

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana M. Jovanović Marić

**PROCENA OSETLJIVOSTI *IN VITRO* I *IN VIVO*
TESTOVA U EKOGENOTOKSIKOLOGIJI I
FORMULISANJE SMERNICA ZA NJIHOVU
PRIMENU U ISTRAŽIVANJIMA NA VELIKIM
RAVNIČARSKIM REKAMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jovana M. Jovanović Marić

**SENSITIVITY ASSESSMENT OF *IN VITRO*
AND *IN VIVO* TESTS IN
ECOGENOTOXICOLOGY AND GUIDELINES
FORMULATION FOR THEIR APPLICATION IN
STUDIES OF LARGE LOWLAND RIVERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Mentori:

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

dr Margareta Kračun-Kolarević, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ –
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Komisija:

dr Stoimir Kolarević – viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ -
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Karolina Sunjog – naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

dr Ana Marić – docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

U okviru ove disertacije istraživanja su sprovedena na Katedri za mikrobiologiju, Centru za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja su realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja - „Merenje i modeliranje fizičkih, hemijskih, bioloških i morfo-dinamičkih parametara reka i vodnih akumulacija“ (TR37009), bilateralnog projekta sa Republikom Slovenijom - „Kombinovani *in vivo* i *in vitro* pristup za detekciju genotoksičnog potencijala u akvatičnim sredinama“ i međunarodne ekspedicije „Joint Danube Survey 4“ (JDS4), projekat Međunarodne komisije za zaštitu Dunava (International Commission of the Protection of the Danube River).

Zahvaljujem se Gradskom zavodu za javno zdravlje Beograd, Agenciji za zaštitu životne sredine Republike Srbije, Republičkom hidrometeorološkom zavodu Republike Srbije, udruženju NORMAN (Network of reference laboratories, research centres and related organizations for monitoring of emerging environmental substances), Evropskoj agenciji za hemikalije (European Chemical Agency), Međunarodnoj komisiji za zaštitu Dunava i dr Alexander Kirschner-u, rukovodiocu projekta „Fecal pollution routes of antibiotic resistance in river“, Austrijskog fonda za nauku (Austrian Science Fund, FWF) na ustupljenim podacima.

Veliku zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Branki Vuković-Gačić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na nesebičnoj pomoći tokom svih faza izrade disertacije. Hvala Vam na strpljenju, trudu, vremenu koji ste uložili i svim savetima koji su bili od velikog značaja za oblikovanje ove disertacije.

Nezmernu zahvalnost dugujem mentorki dr Margareti Kračun-Kolarević, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, na pruženom znanju, iskustvu, neprocenjivim savetima, sugestijama i pomoći tokom terenskog rada i rada u laboratoriji. Hvala na svim idejama i sugestijama koje su pomogle u oblikovanju i izradi disertacija. Hvala na svim satima koji su potrošeni u planiranju, organizovanju terena, izvođenju eksperimenata i pomoći prilikom obrade podataka. Hvala na razumevanju i prijateljskoj atmosferi.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Stoimiru Kolareviću, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. Pre svega, hvala što ste mi pružili priliku da se upoznam i zavolim ekogenotoksikologiju. Hvala na uloženom vremenu, trudu, nesebičnoj pomoći i svim savetima koji su pomogli u izradi i oblikovanju disertacije. Hvala na strpljenju i svim odgovorenim pitanjima.

Veliku zahvalnost dugujem dr Karolini Sunjog, naučnom saradniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu na nesebičnoj, stručnoj pomoći i vremenu posvećenom obradi podataka dobijenih u RAPD analizi. Kaća, hvala na strpljenju, savetima i pomoći u laboratoriji, prijateljskoj atmosferi i na svim sugestijama koji su doprineli oblikovanju disertacije.

Najlepše hvala dr Ani Marić, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na izdvojenom vremenu, pomoći prilikom obrade RAPD podataka, savetima i korekcijama koje su doprinele kvalitetu disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Momiru Paunoviću, naučnom savetniku i rukovodiocu Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu na podršci, konstruktivnim savetima i sugestijama koje su značajno uticale na oblikovanje doktorske disertacije.

Hvala prof. dr Vladići Simiću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, i dr Aleksandri Milošković, naučnom saradniku Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu na pomoći tokom terenskih i

eksperimentalnih istraživanja. Aleksandra, hvala Vam na izdvojenom vremenu i svim odgovorima koji su mi pomogli da prevaziđem nedoumice oko obrade podataka.

Zahvaljujem se članovima nacionalnog tima JDS4 ekspedicije na nesebičnoj pomoći, savetima i prijateljskoj atmosferi tokom trajanja ekspedicije.

Posebno se zahvaljujem docentu dr Bojani Žeguri, prof. dr Metki Filipič i ostalim kolegama sa Nacionalnog instituta za biologiju u Ljubljani na pomoći tokom eksperimentalnog rada na ZFL ćelijskoj liniji. Hvala na prenetom znanju i prijateljskoj atmosferi prilikom boravka u vašoj laboratoriji.

Veliku zahvalnost dugujem dr Zoranu Gačiću, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu na strpljenju, savetima i velikoj pomoći prilikom statističke obrade podataka.

Svojim dragim kolegicama dr Jovani Kostić-Vuković, naučnom saradniku, i Jeleni Đorđević, istraživaču saradniku, sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu zahvaljujem na velikoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada, podršci i strpljenju. Hvala vam na prijateljstvu i divnoj atmosferi zbog koje su sati provedeni u laboratoriji proticali mnogo brže. Jelena, hvala na svim genijalnim i kreativnim idejama koje su učinile eksperimentalni rad još zanimljivijim. Takođe, veliku zahvalnost dugujem kolegama dr Mariji Ilić, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, i Petru Smiljaniću, doktorantu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na značajnoj i nesebičnoj pomoći prilikom terenskog rada. Hvala vam na strpljenju, pozitivnoj energiji i smehu zbog kojih smo lakše prebrodili čak i najezdu komaraca na Timoku.

Zahvaljujem se dr Maji Raković, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, i dr Ivanu Nikoliću, naučnom saradniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na vremenu, strpljenju i konstruktivnim savetima vezanih za RAPD analizu.

Veliku zahvalnost dugujem članovima Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu: dr Jeleni Tomović, dr Katarini Zorić, dr Ani Atanacković, dr Božici Vasiljević, dr Nataši Popović, dr Vesni Đikanović, dr Bojani Tubić, dr Jeleni Vranković, dr Katarini Jovičić, dr Stefanu Anđusu, dr Nikoli Marinkoviću, Jeleni Đuknić i Jeleni Čanak Atlagić na pozitivnoj atmosferi, pomoći i divnoj saradnji.

Veliko hvala profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević, prof. dr Slaviši Stankoviću, prof. dr Biljani Nikolić, prof. dr Tanji Berić i dr Dragani Mitić Čulafić na pruženom znanju. Hvala dr Olji Stanojević, dr Bojani Vasiljević, dr Ivici Dimkiću, dr Tamari Janakiev, dr Marini Jovanović, Stefani Cvetković, Stefani Đukanović, Aleksandri Jelišić i Tamari Pavlović na prijatnoj i prijateljskoj atmosferi.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima. Hvala vam na beskrajnom razumevanju, podršci i ljubavi koju mi pružate. Posebno hvala mojim roditeljima na podršci, strpljenju i безусловnoj ljubavi.

Na kraju, hvala ti Miloše na безусловnoj ljubavi i razumevanju. Hvala što si moj oslonac i podrška u svakom trenutku, što si zbog mene postao i „terenac“ i savladao osnovne pojmove genotoksikologije.

Procena osetljivosti *in vitro* i *in vivo* testova u ekogenotoksikologiji i formulisanje smernica za njihovu primenu u istraživanjima na velikim ravničarskim rekama

Sažetak

Uvođenje metoda uslovljenim efektima (eng. *effect based methods*), uključujući i genotoksikološke metode, u programe monitoringa i naučna istraživanja na velikim ravničarskim rekama, omogućilo bi sveobuhvatniju procenu stanja ekosistema i odnosa između samog hemijskog i ekološkog statusa.

Osnovni ciljevi disertacije su ispitivanje osetljivosti *in vitro* i *in vivo* testova u ekogenotoksikologiji i formulisanje smernica za njihovu primenu u istraživanjima velikih ravničarskih reka. Studija je obuhvatila ukupno 17 lokaliteta u slivovima Velike Morave, Save i Dunava. Za procenu genotoksičnog efekta nativnih i koncentrisanih uzoraka rečne vode, *in vitro* pristup obuhvatio je SOS/*umuC* test, alkalni komet test na HepG2 i ZFL ćelijama, kao i analizu ćelijskog ciklusa na ZFL ćelijama. *In vivo* pristup je za procenu genotoksičnosti obuhvatio alkalni, Fpg modifikovani komet test, kao i mikronukleus test na ćelijama krvi *Alburnus alburnus* (uklija). Dodatno, ispitivana je osetljivost RAPD analize u detekciji genotoksičnog efekta. U *in silico* pristupu na osnovu literature analiziran je toksični/genotoksični potencijal hemijskih parametara koji su detektovani u vodi i u ukljajama, a integrativnim metodama vršena je kvantifikacija pritiska zagađenja.

Biotestovi su pokazali različitu osetljivost u detekciji genotoksičnog efekta. U *in vitro* istraživanju koncentrisani uzorci rečne vode su se pokazali pogodnim za testiranje toksičnosti/genotoksičnosti, a ZFL ćelije kao dobar model sistem. U *in vivo* istraživanju *A. alburnus* se pokazao kao pouzdan bioindikator. Najveća osetljivost u detekciji genotoksičnog efekta u ćelijama krvi dobijena je u alkalnom komet testu. *In silico* analizom ne može se izvršiti potpuna predikcija genotoksičnog efekta ksenobiotika na organizme.

Ključne reči: velike ravničarske reke, ekogenotoksikološka istraživanja, *in vitro* pristup, *in vivo* pristup, *in silico* pristup, osetljivost biotestova, ZFL ćelijska linija, *Alburnus alburnus* (uklija), mikrobiološki indikatori fekalnog zagađenja, monitoring uslovljen efektima

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Ekotoksikologija, Genotoksikologija, Mikrobiologija

Sensitivity assessment of *in vitro* and *in vivo* tests in ecogenotoxicology and guidelines formulation for their application in studies of large lowland rivers

Abstract

The implementation of effect based methods, including genotoxicological methods, in monitoring and research programs on large lowland rivers, could provide comprehensive assessment of ecosystem quality and relationship between chemical and ecological status itself.

The main objectives of the dissertation are examination the sensitivity of *in vitro* and *in vivo* tests in ecogenotoxicology and guidelines formulation for their application in studies of large lowland rivers. The study included a total of 17 sites in the Velika Morava, Sava and Danube River basins. To assess the genotoxic effect of native and concentrated river water samples, the *in vitro* approach included the SOS/*umuC* test, alkaline comet test on HepG2 and ZFL cells, and cell cycle analysis on ZFL cells. The *in vivo* approach for genotoxicity assessment included the alkaline, Fpg modified comet and micronucleus test on *Alburnus alburnus* (bleak) blood cells. Also, the sensitivity of RAPD analysis in the detection of genotoxic effects was examined. Within *in silico* approach, based on the literature, the toxic/genotoxic potential of chemical parameters detected in water and bleaks was analyzed while the quantification of pollution pressure was performed by integrative methods.

Bioassays showed different sensitivity in detecting the genotoxic effect. Within *in vitro* study, concentrated river water samples proved to be a suitable for toxicity/genotoxicity testing, and ZFL cells a good model system. Within *in vivo* research, bleak proved to be a reliable bioindicator. The highest sensitivity in the detection of genotoxic effect in blood cells was obtained in the alkaline comet test. A complete prediction of the genotoxic effect of xenobiotics on organisms cannot be performed by *in silico* analysis.

Key words: large lowland rivers, ecogenotoxicology research, *in vitro* approach, *in vivo* approach, *in silico* approach, sensitivity of bioassays, ZFL cell line, *Alburnus alburnus* (bleak), microbiological indicators of fecal pollution, effect based monitoring

Research area: Biology

Area of special interest: Ecotoxicology, Genotoxicology, Microbiology

Lista skraćenica korišćenih u disertaciji:

- 3R - *reduction* (smanjenje), *replacement* (zamena), *refinement* (poboljšanje)
- 4-NQO - 4-nitrohinolin N-oksidi
- 8-oxoG – 8-okso guanin
- AFLB1 – aflatoksin B1
- AO – akridin oranž
- ATTC - eng. *American Type Culture Collection*
- BaP - benzo(a)piren
- BPK₅ – biološka potrošnja kiseonika
- BSA – eng. *bovine serum albumin*
- CDK - ciklin zavisna kinaza
- CI – kondicioni indeks
- CYP enzim – citohrom 450 enzim
- DMSO – dimetil sulfoksid
- EBM – efektima uslovljene metode (eng. *effect based methods*)
- ECHA – Evropska agencija za hemikalije
- EDA - efektima usmerena analiza (eng. *effect directed analysis*)
- EDTA – etilendiaminosirćetna kiselina
- EGF – eng. *epidermal growth factor*
- EtBr – etidijum bromid
- EU – Evropska Unija
- FBS – eng. *fetal bovine serum*
- FET – test akutne toksičnosti na embrionima riba (eng. *fish embryo acute toxicity*)
- Fpg enzim - formamidopirimidin glikozilaza
- GZZJZ Beograd – Gradski zavod za javno zdravlje Beograd
- HepG2 - ćelijska linija humanog karcinoma jetre
- HH – „ježevi“, jedra sa fragmentisanom DNK (eng. *hadgehogs*)
- HPK- hemijska potrošnja kiseonika
- ICP-OES - indukcijom spregnuta plazma – optičko emisiona spektroskopija
- IBR – integrisani odgovor biomarkera (eng. *integrated biomarker response*)
- IPBR – eng. *integrated pollution based response*
- IRR – ćelije sa iregularnim jedrima
- JDS4 – ekspedicija Zajedničkog istraživanja Dunava (eng. *The Joint Danube River Survey 4*)
- LC₅₀ – letalna koncentracija koja dovodi do 50 % smrtnosti (eng. *lethal concentration 50*)
- LC-MS/MS - tačna hromatografija-masena spektrometrija
- LMP – agarozna niske tačke topljenja

