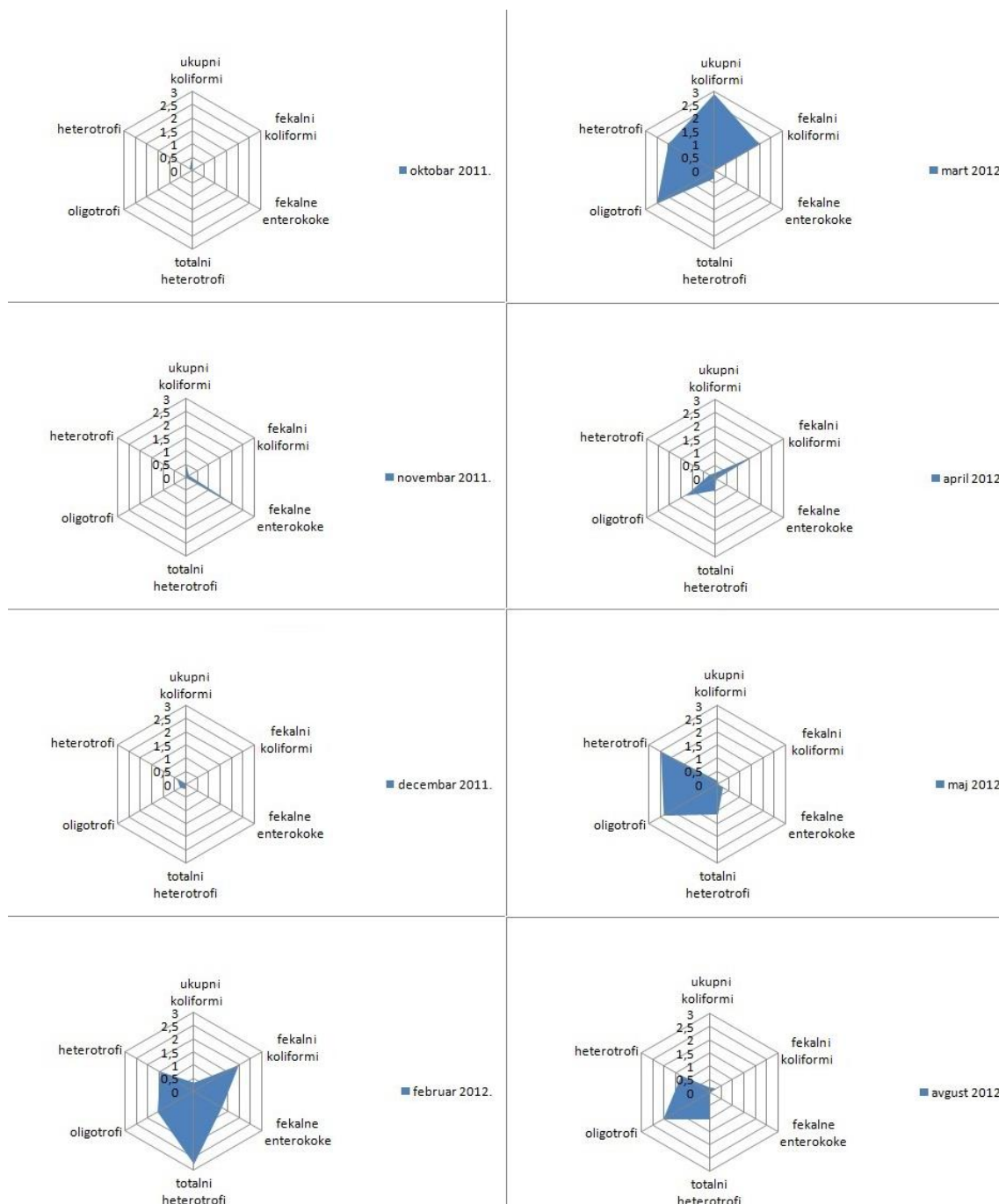
* uzorci nisu bili brojivi

4.3.1.1 Integrisani odgovor biomarkera (IBR)

Mikrobiološki indikatori su često korišćeni pokazatelji stanja vode pod uticajem polutanata i opšteg sredinskog stresa vodenih ekosistema. IBR metodom se u ovom slučaju integrišu odgovori mikrobioloških indikatora. Kako su uzorkovanja za mikrobiološke analize na Peštanu rađena tokom 7 meseci, a na Beljanici tokom 9 meseci, IBR metoda je imala za cilj bolje sagledavanje odnosa mikrobioloških parametara tokom sezone na obe reke. Vizuelni prikaz rezultata IBR metodom dao je jasan uvid u minimalne i maksimalne vrednosti svakog od indikatora fekalnog i organskog zagađenja tokom različitih meseci uzorkovanja na Peštanu (Slika 4.3) i Beljanici (Slika 4.4). Očigledno je variranje mikrobioloških parametara tokom različitih sezona. Na obe reke se uočava trend porasta mikrobioloških parametara tokom prolećnih meseci, na Peštanu najviše tokom marta meseca, dok na Beljanici počinje od februara, opada u aprilu, pa ponovo raste u maju.



Slika 4.3. IBR vrednosti mikrobioloških parametara na reci Peštan



Slika 4.4. IBR vrednosti mikrobioloških parametrov na reci Beljanica

4.3.2. Analize oštećenja DNK molekula i koncentracije elemenata u tkivima

Oštećenje DNK molekula u tkivima klena praćeno je od oktobra 2011. do septembra 2012. godine, na 28 jedinki klena uzorkovanih tokom 8 meseci na Peštanu i na 37 jedinki klena uzorkovanih tokom 10 meseci sa Beljanice. Prosečna dužina i težina jedinki na Peštanu bila je $21,98 \pm 6,76$ cm i $143,56 \pm 126,46$ g, a na Beljanici $23,53 \pm 7,66$ cm i $182,99 \pm 203,38$ g. Za analizu oštećenja DNK molekula korišćene su sve jedinke, dok su za analizu metala i metaloida korišćene sve jedinke, osim 3 jedinke sa Peštana iz oktobra 2011. godine, kao i 1 jedinke sa Beljanice iz februara 2012. godine.

4.3.2.1. Oštećenje DNK molekula

Pre korišćenja suspenzije ćelija za praćenje oštećenja DNK molekula, bitno je odrediti vijabilnost ćelija. Ovom procedurom se isključuju lažno pozitivni rezultati oštećenja DNK koji bi potencijalno potekli od apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u visokom procentu. Ovi testovi su obavezni u analizama tretmana ćelija test supstancama. Iako u našoj studiji nije bilo tretmana, pravljenje suspenzija ćelija iz čvrstih tkiva je potencijalno moglo dovesti do takvog oštećenja.

Vijabilnost ćelija je rađena za tkiva uzorkovana sa Peštana i Beljanice od februara do septembra 2012. godine. Krv je dala najvišu vijabilnost, u proseku za Beljanicu 91%, a za Peštan 98%. Škrge su takođe imale visok procenat vijabilnih ćelija, na Beljanici 84%, a na Peštanu 86%. Jetra je imala najnižu vijabilnost, oko 70 % na obe reke (Tabela 4.11).

Tabela 4.11. Vijabilnost ćelija krvi, jetre, škrge uzorkovanih na Beljanici (a) i Peštanu (b)

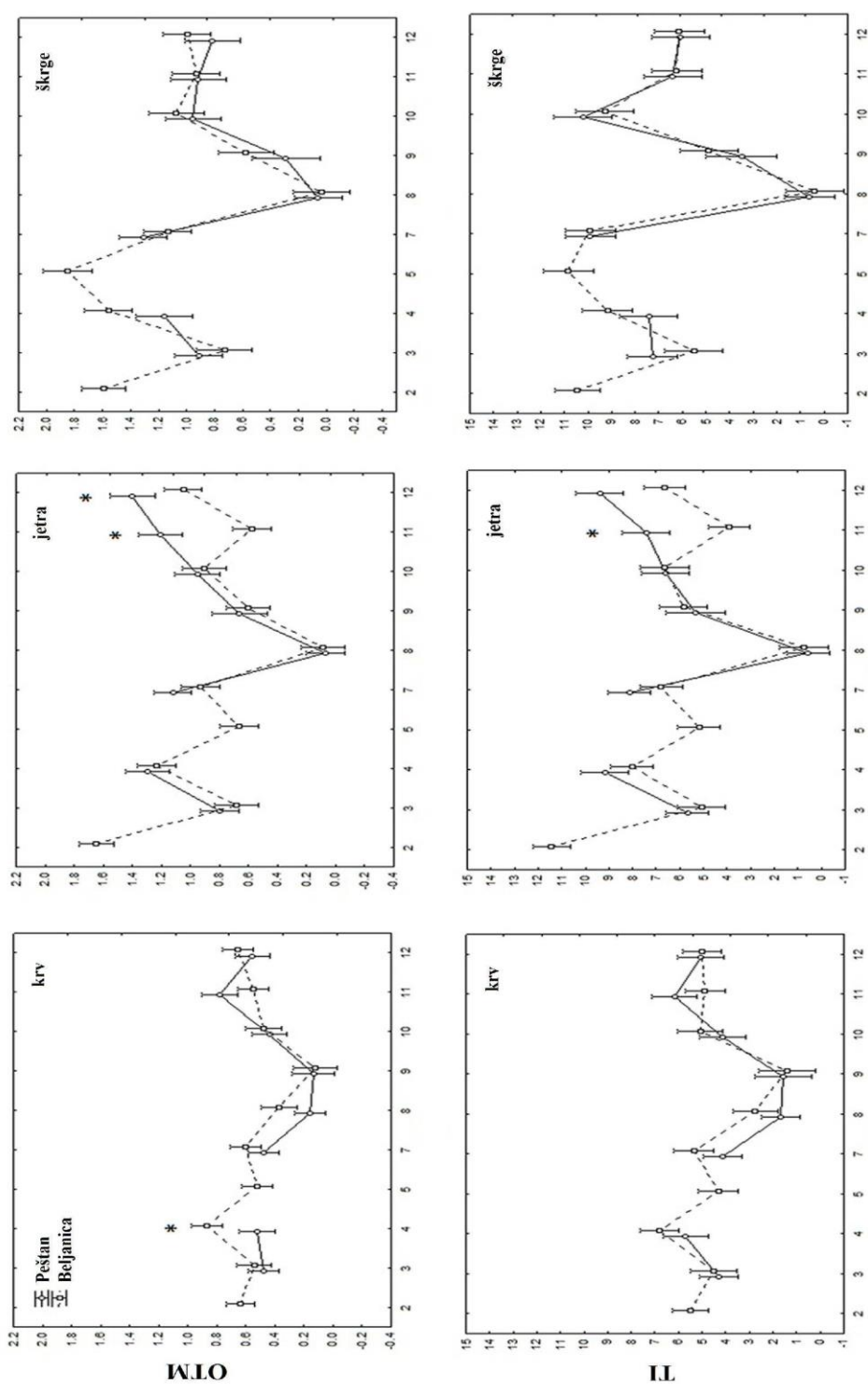
a)

Beljanica 2012. god	Vijabilnost (%)		
	krv	jetra	škrge
februar	86,60	70,20	87,00
mart	81,50	68,00	63,00
april	99,50	76,25	87,50
maj	95,50	78,00	97,25
jul	90,50	55,00	87,00
avgust	95,00	84,00	97,33
septembar	89,33	60,33	71,33
srednja vrednost	91,13	70,25	84,35

b)

Peštan 2012. god	Vijabilnost (%)		
	krv	jetra	škrge
mart	80,40	58,00	83,25
april	91,00	85,67	81,00
jul	85,50	78,50	85,00
avgust	92,50	70,00	94,00
septembar	92,67	59,00	85,67
srednja vrednost	88,41	70,23	85,78

Oštećenje DNK molekula praćeno je na krvi, jetri i škragama, a srednje mesečne vrednosti oštećenja DNK molekula su prikazane preko TI i OTM. Analiza oštećenja DNK molekula komet testom pokazala je variranje u odgovoru između krvi, jetre i škrge na obe reke, Peštan i Beljanica, tokom sezone 2011/2012 gledano iz ugla oba parametra, OTM i TI (Slika. 4.5).



Slika 4.5. Oštećenje molekula DNK (TI, OTM) Peštan i Beljanica

*statistički značajne razlike između reka u okviru meseca uzorkovanja (Mann-Whitney U test)

Na Slici 4.5 se jasno vide oscilacije u oštećenju DNK molekula tokom sezona sa tim da je tokom najtoplijih meseci (avgust, septembar) smanjeno oštećenje za sva tri tkiva, a da se tokom proleća (april, maj) i jeseni (oktobra i novembra) oštećenje povećalo, posebno za škrge. Postojala je značajna razlika između meseci sa najvećom temperaturom vode (avgust i septembar) i drugih meseci. Prema rezultatima krv ima niži stepen oštećenja DNK u odnosu na jetru i škrge. Oštećenje na ćelijama krvi je tokom godine bilo najviše u novembru na Peštanu, a u aprilu na Beljanici. Oštećenje na ćelijama jetre je bilo najviše u decembru i julu na Peštanu, a u februaru i aprilu na Beljanici. Oštećenje na ćelijama škrge je bilo najviše tokom oktobra i jula na Peštanu, a tokom maja i februara na Beljanici.

Razlike između reka su pokazane samo u aprilu za krv i novembru i decembru za jetru. Najviši nivo oštećenja DNK u krvi je otkriven u aprilu i novembru. Škrge su imale najveći stepen oštećenja u februaru i maju, dok je jetra dostigla najviši nivo oštećenja DNK u decembru i februaru. Prema svim ispitivanim parametrima, značajna korelacija je primećena između reka Peštan i Beljanica za svako tkivo i parametar (Tabela 4.12).

Tabela 4.12. Koeficijenti korelacije između reka Peštan i Beljanica po tkivu i parametru (Pearson-ov test korelacije)

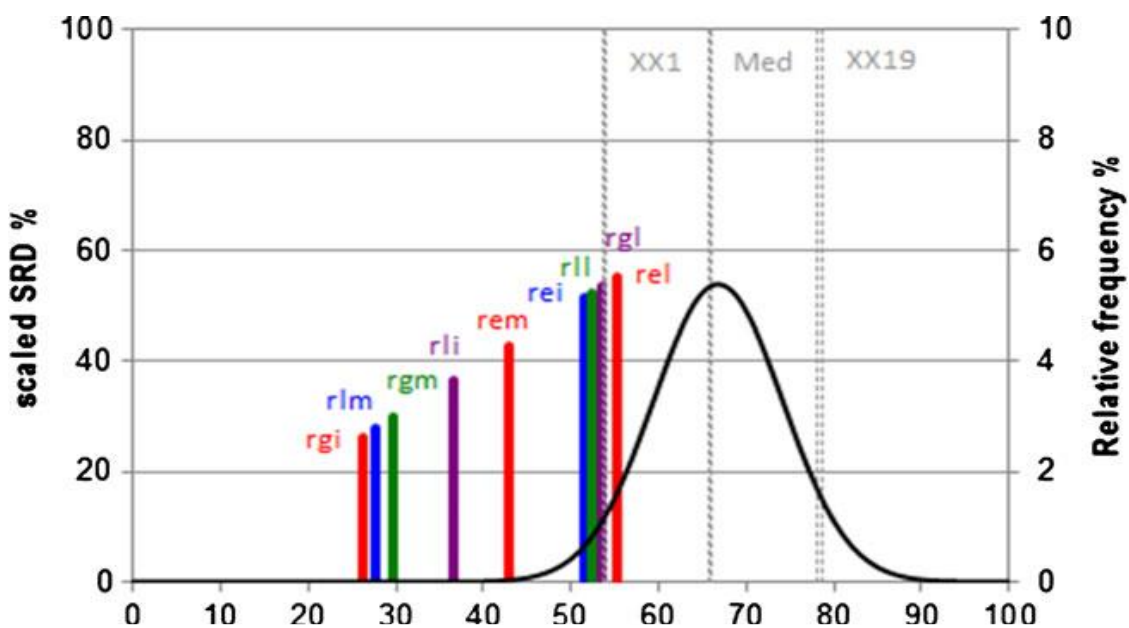
tkivo/parametar	r (koeficijent korelacije)
krv TI	0,86
krv OTM	0,66
jetra TI	0,89
jetra OTM	0,86
škrge TI	0,94
škrge OTM	0,87

Za rezultate poređenja sa referentnim lokalitetom Uvac korišćene su jedinke iz istih meseci/sezona uzorkovanja sa datih lokaliteta. Sa Uvca su su korišćeni rezultati 7 jedinki iz oktobra 2011. godine. Sa Peštana su uzeti rezultati 7 jedinki iz oktobra i novembra 2011. god. Sa Beljanice je takođe uzeto 7 jedinki iz oktobra i novembra 2011 godine. Analize poređenja oštećenja DNK u ćelijama krvi, jetre i škrge klena sa Peštana pokazale su da su oštećenja u svim tkivima značajno viša u odnosu na tkiva sa Uvca za

oba parametra. Takođe su oštećenja u krvi, jetri i škragama sa Beljanice bila značajno viša u odnosu na oštećenja istih sa Uvca kod oba parametra.

4.3.2.1.1. Rangiranje parametara za procenu oštećenja DNK metodom SRD

Cilj ove metode bio je da se utvrdi koji od postojećih parametara su najpouzdaniji za procenu genotoksičnosti vodnih tela. Za analizu su korišćeni rezultati dobijeni na klenu (ukupno 34 jedinke), odnosno jedinkama koje su korišćene u dosadašnjim analizama, sa Peštana (7 jedinki), Beljanice (3 jedinke), sa rezervoara Garaši (5 jedinki) i Uvca (11 jedinki), kao i jedinke prethodno uzorkovane tokom juna i jula 2011. godine sa reka Bujanj Potok (4 jedinke) i Kolubare (4 jedinke) (Tabela 1, Prilog). Podaci su dobijeni analizom kometa ćelija jetre (l), škrge (g) i eritrocita (e). Rangirani parametri su sledeći: dužina repa (l), TI (i), kao i OTM (m). Kombinacijom ćelija i parametara dobija se 9 rankiranih (r) parametara: rll, rli, rlm, rgl, rgi, rgm, rel, rei, rem (Slika 4.6).



Slika 4.6. SRD test rezultati. Y osa-leva strana i X osa—SRD vrednosti; Y osa, desna strana — relativne frekvencije za teorijsku distribuciju nasumičnih brojeva

SRD procedura je pokazala da su OTM (m) i TI (i) jednako dobri parametri, tačnije vrednosti SRD su bile manje za ova dva parametra nego za dužinu repa komete (l). Prema rezultatima „rel“ je najmanje pouzdan parametar. Rezultati su pokazali da su škrge i jetra, kao i „OTM“ i „TI“ (rgi, rlm, rgm, rli) najbolje rangirani parametri.

4.3.2.2. Koncentracije metala i metaloida u tkivima

Analiza 14 metala i metaloida rađena je u 4 tkiva klena: jetra, mišić, škrge i gonade.

Koncentracija elemenata je izražena na $\mu\text{g/g}$ suve mase tkiva za svaku jedinku pojedinačno po analiziranom tkivu (jetra, mišić, škrge i gonade), kao i srednje vrednosti za svaki mesec uzorkovanja (Tabele 9-13, 15-19 Prilog). U tabelama 4.13 i 4.15 prikazane su srednje vrednosti koncentracija metala i metaloida po sezonama tokom 2011/2012. godine u mišiću, škragama, gonadama i jetri u uzorcima klena sa Peštana i Beljanice. Pored ovog urađena je i PCA analiza koncentracije ovih elemenata tokom sezona za svako tkivo pojedinačno (Slike 4.7, 4.8). Dodatno su i koncentracije elemenata za Pb, Cd, Hg i As iskazane kao $\mu\text{g/g}$ vlažne mase za mišić radi poređenja sa MDK vrednostima (Tabele 4.14, 4.16).

U Tabeli 4.13 prikazane su srednje vrednosti koncentracija metala i metaloida tokom jeseni i zime 2011. godine kao i tokom proleća i leta 2012. godine sa Peštana. Za sezonu jesen su korišćene jedinke iz oktobra i novembra, za zimu jedinke iz decembra, za proleće jedinke iz marta i aprila, dok su za leto korišćenje jedinke iz jula, avgusta i septembra.

Rezultati

Tabela 4.13. Koncentracije metala i metaloida u mišiću, škragama, gonadama i jetri (izražene u $\mu\text{g/g}$ suve težine) u uzorcima klena (srednja vrednost $\pm$ SD) sa Peštana po sezonama tokom 2011/2012; ND - ispod granice detekcije, - analize nisu rađene *detektovano u jednoj jedinki, ** detektovano u dve jedinke

	2011. god.		2012. god.	
	JESEN	ZIMA	PROLEĆE	LETO
Al				
mišić	$0,09 \pm 0,03^a$	$15,2 \pm 11,56^a$	$13,77 \pm 17,79^a$	$15,77 \pm 21,75^a$
škrge	$22,03 \pm 30,47^a$	$25,71 \pm 17,89^a$	$22,91 \pm 30,37^a$	$50,86 \pm 59,18^a$
gonade	$1,06 \pm 1,4^a$	—	$29,23 \pm 59,71^a$	$7,04 \pm 10,36^a$
jetra	$0,11 \pm 0,05^a$	—	$15,19 \pm 11,41^a$	$20,41 \pm 25,69^a$
B				
mišić	ND	ND	ND	ND
škrge	$0,36 \pm 0,14$	ND	ND	$1,02; 0,27^{**}$
gonade	$0,17 \pm 0,07^a$	—	$29,23 \pm 59,71^a$	$7,04 \pm 10,36^a$
jetra	$0,31 \pm 0,36^a$	—	ND	$0,33 \pm 1,08^a$
As				
mišić	ND	$1 \pm 1,07^a$	$0,13 \pm 0,08^a$	$0,46 \pm 0,39^a$
škrge	ND	$1,81 \pm 2,78^a$	$0,19 \pm 0,05^a$	$0,67 \pm 0,67^a$
gonade	$0,33 \pm 0,31^{a,b}$	—	$0,48 \pm 0,54^a$	$3,79 \pm 2,3^b$
jetra	ND	—	$0,51 \pm 0,64^a$	$0,89 \pm 0,87^a$
Ba				
mišić	$0,62 \pm 0,29^a$	$0,63 \pm 0,10^a$	$1,13 \pm 0,59^a$	$1,3 \pm 0,76^a$
škrge	$18,55 \pm 5,76^a$	$15,16 \pm 3,39^a$	$23,27 \pm 8,73^a$	$23,62 \pm 8,46^a$
gonade	$1,8 \pm 0,93^{a,b}$	—	$2,06 \pm 1,88^a$	$12,09 \pm 7,43^b$
jetra	ND	—	$0,05^*$	$0,12 \pm 0,25$
Cr				
mišić	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,05 \pm 0,01^a$	$0,1 \pm 0,07^a$	$0,18 \pm 0,25^a$
škrge	$0,14 \pm 0,09^a$	$0,94 \pm 0,56^b$	$0,64 \pm 0,16^b$	$0,79 \pm 0,28^b$
gonade	$0,01 \pm 0,01^a$	—	$0,11 \pm 0,13^b$	$0,24 \pm 0,24^b$
jetra	$0,03 \pm 0,01^a$	—	$0,20 \pm 0,1^{a,b}$	$0,42 \pm 0,28^b$
Cu				
mišić	$0,89 \pm 0,19^a$	$1,45 \pm 0,04^a$	$0,98 \pm 0,21^a$	$1,75 \pm 1,27^a$
škrge	$1,96 \pm 0,95^{a,b}$	$2,64 \pm 0,87^{a,b}$	$1,99 \pm 0,61^a$	$3,56 \pm 1,45^b$
gonade	$4,38 \pm 2,12^a$	—	$2,23 \pm 0,85^a$	$4,5 \pm 3,09^a$
jetra	$18,65 \pm 16,62^a$	—	$24,71 \pm 16,3^a$	$34,48 \pm 15,45^a$
Fe				
mišić	$7,06 \pm 1,74^a$	$10,21 \pm 1,02^a$	$8,34 \pm 4,00^a$	$10,99 \pm 4,46^a$
škrge	$90,73 \pm 30,15^a$	$101,7 \pm 4,06^a$	$91,69 \pm 20,77^a$	$203,03 \pm 175,77^a$

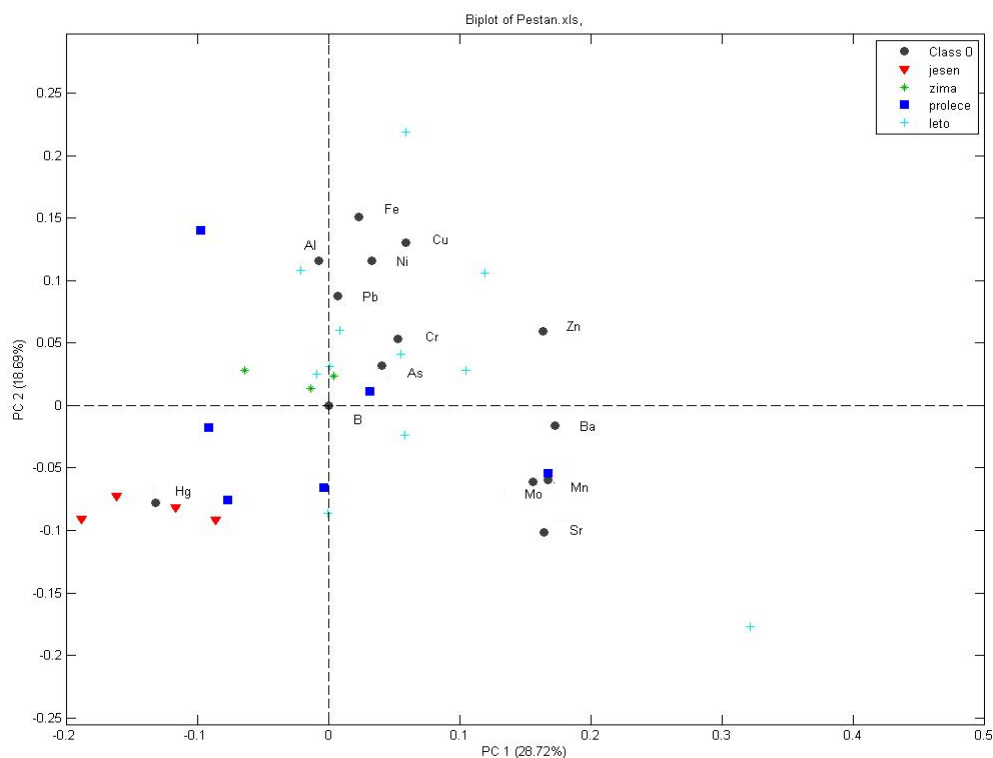
Rezultati

gonade	58,72 ± 17,41 ^a	—	44,84 ± 46,24 ^a	59,1 ± 26,37 ^a
jetra	128,05 ± 102,69 ^a	—	302,98 ± 248,46 ^a	316,85 ± 220,42 ^a
Hg				
mišić	1,78 ± 0,29^a	0,94 ± 0,21^b	0,99 ± 0,36^b	0,88 ± 0,26^b
škrge	1,28 ± 0,27^a	0,85 ± 0,52^{a,b}	0,57 ± 0,12^b	0,85 ± 0,26^{a,b}
gonade	1,29 ± 0,34^a	—	0,47 ± 0,08^b	1,00 ± 0,35^a
jetra	1,01 ± 0,28^{a,b}	—	0,69 ± 0,18^a	1,15 ± 0,23^b
Mn				
mišić	0,79 ± 0,29 ^a	0,89 ± 0,21 ^a	0,83 ± 0,46 ^a	1,04 ± 0,34 ^a
škrge	22,66 ^a	14,92 ± 3,86 ^a	19,27 ± 8,46 ^a	25,22 ± 11,37 ^a
gonade	10,05 ± 10,44 ^a	—	14,79 ± 23,82 ^a	2,61 ± 1,88 ^a
jetra	2,60 ± 0,84^{a,b}	—	5,62 ± 1,51^a	7,41 ± 2,65^b
Mo				
mišić	0,03 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,08 ^a	0,25 ± 0,12 ^a	0,33 ± 0,28 ^a
škrge	0,03 ± 0,03^a	2,26 ± 1,96^b	1,60 ± 0,4^b	2,05 ± 0,68^b
gonade	0,16 ± 0,01 ^a	—	0,10 ± 0,18 ^a	0,10 ± 0,10 ^a
jetra	0,71 ± 0,42 ^a	—	0,40 ± 0,41 ^a	0,76 ± 0,35 ^a
Ni				
mišić	ND	0,07 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,91 ^a
škrge	0,84 ± 1,65 ^a	0,16 ± 0,13 ^a	0,10 ± 0,05 ^a	0,54 ± 0,73 ^a
gonade	0,04 ± 0,01 ^a	—	0,13 ± 0,24 ^a	0,15 ± 0,09 ^a
jetra	0,07 ± 0,13 ^a	—	0,08 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,17 ^a
Pb				
mišić	ND	0,35*	0,21 ± 0,32 ^a	0,10 ± 0,17 ^a
škrge	ND	ND	ND	0,39 ± 0,79
gonade	ND	—	0,27 ± 0,28	6,15*
jetra	ND	—	0,31 ± 0,25	1,14*
Sr				
mišić	1,61 ± 0,42 ^a	2,11 ± 1,12 ^a	2,03 ± 1,94 ^a	3,06 ± 2,78 ^a
škrge	66,42 ± 14,75 ^a	57,98 ± 16,62 ^a	95,95 ± 29,8 ^a	86,46 ± 22,01 ^a
gonade	0,41 ± 0,08 ^a	—	0,62 ± 0,63 ^a	1,34 ± 1,88 ^a
jetra	0,15 ± 0,07^a	—	0,53 ± 0,32^{a,b}	0,60 ± 0,33^b
Zn				
mišić	32,57 ± 8,89^a	60,56 ± 9,24^b	63,08 ± 12,77^b	74,36 ± 13,85^b
škrge	197,67 ± 43,29^{a,b}	246,23 ± 58,7^{a,b}	210,57 ± 46,19^a	307,24 ± 86,60^b
gonade	194,46 ± 51,7^{a,b}	—	93,50 ± 35,77^a	481,16 ± 257,48^b
jetra	51,36 ± 21,35^a	—	100,14 ± 26,27^{a,b}	117,93 ± 39,71^b

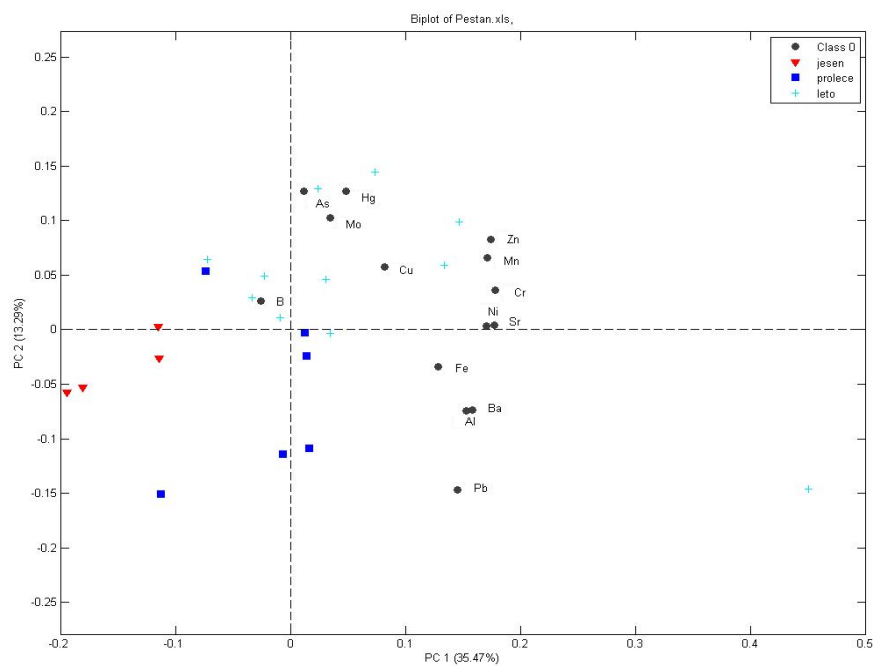
različito slovo-značajna razlika (markirano)

PCA analiza koncentracije 14 elemenata tokom 4 sezone (jesen, zima, proleće, leto) pokazala je da se jedinice sa Peštana uzorkovane tokom jeseni grupišu po većim vrednostima za koncentracije Hg u mišiću (Slika 4.7a). Kod sva tri tkiva je pokazano grupisanje većih koncentracija elemenata tokom leta (Slika 4.7 a, b, c, Tabela 4.13). Značajne razlike u koncentracijama elemenata u različitim sezonama su nađene kod As, Ba (gonade), Cr, Mn i Sr (jetra), Mo (škrge), Hg i Zn (u svim analiziranim tkivima) (Tabela 4.13). Pokazana je razlika između sezone jesen u odnosu na druge sezone u akumulaciji Hg i Zn u mišiću i Cr i Mo u škragama (Tabela 4.13). Takođe je pokazana razlika između sezone proleća i leta u akumulaciji Cu i Zn u škragama, kao i As, Ba, Hg i Zn u gonadama i Hg i Mn u jetri (Tabela 4.13). Pored ovoga pokazana je i razlika između proleća i jeseni u akumulaciji Hg u škragama i gonadama, kao i između leta i jeseni u akumulaciji Cr, Sr i Zn u jetri (Tabela 4.13).