LVSPE - ekstrakcije čvrste faze iz uzoraka velike zapremine (eng. *large volume sampling solid phase extraction*)

MDK - maksimalno dozvoljena koncentracija

MN – mikronukleus

MPI – indeks zagađenja metalima

MPN – eng. *most probable number*

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

MUG - metilumberiferil- β -glukuronid

NMP - agarozna normalne tačke topljenja

NOEC – koncentracije bez štetnog efekta (eng. *no observed effect concentration*)

NORMAN udruženje - eng. *network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances*

ODV – Okvirna direktiva o vodama

ONP - O-nitrofenol

ONPG - orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid

OPI – indeks zagađenja organskim jedinjenjima

PAH – policiklični aromatični ugljovodonici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PBS - eng. *phosphate buffered saline solution*

PCB – polohlorovani bifenili (eng. *polychlorinated biphenyls*)

PCR - lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*)

PNEC - pretpostavljena koncentracija koja ne dovodi do efekta (eng. *predicted no-effect concentration*)

QSAR modeli - modeli kvalitativnog odnosa struktura-aktivnost (eng. *qualitative structure-activity relationship models*)

RAPD - nasumično umnožena polimorfna DNK (eng. *random amplified polymorphic DNA*)

REF - relativni faktor obogaćivanja (eng. *relative enrichment factor*)

RHMZ – Republički hidrometeorološki zavod

ROS – reaktivni oblici kiseonika (eng. *reactive oxygen species*)

RS – Republika Srbija

SD – standardna devijacija

SDS - natrijum dodecil sulfat

SE – standardna greška

SEPA – Agencija za zaštitu životne sredine Republike Srbije

SPEC – kontrola procesa ekstrakcije (eng. *solid phase extraction control*)

SumTU – suma toksičnih jedinica

TC – ukupni koliformi (eng. *total coliforms*)

TI %- intenzitet repa komete (eng. *tail intensity*)

TU - toksična jedinica (eng. *toxic unit*)

UPGMA – eng. *unweighted pair group method with arithmetic mean*

ZFL - ćelijska linija jetre zebrica

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Zagađenje velikih ravničarskih reka	1
1.2	Savremeni pristupi u monitoringu kvaliteta površinskih voda	2
1.2.1	Procena ekološkog statusa površinskih voda.....	2
1.2.1.1	Hemijski i fizičko-hemijski parametri u proceni ekološkog statusa površinskih voda.....	3
1.2.1.2	Mikrobiološki parametri u proceni ekološkog statusa površinskih voda	3
1.2.1.3	Biomonitoring.....	4
1.2.2	Efektima uslovljen monitoring	6
1.3	Ekogenotoksikologija i DNK oštećenje kao biomarker u EBM.....	7
1.3.1	Primena <i>in vitro</i> i/ili <i>in vivo</i> testova u ekogenotoksikološkim studijama	7
1.3.1.1	Detekcija genotoksičnog potencijala SOS/ <i>umuC</i> testom	8
1.3.1.2	Detekcija DNK oštećenja komet testom.....	9
1.3.1.3	Detekcija trajnih promena na molekulu DNK mikronukleus testom	10
1.3.1.4	Detekcija promena u ćelijskom ciklusu.....	11
1.3.1.5	Procena genotoksičnosti na osnovu nasumično umnožene polimorfne DNK.....	12
1.3.2	Pristupi u istraživanju u ekogenotoksikologiji.....	13
1.3.3	<i>Ex situ/in vitro</i> istraživanja	14
1.3.4	<i>In situ/in vivo</i> istraživanja	15
1.3.5	<i>In silico</i> pristup	16
1.3.6	Integrirani pristupi u proceni uticaja zagađenja akvatičnih ekosistema	17
1.4	Slivovi velikih ravničarskih reka u Srbiji	17
1.4.1	Sliv Velike Morave	18
1.4.2	Sliv Save	18
1.4.3	Sliv Dunava.....	19
1.5	Procena genotoksičnog potencijala primenom baterije <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> testova	19
2	CILJEVI	21
3	MATERIJAL I METODE	22
3.1	Materijal.....	22
3.1.1	Rastvori.....	22
3.1.2	Medijumi.....	28
3.1.3	<i>S. thyphimurium</i> TA1535/pSK1002.....	30
3.1.4	Ćelijske linije	30
3.1.4.1	HepG2 ćelijska linija	30
3.1.4.2	ZFL ćelijska linija.....	30
3.2	Metode	31

3.2.1	Fizičko-hemijski i hemijski parametri u proceni ekološkog statusa reka.....	31
3.2.1.1	Priprema LVSPE uzoraka rečne vode	32
3.2.2	Mikrobiološki parametri u proceni ekološkog statusa reka	33
3.2.2.1	Uzorkovanje vode.....	33
3.2.2.2	Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja	33
3.2.3	<i>Ex situ</i> i <i>in situ</i> pristup	34
3.2.3.1	Procena citotoksičnog i genotoksičnog efekta.....	34
3.2.3.1.1	SOS/ <i>umuC</i> test	34
3.2.3.1.2	HepG2 i ZFL ćelijske linije.....	35
3.2.3.1.2.1	Kultivacija ćelijskih linija	35
3.2.3.1.2.2	Određivanje broja HepG2 i ZFL ćelija hemocitometrom	36
3.2.3.1.2.3	Tretman ćelijskih linija i priprema ćelijske suspenzije za biotestove	36
3.2.3.1.3	Uzorkovanje uklija	37
3.2.3.1.3.1	Uzorkovanje i metode čuvanja ćelija krvi uklija.....	38
3.2.3.1.3.2	Priprema ćelijske suspenzije krvi uklija.....	38
3.2.3.1.4	Procena citotoksičnosti – diferencijalno bojenje i MTS test.....	38
3.2.3.1.5	Procena genotoksičnosti.....	39
3.2.3.1.5.1	Alkalni i Fpg-modifikovani komet test	39
3.2.3.1.5.2	Mikronukleus test.....	40
3.2.3.2	Protočna citometrija u analizi ćelijskog ciklusa	41
3.2.3.3	RAPD test.....	41
3.2.3.4	Određivanje koncentracije metala i metaloida u tkivima uklija	43
3.2.4	<i>In silico</i> pristup	44
3.2.5	Statističke analize.....	44
3.2.6	Opis područja istraživanja.....	46
3.2.6.1	Sliv Velike Morave.....	46
3.2.6.2	Sliv Save	48
3.2.6.3	Sliv Dunava	50
4	REZULTATI I DISKUSIJA	53
4.1	Istraživanje sliva Velike Morave	53
4.1.1	Analiza fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode na lokalitetima u slivu Velike Morave	53
4.1.1.1	Fizičko-hemijski parametri.....	53
4.1.1.2	<i>In silico</i> analiza.....	54
4.1.1.2.1	Analiza podataka nadzornog monitoringa.....	54
4.1.1.2.2	SumTU analiza.....	57
4.1.2	<i>Ex situ/in vitro</i> pristup.....	58

4.1.2.1	Citotoksični i genotoksični efekat u SOS/ <i>umuC</i> testu.....	58
4.1.2.2	Citotoksični i genotoksični efekat kod HepG2 ćelijske linije	59
4.1.3	<i>In situ</i> pristup	61
4.1.3.1	Opšte fiziološko stanje uzorkovanih jedinki uklija	61
4.1.3.2	Citotoksični efekat na ćelijama krvi uklija.....	61
4.1.3.3	Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija	62
4.1.3.3.1	Alkalni i Fpg-modifikovani komet test	62
4.1.3.3.2	Mikronukleus test.....	64
4.1.3.4	Analiza akumuliranih metala i metaloida u jedinkama uklija	66
4.1.3.5	IBR analiza	67
4.2	Istraživanje sliva Save.....	70
4.2.1	Analiza fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode na lokalitetima u slivu Save.....	70
4.2.1.1	Fizičko-hemijski parametri.....	70
4.2.1.2	<i>In silico</i> analiza.....	70
4.2.1.2.1	Analiza podataka nadzornog monitoringa.....	70
4.2.1.2.2	SumTU analiza.....	73
4.2.2	Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja	73
4.2.3	<i>In situ/in vivo</i> pristup	75
4.2.3.1	Opšte fiziološko stanje izlovljenih uklija	75
4.2.3.2	Citotoksični efekat na ćelijama krvi uklija.....	75
4.2.3.3	Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija	75
4.2.3.3.1	Alkalni komet test	75
4.2.3.3.2	Mikronukleus test.....	77
4.2.3.4	Analiza akumuliranih metala i metaloida u mišiću jedinki uklija.....	78
4.2.3.5	RAPD analiza	79
4.2.3.6	IPBR i IBR analiza	82
4.3	Istraživanje sliva Dunava.....	83
4.3.1	Analiza fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode na lokalitetima u slivu Dunava.....	84
4.3.1.1	Fizičko-hemijski parametri.....	84
4.3.1.2	<i>In silico</i> analiza.....	84
4.3.1.2.1	Analiza podataka nadzornog monitoringa.....	84
4.3.1.2.2	Analiza podataka iz NORMAN baze	87
4.3.1.2.3	SumTU analiza.....	90
4.3.2	Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja	92
4.3.3	<i>Ex situ/in vitro</i> pristup.....	93
4.3.3.1	Citotoksični i genotoksični efekat u SOS/ <i>umuC</i> testu.....	93

4.3.3.2	Citotoksični i genotoksični efekat kod ZFL ćelijske linije.....	93
4.3.4	Efekat LVSPE uzoraka na ćelijski ciklus ZFL ćelija.....	95
4.3.5	<i>In situ/in vivo</i> pristup	96
4.3.5.1	Opšte fiziološko stanje uzorkovanih jedinki uklija	96
4.3.5.2	Citotoksični efekat na ćelijama krvi uklija	97
4.3.5.3	Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija	97
4.3.5.4	Alkalni komet test.....	97
4.3.5.5	Mikronukleus test	99
4.3.5.6	RAPD analiza	100
4.3.5.7	IBR analiza	103
4.4	Formulisanje smernica za primenu <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> testova u ekogenotoksikologiji u istraživanjima na velikim ravničarskim rekama	105
5	ZAKLJUČCI	110
6	LITERATURA	115
7	PRILOZI	137

UVOD

1 UVOD

1.1 Zagađenje velikih ravničarskih reka

Velike ravničarske reke i njihove obale su hiljadama godina značajna mesta za nastanak prvih naselja i razvoj civilizacije jer su predstavljale izvor pijaće vode i hrane, a plodne doline su korišćene za gajenje prvih poljoprivrednih kultura. I danas ove reke imaju važnu ulogu: najveći gradovi smešteni su upravo u dolinama velikih reka, one predstavljaju glavne izvore pijaće vode, koriste se za navodnjavanje poljoprivrednih površina, u hidroenergetici, itd. Međutim, upravo zbog guste naseljenosti obala, ravničarske reke predstavljaju i glavne recipijente otpadnih voda i drugih izvora zagađenja koji dospevaju direktno u njih, bez prethodnog tretmana ili nakon nekog vida njihove prerade (primenom mehaničkih, hemijskih i/ili bioloških postupaka prečišćavanja) u postrojenjima za preradu otpadnih voda. Pored hemijskih agenasa koji u vodenu sredinu dospevaju zajedno sa otpadnim vodama, do promena u hemijskom sastavu sedimenta i vodenog stuba mogu dovesti i hemijski agensi koji u površinske vode dospevaju usled drugih antropogenih aktivnosti (poljoprivreda, stočarstvo, seča šuma, itd.), ali i prirodnih procesa kao što su erozija, padavine, itd.

U zavisnosti od načina dospevanja hemijskih agenasa u površinske vode, izvori zagađenja se mogu podeliti na tačkaste i difuzne (Kirschner i sar., 2009). Tačkasti izvori zagađenja predstavljaju lokalizovane ispuste kao što su ispusti kolektora komunalnih i/ili industrijskih otpadnih voda i procedne vode sa deponija. Sa druge strane, difuzni izvori zagađenja površinskih voda nastaju kao posledica meteoroloških događaja, kada zagađujuće supstance dospevaju u vodenu sredinu usled spiranja zemljišta nakon obilnih padavina, poplava ili kao posledica seče šuma, poljoprivrednih aktivnosti, stočarstva, erozije tla, itd. (de Wit i sar., 2000; Campbell i sar., 2005). Problem upliva zagađujućih supstanci poreklom iz lokalizovanih izvora zagađenja se u velikoj meri može umanjiti uvođenjem sistema za preradu otpadnih voda. Međutim, zemljama u razvoju, poput Srbije, uvođenje kanalizacione mreže i postrojenja za preradu otpadnih voda predstavlja veliki finansijski izdatak, te se veliki deo komunalnih i industrijskih otpadnih voda direktno (bez prethodnog tretmana) ispušta u površinske vode. Za razliku od tačkastih izvora, difuzni izvori zagađenja predstavljaju ozbiljan izazov i za ekonomski razvijene zemlje s obzirom da se uplivi zagađujućih supstanci koje u vodenu sredinu dospevaju na ovaj način često ne mogu predvideti.

Velike ravničarske reke su pod značajnim antropogenim pritiscima, ali ovaj tip vodotokova odlikuje i veliki proticaj vode koji doprinosi razblaženju zagađujućih supstanci. Usled toga, mnogi ksenobiotici se u vodi nalaze u niskim koncentracijama, što otežava ili onemogućava njihovu detekciju standardnim hemijskim analizama.

Međutim, iako se u vodi mogu naći u niskim koncentracijama (ng/l, µg/l), zagađujuće supstance pojedinačno ili u interakciji sa drugim jedinjenjima mogu izazvati različite efekte na akvatične organizme. Na primer, policiklični aromatični ugljovodoni (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH), dioksini, metali i metaloidi, farmaceutici, itd. mogu izazvati toksične (Daughton i Ternes, 1999; Cooman i sar., 2003; Zhou i sar., 2006) i/ili genotoksične efekte (Vargas i sar., 2001; Alvim i dos Reis Martinez, 2019; Khan i sar., 2019). Pored toga, dovode do fizioloških i histopatoloških promena u organima (Kaur i Dua, 2015), ponašaju se kao imunomodulatori (Minguez i sar., 2014; Banday i sar., 2020) ili smanjuju reproduktivni potencijal akvatičnih organizama (Abe i sar., 2001; Runnalls i sar., 2013; Huang i sar., 2016). Dodatno, organska i neorganska jedinjenja mogu se akumulirati u organizmima i biomagnifikovati u lancu ishrane (Kaushik i Kaushik 2007; Katagi, 2010; Zhang i sar., 2015). Svi navedeni efekti mogu dovesti do postepenog narušavanja strukture populacija, do promena sastava zajednica, a sve to kao posledicu može imati smanjenje biodiverziteta i degradaciju čitavih ekosistema.

Zbog karakteristika toka velikih ravničarskih reka može se postaviti pitanje da li je uticaj zagađenja lokalnog karaktera ili se uticaj odražava na određeni sektor reke. Naime, usled velikog

protoka vode dolazi do mešanja i kretanja jedinjenja koja su prisutna u vodenom stubu i sedimentu. Međutim, veliki protok i razblaženje otežavaju procenu uticaja zagađenja na ispitivanom lokalitetu, kao i procenu da li se taj uticaj odražava samo na ograničeno područje, odnosno lokalitet, ili zagađenje utiče na veću oblast. Stoga, da bi se ispitao realan uticaj zagađenja na živi svet koji naseljava vodenu sredinu potrebno je primeniti integrisani pristup koji uključuje hemijske analize u vodi i akvatičnim organizmima, ali i bateriju biotestova sačinjenu od različitih test i/ili model sistema kako bi se detektovale promene na različitim nivoima biološke organizacije.

1.2 Savremeni pristupi u monitoringu kvaliteta površinskih voda

Monitoring i procena kvaliteta površinskih voda zahteva analize hidromorfoloških, fizičko-hemijskih, hemijskih i bioloških karakteristika akvatičnih ekosistema. U skladu sa dobijenim podacima o stanju ekosistema moguće je utvrditi izvore zagađenja ispitivanog vodnog tela i dati smernice o bezbednosti za korišćenje vode za piće, navodnjavanje, u rekreativne svrhe, itd. Međutim, na kvalitet akvatičnih ekosistema utiče veliki broj varijabli (činioci abiotičke i biotičke komponente) i praktično je nemoguće analizirati sve. Zbog toga se postavlja pitanje kako odabrati dovoljan (adekvatan) broj i tipove varijabli koje su reprezentativne i pouzdane u proceni stvarnog stanja ispitivanog ekosistema.

U zavisnosti od ciljeva, postoje tri tipa monitoringa: nadzorni, operativni i istraživački (European Commission, 2000). Nadzorni monitoring daje informaciju o kompletnom statusu ekosistema i procenu dugoročnih promena koje mogu nastati kao posledica antropogenog uticaja. Ovaj tip monitoringa zahteva praćenje stanja ekosistema najmanje godinu dana. Cilj operativnog monitoringa je procena ili potvrđivanje statusa ekosistema koji su identifikovani kao rizični. Istraživački monitoring se sprovodi ukoliko je došlo do narušavanja statusa ekosistema, a uzrok je nepoznat ili u slučaju procene uticaja akcidentnih zagađenja na ekosistem.

Iako u svetu ne postoji jedinstven sistem monitoringa površinskih voda, zemlje članice Evropske Unije (EU), ali i veliki broj evropskih zemalja koje nisu članice, primenjuju zakonske regulative EU o parametarima koji se prate i propisanim graničnim vrednostima tih parametara (European Commission, 2006; European Parliament & Council, 2013). Okvirna direktiva o vodama (ODV) (eng. *Water Frame Directive*) (EU Directive, 2000/60/EC; European Commission, 2000) predstavlja ključnu evropsku zakonsku direktivu u oblasti upravljanja vodama. Jedan od osnovnih ciljeva ODV je zaštita ekološkog statusa akvatičnih ekosistema, sprečavanje daljeg narušavanja statusa i/ili poboljšavanje trenutnog statusa akvatičnih ekosistema EU.

Međutim, trenutno zakonski regulisani sistemi monitoringa EU, kao i zemalja koje nisu članice imaju nedostatke. Pre svega, mnoga hemijska jedinjenja nisu uključena u monitoring (npr. bisfenol A, pesticidi karbamazepin, dimetoat, itd.), a istraživanja su pokazala da su neka od tih jedinjenja često prisutna u površinskim vodama i da mogu izazvati različite efekte u akvatičnim organizmima (toksične, mutagene, narušavanje hormonalne ravnoteže i reproduktivne sposobnosti, promene u ponašanju, itd.) (Kang i sar., 2007; Kim i sar., 2007; Pandey i sar. 2009).

1.2.1 Procena ekološkog statusa površinskih voda

Iako Republika Srbija nije članica EU, zakonodavstvo Republike Srbije je prepoznalo značaj ODV (European Commission, 2000) koja imaju za cilj očuvanje, zaštitu i unapređenje kvaliteta akvatičnih ekosistema. Iz tog razloga, u saglasnosti sa EU pravilnicima, u Republici Srbiji je donet Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (dalje u tekstu Pravilnik) („Službeni glasnik RS” broj 74/2011) i dodatne uredbe: Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u

površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovim dostizanje („Službeni glasnik RS” broj 50/2012) i Uredba o graničnim vrednostima prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovim dostizanje („Službeni glasnik RS” broj 24/2014).

Prema Pravilniku („Službeni glasnik RS” broj 74/2011) procena ekološkog statusa/potencijala se vrši na osnovu analiza bioloških elemenata kvaliteta, hidromorfoloških, hemijskih i fizičko-hemijskih parametara koji su od značaja za biološke elemente za dati tip vodnog tela.

1.2.1.1 Hemijski i fizičko-hemijski parametri u proceni ekološkog statusa površinskih voda

Hemijsko zagađenje je jedan od najdominantnijih tipova zagađenja vodenih ekosistema. Iz tog razloga, kvalitativne i kvantitativne hemijske analize površinskih i podzemnih voda već decenijama predstavljaju osnovu u proceni i praćenju stanja vodenih ekosistema, odnosno u monitoringu vodenih ekosistema. Identifikacija polutanata može ukazati i na izvore zagađenja. Na primer, pesticidi i njihovi produkti transformacije u vodenu sredinu najčešće dospevaju spiranjem okolnog poljoprivrednog zemljišta. Samim tim, detekcija ovih agenasa u vodi može ukazati na poljoprivrednu aktivnost u blizini lokaliteta. Sa druge strane, detekcija povišenih koncentracija metala i metaloida u vodi ukazuje na industrijske aktivnosti, odnosno uticaj industrijskih otpadnih voda, dok prisustvo farmaceutika, proizvoda za ličnu negu, itd. ukazuju na uticaj komunalnih otpadnih voda.

Hemijski status vodnog tela ukazuje da li je ono pod uticajem zagađenja prioriternim supstancama, prioriternim hazardnim i drugim zagađujućim supstancama („Službeni glasnik RS” broj 74/2011). U okviru EU Direktive o prioriternim supstancama (European Parliament & Council, 2013) nalazi se lista od 45 prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci i za njih su propisane maksimalno dozvoljene koncentracije u vodi. Za ove supstance je potvrđeno da predstavljaju opasnost po životnu sredinu i čoveka, zbog čega je neophodno da se smanji njihova pojava u prirodi. U ovu grupu jedinjenja spadaju pesticidi, endokrini disruptori, metali, PAH-ovi, ftalati, polihlorovani bifenili (eng. *polychlorinated byphenils*, PCB), itd. U skladu sa propisima EU, u Republici Srbiji je doneta uredba u kojima su definisane prioriternne supstance i granične vrednosti u površinskim vodama („Službeni glasnik RS” broj 24/2014). Pored prioriternih supstanci, u okviru nadzornog monitoringa važno je uključiti i zagađujuće supstance koje nisu definisane kao prioriternne, ali koje mogu uticati na narušavanje kvaliteta površinskih voda. U okviru Uredbe o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovim dostizanje („Službeni glasnik RS” broj 50/2012) propisane su granične vrednosti nutrijenata (ukupan azot, nitrati, nitriti, ortofosfati, itd.), saliniteta (hloridi, sulfati, ukupna mineralizacija), pojedinih metala i metaloida (arsen, bor, bakr, cink, itd.) i organskih supstanci (fenolna jedinjenja, naftni ugljovodonici, itd.). Poređenjem graničnih vrednosti i izmerene koncentracije u vodi vrši se klasifikacija kvaliteta vode. Za procenu hemijskog statusa važno je uzeti u obzir i fizičko-hemijske elemente, s obzirom da temperatura vode, provodljivost, pH i ostali parametri utiču na rastvorljivost hemijskih agenasa, kao i na moguće hemijske reakcije između ksenobiotika. Imajući u vidu da je do 2013. godine registrovano 72 miliona pojedinačnih supstanci (Brack i sar., 2013) i da određen procenat registrovanih supstanci ima komercijalnu upotrebu pa samim tim mogu dospeti u akvatičnu sredinu, jasno je da se trenutno procena hemijskog statusa površinskih voda zasniva na analizi veoma malog broja hemijskih parametara.

1.2.1.2 Mikrobiološki parametri u proceni ekološkog statusa površinskih voda

Tačkasti i/ili difuzni izvori zagađenja površinskih voda, pored zagađujućih supstanci, mogu dovesti i do upliva mikroorganizama koji su prisutni u fecesu toplokrvnih životinja. Fekalno zagađenje predstavlja važan problem, jer na taj način u vodenu sredinu mogu dospeti patogene

bakterije, virusi i protozoe, zbog čega je potrebno ograničiti njeno korišćenje usled rizika po zdravlje ljudi i životinja. Iz tog razloga važno je vršiti procenu sanitarnog kvaliteta površinskih voda kako bi se preventivno reagovalo, ograničila upotreba kontaminirane vode i na taj način sprečio nastanak oboljenja ljudi i životinja. Međutim, patogeni mikroorganizmi se u vodenoj sredini mogu naći u malom broju, zbog čega ih je teško detektovati, a često zahtevaju i specifične metode za izolaciju i gajenje u laboratorijskim uslovima (Field i Samadpour, 2007). Sa druge strane, mikroorganizmi normalne crevne flore toplokrvnih životinja i čoveka se nalaze u većem broju, te ih je lakše detektovati u akvatičnoj sredini i iz tog razloga su odabrani kao mikrobiološki indikatori fekalnog zagađenja (WHO, 1958). Ukupni koliformi, fekalni koliformi i *Escherichia coli* predstavljaju indikatore koji se danas koriste za procenu mikrobiološkog kvaliteta vode. U koliformnu grupu bakterija spadaju rodovi iz familije Enterobacteriaceae koje fermentišu laktozu. Ukupni koliformi (eng. *total coliforms*, TC) predstavljaju grupu gram negativnih, fakultativno anaerobnih, nesporulišućih bakterija koje fermentišu laktozu uz produkciju gasa i kiseline na 35 ± 2 °C i prisutne su u digestivnom traktu beskičmenjaka i kičmenjaka. Ova grupa bakterija razlaže laktozu pomoću enzima β -galaktozidaze (APHA, 1998). U podgrupu ukupnih koliforma, termotolerantni (fekalni) koliformi spadaju koliformne bakterije koje mogu fermentisati laktozu na $44,5$ °C i poseduju enzime β -galaktozidazu i β -glukuronidazu (Bonde, 1977).

EU Direktiva o kvalitetu vode za piće (European Commission, 1998) propisuje praćenje *E. coli* i fekalnih enterokoka kao mikrobioloških parametara samo za ona vodna tela koja se koristi kao izvor pijaće vode. Sa druge strane, u Republici Srbiji su Pravilnikom („Službeni glasnik RS” broj 74/2011) definisani mikrobiološki parametri koji se koriste za procenu ekološkog statusa svih vodnih tela. Drugim rečima, vrši se procena mikrobiološkog kvaliteta svih vodnih tela koja su uključena u nadzorni monitoring, a ne samo ona koja se koriste kao izvor pijaće vode. U skladu sa navedenim pravilnikom, procena mikrobiološkog kvaliteta se vrši na osnovu broja ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i broja fekalnih enterokoka u 100 ml uzorka vode (ISO 9308-2:2012). Pored toga, određuje se broj aerobnih heterotrofa u 1 ml uzorka i odnos oligotrofnih i heterotrofnih bakterija.

1.2.1.3 Biomonitoring

Rezultati analiza fizičko-hemijskih, hemijskih i mikrobioloških elemenata kvaliteta vode u okviru monitoringa mogu pružiti informacije o izvoru i distribuciji zagađenja akvatičnih ekosistema. Međutim, ovakve analize ne mogu ukazati na efekte pojedinačnih jedinjenja i smeša zagađujućih supstanci na biotičku komponentu ekosistema. Praćenjem promena na različitim nivoima biološke organizacije koje su posledica uticaja zagađenja moguće je utvrditi da li i na koji način pojedinačna ili smeše jedinjenja utiču na akvatične organizme. Iz tog razloga biološki elementi kvaliteta imaju važnu ulogu u proceni ekološkog statusa akvatičnih ekosistema.

Biomonitoring podrazumeva korišćenje organizama, odnosno njihovih odgovora, u praćenju promena u životnoj sredini (Rosenberg, 1998). Nakon dejstva, hemijski agensi u organizmu mogu ostaviti trag (marker, odnosno biomarker) svoje aktivnosti, što je pokazatelj da je došlo do izlaganja organizama. Pri tome, markeri mogu biti hemijski agensi, njihovi produkti metabolizma ili biomarkeri, tj. promene na različitim nivoima biološke organizacije (molekul, ćelija, tkivo, organ, sistem organa, jedinka, zajednica, ekosistem) koje su nastale nakon dejstva hemijskih agenasa (Kostić-Vuković, 2018).

U okviru biomonitoringa, za procenu ekološkog statusa ekosistema koriste se bioindikatori. Organizmi ili zajednice organizama koji mogu detektovati uticaj stresora u životnoj sredini i koji se zbog svoje osetljivosti mogu koristiti za procenu stanja ekosistema definišu se kao bioindikatori (Phillips i Philip, 1994). Pored odgovora na hronično izlaganje zagađujućim agensima, bioindikatori moraju biti osetljivi i na trenutne, nagle promene u okolini (Li i sar., 2010). Da bi se klasifikovali kao bioindikatori akvatičnih ekosistema, potrebno je da se zna ekologija organizama, da deo ili čitav životni ciklus provode u vodenoj sredini, da zauzimaju važno mesto u lancu ishrane,

da se odlikuju velikom brojnošću i širokom rasprostranjenošću jer se na taj način analize mogu više puta ponavljati i vršiti poređenja između različitih lokaliteta. Bioindikator treba da budu i dovoljne veličine kako bi bilo dovoljno tkiva i ćelija za analize. Pored toga, bioindikator treba da se karakterišu relativno lakim uzorkovanjem i uzgajanjem u laboratorijskim uslovima. Zatim, da bi pružili informacije o stanju određenog područja, odnosno lokaliteta, organizmi bi trebalo da budu slabo pokretni ili sesilni. Potrebno je da imaju dovoljno dug životni vek kako bi mogle da se prate eventualne razlike u osetljivosti različitih uzrasnih kategorija prema ispitivanim zagađujućim agensima i potencijalno dejstvo hroničnog izlaganja ksenobioticima (Zhou i sar., 2008).