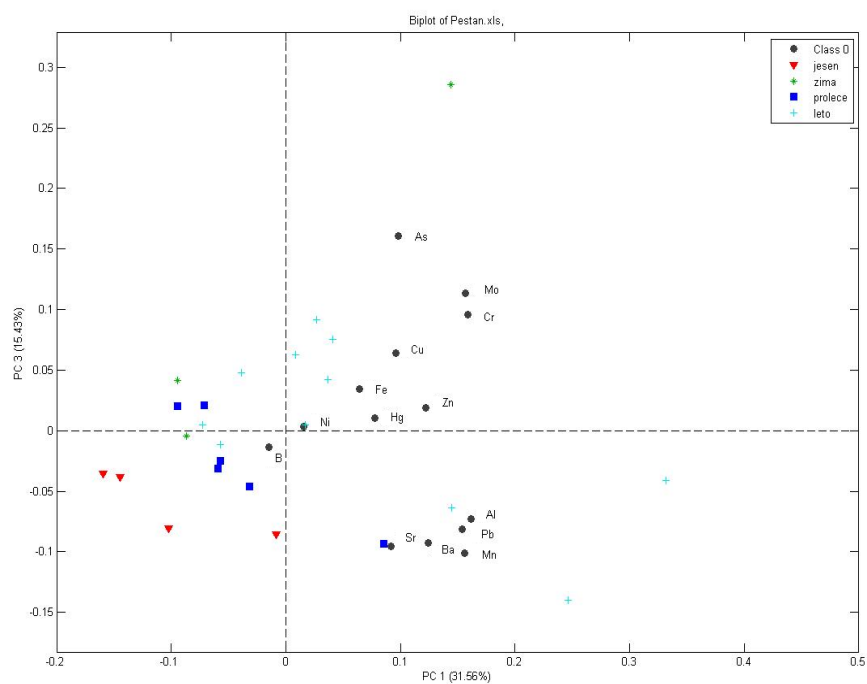
(a) mišić



(b) jetra

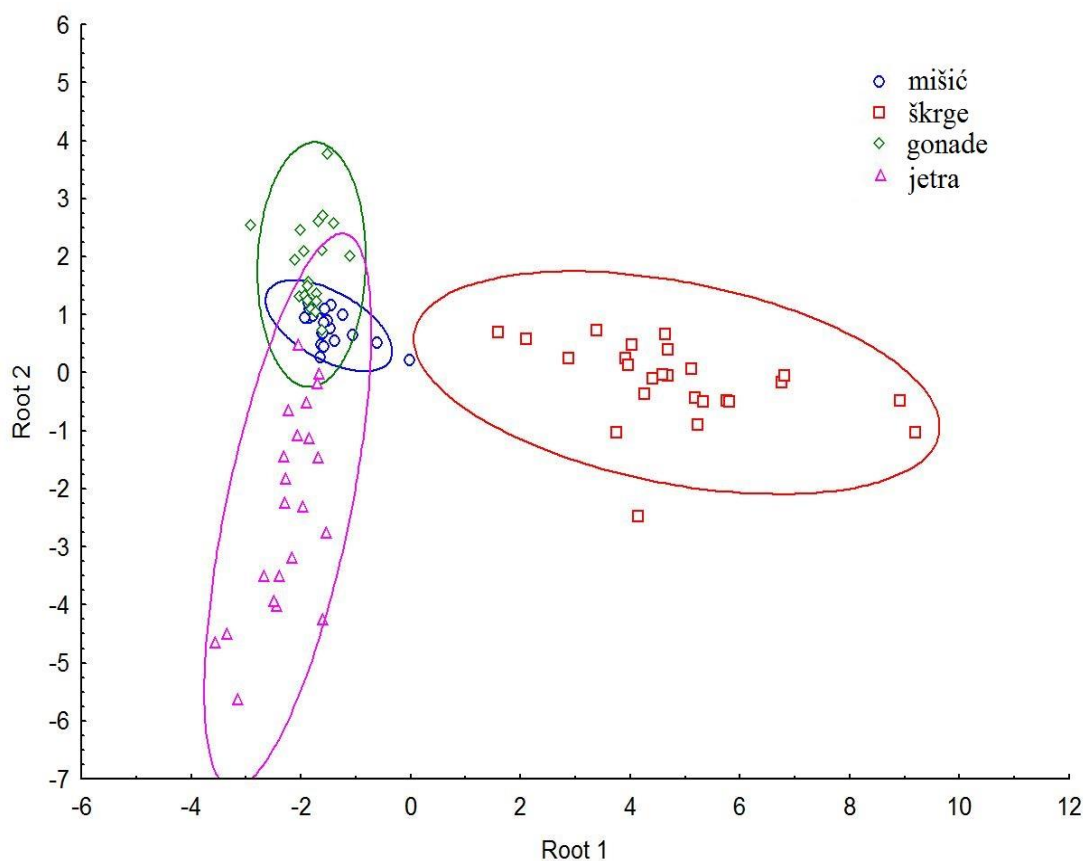


(c)



Slika 4.7. PCA analiza koncentracije elemenata u mišićima (a), jetri (b) i škrgama (c) tokom 4 sezone na Peštanu

Kanonijska diskriminantna analiza (Slika 4.8) je u odnosu na ukupni sadžaj elemenata u tkivima ukazala na visok stepen diferencijacije škrga u odnosu na druga tkiva. Pored ovoga, vidi se delimično preklapanje kod mišića, gonada i jetre.



Slika 4.8 Rezultati kanonijske diskriminantne analize, primenjene na koncentracijama metala i metaloida u četiri ispitivana tkiva (elipse pokazuju 95% intervale pouzdanosti) na Peštanu

Koncentracija elemenata ne prelazi maksimalno dozvoljene koncentracije propisane za riblje meso, odnosno mišić, sem Pb za mart (Tabela 4.14).

Tabela 4.14. Srednje vrednosti $\pm$ SD koncentracija elemenata u mišiću (izražene u $\mu\text{g/g}$ vlažne težine) u uzorcima klena sa Peštana, ND – ispod granice detekcije *detektovano u jednoj jedinki

	Cd	Pb	Hg	As
oktobar	ND	ND	0,32*	ND
novembar	ND	ND	0,44 $\pm$ 0,05	ND
decembar	ND	0,09*	0,22 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,22
mart	ND	0,11 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,02
april	ND	ND	0,33 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,00
jul	ND	0,06 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,10
avgust	ND	ND	0,20 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,08
septembar	ND	ND	0,23 $\pm$ 0,11	0,08 $\pm$ 0,05

U Tabeli 4.15 su prikazane srednje vrednosti koncentracija metala i metaloida tokom jeseni i zime 2011. godine kao i tokom proleća i leta 2012. godine sa Beljanice. Za sezonu jesen su korišćene jedinke iz oktobra i novembra, za zimu jedinke iz decembra i februara, za proleće jedinke iz marta, aprila i maja, dok su za leto korišćenje jedinke iz jula, avgusta i septembra.

Tabela 4.15. Koncentracije metala i metaloida u mišiću, škragama, gonadama i jetri (izražene u $\mu\text{g/g}$ suve težine) u uzorcima klena (srednja vrednost $\pm$ SD) sa Beljanice po sezonama tokom godine 2011/2012; ND- ispod granice detekcije *detektovano u jednoj jedinki, ** detektovano u dve jedinke

	2011. god.		2012.god.	
	JESEN	ZIMA	PROLEĆE	LETO
Al				
mišić	1,11 $\pm$ 2,25 ^a	9,35 $\pm$ 10,93 ^a	7,76 $\pm$ 11,24 ^a	8,77 $\pm$ 10,23 ^a
škrge	17,31 $\pm$ 23,53 ^a	15,62 $\pm$ 15,49 ^a	31,88 $\pm$ 21,10 ^a	40,45 $\pm$ 65,62 ^a
gonade	7,23 $\pm$ 5,29 ^a	11,74 $\pm$ 22,19 ^a	20,40 $\pm$ 18,06 ^a	10,09 $\pm$ 12,78 ^a
jetra	1,23 $\pm$ 1,65 ^a	3,94 $\pm$ 2,61 ^a	17,90 $\pm$ 23,18 ^a	2,25 $\pm$ 5,40 ^a
B				
mišić	0,05 $\pm$ 0,04 ^a	0,18 $\pm$ 0,26 ^a	ND	ND
škrge	0,63 $\pm$ 0,13 ^a	0,07 $\pm$ 0,19 ^a	ND	ND
gonade	0,23 $\pm$ 0,03 ^a	0,16 $\pm$ 0,26 ^a	0,04 $\pm$ 0,12 ^a	0,08 $\pm$ 0,22 ^a
jetra	0,71 $\pm$ 0,53	0,03 $\pm$ 0,08	ND	ND
As				
mišić	0,26 $\pm$ 0,26 ^a	0,20 $\pm$ 0,19 ^a	0,59 $\pm$ 1,21 ^a	0,45 $\pm$ 0,63 ^a

Rezultati

škrge	$0,08 \pm 0,22^a$	$0,22 \pm 0,29^a$	$0,35 \pm 0,42^a$	$0,29 \pm 0,13^a$
gonade	$1,00 \pm 0,67^a$	$0,82 \pm 1,19^a$	$2,30 \pm 2,36^a$	$1,52 \pm 2,20^a$
jetra	$0,05 \pm 0,11^a$	$0,13 \pm 0,07^a$	$0,71 \pm 0,83^a$	$0,86 \pm 0,82^a$
Ba				
mišić	$0,18 \pm 0,14^a$	$1,69 \pm 3,22^a$	$0,7 \pm 0,59^a$	$0,62 \pm 0,26^a$
škrge	$10,14 \pm 2,03^a$	$15,97 \pm 2,59^b$	$11,80 \pm 3,54^{a,c}$	$14,69 \pm 3,47^{b,c}$
gonade	$1,31 \pm 0,62^a$	$1,40 \pm 1,20^a$	$2,31 \pm 2,45^a$	$2,44 \pm 2,46^a$
jetra	$0,02 \pm 0,02^a$	$0,04 \pm 0,11^a$	$0,17 \pm 0,34^a$	$0,05 \pm 0,11^a$
Cr				
mišić	$0,02 \pm 0,02^a$	$0,26 \pm 0,20^b$	$0,07 \pm 0,07^a$	$0,06 \pm 0,08^a$
škrge	$0,44 \pm 0,43^a$	$0,96 \pm 0,82^a$	$0,64 \pm 0,22^a$	$0,69 \pm 0,33^a$
gonade	$0,07 \pm 0,03^a$	$0,24 \pm 0,15^a$	$0,08 \pm 0,07^a$	$0,26 \pm 0,54^a$
jetra	$0,03 \pm 0,02^a$	$0,18 \pm 0,18^a$	$0,14 \pm 0,12^a$	$0,15 \pm 0,16^a$
Cu				
mišić	$1,64 \pm 0,54^a$	$1,43 \pm 0,70^a$	$2,21 \pm 2,27^a$	$1,19 \pm 0,33^a$
škrge	$2,42 \pm 0,44^{a,b}$	$2,24 \pm 0,52^a$	$2,51 \pm 0,35^{a,b}$	$2,98 \pm 0,79^b$
gonade	$6,87 \pm 1,03^a$	$5,23 \pm 3,63^a$	$2,94 \pm 1,37^a$	$8,64 \pm 5,98^a$
jetra	$22,01 \pm 9,09^a$	$32,03 \pm 16,63^{a,b}$	$28,72 \pm 11,69^a$	$45,46 \pm 14,09^b$
Fe				
mišić	$7,62 \pm 3,16^a$	$17,62 \pm 23,91^a$	$11,50 \pm 8,32^a$	$11,13 \pm 6,42^a$
škrge	$83,97 \pm 19,36^a$	$99,40 \pm 19,22^a$	$106,64 \pm 32,92^a$	$115,74 \pm 50,97^a$
gonade	$54,64 \pm 4,52^a$	$51,88 \pm 12,24^a$	$51,76 \pm 47,18^a$	$65,51 \pm 28,51^a$
jetra	$198,35 \pm 159,19^a$	$190,85 \pm 103,24^a$	$202,18 \pm 96,37^a$	$390,69 \pm 235,29^a$
Hg				
mišić	$1,03 \pm 0,19^a$	$0,53 \pm 0,18^b$	$0,54 \pm 0,15^b$	$0,64 \pm 0,16^b$
škrge	$0,75 \pm 0,52^a$	$0,48 \pm 0,18^a$	$0,64 \pm 0,21^a$	$0,75 \pm 0,26^a$
gonade	$0,77 \pm 0,05^a$	$0,44 \pm 0,21^a$	$0,58 \pm 0,40^a$	$0,48 \pm 0,22^a$
jetra	$0,46 \pm 0,41^a$	$0,41 \pm 0,25^a$	$0,62 \pm 0,22^a$	$1,03 \pm 0,30^b$
Mn				
mišić	$0,77 \pm 0,39^a$	$1,97 \pm 3,17^a$	$1,12 \pm 0,33^a$	$1,01 \pm 0,23^a$
škrge	$26,70 \pm 9,11^a$	$18,84 \pm 6,98^a$	$25,00 \pm 7,54^a$	$31,46 \pm 14,62^a$
gonade	$40,06 \pm 7,53^a$	$17,23 \pm 21,39^{a,b}$	$2,39 \pm 1,52^b$	$17,11 \pm 16,90^{a,b}$
jetra	$4,71 \pm 1,14^a$	$4,71 \pm 1,07^a$	$9,21 \pm 4,91^a$	$9,21 \pm 4,32^a$
Mo				
mišić	$0,07 \pm 0,08^a$	$0,18 \pm 0,23^a$	$0,15 \pm 0,12^a$	$0,19 \pm 0,14^a$
škrge	$0,24 \pm 0,11^a$	$1,09 \pm 0,19^b$	$1,51 \pm 0,28^b$	$2,09 \pm 0,67^c$
gonade	$0,18 \pm 0,08^a$	$0,30 \pm 0,34^a$	$0,06 \pm 0,05^a$	$0,23 \pm 0,26^a$
jetra	$0,94 \pm 0,30^a$	$0,53 \pm 0,38^a$	$0,16 \pm 0,18^a$	$0,83 \pm 1,38^a$

Rezultati

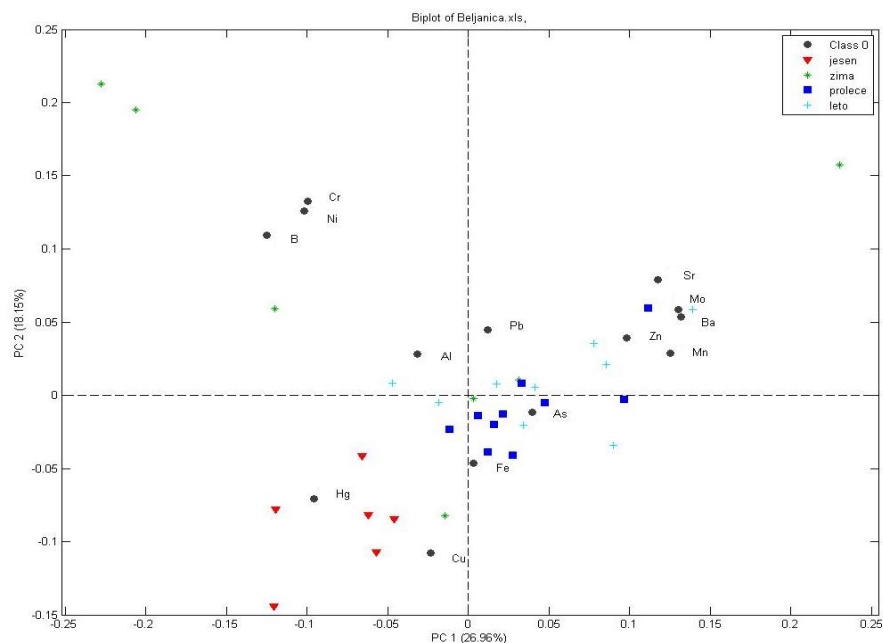
Ni				
mišić	0,01 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,63 ^a	0,25 ± 0,71 ^a	0,05 ± 0,04 ^a
škrge	0,10 ± 0,10 ^a	0,12 ± 0,11 ^a	0,10 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,16 ^a
gonade	0,03 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,36 ^a	0,07 ± 0,04 ^a	0,12 ± 0,17 ^a
jetra	0,09 ± 0,16 ^a	0,07 ± 0,05 ^a	0,11 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,07 ^a
Pb				
mišić	ND	0,23 ± 0,13 ^a	0,22 ± 0,22 ^a	0,18 ± 0,12 ^a
škrge	ND	0,68 ± 0,43 ^a	0,25 ± 0,42 ^a	0,37 ± 0,43 ^a
gonade	ND	0,51 ± 0,38 ^a	0,65 ± 0,35 ^a	0,44 ± 0,24 ^a
jetra	ND	0,69 ± 1,07 ^a	0,74 ± 0,24 ^a	0,68 ± 0,61 ^a
Sr				
mišić	1,80 ± 0,81 ^a	17,96 ± 36,51 ^a	2,94 ± 1,36 ^a	3,77 ± 2,38 ^a
škrge	108,94 ± 16,46^a	170,89 ± 26,80^b	118,12 ± 26,36^a	160,89 ± 45,02^b
gonade	1,01 ± 0,35^{a,b}	17,10 ± 38,68^a	0,64 ± 0,37^b	1,19 ± 0,70^b
jetra	0,48 ± 0,17 ^a	2,45 ± 3,82 ^a	1,01 ± 0,57 ^a	1,87 ± 2,40 ^a
Zn				
mišić	40,18 ± 19,53 ^a	68,89 ± 45,81 ^a	67,42 ± 10,28 ^a	72,39 ± 12,07 ^a
škrge	206,68 ± 64,38^a	236,11 ± 54,92^{a,b}	221,16 ± 39,31^a	313,94 ± 80,37^b
gonade	162,39 ± 22,75 ^a	188,30 ± 97,89 ^a	188,80 ± 135,30 ^a	296,16 ± 204,19 ^a
jetra	74,36 ± 15,77 ^a	146,98 ± 75,61 ^a	165,86 ± 87,20 ^a	161,36 ± 48,96 ^a

različito slovo-značajna razlika (markirano)

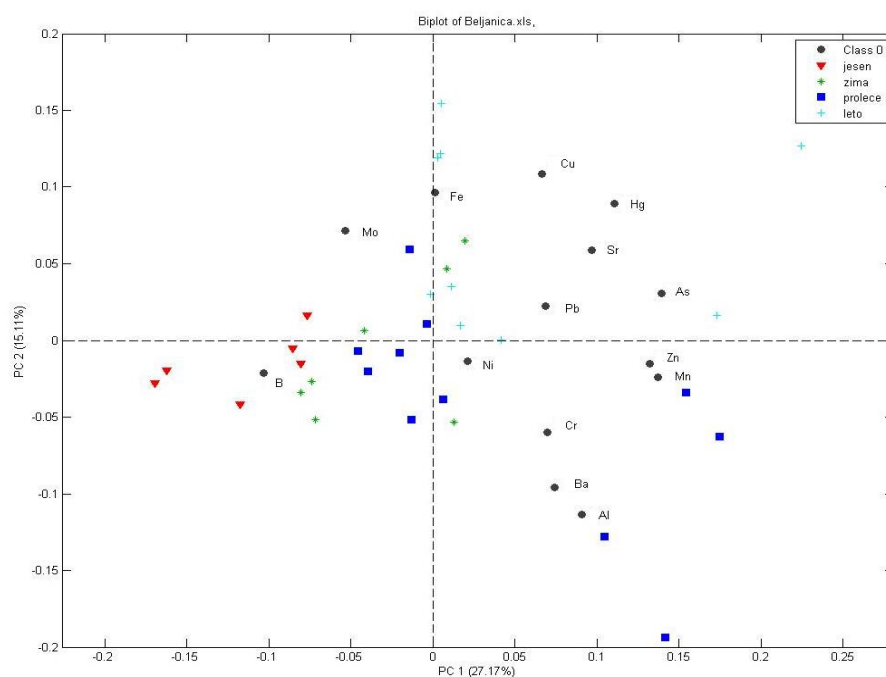
PCA analiza akumulacije 14 metala tokom 4 sezone (jesen, zima, proleće, leto) pokazala je da se jedinke sa Beljanice uzorkovane tokom jeseni grupišu po većim vrednostima za koncentracije B u jetri i škragama, kao i većim koncentracijama Hg u mišiću (Slika 4.8). Značajne razlike u koncentracijama elemenata u različitim sezonama su nađene kod Mn i Sr (gonade), Cu, Hg (jetra), Cr, Hg (mišić), Ba, Cu, Mo, Sr, Zn (škrge) (Tabela 4.15). Pokazana je razlika između sezone jesen u odnosu na druge sezone u akumulaciji Hg u mišiću i Mo u škragama. Razlika između leta i drugih sezona je pokazana za akumulaciju Mo u škragama, kao i Hg u jetri. Takođe je pokazana i značajno veća akumulacija Cr u mišiću tokom zime u odnosu na ostale sezone. Pored ovoga, pokazana je i razlika između sezone proleća i leta u akumulaciji Sr i Mo u škragama, kao i Cu u jetri, kao i između proleća i jeseni u akumulaciji Hg u mišiću, Mo u škragama i Mn u gonadama. Razlike u akumulaciji između jeseni i zime su pokazane za Ba, Mo i Sr u škragama, dok su razlike između jeseni i leta pokazane u akumulaciji

Cu u jetri, Zn, Sr, Mo, Ba u škragama. Razlika između zime i proleća je pokazana za vrednosti Ba u škragama, kao i za Sr u škragama i gonadama, dok je razlika između zime i leta pokazana za vrednosti Ba, Cu i Mo u škragama.

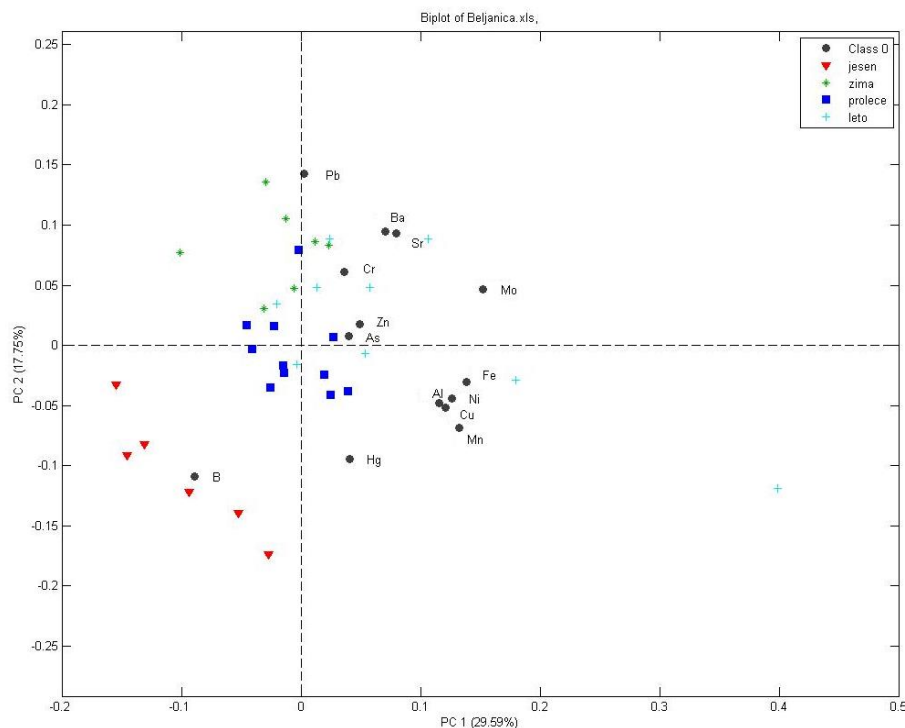
a) mišić



b) jetra

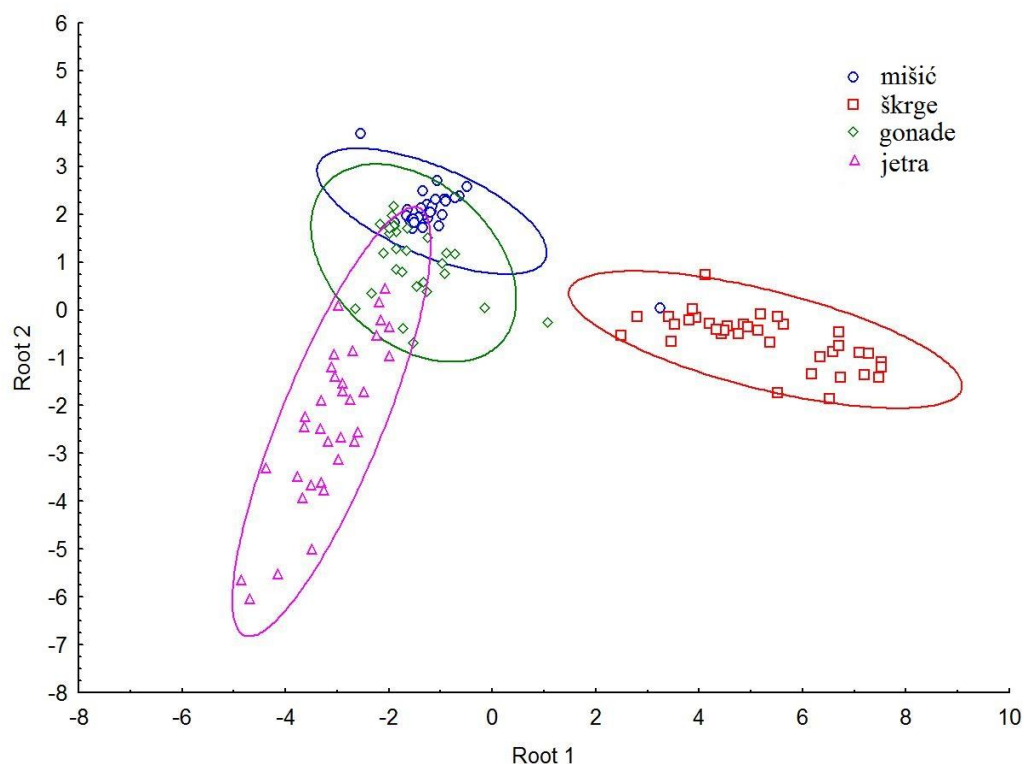


c) škrge



Slika 4.9. PCA analiza koncentracije elemenata u mišićima (a), jetri (b) i škrgamma (c) tokom 4 sezone na Beljanici

Kanonijska diskriminantna analiza (Slika 4.10) je u odnosu na ukupni sadžaj elemenata u tkivima ukazala na visok stepen diferencijacije škrge u odnosu na druga tkiva. Pored ovoga, vidi se delimično preklapanje kod mišića, gonada i jetre.



Slika 4.10. Rezultati kanonijske diskriminantne analize, primenjene na koncentracijama metala i metaloida u četiri ispitivana tkiva (elipse pokazuju 95% intervale pouzdanosti) na Beljanici

Koncentracija elemenata ne prelazi maksimalno dozvoljene koncentracije propisane za riblje meso, odnosno mišić (Tabela 4.16).

Tabela 4.16. Srednje vrednosti $\pm$ SD koncentracija elemenata u mišiću (izražene u $\mu\text{g/g}$ vlažne težine) u uzorcima klena sa Beljanice, ND- ispod granice detekcije *detektovano u jednoj jedinki

	Cd	Pb	Hg	As
oktobar	ND	ND	$0,21 \pm 0,02$	$0,05^*$
novembar	ND	ND	$0,25 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,06$
decembar	ND	$0,06 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,05$
februar	ND	$0,06 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,06$
mart	ND	$0,05 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$
april	ND	$0,17^*$	$0,15 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,42$
maj	ND	$0,05 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,05$
jul	ND	$0,05 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,12$
avgust	ND	$0,05 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,26$
septembar	ND	$0,05^*$	$0,13 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$

4.4. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara

Korelacije između nivoa oštećenja DNK, fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara rađene su samo za lokalitete Peštan i Beljanica, jer su samo na pomenutim lokalitetima uzorkovanja rađena tokom više meseci.

Na Peštanu je utvrđena značajna pozitivna korelacija između NO_3 u vodi sa stepenom oštećenja DNK molekula u krvi i za TI ($r=0,76$) i za OTM ($r=0,81$) (Tabela 4.17a). Korelacija između oštećenja DNK i mikrobioloških parametara nije pokazana (rezultati nisu prikazani). Negativna korelacija je pokazana između svih tkiva (najviše za krv) i temperature vode. Korelacija između parametara TI i OTM je visoka i značajna za sva tkiva. Takođe je pokazana i značajna pozitivna korelacija između krvi i jetre za OTM (Tabela 4.17a). Što se tiče korelacije između mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja i fizičko-hemijskih parametara, nije primećena značajna korelacija (rezultati nisu prikazani). Kada se porede mikrobiološki parametri jedni u odnosu na druge dolazi do značajne korelacije za većinu parametara (Tabela 4.18a).

Na Beljanici nije uočena značajna korelacija između fizičko-hemijskih parametara i vrednosti TI i OTM (Tabela 4.17b). Korelacija između oštećenja DNK i mikrobioloških parametara nije primećena. Kao i na Peštanu, korelacija između parametara TI i OTM je visoka i značajna za sva tkiva. Takođe je pokazana i značajna pozitivna korelacija između jetre i škrge za TI i OTM (Tabela 4.17b). Što se tiče korelacije između mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja i fizičko-hemijskih parametara, nije primećena značajna korelacija (rezultati nisu prikazani). Visoka, ali ne statistički značajna negativna korelacija je primećena između oštećenja svih tkiva (najviše za jetru) i temperature vode (Tabela 4.17b). Kada se porede mikrobiološki parametri jedni u odnosu na druge dolazi do značajne korelacije između TH i FC, O i AM kao i između H i O (Tabela 4.18b).

Tabela 4.17. Korelacije fizičko-hemijskih parametara sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u tkivima sa Peštana (a) i Beljanice (b) (Pearson-ov test korelacije)

(a)

Peštan	TI krv N=8	OTM krv N=8	TI jetra N=8	OTM jetra N=8	TI škrge N=8	OTM škrge N=8	T °C N=8	O ₂ mg/L N=8	O ₂ % N=8	pH N=8	NH ₄ N mg/L N=7	NO ₂ N mg/L N=7	NO ₃ N mg/L N=7
TI krv	1,00	0,98	0,67	0,76	0,65	0,74	-0,65	0,53	0,31	0,10	0,33	0,21	0,76
OTM krv	0,98	1,00	0,63	0,73	0,60	0,69	-0,61	0,53	0,33	0,02	0,31	0,10	0,81
TI jetra	0,67	0,63	1,00	0,99	0,68	0,68	-0,47	0,40	0,20	0,07	0,00	0,61	0,14
OTM jetra	0,76	0,73	0,99	1,00	0,65	0,67	-0,54	0,46	0,23	0,09	0,15	0,57	0,43
TI škrge	0,65	0,60	0,68	0,65	1,00	0,98	-0,24	0,22	0,17	-0,06	-0,59	-0,29	-0,20
OTM škrge	0,74	0,69	0,68	0,67	0,98	1,00	-0,27	0,20	0,10	0,01	-0,46	-0,18	-0,03
T °C	-0,65	-0,61	-0,47	-0,54	-0,24	-0,27	1,00	-0,90	-0,52	0,24	-0,63	-0,67	-0,41
O ₂ mg/L	0,53	0,53	0,40	0,46	0,22	0,20	-0,90	1,00	0,84	-0,44	0,69	0,38	0,38
O ₂ %	0,31	0,33	0,20	0,23	0,17	0,10	-0,52	0,84	1,00	-0,40	0,54	-0,17	0,31
pH	0,10	0,02	0,07	0,09	-0,06	0,01	0,24	-0,44	-0,40	1,00	-0,13	-0,02	0,20

(b)

Beljanica	TI krv N=8	OTM krv N=8	TI jetra N=8	OTM jetra N=8	TI škrge N=8	OTM škrge N=8	T °C N=8	O ₂ mg/L N=8	O ₂ % N=8	NH ₄ N mg/L N=6	NO ₂ N mg/L N=6	NO ₃ N mg/L N=6
TI krv	1,00	0,99	0,59	0,72	0,66	0,68	-0,39	0,12	-0,13	0,25	-0,34	0,00
OTM krv	0,99	1,00	0,50	0,65	0,56	0,61	-0,38	0,19	-0,06	0,29	-0,29	0,09
TI jetra	0,59	0,50	1,00	0,98	0,76	0,71	-0,62	0,24	-0,07	0,08	-0,52	-0,40
OTM jetra	0,72	0,65	0,98	1,00	0,74	0,72	-0,67	0,26	-0,10	0,16	-0,52	-0,31
TI škrge	0,66	0,56	0,76	0,74	1,00	0,95	-0,33	-0,03	-0,18	0,06	0,07	0,03
OTM škrge	0,68	0,61	0,71	0,72	0,95	1,00	-0,38	0,15	-0,01	0,30	0,30	0,39
T °C	-0,39	-0,38	-0,62	-0,67	-0,33	-0,38	1,00	-0,58	0,00	-0,74	-0,03	-0,06
O ₂ mg/L	0,12	0,19	0,24	0,26	-0,03	0,15	-0,58	1,00	0,80	0,70	0,31	0,64
O ₂ %	-0,13	-0,06	-0,07	-0,10	-0,18	-0,01	0,00	0,80	1,00	0,33	0,33	0,65

Markirano crveno su vrednosti koje su statistički značajne

Tabela 4.18. Korelacije mikrobioloških parametara sa Peštana (a) i Beljanice (b) (Pearson-ov test korelacije)

a)

Peštan	TC N=6	FC N=6	FE N=6	TH N=6	O N=6	H N=6
TC	1,00	0,37	0,96	0,63	0,31	0,87
FC	0,37	1,00	0,33	0,93	0,94	0,73
FE	0,96	0,33	1,00	0,54	0,29	0,79
TH	0,63	0,93	0,54	1,00	0,85	0,91
O	0,31	0,94	0,29	0,85	1,00	0,67
H	0,87	0,73	0,79	0,91	0,67	1,00

b)

Beljanica	TC N=6	FC N=6	FE N=6	AM N=6	TH N=6	O N=6	H N=6
TC	1,00	0,01	0,57	-0,31	-0,27	-0,48	-0,56
FC	0,01	1,00	0,28	0,54	0,90	0,29	0,27
FE	0,57	0,28	1,00	-0,20	0,03	-0,16	-0,31
AM	-0,31	0,54	-0,20	1,00	0,78	0,87	0,73
TH	-0,27	0,90	0,03	0,78	1,00	0,65	0,66
O	-0,48	0,29	-0,16	0,87	0,65	1,00	0,92
H	-0,56	0,27	-0,31	0,73	0,66	0,92	1,00

TC-totalni koliformi, FC-fekalni koliformi, FE-fekalne enterokoke, AM-aerobni mezofili, TH-aerobni heterotrofi, O-oligotrofi, H-heterotrofi;

Markirano crveno su vrednosti koje su statistički značajne

4.5. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida u tkivima

Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida u tkivima je rađena za sve lokalitete. Korelacije su rađene za jetru i škrge, jer se u pomenutim tkivima uporedno radila i procena oštećenja DNK (TI, OTM) kao i detekcija metala i metaloida. Dodatno su urađene i korelacije između metala unutar svakog tkiva.