Za procenu stanja akvatičnih ekosistema, mogu se koristiti različite grupe organizama: alge, vodene makrofite, makrobeskičmenjaci, vodozemci i ribe, pri čemu svaka grupa može ispoljiti različitu osetljivost na prisustvo i dejstvo zagađujućih supstanci (Masese i sar., 2013). Kako bi se izvršila procena ekološkog statusa/potencijala ispitivanog vodnog tela, ODV (European Commission, 2000) i Pravilnik („Službeni glasnik RS” broj 74/2011) propisuju analizu sastava zajednica fitoplanktona, makrofita i fitobentosa, makrobeskičmenjaka i riba. Procena da li je došlo do degradacije ispitivanog akvatičnog ekosistema vrši se na osnovu vrednosti indeksa koji analiziraju parametre raznovrsnosti, saprobnosti i prisustva indikatorskih vrsta i/ili zajednica koje su osetljive na pojavu zagađenja u staništu. Međutim, iako je u okviru nadzornog monitoringa preporučeno praćenje promene u sastavu i strukturi zajednica organizama, treba imati u vidu da promene na ovom nivou biološke organizacije često predstavljaju odloženu reakciju na promene u životnoj sredini. Sa druge strane, bioindikacija se može vršiti i na nižim nivoima biološke organizacije: molekularnom i/ili ćelijskom nivou čime se dobija uvid u prve biološke odgovore na izmene sredinskih uslova. Samim tim, njihova detekcija može predstavljati rane znake upozorenja na promene u akvatičnim ekosistemima.

Izbor odgovarajućeg bioindikatora jedan od najvažnijih koraka i u istraživačkom biomonitoringu, a njihov odabir zavisi od ciljeva biomonitoringa. Za procenu stanja akvatičnih ekosistema najčešće se koriste makrobeskičmenjaci (Rygg, 1986; Rosenberg i Resh, 1993; Buffagni i sar., 2004) i ribe (Stein i sar., 1992; Adams i sar., 1996; Chovanec i sar., 2003). RIBE imaju važnu ulogu u akvatičnim ekosistemima, a zagađujuće supstance mogu uneti u sebe iz vode preko škrga ili konzumacijom kontaminirane hrane (fitoplanktona, zooplanktona, beskičmenjaka, vodenih makrofita). Zbog tih osobina, a pre svega zbog njihovog položaja u lancu ishrane, osetljivosti i značaja u ljudskoj ishrani, ribe se koriste kao bioindikator za procenu nivoa sredinskog zagađenja različitim hemijskim supstancama, među kojima metali i metaloidi zauzimaju značajno mesto (Asuquo i sar., 2004; Sunjog i sar., 2012; Javed i sar., 2016; Kostić i sar., 2017). Metali se mogu podeliti na esencijalne i neesencijalne. Za razliku od esencijalnih elemenata, za koje se zna biološka uloga i koji su neophodni za funkcionisanje organizama, za neesencijalne ta uloga nije utvrđena, a za neke elemente kao što su živa, kadmijum, arsen, itd. je utvrđeno da indukuju negativne metaboličke, fiziološke, histopatološke promene u organizmima (Fallah et al., 2011). Esencijalni elementi u visokim koncentracijama, takođe, mogu imati toksične efekte na organizme (Sfakianakis i sar., 2015). Na primer, hrom, bakar, magnezijum i gvožđe kada se u ćeliji nađu u visokim koncentracijama tokom oksido-redukcionih reakcija dovode do produkcije slobodnih radikala koji mogu narušiti strukturu biomolekula (Sevcikova i sar., 2011). Jedna od glavnih karakteristika metala i metaloida je da se teško ili se uopšte ne mogu degradovati. Pored toga, organizmi ih ne mogu metabolisati, ali ih mogu akumulirati u organima (pre svega u mišićima, jetri, škragama, slezini, gonadama, itd.) i na taj način se mogu prenositi kroz lanac ishrane i dovesti do biomagnifikacije (Ashraf i sar., 2006). Da bi se sprečio rizik po ljudsko zdravlje, uvedene su zakonski regulisane maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) pojedinih metala i metaloida u mišićnom tkivu. Republika Srbija je propisala MDK vrednosti za As, Cd, Cu, Hg, Fe i Pb („Službeni glasnik RS” broj 29/2014), dok je Evropska komisija propisala MDK vrednosti za Cd, Hg, Pb (European Commission, 2006).

1.2.2 Efektima uslovljen monitoring

Jedan od glavnih nedostataka trenutno zakonski definisanih sistema nadzornog monitoringa površinskih voda zemalja EU i Srbije je taj što se u proceni ekološkog statusa analizira koncentracija malog broja supstanci koje su definisane kao prioritetne (European Commission, 2008; European Parliament & Council, 2013), kao i koncentracije ograničenog broja drugih elemenata i jedinjenja (metali, metaloidi, hloridi, fosfati, sulfati, nitrati, nitriti, itd.). Uzimajući u obzir da je u akvatičnim ekosistemima prisutan veliki broj različitih jedinjenja, da je detekcija svih jedinjenja finansijski zahtevna i podrazumeva kompleksne hemijske analize, koje ne mogu ukazati na kumulativno ili antagonističko dejstvo više jedinjenja, rodila se ideja o novom pristupu – efektima uslovljenom monitoringu (eng. *effect based monitoring*). Ovaj tip monitoringa podrazumeva primenu tzv. efektima uslovljenih metoda (eng. *effect based methods*, EBM, u daljem tekstu EBM) i efektima usmerene analize (eng. *effect directed analysis*, EDA) čiji je osnovni cilj detekcija biološkog odgovora na dejstvo jedinjenja iz sredine i identifikacija jedinjenja prisutnih u akvatičnim ekosistemima koja su uzrokovala detektovane efekte (Brack i sar., 2019). Primenom ovakvih analiza moguće je redukovati broj analiziranih supstanci, pri čemu to neće uticati na definisanje krajnje ocene ekološkog statusa. Osnovni koncept efektima uslovljenog monitoringa (Hecker i Hollert, 2009; Weller, 2012; Wernersson i sar., 2015; Brack i sar., 2016) je:

- Primena EBM koje podrazumevaju korišćenje *in vitro* i *in vivo* testova, u kojima se efekti dejstva pojedinačnih supstanci ili smeša na biološke sisteme prate preko različitih biomarkera
- Primena EDA koja podrazumeva primenu hemijskih analitičkih metoda u kojima se vrši identifikacija supstanci u uzorcima za koje je zabeležen odgovor biomarkera
- Povezivanje detektovanih efekata sa identifikovanim supstancama

Primena odgovarajućih biotestova omogućava praćenje efekata na različitim nivoima biološke organizacije (subćelijski, ćelijski, nivo tkiva, organa, jedinke, populacije, zajednice, ekosistem) koji su posledica izlaganja pojedinačnim ili smešama jedinjenja. Samo za one uzorke za koje je detektovan biološki efekat dalje se vrše kompleksne hemijske analize kako bi se identifikovali uzročnici, što redukuje broj skupih i zahtevnih analiza. Do sada su se istraživanja u okviru koncepta EBM najviše bazirala na praćenju efekata izazvanih oksidativnim stresom, endokrinim disruptorima i/ili toksičnim efektima raznih pojedinačnih ili smeša supstanci (Hecker i Hollert, 2009; Schulze i sar., 2010; Weiss i sar., 2011; Higley i sar., 2012; Wernersson i sar., 2015; Brack i sar., 2016). Međutim, subtoksični efekti, naročito oni koji se događaju na nivou DNK molekula su veoma važni jer ne predstavljaju opasnost samo u datom trenutku po te ćelije, odnosno jedinke, već se nastale promene na nivou DNK mogu preneti na potomstvo, što može dovesti do narušavanja genetičke strukture populacije. Iz tog razloga je važno posvetiti veću pažnju ekogenotoksikološkim istraživanjima u biomonitoringu.

Uvođenje EBM u zakonske regulative koje se odnose na monitoring površinskih i podzemnih voda moglo bi da omogući sveobuhvatniju procenu stanja ekosistema i da utvrdi vezu između dobijene procene hemijskog i ekološkog statusa. Međutim, da bi EBM postale deo zakonskih regulativa, neophodno je jasno definisati metodologiju koja bi trebalo da bude ekonomski isplativa i relativno jednostavna za izvođenje, da pruži informacije koje mogu biti primenjene u praksi u okviru plana upravljanja vodama (Wernersson i sar., 2015). Ove metode bi mogle da imaju ulogu u proceni uticaja i pritiska zagađenja na vodna tela za koja se zna da su pod antropogenim pritiskom, ali bi mogle da se primene i u istraživačkom monitoringu u okviru ispitivanja onih oblasti koje nisu nadzornim monitoringom ocenjene kao rizične, jer se nalaze daleko od poznatih izvora zagađenja. Zatim, u EBM se mogu pratiti bio/markeri koji predstavljaju rane znake upozorenja, koji ukazuju na promene u ekosistemu i pre nego što se te promene odraze na višim nivoima biološkim organizacije.

1.3 Ekogenotoksikologija i DNK oštećenje kao biomarker u EBM

Genotoksikologija je oblast koja se bavi ispitivanjem interakcija agenasa sa DNK molekulom i efektima tih interakcija na organizme (Shugart i Theodorakis, 1998). Glavni ciljevi genotoksikologije su detekcija, analiza i određivanje mehanizama delovanja agenasa koji interaguju sa DNK molekulom i izazivaju oštećenja pri niskim koncentracijama ($\mu\text{g/l}$, ng/l) (Moutschen, 1985). Ekogenotoksikologija je grana genotoksikologije čiji je osnovni cilj procena efekata zagađenja ekosistema genotoksičnim agenasima primenom genotoksikoloških metoda (Shugart i Theodorakis, 1998).

Oštećenje DNK molekula je jedan od prvih efekata u organizmu koji može nastati usled izloženosti agensima. Kao posledica dejstva subtoksičnih koncentracija agenasa na nasledni materijal mogu nastati jednolančani, dvolančani prekidi, DNK unakrsne veze, modifikacije baza. Navedene promene na DNK molekulu mogu biti uzrokovane direktnom ili indirektnom interakcijom. Primer direktne interakcije je dejstvo PAH-ova koji se mogu se kovalentno vezivati za DNK molekul i na taj način narušavaju njegov integritet. Sa druge strane, primer indirektno interakcije su agensi koji dovode do produkcije slobodnih radikala u ćelijama koji potom interaguju sa DNK molekulom. Iako ćelije poseduju kompleksne mehanizme za reparaciju DNK molekula, neka oštećenja mogu ostati neispravljena i indukovati mutacije. Ukoliko se DNK oštećenja u somatskim ćelijama ne isprave, ona mogu indukovati mutagenezu i/ili kancerogenezu, što može dovesti do negativnih efekata u pogledu fiziološkog stanja i preživljavanja jedinke (Waters i sar., 1999). Ukoliko se ne isprave DNK oštećenja u gametima, nastaću mutacije koje se mogu odraziti na reprodukciju i mogu se preneti na sledeće generacije.

U ekogenotoksikološkim istraživanjima važno je razgraničiti citotoksičan u odnosu na genotoksičan efekat. Toksične koncentracije jedinjenja indukuju, pored narušavanje strukture ostalih biomolekula i ćelijskih struktura, visok stepen oštećenja DNK, zbog čega dolazi do fragmentacije ovog molekula, smrti ćelije (apoptoze ili nekroze) pa i samog organizma. Sa druge strane, u genotoksikologiji se prate promene na genetičkom materijalu koje ne dovode do smrti ćelije i/ili organizma. Da bi se isključio potencijalni toksični efekat u daljoj analizi, paralelno sa genotoksikološkim testovima trebalo bi uraditi i testove za procenu vijabilnosti ćelija, odnosno citotoksičnosti. Sa tim u vezi, u naučnoj javnosti koja se bavi datom problematikom uspostavljen je konsenzus po kome granična stopa preživljavanja iznosi 70 %, odnosno stopa preživljavanja niža od 70 % ukazuje na citotoksični efekat i takvi uzorci ne ulaze u analize genotoksičnih efekata (Tice i sar., 2000).

1.3.1 Primena *in vitro* i/ili *in vivo* testova u ekogenotoksikološkim studijama

Za procenu uticaja genotoksičnih agenasa na organizme razvijeni su *in vitro* i/ili *in vivo* testovi koji podrazumevaju upotrebu prokariotskih i eukariotskih model/test sistema. Jedan od najčešće korišćenih prokariotskih testova za procenu genotoksičnog potencijala nativnih i koncentrisanih uzoraka iz prirode je standardizovani SOS/*umuC* test na bakterijskom soju *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 (ISO/CD 13829, 2000). U ispitivanju uticaja genotoksičnih agenasa na eukariotske model/test sisteme često se koriste dva testa: komet test (test elektroforeze pojedinačnih ćelija na gelu, eng. *single cell gel electrophoresis*), u kome se detektuje DNK oštećenje kao biomarker izlaganja, i mikronukleus test, u kome se detektuje DNK oštećenje kao biomarker efekta. Međutim, iako je danas veliki broj testova razvijen i dalje deo njih nije standardizovan, što predstavlja problem u poređenju rezultata dobijenih u različitim laboratorijama.

S obzirom da biotestovi omogućuju detekciju samo određenog tipa oštećenja DNK molekula, sve više se ističe važnost primene baterije biotestova, odnosno primena više različitih biotestova čime se dobijaju kompletnije informacije o uticaju kako pojedinačnih hemijskih agenasa, tako i kompleksnih hemijskih smeša i njihovih mehanizama dejstva (Dar i sar., 2016, Kolarević i

sar., 2016a; 2016b Kračun-Kolarević i sar., 2016). Pored toga, da bi se dobio kompletniji uvid o uticaju ispitivanih agenasa na biološke sisteme važno je da baterija biotestova obuhvati i ispitivanja na više nivoa biološke organizacije. Korišćenjem baterije testova može se ispitivati osetljivost odabranih testova i/ili eksperimentalnih test, odnosno model sistema, što može biti od velike važnosti za buduća istraživanja.

Oštećenja DNK molekula, takođe, nastaju spontano u normalnim uslovima, bez dejstva agenasa, zbog čega za svaku ćelijsku liniju/organizam postoji određeni nivo bazalnog oštećenja DNK molekula. U istraživanjima bazalni nivo DNK oštećenja ćelijskih linija se određuje nakon gajenja netretiranih ćelija u odgovarajućem hranljivom medijumu. Ukoliko se istraživanja sprovode na organizmima, najčešće se bazalni nivo DNK oštećenja određuje u laboratorijskoj netretiranoj grupi organizama, u organizmima koji su uzorkovani direktno iz sredine, sa referentnih lokaliteta, ili u onim koji su nakon uzorkovanja prošli određen proces aklimacije u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Kvantifikacija oštećenja kod izlaganih ćelija ili organizama vrši se u odnosu na DNK oštećenja kod kontrolnih grupa (ćelija/organizama). U istraživanjima u kojima se ispituje genotoksični potencijal ekstrakata ili jedinjenja rastvorenih u rastvaračima važno je ispitati da li sam rastvarač indukuje DNK oštećenja. U slučaju da rastvarač indukuje viši nivo DNK oštećenja u odnosu na bazalni, neophodno je prilagoditi koncentraciju rastvarača u uzorcima ili koristiti drugi rastvarač koji nije genotoksičan.

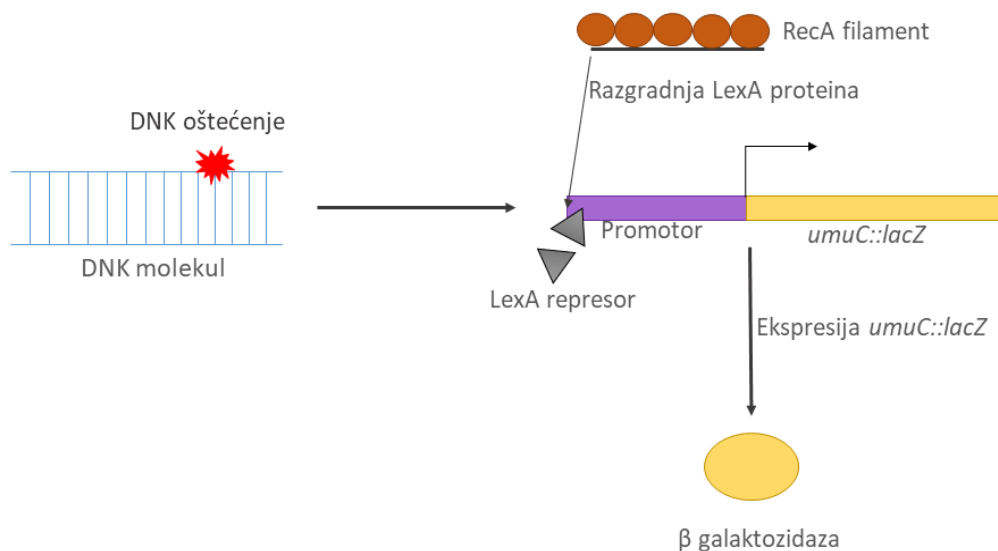
1.3.1.1 Detekcija genotoksičnog potencijala SOS/*umuC* testom

SOS odgovor je prvi put opisan kod *E. coli* i predstavlja specifični mehanizam koji se indukuje u slučaju nastanka mnogobrojnih DNK oštećenja i/ili zaustavljanja replikacije (Radman, 1975). Pored *E. coli*, sposobnost indukcije SOS odgovora imaju i bakterije *Caulobacter crescentus*, *Mycobacterium tuberculosis* (Janion, 2008). Ukoliko neki agens indukuje jednolančani ili dvolančani prekid DNK molekula dolazi do kaskadne ekspresije gena koji su uključeni u proces reparacije. Prvo se ekspimiraju geni *error-free* mehanizama reparacije, koji ne greše u toku reparacije, odnosno nakon procesa reparacije oštećenja DNK sekvenca će biti precizno obnovljena. U ovu grupu mehanizama spadaju nukleotidna i bazna ekscizija, kao i metil zavisna ekscizija pogrešno sparenih baza. Međutim, ukoliko ovi mehanizmi ne isprave sva oštećenja, aktiviraju se *error-prone* mehanizmi, koji ne mogu kao *error-free* mehanizmi, pouzdano „prepoznati“ ispravno ili pogrešno sparene baze, što može dovesti do promena u sekvenci i nastanka mutacija nakon replikacije (Henrikus i sar., 2018). Jedan od *error-prone* mehanizama je translezijska sinteza koja je deo SOS odgovora. Evolutivni značaj SOS odgovora za prokariote je preživljavanje po svaku cenu, odnosno i po cenu nastanka velikog broja mutacija i nastavak replikacije uprkos povećanoj stopi mutagenoze. Regulacija SOS odgovora u koju je uključeno oko 50 gena je pod kontrolom proteina RecA i LexA (Maslowska i sar., 2019). Istraživanja su pokazala da se SOS odgovor indukuje nakon nastanka jednolančane DNK naspram oštećene DNK matrice (Jaszczur i sar., 2016). Za jednolančanu DNK se vezuje RecA protein formirajući filament i uz prisustvo ATP kao izvora energije prevodi se u aktivnu formu koja indukuje razgradnju LexA proteina koji je represor SOS regulona. Razgradnjom represora indukuje se kaskadna ekspresija SOS gena. Jedan od gena uključenih u *error-prone* mehanizam SOS odgovora je *umuC* gen koji je iskorišćen za SOS/*umuC* test.

Zahvaljujući poznavanju mehanizma SOS odgovora konstruisan je SOS/*umuC* test u kome se prati nivo DNK oštećenja soja *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. U ovom testu prati se nivo ekspresije fuzionisanih *umuC* i *lacZ* gena koji se nalaze na plazmidima i aktiviraju se kao odgovor na DNK oštećenje. Naime, DNK oštećenje je „signal“ za aktivaciju RecA proteina, razgradnju LexA represora i ekspimiranje gena SOS odgovora, u ovom slučaju *umuC* gena (Slika 1.1). Kolorimetrijskim merenjem aktivnosti enzima β galaktozidaze, produkta *lacZ* gena, moguće je odrediti i stepen ekspimiranog *umuC* gena.

Neke hemijske supstance koje su prisutne u vodi mogu ispoljiti genotoksični i/ili mutageni

efekat tek nakon metaboličke obrade (Conney, 1982). Jetra kičmenjaka je glavni organ u kome se odvijaju metabolički procesi, a CYP enzimi (eng. *cytochrome 450*, CYP) imaju važnu ulogu u metaboličkim procesima i aktiviranju promutagena (Franco i sar., 1999; Kamataki i sar., 2002; Chiang i sar., 2011). Uvođenjem enzimske frakcije izolovane iz jetre pacova (S9) u SOS/*umuC* test moguće je u *in vitro* uslovima obuhvatiti i istraživanje promutagena koji su prisutni u uzorcima koji se analiziraju (Nakamura i sar., 1987; Bihari i sar., 1990).



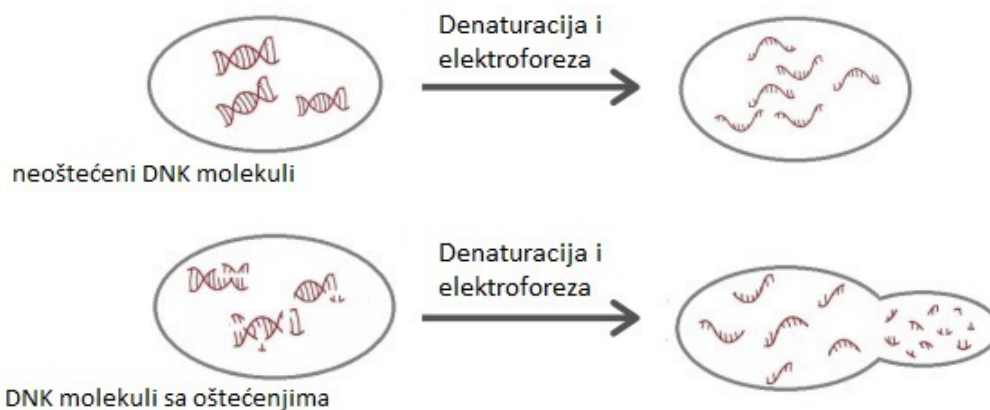
Slika 1.1. Šematski prikaz indukcije SOS odgovora u *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 nakon DNK oštećenja.

1.3.1.2 Detekcija DNK oštećenja komet testom

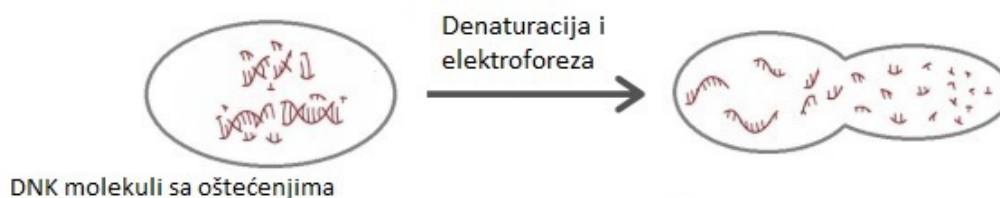
Komet test je metoda u kojoj se mogu detektovati DNK oštećenja pojedinačnih ćelija (Ostling i Johanson, 1984). Danas se najčešće primenjuje alkalna verzija testa pomoću koje je moguće detektovati jednolančane, dvolančane prekide i alkalno labilna mesta (Singh, 1988) (Slika 1.2). Glavne prednosti ovog testa su te što je relativno brz i jeftin, dovoljno senzitiv, moguće je analizirati DNK oštećenja gotovo svih eukariotskih organizama (biljne ćelije, ćelije beskičmenjaka i kičmenjaka) i eukariotskih model sistema (ćelijskih linija). U ovom testu prate se biomarkeri izlaganja i zbog toga se njegovom primenom može detektovati rani odgovor ćelija na dejstvo genotoksina. Zbog navedenih karakteristika, alkalni komet test je našao primenu i u ekogenotoksikologiji (Schnurstein i Braunbeck, 2001; Rajaguru i sar., 2003; Bolognesi i sar., 2004; Frenzilli i sar., 2009; Aborgiba i sar., 2016; Kolarević i sar., 2016b; Kostić i sar., 2016).

Hemijski agensi mogu indukovati DNK oštećenja produkcijom slobodnih radikala (Radetski i sar., 2004; Liu i sar., 2009). Jedna od najvažnijih i najreaktivnijih grupa slobodnih radikala su reaktivni oblici kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS). U reakciji sa DNK molekulom ROS može narušiti strukturu purinskih i pirimidinskih baza i dovesti do nastanka oksidovanih baza, formiranja unakrsnih veza unutar istog lanca ili između lanaca, DNK - protein veza (Cadet i Wagner, 2013). Jedan od najčešćih događaja nakon ROS dejstva na DNK molekul je nastanak oksidovanog guanina (8-oxoG). Da bi se analizirala oštećenja DNK nastala pod uticajem oksidativnog stresa razvijen je modifikovani komet test koja podrazumeva tretman ćelija enzimom fordamidopirimidin glikozilazom (Fpg) koji prepoznaje i iseca oksidovane baze, pre svega 8-oxoG (Tice i sar., 2000). Na taj način se u Fpg-modifikovanom testu, pored jednolančanih i dvolančanih prekida i alkalno labilnih mesta, detektuju apurinska i apirimidinska mesta nastala isecanjem oksidovanih baza. Analizom stepena oštećenja DNK molekula dobijenih u komet i Fpg-modifikovanom testu moguće je uvideti da li je glavni mehanizam indukcije DNK oštećenja produkcija ROS jedinjenja ili ne.

Alkalni komet test



Fpg-modifikovani komet test



Slika 1.2. Šematski prikaz alkalnog i Fpg-modifikovanog komet testa.

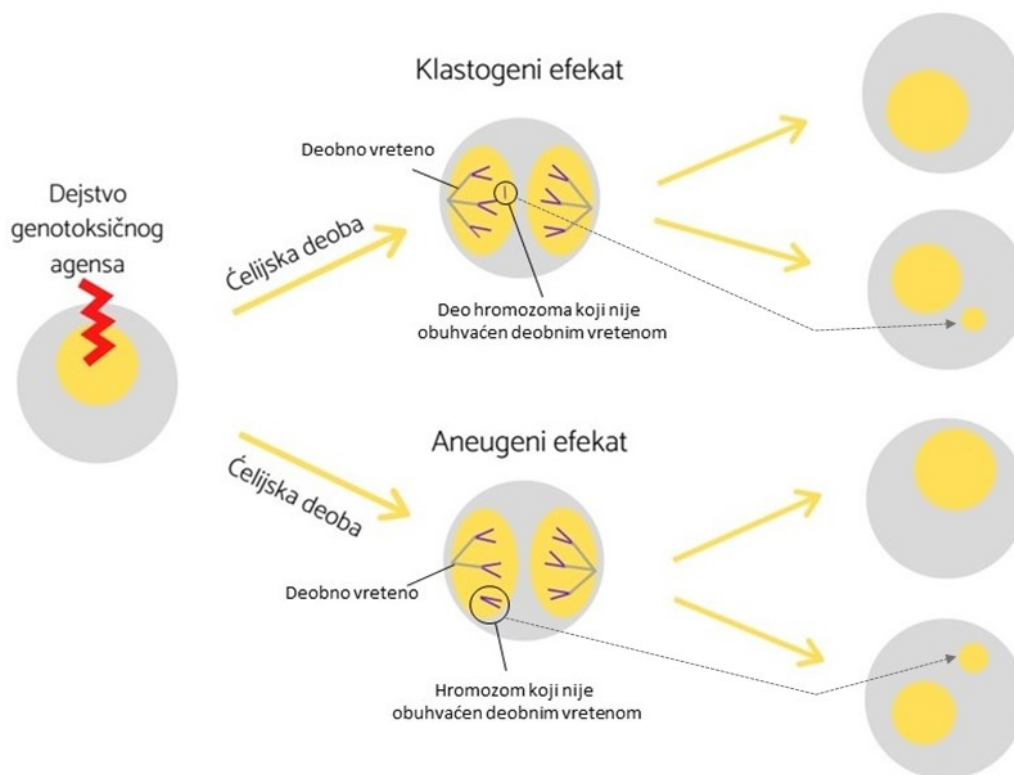
Zbog nabrojanih osobina (osetljivost, ekonomski nije zahtevan za izvođenje, može se koristiti na različitim tipovima ćelija, itd.), alkalni komet test je često korišćena metoda u mnogobrojnim laboratorijama. Međutim, ova metoda još uvek nije standardizovana usled čega postoji velika varijabilnost u samom protokolu između laboratorija (Collins i sar., 2008; Kumaravel i sar., 2009; Møller i sar., 2010). Nepostojanje konsenzusa i međulaboratorijske kalibracije metodologije dovodi do poteškoća prilikom upoređivanja rezultata studija. Poslednjih godina, u cilju metodološke harmonizacije, odnosno međulaboratorijske kolaboracije, uključene su različite institucije kojima se šalju isti uzorci za testiranje kako bi se ispitalo da li postoji varijabilnost u dobijenim rezultatima i ukoliko postoji, koji koraci tokom izvođenja procedure dovode do varijabilnosti rezultata.