Vrednosti korelacija elemenata detektovanih u jetri i škragama sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škragama sa Uvca su prikazane u tabeli 19. U jetri, korelacija između TI i OTM sa elementima je pokazana samo između OTM i Cr (Tabela 4.19a). Što se tiče škrge, korelacija između TI i OTM sa elementima nije dostigla statističku značajnost (Tabela 4.19b).

Tabela 4.19. Korelacija elemenata detektovanih u jetri (a) i škragama (b) sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škragama sa Uvca (Pearson-ov test korelacije, N=7)

a)

jetra	Al	B	As	Ba	Cr	Cd	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
TI	-0,46	-0,58	0,37	0,41	-0,15	-0,01	-0,22	-0,58		-0,48	-0,11	0,22	-0,38
OTM	-0,23	-0,62	0,60	0,42	-0,83	-0,30	-0,11	-0,70		-0,22	-0,61	0,46	-0,58

b)

škrge	Al	B	As	Ba	Cr	Cd	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
TI	0,65	-0,28	-0,25	0,55	0,30		-0,43	0,16	-0,13	0,37	0,69	0,15	-0,34
OTM	0,20	-0,56	-0,52	0,66	0,67		-0,53	0,23	-0,16	0,58	0,37	0,08	-0,65

Korelacije između elemenata unutar svakog tkiva sa Uvca su pokazale mali broj pozitivnih i statistički značajnih korelacija (Tabela 20, Prilog). Al i Mo su pozitivno korelisali u mišiću, škragama i gonadama. Koncentracije Ba i Mn su pozitivno korelisale u škragama i gonadama. Vrednosti za B i As su pozitivno korelisale u mišćima i škragama.

Vrednosti korelacija elemenata detektovanih u jetri i škragama sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škragama sa Garaša su prikazane u tabeli 4.20. U jetri korelacija između TI i OTM sa elementima je pokazana između TI i Mn, Mo i Sr, dok je OTM pozitivno korelisao sa Hg (Tabela 4.20a). Što se tiče škrge, korelacija između TI i OTM sa elementima nije dostigla statističku značajnost (Tabela 4.20b).

Tabela 4.20. Korelacija elemenata detektovanih u jetri (a) i škrigama (b) sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škrigama sa Garaša (Pearson-ov test korelacije, N=5)

a)

jetra	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
TI	-0,06	0,83	-0,41		-0,05	-0,59	0,83	0,75	0,89	0,90	0,96	0,80
OTM	-0,12	0,74	-0,14		-0,11	-0,54	0,72	0,90	0,88	0,75	0,80	0,66

b)

škrge	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
TI	-0,82	-0,84		-0,67	-0,86	-0,46	-0,84	-0,06	-0,82	0,02	-0,08	-0,03
OTM	-0,79	-0,82		-0,54	-0,80	-0,29	-0,81	-0,17	-0,78	0,18	0,06	0,13

Korelacije između elemenata unutar svakog tkiva sa Garaša su pokazale mali broj statistički značajnih korelacija (Tabela 21, prilog). Al i Cr su pozitivno korelisali u mišiću, škrigama i jetri. Veći broj korelacija između metala je primećen u mišiću i škrigama.

Vrednosti korelacija elemenata detektovanih u jetri i škrigama sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škrigama sa Peštana su prikazane u tabeli 4.21. U jetri, korelacija između TI i OTM sa elementima nije dostigla statističku značajnost, sa tim da je u više slučajeva pokazana negativna nego pozitivna korelacija (Tabela 4.21a). Što se tiče škriga pokazana je samo negativna korelacija za TI i OTM sa Cu. Kao i za jetru, u više slučajeva je pokazana negativna korelacija (Tabela 4.21b).

Tabela 4.21. Korelacija elemenata detektovanih u jetri (a) i škrigama (b) sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škrigama sa Peštana (Pearson-ov test korelacije)

a)

jetra	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
TI	-0,02	-0,31	0,32	0,06	-0,37	-0,20	-0,35	-0,13	0,00	-0,22	-0,39	-0,24	-0,17	-0,15
OTM	-0,07	-0,29	0,18	0,01	-0,34	-0,23	-0,40	-0,14	-0,10	-0,26	-0,42	-0,18	-0,12	-0,26

N=22

b)

škrge	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
TI	-0,17	0,09	-0,13	-0,05	-0,13	-0,43	-0,02	0,01	0,04	-0,15	-0,07	-0,18	0,00	-0,32
OTM	-0,20	0,20	-0,12	-0,08	-0,18	-0,45	0,06	0,02	-0,01	-0,21	-0,04	-0,24	-0,06	-0,42

N=24

Zabeležen je veliki broj jakih, najčešće pozitivnih i statistički značajnih korelacija različitih elemenata unutar istog tkiva sa Peštana (Tabela 22, Prilog). Koncentracije Sr i Ba su pozitivno korelirale u mišiću, škragama i gonadama. Sr i Mn su pozitivno korelirali u mišiću, škragama i jetri. Al i Mn su pozitivno korelirali škragama, gonadama i jetri. Sr i Zn su pozitivno korelirali u jetri i gonadama. Cr i Hg su pozitivno korelirali u jetri i gonadama sa barijumom. Cr je pozitivno korelirao sa Fe, Ni, Sr i Zn u jetri i gonadama. Cu i Hg su takođe pozitivno korelirali u škragama, jetri i gonadama. Mn i Ni su pozitivno korelirali u jetri i gonadama. Nikl je sa Al, Cr i Mn pozitivno korelirao u jetri i gonadama.

Vrednosti korelacija elemenata detektovanih u jetri i škragama sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri i škragama sa Beljanice su prikazane u tabeli 4.22. Statistički značajna korelacija između TI i OTM i elemenata je uočena za OTM jetru i Hg (Tabela 4.22a). U škragama su oba parametra genotoksičnosti negativno korelirali Ba, Mn, Ni i Pb, dok se samo TI korelirao sa Al (Tabela 4.22b).

Tabela 4.22. Korelacija elemenata detektovanih u jetri (a) i škragama (b) sa oštećenjem DNK (TI, OTM) u jetri (a) i škragama (b) sa Beljanice (Spearman-ov test korelacije)

a)

jetra	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
TI	0,15	-0,11	-0,09	-0,03	0,16	-0,22	-0,02	-0,31	-0,17	-0,08	0,22	0,04	0,06	0,23
OTM	0,32	-0,05	-0,16	0,08	0,15	-0,26	-0,14	-0,34	-0,18	-0,08	0,13	0,00	0,07	0,23

b)

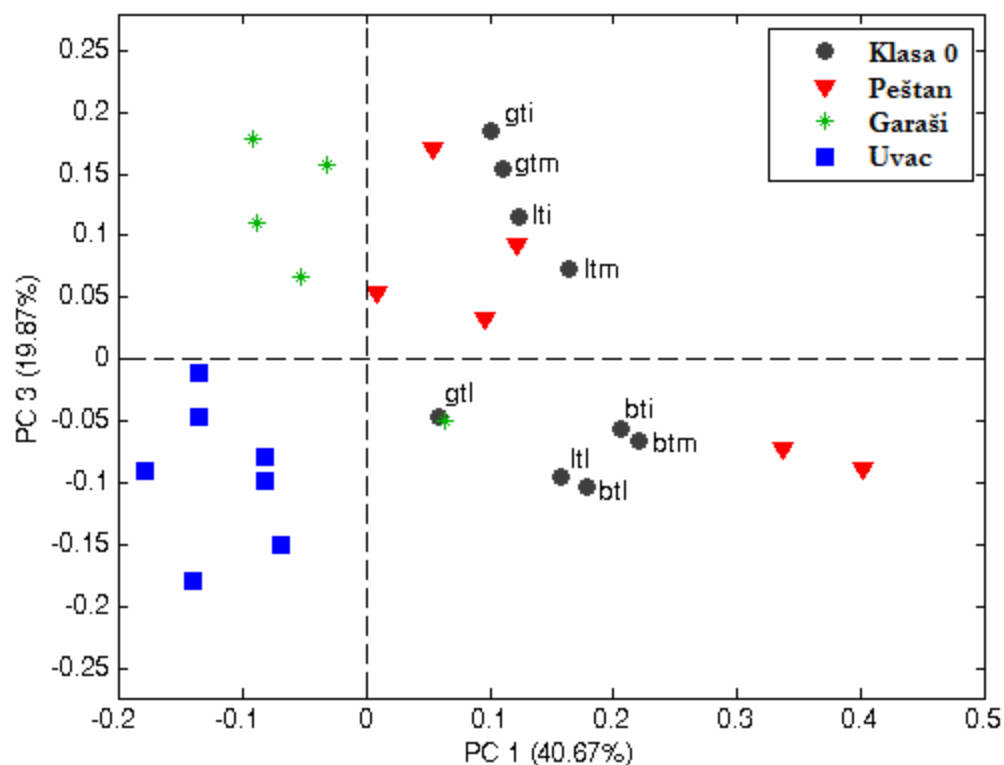
škrge	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
TI	-0,28	0,03	0,07	-0,33	-0,10	0,01	0,05	-0,14	-0,28	-0,15	-0,26	-0,40	-0,23	0,14
OTM	-0,15	0,02	0,01	-0,33	-0,06	-0,14	0,11	-0,16	-0,31	-0,16	-0,26	-0,35	-0,20	0,11

Zabeležen je veliki broj statistički značajnih korelacija različitih elemenata unutar istog tkiva (Tabela 23, Prilog). Al sa Ni su pozitivno korelisali u mišiću, škragama i gonadama. B je sa Zn negativno korelisao u mišiću, škragama i jetri, dok je sa Mo negativno korelisao u škragama, a pozitivno u mišiću i jetri. As je sa Al pozitivno korelisao u mišiću i gonadama, dok je sa Ni pozitivno korelisao u svim tkivima. As je sa Pb, Sr i Zn korelisao u gonadama (samo je negativno za Sr) i jetri (pozitivna korelacija u svim slučajevima). Ba je pozitivno korelisao sa Mo i Pb u mišiću i škragama. Cu je sa Sr korelisao u mišiću, gonadama i jetri, dok je sa Zn korelisao u škragama i gonadama. Fe je pozitivno korelisao sa Mn, Mo i Sr u škragama i gonadama. Hg je pozitivno korelisao sa As u škragama, gonadama i jetri. Mn je korelisao sa Mo u svim tkivima (samo u jetri negativno), dok je sa Sr i Zn pozitivno korelisao u gonadama i jetri. Mo je korelisao sa Cu, Zn i Sr u mišiću, škragama i gonadama (samo sa Cu u škragama negativno). Ni je sa Al i As pozitivno korelisao u mišiću, škragama i gonadama, dok je sa Pb pozitivno korelisao u mišiću, gonadama i jetri. Pb je sa Al pozitivno korelisao u mišićima, gonadama i jetri. Sr i Zn su pozitivno korelisali u gonadama i jetri.

4.6. PCA analiza ispitivanih lokaliteta na osnovu genotoksičnosti i koncentracije elemenata u tkivima

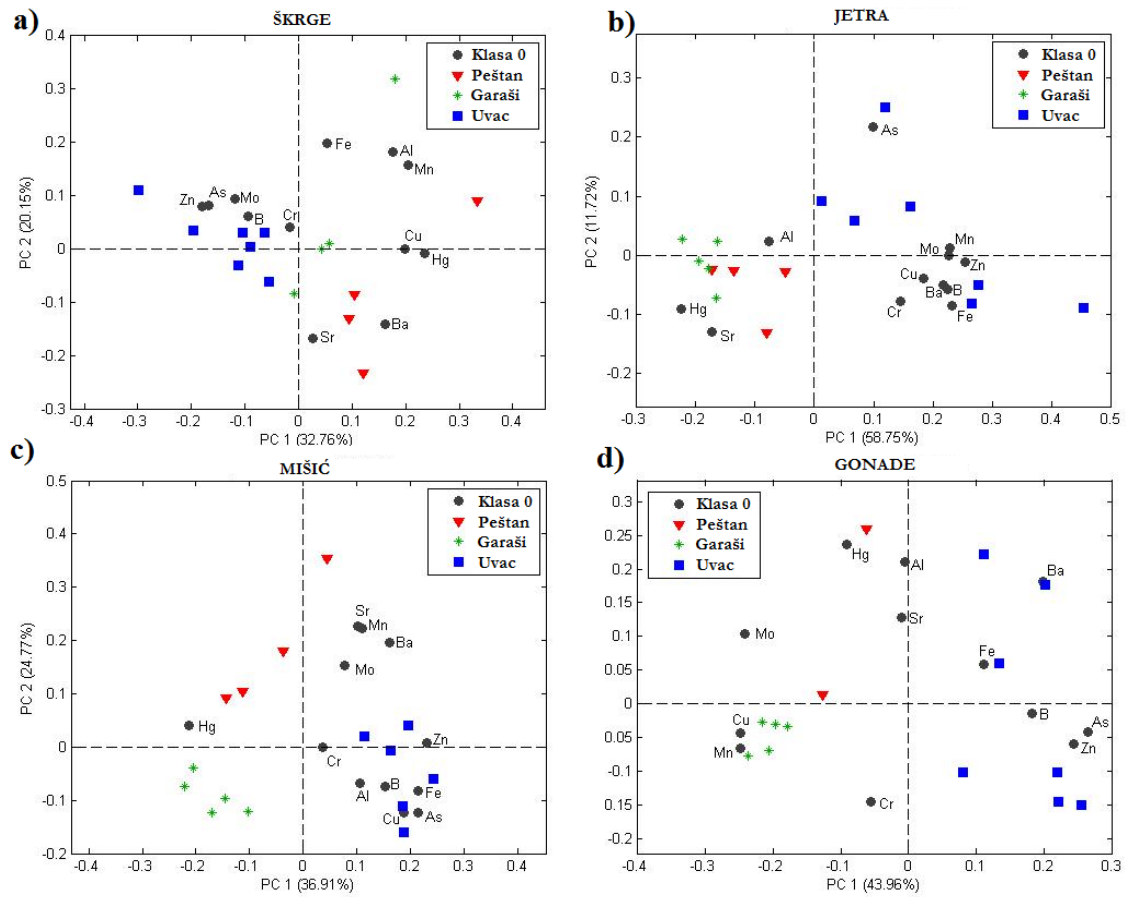
Zbog izražene sezonske varijacije u odgovoru tkiva i za oštećenje DNK u tkivima kao i za akumulaciju u tkivima, za poređenje lokaliteta su korišćene vrednosti oštećenja jedinki iz istih sezona, pa su tako sa Peštana i Beljanice korišćene jedinke iz oktobra i novembra 2011. godine (kao jedna populacija, označena kao Peštan) sa Uvca jedinke iz oktobra 2011. godine i sa Garaša jedinke iz novembra 2011. godine.

Za analizu genotoksičnosti između lokaliteta rađena je PCA analiza kometa ćelija jetre (l), škrge (g) i krvi (b) sa Peštana, Garaša i Uvca. Rangirani su sledeći parametri: dužina repa komete (tl), intenzitet repa komete (ti), kao i Olive tail moment (tm). Kombinacijom ćelija i parametara dobija se 9 klasa: ltl, lti, rlm, gtl, gti, gtm, btl, bti, btm. PCA analiza je jasno pokazala razdvajanje lokaliteta, kao i da su se jedinke klana sa Peštana grupisale oko viših vrednosti za sve ispitivane parametre i tkiva (Slika 4.11).



Slika 4.11. PCA analiza parametara oštećenja DNK sa Peštana, Garaša i Uvca

Poredeći koncentracije metala u različitim tkivima pokazano je da su škrge sa Garaša imale najveće koncentracije Al, B, Fe i Mn, sa Uvca As, Mo i Zn, dok su Ba, Cu, Hg i Sr bili najviši na Peštanu (Slika 4.12a). Poređenjem nivoa akumulacije u jetri, uočeno je da su skoro svi metali bili najviši na Uvcu, izuzev Al i Hg koji su bili najviši na Garašima i Sr koji je bio iznad granice detekcije samo na Garašima i Peštanu (Slika 4.12b). Mišić je akumulirao najviše koncentracije Sr i Mn na Peštanu, a Hg je bio najviši na Garašima, dok su Al, As, B, Cu, Fe, Mo i Zn bili najviši na Uvcu (Slika 4.12c). U gonadama najviše koncentracije As, B, Ba, Fe i Zn su nađene na Uvcu dok su Cu i Mn bili najviši na Garašima (Slika 4.12d).



Slika 4.12. PCA analiza koncentracije metala u škragama (a), jetri (b), mišiću (c) i gonadama (d) sa Peštana, Garaša i Uvca

DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Određivanje ekoloških klasa kvaliteta vode dve akumulacije, Uvac i Garaši, i dve reke, Peštan i Beljanica tokom 2011/2012 godine, vršena je na osnovu fizičko-hemijskih svojstava vode i prisustva 7 različitih grupa bakterija, ukupnih i fekalnih koliforma, fekalnih enterokoka, aerobnih mezofila i heterotrofa, heterotrofa i oligotrofa.

Poreklo zagađenja dobijeno je iz odnosa fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka (F/E), a status samoprečišćavanja iz odnosa oligotrofa i heterotrofa (O/H). Pokazatelj odnosa različitih grupa bakterija tokom višemesečnog monitoringa predstavljen je kao integrisani odgovor biomarkera (IBR).

Procena genotoksičnog potencijala ovih vodnih tela vršena je na osnovu detekcije oštećenja DNK molekula alkalnim komet testom u različitim tkivima klena: krv, jetra, škrge, a rangiranje parametara za procenu DNK oštećenja (TL, TI i OTM) metodom „SRD - sum of ranking differences”.

Koncentracija metala i metaloida određivana je u različitim tkivima klena: jetra, škrge, mišići i gonade metodom induktivno spregnute plazme – optičko emisijne spektrometrije (ICP - OES). Pošto su paralelno rađeni alkalni komet test i sadržaj metala i metaloida u jetri i škragama, dobijena je informacija o uticaju elemenata na nivo oštećenja DNK.

Uporednom analizom oštećenja DNK molekula i akumulacije elemenata korišćenjem više tkiva proučavana je eventualna razlika u odgovoru, odnosno njihova senzitivnost za ove vrste analiza.

5.1. Analiza kvaliteta voda akumulacija, Uvac i Garaši

Akumulacije Uvac i Garaši su veštački formirana vodna tela čiji se kvalitet vode, na osnovu rezultata fizičko-hemijske analize primarnih nutrijenata, može klasifikovati na različite načine u zavisnosti od toga koji se Pravilnik primenjuje. Prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima, kvalitet vode bi odgovarao II/III klasi. Prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera Uvac odgovara I, a Garaši I-III klasi kvaliteta vode. Takođe, i u slučaju mikrobioloških parametara koji su praćeni, ukupni i fekalni koliformi,

fekalne enterokoke, aerobni heterotrofi i oligotrofi, u zavisnosti od pravilnika različite su procene kvaliteta, prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za akumulacije formirane na vodnim telima Uvac i Garaši su II/III klase voda, dok su prema Pravilniku o parametrima ekološkog statusa za jezera oba lokaliteta u I klasi vode.

Dalje analize su pokazale da broj aerobnih mezofila ne prelazi dozvoljenu granicu, a indeks O/H ukazuje na zadovoljavajući status samoprečišćavanja ovih vodnih tela, iako je u slučaju Uvca bio nešto niži u poređenju sa akumulacijom Garaši. Kako je Uvac pod zaštitom države više od 40 godina, negativan antropogeni uticaj i prinos organskog materijala na ovom lokalitetu sveden je na minimum što se vidi i iz odnosa O/H.

Prema klasifikaciji po Kohlu (1975) po svim mikrobiološkim parametrima Uvac spada u I klasu kvaliteta vode, a Garaši su za većinu parametara u I klasi, sem za ukupne koliforme, prema kojima su u II klasi. Kod obe akumulacije vidi se razlika u klasama kvaliteta vode u odnosu na Pravilnik koji se koristi, ali su te razlike značajno manje za Garaše nego one koje su uočene za Uvac.

Akumulacija Garaši se koristi kao resurs pijaće vode što sa sobom uzrokuje imperativnim propisima predviđenu zaštitu i sprečavanje antropogenog uticaja na kvalitet vode. Međutim, obradive površine koje su raspoređene oko same akumulacije očigledno su dovele do unosa organskog i drugog materijala, a samim time i do porasta stepena zagađenja u odnosu na Uvac.

Genotoksični efekat vode akumulacija Uvac i Garaši praćen je preko nivoa oštećenja DNK molekula na različitim tkivima klena, krvi, jetri i škragama, tokom 2011. godine. Poznato je da različiti tipovi ćelija imaju različitu stopu metabolizma, period obnavljanja tkiva, različit broj prekida na DNK molekulu, pa samim tim i različitu stopu reparacije DNK molekula, što razliku u odgovoru i čini očekivanom (Lee & Steinert, 2003). Najveći broj radova je upravo pokazao tkivno specifično oštećenje DNK molekula (Abd-Allah et al., 1999, Rajaguru et al., 2003, Frenzilli et al., 2009). Najčešće korišćena tkiva za analizu oštećenja DNK molekula kod riba su krv, jetra, škrge, ali su zabeležene i analize na bubrezima, slezini, mišiću i gonadama. Kod riba krv je najčešće korišćeno tkivo u analizama DNK oštećenja pre svega zbog lakšeg uzorkovanja. Takođe je i jako bitno što kod krvi nema potrebe za pravljenjem suspenzije ćelija, procesom koji dodatno može oštetiti ćelije pre same analize (Lee & Steinert, 2003). Jetra je tkivo sa

intenzivnim metabolizmom, akumulacijom ksenobiotika i centar za detoksikaciju (Jezierska & Witeska, 2006). Škrge su jedini organ koji je u direktnom kontaktu sa vodom i štetnim jedinjenjima rastvorenim u njoj. Ipak, u nekim radovima nije pokazano tkivno-specifično oštećenje DNK molekula (Sharma et al., 2007, Rocco et al., 2012).

Rezultati oštećenja DNK molekula su prikazani preko 2 parametra, TI i OTM, izabrana za najpogodnije na osnovu analiza rangiranja vrednosti oštećenja na ćelijama klena, kao i na osnovu procene drugih tipova ćelija. Na osnovu rezultata analize 5100 ćelija krvi, jetre i škrge na 34 jedinke klena i parametara TL, TI i OTM (Sunjog et al., 2013), kao najpouzdaniji parametri su se izdvojili TI i OTM za sva tkiva. Druge studije procene najpouzdanijeg parametra koje su rađene na humanim limfocitima, gde je analizirano 1750000 ćelija, takođe su izdvojile ova dva parametra kao najpogodnije (Rosenberger et al., 2011). Heberger i saradnici (2014) su analizirajući tri parametra (TL, TI i OTM) na 12600 ćelija hemolimfe, škrge i digestivne žlezde izdvojili TI kao najpouzdaniji parametar.

Vrednosti DNK oštećenja tkiva jedinki uzorkovanih na Uvcu tokom maja i oktobra nisu se međusobno značajno razlikovale. Oštećenje na eritrocitima je bilo značajno niže od oštećenja na ćelijama jetre i škrge u oktobru, dok su se u maju sva tkiva značajno razlikovala. Pored toga, nivo oštećenja na eritrocitima sa ovog lokaliteta bio je isti ili niži od vrednosti oštećenja dobijenih od strane drugih autora takođe na eritrocitima klena uzorkovanih sa referentnih lokaliteta (Devaux et al., 1998, Pavlica et al., 2011). Ove vrednosti takođe su bile u rangi bazalnih vrednosti za eritrocite kod vrste *Cyprinus carpio*, kao i za škrge kod vrsta *Umbra pygmaea* i *Channa punctatus* (Alink et al., 2007, Cok et al., 2011, Pandey et al., 2011).

Genotoksični efekat vode akumulacije Garaši za TI i OTM bio je značajno niži za krv u poređenju sa vrednostima za jetru i škrge, između kojih nije pokazana značajna razlika. Poredeći DNK oštećenja sa vrednostima dobijenim na Uvcu, slične vrednosti su dobijene za ćelije krvi dok su vrednosti za ćelije jetre i škrge bile više i značajno različite.

Visok kvalitet vode na Uvcu potvrđen je niskim vrednostima primarnih nutrijenata, mikrobioloških parametara i DNK oštećenja na tkivima klena. Jedinke klena sa Uvca su zbog svega navedenog izabrane kao kontrolna populacija za određivanje bazalnog oštećenja DNK molekula.

Pokazano je da se tkiva kod riba bitno razlikuju po stepenu akumulacije određenih metala i metaloida. U analizama akumulacije metala i metaloida se obično koriste metabolički aktivna tkiva, kao što su jetra, gonade, bubrezi, škrge, jer ona po pravilu akumuliraju metale u većim koncentracijama, što je uočeno u studijama sa tretmanom kao i u studijama monitoringa u prirodnim uslovima (Kalay et al, 1995, Unlu et al., 1996, Karadede & Unlu, 2000). Iako mišići u poređenju sa ostalim organima kao što su jetra, škrge i bubrezi, akumuliraju manje količine metala, često su korišćeni u analizama jer predstavljaju bitan deo ishrane čoveka (Jezierska & Witeska, 2006, Jarić et al., 2011).

Jetra se smatra dobrim tkivom za monitoring zagađenja vode metalima, jer su koncentracije akumulirane u ovom tkivu često proporcionalne onima prisutnim u okruženju. Takođe, za razliku od ostalih tkiva, akumulirani metali ostaju dugo prisutni, čak i posle dužeg perioda aklimacije, dok se u ostalim tkivima koncentracija metala mnogo brže smanjuje (Jezierska & Witeska, 2006). Visoki bioakumulacioni potencijal jetre predstavlja i rezultat metaboličke aktivnosti metalotioneina, proteina koji imaju sposobnost vezivanja za određene metale, kao što su Cu, Cd i Zn. Vezivanjem za metale u jetri, metalotioneini dovode do smanjenja njihove toksičnosti, čime se omogućava akumulacija metala u visokim koncentracijama (Canli & Atli, 2003, Ikem et al., 2003).

Škrge su često centar za akumulaciju najviših koncentracija metala. Kako navode Dural i saradnici (2006) i Erdoğan & Erbilir (2007), ukupne koncentracije metala koje su nađene u škragama mogu biti i pod uticajem procesa adsorpcije metala na površinu škrge, ali takođe i procesa formiranja hemijskih kompleksa između metala i mukusa na škragama, koje je veoma teško ukloniti sa škržnih lamela pre same analize. Ova adsorpcija metala za površinu škrge je prema nekim autorima i neophodna za njihovo pravilno funkcionisanje (Morsy & Protasowicki, 1990).

Mišići se generalno smatraju tkivom sa slabim potencijalom akumulacije (Canli & Atli, 2003, Jarić et al., 2011, Akan et al., 2012, Sunjog et al., 2012, Jaćimović et al., 2015). Ovakav princip tkivno-specifične akumulacije, gde škrge i jetra akumuliraju veće koncentracije metala u odnosu na mišiće se pokazao veoma uobičajen kako kod klena tako i kod drugih vrsta riba (Bervoets et al., 2001, Duman & Kar, 2012, Harkabusová et al. 2012, Rajkowska & Protasowicki, 2013, Salem et al., 2014).

Analiza 13 metala i metaloida u tkivima klena sa Uvca pokazala je da je većina elemenata bila najniža u mišićima. Ba, Hg, Mn, Mo, Sr bili su najviši u škragama, dok su B, Cr, Cu, Fe i Mo bili najviši u jetri. Pokazano je da je većina elemenata u jetri (B, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo i Zn) i neki u škragama (Mo, Zn) imala veće vrednosti nego uzorci sa drugih lokaliteta tokom istih sezona uzorkovanja. S druge strane, rezultati genotoksičnosti dobijeni na jetri i škragama izdvojili su Uvac kao referentni lokalitet. Ovi, naizgled suprotni rezultati, mogu se objasniti aklimatizacijom/adaptacijom riba u ovim prilično konstantnim (bez antropogenog ulaza) nivoima elemenata u vodi, kao i specifičnim geohemijskim sastavom metala u geološkoj podlozi Uvca (Sunjog et al., 2016). Navedeno ukazuje na to da mogu postojati velike razlike u toleranciji na određene koncentracije metala između različitih populacija jedne vrste, i sa tim u vidu implikacije na odluke u vezi sa tim kako odrediti bezbedne nivoe zagađujućih materija u okolini (Klerks i Veiss, 1987, Chapman i Vang, 2000). Postoje dva razloga zašto organizmi mogu biti otporni na zagađivače: (1) pojedinačni organizmi mogu steći određeni stepen tolerancije tzv. fiziološkom aklimacijom tokom izlaganja subletalnim koncentracijama zagađivača u nekom periodu svog životnog ciklusa (2) populacije mogu evoluirati u otpornosti na genetski zasnovanoj bazi, delovanjem prirodne selekcije na genetski materijal odnosno na individualne varijacije u rezistenciji (Klerks i Veiss, 1987). Pošto je Uvac zaštićeno područje više od 40 godina, vrlo je verovatno da je populacija klena prilagođena nivoima prirodno prisutnih metala i metaloida.

Analiza 12 metala i metaloida u tkivima klena na Garašima takođe je pokazala da je većina elemenata bila najniža u mišićima. Škrge su bile centar akumulacije za Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Sr i Zn, dok je jetra u najvišim koncentracijama akumulirala As, Cu i Mo.

5.2. Analiza kvaliteta voda reka, Peštan i Beljanica

5.2.1. Fizičko-hemijske i mikrobiološke analize

Rezultati fizičko-hemijske analize vode sa Peštana i Beljanice su generalno pokazale povećane koncentracije primarnih nutrijenata, koje su uglavnom odgovarale

III i IV klasi kvaliteta voda prema Pravilnika o parametrima ekološkog statusa za male i srednje vodotoke.

Analiza mikrobioloških parametara na Peštanu i na Beljanici tokom 2011/2012 godine pokazala je da obe reke prate isti trend, odnosno da se na osnovu analiziranih grupa bakterija uzorci pretežno grupišu između I i III klase. Tokom marta i aprila se na obe reke uočava porast broja ukupnih koliforma, fekalnih koliforma kao i oligotrofa i heterotrofa. Indeks O/H je u većini uzoraka (u 9 od 14) bio < 1 , što ukazuje na lošu sposobnost samoprečišćavanja. Pored ovoga, indeks F/E je bio > 4 u većini uzoraka sa obe reke, što generalno ukazuje na antropogeno poreklo zagađenja tokom uzorkovanih meseci. Po klasifikaciji po Kohlu prema broju ukupnih koliforma obe reke se kreću od II-III klase, dok se prema broju fekalnih koliforma, fekalnih enterokoka i aerobnih heterotrofa kreću od I-III.