1.3.1.3 Detekcija trajnih promena na molekulu DNK mikronukleus testom

Mikronukleus test koristi se za analizu biomarkera efekta, odnosno trajnih promena u genetičkom materijalu. Mikronukleusi predstavljaju delove ili čitave hromozome koji nisu uključeni u deobno vreteno tokom anafaze (Al-Sabti i Metcalfe, 1995; Kirsch-Volders i sar., 2003). Usled delovanja genotoksičnog agensa može doći do fragmentisanja dela hromozoma (klastogeni efekat) ili gubitka čitavog hromozoma (aneugeni efekat), tako da u toku ćelijske deobe ne mogu biti obuhvaćeni deobnim vretenom, ne kreću se ka polovima ćelije i ne ulaze u sastav jedra nakon deobe (Heddle, 1973; Schmidt, 1975) (Slika 1.3). Agensi prisutni u akvatičnim ekosistemima mogu indukovati ovakve hromozomske promene i zbog toga njihova detekcija i kvantifikacija može biti jedna od metoda u okviru monitoringa vodenih ekosistema (Rocha i sar., 2019).

Mikronukleus test je jednostavna i brza metoda koja omogućava detekciju klastogenog i aneugenog efekta, kao i detekciju ćelija sa fragmentisanim jedrom koje mogu biti indikatori

apoptoze (Heddle i sar., 1991). U ekogenotoksikološkim istraživanjima mikronukleus test se često primenjuje na tkivima riba (Ayllon i Garcia-Vazquez, 2000; Baršienė i sar., 2006; Udroui, 2006; de Lemos i sar., 2007; Boettcher i sar., 2010). Jedno od najčešće korišćenih tkiva riba je krv zbog jednostavnog uzorkovanja i pripreme preparata (Hooftman i sar., 1982; Costa i Costa, 2007; Nwani i sar., 2011; Kračun-Kolarević, 2016).



Slika 1.3. Šematski prikaz nastanka mikronukleusa nakon gubitka dela ili čitavog hromozoma.

Iako mikronukleus test ima široku primenu u ekogenotoksikološkim istraživanjima, još uvek ne postoji jasno usaglašene smernice o optimalnom broju ukupno analiziranih ćelija. Naime, pojedini istraživači određuju učestalost pojave mikronukleusa uzimajući u obzir analizu 2.000 jedara po uzorku (de Lemos i sar., 2007; Kim i sar., 2007), dok drugi analiziraju više od 4.000 (Kumar i sar., 2013; Deutschmann i sar., 2016). Savremena istraživanja bave se optimizacijom mikronukleus testa primenom protočne citometrije pomoću koje je moguće izvršiti diskriminaciju ćelija na one sa ili bez mikronukleusa analizom velikog broja „događaja“, odnosno ćelija (preko 10.000). Automatskom analizom uzoraka isključuje se subjektivnost u ovom procesu, odnosno smanjuje se mogućnost previda ili pogrešna detekcija mikronukleusa.

1.3.1.4 Detekcija promena u ćelijskom ciklusu

Ćelijski ciklus čini pet faza: G_1 (presintetička, priprema ćelije za replikaciju), S (faza DNK replikacije), G_2 (postsintetička, priprema ćelije za deobu), M (faza deobe) i G_0 (faza mirovanja) (Shackelford i sar., 1999) između kojih se nalaze tzv. kontrolne tačke (eng. *checkpoints*) u kojima se proverava narušavanje ciklusa ili integriteta njegovih komponenti. Na ovaj način se vrši provera pravilnosti sinteze molekula DNK.

Kontrolne tačke se nalaze između G_1 i S, zatim nakon S, kao i između S i M faza (Shackelford i sar., 1999) i ukoliko je došlo do promena, ćelijski ciklus će biti zaustavljen. Na primer, ćelije koje su izložene genotoksičnim agensima u ranoj G_1 fazi mogu zaustaviti ćelijski

ciklus u kasnoj G₁ fazi, a ukoliko su izložene u kasnoj G₁ ili S fazi, ćelije će odložiti sintezu DNK. Takođe, ukoliko su ćelije izložene genotoksičnim agensima tokom G₂ faze, doći će do njenog prolongiranja i odlaganja mitoze.

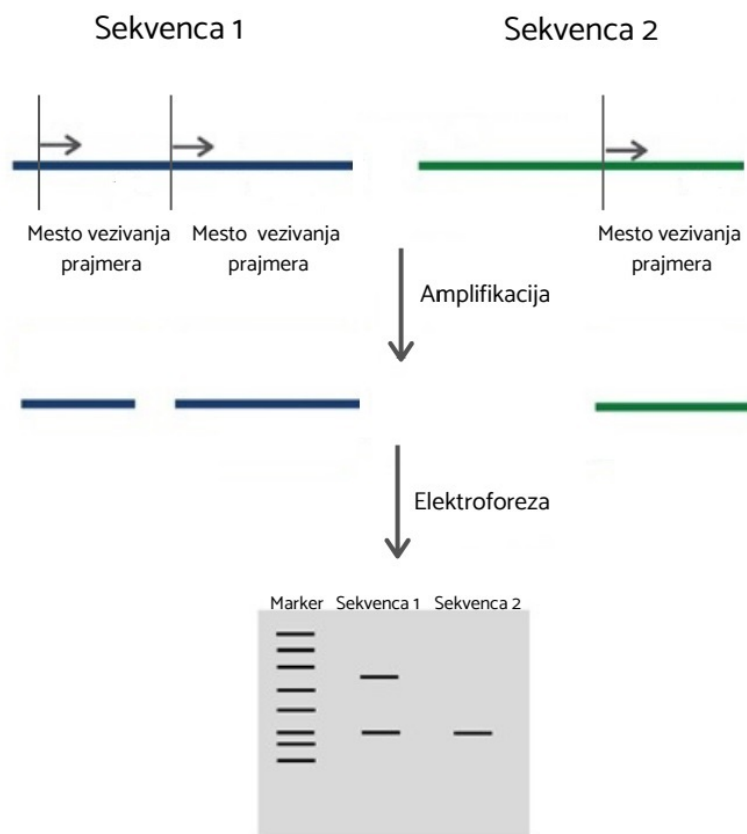
U slučaju kada je prisutan veliki broj DNK oštećenja koja se ne mogu ispraviti, ćelija će ući u proces programirane smrti, odnosno indukovaće se apoptoza (Schafer, 1998). Proteini ciklin zavisne kinase (CDK) imaju važnu ulogu u ćeliji jer regulišu ekspresiju gena koji su neophodni za pravilno odvijanje ćelijskog ciklusa (p53, p21, p16, itd.) (Schafer, 1998). Iz tog razloga, jedan od načina detekcije genotoksičnih i/ili citotoksičnih efekata jeste i praćenje markera specifičnih za određenu fazu ćelijskog ciklusa koji ukazuju da li se ciklus odvija neometano, kao i praćenjem markera koji su indikatori apoptoze.

Primena protočne citometrije je jedna od metoda koja se koristi za ispitivanje uticaja agenasa na ćelijski ciklus. Metoda se zasniva na diskriminaciji ćelija („dogadaja“) koja se može vršiti na osnovu nekoliko parametara: tipa ćelije, veličine, granularnosti, zatim mogu se koristiti različita fluorescentno obojeno antitela ili neki drugi fluorescentno obojeni molekuli (Macey, 2007). U slučaju analize efekata agenasa na ćelijski ciklus mogu se pratiti odgovarajući proteinski markeri proliferacije na osnovu čega se može utvrditi mehanizam dejstva ispitivanih agenasa (Pozarowski i Darzynkiewicz, 2004; Pezdirc i sar., 2013; Štraser i sar., 2013).

1.3.1.5 Procena genotoksičnosti na osnovu nasumično umnožene polimorfne DNK

Nasumično umnožena polimorfna DNK (eng. *random amplified polymorphic DNA*, RAPD) je metoda lančane reakcije polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) u kojoj se koriste kratki prajmeri za nasumičnu amplifikaciju genomske DNK sekvence (Williams i sar., 1990) i ima primenu, pre svega, za mapiranje gena u taksonomiji i populacionoj genetici (Hadrys i sar., 1992; Stammers i sar., 1995; Iruela i sar., 2002). Jedna od osnovnih prednosti metode je u tome što se može primeniti na bilo koju vrstu, bez prethodnog poznavanja genotipa. Iz ugla ekogenotoksikologije, osnovna prednost RAPD metode je što može detektovati mutacije, DNK prekide, adukte, oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom, itd. (Atienzar i sar., 2000). Istraživanja su pokazala da ova metoda može pružiti informacije o efektima genotoksičnih agenasa u *ex situ* i *in situ* uslovima (Atienzar i sar., 2001; Hagger i sar., 2005; Zhou i sar., 2011; Salem i sar., 2014; Kolarević i sar., 2018).

Ukoliko postoji razlika u sekvencama, odabrani prajmeri će se vezivati na različitim mestima i umnožavaće se različiti regioni DNK, što će, nakon elektroforeze, dovesti do nastanka različitih profila fragmenata (umnoženih DNK regiona) (Slika 1.4). Prisustvo i/ili odsustvo, kao i intenzitet fragmenata može se koristiti za procenu sličnosti, odnosno razlika između sekvenci ispitivanih genomskih DNK (Welsh i McClelland, 1990).



Slika 1.4. Šematski prikaz RAPD testa.

1.3.2 Pristupi u istraživanju u ekogenotoksikologiji

Procena uticaja genotoksičnih agenasa na ekosisteme je kompleksan problem i zbog toga su se tokom decenija razvijali različiti pristupi koji bi omogućili što realniji uvid u ovu problematiku. Danas se u okviru ekogenotoksikoloških istraživanja mogu vršiti različiti tipovi biomonitoringa.

Pre svega, istraživanja mogu uključiti *in vitro* i *in vivo* ispitivanja. *In vitro* pristup podrazumeva upotrebu ćelijskih linija i primarnih kultura tkiva. Danas je ovakav tip istraživanja veoma rasprostranjen u različitim granama biologije i medicine, pre svega iz etičkih razloga, odnosno dobrobiti oglednih životinja i 3R pravila (eng. *reduction* - smanjenje, *replacement* - zamena, *refinement* - poboljšanje). Pored toga, karakteristike različitih ćelijskih linija i kultura tkiva su dobro poznate, čime se istraživačima olakšava odabir odgovarajućeg model sistema. Dodatno, rezultati dobijeni u *in vitro* uslovima mogu nam dati informacije o mehanizmima delovanja zagađujućih supstanci na nivou ćelija. Pošto je ćelija osnovna jedinica svakog organizma, rezultati koji se dobijaju na ovom nivou biološke organizacije se mogu ekstrapolirati na sledeće, kompleksnije nivoe, tkiva, odnosno jedinice. Sa druge strane, *in vivo* istraživanja uključuju ispitivanja na čitavom organizmu i mogu pokazati da li postoji integrisani odgovor na nivou čitavog organizma koji je izložen zagađujućim supstancama. Pored toga, *in vivo* ispitivanja se mogu sprovoditi *ex situ*, odnosno u laboratorijskim kontrolisanim uslovima i *in situ*, odnosno direktno u životnoj sredini, na lokalitetu od interesa. Dalje, u *in situ* uslovima moguće je primeniti dve vrste biomonitoringa: pasivni i aktivni. Pasivni monitoring podrazumeva ispitivanje uticaja sredinskog stresa koristeći organizme koje žive na ispitivanom lokalitetu (Kolarević, 2014). Aktivni biomonitoring predstavlja praćenje uticaja sredinskog stresa na organizmima koji su izloženi određeni vremenski period na lokalitetu od interesa (Kolarević, 2014). Organizmi koji se koriste u

aktivnom monitoringu moraju proći proces aklimacije u kontrolisanim laboratorijskim uslovima ili moraju biti uzorkovani sa referentnih lokaliteta.

Postojanje širokog dijapazona pristupa koji se mogu primeniti za ekogenotoksikološke analize može predstavljati i problem jer ne postoji usaglašenost naučne zajednice po pitanju odabira pristupa, odnosno metodologije istraživanja. Tako na primer ne postoje definisane smernice kada raditi *in vitro* ili *in vivo*, odnosno *ex situ* ili *in situ* istraživanje. Zatim, ne postoji jasan konsenzus koje test/model sisteme treba koristiti, te da li je bolje raditi aktivan ili pasivan monitoring, itd.

1.3.3 *Ex situ/in vitro* istraživanja

Kao što je već pomenuto, *ex situ* istraživanja podrazumevaju ispitivanje uticaja agenasa u laboratorijskim uslovima. Čelijske linije predstavljaju jedan od čestih modela koji se koriste u *in vitro* testiranju i imaju široku primenu u ekogenotoksikološkim istraživanjima akvatičnih ekosistema (Segner, 1998).

Kao odgovori na dejstvo toksičnih i subtoksičnih koncentracija agenasa mogu se pratiti promene u „ponašanju“ ćelija (brzina rasta ćelija i vreme između dve deobe, sposobnost ili odsustvo adhezije), učestalost pojave apoptoze, da li je došlo do oštećenja DNK molekula i koji su mehanizmi delovanja agenasa na ćelije. Čelije rastu u monosloju ili formiraju manje agregate zbog čega se može smatrati da su sve ćelije podjednako izložene agensima, što olakšava detekciju njihovog efekta. Pored toga, osobine ćelijskih linija su dobro proučene, što olakšava istraživačima da odaberu odgovarajući model sistem u zavisnosti od efekta koji prate i da primene odgovarajuću metodologiju. Dodatno, *in vitro* istraživanja omogućavaju testiranje u većem broju ponavljanja, što može biti problem u istraživanjima *in vivo*. Iz etičkog ugla, korišćenje ćelijskih linija može redukovati broj žrtvovanih organizama koji se inače koriste u *in vivo* istraživanjima. Međutim, uprkos brojnim prednostima, *in vitro* istraživanja imaju i nedostatke. U akvatičnim ekosistemima dolazi do konstantnih promena uslova koji vladaju u životnoj sredini, te je teško ili nemoguće takve uslove postići u laboratoriji.

Ćelijska linija humanog karcinoma jetre (eng. *human hepatoma cell line*, HepG2) je čest model sistem u toksikološkim (Aston i sar., 2000; Cederbaum i sar., 2001; Marabini i sar., 2006), ali i u genotoksikološkim istraživanjima (Naji-Ali i sar., 1994; Lu i sar., 2004; Žegura i sar., 2009). Jedna od najvažnijih karakteristika HepG2 ćelija, zbog koje se koriste u ovim istraživanjima, je njihova metabolička aktivnost. Naime, ove ćelije poseduju enzime koji su uključeni u fazu I metabolizma ksenobiotika, odnosno CYP enzime i enzime faze II koji su uključeni u procese detoksifikacije (glutation-S transferazu M1, mikrozomalnu epoksidnu hidrolazu, UDP-glukuronsiltransferazu, N-acetil transferazu 1, NADP-kinon reduktazu 1) (Wilkening i sar., 2003). Dejstvom navedenih enzima može doći do prevođenja nemutagene forme ksenobiotika u mutagenu.

Zbog značaja riba kao indikatorskih organizama akvatičnih ekosistema, kao i iz etičkih razloga rodila se ideja o formiranju primarnih ćelijskih kultura riba. Danas postoji preko 300 ćelijskih linija riba, poreklom od različitih vrsta, i izolovanih iz različitih tkiva: ovarijuma, peraja, ribljeg mehura, srca, slezine, jetre, kože, mišića, mozga, itd. (Pandey, 2013). Zbog poikilotermne prirode riba, optimalna temperatura za kultivaciju ovih ćelija je najčešće ispod 30°C, dok se za gajenje koriste hranljivi medijumi za gajenje sisarskih ćelija (Fent, 2001)

Ćelijska linija jetre zebrića (eng. *zebra fish cell line*, ZFL) je poreklom iz zdrave jetre adulta *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Ove ćelije poseduju enzime koji su uključeni u procese metaboličke obrade ksenobiotika i detoksifikacije, kao što su: alanin aminotransferazu, aspartat aminotransferazu, glukoza-6-fosfatazu i enzime slične citohromu P450 1A1 (Ghosh i sar., 1994). Zbog sposobnosti metaboličke aktivacije promutagena ZFL ćelijska linija se često koristi kao model za procenu genotoksičnog potencijala pojedinačnih agenasa (Zakhama-Sraieb i sar., 2016; Novak i sar., 2017) ili složenih smeša iz prirode (Lachner i sar., 2015; Isidori i sar., 2016).

1.3.4 *In situ/in vivo* istraživanja

U okviru *in situ* istraživanja jedan od najbitnijih koraka je odabir odgovarajućeg bioindikatora i biomarkera. Ukoliko se u ovakvom tipu istraživanja koriste *in vivo* testovi za ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog potencijala akvatičnih ekosistema potrebno je da organizmi ispunjavaju kriterijume koji su opisani u delu 1.2.1.3. U ekogenotoksikološkim istraživanjima akvatičnih ekosistema jedna od najčešće korišćenih bioindikatorskih grupa organizama su ribe. Kod mnogih vrsta riba utvrđena je osetljivost na prisustvo genotoksičnih agenasa u vodenoj sredini (Al-Sabti i Metcalfe, 1995, Kostić i sar., 2016; Sunjog i sar., 2016) i sličan odgovor na dejstvo zagađujućih supstanci kao ostale grupe kičmenjaka (Kleinow i sar., 1987). Ribe se mogu okarakterisati kao dobri indikatori s obzirom da naseljavaju gotovo sve akvatične ekosisteme i relativno je lako izvršiti identifikaciju do nivoa vrste. Mnoge vrste mogu imati relativno dug životni vek (2-10 godina), zbog čega se mogu koristiti za praćenje efekta akutnog i hroničnog izlaganja zagađujućim supstancama. Pored toga, ribe zauzimaju najviše trofičke nivoe pa su amplifikatori zagađujućih supstanci akumuliranih na nižim trofičkim nivoima (Al-Sabti i Metcalfe, 1995). Ukoliko se uzorkuju sa izuzetno zagađenih lokaliteta moguće je lako uočiti anatomske i morfološke promene, kao i promene u ponašanju (Weis i sar., 2001).

Pored prednosti riba kao bioindikatora ne treba zanemariti i njihove nedostatke. Pre svega, iako je poželjno da bioindikatorske vrste imaju mali areal kretanja, ribe ipak prelaze manje ili veće distance tokom dnevno/noćnih aktivnosti (potraga za hranom, tokom perioda razmnožavanja, itd.). S obzirom da su agilni organizmi i da mogu migrirati usled stresnih uslova, u pasivnom monitoringu nije moguće sa sigurnošću tvrditi da su jedinke na ispitivanom lokalitetu zaista provele najveći deo životnog ciklusa tu ili period koji je dovoljan da se efekti zagađenja na tom lokalitetu ispolje. Izlovljavanje može izazvati stres jedinki koji takođe može biti detektovan kao odgovor biomarkera. Takođe, često u okviru pasivnog monitoringa nije moguće uzorkovati jedinke iste uzrasne kategorije, pola, itd. U slučaju aktivnog monitoringa, prilikom dizajna ogleda, treba voditi računa o dužini izlaganja i o broju jedinki u ograničenom prostoru u kojem su izlagane pošto ovi parametri mogu uticati na pojavu dodatnog stresa kod oglednih životinja i dovesti do lažnih rezultata.

Vrsta ribe koja pokazuje veliki potencijal u toksikološkim istraživanjima, uključujući i ekogenotoksikološka, je *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) (Slika 1.5). Vrsta *A. alburnus* ili ukljeva, uklija, pripada porodici Cyprinidae i naseljava vode u Evropi i Aziji. Zbog široke rasprostranjenosti, lakog uzorkovanja, velike brojnosti na lokalitetima i arealom kretanja malog radijusa (Williams, 1965), ova vrsta je korišćena u različitim studijama gde se pokazala kao dobar indikator uticaja toksičnih i genotoksičnih agenasa (Linden i sar., 1979; Deutschmann i sar., 2016; Ionescu i sar., 2016; Kolarević i sar., 2016a; Milošković i sar., 2016). Karakteriše se izduženim, bočno spljoštenim telom, malom glavom i dužinom tela do 25 cm. Leđna strana je maslinasto zelene boje, dok je ostatak tela srebrne boje. Najčešće živi u velikim sporotekućim rekama i jezerima, ali se mogu naći i u brzim i plitkim rekama (Simonović, 2001). Žive u jatima i uglavnom se kreću neposredno ispod površine vode. Hrani se larvama insekata, kao i insektima sa površine vode i planktonom (Kottelat i Freyhof, 2007). Nije konzumna vrsta, ali se koristi kao mamac u ribolovu za karnivorne vrste.



Slika 1.5. *Alburnus alburnus* (preuzeto sa sajta: <https://www.ifiske.se/en/fish-common-bleak.htm>).

1.3.5 *In silico* pristup

Poslednjih godina sve veću pažnju naučne javnosti koja se bavi EBM dobija *in silico* pristup (Brack i sar., 2016; Shao i sar., 2019). Pojam *in silico* nastao je krajem osamdesetih godina prošlog veka i odnosi se na istraživanja koja se baziraju na principima matematičkog modelovanja i predviđanja (Langton, 1989). Danas su razvijeni brojni kompjuterski programi i baze podataka u kojima je izvršena podela jedinjenja na osnovu hemijske strukture, ali i efekata detektovanih u istraživanjima *in vitro* i *in vivo*. Pretpostavka je da bi jedinjenja slične hemijske strukture trebalo da imaju sličnu hemijsku aktivnost i, kao posledicu toga, da indukuju sličan biološki odgovor (Palsson, 2000). Ovaj pristup omogućava istraživačima da na osnovu hemijske strukture jedinjenja i analize podataka iz baza (Acute Toxicity Database, ATSDR ToxProfiles, Cefic LRI AMBIT, RepDose, itd.) predvide efekte ispitivanih jedinjenja. Jedan od najčešće korišćenih modela u biološkim istraživanjima je kvalitativni odnos struktura-aktivnost (eng. *qualitative structure-activity relationship models*, QSAR) (Bhatia i sar., 2015). Uvođenje ovakvih modela u istraživanjima ubrzalo bi identifikaciju potencijalnih zagađujućih supstanci za koje ne postoje podaci o njihovim biološkim efektima i to predviđanjem njihovog mehanizma delovanja na biološke sisteme na osnovu hemijske strukture. Međutim, Shao i sar. (2019) su pokazali da QSAR model ipak ne može predvideti efekte svih jedinjenja koji su prisutni u uzorcima iz vodene sredine. Samim tim, primena isključivo *in silico* analize u istraživanjima može dovesti do previda prisustva hemikalija koje se ne nalazi u bazi podataka koja se koristi u modelovanju.

Kao što je pomenuto, u vodenoj sredini je prisutan veliki broj supstanci koje nisu deo nadzornog monitoringa, a koji mogu narušiti ekološki status akvatičnih ekosistema. Iz tog razloga, ispitivanje uticaja supstanci na biološke sisteme i prioritizacija supstanci koje su uzrokovale efekte je od velikog značaja za kontrolu i prevenciju zagađenja, ali i za dalju procenu ekološkog statusa vodnog tela (Dulio i sar., 2018). Veliki broj međunarodnih akreditovanih laboratorija je prepoznalo ovaj problem i formirana je jedinstvena i do sada najobimnija baza podataka u kojoj se pothranjuju informacije o prisustvu nosintetisanih zagađujućih supstanci (eng. *emerging pollutants*), a koje nisu obuhvaćene nadzornim monitoringom akvatičnih ekosistema. Baza podataka pripada NORMAN udruženju (eng. *network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances*, <https://www.norman-network.com>). Najveći akcenat je stavljen na organske supstance koje gotovo svakodnevno dospevaju u vodene ekosisteme, a koje organizmi mogu akumulirati. U ovu grupu spadaju jedinjenja koja su nusprodukti proizvodnih procesa različitih tipova industrija, zatim pesticidi, herbicidi, farmaceutici, jedinjenja poreklom iz proizvoda za ličnu negu, itd. Ova baza podataka je otvorenog tipa po pitanju korišćenja podataka, te je dostupna i istraživačima koji nisu članovi NORMAN udruženja.

NORMAN udruženje primenjuje različite pristupe u detekciji jedinjenja, s obzirom na to da se u nativnim uzorcima mnoga jedinjenja nalaze ispod limita detekcije analitičkih uređaja. Iz tog

razloga su konstruisani uređaji koji filtriraju desetine litara uzoraka vode i te uzorke koncentrišu nekoliko hiljada puta. Na ovaj način je omogućena detekcija i onih jedinjenja koja zbog niskih koncentracija ne bi mogla da se detektuju u nativnim uzorcima. Pored toga, istraživanja ovog udruženja uključuju i detekciju akumuliranih jedinjenja u organizmima kako bi se procenio stvarni uticaj zagađenja na biotičku komponentu ekosistema.

1.3.6 Integrirani pristupi u proceni uticaja zagađenja akvatičnih ekosistema

Detekcija i kvantifikacija jedinjenja koja su prisutna u akvatičnim ekosistemima je prvi korak u proceni uticaja realnih smeša jedinjenja iz životne sredine. Međutim, pojedinačne vrednosti koncentracija jedinjenja koje ulaze u sastav smeša ne daju informacije o kumulativnom ili antagonističkom efektu. Da bi se prevazišao ovaj problem, poslednjih decenija razvijeni su različiti pristupi zasnovani na integraciji vrednosti pojedinačnih merenja u jedinstveni indeks koji predstavlja ukupnu meru rizika jedinjenja na organizme. Jedan od takvih pristupa, nastao šesdesetih godina XX veka, zasniva se na utvrđivanju tzv. toksičnih jedinica (eng. *toxic unit*, TU) (Sprague i Ramsay, 1965). Ovaj pristup ima nekoliko koraka koji uključuju, prvo određivanje koncentracije svih jedinjenja prisutnih u vodenoj sredini, a zatim i detekciju najniže koncentracije pojedinačnih jedinjenja sa toksičnim efektom na model organizam (*Daphnia magna*, *Selenastrum subcapitata*, *Pimephales promelas*, *Danio rerio*, itd.). Najčešće se kao efekat akutnog izlaganja prati najniža koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50 % smrtnosti (eng. *lethal concentration 50*, LC50), dok se za analizu hroničnog izlaganja koristi pretpostavljena koncentracija jedinjenja koja ne dovodi do efekta u organizmima (eng. *predicted no-effect concentration*, PNEC). Odnos izmerene koncentracije i LC50/PNEC vrednosti predstavlja jedinicu toksičnosti za dato jedinjenje. Sabiranjem dobijenih vrednosti toksičnih jedinica za svako jedinjenje koja je prisutno u istom uzorku vode može se utvrditi kumulativni efekat, odnosno ukupan rizik ispitivane smeše po akvatične organizme (Libralato i sar., 2010; Von der Ohe i De Zwart, 2013; Bundschuh i sar., 2014). Baza podataka NORMAN udruženja sadrži podatke najnižih PNEC vrednosti za preko 60.000 supstanci koje su dobijene na osnovu *in vitro* i *in situ* istraživanja i QSAR analizom. Ovi podaci su javno dostupni i mogu se koristiti za računanje sume hroničnih jedinica toksičnosti (eng. *sum of toxic units*, SumTU).