Baterija biomarkera se često koristi u proceni efekata hemijske kontaminacije i detekcije odgovora na sredinski stres. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) je metod koji kombinuje odgovore biomarkera u generalni "stres indeks" i samim tim pokazuje njihov zajednički uticaj i olakšava njihovu interpretaciju. IBR se izražava preko poligonalnih polja, koji predstavljaju površine za dati biomarker/parametar, i preko kojih se mogu porediti lokacije i/ili meseci uzorkovanja. Mikrobiološki indikatori su često korišćeni pokazatelji stanja vode pod uticajem polutanata i opšteg sredinskog stresa vodenih ekosistema pa se IBR metodom oni mogu integrisati. Primena ove metode dala je jasniji uvid u sezonsko variranje fekalnog i organskog zagađenja tokom različitih meseci na Peštanu i Beljanici. Obe reke su pokazale porast mikrobioloških parametara tokom prolećnih meseci, na Peštanu najviše tokom marta, dok na Beljanici počinje od februara, opada u aprilu, pa ponovo raste u maju. Jedan od uzroka za ovakav trend povećanja ukupnog mikrobiološkog zagađenja tokom proleća je priliv organskog materijala i spiranja zemljišta oko reka (topljenjem snega zbog porasta temperature), kojim takođe mogu stići i različite grupe zemljišnih bakterija, a sa njima i rodova koji spadaju u koliformne bakterije, što dokazuje i porast broja ukupnih koliforma u datom periodu.

5.2.2. Analiza oštećenja DNK molekula u tkivima klena

Analiza oštećenja DNK molekula komet testom na Peštanu, tokom osam meseci, i na Beljanici, tokom deset meseci uzorkovanja 2011/2012 godine, pokazala je variranje u odgovoru između ćelija krvi, jetre i škrge na obe reke, kod oba parametra, OTM i TI. Sezonsko variranje u oštećenju DNK molekula može biti vezano, kako za egzogene (temperatura vode, prisustvo određenih polutanata, vodostaj itd.), tako i za endogene faktore (rast, razviće, pol, reprodukcija) (Stoliar & Lushchak, 2012). Pokazana je visoka korelacija između TI i OTM za sva tkiva. Obe reke pokazuju vrlo sličan godišnji trend u oštećenju DNK (visoka korelacija), koji najbolje potkrepljuje činjenica da su ove reke na sličnoj udaljenosti od glavnih zagađivača, postrojenja za preradu uglja. Takođe, zbog blizine uzorkovanja ova dva lokaliteta ne može se isključiti i prisustvo jedne populacije klena na tom području.

Poređenjem oba parametra oštećenja DNK molekula pokazana je značajna razlika između meseci sa najvišom temperaturom vode (avgust i septembar) i drugih meseci za sva tkiva.

Tokom meseci sa najvišim temperaturama vode (avgust i septembar) može se uočiti pad oštećenja za sva tri tkiva, krv, jetra, škrge, na oba lokaliteta. Slične rezultate su pokazale studije u kojima je viša temperatura vode dovođila do pada oštećenja u eritrocitima klena (Devaux et al., 1998, Pavlica et al., 2011) i vrste *Gasterosteus aculeatus* (Wirzinger et al., 2007). Međutim, postoje i studije u kojima je zabeleženo povećanje DNK oštećenja tokom toplijih meseci na eritrocitima kod rodova *Mugil*, *Netuma*, *Oreochromis* i *Clarias* (De Andrade et al., 2004, Buschini et al., 2004, Osman et al., 2012).

Poznato je da različiti endogeni faktori, pol, rast, razviće i reprodukcija, kao i egzogeni faktori, mogu dovesti do različitog odgovora tkiva tokom toplijih meseci kod riba, pre svega zbog razlike u veličini i vrsti vodnog tela, uslova na staništu, kao i drugih fizičko-hemijskih parametara tokom ispitivanih sezona. Sudeći prema našim rezultatima, temperatura igra jednu od značajnih faktora u dinamici genotoksičnosti. Kako je optimalna temperatura za klena od 4 do 20 °C, može se pretpostaviti da su uslovi tokom letnjih meseci na Peštanu i Beljanici bili iznad gornje granice optimuma. Obe reke su tokom letnje sezone pretrpele značajan pad vodostaja, gde su pored visokih

temperatura, jedinke klana bile i u uslovima bez dovoljne količine rastvorenog kiseonika vodi. Ovakvi uslovi su mogli dovesti do neaktivnosti jedinki, pada metabolizma pa i nivoa oštećenja DNK molekula. Pored toga, stanje hipoksije može dovesti i do povećanja broja eritrocita u krvotoku, što takođe može doprineti klasi neoštećenih ćelija u krvi (Reebs, 2009).

Razlog nižeg oštećenja DNK molekula u škrigama tokom toplijih meseci može biti usled hiperplazije epitelnih ćelija škržnih sekundarnih lamela, koje mogu doprineti klasi neoštećenih ćelija (Saber, 2011). Takođe, visoke temperature mogu dovesti i do proliferacije ćelija jetre, sa tim da se to dešava na temperaturama višim od onih zabeleženih tokom letnjih meseci na obe reke (Schultz et al., 1993). Sa druge strane Winter i saradnici (2004) nisu pokazali promenu u oštećenju na hepatocitima klana u odnosu na sezonu uzorkovanja.

Dodatne histopatološke analize na jetri i škrigama bi u ovom slučaju potencijalno dale odgovor na to koje posledice trpe ova tkiva klana u uslovima povišene temperature i smanjene koncentracije kiseonika.

Tokom decembra na Peštanu merenja su pokazala povećane vrednosti NH_4^+ , NO_2 i NO_3 , koje bi mogle biti razlog za oštećenje jetre (najviša vrednost TI i OTM) usled metabolizma azota (Iqbal et al., 2005).

Poredeći oštećenja ćelija krvi, jetre i škriga klana sa Peštana i Uvca, uzorkovanih u istim sezonama, pokazana je značajnost razlike za sva tkiva kod oba parametra. Takođe su poređenja na istim tkivima sa Beljanice i Uvca pokazala da su oštećenja u krvi i škrigama bila značajno različita za oba parametra, dok jetra nije pokazala značajnost razlike ni za TI ni za OTM.

Oštećenja na ćelijama krvi, jetre i škriga sa Garaša bila su bliska oštećenjima na istim tkivima sa Peštana i Beljanice, uzorkovanih u istim sezonama, bez značajnosti razlike kod oba parametra.

5.2.3. Analiza akumulacije metala i metaloida u tkivima klana

Na Peštanu i Beljanici analizirani su elementi u 4 tkiva tokom osam, odnosno deset meseci 2011/2012 godine. Ovi rezultati su grupisani u četiri sezone, pa možemo govoriti o promeni u akumulaciji elemenata u različitim tkivima između sezona.

Na Peštanu se Hg izdvojila kao element koji je pokazao veći stepen akumulacije tokom jeseni, naročito u mišiću, gde uzrok ne mora biti usko vezan za temperaturu vode već za antropogeni ili drugi izvor povišenih koncentracija žive u datom periodu. Sa obzirom na to da merenja Hg u vodi tokom 2011. godine nisu pokazala promene u vrednostima, povišene vrednosti se ne mogu pripisati kontaminaciji. Takođe je tokom jeseni u mišiću Zn dao niže vrednosti. Zanimljivo je da su Hg i Zn pokazali sezonsku razliku kod svih tkiva. Jetra je u odnosu na ostala tkiva pokazala izraženiju varijaciju u akumulaciji metala (Cr, Mn, Sr, Hg i Zn) u odnosu na sezonu uzorkovanja.

Na Beljanici se jesen izdvojila po većim vrednostima za Hg u mišiću, i B u škragama i jetri, dok se leto razlikuje od ostalih po višim vrednostima za Mo u škragama, i Hg u jetri. Tokom zime je zapažena veća akumulacija Cr u mišiću u odnosu na ostale sezone. Škrge su u odnosu na ostala tkiva pokazale izraženiju varijaciju u akumulaciji metala (Ba, Cu, Mo, Sr, Zn) u odnosu na sezonu uzorkovanja.

Na obe reke škrge su takođe akumulirale veće koncentracije elemenata u odnosu na druga tkiva, dok je mišić za većinu elemenata imao najniže vrednosti. Pored ovoga, Cu i Fe su se koncentrisali u jetri, dok se Zn primarno akumulirao u gonadama. Takođe je pokazana veća, ali ne uvek značajna akumulacija elemenata tokom leta.

Kanonijska diskriminantna analiza (CDA) je, u odnosu na ukupni sadržaj elemenata u tkivima, pokazala odvajanje škrge u odnosu na druga tkiva na Peštanu i Beljanici.

Duman & Kar (2012) su pokazali povećanu akumulaciju Pb, Ni i Cd u jetri klena tokom leta, dok su Cr, Mn i Zn bili najviši tokom zime. Isti autori su takođe pokazali povećanu akumulaciju Pb u škragama klena tokom leta, kao i povećanu koncentraciju Cr, Mn i Cu u škragama klena tokom zime. Omar & Ahmed (2013) su pokazali veću akumulaciju Fe, Cu, Pb, Zn, Cr i Mn u mišićima afričkog soma tokom toplijih meseci. Povećana akumulacija metala u tkivima riba tokom toplijih sezona, verovatno je rezultat povećane stope metabolizma. Pokazano je da veće temperature pospešuju akumulaciju Cd, pogotovu u najopterećenijim tkivima, kao što su jetra i bubrezi (Jezierska & Witeska, 2006). Pojava veće akumulacije metala u tkivima tokom toplijih meseci uočili su i Salem i saradnici (2014a) u tkivima *Rutilus rutilus*.

5.3. Tkivno-specifično oštećenje DNK molekula i akumulacija elemenata

Prema našim rezultatima krv je pokazala najmanje oštećenje u odnosu na jetru i škrge na svim ispitivanim lokalitetima. Ovo može biti posledica regularnih ciklusa promene krvnih ćelija u krvotoku, za koju je potrebno oko 100 dana (Devaux et al., 1998, Buschini et al., 2004, Russo et al., 2004), iz čega proizilazi da se krv može bolje koristiti kao biomarker za akutne kontaminacije rečnih tokova. Jetra i škrge su pokazale izraženiju varijaciju u oštećenju između meseci uzorkovanja u odnosu na krv.

Analiza akumulacije metala i metaloida u različitim tkivima klena pokazala je visok stepen njihove diferencijacije, kao i značajne razlike u distribuciji elemenata u tkivima između ispitivanih lokaliteta. Gledajući generalno sve lokalitete, najveće koncentracije većine analiziranih metala i metaloida su nađene u škragama, jetri i gonadama, a najmanje u mišićima.

Zajedničko za sve lokalitete jeste da se Cu akumulira u jetri u najvišim koncentracijama, što je u skladu sa literaturom (Lenhardt et al., 2012, Rajkowska & Protasowicki, 2013, Ahmed et al., 2014). Kako je Cu esencijalan za mnoge enzimske procese koji se odvijaju u jetri, kao sastavni deo enzima, akumulacija bakra se može tumačiti kao fiziološka potreba organizma. Kako navode Pyle i saradnici (2005), koncentracije Cu u jetri se obično regulišu homeostatskim mehanizmima i održavaju na nivou ispod 50 µg/gdw što se u našem slučaju i pokazalo. Jedino su vrednosti za jedinke iz jula i avgusta sa Beljanice bile bliske ovoj sa 48,15 µg/gdw i 54,03 µg/gdw, dok su se ostale vrednosti kretale uglavnom od 10 - 20 µg/gdw.

Može se primetiti veća akumulacija Fe u jetri i škragama na svim lokalitetima. Kako se Fe akumulira u jetri u obliku feritina i hemosiderina, najviše koncentracije u ovom organu se takođe mogu tumačiti kao fiziološki odgovor (Ahmed et al., 2014).

U škragama se vidi obrazac akumulacije u najvišim koncentracijama Ba, Mn i Sr na svim lokalitetima. Pojava da se ovi metali koncentruju u škragama više nego u drugim organima je pokazana kod vrsta *Hypophthalmichthys molitrix*, *Abramis brama*, *Cyprinus carpio*, *Silurus glanis*, *Sander lucioperca*, *Silurus glanis*, *Lota lota* (Lenhardt et al., 2012, Subotić et al., 2013).

U gonadama su na svim lokalitetima akumulirane značajne koncentracije Zn, što bi takođe bilo vezano za njihovu ulogu u razvoju gonada (Olsson et al., 1990, Zubcov et

al., 2012). Veće koncentracije ovog elementa u gonadama su veoma česte (Papagiannis et al., 2004, Zubcov et al., 2012, Sunjog et al., 2012), posebno pred sezonu mresta (Olsson et al., 1990, Zubcov et al., 2012).

Iako su najmanje koncentracije skoro svih ispitivanih elemenata nađene u mišićima na svim lokalitetima, pojedini elementi (As, Zn, Cu) su bili od 4 do 15 puta viših koncentracija od onih koje su Harkabusová i saradnici (2012) ustanovili u mišićima klena na više lokaliteta u Češkoj.

Pojava tkivne specifičnosti posebno važi za esencijalne metale kao što su Fe, Zn, Cu, Mn i Co, što se i pokazalo u našim rezultatima za Fe, Cu i Zn. Iako su koncentracije ovih metala niske u okruženju, Cu pokazuje specifičan afinitet za jetru, dok se Zn koncentruje primarno u gonadama, jer u ovim organima oba metala pokazuju svoje specifične metaboličke uloge. Međutim, u uslovima kontaminacije okruženja metalima, metali ne pokazuju specifičnu tendenciju ka određenim organima (Jezierska & Witeska, 2006).

Da bi se koncentracije metala koje su nađene u klenu tokom ovih istraživanja mogle uporediti sa propisanim MDK, sve vrednosti koncentracija po jedinici suve težine (dw) su preračunate u koncentracije po jedinici sveže težine (ww). U skoro svim analiziranim uzorcima klena, koncentracije Pb, Cd, Hg i As (u mišićnom tkivu) su bile ispod propisanih MDK vrednosti. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da se meso klena može bezbedno upotrebljavati u ljudskoj ishrani. Ni u regulativi Evropske Unije (EU) niti u zakonodavstvu Republike Srbije nisu uspostavljene MDK za većinu drugih elemenata.

5.4. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula, fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara

Kako se komunalne otpadne vode u Srbiji ne prečišćavaju pre ispuštanja, sa njima u vodu pored mikroorganizma dospevaju i razne smeše ksenobiotika. Ovaj tip zagađenja se direktno može pratiti preko promena vrednosti fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara. Kako se oštećenje na molekulu DNK u tkivima riba prvenstveno vezuje za emisiju otpadnih voda, komet testom se može proceniti uticaj ovih i drugih zagađivača na iste.

Korelacije između nivoa oštećenja DNK, fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara rađene su samo za lokalitete Peštan i Beljanica, jer su samo na pomenutim lokalitetima uzorkovanja rađena tokom više meseci. Korelacijom fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara sa vrednostima oštećenja, nije primećena značajna korelacija između većine parametara. Na Peštanu je utvrđena značajana pozitivna korelacija između NO_3 u vodi sa stepenom oštećenja DNK molekula u krvi i za TI ($r = 0,76$) i za OTM ($r = 0,81$), dok korelacija između oštećenja DNK i mikrobioloških parametara nije pokazana. Na Beljanici nije uočena značajna korelacija između fizičko-hemijskih parametara i vrednosti TI i OTM, kao ni korelacija između oštećenja DNK i mikrobioloških parametara.

Na osnovu naših rezultata ne može se zaključiti da prisustvo određenih mikrobioloških parametara zagađenja na rekama direktno ukazuje i na prisustvo genotoksičnog zagađenja. Međutim, povećane vrednosti ovih parametara tokom svih sezona uzorkovanja svakako ukazuju na pritisak otpadnih voda na rekama Peštan i Beljanica, u poređenju sa Uvcem i Garašima, na kojima su ove vrednosti neuporedivo manje.

5.5. Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida u tkivima

Korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i koncentracije metala i metaloida rađena je za jetru i škrge klena sa ispitivanih lokaliteta. Pored ovog, rađena je i korelacija metala i metaloida unutar svakog tkiva: jetra, škrge, mišić i gonade. Naši rezultati su pokazali značajnu korelaciju između koncentracije pojedinih metala i metaloida i oštećenja DNK molekula u jetri i škragama.

Na Uvcu je uočena značajna negativna korelacija između OTM i Cr u jetri. Na Garašima je ustanovljena značajna pozitivna korelacija između TI i Mn, Mo i Sr u jetri, kao i između OTM i Hg, takođe u jetri. Na Peštanu je uočena značajna negativna korelacija između TI i OTM sa Cu u škragama. Na Beljanici su sve korelacije bile negativne, gde je pokazana statistički značajna korelacija između OTM i Hg u jetri, dok su u škragama oba parametara genotoksičnosti značajno korelisali sa Ba, Mn, Ni i Pb, dok je TI korelisao samo sa Al.

Pojava da određeni metali, kao što su Cd i Cr u eritrocitima, jetri i bubrezima riba imaju genotoksični potencijal pokazana je u pojedinim studijama, ali isključivo u studijama tretmana pod kontrolisanim uslovima (Lemos et al., 2001, Chandra & Khuda-Bukhsh 2004, Velma & Tchounwou, 2010, Salem et al., 2014, Mahrous et al., 2015), koji se umnogome razlikuju od procena u *in situ* studijama. Prema radovima Matsumoto i saradnika (2003, 2005) komet test je dovoljno senzitivna da bi se koristio za monitoring vodenih ekosistema kontaminiranih sa Cr; autori ove studije su koristili komet test za detekciju genotoksičnog efekta Cr koncentracija $0,01\text{mgL}^{-1}$ kod vrste *Oreochromis niloticus*, koja je inače mnogo manja od trenutne granice od $0,05\text{mgL}^{-1}$, koja je trenutna dozvoljena koncentracija za Cr.

Korelacija između nivoa oštećenja DNK i rasta koncentracije Hg u jetri je pokazana u brojnim biomonitoring studijama, gde je čak uočena i pojava hepatokancera, kod radnika izloženih Hg (Boffeta et al., 1998, Zadnik & Pompe-Kirn 2007, Garcia Gomez et al., 2007, Crespo-López et al., 2009). Iako je u dosadašnjim istraživanjima prvenstveno ispitivana i uočena pozitivna korelacija između određenih metala i pojave oštećenja genetičkog materijala, takođe se može napraviti veza između smanjenja koncentracije nekih elementa i pojave oštećenja DNK molekula. Studije praćenja nivoa genotoksičnosti i deficijencije Cu u sisarskim modelima, pokazala su da deficijencija Cu, može dovesti do povećanja oštećenja DNK molekula. Smatra se da odsustvo Cu dovodi do povećanog oksidativnog stresa, koji je jedan od glavnih mehanizama u genotoksičnosti i kancerogenosti metala (Idde et al., 1994, Picco et al., 2004). Negativna korelacija između Cr i oštećenja DNK se mogla dobiti usled povećanja nivoa metalotioneina, i potencijalnog vezivanja Cr, gde bi ova klasa detoksifikujućih proteina inhibirala njegov negativan uticaj. Velma & Tchounwou (2010) su pokazali povećanje proteina metalotioneina u jetri i bubrezima kod vrste *Carassius auratus* usled odgovora na stres tretmanom CdCl_2 .

Jedno od mogućih objašnjenja malog broja pozitivnih korelacija može biti dejstvo drugih polutanata u vodi i sedimentu, koji su sinergistički ili nezavisno od dejstva metala, takođe dovodili do oštećenja na DNK molekulu. Drugi uzrok može biti dejstvo drugih faktora koji nisu vezani za zagađenje, kao što su sezonske varijacije, nivo ishrane, reproduktivni i razvojni status i gustina populacije, koji takođe mogu uticati na akumulaciju metala kao i na nivo oštećenja DNK (Jarić, 2010, Van der Oost et al.

2003, Lenhardt et al. 2009, Shivakumar et al., 2014). Imajući u vidu naveden kompleksan uticaj mnogih faktora, odsustvo jasne pozitivne korelacije između pojedinih metala i oštećenja DNK u prirodnim uslovima nije neočekivan.

Koncentracije ispitivanih elemenata unutar istog tkiva su bile međusobno snažno i uglavnom pozitivno korelisane na svim lokalitetima. Na Peštanu i Beljanici su pozitivne korelacije između različitih elemenata bile najbrojnije u gonadama, gde je većina elemenata međusobno pozitivno korelisala. U proseku na obe reke, najjače i najbrojnije korelacije sa drugim elementima u gonadama i jetri imale su koncentracije Zn, gde je korelacija Zn sa Cu pokazana u škragama, gonadama i jetri. Korelacija između Zn i Cu je takođe pokazana u škragama i jetri klana izlovljenog u turskoj regiji (Yilmaz et al., 2007). Pojava da neki elementi korelišu, dok drugi ne, zavisi od izvora tih elemenata, odnosno od pojave da se određeni elementi prirodno grupišu u određenim geološkim podlogama (Yilmaz et al., 2007). Takođe, kao što je već i pokazano određeni elementi se tkivno specifično akumuliraju, što se oslikava na pojavu korelacije pojedinih metala samo u određenim tkivima.

5.6. Poređenje lokaliteta na osnovu genotoksičnosti i akumulaciji metala i metaloida u tkivima klana

Za poređenje svih ispitivanih lokaliteta na osnovu genotoksičnosti vode rađena je PCA analiza na osnovu oštećenja DNK u ćelijama krvi, jetre i škraga klana. Takođe je ista analiza urađena za poređenje lokaliteta na osnovu akumulacije metala i metaloida u mišiću, jetri, škragama i gonadama klana. PCA analiza genotoksičnosti vode je jasno pokazala da su se jedinke klana sa Peštana i Beljanice grupisale oko viših vrednosti za sve ispitivane parametre (TI i OTM) i tkiva. PCA analiza koncentracije elemenata u tkivima je pokazala grupisanje jedinki sa Uvca oko viših vrednosti za većinu elemenata, posebno u mišiću i jetri. Dodatno Hg se u mišiću grupisao oko viših vrednosti na Peštanu i Garašima u odnosu na Uvac. Takođe su se Cu i Mn grupisali oko viših vrednosti u gonadama na Garašima u odnosu na Peštan i Uvac. Hg i Sr u jetri su se grupisali oko viših vrednosti na Peštanu i Garašima u odnosu na Uvac.

Kao što je rečeno iako Uvac ima najmanje vrednosti oštećenja DNK molekula u tkivima, povećane vrednosti pojedinih elemenata, ne moraju neminovno dovesti i do

pojave oštećenja DNK. Uticaj na intenzitet genotoksičnosti vode, pored metala, imaju i različite smeše organskog i drugog zagađenja u vodi i sedimentu. Pesticidi se smatraju za potencijalne hemijske mutagene. Na Peštanu je u prethodnim istraživanjima (Sunjog et al., 2016) identifikovano prisustvo značajnijih koncentracija metoksihlora i oktilfenola u sedimentu.

Metoksihlor, insekticid, korišćen umesto DDT-a u životinjskoj hrani i usevima, je široko raspostranjen u površinskim i podzemnim vodama (Gupta & Ali, 2008). Svetska zdravstvena organizacija dozvoljava maksimum od 20 µg/L metoksihlora u vodi (WHO, 1996) a u sedimentu Peštana metoksihlor je detektovan u koncentraciji od 91,65 µg/kg. Ovo predstavlja zabrinjavajuću količinu, pogotovu ako se uzme u obzir činjenica da polutanti nisu zarobljeni u sedimentu, već da naprotiv sa promenom hemizma vode, promuljavanjem, dospevaju ponovo u vodu i tako postaju dostupni svim živim organizmima. Američka agencija za zaštitu životne sredine (US EPA, 1995) je upozorila na opasnost metoksihlora kao uzročnika depresije centralnog nervnog sistema, koji može dovesti i do oštećenja jetre, bubrega i srca, kako pri akutnom tako i u hroničnom izlaganju koncentracijama iznad propisano dozvoljenih.

Oktilfenol je čest sredinski polutant koji se ponaša kao agonist receptora za estrogen kod riba. Agonisti estrogena ometaju normalnu reproduktivnu funkciju i reproduktivni rast i razvoj. Izlaganje agensima poput oktilfenola može izazvati dugotrajne posledice posebno tokom osetljivih faza životnog ciklusa što može dovesti do nepravilnog razvoja reproduktivnog sistema i uticati na odnos polova. Kako se oktilfenol razgrađuje veoma sporo u okruženju sa tendencijom da se adsorbuje na sediment i zemljište, rizik od izlaganja ovom polutantu je veći. Ferreira-Leach & Hill (2001) su prijavili biotransformaciju, biokoncentraciju i distribuciju oktilfenola u juvenilnim primercima pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*). Nakon izlaganja riba koncentraciji oktilfenola od 4 µg/L 10 dana pokazana je tkivno specifična biokoncentracija, sa najvišim vrednostima u jetri i masti. Ova studija je pokazala da se alkilfenoli poreklom iz vode brzo akumuliraju u tkivima i da, iako se primarno metabolišu u jetri, velike koncentracije početnog oblika supstance se akumuliraju i u drugim tkivima.

ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa zadatim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima tokom istraživanja može se zaključiti sledeće:

- Akumulacije Uvac i Garaši se na osnovu fizičko-hemijske analize primarnih nutrijenata i mikrobioloških parametara mogu klasifikovati u I klasu vode. Broj aerobnih mezofila ne prelazi dozvoljenu granicu, a indeks O/H ukazuje na zadovoljavajući status samoprečišćavanja ovih vodnih tela.
- Reke Peštan i Beljanica se na osnovu fizičko-hemijske analize mogu klasifikovati u III i IV klasu voda usled povećane koncentracije primarnih nutrijenata.
- Reke Peštan i Beljanica se na osnovu mikrobioloških parametara mogu klasifikovati između I i III klase. IBR metoda dala je jasan uvid u sezonsko variranje fekalnog i organskog zagađenja, koji su u porastu tokom prolećnih meseci.
- Na osnovu rangiranja parametara za procenu DNK oštećenja metodom SRD pokazano je da su TI i OTM pouzdani pokazatelji oštećenja DNK molekula između kojih postoji visoka korelacija.
- Visok kvalitet vode akumulacije Uvac potvrđen je niskim vrednostima primarnih nutrijenata, mikrobioloških parametara i DNK oštećenja na tkivima klena koja su bila niža u poređenju sa DNK oštećenjima na tkivima klena sa ostala tri lokaliteta, Garaši, Peštan i Beljanica.
- Vrednosti DNK oštećenja tkiva jedinki uzorkovanih sa Garaša, Peštana i Beljanice nisu se međusobno značajno razlikovala.
- Peštan i Beljanica pokazuju visoku korelaciju oštećenja DNK tokom godine što je u saglasnosti sa činjenicom da se sliv ovih reka nalazi u okviru Kolubarskog basena lignita sa površinskim kopovima uglja i deponijama pepela. Na ovim lokalitetima, u svim tkivima, uočen je pad DNK oštećenja tokom leta.
- Na svim ispitivanim lokalitetima krv je pokazala najmanje oštećenje DNK molekula u poređenju sa jetrom i škragama. Jetra i škrge su pokazale značajno variranje nivoa oštećenja tokom različitih meseci.

- Na Peštanu je utvrđena značajana pozitivna korelacija (Pearson-ov test korelacije, $r = 0,76$ TI; $r = 0,81$ OTM) između koncentracije NO_3 u vodi sa stepenom oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi.
- Analiza akumulacije metala i metaloida u različitim tkivima klena pokazala je visok stepen njihove diferencijacije, kao i značajne razlike u distribuciji elemenata u tkivima između ispitivanih lokaliteta.
- Najveće koncentracije većine analiziranih metala i metaloida su nađene u škragama, jetri i gonadama, a najmanje u mišićima na svim lokalitetima.
- Na lokalitetu Uvac, Ba, Hg, Mn, Mo i Sr su bili najviši u škragama, dok su B, Cr, Cu, Fe i Mo, bili najviši u jetri.
- Na lokalitetu Garaši, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Sr i Zn su bili najviši u škragama, dok su As, Cu i Mo bili najviši u jetri.
- PCA analiza koncentracije elemenata u tkivima sa Peštana i Beljanice je pokazala grupisanje po višim vrednostima za Hg tokom jeseni. Pored ovoga, pokazano je i grupisanje po višim vrednostima B u jetri i škragama tokom jeseni na Beljanici.
- Na Peštanu je pokazana statistički značajna razlika između sezone jesen u odnosu na druge sezone u akumulaciji nižih vrednosti Zn u mišiću, kao i nižih vrednosti Cr i Mo u škragama. Razlika u variranju koncentracija Hg i Zn tokom sezona pokazana je u svim tkivima. Jetra je u odnosu na ostala tkiva pokazala izraženiju varijaciju u akumulaciji metala (Cr, Mn, Sr, Hg i Zn) u odnosu na sezonu uzorkovanja.
- Na Beljanici je pokazana statistički značajna razlika između sezone leto u odnosu na druge sezone u akumulaciji viših vrednosti Hg u jetri i Mo u škragama, kao i razlika između sezone zima u odnosu na druge sezone u akumulaciji viših vrednosti Cr u mišiću. Škrge su u odnosu na ostala tkiva pokazale izraženiju varijaciju u akumulaciji metala (Ba, Cu, Mo, Sr, Zn) u odnosu na sezonu uzorkovanja.
- Kanonijska diskriminantna analiza (CDA) je, u odnosu na ukupni sadržaj elemenata u tkivima, pokazala odvajanje škrga u odnosu na druga tkiva na Peštanu i Beljanici.

- Koncentracije ispitivanih elemenata unutar istog tkiva su bile uglavnom pozitivno korelisane na svim lokalitetima. Na Peštanu i Beljanici su pozitivne korelacije između različitih elemenata bile najbrojnije u gonadama.
- Na Uvcu je uočena značajna negativna korelacija (Pearson-ov test korelacije) između OTM i Cr ($r = -0,83$) u jetri.
- Na Garašima je ustanovljena značajna pozitivna korelacija (Pearson-ov test korelacije) između TI i Mn ($r = 0,89$), Mo ($r = 0,90$) i Sr ($r = 0,96$) kao i OTM i Hg ($r = 0,90$) u jetri.
- Na Peštanu je uočena značajna negativna korelacija (Pearson-ov test korelacije) između TI i OTM sa Cu ($r = -0,43$ TI, $r = -0,45$ OTM) u škragama. Na Beljanici je uočena značajna negativna korelacija (Spearman-ov test korelacije) između OTM i Hg ($r = -0,34$) u jetri, dok su u škragama TI i OTM značajno korelisali sa Ba ($r = -0,33$ TI, OTM), Mn ($r = -0,28$ TI, $r = -0,31$ OTM), Ni ($r = -0,26$ TI, $r = -0,26$ OTM) i Pb ($r = -0,40$ TI, $r = -0,35$ OTM), dok je samo TI korelisao sa Al ($r = -0,28$).
- PCA analiza oštećenja DNK u tkivima je pokazala grupisanje jedinki klena sa Peštana i Beljanice oko viših vrednosti za sve ispitivane parametre (TI i OTM) i tkiva.
- PCA analiza koncentracije elemenata u tkivima je pokazala grupisanje jedinki klena sa Uvca oko većih vrednosti za većinu elemenata, posebno u mišiću i jetri.
- Povećane vrednosti pojedinih elemenata u tkivima klena sa Uvca nisu dovele do pojave većih oštećenja na DNK molekulu, što ukazuje na mogućnost određene adaptacije ovih jedinki na date količine metala u vodi.
- Pokazano je da pritisak hemijskog zagađenja antropogenog porekla dovodi do značajnog rasta oštećenja DNK molekula u tkivima klena.
- Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da primena komet testa u detekciji DNK oštećenja predstavlja značajan eksperimentalni sistem u ekogenotoksikološkoj proceni kvaliteta površinskih voda.

LITERATURA

7. LITERATURA

- Abd-Allah, G.A., El-Fayoumi, R.I., Smith, M.J., Heckmann, R.A., O'Neill, K.L. (1999) A comparative evaluation of aflatoxin B 1 genotoxicity in fish models using the Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 446(2): 181-188.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profile for Chromium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2012
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Public Health Service. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 1999. Toxicological Profile for Lead.
- Ahmed, Q., Khan, D., Elahi, N. (2014) Concentrations of heavy metals (Fe, Mn, Zn, Cd, Pb, And Cu) in muscles, liver and gills of adult *Sardinella Albella* (Valenciennes, 1847) from gwadar water of Balochistan, Pakistan. *FUUAJST Journal of Biology* 4(2): 195-204.
- Akan, J.C., Mohmoud, S., Yikala, B.S., Ogugbuaja, V.O. (2012) Bioaccumulation of some heavy metals in fish samples from river Benue in Vinikilang, Adamawa State, Nigeria. *American Journal of Analytical Chemistry* 3(11):727.
- Akpoilih, B.U. (2013) Fish Ecogenotoxicology: An Emerging Science, an Emerging Tool for Environmental Monitoring and Risk Assessment. *Environmental & Analytical Toxicology* 3: 165 doi: 10.4172/2161-0525.1000165
- Alink, G.M., Quik, J.T.K., Penders, E.J.M., Spenkeliink, A., Rotteveel, S.G.P., Maas, J.L., Hoogenboezem, W. (2007) Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: a comparison between 1978 and 2005. *Mutation Research* 631: 93-100.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343(2): 121-135.

- American Public Health Association (1998) APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed, American Public Health Association, Washington, D.C.
- Aniagu, S.O., Day, N., Chipman, J.K., Taylor, E.W., Butler, P.J., Winter, M.J. (2006) Does exhaustive exercise result in oxidative stress and associated DNA damage in the chub (*Leuciscus cephalus*)?. Environmental and molecular mutagenesis 47(8): 616-623.
- Azqueta, A., Collins, A.R. (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. Archives of toxicology 87(6): 949-968.
- Balogh, G. T., Tarcsay, Á., Keserű, G. M. (2012) Comparative evaluation of pK a prediction tools on a drug discovery dataset. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 67: 63-70.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K. (2001) Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 488(2): 171-194.
- Begum, A., Amin, M. N., Kaneco, S., Ohta, K. (2005) Selected elemental composition of the muscle tissue of three species of fish, *Tilapia nilotica*, *Cirrhina mrigala* and *Clarius batrachus*, from the fresh water Dhanmondi Lake in Bangladesh. Food chemistry 93(3): 439-443.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 21(6): 1316-1322.
- Bernhoft, R. (2012) Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature,” Journal of Environmental and Public Health Article ID 460508 <http://dx.doi.org/10.1155/2012/460508>
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R. (2001) Accumulation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. Ecotoxicology and Environmental Safety 48(2): 117-127.
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P.S., Hollert, H. and Braunbeck, T. (2010) Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the

- micronucleus test. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 700(1): 11-17.
- Boffetta, P., Garcia-Gómez, M., Pompe-Kirn, V., Zaridze, D., Bellander, T., Bulbulyan, M., Caballero, J.D., Ceccarelli, F., Colin, D., Dizdarevic Español, S. (1998) Cancer occurrence among European mercury miners. Cancer Causes & Control 9(6): 591-599.
- Bruce, W.R., Heddle, J.A. (1979) The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella*, and sperm abnormality assays. Canadian journal of genetics and cytology 21(3): 319-333.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F. (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 627(1): 31-35.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M. Rizzoni, M. (2004) Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 557(2): 119-129.
- Camper, A.K., McFeters, G.A., Characklis, W.G., Jones, W.L. (1991) Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. Applied and Environmental Microbiology 57(8): 2233-2239.
- Canli, M., Atli, G. (2003) The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. Environmental pollution 121(1): 129-136.
- Censi, P.A.O.L.O., Spoto, S.E., Saiano, F.I.L.I.P.P.O., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Di Geronimo, S.I., Punturo, R., Ottonello, D. (2006). Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. Chemosphere 64(7): 1167-1176.
- Chandra, P., Khuda-Bukhsh, A.R. (2004) Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish. Ecotoxicology and environmental safety 58(2): 194-201.

- Chang, M.J.W. (1987) Toxic effects of arsenic compounds on cultured human fibroblasts. *In vitro toxicology* 1(2): 103-110.
- Chapman, P.M., Wang, F. (2000) Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human and Ecological Risk Assessment* 6(6): 965-988.
- Chaudhary, R., Pandey, S., Kushwaha, B., Gaur, K.K., Nagpure, N.S. (2006) Fish micronucleus assay: a sensitive tool for ecogenotoxicity studies. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health* 6(3): 143-147.
- Ćirić, A. (1977) Tumač za list Prijepolje K 34-16 (OGK SFRJ 1:100 000). Savezni Geološki zavod, Beograd.
- Ćirić, A., Obradinović, Z., Novković, D., Popević, A., Karajičić, Lj. Jović, B., Serdar, B. (1977) Osnovna geološka karta SFRJ – list Prijepolje (1:100 000). Savezni Geološki zavod, Beograd.
- Clarkson, T.W., Magos, L., Myers, G.J. (2003) The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *New England Journal of Medicine* 349: 1731–1737.
- Çok, I., Ulutaş, O.K., Okuşluk, O., Durmaz, E., Demir N. (2011) Evaluation of DNA damage in common Carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). *The Scientific World Journal* 11: 1455-1461.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3): 249-261.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., Dobson, V. L. (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14(9): 1733-1735.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C. Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143-151.
- Cotelle, S., Ferard, J.F. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and molecular mutagenesis* 34(4): 246-255.
- Crespo-López, M.E., Macêdo, G.L., Pereira, S.I., Arrifano, G.P., Picanço-Diniz, D.L., do Nascimento, J.L.M., Herculano, A.M. (2009) Mercury and human genotoxicity:

- critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research* 60(4): 212-220.
- Dalman, Ö., Demirak, A., Balci, A. (2006) Determination of heavy metals (Cd, Pb) and trace elements (Cu, Zn) in sediments and fish of the Southeastern Aegean Sea (Turkey) by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 95(1): 157-162.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., Salbert, V. (2007) Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66(3): 574-583.
- De Andrade, V.M., Da Silva, J., Da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M. L., De Freitas, T.R. (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis* 44(5): 459-468.
- De Flora, S., Vigano, L., D'agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C.F. Melodia, Arillo, A. (1993) Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 319(3): 167-177.
- de Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S.A., Borràs, M., Martins, M.G., Costa, P.M., Pacheco, M. (2015) The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in genetics*, 6: doi: 10.3389/fgene.2015.00180
- de Lemos, C.T., Rödel, P.M., Terra, N.R., Erdtmann, B. (2001) Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6): 1320-1324.
- Degraeve, N. (1981) Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 86(1): 115-135.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J., Monod, G. (1998) Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research* 46(1): 257-262.
- Djakovic-Sekulic, T., Mandic, A., Trisovic, N., Uscumlic, G. (2012) Structure-Retention Relationship Study of HPLC Data of Antiepileptic Hydantoin Analogues. *Current computer-aided drug design*, 8(1): 3-9.

- Dong J.T., Luo X.M. (1994) Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblasts. *Mutation Research* 315: 11–15.
- Duman, F., Kar, M. (2012) Temporal variation of metals in water, sediment and tissues of the European chup (*Squalius cephalus* L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(2): 428-433.
- Dural, M., Göksu, M.L., Özak, A.A., Derici, B. (2006) Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 and *Mugil cephalus* L, 1758 from the Camlik lagoon of the eastern coast of mediterranean (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 118(1-3): 65-74.
- Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J., Allen, M.J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for publichealth protection. *Journal of Applied Microbiology* 88: 106-116.
- EPA, 1995. National primary drinking water regulations, EPA 811-F-95-003v-T. Environmental Protection Agency, United States
- Erdoğan, Ö., Erbilir, F. (2007) Heavy metal and trace elements in various fish samples from Sır Dam Lake, Kahramanmaraş, Turkey. *Environmental monitoring and assessment* 130(1-3): 373-379.
- Felten, T.L. (1978) Preliminary-report of cadmium-induced chromosomal changes in somatic and germinal tissues of c57b1-6j male mice. In *Genetics*, Vol. 88(4): 26
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Cabral, D., Salgado, M. A. (2008) Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz–Paramos lagoon, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment* 136(1-3): 267-275.
- Ferreira-Leach, A.M.R., Hill, E.M. (2001) Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine environmental research* 51(1): 75-89.
- Filipović, I., Marković, B., Pavlović, Z., Rodin, V. Marković, O. (1971b) Tumač za list Gornji Milanovac L 34-137 (OGK SFRJ 1:100 000). Savezni Geološki zavod, Beograd.
- Filipović, I., Pavlović, Z., Marković, B., Rodin, V., Marković, O., Gagić, N., Antin, B., Milićević, M. (1971a) Osnovna geološka karta SFRJ – list Gornji Milanovac (1:100 000). Savezni Geološki zavod, Beograd.

- Filipović, I., Rodin, V. (1976) Tumač za list Obrenovac L 34-125 (OGK SFRJ 1:100 000). Savezni Geološki zavod, Beograd.
- Filipović, I., Rodin, V., Pavlović, Z., Marković, B., Milićević, M., Antin, B. (1976) Osnovna geološka karta SFRJ – list Obrenovac (1:100 000). Savezni Geološki zavod, Beograd.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681: 80-92.
- Gačić, Z., Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2014) The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environmental Pollution* 191: 145-150.
- García Gómez, M., Boffetta, P., Caballero Klink, J. D., Español, S., Gómez Quintana, J., Colin, D. (2007) Cancer mortality in mercury miners. *Gaceta Sanitaria* 21(3): 210-217. *Critical reviews in toxicology* 34: 301–333.
- Garcia-Rodriguez, M. C., López-Santiago, V., Altamirano-Lozano, M. (2001) Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 496(1): 145-151.
- Geldreich, E. E., Kenner, B.A. (1969) Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *Water Pollution Control Federation* 41: 336-352.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., Dezfuli, B.S. (2008) Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicology and environmental safety* 70: 400-410.
- Goyer, R.A. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD, editor. *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill Publisher; 2001. pp. 811–867.
- Gupta, V.K., Ali, I. (2008) Removal of endosulfan and methoxychlor from water on carbon slurry. *Environmental science & technology* 42(3): 766-770.
- Gustavino, B., Buschini, A., Monfrinotti, M., Rizzoni, M., Tancioni, L., Poli, P., Rossi, C. (2005) Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 587(1): 103-113.

- Harkabusová, V., Čelechovská, O., Lavičková, A., Svobodová, Z. (2012) Monitoring of risk metals in chub (*Leuciscus cephalus* L.) from the Svitava and Svratka rivers in the urban area of Brno, Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* 81(1): 69-73.
- Hartmann, A., Speit, G. (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cells gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.* 23: 299–305.
- Hauser, L., Hemingway, K.L., Wedderburn, J., Lawrence, A.J. (2003) Molecular/cellular processes and the population genetics of a species. *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses* pp 256-288.
- Héberger, K. (2010) Sum of ranking differences compares methods or models fairly. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(1): 101-109.
- Héberger, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Sunjog, K., Gačić, Z., Kljajić, Z., Mitrić, M., Vuković-Gačić, B. (2014) Evaluation of single-cell gel electrophoresis data: Combination of variance analysis with sum of ranking differences. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 771: 15-22.
- Héberger, K., Kollár-Hunek, K. (2011) Sum of ranking differences for method discrimination and its validation: comparison of ranks with random numbers. *Journal of Chemometrics* 25(4): 151-158.
- Hermes-Lima, M., Pereira, B., Bechara, E.J. (1991) Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 8: 1085–1090.
- IARC. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 49. Lyon, France: IARC Scientific Publications, IARC; 1990. Chromium, nickel and welding.
- IARC. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7. Volumes 1–42. Lyons, France: IARC; 1987. Overall Evaluation of Carcinogenicity: An updating of Monographs; pp. 230–232.
- Ide, H., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., Rao, M.S. (1994) Increased expression of sulfated glycoprotein-2 and DNA fragmentation in the pancreas of copper-deficient rats. *Toxicology and applied pharmacology* 126(1): 174-177.

- Ikem, A., Egiebor, N.O., Nyavor, K. (2003) Trace elements in water, fish and sediment from Tuskegee Lake, Southeastern USA. *Water, Air, and Soil Pollution* 149(1-4):51-75.
- Iqbal, F., Qureshi, I.Z., Ali, M. (2005) Histopathological changes in the liver of a farmed cyprinid fish, *Cyprinus carpio*, following exposure to nitrate. *Pakistan Journal of Zoology* 37 (4): 297–300.
- Izveštaj na kraju druge istraživačke godine u okviru projekta: Ekološka i ribarstvena istraživanja voda na području Specijalnog rezervata prirode „Uvac“, 2008.
- Izveštaj o ihtiološkim ispitivanjima na akumulaciji “Garaši” u okviru projekta: Unapredjenje prečišćavanja vode za piće i zaštita akumulacija u Republici Srbiji, 2006.
- Jaćimović, M., Lenhardt, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Jarić, I., Gačić, Z., Hegediš, A., & Krpo-Četković, J. (2015) Elemental concentrations in different tissues of European perch and Black bullhead From Sava Lake (Serbia). *Slovenian Veterinary Research*: 52(2): 57-65.
- Jarić, I. (2010) Histopatološke promene i akumulacija teških metala u populacijama kečige (*Acipenser ruthenus* L.) U Dunavu. Doktorska disertacija. Beograd
- Jarić, I., Višnjić-Jeftić, Ž., Cvijanović, G., Gačić, Z., Jovanović, L., Skorić, S., Lenhardt, M. (2011) Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal* 98(1): 77-81.
- Jezierska, B., Witeska, M. (2006) The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation* (pp. 107-114). Springer Netherlands.
- Jovičić, K., Nikolić, D. M., Višnjić-Jeftić, Ž., Đikanović, V., Skorić, S., Stefanović, S. M., Lenhardt, M., Hegediš, A., Krpo-Četković, J., Jarić, I. (2015). Mapping differential elemental accumulation in fish tissues: assessment of metal and trace element concentrations in wels catfish (*Silurus glanis*) from the Danube River by ICP-MS. *Environmental Science and Pollution Research* 22(5): 3820-3827.
- Kalay, M., Ay, Ö., Canli, M. (1999) Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63(5): 673-681.

- Kapetanović, D., Vardić, I., Valić, D., Teskeredžić, Z., Teskeredžić, E. (2010) Environmental impacts of tuna aquaculture in the Adriatic Sea. *Krmiva* 52(4): 201-209.
- Karadede, H., & Ünlü, E. (2000) Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Chemosphere* 41(9): 1371-1376.
- Kato, K., Hayashi, H., Hasegawa, A., Yamanaka, K., Okada, S. (1994) DNA damage induced in cultured human alveolar (L-132) cells by exposure to dimethyl arsinic acid. *Environmental Health Perspect.* 102: 285–288.
- Kavka, G., Poetsch, E. (2002) Joint Danube Survey: Microbiology. Technical Report of the Int. Commission for the Protection of the Danube River 138-155.
- Kay, D., Bartram, J., Pruss, A., Ashbolt, N., Wyer, M.D., Fleisher, J.M., Fewtrell, L., Rogers, A., Rees, G. (2004) Derivation of numerical values for the World Health Organization guidelines for recreational waters. *Water Research* 38: 1296-1304.
- Kirkland, D., Kasper, P., Müller, L., Corvi, R., Speit, G. (2008) Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 653(1): 99-108.
- Klerks, P.L., Weis, J.S. (1987) Genetic Adaptation to Heavy Metals in Aquatic Organisms: A Review. *Environmental Pollution* 45: 173-205.
- Kohl, W. (1975) Ueber die Bedeutung bakteriologischer Untersuchungen fuer die Beurteilung von Fleisgewässern, Dargestellt am Beispiel der Osterreich, Donau. *Arch. Hydrobiol.* 44 IV, 392-46.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Kračun, M., Vasiljević, B., Tomović, J., Vuković-Gačić, B., Gačić, Z. (2013). Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere* 93(2): 243-251.
- Krča, S., Žaja, R., Čalić, V., Terzić, S., Grubešić, M. S., Ahel, M., Smital, T. (2007) Hepatic biomarker responses to organic contaminants in feral chub (*Leuciscus cephalus*)—laboratory characterization and field study in the Sava River, Croatia. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(12): 2620-2633.

- Kumaravel, T.S., Jha, A.N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 605(1): 7-16.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux S.P., Jha, A.N. (2009) Cell biology and toxicology 25(1): 53–64.
- Larno, V., Laroche, J., Launey, S., Flammarion, P., Devaux, A. (2001) Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction. *Ecotoxicology* 10(3): 145-158.
- LeChevallier, M.W., Welch, N.J., Smith, D.B. (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7): 2201-2211.
- Lee, R.F., Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544(1): 43-64.
- Lee, R.F., Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544(1): 43-64.
- Lenhardt, M., Jarić, I., Višnjić-Jeftić, Ž., Skorić, S., Gačić, Z., Pucar, M., Hegediš, A. (2012) Concentrations of 17 elements in muscle, gills, liver and gonads of five economically important fish species from the Danube River. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 407, 02. <http://dx.doi.org/10.1051/kmae/2012028>
- Lenhardt, M., Poleksić V., Vuković-Gačić, B., Rašković, B., Sunjog K., Kolarević, S., Jarić I., Gačić Z. (2015) Integrated use of different fish related parameters to assess the status of water bodies. *Slovenian Veterinary Research* 52 (1): 5-13.
- Li, Y., Chen, D.H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R.A., Zhang, Y., Biris, A.S., Heflich, R.H. and Chen, T. (2012) Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 745(1): 4-10.

- MacFarlane, G. R., Burchett, M. D. (2000) Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Aquatic botany 68(1): 45-59.
- Mahrous, K.F., Hassan, A.M., Radwan, H.A., Mahmoud, M.A. (2015) Inhibition of cadmium-induced genotoxicity and histopathological changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. Ecotoxicology and environmental safety 119: 140-147.
- Majer, B.J., Tscherko, D., Paschke, A., Wennrich, R., Kundi, M., Kandeler, E., Knasmüller, S. (2002) Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 515(1): 111-124.
- Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A. (2006) Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genetics and Molecular Biology 29(1): 148-158.
- Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Mallaguti, M.I., Marin-Morales, M.A. (2003) Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. Cytologia, 68(4): 395-401.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J. (2011) Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. Analytical and bioanalytical chemistry 399(6): 2235-2242.
- Morsy, M., Protasowicki, M. (1990) Cadmium bioaccumulation and its effects on some hematological and histological aspects in carp, *Cyprinus carpio* L., at selected temperature. Acta Ichthyologica et Piscatoria 20: 105-116.
- Obiakor, M.O., Okonkwo, J.C., Nnabude, P.C., Ezeonyejiaku, C.D. (2012) Ecogenotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. Journal of Animal Science Advances 2(1): 123-133.

- Official Journal of the European Communities. Commission Regulation (EC) No466/2001, of 8 March 2001. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004) Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567(2): 109-149.
- Oliveira Ribeiro, C.A, Filipak Neto, F., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Rabitto, I.S., Alves Costa, J.R.M., Pelletier, E. (2006) Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental research* 101: 74-80.
- Olsson, P.E., Zafarullah, M., Foster, R., Hamor, T., Gedamu, L. (1990) Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *European Journal of Biochemistry* 193(1): 229-235.
- Omar, H.E.D.M. Ahmed, T.A.I. (2013) Seasonal variation of heavy metals accumulation in muscles of the African Catfish *Clarias gariepinus* and in River Nile water and sediments at Assiut Governorate, Egypt. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(2): 236-248.
- Osman, A.G., Abuel-Fadl, K.Y., Kloas, W. (2012) In Situ Evaluation of the Genotoxic Potential of the River Nile: II. Detection of DNA Strand-Breakage and Apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Mutation Research* 747: 14-21.
- Ostling, O., Johanson, K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123(1): 291-298.
- Özmen, H., Külahcı, F., Çukurovalı, A., Doğru, M. (2004) Concentrations of heavy metal and radioactivity in surface water and sediment of Hazar Lake (Elazığ, Turkey). *Chemosphere* 55(3): 401-408.
- Öztürk, M., Özözen, G., Minareci, O., Minareci, E. (2009) Determination of heavy metals in fish, water and sediments of Avsar Dam Lake in Turkey. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 6(2): 73-80.
- Pandey, A.K., Bajpayee, M., Parmar, D., Rastogi, S.K., Mathur, N., Seth, P.K., Dhawan, A. (2006) DNA damage in lymphocytes of Indian rickshaw pullers as

- measured by the alkaline Comet assay. Environmental and molecular mutagenesis 47(1): 25-30.
- Pandey, A.K., Nagpure, N.S., Trivedi, S.P., Kumar, R., Kushwaha, B. (2011) Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 726(2): 209-214.
- Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M. (1995) Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. Environmental and molecular mutagenesis 26(4): 345-356.
- Patlolla, A. K., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V. R., Tchounwou, P. B. (2009) Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. Environmental toxicology 24(1): 66-73.
- Patlolla, A. K., Tchounwou, P. B. (2006). The effects of potassium dichromate induced oxidative stress on the antioxidant defense system in Sprague-Dawley rat liver and kidney. Cancer Research 66: 664-665.
- Pavlica, M., Štambuk, A., Malović, L., Mladinić, M., Klobučar, G.I. (2011) DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius cephalus* L.) as an indicator of pollution-related genotoxicity in the River Sava. Environmental monitoring and assessment, 177(1-4): 85-94.
- Pedlar, R.M., Ptashynski, M.D., Evans, R., Klaverkamp, J.F. (2002) Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Aquatic Toxicology 57: 167-189.
- Picco, S.J., Abba, M.C., Mattioli, G.A., Fazzio, L.E., Rosa, D., De Luca, J.C., Dulout, F.N. (2004) Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. Mutagenesis 19(6): 453-456.
- Podrug, M., Raspor, B. (2009) Seasonal variation of the metal (Zn, Fe, Mn) and metallothionein concentrations in the liver cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). Environmental monitoring and assessment 157(1-4): 1-10.
- Poté, J., Haller, L., Loizeau, J. L., Bravo, A. G., Sastre, V., Wildi, W (2008) Effects of a sewage treatment plant outlet pipe extension on the distribution of contaminants in

- the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Bioresource Technology* 99(15): 7122-7131.
- Praveena, S. M., Ahmed, A., Radojevic, M., Abdullah, M. H., Aris, A. Z. (2008) Heavy metals in mangrove surface sediment of Mengkabong Lagoon, Sabah: multivariate and geo-accumulation index approaches. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2(2): 139-148.
- Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće (Službeni glasnik RS br. 42/98 i 44/99).
- Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama (Službeni glasnik RS br. 28/2011).
- Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti vode za piće (Službeni glasnik SFRJ br. 33/87)
- Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (Službeni glasnik RS br. 74/2011)
- Pruski, A.M., Dixon, D.R. (2002) Effects of Cadmium on Nuclear Integrity and DNA Repair Efficiency in the Gill Cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology* 57: 127-137.
- Pyle G.G., Rajotte J.W. & Couture P. (2005) Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61: 287-312.
- Rabitto, I.S., Alves Costa, J.R.M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, É., Akaishi, F.M., Anjos, A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A. (2005) Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and environmental safety* 60: 147-156.
- Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M., Kalaiselvi, K. (2003) Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41(2): 85-91.
- Rajkowska, M., Protasowicki, M. (2013) Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophic level in Northwestern Poland. *Environmental monitoring and assessment* 185(4): 3493-3502.
- Rashed, M.N. (2001) Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International* 27(1): 27-33.

- Reebs, S. G. (2009) Oxygen and fish behaviour. Universite de Moncton. Canada.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2004) The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(2): 208-215.
- Rocco, L., Peluso, C., Stingo, V. (2012) Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *Environmental toxicology* 27(10): 598-604.
- Rocha, M.J., Rocha, E., Cruzeiro, C., Ferreira, P.C., Reis, P.A. (2011) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Porto region (Portugal) by microwave-assisted extraction, followed by SPME and GC-MS. *Journal of chromatographic science* 49(9): 695-701.
- Rosenberger, A., Rössler, U., Hornhardt, S., Sauter, W., Bickeböller, H., Wichmann, H. E., Gomolka, M. (2011) Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA repair* 10(3): 322-337.
- Roy, S., Bhattacharya, S. (2006) Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Chara punctatus*. *Ecotoxicology and environmental safety* 65: 218-229.
- Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V. (2004) Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology and environmental safety* 57(2): 168-174.
- Saber, H.T. (2011) Histological adaptation to thermal changes in gills of common carp fishes *Cyprinus carpio* L. *Rafidain journal of science* 22 (1): 46–55.
- Salem, Z. B., Capelli, N., Laffray, X., Elise, G., Ayadi, H., Aleya, L. (2014a) Seasonal variation of heavy metals in water, sediment and roach tissues in a landfill draining system pond (Etuefont, France). *Ecological Engineering* 69: 25-37.
- Salem, Z.B., Capelli, N., Grisey, E., Baurand, P.E., Ayadi, H., Aleya, L. (2014) First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: the advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicology and environmental safety* 101: 90-96.
- Sarkar, B.A. (2005) Mercury in the environment: Effects on health and reproduction. *Rev Environ Health* 20: 39–56.

- Sharma, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S.K., Singh, P. J., Mathur, P. K. (2007) Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. Archives of environmental contamination and toxicology 53(4): 617-623.
- Shivakumar, C.K., Thippeswamy, B., Tejaswikumar, M.V., Prashanthakumar, S.M. (2014) Bioaccumulation of heavy metals and its effect on organs of edible fishes located in Bhandra River, Karnatka. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture 4(2): 90-98.
- Simonović, P., Karan-Žnidaršič, T., Nikolić, V. (2006) Ichthyofauna of the upper course of Kolubara River and its tributaries. In Proceedings 36th International Conference of IAD. Austrian Committee DanubeResearch/IAD, Vienna (pp. 168-173).
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research 175: 184-191.
- Skorić, S., Višnjić-Jeftić, Z., Jarić, I., Đikanovic, V., Mićković, B., Nikčević, M., Lenhardt, M. (2012) Accumulation of 20 elements in great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and its main prey, common carp (*Cyprinus carpio*) and Prussian carp (*Carassius gibelio*). Ecotoxicology and environmental safety 80: 244-251.
- Speit, G., Hartmann, A. (1999) The comet assay (single-cell gel test). DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems 203-212.
- Squier, M.K., Cohen, J.J. (2001) Standard quantitative assays for apoptosis. Molecular biotechnology 19(3): 305-312.
- Stoliar, O.B., Lushchak, V.I. (2012) Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish, Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN:978-953-51-0553-4
- Subotić, S., Spasić, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Hegediš, A., Krpo-Ćetković, J., Mićković, B., Skorić, S., Lenhardt, M. (2013) Heavy metal and trace element bioaccumulation in target tissues of four edible fish species from the Danube River (Serbia). Ecotoxicology and environmental safety 98: 196-202.
- Sunjog, K., Gačić, Z., Kolarević, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Jarić, I., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. Lenhardt, M. (2012) Heavy metal accumulation and the

- genotoxicity in barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube River pollution. The Scientific World Journal <http://dx.doi.org/10.1100/2012/351074>
- Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2013) Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. Analytical and bioanalytical chemistry 405(14): 4879-4885.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Skorić, S., Gačić, Z., Lenhardt, M., Vasić, N., Vuković-Gačić, B. (2016) Assessment of status of three water bodies in Serbia based on tissue metal and metalloid concentration (ICP-OES) and genotoxicity (comet assay). Environmental Pollution 213: 600-607.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Gačić, Z., Skorić, S., Đikanović, V., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2014) Variability in DNA damage of chub (*Squalius cephalus* L.) blood, gill and liver cells during the annual cycle. Environmental toxicology and pharmacology 37: 967-974.
- Szewzyk, U., Manz, W., Amann, R., Schleifer, K. H., Stenström, T. A. (1994) Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. FEMS microbiology ecology 13(3): 169-175.
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K.T. (2005) Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. Water, Air, and Soil Pollution 166 (1-4): 139-166.
- Tchounwou, P.B., Centeno, J.A., Patlolla, A.K. (2004) Arsenic toxicity, mutagenesis and carcinogenesis - a health risk assessment and management approach. Molecular Cell Biochemistry 255: 47-55.
- Tchounwou, P.B., Ishaque, A., Schneider, J. (2001) Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG₂) exposed to cadmium chloride. Molecular Cell Biochemistry 222: 21-28.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. (2012) Heavy metal toxicity and the environment. In Molecular, Clinical and Environmental Toxicology (pp. 133-164). Springer Basel.

- U.S. EPA. Environmental Criteria and Assessment Office. Cincinnati, OH: United States Environmental Protection Agency; 1992. Integrated Risk Information System (IRIS)
- Uherek, C.B., Pinto Gouveia, F.B. (2014) Biological Monitoring Using Macroinvertebrates as Bioindicators of Water Quality of Maroaga Stream in the Maroaga Cave System, Presidente Figueiredo, Amazon, Brazil. *International Journal of Ecology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308149>
- Ünlü, E., Akba, O., Sevim, S., Gümgüm, B. (1996) Heavy metal levels in mullet, *Liza abu* (Heckel, 1843)(Mugilidae) from the Tigris River, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin* 5(1): 107-112.
- Ünver, B., Erk'akan, F. (2011) Diet composition of chub, *Squalius cephalus* (teleostei: Cyprinidae), in lake Tödürge, Sivas, Turkey. *Journal of Applied Ichthyology* 27(6): 1350-1355.
- Uredba o zaštiti specijalnog rezervata prirode „Uvac”, Službeni glasnik RS, br. 25/06
- Valko, M, Rhodes, C.J., Monocol J, Izakovic-Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160: 1–40.
- Van der Oost R., Beyer J. Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- Velimirović, D. (2013) Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u realnim uzorcima, Doktorska disertacija. Niš
- Velma, V., Tchounwou, P.B. (2010) Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Mutation Research* 698(1-2): 43–51.
- Vincent-Hubert, F., Arini, A., Gourlay-Francé, C. (2011) Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B [a] P and a combination of B [a] P and Cd. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 723(1): 26-35.
- Višnjić-Jeftić, Z., Jarić, I., Jovanović, L., Skorić, S., Smederevac-Lalić, M., Nikčević, M., Lenhardt, M. (2010) Heavy metal and trace element accumulation in muscle,

- liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). *Microchemical Journal* 95(2): 341-344.
- Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. (2014) Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress. *Hydrobiologia* 735(1): 221-231.
- Waalkes, M.P., Hiwan, B.A., Ward, J.M., Devor, D.E., Goyer, R.A. (1995) Renal tubular tumors and a typical hepatic plasias in B6C3F₁ mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer Research* 55: 5265–5271.
- Wang, Z., Yan C., Kong H., Wu, D. (2010) Mechanisms of cadmium toxicity to various trophic saltwater organisms. In: Parvau RG (ed) *Cadmium in the environment*. Nova Science Publishers Inc, New York, pp 297–336.
- WHO, 1996. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health organization, Geneva.
- Winter, M.J., Day, N., Hayes, R.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., Chipman, J.K. (2004) DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552(1): 163-175.
- Winter, M.J., Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D.J., Williams, M.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., van der Oost, R. and Chipman, J.K. (2005) Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. *Aquatic toxicology* 73(4): 394-405.
- Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J., Sordyl, H. (2007) Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool?. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628 (1): 19-30.
- Würgler, F.E., Kramers, P.G. (1992) Environmental Effects of Genotoxins (Eco-Genotoxicology). *Mutagenesis* 7: 321-327.
- www.leskovackolubarski.rs.

www.uvac.org.rs

- Yamaguchi, S., Miura, C., Ito A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., Cach Tuyen, B., Miura, T. (2007) Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment. *Aquat. Toxicol.* 83: 43-51.
- Yedjou, G.C., Tchounwou, P.B. (2007) *In vitro* cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assays *Molecular Cell Biochemistry* 301: 123–130.
- Yedjou, G.C., Tchounwou, P.B. (2008) N-acetyl-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG₂) cells. *International journal of environmental research and public health* 4(2): 132–137.
- Yilmaz F., Özdemir N., Demirak A., Tuna A.L. (2007) Heavy metal levels in two fish species *Leuscius cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100: 830-5.
- Zadnik, V., Pompe-Kirn, V. (2007) Effects of 500-year mercury mining and milling on cancer incidence in the region of Idrija. *Collegium antropologicum* 31 (3): 897–903.
- Živanović, M., Novković, I. (2013) Degradation of soil and hydrological conditions in the Peštan River Basin. *Glasnik Srpskog geografskog drustva* 93(4): 103-119.
- Zubcov, E., Zubcov, N., Ene, A., Biletschi, L. (2012) Assessment of copper and zinc levels in fish from freshwater ecosystems of Moldova. *Environmental Science and Pollution Research* 19(6): 2238-2247.

PRILOG

PRILOG

U tabeli 1 su rezultati komet testa predstavljeni sa tri parametra (dužina repa—l, intenzitet repa komete—i, “Olive tail moment”—m) za tri tkiva (krv, jetra, škrge) klena uzorkovanog sa četiri reke (Bubanj Potok, Kolubara, Peštan, Beljanica) i dva rezervoara (Uvac i Garaši), korišćeni za SRD metodu.

Tabela 1. Rezultati komet testa predstavljeni sa tri parametra (dužina repa—l, intenzitet repa komete—i, “Olive tail moment”—m) za tri tkiva (krv, jetra, škrge) klena uzorkovanog sa četiri reke (Bubanj Potok, Kolubara, Peštan, Beljanica) i dva rezervoara (Uvac i Garaši)

Lokacija i datum uzorkovanja	jedinka	krv			jetra			škrge		
		l	m	i	l	m	i	l	m	i
Uvac, Zlatarsko jezero, 17.05.2011.	1	13,8	0,42	4,89	22,76	0,53	3,61	15,3	0,35	3,9
	2	13,24	0,28	3,46	15,74	0,52	6,15	17,24	0,52	3,28
	3	14,96	0,26	3	17,86	0,43	4,72	16,84	0,31	3,3
	4	13,66	0,26	3,94	18,18	0,51	5,46	12,54	0,35	7,96
Uvac, Zlatarsko jezero, 24.10.2011.	1	17,64	0,39	3,76	27,38	0,53	3,45	21,04	0,49	3,96
	2	18,96	0,32	2,51	24,2	0,31	2,9	25,82	0,73	6,43
	3	15,42	0,32	2,78	22,48	0,69	4,88	22,96	0,48	4,37
	4	17,02	0,44	3,17	21,74	0,3	4,3	25,06	0,36	2,44
	5	16,36	0,3	4,68	16	0,53	3,22	17,22	0,36	3,65
	6	17,82	0,27	3	28,38	0,63	4,49	18,36	0,58	4,02
	7	18,04	0,29	2,77	17,2	0,41	2,91	22,6	0,92	5,49
Bubanj potok 29.06.2011.	1	12,12	0,52	7,75	18,32	0,72	6,54	21,38	0,99	7,59
	2	13,8	0,47	4,52	18,16	0,82	5,63	36,86	0,74	7,21
	3	14,3	0,5	6,17	20,18	0,53	4,3	25,2	0,93	6,62
	4	14,94	0,41	5,3	21,1	0,68	6,14	18,88	1,46	6,57
Kolubara 1.07.2011.	1	15,2	0,56	5,83	24,7	0,51	3,35	17,58	0,58	5,22
	2	14,92	0,46	5,36	21,22	0,46	3,66	23,08	0,47	3,77
	3	13,88	0,42	6,03	17,14	0,74	7,19	18,88	0,5	4,91
	4	14,5	0,53	7,63	16,6	0,35	3,46	16,88	0,58	6,29
Peštan 30.06.2011.	1	15,66	0,39	3,96	21,96	0,93	6,89	17,42	1,01	9,55
	2	13,4	0,57	7,09	22,32	0,85	6,11	21,04	1,27	9,92
	3	18,62	0,58	4,43	26,9	1,23	7,3	21,14	1,3	9,92
	4	13,4	0,63	10	15,74	0,79	7,85	24,38	1,99	13,54
Peštan 14.10.2011.	1	17,68	0,57	4,97	27,42	1,12	7,15	24,36	2,14	14,64
	2	18,38	0,51	3,38	18,78	1,06	5,26	26,42	0,77	9,73
	3	16,26	0,39	3,99	24,98	0,67	7,43	17,3	0,63	6,27
Beljanica 14.10.2011.	1	14,16	0,45	5,61	21,5	0,6	4,55	23,64	1,35	9,44
	2	16,28	0,55	4,72	16,32	1,47	6,28	18,38	1,1	6,79
	3	17,96	0,43	4,93	28,94	0,64	9,1	18,16	0,77	11,61
Garaši 4.11.2011.	1	15,12	0,19	2,03	18,44	1,07	8,87	21,4	0,83	6,42

	2	15,74	0,3	4,07	17,08	0,67	6,13	20,5	0,91	8,37
	3	19,22	0,31	4,92	21	0,78	7,21	19,18	0,77	4,8
	4	17,84	0,56	2,72	20,5	0,95	6,6	19,4	0,55	6,65
	5	14,84	0,43	3,27	22,76	0,63	5,02	18,94	1,09	7,74

Tabela 2 prikazuje srednje vrednosti oštećenja DNK molekula za krv, jetru i škrge izraženih preko TI i OTM na Peštanu tokom 2011/2012 godine. Tabela 3 prikazuje srednje vrednosti oštećenja DNK molekula za krv, jetru i škrge izraženih preko TI i OTM na Beljanici tokom 2011/2012 godine.

Tabela 2. Oštećenja DNK molekula (srednja vrednost $\pm$ SD) za krv, jetru i škrge po mesecima sa Peštana

	krv		jetra		škrge	
	TI	OTM	TI	OTM	TI	OTM
oktobar	4,34 $\pm$ 0,8	0,47 $\pm$ 0,08	6,61 $\pm$ 1,18	0,95 $\pm$ 0,24	9,89 $\pm$ 3,50	1,25 $\pm$ 0,69
novembar	6,18 $\pm$ 1,69	0,78 $\pm$ 0,34	7,43 $\pm$ 2,08	1,21 $\pm$ 0,37	6,42 $\pm$ 1,74	0,92 $\pm$ 0,25
decembar	5,05 $\pm$ 0,36	0,56 $\pm$ 0,06	9,39 $\pm$ 1,57	1,40 $\pm$ 0,37	6,09 $\pm$ 1,25	0,82 $\pm$ 0,18
mart	4,31 $\pm$ 0,99	0,48 $\pm$ 0,08	5,68 $\pm$ 1,62	0,79 $\pm$ 0,26	7,26 $\pm$ 2,48	0,91 $\pm$ 0,27
april	4,37 $\pm$ 1,03	0,42 $\pm$ 0,08	6,65 $\pm$ 1,92	0,95 $\pm$ 0,67	6,64 $\pm$ 5,08	0,94 $\pm$ 0,87
jul	4,13 $\pm$ 1,04	0,48 $\pm$ 0,12	8,14 $\pm$ 3,17	1,12 $\pm$ 0,36	9,91 $\pm$ 2,89	1,31 $\pm$ 0,53
avgust	1,68 $\pm$ 0,65	0,16 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,21	0,07 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,39	0,06 $\pm$ 0,04
septembar	1,84 $\pm$ 0,46	0,17 $\pm$ 0,06	6,55 $\pm$ 2,08	0,87 $\pm$ 0,37	3,51 $\pm$ 0,40	0,29 $\pm$ 0,08

Tabela 3. Oštećenja DNK molekula (srednja vrednost $\pm$ SD) za krv, jetru i škrge po mesecima sa Beljanice

	krv		jetra		škrge	
	TI	OTM	TI	OTM	TI	OTM
oktobar	5,09 $\pm$ 0,46	0,48 $\pm$ 0,07	6,64 $\pm$ 2,30	0,90 $\pm$ 0,49	9,28 $\pm$ 2,42	1,07 $\pm$ 0,29
novembar	4,88 $\pm$ 1,18	0,55 $\pm$ 0,17	3,92 $\pm$ 1,07	0,58 $\pm$ 0,27	6,24 $\pm$ 1,60	0,93 $\pm$ 0,27
decembar	5,00 $\pm$ 0,47	0,66 $\pm$ 0,09	6,64 $\pm$ 2,33	1,05 $\pm$ 0,42	6,14 $\pm$ 3,38	1,00 $\pm$ 0,67
februar	5,51 $\pm$ 1,39	0,64 $\pm$ 0,32	11,44 $\pm$ 2,60	1,65 $\pm$ 0,49	10,46 $\pm$ 3,42	1,59 $\pm$ 0,64
mart	4,51 $\pm$ 1,35	0,55 $\pm$ 0,17	5,09 $\pm$ 1,47	0,68 $\pm$ 0,27	5,52 $\pm$ 2,35	0,73 $\pm$ 0,42
april	6,81 $\pm$ 3,18	0,87 $\pm$ 0,45	8,04 $\pm$ 2,74	1,23 $\pm$ 0,51	9,18 $\pm$ 3,88	1,56 $\pm$ 0,75
maj	4,32 $\pm$ 0,48	0,52 $\pm$ 0,15	5,20 $\pm$ 1,17	0,67 $\pm$ 0,22	10,83 $\pm$ 4,28	1,85 $\pm$ 0,88
jul	5,35 $\pm$ 1,28	0,61 $\pm$ 0,20	6,79 $\pm$ 1,45	0,93 $\pm$ 0,13	9,92 $\pm$ 3,62	1,13 $\pm$ 0,38
avgust	2,75 $\pm$ 1,08	0,37 $\pm$ 0,19	0,74 $\pm$ 0,60	0,09 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,18	0,04 $\pm$ 0,02
septembar	1,41 $\pm$ 0,49	0,13 $\pm$ 0,07	5,85 $\pm$ 2,03	0,60 $\pm$ 0,17	4,88 $\pm$ 1,86	0,58 $\pm$ 0,36

U tabeli 4 su prikazane izmerene vrednosti dužine i težine svakog uzorkovanog primerka klana sa Uvca. U tabeli 5 (a, b, c, d) su prikazane koncentracije ($\mu\text{g/g}$ suve

težine) 13 metala u četiri tkiva: škrge, jetra, mišić i gonade za 7 jedinki sa Uvca. Rađeni su i Co, Li, Ni, Pb, ali su u svim uzorcima bili ispod granice detekcije (ND).

Tabela 4. Uzorkovane jedinke klena sa dužinom (cm) i težinom (g)

Uvac (Zlatarsko jezero)			
datum uzorkovanja	red.br.	dužina	težina
oktobar 2011. god.	1	19,5	118,2
	2	23,5	125,2
	3	24,5	144
	4	23,5	112,5
	5	25,5	155,4
	6	23	103,2
	7	20,5	78,2

Tabela 5. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u tkivima a) mišić, b) škrge, c) gonade, d) jetra svakog ispitanog primerka klena sa Uvca, ND-ispod granice detekcije

a)

mišić													
red.br.	Al	As	B	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,08	1,45	0,08	0,71	ND	0,06	3,12	27,73	1,08	0,56	0,01	0,70	84,80
2	0,06	2,03	0,17	0,32	ND	0,01	1,77	18,21	0,20	0,49	0,03	0,93	56,74
3	1,90	1,46	0,07	0,63	ND	0,02	1,88	17,46	0,85	0,66	0,04	1,87	84,96
4	ND	1,11	0,09	0,52	ND	0,01	1,76	28,75	1,62	0,69	0,03	1,52	47,03
5	8,34	3,65	0,53	0,49	ND	0,02	2,68	20,43	0,23	0,51	0,27	0,89	59,41
6	4,29	1,42	0,14	0,35	ND	0,02	2,34	23,63	1,14	0,58	0,00	0,33	48,33
7	0,08	1,91	0,17	0,32	ND	0,02	1,62	13,28	0,28	0,56	0,06	1,05	37,20

b)

škrge													
red.br.	Al	As	B	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,13	0,72	0,42	6,49	ND	0,08	1,17	153,54	1,32	11,29	0,01	62,62	446,98
2	5,73	ND	ND	5,63	ND	0,12	0,18	76,85	ND	8,92	1,02	49,78	342,09
3	1,94	2,35	0,48	6,74	ND	0,10	1,56	133,22	ND	14,26	0,00	71,31	379,03
4	0,22	ND	ND	4,44	ND	0,19	0,93	78,83	ND	7,59	0,03	47,12	383,30
5	3,17	6,53	1,04	4,53	ND	0,20	0,51	90,52	ND	8,95	0,45	53,15	399,72
6	0,33	ND	ND	4,65	ND	0,08	0,12	47,67	ND	12,13	0,16	49,55	199,98
7	0,92	ND	ND	7,74	ND	0,71	0,29	146,75	ND	15,56	0,22	59,82	229,05

c)

gonade													
red.br.	Al	As	B	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,09	2,34	0,23	2,40	ND	0,02	1,32	90,33	1,18	0,90	0,04	0,30	252,03
2	0,16	2,93	0,25	1,89	ND	0,02	1,95	118,56	ND	1,01	0,01	0,14	601,85
3	0,06	2,50	0,12	1,31	ND	0,01	0,58	25,50	ND	0,40	0,03	0,24	164,67
4	2,19	2,75	0,20	3,70	ND	0,02	1,57	71,67	1,14	1,06	0,11	0,36	265,91
5	0,09	4,48	0,41	0,90	ND	0,02	2,23	51,10	ND	0,47	0,04	0,18	491,94
6	0,12	4,69	0,19	2,10	ND	0,00	1,05	44,11	ND	0,29	0,06	0,11	428,11
7	0,09	2,88	0,31	3,55	ND	0,02	1,47	106,35	1,20	1,27	0,04	1,63	354,53

d)

jetra													
red.br.	Al	As	B	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,40	1,47	0,40	0,87	0,13	0,09	28,08	209,60	ND	4,96	1,45	ND	120,96
2	0,33	0,59	2,51	0,38	0,26	2,02	8,92	846,63	ND	5,00	1,35	ND	117,18
3	0,15	1,05	0,99	0,14	0,29	0,17	24,35	289,02	ND	3,57	0,81	ND	84,70
4	0,66	1,18	1,38	1,26	0,22	1,90	30,68	569,77	ND	3,18	1,68	ND	134,58
5	1,51	1,53	1,08	0,20	0,16	0,03	16,46	253,29	ND	2,55	0,43	0,17	65,14
6	0,15	4,28	0,90	ND	0,08	0,04	27,96	178,65	ND	4,19	1,15	0,28	95,26
7	0,66	1,18	3,01	1,35	0,22	0,26	81,73	1120,75	ND	5,87	1,48	ND	175,92

U tabeli 6 su prikazane izmerene vrednosti dužine i težine svakog uzorkovanog primerka klena sa Garaša. U tabeli 7 (a, b, c, d) su prikazane koncentracije ($\mu\text{g/g}$ suve težine) 12 metala u četiri tkiva: škrge, jetra, mišić i gonade za 5 jedinki sa Garaša. Cd, Co, Ni i Pb su bili ispod granica detekcije (ND).

Tabela 6. Uzorkovane jedinice klena sa dužinom (cm) i težinom (g)

Garaši			
mesec	red.br.	dužina	težina
NOV	1	36,5	546
	2	36	562
	3	36,4	544
	4	44	1050
	5	35,7	517

Tabela 7. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u tkivima a) mišić, b) škrge, c) gonade, d) jetra svakog ispitanog primerka klana sa Garaša, ND-ispod granice detekcije

a)

mišić												
red. br.	Al	As	B	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,07	0,25	ND	0,02	0,02	1,84	12,54	2,41	0,32	0,03	0,24	33,10
2	0,07	0,44	ND	0,02	0,02	1,52	7,09	1,53	0,17	0,04	0,15	11,72
3	0,14	0,25	ND	0,05	0,03	0,38	2,00	1,79	0,41	0,07	0,27	10,61
4	0,07	0,69	ND	0,02	0,02	1,02	3,06	2,40	0,28	0,04	0,32	7,22
5	0,05	0,88	ND	0,02	0,01	1,81	13,33	1,63	0,34	0,03	0,18	20,45

b)

škrge												
red. br.	Al	As	B	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	22,14	ND	ND	6,19	0,17	2,42	82,95	ND	15,08	0,24	43,22	247,90
2	101,66	ND	ND	6,08	0,09	1,09	184,91	ND	47,77	0,25	37,54	311,08
3	10,64	ND	0,27	5,09	0,04	1,12	104,57	1,33	17,51	0,08	50,71	259,11
4	585,80	ND	2,96	11,31	0,79	1,14	833,49	ND	105,05	0,03	51,75	206,75
5	13,54	ND	ND	7,00	0,06	0,69	71,21	ND	17,77	0,09	70,07	305,84

c)

gonade												
red. br.	Al	As	B	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,06	ND	0,18	0,02	0,01	5,55	66,16	0,98	21,85	0,14	0,53	123,57
2	0,06	ND	0,16	0,02	0,00	6,08	57,69	0,80	25,99	0,15	0,43	88,85
3	0,46	ND	0,18	0,02	0,01	7,06	61,06	0,93	24,02	0,16	0,46	105,47
4	0,06	ND	0,03	0,02	0,01	4,48	21,99	0,95	18,77	0,10	0,38	74,61
5	0,06	ND	0,13	0,02	0,01	6,25	53,21	0,82	37,60	0,12	0,53	90,21

d)

jetra												
red. br.	Al	As	B	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Sr	Zn
1	0,07	0,28	0,29	ND	0,02	9,96	105,46	1,50	2,79	0,50	0,18	38,22
2	0,05	0,76	ND	ND	0,01	19,51	25,92	1,22	1,67	0,14	0,03	26,95
3	30,87	0,96	0,08	ND	0,16	6,14	31,70	1,43	1,63	0,24	0,10	27,40
4	0,06	0,78	ND	ND	0,01	4,83	25,89	1,50	2,35	0,21	0,13	26,72
5	0,06	0,27	ND	ND	0,01	12,10	32,24	1,12	1,91	0,23	0,11	28,84

U tabeli 8 su izmerene vrednosti dužine i težine svakog uzorkovanog primerka klana sa Peštana. U tabelama 9-12 (a, b, c, d) su prikazane koncentracije ($\mu\text{g/g}$ suve težine) 14 metala u četiri tkiva: mišić, škrge, gonade i jetra za jedinke sa Peštana. U tabeli 13 su

prikazane mesečne srednje vrednosti koncentracije ($\mu\text{g/g}$ suve težine) elemenata sa Peštana.

Tabela 8. Uzorkovane jedinice klena sa Peštana sa dužinom (cm) i težinom (g)

Peštan			
mesec	red.br.	dužina	težina
OKT	4	31	332
NOV	1	26,5	119
	2	28	243
	3	39	416
DEC	1	16	45
	2	22	114
	3	12,5	20
MAR	1	20	87
	2	19,5	82
	3	17	54
	4	31	418
APR	1	29,5	377
	2	28	282
	3	29	297
JUL	1	19,5	83
	2	19	72
	3	19	70
	4	17	59
AVG	1	25	155
	2	20	84
	3	30	236
	4	16	46
SEP	1	23	123
	2	20	76
	3	18	58

Tabela 9. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u mišiću svakog ispitanog primerka klena sa Peštana, ND-ispod granice detekcije

MIŠIĆ															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	4	0,06	ND	ND	0,80	0,03	0,81	4,57	1,46	0,60	0,01	ND	ND	1,87	45,30
NOV	1	0,13	ND	ND	0,33	0,01	0,94	7,20	2,17	0,67	0,02	ND	ND	1,21	24,57
	2	0,06	ND	ND	0,41	0,01	0,68	8,52	1,76	0,66	0,03	ND	ND	1,30	30,27
	3	0,10	ND	ND	0,94	0,02	1,13	7,94	1,74	1,22	0,07	ND	ND	2,07	30,16
DEC	1	6,35	ND	0,10	0,75	0,03	1,41	11,01	0,83	0,95	0,23	0,04	0,35	2,41	55,34
	2	10,97	ND	0,70	0,58	0,06	1,47	10,55	0,81	0,65	0,10	0,04	ND	0,87	55,12
	3	28,28	ND	2,19	0,57	0,04	1,49	9,06	1,19	1,06	0,09	0,13	ND	3,05	71,23
MAR	1	3,49	ND	0,28	1,57	0,07	0,88	8,55	0,60	0,60	0,31	0,04	0,33	1,86	79,78
	2														
	3	4,90	ND	0,11	2,02	0,12	1,34	9,58	0,54	1,72	0,34	0,04	0,13	5,89	72,23
	4	42,52	ND	0,11	0,68	0,06	1,10	15,51	0,99	0,53	0,03	0,04	0,80	0,64	47,50
APR	1	29,53	ND	0,11	0,53	0,06	0,83	6,38	1,47	0,51	0,24	0,04	ND	0,86	67,74
	2	0,05	ND	0,08	1,24	0,25	0,93	5,61	1,18	0,90	0,37	0,03	ND	1,59	61,83
	3	2,15	ND	0,08	0,73	0,05	0,79	4,36	1,17	0,72	0,22	0,03	ND	1,34	49,42
JUL	1	15,22	ND	0,36	0,42	0,05	1,41	11,33	0,61	0,73	0,36	0,03	0,28	3,30	53,95
	2	0,07	ND	0,64	1,16	0,01	1,43	7,68	0,53	1,30	0,21	0,06	0,14	2,79	68,27
	3	29,97	ND	1,33	0,83	0,02	1,08	7,27	0,83	0,95	0,01	0,05	0,14	2,04	81,73
	4	48,34	ND	0,64	2,74	0,27	1,94	9,61	0,87	1,33	0,04	0,06	0,51	1,87	89,29
AVG	1	9,39	ND	0,08	0,87	0,21	0,83	20,54	0,82	0,91	0,37	0,03	ND	1,20	65,87
	2	0,04	ND	0,07	1,13	0,88	1,04	13,78	0,69	0,90	0,26	0,05	ND	2,70	67,27
	3	1,29	ND	0,07	1,43	0,14	5,21	16,77	1,14	0,83	0,29	3,08	ND	1,34	64,21
	4	62,15	ND	0,84	0,45	0,28	1,46	10,97	1,06	0,80	0,05	0,07	ND	1,22	88,56
SEP	1	0,13	ND	0,40	1,42	0,03	1,10	6,48	1,43	0,81	0,38	0,03	ND	3,37	58,46
	2	0,06	ND	0,55	2,61	0,12	0,98	6,80	0,97	1,87	0,98	0,01	ND	11,10	92,06
	3	6,86	ND	0,13	1,18	0,01	2,79	9,66	0,69	0,96	0,64	0,57	ND	2,67	88,32

Tabela 10. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u škragama svakog ispitanog primerka klena sa Peštana, ND-ispod granice detekcije

ŠKRGE															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	4	12,06	0,22	ND	26,84	0,13	1,42	64,74	0,97	14,67	0,01	0,03	ND	87,15	262,56
NOV	1	0,24	0,27	ND	16,39	0,05	1,44	67,52	1,22	13,62	0,05	ND	ND	52,55	174,40
	2	8,69	0,50	ND	13,59	0,14	1,60	103,01	1,28	15,20	0,00	ND	ND	64,78	178,10
	3	67,12	0,45	ND	17,40	0,26	3,38	127,64	1,63	47,16	0,07	3,31	ND	61,18	175,62
DEC	1	42,35	ND	0,30	11,71	0,62	2,26	104,73	0,64	11,26	1,00	0,12	ND	40,69	252,15
	2	6,78	ND	0,12	18,49	0,60	2,04	103,27	0,47	18,96	1,26	0,05	ND	73,85	184,79
	3	27,99	ND	5,02	15,29	1,58	3,64	97,09	1,45	14,53	4,51	0,30	ND	59,41	301,74
MAR	1	23,28	ND	0,17	19,83	0,81	1,81	108,91	0,43	9,80	1,41	0,07	ND	70,09	244,59
	2	8,08	ND	0,17	20,57	0,35	1,88	79,04	0,56	19,76	1,83	0,07	ND	78,48	237,33
	3	88,06	ND	0,28	41,28	0,84	2,23	108,49	0,69	35,68	2,07	0,11	ND	109,37	201,64
	4	0,09	ND	0,16	15,02	0,62	3,27	90,54	0,45	22,05	0,97	0,08	ND	155,70	268,39
APR	1	9,30	ND	0,20	16,85	0,63	1,53	57,60	0,59	12,44	2,03	0,08	ND	73,42	149,17
	2	4,32	ND	0,13	25,14	0,62	1,59	115,80	0,54	19,87	1,41	0,20	ND	86,32	222,30
	3	27,21	ND	0,20	24,19	0,61	1,64	81,45	0,77	15,32	1,46	0,08	ND	98,31	150,59
JUL	1	17,14	ND	0,17	15,78	0,41	2,25	86,02	0,60	16,86	1,06	0,07	ND	65,35	352,20
	2	25,43	ND	0,28	26,58	0,99	2,97	162,17	0,94	23,14	1,83	0,11	ND	88,83	203,46
	3	45,37	1,02	1,86	16,08	0,67	2,79	714,04	1,04	21,89	2,41	0,11	ND	67,33	169,65
	4	36,23	ND	0,41	22,36	1,04	3,46	173,17	0,86	23,09	2,67	0,17	ND	83,63	211,59
AVG	1	11,20	ND	0,16	19,52	0,60	7,42	128,24	0,68	15,47	1,61	1,90	ND	75,23	328,21
	2	25,87	ND	0,20	15,92	0,65	4,17	144,06	0,51	14,68	1,59	2,03	ND	63,26	279,88
	3	16,90	ND	0,09	19,33	0,50	2,37	121,62	0,49	16,16	1,00	0,09	ND	83,88	339,73
	4	24,68	ND	1,75	20,81	0,67	3,81	130,61	0,87	21,66	2,25	0,70	ND	75,58	370,86
SEP	1	193,99	0,27	0,28	25,60	0,84	3,25	232,19	0,99	42,54	2,41	0,09	2,35	105,48	293,96
	2	138,85	ND	1,32	36,24	1,38	4,17	232,49	1,31	48,22	3,15	0,55	1,47	106,25	461,96
	3	23,80	ND	0,81	41,57	0,90	2,54	108,68	1,04	33,72	2,52	0,15	0,45	136,22	368,19

Tabela 11. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u gonadama svakog ispitanog primerka klena sa Peštana, ND-ispod granice detekcije

GONADE															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	4														
NOV	1	2,05	0,13	0,55	2,46	0,02	2,88	46,41	1,54	2,67	0,15	0,05	ND	0,36	157,90
	2	0,06	0,22	0,11	1,14	0,01	5,87	71,03	1,05	17,43	0,17	0,03	ND	0,47	231,02
	3														
DEC	1														
	2														
	3														
MAR	1	10,93	0,40	0,13	2,23	0,05	1,61	21,57	0,39	1,18	0,03	0,04	0,31	0,42	72,40
	2														
	3	7,21	ND	1,41	5,25	0,10	1,53	42,91	0,59	2,16	0,04	0,06	0,55	0,53	142,15
	4	0,46	ND	0,00	0,16	0,10	3,36	41,85	0,50	18,20	0,03	0,05	0,14	0,40	97,12
APR	1	5,98	ND	0,29	0,02	0,08	1,81	17,27	0,42	1,02	0,03	0,05	ND	0,23	40,65
	2	8,09	ND	0,07	2,87	0,04	1,31	19,95	0,37	0,75	0,03	0,03	0,19	0,19	100,21
	3	7,49	ND	1,03	0,81	0,01	2,90	23,36	0,52	13,86	0,03	0,05	ND	0,52	70,17
JUL	1	5,47	ND	5,40	16,92	0,07	4,47	52,53	1,52	1,90	0,16	0,23	ND	1,45	646,43
	2	0,10	ND	2,25	6,33	0,32	2,68	38,68	0,58	1,18	0,05	0,07	ND	0,67	163,32
	3	6,77	ND	4,06	4,76	0,02	2,79	32,49	0,75	0,95	0,01	0,10	ND	0,31	294,69
	4	0,16	ND	4,92	22,50	0,04	1,00	31,48	1,23	1,41	0,00	0,11	ND	0,80	389,23
AVG	1	14,31	ND	2,99	10,99	0,36	6,51	106,01	0,91	3,71	0,06	0,29	ND	0,65	509,71
	2	5,43	ND	4,82	9,85	0,32	3,71	39,80	0,84	0,74	0,05	0,07	ND	0,44	443,48
	3	0,07	ND	0,13	10,65	0,09	10,47	55,83	0,66	7,36	0,27	0,26	ND	1,62	628,47
	4	35,32	ND	3,62	4,44	0,09	5,59	80,28	1,48	3,57	0,26	0,16	6,15	0,74	688,24
SEP	1	1,82	ND	1,59	3,24	0,02	1,10	39,18	0,70	2,46	0,04	0,06	ND	0,27	80,56
	2	7,61	ND	3,07	20,17	0,55	2,29	91,79	0,90	2,30	0,07	0,10	ND	0,94	454,31
	3	0,35	ND	8,90	23,18	0,71	8,88	82,02	1,43	3,09	0,17	0,25	ND	6,87	994,36

Tabela 12. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u jetri svakog ispitanog primerka klana sa Peštana, ND-ispod granice detekcije

JETRA															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	4	0,18	ND	ND	ND	0,04	20,53	70,05	0,63	3,80	1,31	0,26	ND	0,16	56,12
NOV	1	0,10	0,83	ND	ND	0,04	41,37	281,07	1,20	2,55	0,62	ND	ND	0,24	75,81
	2	0,06	0,19	ND	ND	0,01	8,15	67,45	0,99	2,16	0,57	ND	ND	0,10	49,38
	3	0,10	0,21	ND	ND	0,02	4,55	93,64	1,23	1,90	0,34	ND	ND	0,09	24,12
DEC	1														
	2														
	3														
MAR	1	19,14	ND	0,28	ND	0,32	25,90	750,48	0,70	4,96	0,08	0,11	0,33	0,37	105,90
	2	3,74	ND	0,22	ND	0,30	15,42	429,05	0,51	6,33	0,06	0,09	0,70	0,65	119,95
	3	16,77	ND	0,40	ND	0,05	24,07	438,04	0,80	4,92	0,11	0,16	0,48	0,62	87,82
	4	24,32	ND	0,14	ND	0,22	17,36	151,51	0,92	8,45	1,12	0,06	0,42	0,49	109,23
APR	1	5,96	ND	0,14	ND	0,24	58,82	164,92	0,74	5,81	0,29	0,06	ND	1,14	119,04
	2	3,28	ND	1,93	ND	0,14	23,65	149,06	0,77	5,31	0,83	0,08	ND	0,21	113,25
	3	33,11	ND	0,46	0,05	0,13	7,78	37,80	0,40	3,59	0,30	0,03	0,25	0,23	45,80
JUL	1	0,16	ND	0,28	ND	0,43	37,16	331,19	1,08	5,26	0,80	0,11	ND	0,29	86,25
	2	0,15	ND	2,18	ND	0,26	16,33	86,16	0,96	6,24	0,70	0,06	ND	0,44	76,72
	3	25,66	ND	2,53	ND	0,05	59,31	135,04	1,06	8,28	0,86	0,14	ND	0,50	129,23
	4	59,90	ND	0,46	ND	0,10	23,11	244,33	1,31	9,48	0,43	0,16	ND	0,58	83,72
AVG	1	13,41	3,60	0,26	0,05	0,14	29,69	227,69	1,31	5,74	0,70	0,39	ND	0,25	90,15
	2	0,18	ND	0,38	0,06	0,57	58,35	491,39	0,97	3,48	0,42	0,09	ND	0,22	105,94
	3	6,46	ND	0,93	0,38	0,26	44,29	73,11	1,04	4,79	1,22	0,05	ND	1,04	97,37
	4	75,09	ND	0,36	0,79	0,88	41,10	549,61	1,06	10,41	0,75	0,62	1,14	1,27	151,88
SEP	1	13,38	ND	1,84	ND	0,71	12,65	103,42	1,73	8,58	0,66	0,37	ND	0,57	105,13
	2	0,20	ND	0,36	ND	0,58	24,97	548,60	0,93	12,24	0,34	0,24	ND	0,78	187,20
	3	29,87	ND	0,19	ND	0,65	32,27	694,82	1,24	7,00	1,54	0,18	ND	0,72	183,61

Tabela 13. Koncentracije metala i metaloida u tragovima u mišiću, škragama, gonadama i jetri (izražene u $\mu\text{g/g}$ suve težine) u uzorcima klena (srednja vrednost $\pm$ SD) sa Peštana tokom godine 2011/2012;

*detektovano u jednoj jedinki, ND-ispod granice detekcije

	oktobar	novembar	decembar	mart	april	jul	avgust	septembar
Al								
mišić	0,06*	0,10 $\pm$ 0,03	15,2 $\pm$ 11,56	16,41 $\pm$ 19,42	10,58 $\pm$ 16,45	23,4 $\pm$ 20,63	18,22 $\pm$ 29,58	2,35 $\pm$ 3,90
škrge	12,06*	25,35 $\pm$ 36,42	25,71 $\pm$ 17,89	29,88 $\pm$ 39,96	13,61 $\pm$ 12,04	31,04 $\pm$ 12,34	19,66 $\pm$ 6,90	118,88 $\pm$ 86,83
gonade		1,06 $\pm$ 1,40		45,76 $\pm$ 79,25	7,19 $\pm$ 1,09	3,12 $\pm$ 3,50	13,78 $\pm$ 15,51	3,26 $\pm$ 3,84
jetra	0,18*	0,08 $\pm$ 0,02		15,99 $\pm$ 8,76	14,12 $\pm$ 16,51	21,47 $\pm$ 28,31	23,79 $\pm$ 34,63	14,48 $\pm$ 14,86
B								
mišić	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
škrge	0,22*	0,41 $\pm$ 0,12	ND	ND	ND	1,02*	ND	0,27*
gonade		0,17 $\pm$ 0,07		0,7**	ND	ND	0,27*	ND
jetra	ND	0,41 $\pm$ 0,36		ND	ND	ND	3,60*	ND
As								
mišić	ND	ND	1,00 $\pm$ 1,07	0,17 $\pm$ 0,10	0,09 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,41	0,26 $\pm$ 0,38	0,36 $\pm$ 0,21
škrge	ND	ND	1,81 $\pm$ 2,78	0,2 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,79	0,55 $\pm$ 0,8	0,80 $\pm$ 0,52
gonade		0,33 $\pm$ 0,31		0,49 $\pm$ 0,64	0,46 $\pm$ 0,50	4,15 $\pm$ 1,39	2,89 $\pm$ 1,99	4,52 $\pm$ 3,86
jetra	ND	ND		0,26 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,95	1,36 $\pm$ 1,16	0,48 $\pm$ 0,30	0,79 $\pm$ 0,91
Ba								
mišić	0,8*	0,56 $\pm$ 0,33	0,63 $\pm$ 0,10	1,42 $\pm$ 0,68	0,83 $\pm$ 0,37	1,29 $\pm$ 1,02	0,97 $\pm$ 0,42	1,74 $\pm$ 0,77
škrge	26,84*	15,79 $\pm$ 1,98	15,16 $\pm$ 3,39	24,17 $\pm$ 11,67	22,06 $\pm$ 4,54	20,2 $\pm$ 5,23	18,9 $\pm$ 2,09	34,47 $\pm$ 8,13
gonade		1,8 $\pm$ 0,93		2,69 $\pm$ 2,11	1,23 $\pm$ 1,47	12,63 $\pm$ 7,37	8,98 $\pm$ 3,07	15,53 $\pm$ 10,75
jetra	ND	ND		ND	0,04*	ND	0,32 $\pm$ 0,35	ND
Cr								
mišić	0,03*	0,02 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,11	0,09 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,34	0,05 $\pm$ 0,05
škrge	0,13*	0,15 $\pm$ 0,1	0,94 $\pm$ 0,56	0,65 $\pm$ 0,22	0,62 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,29	0,61 $\pm$ 0,07	1,04 $\pm$ 0,30
gonade		0,01 $\pm$ 0,01		0,16 $\pm$ 0,16	0,04 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,14	0,22 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,36
jetra	0,04*	0,03 $\pm$ 0,01		0,22 $\pm$ 0,12	0,17 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,17	0,46 $\pm$ 0,33	0,65 $\pm$ 0,07
Cu								
mišić	0,81*	0,92 $\pm$ 0,23	1,45 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,23	0,85 $\pm$ 0,07	1,47 $\pm$ 0,36	2,14 $\pm$ 2,06	1,62 $\pm$ 1,02
škrge	1,42*	2,14 $\pm$ 1,07	2,64 $\pm$ 0,87	2,30 $\pm$ 0,67	1,59 $\pm$ 0,05	2,87 $\pm$ 0,50	4,44 $\pm$ 2,13	3,32 $\pm$ 0,82
gonade		4,38 $\pm$ 2,12		2,40 $\pm$ 0,96	2,01 $\pm$ 0,81	2,74 $\pm$ 1,42	6,57 $\pm$ 2,85	4,09 $\pm$ 4,19
jetra	20,53*	18,02 $\pm$ 20,3		20,69 $\pm$ 5,08	30,08 $\pm$ 26,12	33,98 $\pm$ 18,99	43,36 $\pm$ 11,8	23,3 $\pm$ 9,91
Fe								
mišić	4,57*	7,89 $\pm$ 0,66	10,21 $\pm$ 1,02	11,21 $\pm$ 3,76	5,45 $\pm$ 1,02	8,97 $\pm$ 1,87	15,52 $\pm$ 4,11	7,64 $\pm$ 1,75
škrge	64,74*	99,39 $\pm$ 30,23	101,70 $\pm$ 4,06	96,75 $\pm$ 14,58	84,95 $\pm$ 29,26	283,85 $\pm$ 289,4	131,13 $\pm$ 9,42	191,12 $\pm$ 71,39
gonade		58,72 $\pm$ 17,41		63,33 $\pm$ 56,63	20,19 $\pm$ 3,05	38,79 $\pm$ 9,69	70,48 $\pm$ 28,95	71,00 $\pm$ 27,98
jetra	70,05*	147,39 $\pm$ 116,51		442,27 $\pm$ 244,76	117,26 $\pm$ 69,27	199,18 $\pm$ 110,08	335,45 $\pm$ 224,06	448,95 $\pm$ 308,04
Hg								
mišić	1,46*	1,89 $\pm$ 0,24	0,94 $\pm$ 0,21	0,71 $\pm$ 0,25	1,27 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,17	0,93 $\pm$ 0,21	1,03 $\pm$ 0,37
škrge	0,97*	1,38 $\pm$ 0,22	0,85 $\pm$ 0,52	0,53 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,19	0,63 $\pm$ 0,18	1,11 $\pm$ 0,17
gonade		1,29 $\pm$ 0,34		0,49 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,43	0,97 $\pm$ 0,35	1,01 $\pm$ 0,38
jetra	0,63*	1,14 $\pm$ 0,13		0,73 $\pm$ 0,17	0,64 $\pm$ 0,21	1,10 $\pm$ 0,15	1,09 $\pm$ 0,15	1,3 $\pm$ 0,40
Mn								
mišić	0,60*	0,85 $\pm$ 0,32	0,89 $\pm$ 0,21	1,12 $\pm$ 0,64	0,95 $\pm$ 0,21	1,08 $\pm$ 0,29	0,86 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,57
škrge	14,67*	25,33 $\pm$ 18,92	14,92 $\pm$ 3,86	21,82 $\pm$ 10,66	15,88 $\pm$ 3,75	21,25 $\pm$ 2,98	16,99 $\pm$ 3,17	41,49 $\pm$ 7,31
gonade		10,05 $\pm$ 10,44		21,98 $\pm$ 30,6	5,21 $\pm$ 7,49	1,36 $\pm$ 0,41	3,85 $\pm$ 2,71	2,61 $\pm$ 0,42
jetra	3,80*	2,20 $\pm$ 0,32		6,16 $\pm$ 1,66	4,90 $\pm$ 1,16	7,32 $\pm$ 1,91	6,10 $\pm$ 3,02	9,28 $\pm$ 2,69
Mo								
mišić	0,01*	0,04 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,24	0,23 $\pm$ 0,17	0,16 $\pm$ 0,16	0,24 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,3
škrge	0,01*	0,04 $\pm$ 0,04	2,26 $\pm$ 1,96	1,57 $\pm$ 0,48	1,64 $\pm$ 0,34	1,99 $\pm$ 0,71	1,61 $\pm$ 0,51	2,69 $\pm$ 0,4
gonade		0,16 $\pm$ 0,01		0,15 $\pm$ 0,24	0,03 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,12	0,09 $\pm$ 0,07
jetra	1,31*	0,51 $\pm$ 0,14		0,34 $\pm$ 0,52	0,48 $\pm$ 0,31	0,70 $\pm$ 0,19	0,77 $\pm$ 0,33	0,85 $\pm$ 0,62
Ni								
mišić	ND	ND	0,07 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 1,52	0,2 $\pm$ 0,32
škrge	0,03*	3,31*	0,16 $\pm$ 0,13	0,08 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,94	0,26 $\pm$ 0,25
gonade		0,04 $\pm$ 0,01		0,21 $\pm$ 0,32	0,04 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,10
jetra	0,26*	ND		0,1 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,27	0,26 $\pm$ 0,10
Pb								
mišić	ND	ND	0,35*	40,9 $\pm$ 80,96	ND	0,27 $\pm$ 0,17	ND	ND
škrge	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,42 $\pm$ 0,95
gonade		ND		0,43 $\pm$ 0,26	0,19*	ND	6,15*	ND
jetra	ND	ND		0,48 $\pm$ 0,16	0,25*	ND	1,14*	ND
Sr								
mišić	1,87*	1,53 $\pm$ 0,47	2,11 $\pm$ 1,12	9,18 $\pm$ 12,96	2,80 $\pm$ 2,75	2,50 $\pm$ 0,67	1,61 $\pm$ 0,73	5,71 $\pm$ 4,67
škrge	87,15*	59,5 $\pm$ 6,29	57,98 $\pm$ 16,62	103,41 $\pm$ 38,74	86,02*	76,29 $\pm$ 11,71	74,49 $\pm$ 8,49	115,98 $\pm$ 17,53
gonade		0,41 $\pm$ 0,08		0,84 $\pm$ 0,78	0,31 $\pm$ 0,18	0,81 $\pm$ 0,48	0,86 $\pm$ 0,52	2,69 $\pm$ 3,63
jetra	0,16*	0,14 $\pm$ 0,09		0,53 $\pm$ 0,13	0,53 $\pm$ 0,53	0,45 $\pm$ 0,12	0,70*	0,69 $\pm$ 0,11
Zn								
mišić	45,30*	28,33 $\pm$ 3,26	60,56 $\pm$ 9,24	60,36 $\pm$ 18,47	66,5 $\pm$ 16,88	73,31 $\pm$ 15,56	71,48 $\pm$ 11,46	79,61 $\pm$ 18,41
škrge	262,56*	176,04 $\pm$ 1,89	246,23 $\pm$ 58,7	237,99 $\pm$ 27,62	174,02*	234,22 $\pm$ 80,72	329,67 $\pm$ 37,77	374,7 $\pm$ 84,19
gonade		194,46 $\pm$ 51,70		110,87 $\pm$ 32,08	70,34 $\pm$ 29,78	373,42 $\pm$ 204,23	567,47 $\pm$ 111,08	509,74 $\pm$ 459,41
jetra	56,12*	49,77 $\pm$ 25,85		105,73 $\pm$ 13,36	92,7 $\pm$ 40,72	93,98 $\pm$ 23,85	111,33 $\pm$ 27,79	158,64 $\pm$ 46,38

U tabeli 14 su izmerene vrednosti dužine i težine svakog uzorkovanog primerka klana sa Beljanice. U tabelama 15-18 (a, b, c, d) su prikazane koncentracije ($\mu\text{g/g}$ suve težine) 14 metala u četiri tkiva: mišić, škrge, gonade i jetra za jedinke sa Beljanice. U tabeli 19 su prikazane mesečne srednje vrednosti koncentracije ($\mu\text{g/g}$ suve težine) elemenata sa Beljanice.

Tabela 14. Uzorkovane jedinke klana sa Beljanice sa dužinom (cm) i težinom (g)

Beljanica			
mesec	red.br.	dužina	težina
OKT	1	17	36
	2	18,5	63
	3	33,8	402
	4	39	718
NOV	1	24,8	169
	2	28,7	290
	3	21,5	114
	4	33	406
DEC	1	33	406
	2	46	762
	3	39	750
	4	32,7	404
FEB	1	25	166
	2	24	133
	3	19	66
	4	19	69
MAR	1	20	94
	2	22	135
	3	18,5	73
	4	16	47
APR	1	21	93
	2	15,5	41
	3	18,5	71
	4	16	47
MAJ	1	25	151
	2	17	62
	3	22	121
	4	18	73
JUL	1	30	129
	2	19,5	76
	3	22	106
	4	17,5	54
AVG	1	19	68
	2	35	475
	3	21	89
	4	20	82
SEP	1	20	82
	2	23	120
	3	17	51

Tabela 15. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u mišiću svakog ispitanog primerka klena sa Beljanice, ND-ispod granice detekcije

MIŠIĆ															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	1	0,22	ND	ND	0,07	0,05	1,57	8,77	0,77	0,58	0,25	ND	ND	0,59	63,96
	2	0,10	ND	ND	0,34	0,04	1,78	9,00	0,97	0,42	0,06	0,08	ND	1,00	67,28
	3	0,05	0,09	0,24	0,09	0,01	0,78	4,16	0,94	0,63	0,07	ND	ND	2,66	48,40
NOV	1	0,06	0,03	0,74	0,30	0,00	2,07	8,89	0,89	0,81	0,03	ND	ND	2,18	30,56
	2	6,14	0,05	0,14	0,06	0,00	2,41	10,84	1,20	0,68	0,00	ND	ND	1,45	26,22
	3	1,12	0,08	0,32	0,35	0,02	1,68	9,47	1,15	1,61	0,03	ND	ND	2,02	24,00
	4	0,05	0,09	0,37	0,04	0,05	1,17	2,20	1,30	0,65	0,03	ND	ND	2,69	20,87
DEC	1	6,98	0,10	0,09	9,63	0,43	1,35	75,28	0,33	9,75	0,63	0,04	0,11	107,28	178,49
	2	32,17	0,22	0,42	0,28	0,23	0,78	6,91	0,74	0,45	0,03	0,04	0,49	1,49	39,20
	3	0,05	0,68	0,08	0,44	0,45	1,32	8,55	0,73	0,72	0,02	1,14	0,26	3,23	44,48
	4	9,99	0,43	0,08	0,25	0,57	1,03	7,05	0,72	0,62	0,06	1,59	0,10	1,61	49,25
FEB	1	0,80	ND	0,17	0,65	0,09	2,94	22,13	0,44	0,72	0,02	0,04	0,30	3,28	46,67
	2	6,79	ND	0,09	1,32	0,11	0,75	4,57	0,30	1,81	0,35	0,04	0,11	18,40	69,38
	3	0,53	ND	0,56	0,56	0,17	1,72	7,50	0,51	0,77	0,02	0,03	0,25	3,59	72,33
	4	17,47	ND	0,08	0,39	0,04	1,50	8,95	0,45	0,89	0,31	0,03	0,27	4,81	51,32
MAR	1	20,12	ND	0,28	0,23	0,01	1,60	7,34	0,38	0,73	0,06	0,04	0,27	1,81	71,88
	2	4,28	ND	0,14	0,77	0,09	0,88	4,22	0,56	1,79	0,37	0,04	0,11	4,43	63,10
	3	0,05	ND	0,09	0,59	0,08	1,49	7,69	0,36	0,92	0,02	0,04	0,24	5,84	66,95
APR	1	0,06	ND	0,10	0,30	0,18	1,55	12,66	0,52	1,27	0,03	0,04	ND	3,38	77,93
	2	32,45	ND	4,17	2,31	0,23	8,99	33,26	0,91	1,27	0,13	2,39	0,79	2,28	58,33
	3	19,63	ND	0,77	0,36	0,03	1,18	7,65	0,51	1,04	0,18	0,04	ND	1,87	66,66
	4	0,62	ND	0,17	1,01	0,01	1,59	8,27	0,53	1,50	0,32	0,04	ND	3,93	46,25
MAJ	1	7,95	ND	0,06	0,41	0,05	1,68	20,26	0,58	0,91	0,14	0,03	0,26	1,60	78,08
	2	0,08	ND	0,57	0,77	0,02	1,93	7,69	0,67	0,91	0,04	0,09	0,17	1,66	82,99
	3	0,05	ND	0,08	0,60	0,04	1,63	9,10	0,46	0,76	0,12	0,03	0,26	2,31	63,09
	4	0,05	ND	0,09	0,34	0,07	1,80	8,33	0,46	1,17	0,29	0,00	0,27	3,20	66,39
JUL	1	0,04	ND	0,08	0,48	0,05	1,14	6,31	0,37	0,80	0,22	0,01	0,09	1,95	81,66
	2	12,08	ND	0,11	0,70	0,01	1,56	11,79	0,64	0,91	0,15	0,04	0,13	2,85	77,74
	3	1,16	ND	1,12	1,09	0,01	1,71	24,01	0,78	1,53	0,11	0,04	0,34	4,06	60,70
	4	14,85	ND	0,62	0,35	0,04	1,67	10,73	0,61	0,99	0,03	0,04	0,34	2,33	94,68
AVG	1	0,50	ND	1,96	1,00	0,09	1,03	9,22	0,69	1,20	0,39	0,15	0,21	8,01	68,93
	2	17,21	ND	0,08	0,69	0,02	0,91	5,83	0,98	0,84	0,27	0,03	0,22	3,21	58,97
	3	0,04	ND	0,07	0,40	0,01	0,96	6,46	0,56	0,88	0,33	0,03	0,25	7,42	77,80
SEP	1	30,23	ND	0,30	0,33	0,26	0,84	21,34	0,63	0,84	0,01	0,05	ND	1,95	72,82
	2	11,54	ND	0,06	0,68	0,11	1,04	8,48	0,68	0,97	0,02	0,03	0,21	0,94	54,31
	3	0,08	ND	0,15	0,48	0,02	1,05	7,08	0,49	1,18	0,36	0,06	ND	5,00	76,28

Tabela 16. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u škragama svakog ispitanog primerka klena sa Beljanice, ND-ispod granice detekcije

ŠKRGE															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	1	0,25	0,57	ND	14,06	1,20	2,70	83,02	ND	34,36	0,40	0,08	ND	127,74	228,75
	2	0,16	0,42	ND	8,01	0,47	2,47	63,64	ND	19,63	0,29	ND	ND	94,03	169,87
	3	4,24	0,54	ND	8,54	0,09	2,50	63,98	0,93	15,56	0,31	ND	ND	110,54	324,44
NOV	1	23,07	0,79	0,57	10,13	0,82	2,10	85,48	1,09	26,43	0,06	0,17	ND	103,16	124,68
	2	30,78	0,64	ND	11,15	0,13	2,49	103,54	1,13	34,17	0,17	0,18	ND	105,34	221,16
	3	62,62	0,75	ND	9,04	0,32	3,02	114,63	0,92	38,44	0,15	0,24	ND	88,61	160,65
	4	0,05	0,71	ND	10,07	0,04	1,63	73,47	1,18	18,29	0,27	0,04	ND	133,19	217,17
DEC	1	12,59	ND	0,14	15,33	0,75	2,11	121,17	0,45	15,56	1,30	0,06	0,17	172,52	283,74
	2	29,26	0,54	0,10	15,73	0,66	1,38	73,38	0,28	14,58	0,74	0,04	0,68	193,84	254,38
	3	13,89	ND	0,08	19,47	0,59	2,28	84,46	0,28	20,23	0,87	0,23	0,81	200,54	143,45
	4	46,49	ND	0,10	18,83	0,77	2,14	107,51	0,35	35,45	1,23	0,04	0,78	178,56	166,53
FEB	1	ND	ND	0,91	17,83	0,37	1,73	104,89	0,79	18,04	1,11	0,01	1,53	187,75	232,91
	2	0,11	ND	0,20	15,26	0,85	2,67	128,09	0,56	16,80	1,20	0,08	0,24	172,05	235,83
	3	9,48	ND	0,01	13,16	0,73	2,66	84,22	0,66	14,70	1,20	0,14	0,42	137,20	292,75
	4	13,13	ND	0,20	12,18	2,95	2,96	91,47	0,48	15,37	1,07	0,33	0,85	124,64	279,31
MAR	1	23,00	ND	0,22	9,14	0,79	2,70	83,03	0,61	17,50	1,09	0,09	0,57	129,41	224,10
	2	13,89	ND	0,20	15,36	0,46	2,15	93,89	0,49	34,92	1,24	0,08	0,25	134,24	151,62
	3	61,89	ND	0,27	14,12	0,77	2,06	98,27	0,84	15,74	1,60	0,12	1,31	153,17	202,17
APR	1	26,22	ND	0,24	9,26	0,46	2,14	110,74	0,47	28,73	1,76	0,10	ND	128,47	208,07
	2	4,02	ND	1,59	14,78	0,29	2,72	58,75	0,94	20,03	1,10	0,16	ND	74,66	214,84
	3	54,41	ND	0,16	10,25	0,67	2,21	122,11	0,61	30,64	1,96	0,09	ND	122,59	253,84
	4	62,47	ND	0,42	18,71	0,72	2,46	87,45	1,04	29,18	1,55	0,17	ND	67,84	199,17
MAJ	1	33,64	ND	0,17	12,03	0,56	2,53	186,11	0,53	36,00	1,46	0,07	ND	115,19	200,38
	2	17,27	ND	0,22	10,72	0,52	3,11	133,40	0,65	27,13	1,73	0,09	0,59	145,50	218,49
	3	9,15	ND	0,15	8,05	1,12	2,62	98,53	0,55	16,24	1,44	0,06	ND	114,07	303,59
	4	44,78	ND	0,25	7,35	0,61	2,94	100,81	0,35	18,84	1,69	0,10	ND	114,24	256,54
JUL	1	1,72	ND	0,27	8,50	0,37	2,80	97,89	0,55	23,93	1,58	0,11	ND	126,65	470,67
	2	2,55	ND	0,32	16,01	0,46	3,41	117,65	0,94	23,67	1,81	0,13	ND	162,74	298,67
	3	3,75	ND	0,24	18,74	0,40	2,20	77,33	0,59	36,84	2,15	0,03	0,66	182,38	333,24
	4	12,90	ND	0,24	10,15	1,28	2,94	96,08	0,51	24,41	1,46	0,10	ND	107,12	292,02
AVG	1	13,60	ND	0,35	16,35	1,10	3,20	69,57	0,87	26,57	2,03	0,14	0,43	166,31	411,28
	2	0,14	ND	0,08	17,85	0,72	1,74	92,04	0,97	21,64	2,13	0,32	0,99	81,34	303,29
	3	15,61	ND	0,19	11,37	0,60	3,20	78,83	0,57	20,73	1,36	0,08	0,66	157,39	193,84
SEP	1	194,56	ND	0,54	17,24	0,25	2,70	126,65	1,02	34,86	2,19	0,22	ND	225,15	313,32
	2	35,70	ND	0,24	15,31	0,77	2,92	164,58	0,38	32,03	2,49	0,14	1,00	208,97	222,95
	3	123,94	ND	0,46	15,38	0,90	4,74	236,74	1,11	69,92	3,68	0,56	ND	190,86	300,07

Tabela 17. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u gonadama svakog ispitanog primerka klena sa Beljanice, ND-ispod granice detekcije

GONADE															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	1														
	2	9,50	0,20	0,59	1,08	0,04	6,22	59,79	0,79	48,20	0,23	0,05	ND	1,40	179,61
	3														
NOV	1														
	2														
	3	11,01	0,23	1,78	2,01	0,10	8,06	51,33	0,71	38,65	0,09	0,01	ND	0,89	170,97
DEC	4	1,19	0,26	0,64	0,84	0,06	6,33	52,80	0,80	33,33	0,22	0,04	ND	0,73	136,60
	1	3,62	0,16	0,07	0,38	0,14	9,00	61,97	0,32	44,76	0,50	0,03	0,30	5,21	182,86
	2	ND	0,64	0,09	3,91	0,27	7,34	67,53	0,28	2,77	0,84	1,09	0,11	112,00	385,63
FEB	3	2,71	ND	0,10	1,35	0,23	7,00	57,64	0,36	34,83	0,73	0,04	0,12	15,43	236,83
	4	0,06	0,47	0,12	0,32	0,29	2,02	35,30	0,18	2,76	0,03	0,05	0,33	0,26	95,35
	1	10,96	ND	2,37	0,86	0,28	1,74	42,97	0,52	1,24	0,05	0,08	0,57	0,98	95,01
MAR	2	8,95	ND	0,01	1,78	0,15	10,57	63,61	0,44	48,36	0,05	0,08	0,53	1,72	235,26
	3	1,85	ND	0,83	2,03	0,02	2,14	39,88	0,62	1,81	0,08	0,12	0,85	0,55	161,00
	4	65,75	ND	2,98	0,55	0,53	2,05	46,13	0,84	1,28	0,09	0,13	1,23	0,64	114,42
APR	1	0,58	ND	0,10	0,29	0,01	1,86	24,16	0,23	1,94	0,03	0,04	0,31	0,21	70,94
	2	43,08	ND	0,11	0,94	0,16	2,09	52,16	0,32	5,28	0,03	0,04	1,02	1,29	79,58
	3	16,69	ND	0,10	0,10	0,15	1,86	18,01	0,20	1,34	0,03	0,04	0,32	0,95	55,49
MAJ	4														
	1	26,56	0,31	1,53	1,98	0,02	1,94	29,65	0,52	1,73	0,05	0,08	0,67	0,62	150,42
	2	44,21	ND	4,90	3,79	0,03	3,21	155,43	1,29	1,82	0,11	0,16	1,11	0,41	301,16
JUL	3	7,93	ND	4,79	7,07	0,02	4,92	43,36	0,55	3,63	0,05	0,07	0,82	0,56	406,63
	4	3,77	ND	4,61	2,00	0,15	4,72	39,50	0,91	0,98	0,15	0,09	0,27	0,44	257,39
	1	0,09	ND	1,76	1,88	0,02	13,93	79,02	0,30	14,02	0,27	0,10	0,47	0,80	400,02
AVG	2	0,51	ND	0,16	2,66	0,02	2,01	29,56	0,35	0,90	0,04	0,00	0,19	1,04	109,20
	3	4,05	ND	0,08	0,19	0,01	1,89	28,12	0,30	1,22	0,11	0,03	0,21	0,60	52,05
	4	12,35	ND	0,46	0,60	0,09	3,02	40,89	0,53	1,29	0,11	0,15	0,47	0,50	142,49
SEP	1	13,89	0,71	3,30	5,73	0,15	6,94	57,82	0,33	8,08	0,07	0,10	0,74	1,15	418,95
	2	5,45	ND	0,76	3,55	0,17	18,46	93,01	0,61	24,80	0,80	0,04	0,35	1,61	404,86
	3	0,03	0,12	0,46	1,06	0,05	5,93	61,26	0,39	7,56	0,01	0,00	0,28	0,42	201,75
	1	5,65	ND	0,17	0,67	0,21	9,92	73,12	0,52	49,60	0,05	0,07	0,48	1,93	235,30
	2	42,32	ND	0,91	0,64	0,08	16,58	73,03	0,49	37,89	0,59	0,57	0,28	1,21	248,61
	3	16,50	ND	7,14	7,46	1,78	7,70	119,28	1,02	25,79	0,22	0,08	0,95	2,63	748,41

Tabela 18. Koncentracije metala i metaloida ($\mu\text{g/g}$) u jetri svakog ispitanog primerka klena sa Beljanice, ND-ispod granice detekcije

JETRA															
mesec	red.br.	Al	B	As	Ba	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sr	Zn
OKT	1														
	2	0,25	1,43	ND	ND	0,06	11,40	427,36	ND	4,13	1,35	0,18	ND	0,75	87,82
	3	0,12	1,32	ND	ND	0,00	25,23	372,29	ND	3,45	1,23	0,37	ND	0,41	72,64
NOV	1	1,12	0,43	ND	0,04	0,02	12,58	112,23	0,30	6,17	0,72	ND	ND	0,63	52,54
	2	0,07	0,15	ND	0,02	0,03	22,80	51,01	0,83	3,82	0,78	ND	ND	0,35	76,05
	3	4,40	0,38	ND	0,06	0,03	23,95	97,63	0,83	6,00	0,59	ND	ND	0,37	62,06
	4	1,45	0,55	0,28	0,02	0,05	36,06	129,56	0,83	4,66	0,95	ND	ND	0,38	95,06
DEC	1	3,86	ND	0,10	0,32	0,12	24,82	132,14	0,16	4,45	0,90	0,04	0,12	11,70	314,86
	2	4,70	ND	0,09	ND	0,14	33,43	261,69	0,36	5,03	0,71	0,04	0,35	1,74	120,22
	3	4,46	0,24	0,10	ND	0,17	8,73	77,13	0,43	4,29	1,02	0,04	0,35	0,53	149,74
	4	0,04	ND	0,08	ND	0,12	23,63	122,14	0,33	5,02	0,72	0,05	0,09	0,39	108,34
FEB	1	3,34	ND	0,12	ND	0,18	24,94	196,14	0,22	2,76	0,10	0,05	0,39	0,62	61,45
	2	5,58	ND	0,17	ND	0,04	66,12	173,17	0,30	6,58	0,55	0,07	0,57	2,79	171,01
	3	1,09	ND	0,12	ND	0,06	36,53	407,61	0,98	4,48	0,13	0,19	3,30	1,05	105,45
	4	8,47	ND	0,29	ND	0,59	38,03	156,79	0,51	5,10	0,08	0,12	0,35	0,74	144,77
MAR	1	5,62	ND	0,21	ND	0,10	29,56	218,22	0,39	5,48	0,06	0,08	0,63	0,49	120,17
	2	15,46	ND	0,21	ND	0,02	25,20	118,52	0,48	7,91	0,19	0,06	0,65	1,14	216,79
	3	0,15	ND	0,29	ND	0,03	36,97	143,00	0,48	7,67	0,07	0,19	1,02	2,28	111,49
APR	1	14,14	ND	2,53	0,43	0,11	24,93	154,41	0,80	11,91	0,08	0,12	0,35	0,87	405,52
	2	78,48	ND	0,24	1,13	0,24	42,23	245,08	0,70	9,69	0,07	0,10	0,87	0,97	147,19
	3	9,44	ND	1,05	0,04	0,03	13,28	140,75	0,26	6,64	0,06	0,09	0,59	0,95	156,61
	4	31,02	ND	0,69	0,06	0,42	12,88	90,62	0,52	21,01	0,08	0,12	0,80	0,65	173,60
MAJ	1	0,09	ND	0,17	ND	0,19	15,60	309,38	0,71	5,80	0,52	0,07	0,50	0,44	98,17
	2	0,11	ND	0,16	ND	0,19	29,48	196,16	0,64	6,23	0,06	0,08	0,73	0,89	122,15
	3	8,60	ND	0,25	ND	0,03	46,34	425,43	0,96	4,49	0,50	0,16	0,75	0,57	102,93
	4	33,84	ND	2,03	0,22	0,17	39,44	182,39	0,92	14,42	0,09	0,13	1,22	1,80	169,89
JUL	1	0,15	ND	0,43	0,10	0,01	48,18	188,62	0,72	7,16	0,46	0,08	0,71	1,36	164,11
	2	16,61	ND	1,49	ND	0,48	44,61	157,83	1,55	8,88	0,15	0,25	1,91	1,69	245,16
	3	0,24	ND	0,42	ND	0,02	51,66	623,02	1,36	5,49	0,70	0,01	0,52	0,47	134,27
	4														
AVG	1	0,20	ND	0,36	ND	0,02	43,48	894,05	0,99	6,31	0,27	0,05	1,21	0,69	132,22
	2	1,23	ND	1,34	ND	0,18	76,19	245,43	0,97	5,93	4,45	0,08	0,54	0,68	114,54
	3	0,15	ND	0,26	0,33	0,14	42,44	437,96	0,71	11,05	0,07	0,06	0,32	1,12	95,68
SEP	1	0,26	ND	0,37	ND	0,06	28,57	316,10	0,88	8,61	0,47	0,06	ND	1,52	157,06
	2	1,06	ND	0,39	ND	0,35	28,17	285,59	0,81	9,90	0,69	0,13	0,91	1,12	192,34
	3	0,39	ND	2,68	ND	0,07	45,82	367,63	1,29	19,60	0,19	0,08	ND	8,18	216,83

*detektovano u jednoj jedinki, ** detektovano u dve jedinke, ND-ispod granice detekcije

136

Tabele od 20 – 23 prikazuju korelaciju elemenata unutar svakog tkiva na Uvcu (Tabela 20), na Garašima (Tabela 21), na Peštanu (Tabela 22) i Beljanici (Tabela 23).

Tabela 20. Korelacija elemenata u mišiću (a), škragama (b), gonadama (c) i jetri sa Uvca (Pearson-ov test korelacije, $p < 0.05$, $N=7$)

a)

	Al mišić	B mišić	As mišić	Ba mišić	Cr mišić	Cd mišić	Cu mišić	Fe mišić	Hg mišić	Mn mišić	Mo mišić	Sr mišić	Zn mišić
Al mišić	1,00	0,84	0,76	-0,05	-0,20		0,42	-0,05	-0,27	-0,30	0,80	-0,29	-0,01
B mišić	0,84	1,00	0,97	-0,19	-0,22		0,30	-0,20	-0,57	-0,57	0,96	-0,25	-0,19
As mišić	0,76	0,97	1,00	-0,18	-0,14		0,27	-0,36	-0,73	-0,67	0,94	-0,20	-0,09
Ba mišić	-0,05	-0,19	-0,18	1,00	0,59		0,56	0,51	0,45	0,41	-0,02	0,36	0,84
Cr mišić	-0,20	-0,22	-0,14	0,59	1,00		0,76	0,33	0,10	-0,23	-0,23	-0,37	0,60
Cd mišić						1,00							
Cu mišić	0,42	0,30	0,27	0,56	0,76		1,00	0,51	0,11	-0,32	0,26	-0,53	0,53
Fe mišić	-0,05	-0,20	-0,36	0,51	0,33		0,51	1,00	0,81	0,33	-0,20	-0,17	0,21
Hg mišić	-0,27	-0,57	-0,73	0,45	0,10		0,11	0,81	1,00	0,78	-0,51	0,15	0,12
Mn mišić	-0,30	-0,57	-0,67	0,41	-0,23		-0,32	0,33	0,78	1,00	-0,40	0,66	0,12
Mo mišić	0,80	0,96	0,94	-0,02	-0,23		0,26	-0,20	-0,51	-0,40	1,00	-0,02	-0,08
Sr mišić	-0,29	-0,25	-0,20	0,36	-0,37		-0,53	-0,17	0,15	0,66	-0,02	1,00	0,26
Zn mišić	-0,01	-0,19	-0,09	0,84	0,60		0,53	0,21	0,12	0,12	-0,08	0,26	1,00

b)

	Al škrge	B škrge	As škrge	Ba škrge	Cr škrge	Cd škrge	Cu škrge	Fe škrge	Hg škrge	Mn škrge	Mo škrge	Sr škrge	Zn škrge
Al škrge	1,00	0,17	0,28	-0,09	-0,13		-0,31	-0,24	-0,36	-0,31	0,92	-0,16	0,13
B škrge	0,17	1,00	0,96	-0,16	-0,22		0,34	0,21	0,15	-0,13	-0,05	0,32	0,57
As škrge	0,28	0,96	1,00	-0,27	-0,12		0,16	0,03	-0,12	-0,18	0,07	0,16	0,42
Ba škrge	-0,09	-0,16	-0,27	1,00	0,57		0,24	0,85	0,26	0,81	-0,16	0,75	-0,11
Cr škrge	-0,13	-0,22	-0,12	0,57	1,00		-0,32	0,41	-0,26	0,50	-0,02	0,08	-0,46
Cd škrge						1,00							
Cu škrge	-0,31	0,34	0,16	0,24	-0,32		1,00	0,55	0,39	0,12	-0,62	0,70	0,69
Fe škrge	-0,24	0,21	0,03	0,85	0,41		0,55	1,00	0,54	0,57	-0,38	0,81	0,34
Hg škrge	-0,36	0,15	-0,12	0,26	-0,26		0,39	0,54	1,00	0,01	-0,31	0,32	0,51
Mn škrge	-0,31	-0,13	-0,18	0,81	0,50		0,12	0,57	0,01	1,00	-0,37	0,71	-0,48
Mo škrge	0,92	-0,05	0,07	-0,16	-0,02		-0,62	-0,38	-0,31	-0,37	1,00	-0,43	-0,08
Sr škrge	-0,16	0,32	0,16	0,75	0,08		0,70	0,81	0,32	0,71	-0,43	1,00	0,25
Zn škrge	0,13	0,57	0,42	-0,11	-0,46		0,69	0,34	0,51	-0,48	-0,08	0,25	1,00

c)

	Al gonade	B gonade	As gonade	Ba gonade	Cr gonade	Cd gonade	Cu gonade	Fe gonade	Hg gonade	Mn gonade	Mo gonade	Sr gonade	Zn gonade
Al gonade	1,00	-0,19	-0,21	0,60	0,34		0,11	0,01	0,44	0,34	0,87	-0,06	-0,26
B gonade	-0,19	1,00	0,42	-0,13	0,35		0,85	0,32	0,04	0,20	-0,12	0,26	0,57
As gonade	-0,21	0,42	1,00	-0,40	-0,61		0,30	-0,38	-0,55	-0,60	0,11	-0,27	0,55
Ba gonade	0,60	-0,13	-0,40	1,00	0,27		-0,05	0,49	0,84	0,76	0,60	0,62	-0,26
Cr gonade	0,34	0,35	-0,61	0,27	1,00		0,55	0,61	0,45	0,75	-0,04	0,25	0,05
Cd gonade						1,00							
Cu gonade	0,11	0,85	0,30	-0,05	0,55		1,00	0,50	0,00	0,34	-0,02	0,00	0,73
Fe gonade	0,01	0,32	-0,38	0,49	0,61		0,50	1,00	0,47	0,86	-0,23	0,44	0,43
Hg gonade	0,44	0,04	-0,55	0,84	0,45		0,00	0,47	1,00	0,76	0,45	0,61	-0,45
Mn gonade	0,34	0,20	-0,60	0,76	0,75		0,34	0,86	0,76	1,00	0,11	0,64	0,04
Mo gonade	0,87	-0,12	0,11	0,60	-0,04		-0,02	-0,23	0,45	0,11	1,00	0,05	-0,34
Sr gonade	-0,06	0,26	-0,27	0,62	0,25		0,00	0,44	0,61	0,64	0,05	1,00	-0,15
Zn gonade	-0,26	0,57	0,55	-0,26	0,05		0,73	0,43	-0,45	0,04	-0,34	-0,15	1,00

d)

	Al jetra	B jetra	As jetra	Ba jetra	Cr jetra	Cd jetra	Cu jetra	Fe jetra	Hg jetra	Mn jetra	Mo jetra	Sr jetra	Zn jetra
Al jetra	1,00	0,05	-0,21	-0,37	-0,11	-0,10	0,00	0,01		-0,47	-0,45	0,15	-0,21
B jetra	0,05	1,00	-0,41	-0,26	0,42	0,48	0,51	0,97		0,55	0,32	-0,35	0,65
As jetra	-0,21	-0,41	1,00	0,94	-0,57	-0,81	0,02	-0,51		-0,05	-0,19	0,88	-0,29
Ba jetra	-0,37	-0,26	0,94	1,00	-0,29	-0,70	-0,05	-0,38		0,01	-0,03	0,83	-0,21
Cr jetra	-0,11	0,42	-0,57	-0,29	1,00	0,47	-0,27	0,47		0,01	0,53	-0,44	0,29
Cd jetra	-0,10	0,48	-0,81	-0,70	0,47	1,00	0,02	0,50		0,02	0,03	-0,75	0,17
Cu jetra	0,00	0,51	0,02	-0,05	-0,27	0,02	1,00	0,59		0,57	0,39	-0,21	0,78
Fe jetra	0,01	0,97	-0,51	-0,38	0,47	0,50	0,59	1,00		0,61	0,49	-0,52	0,79
Hg jetra									1,00				
Mn jetra	-0,47	0,55	-0,05	0,01	0,01	0,02	0,57	0,61		1,00	0,59	-0,34	0,74
Mo jetra	-0,45	0,32	-0,19	-0,03	0,53	0,03	0,39	0,49		0,59	1,00	-0,47	0,84
Sr jetra	0,15	-0,35	0,88	0,83	-0,44	-0,75	-0,21	-0,52		-0,34	-0,47	1,00	-0,53
Zn jetra	-0,21	0,65	-0,29	-0,21	0,29	0,17	0,78	0,79		0,74	0,84	-0,53	1,00

Markirano crveno - statistički značajno

Tabela 21. Korelacija elemenata u mišiću (a), škragama (b), gonadama (c) i jetri (d) sa Garaša (Pearson-ov test korelacije, $p < 0.05$ N=5)

a)

	Al mišić	B mišić	As mišić	Ba mišić	Cr mišić	Cu mišić	Fe mišić	Hg mišić	Mn mišić	Mo mišić	Sr mišić	Zn mišić
Al mišić	1,00		-0,62	1,00	1,00	-0,89	-0,71	-0,12	0,54	1,00	0,36	-0,37
B mišić		1,00										
As mišić	-0,62		1,00	-0,62	-0,67	0,32	0,25	-0,18	-0,13	-0,62	-0,07	-0,23
Ba mišić	1,00		-0,62	1,00	1,00	-0,89	-0,71	-0,12	0,54	1,00	0,36	-0,37
Cr mišić	1,00		-0,67	1,00	1,00	-0,88	-0,72	-0,09	0,48	1,00	0,36	-0,37
Cu mišić	-0,89		0,32	-0,89	-0,88	1,00	0,92	0,02	-0,40	-0,89	-0,59	0,70
Fe mišić	-0,71		0,25	-0,71	-0,72	0,92	1,00	-0,06	-0,05	-0,71	-0,58	0,84
Hg mišić	-0,12		-0,18	-0,12	-0,09	0,02	-0,06	1,00	0,15	-0,12	0,74	0,29
Mn mišić	0,54		-0,13	0,54	0,48	-0,40	-0,05	0,15	1,00	0,54	0,45	0,20
Mo mišić	1,00		-0,62	1,00	1,00	-0,89	-0,71	-0,12	0,54	1,00	0,36	-0,37
Sr mišić	0,36		-0,07	0,36	0,36	-0,59	-0,58	0,74	0,45	0,36	1,00	-0,28
Zn mišić	-0,37		-0,23	-0,37	-0,37	0,70	0,84	0,29	0,20	-0,37	-0,28	1,00

b)

	Al škrge	B škrge	As škrge	Ba škrge	Cr škrge	Cu škrge	Fe škrge	Hg škrge	Mn škrge	Mo škrge	Sr škrge	Zn škrge
Al škrge	1,00	0,99		0,78	0,99	0,03	1,00	-0,26	0,99	-0,41	0,17	-0,05
B škrge	0,99	1,00		0,78	0,97	0,02	1,00	-0,16	0,99	-0,44	0,19	-0,02
As škrge			1,00									
Ba škrge	0,78	0,78		1,00	0,83	0,38	0,82	-0,16	0,84	-0,02	0,71	0,57
Cr škrge	0,99	0,97		0,83	1,00	0,19	0,99	-0,30	0,98	-0,25	0,22	0,03
Cu škrge	0,03	0,02		0,38	0,19	1,00	0,07	0,01	0,06	0,87	0,30	0,49
Fe škrge	1,00	1,00		0,82	0,99	0,07	1,00	-0,20	1,00	-0,39	0,23	0,02
Hg škrge	-0,26	-0,16		-0,16	-0,30	0,01	-0,20	1,00	-0,21	-0,11	0,15	0,26
Mn škrge	0,99	0,99		0,84	0,98	0,06	1,00	-0,21	1,00	-0,39	0,27	0,05
Mo škrge	-0,41	-0,44		-0,02	-0,25	0,87	-0,39	-0,11	-0,39	1,00	0,15	0,39
Sr škrge	0,17	0,19		0,71	0,22	0,30	0,23	0,15	0,27	0,15	1,00	0,95
Zn škrge	-0,05	-0,02		0,57	0,03	0,49	0,02	0,26	0,05	0,39	0,95	1,00

c)

	Al gonade	B gonade	As gonade	Ba gonade	Cr gonade	Cu gonade	Fe gonade	Hg gonade	Mn gonade	Mo gonade	Sr gonade	Zn gonade
Al gonade	1,00	0,37		0,31	0,18	0,58	0,26	0,12	-0,16	0,51	-0,14	0,22
B gonade	0,37	1,00		-0,15	-0,20	0,83	0,99	-0,07	0,30	0,93	0,71	0,83
As gonade			1,00									
Ba gonade	0,31	-0,15		1,00	-0,70	0,13	-0,26	0,14	-0,37	0,23	-0,75	-0,41
Cr gonade	0,18	-0,20		-0,70	1,00	-0,31	-0,16	0,17	-0,09	-0,43	0,18	0,15
Cu gonade	0,58	0,83		0,13	-0,31	1,00	0,77	-0,44	0,52	0,85	0,47	0,41
Fe gonade	0,26	0,99		-0,26	-0,16	0,77	1,00	-0,09	0,35	0,87	0,79	0,85
Hg gonade	0,12	-0,07		0,14	0,17	-0,44	-0,09	1,00	-0,95	0,03	-0,35	0,37
Mn gonade	-0,16	0,30		-0,37	-0,09	0,52	0,35	-0,95	1,00	0,11	0,63	-0,08
Mo gonade	0,51	0,93		0,23	-0,43	0,85	0,87	0,03	0,11	1,00	0,40	0,68
Sr gonade	-0,14	0,71		-0,75	0,18	0,47	0,79	-0,35	0,63	0,40	1,00	0,68
Zn gonade	0,22	0,83		-0,41	0,15	0,41	0,85	0,37	-0,08	0,68	0,68	1,00

d)

	Al jetra	B jetra	As jetra	Ba jetra	Cr jetra	Cu jetra	Fe jetra	Hg jetra	Mn jetra	Mo jetra	Sr jetra	Zn jetra
Al jetra	1,00	0,03	0,62		1,00	-0,42	-0,20	0,24	-0,50	-0,09	-0,06	-0,26
B jetra	0,03	1,00	-0,43		0,04	-0,18	0,97	0,56	0,70	0,96	0,73	0,94
As jetra	0,62	-0,43	1,00		0,61	-0,20	-0,61	0,28	-0,57	-0,60	-0,51	-0,69
Ba jetra				1,00								
Cr jetra	1,00	0,04	0,61		1,00	-0,43	-0,20	0,25	-0,49	-0,08	-0,05	-0,25
Cu jetra	-0,42	-0,18	-0,20		-0,43	1,00	-0,07	-0,70	-0,34	-0,27	-0,66	-0,03
Fe jetra	-0,20	0,97	-0,61		-0,20	-0,07	1,00	0,44	0,79	0,98	0,75	0,99
Hg jetra	0,24	0,56	0,28		0,25	-0,70	0,44	1,00	0,59	0,50	0,62	0,36
Mn jetra	-0,50	0,70	-0,57		-0,49	-0,34	0,79	0,59	1,00	0,80	0,84	0,79
Mo jetra	-0,09	0,96	-0,60		-0,08	-0,27	0,98	0,50	0,80	1,00	0,86	0,97
Sr jetra	-0,06	0,73	-0,51		-0,05	-0,66	0,75	0,62	0,84	0,86	1,00	0,74
Zn jetra	-0,26	0,94	-0,69		-0,25	-0,03	0,99	0,36	0,79	0,97	0,74	1,00

Markirano crveno - statistički značajno

Tabela 22. Korelacija elemenata u mišiću (a), škragama (b), gonadama (c) i jetri sa Peštana (Pearson-ov test korelacije , $p < 0.05$)

a)

	Al mišić	B mišić	As mišić	Ba mišić	Cr mišić	Cu mišić	Fe mišić	Hg mišić	Mn mišić	Mo mišić	Ni mišić	Pb mišić	Sr mišić	Zn mišić
Al mišić	1,00		0,46	0,01	0,08	0,02	0,18	-0,13	-0,11	-0,37	-0,12	0,02	-0,21	0,41
B mišić		1,00												
As mišić	0,46		1,00	-0,13	-0,10	0,04	-0,05	-0,17	0,18	-0,16	-0,10	-0,13	0,05	0,44
Ba mišić	0,01		-0,13	1,00	0,02	-0,22	-0,34	-0,19	0,15	0,10	-0,04	1,00	0,57	0,01
Cr mišić	0,08		-0,10	0,02	1,00	0,00	0,33	-0,26	0,09	0,06	0,01	0,01	0,02	0,26
Cu mišić	0,02		0,04	-0,22	0,00	1,00	0,45	-0,13	0,05	0,12	0,92	-0,23	-0,18	0,24
Fe mišić	0,18		-0,05	-0,34	0,33	0,45	1,00	-0,26	-0,10	-0,01	0,39	-0,33	-0,34	0,10
Hg mišić	-0,13		-0,17	-0,19	-0,26	-0,13	-0,26	1,00	-0,33	-0,36	-0,01	-0,18	-0,29	-0,66
Mn mišić	-0,11		0,18	0,15	0,09	0,05	-0,10	-0,33	1,00	0,49	-0,06	0,11	0,73	0,43
Mo mišić	-0,37		-0,16	0,10	0,06	0,12	-0,01	-0,36	0,49	1,00	0,11	0,07	0,67	0,47
Ni mišić	-0,12		-0,10	-0,04	0,01	0,92	0,39	-0,01	-0,06	0,11	1,00	-0,05	-0,12	0,09
Pb mišić	0,02		-0,13	1,00	0,01	-0,23	-0,33	-0,18	0,11	0,07	-0,05	1,00	0,53	-0,03
Sr mišić	-0,21		0,05	0,57	0,02	-0,18	-0,34	-0,29	0,73	0,67	-0,12	0,53	1,00	0,32
Zn mišić	0,41		0,44	0,01	0,26	0,24	0,10	-0,66	0,43	0,47	0,09	-0,03	0,32	1,00

N=25

b)

	Al škrge	B škrge	As škrge	Ba škrge	Cr škrge	Cu škrge	Fe škrge	Hg škrge	Mn škrge	Mo škrge	Ni škrge	Pb škrge	Sr škrge	Zn škrge
Al škrge	1,00	0,15	0,10	0,42	0,40	0,22	0,31	0,34	0,77	0,36	-0,20	0,88	0,21	0,29
B škrge	0,15	1,00	0,07	-0,24	-0,32	-0,10	0,74	0,48	0,16	-0,21	0,35	0,06	-0,24	-0,37
As škrge	0,10	0,07	1,00	-0,04	0,66	0,24	0,27	0,43	0,01	0,75	-0,16	0,04	-0,12	0,28
Ba škrge	0,42	-0,24	-0,04	1,00	0,36	0,00	-0,02	0,11	0,59	0,32	-0,26	0,38	0,62	0,31
Cr škrge	0,40	-0,32	0,66	0,36	1,00	0,37	0,19	0,13	0,29	0,91	-0,48	0,34	0,26	0,40
Cu škrge	0,22	-0,10	0,24	0,00	0,37	1,00	0,18	0,12	0,24	0,36	-0,27	0,18	0,06	0,48
Fe škrge	0,31	0,74	0,27	-0,02	0,19	0,18	1,00	0,20	0,23	0,29	-0,13	0,20	-0,04	-0,05
Hg škrge	0,34	0,48	0,43	0,11	0,13	0,12	0,20	1,00	0,49	0,12	0,37	0,25	-0,15	0,03
Mn škrge	0,77	0,16	0,01	0,59	0,29	0,24	0,23	0,49	1,00	0,23	-0,20	0,64	0,44	0,28
Mo škrge	0,36	-0,21	0,75	0,32	0,91	0,36	0,29	0,12	0,23	1,00	-0,46	0,33	0,19	0,37
Ni škrge	-0,20	0,35	-0,16	-0,26	-0,48	-0,27	-0,13	0,37	-0,20	-0,46	1,00	-0,10	-0,29	-0,29
Pb škrge	0,88	0,06	0,04	0,38	0,34	0,18	0,20	0,25	0,64	0,33	-0,10	1,00	0,34	0,42
Sr škrge	0,21	-0,24	-0,12	0,62	0,26	0,06	-0,04	-0,15	0,44	0,19	-0,29	0,34	1,00	0,27
Zn škrge	0,29	-0,37	0,28	0,31	0,40	0,48	-0,05	0,03	0,28	0,37	-0,29	0,42	0,27	1,00

N=25

c)

	Al gonade	B gonade	As gonade	Ba gonade	Cr gonade	Cu gonade	Fe gonade	Hg gonade	Mn gonade	Mo gonade	Ni gonade	Pb gonade	Sr gonade	Zn gonade
Al gonade	1,00	0,89	-0,17	-0,17	0,24	-0,05	0,69	-0,17	0,89	0,77	0,84	0,25	0,12	-0,11
B gonade	0,89	1,00	-0,31	-0,25	0,14	-0,09	0,55	-0,23	0,86	0,69	0,69	0,03	0,09	-0,27
As gonade	-0,17	-0,31	1,00	0,79	0,54	0,28	0,17	0,63	-0,31	-0,06	0,15	0,08	0,64	0,78
Ba gonade	-0,17	-0,25	0,79	1,00	0,58	0,30	0,26	0,54	-0,26	0,00	0,23	-0,14	0,58	0,75
Cr gonade	0,24	0,14	0,54	0,58	1,00	0,35	0,62	0,15	0,17	0,26	0,46	-0,08	0,70	0,53
Cu gonade	-0,05	-0,09	0,28	0,30	0,35	1,00	0,42	0,37	0,05	0,48	0,37	0,13	0,58	0,75
Fe gonade	0,69	0,55	0,17	0,26	0,62	0,42	1,00	0,26	0,64	0,75	0,82	0,24	0,40	0,40
Hg gonade	-0,17	-0,23	0,63	0,54	0,15	0,37	0,26	1,00	-0,24	0,21	0,08	0,31	0,37	0,69
Mn gonade	0,89	0,86	-0,31	-0,26	0,17	0,05	0,64	-0,24	1,00	0,74	0,75	0,03	0,13	-0,21
Mo gonade	0,77	0,69	-0,06	0,00	0,26	0,48	0,75	0,21	0,74	1,00	0,82	0,35	0,38	0,29
Ni gonade	0,84	0,69	0,15	0,23	0,46	0,37	0,82	0,08	0,75	0,82	1,00	0,11	0,44	0,32
Pb gonade	0,25	0,03	0,08	-0,14	-0,08	0,13	0,24	0,31	0,03	0,35	0,11	1,00	-0,04	0,28
Sr gonade	0,12	0,09	0,64	0,58	0,70	0,58	0,40	0,37	0,13	0,38	0,44	-0,04	1,00	0,69
Zn gonade	-0,11	-0,27	0,78	0,75	0,53	0,75	0,40	0,69	-0,21	0,29	0,32	0,28	0,69	1,00

N=20

d)

	Al jetra	B jetra	As jetra	Ba jetra	Cr jetra	Cu jetra	Fe jetra	Hg jetra	Mn jetra	Mo jetra	Ni jetra	Pb jetra	Sr jetra	Zn jetra
Al jetra	1,00	-0,07	-0,01	-0,01	0,31	0,07	0,25	0,13	0,52	0,06	0,54	0,56	0,45	0,27
B jetra	-0,07	1,00	-0,16	-0,12	-0,19	0,02	-0,07	0,29	-0,12	0,02	0,28	-0,15	-0,23	-0,13
As jetra	-0,01	-0,16	1,00	0,10	0,03	0,12	-0,32	0,19	0,27	0,15	0,06	-0,21	0,04	0,13
Ba jetra	-0,01	-0,12	0,10	1,00	0,60	-0,13	0,32	0,43	0,50	0,21	0,31	-0,20	0,23	0,59
Cr jetra	0,31	-0,19	0,03	0,60	1,00	0,21	0,57	0,29	0,56	0,13	0,60	0,34	0,53	0,68
Cu jetra	0,07	0,02	0,12	-0,13	0,21	1,00	0,25	0,07	0,12	0,15	0,10	-0,07	0,42	0,43
Fe jetra	0,25	-0,07	-0,32	0,32	0,57	0,25	1,00	-0,04	0,31	-0,19	0,30	0,39	0,29	0,65
Hg jetra	0,13	0,29	0,19	0,43	0,29	0,07	-0,04	1,00	0,24	0,28	0,33	-0,31	0,04	0,10
Mn jetra	0,52	-0,12	0,27	0,50	0,56	0,12	0,31	0,24	1,00	0,09	0,59	0,29	0,61	0,74
Mo jetra	0,06	0,02	0,15	0,21	0,13	0,15	-0,19	0,28	0,09	1,00	0,16	-0,24	0,06	0,19
Ni jetra	0,54	0,28	0,06	0,31	0,60	0,10	0,30	0,33	0,59	0,16	1,00	0,45	0,42	0,43
Pb jetra	0,56	-0,15	-0,21	-0,20	0,34	-0,07	0,39	-0,31	0,29	-0,24	0,45	1,00	0,45	0,23
Sr jetra	0,45	-0,23	0,04	0,23	0,53	0,42	0,29	0,04	0,61	0,06	0,42	0,45	1,00	0,64
Zn jetra	0,27	-0,13	0,13	0,59	0,68	0,43	0,65	0,10	0,74	0,19	0,43	0,23	0,64	1,00

N=22

Markirano crveno - statistički značajno

Tabela 23. Korelacija elemenata u mišiću (a), škrigama (b), gonadama (c) i jetri sa Beljanice (Spearman-ov test korelacije, $p < 0.05$)

a)

	Al mišić	B mišić	As mišić	Ba mišić	Cr mišić	Cu mišić	Fe mišić	Hg mišić	Mn mišić	Mo mišić	Ni mišić	Pb mišić	Sr mišić	Zn mišić
Al mišić	1,00	-0,06	0,25	0,09	0,16	-0,07	0,24	0,08	0,13	-0,01	0,35	0,23	-0,24	-0,02
B mišić	-0,06	1,00	0,08	-0,39	0,14	-0,16	-0,12	0,43	-0,33	-0,28	-0,11	-0,21	-0,15	-0,53
As mišić	0,25	0,08	1,00	0,08	-0,14	0,20	0,15	0,17	0,25	-0,18	0,27	0,09	0,13	-0,13
Ba mišić	0,09	-0,39	0,08	1,00	0,16	0,01	0,20	-0,33	0,66	0,43	0,34	0,33	0,53	0,28
Cr mišić	0,16	0,14	-0,14	0,16	1,00	-0,24	0,13	-0,20	0,05	-0,12	0,37	0,20	0,08	0,07
Cu mišić	-0,07	-0,16	0,20	0,01	-0,24	1,00	0,58	0,09	-0,02	-0,30	-0,08	0,21	-0,24	-0,06
Fe mišić	0,24	-0,12	0,15	0,20	0,13	0,58	1,00	0,03	0,24	-0,19	0,19	0,20	-0,04	0,13
Hg mišić	0,08	0,43	0,17	-0,33	-0,20	0,09	0,03	1,00	-0,33	-0,32	-0,09	-0,24	-0,45	-0,54
Mn mišić	0,13	-0,33	0,25	0,66	0,05	-0,02	0,24	-0,33	1,00	0,45	0,16	0,05	0,56	0,31
Mo mišić	-0,01	-0,28	-0,18	0,43	-0,12	-0,30	-0,19	-0,32	0,45	1,00	0,09	0,02	0,46	0,33
Ni mišić	0,35	-0,11	0,27	0,34	0,37	-0,08	0,19	-0,09	0,16	0,09	1,00	0,24	0,08	0,28
Pb mišić	0,23	-0,21	0,09	0,33	0,20	0,21	0,20	-0,24	0,05	0,02	0,24	1,00	0,16	0,09
Sr mišić	-0,24	-0,15	0,13	0,53	0,08	-0,24	-0,04	-0,45	0,56	0,46	0,08	0,16	1,00	0,19
Zn mišić	-0,02	-0,53	-0,13	0,28	0,07	-0,06	0,13	-0,54	0,31	0,33	0,28	0,09	0,19	1,00

b)

	Al škrge	B škrge	As škrge	Ba škrge	Cr škrge	Cu škrge	Fe škrge	Hg škrge	Mn škrge	Mo škrge	Ni škrge	Pb škrge	Sr škrge	Zn škrge
Al škrge	1,00	-0,07	0,20	0,05	0,09	0,13	0,42	0,08	0,43	0,25	0,42	-0,08	0,09	-0,28
B škrge	-0,07	1,00	-0,49	-0,36	-0,25	-0,23	-0,34	0,16	0,00	-0,72	-0,11	-0,35	-0,32	-0,27
As škrge	0,20	-0,49	1,00	0,25	0,09	0,22	0,21	0,27	0,14	0,52	0,30	0,03	0,19	0,14
Ba škrge	0,05	-0,36	0,25	1,00	0,08	-0,20	0,07	0,07	0,22	0,32	0,17	0,52	0,55	0,04
Cr škrge	0,09	-0,25	0,09	0,08	1,00	0,20	0,08	-0,30	-0,14	0,15	0,17	0,24	0,07	0,10
Cu škrge	0,13	-0,23	0,22	-0,20	0,20	1,00	0,18	0,04	0,21	0,27	0,38	-0,23	-0,02	0,26
Fe škrge	0,42	-0,34	0,21	0,07	0,08	0,18	1,00	0,03	0,39	0,46	0,22	-0,05	0,27	0,01
Hg škrge	0,08	0,16	0,27	0,07	-0,30	0,04	0,03	1,00	0,13	0,07	0,38	-0,25	-0,22	0,15
Mn škrge	0,43	0,00	0,14	0,22	-0,14	0,21	0,39	0,13	1,00	0,34	0,25	-0,26	0,01	-0,20
Mo škrge	0,25	-0,72	0,52	0,32	0,15	0,27	0,46	0,07	0,34	1,00	0,21	0,12	0,34	0,47
Ni škrge	0,42	-0,11	0,30	0,17	0,17	0,38	0,22	0,38	0,25	0,21	1,00	-0,04	-0,14	0,00
Pb škrge	-0,08	-0,35	0,03	0,52	0,24	-0,23	-0,05	-0,25	-0,26	0,12	-0,04	1,00	0,52	-0,06
Sr škrge	0,09	-0,32	0,19	0,55	0,07	-0,02	0,27	-0,22	0,01	0,34	-0,14	0,52	1,00	0,18
Zn škrge	-0,28	-0,27	0,14	0,04	0,10	0,26	0,01	0,15	-0,20	0,47	0,00	-0,06	0,18	1,00

c)

	Al gonade	B gonade	As gonade	Ba gonade	Cr gonade	Cu gonade	Fe gonade	Hg gonade	Mn gonade	Mo gonade	Ni gonade	Pb gonade	Sr gonade	Zn gonade
Al gonade	1,00	0,04	0,35	0,09	0,26	-0,04	0,15	0,33	-0,03	0,06	0,45	0,44	0,18	0,06
B gonade	0,04	1,00	0,02	0,05	0,05	-0,02	-0,02	-0,04	-0,04	0,01	0,09	0,02	0,01	0,03
As gonade	0,35	0,02	1,00	0,54	0,08	0,06	0,21	0,71	-0,15	0,11	0,41	0,48	-0,26	0,47
Ba gonade	0,09	0,05	0,54	1,00	0,04	0,36	0,42	0,43	0,09	0,26	0,26	0,20	0,21	0,74
Cr gonade	0,26	0,05	0,08	0,04	1,00	0,21	0,30	0,09	0,18	0,16	0,21	0,12	0,46	0,20
Cu gonade	-0,04	-0,02	0,06	0,36	0,21	1,00	0,82	0,19	0,80	0,62	0,12	-0,07	0,57	0,75
Fe gonade	0,15	-0,02	0,21	0,42	0,30	0,82	1,00	0,30	0,67	0,55	0,28	0,16	0,51	0,75
Hg gonade	0,33	-0,04	0,71	0,43	0,09	0,19	0,30	1,00	0,06	0,30	0,25	0,40	-0,08	0,35
Mn gonade	-0,03	-0,04	-0,15	0,09	0,18	0,80	0,67	0,06	1,00	0,32	-0,13	0,03	0,57	0,44
Mo gonade	0,06	0,01	0,11	0,26	0,16	0,62	0,55	0,30	0,32	1,00	0,31	-0,18	0,46	0,52
Ni gonade	0,45	0,09	0,41	0,26	0,21	0,12	0,28	0,25	-0,13	0,31	1,00	0,32	-0,02	0,38
Pb gonade	0,44	0,02	0,48	0,20	0,12	-0,07	0,16	0,40	0,03	-0,18	0,32	1,00	-0,12	0,09
Sr gonade	0,18	0,01	-0,26	0,21	0,46	0,57	0,51	-0,08	0,57	0,46	-0,02	-0,12	1,00	0,34
Zn gonade	0,06	0,03	0,47	0,74	0,20	0,75	0,75	0,35	0,44	0,52	0,38	0,09	0,34	1,00

d)

	Al jetra	B jetra	As jetra	Ba jetra	Cr jetra	Cu jetra	Fe jetra	Hg jetra	Mn jetra	Mo jetra	Ni jetra	Pb jetra	Sr jetra	Zn jetra
Al jetra	1,00	-0,21	0,34	0,29	0,28	0,06	-0,28	0,00	0,31	-0,32	0,21	0,34	0,25	0,47
B jetra	-0,21	1,00	-0,58	0,08	-0,37	-0,48	-0,26	-0,26	-0,48	0,60	-0,25	-0,62	-0,52	-0,56
As jetra	0,34	-0,58	1,00	0,13	0,22	0,51	0,17	0,56	0,72	-0,43	0,35	0,46	0,41	0,65
Ba jetra	0,29	0,08	0,13	1,00	-0,02	-0,15	-0,35	-0,03	0,34	-0,20	-0,14	-0,09	0,06	0,12
Cr jetra	0,28	-0,37	0,22	-0,02	1,00	-0,02	-0,04	0,07	0,21	-0,27	0,24	0,25	0,14	0,26
Cu jetra	0,06	-0,48	0,51	-0,15	-0,02	1,00	0,50	0,56	0,27	-0,18	0,19	0,41	0,37	0,22
Fe jetra	-0,28	-0,26	0,17	-0,35	-0,04	0,50	1,00	0,30	0,00	-0,05	0,30	0,17	0,16	-0,10
Hg jetra	0,00	-0,26	0,56	-0,03	0,07	0,56	0,30	1,00	0,36	-0,09	0,03	0,31	0,02	0,20
Mn jetra	0,31	-0,48	0,72	0,34	0,21	0,27	0,00	0,36	1,00	-0,54	0,25	0,38	0,53	0,61
Mo jetra	-0,32	0,60	-0,43	-0,20	-0,27	-0,18	-0,05	-0,09	-0,54	1,00	-0,39	-0,54	-0,32	-0,28
Ni jetra	0,21	-0,25	0,35	-0,14	0,24	0,19	0,30	0,03	0,25	-0,39	1,00	0,53	0,32	0,24
Pb jetra	0,34	-0,62	0,46	-0,09	0,25	0,41	0,17	0,31	0,38	-0,54	0,53	1,00	0,35	0,38
Sr jetra	0,25	-0,52	0,41	0,06	0,14	0,37	0,16	0,02	0,53	-0,32	0,32	0,35	1,00	0,65
Zn jetra	0,47	-0,56	0,65	0,12	0,26	0,22	-0,10	0,20	0,61	-0,28	0,24	0,38	0,65	1,00

Markirano crveno - statistički značajno

BIOGRAFIJA

Karolina Sunjog je rođena 21.12.1982. godine u Pančevu. Osnovnu školu je završila u Banatskom Karlovcu, a Srednju ekonomsku školu u Alibunaru. Na Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se školske 2002/03, a diplomirala 2009. godine. Diplomski rad pod naslovom "Testiranje proizvodnje egzoenzima ksilanaze kod bakterija roda *Bacillus*", uradila je na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta pod rukovodstvom prof. dr Slaviše Stankovića. Nakon završenih studija radila je kao nastavnik bioloških predmeta u osnovnoj i srednjim školama.

Školske 2010/2011. godine upisala je doktorske studije, modul Mikrobiologija, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Branke Vuković-Gačić. Od decembra 2010. godine angažovana je kao student doktorskih studija u izvođenju praktične nastave na Katedri za Mikrobiologiju. Od maja 2011. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na projektu Instituta za multidisciplinarna istraživanja OI 173045 - „Ribe kao bioindikatori stanja kvaliteta otvorenih voda Srbije”, koji finansira Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2012. godine uključena je u evropski COST projekat - „COST action NETLAKE, ES 1201, Networking Lake Observation in Europe”. U maju 2012. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. U okviru svojih istraživanja prati kvalitet površinskih voda u Srbiji preko analize različitih mikrobioloških parametara, procene oštećenja DNK molekula i akumulacije metala i metaloida u različitim tkivima riba.

Od 2012. godine Karolina Sunjog je član Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva genetičara Srbije, Srpskog biološkog društva kao i Srpskog društva za zaštitu voda. Godine 2016. dobila je stipendiju za učešće na konferenciji „The Central and Eastern Europe Conference on Health and the Environment (CEECHÉ)“, koja će se održati u Pragu, Češka. Do sada je objavila 8 naučnih radova, 2 poglavlja u monografiji od međunarodnog značaja i imala 26 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Каролина Суњог _____

број уписа _____ Б3051/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Екогенотоксиколошка процена квалитета површинских вода комет тестом на различитим ткивима клена (*Squalius cephalus* L.)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 29.03.2016. године

Каролина Суњог

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Каролина Суњог

Број уписа Б3051/2010

Студијски програм Биологија

Наслов рада Екогенотоксиколошка процена квалитета површинских вода
комет тестом на различитим ткивима клена (*Squalius cephalus* L.)

Ментор Проф. др Бранка Вуковић-Гачић

Потписани Каролина Суњог

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 29.03.2016. године

Каролина Суњог

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Екогенотоксиколошка процена квалитета површинских вода комет тестом на различитим ткивима клена (*Squalius cephalus* L.)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 29.03.2016. године

Каролина Сурџић

1. **Ауторство** - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.