Kao što je već rečeno, primena EBM je od velikog značaja jer može pružiti informacije o efektima na različitim nivoima biološke organizacije, ali, da bi se dobila sveobuhvatna slika o pritiscima zagađivača na nekom lokalitetu, potrebno je povezati sve efekte koji su detektovani u različitim biotestovima. Integrirani odgovor biomarkera (eng. *integrated biomarker response*, IBR) je metoda koja objedinjuje odgovore biomarkera, odnosno efekte dobijene u različitim biotestovima u „generalni indeks stresa“ i na taj način olakšava interpretaciju rezultata i jednostavnije poređenje između lokaliteta (Beliaeff i Burgeot, 2002).

1.4 Slivovi velikih ravničarskih reka u Srbiji

Reke Dunav, Sava, Tisa, Drina, Velika, Južna, Zapadna Morava, Ibar i Kolubara su najveće reke koje protiču kroz teritoriju Republike Srbije i predstavljaju važan resurs. Voda iz ovih reka se koristi za navodnjavanje poljoprivrednih površina, u industrijskim procesima, u hidroenergetici, za sport i rekreaciju. Dodatno, Dunav i Sava su u ovom delu toka plovne zbog čega imaju važnu ulogu u transportnom saobraćaju. Imajući u vidu da naveći broj navedenih tokova, pre svega ravničarskih, protiče kroz gusto naseljene oblasti, glavni izvori zagađenja ovih ekosistema predstavljaju komunalne i industrijske otpadne vode (tačkasti izvori) i spiranje poljoprivrednog zemljišta (kao tip difuznog zagađenja).

U okviru ove doktorske disertacije biće prikazani rezultati istraživanja koja su sprovedena u slivovima Velike Morave, Save i Dunava. Prema osnovnim hidromorfološkim karakteristikama, svi ispitivani lokaliteti se nalaze na sektorima rečnih tokova koji pripadaju tipu ravničarskih reka, ali se razlike ogledaju u protoku vode, tipu podloge, širini i dubini rečnog korita. Pored toga, ispitivani lokaliteti su izloženi različitim tipovima zagađenja.

1.4.1 Sliv Velike Morave

Velika Morava nastaje u blizini Stalaća nakon spajanja Zapadne i Južne Morave i zajedno sa tokom Južne Morave čini najveću nacionalnu reku dužine 480 km. Prosečni godišnji protok Velike Morave u blizini ušća u Dunav iznosi $230 \text{ m}^3/\text{s}$ (Gavrilović i Dukić, 2002), a čitav sliv Velike Morave odlikuju sezonska variranja u visini vodenog stuba i protoku vode (Ocokoljić, 1997). Velika Morava protiče kroz plodnu ravnica koja je gusto naseljena i karakteriše je intenzivna poljoprivredna aktivnost, što za posledicu ima modifikaciju hidromorfoloških (uzrokovano presecanjem meandara, izgradnjom kanala za navodnjavanje, narušavanjem rečnog dna usled eksploatacije peska i šljunka), hemijskih i mikrobioloških karakteristika toka (uzrokovanih uplivom komunalnih i otpadnih voda, čvrstog otpada, nutrijenata i drugih organskih i neorganskih jedinjenja kao posledica poljoprivredne aktivnosti, itd.) (Marković i sar., 2011, 2014; Atanacković, 2015).

Zapadna Morava nastaje spajanjem Đetinje i Moravice nizvodno od Požege i njena dužina iznosi 184 km. Prosečni godišnji protok kod Stalaća iznosi $120 \text{ m}^3/\text{s}$ (Samardžić, 2013). Tok Zapadne Morave je poslednjih decenija značajno izmenjen izgradnjom brana i tri akumulacije (Ovčar, Međuvršeje i Parmenac) koje se nalaze neposredno uzvodno od Čačka. Takođe, ovaj tok je pod značajnim uticajem zagađenja poreklom od neprerađenih komunalnih i industrijskih otpadnih voda, ali i drugih izvora zagađenja kao što su poljoprivredne aktivnosti, stočarstvo, itd.

Južna Morava nastaje spajanjem Preševske i Binačke Moravice kod Bujanovca. Dužina toka je 295 km, a prosečni godišnji protok kod Stalaća iznosi $100 \text{ m}^3/\text{s}$ (Gavrilović i Dukić, 2002). Oblast kroz koju protiče Južna Morava se odlikuje intenzivnom poljoprivrednom aktivnošću, te se ova delatnost smatra jednim od glavnih izvora zagađenja. Pored toga, neprerađene industrijske i komunalne otpadne vode predstavljaju dodatne izvore zagađenja.

Ispitivanje u slivu Velike Morave obuhvatilo je veliko geografsko područje sliva koje je pod uticajem različitih tipova zagađenja. U okviru ovog istraživanja odabrano je osam lokaliteta: dva na Velikoj Moravi, tri na Zapadnoj i tri na Južnoj Moravi.

1.4.2 Sliv Save

Sava nastaje u Sloveniji, spajanjem Save Bohinjke i Save Dolinke, i predstavlja značajnu desnu pritoku Dunava, u koji se uliva u Srbiji. Dužina čitavog toka je 940 km, dok deo toka koji protiče kroz Srbiju iznosi 206 km (Gavrilović i Dukić, 2002). Kroz Srbiju protiče donji deo toka Save koji karakterišu hidromorfološke odlike ravničarske reke. Prosečni godišnji protok Save kod Sremske Mitrovice iznosi $1500 \text{ m}^3/\text{s}$ (Gavrilović i Dukić, 2002). Iako postoje sezonske fluktuacije u vodostaju i protoku, one nisu izražene kao u slučaju vodotokova Velike, Zapadne i Južne Morave. Upravo zbog hidromorfoloških karakteristika donjeg dela toka i plodnih ravnica kroz koje protiče, ovaj sektor reke je pod uticajem zagađenja poreklom od poljoprivrednih aktivnosti. Pored toga, čitav sliv Save naseljava 8,8 miliona stanovnika, što ukazuje da na narušavanje kvaliteta vode Save i pritoka utiču i komunalne i industrijske otpadne vode, pre svega otpadne vode koje se ulivaju u Savu u njenom srednjem i donjem delu toka (Paunović i sar., 2012; Kolarević i sar., 2016a). Pored toga, veliki pritisak zagađenja Save predstavljaju termoelektrane „Nikola Tesla I i II“ (TENT I i II) koje se nalaze u blizini Obrenovca. I pored pritiska zagađenja, nakon prerade, voda iz Save je dobrog kvaliteta i ima značajnu ulogu u vodosnabdevanju Beograda.

Istraživanje u slivu Save je fokusirano na relativno kratak, ali kompleksan potez reke, obuhvatajući prostorno bliske lokalitete koji su pod pritiscima različitih tipova zagađenja. Odabrana su tri lokaliteta na Savi uzvodno od Beograda (28 – 26 rkm).

1.4.3 Sliv Dunava

Dunav je druga najduža reka u Evropi sa dužinom toka od 2.780 km. Ova reka nastaje u jugozapadnom delu Nemačke spajanjem reka Brigah i Breg. U oblasti slivnog područja Dunava naseljeno je oko 160 miliona stanovnika (Paunović i sar., 2007), a Dunav i pritoke imaju važnu ulogu u vodosnabdevanju gradova i naselja vodom za piće, zatim navodnjavanju poljoprivrednih površina i vodosnabdevanju za potrebe industrijskih aktivnosti. Pored toga, Dunav predstavlja važan međunarodni plovni put. Zbog guste naseljenosti i nedovoljnog broja fabrika za preradu otpadnih voda, u različitim sektorima Dunava i njegovih pritoka se ulivaju nedovoljno prerađene, ili u potpunosti neprerađene komunalne i industrijske vode, čime se narušava kvalitet vode ove reke i njenih pritoka. Pored toga, tok Dunava je značajno izmenjen usled presecanja meandara, izgradnje velikog broja brana, akumulacija i kanala za navodnjavanje.

Kroz Srbiju protiče srednji i deo donjeg toka Dunava u dužini od 588 km (Atanacković, 2015). Najznačajnije pritoke u delu toka koji protiče kroz Srbiju su Sava, Tisa i Velika Morava. Prema vrednostima višegodišnjeg proseka protoka, najveći uticaj na vodni režim Dunava imaju Sava (prosečni višegodišnji protok iznosi $5.310 \text{ m}^3/\text{s}$) i Tisa (prosečni višegodišnji protok iznosi $3.690 \text{ m}^3/\text{s}$) (Atanacković, 2015). Reka Dunav u delu toka kroz Srbiju je pretrpela velike hidromorfološke promene usled izgradnje brane i hidrocentrale „Đerdap I“ i „Đerdap II“, ali je i pod velikim pritiscima različitih izvora zagađenja. Pre svega, neprerađene otpadne vode velikih gradova kao što su Novi Sad, Beograd i Pančevo negativno utiču na kvalitet vode Dunava. Pored toga, industrijske otpadne vode velikih industrijskih postrojenja (Železara u Smederevu i termoelektrana Kostolac) predstavljaju značajne izvore zagađenja Dunava. Takođe, na kvalitet vode Dunava utiču i pritoke (Kolarević i sar., 2016b).

Istraživanje u slivu Dunava rađeno je na teritoriji Republike Srbije u okviru međunarodne ekspedicije Zajedničkog istraživanja Dunava 4 (eng. *The Joint Danube River Survey 4, JDS4*) na tri lokaliteta na Dunavu, jednom lokalitetu na Tisi i dva lokaliteta na Savi.

1.5 Procena genotoksičnog potencijala primenom baterije *in vitro* i *in vivo* testova

Ova disertacija bavi se ispitivanjem osetljivosti testova, odnosno metoda koje se koriste u *in vitro* i *in vivo* ekogenotoksikološkim istraživanjima na velikim ravničarskim rekama.

U okviru *in vitro* istraživanja ispitivani su cito/genotoksični potencijal nativnih i koncentrisanih uzoraka površinskih voda sakupljenih na odabranim lokalitetima u slivovima tri velike ravničarske reke Srbije (Velika Morava, Sava i Dunav) primenom SOS/*umuC* testa, diferencijalnog bojenja, MTS testa i alkalnog komet testa na HepG2 i ZFL ćelijskim linijama. Paralelno su rađena i *in vivo* istraživanja na jedinkama uklija koji su izlovljene na ispitivanim lokalitetima. U okviru ovog dela istraživanja vršena je procena citotoksičnog efekta primenom diferencijalnog bojenja i genotoksičnog efekta primenom alkalnog i Fpg-modifikovanog komet i mikronukleus testa na ćelijama krvi uklija. Dodatno, uzorci mišića jedinki korišćeni su za RAPD test i za određivanje koncentracije akumuliranih metala i metaloida.

Paralelno sa ekogenotoksikološkim ispitivanjima, na lokalitetima je vršena procena mikrobiološkog kvaliteta vode. Mikrobiološke analize uzoraka vode vršene su primenom Colilert

18 sistema. Ovom metodom utvrđen je najverovatniji broj ukupnih koliforma i *E. coli* u 100 ml uzorka.

Značajan deo disertacije čini *in silico* pristup kojim je vršena obrada podataka o koncentracijama ksenobiotika na odabranim lokalitetima pri čemu su korišćeni veliki setovi podataka iz nacionalnog monitoringa (Agencije za zaštitu životne sredine i Gradskog zavoda za javno zdravlje Beograd), kao i baza podataka NORMAN udruženja i Evropske agencije za hemikalije (eng. *European Chemicals Agency*, ECHA). Na osnovu dostupne literature za svaku detektovanu supstancu su analizirani toksični i genotoksični potencijal, a primenom različitih integrativnih metoda je urađena kvantifikacija pritiska zagađenja na ispitivanim lokalitetima.

CILJEVI

2 CILJEVI

Velike ravničarske reke su pod uticajem različitih tipova tačkastog i difuznog zagađenja koje može dovesti do degradacije ekosistema. Jedan od prvih odgovora organizama na dejstvo ksenobiotika je DNK oštećenje zbog čega primena ekogenotoksikoloških testova može imati važnu ulogu u detekciji uticaja ksenobiotika pre nego što se oni odraze na više nivoe biološke organizacije i čitav ekosistem. Međutim, još uvek ne postoji jasna usaglašenost naučne zajednice na koji način treba konstruisati bateriju biotestova za procenu genotoksičnog potencijala akvatičnih ekostema.

U skladu sa prethodno navedenim činjenicama, osnovni cilj ove disertacije je da se izvrši procena osetljivosti *in vitro* i *in vivo* testova koji imaju široku primenu u ekogenotoksikologiji i da se formiraju smernice za ekogenotoksikološka istraživanja na velikim ravničarskim rekama. Kako bi se postigao navedeni naučni cilj definisani su sledeći specifični ciljevi:

- Ispitivanje i poređenje osetljivosti prokariotskih i eukariotskih modela u *in vitro* uslovima pri ispitivanju cito/genotoksičnih efekata nativnih i koncentrisanih uzoraka površinskih voda.
- Ispitivanje osetljivosti *in vivo* testova na jedinkama uklije u detekciji cito/genotoksičnog efekta u okviru *in situ* istraživanja.
- Ispitivanje specifičnosti odgovora jedinki uklija u istraživanjima koja obuhvataju prostorno udaljene lokalitete (istraživanje sliva Velike Morave i Dunava) i lokalitete koji su prostorno bliski (istraživanje sliva Save na lokalitetima na teritoriji opštine Obrenovac).
- Ispitivanje *in silico* pristupa u predikciji genotoksičnog potencijala na ispitivanim lokalitetima na osnovu podataka o koncentracijama ksenobiotika u vodi i bioti.
- Proučavanje odnosa mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja i koncentracije ksenobiotika koji u akvatičnu sredinu dospevaju uplivom otpadnih voda.
- Poređenje osetljivosti *in vitro* i *in vivo* testova u detekciji genotoksičnog efekta na primeru studija slučaja na Velikoj Moravi, Savi i Dunavu.
- Formulisanje smernica za ekogenotoksikološka istraživanja na velikim ravničarskim rekama.

MATERIJAL I METODE

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

3.1.1 Rastvori

Primarni stok 4-NQO (4-nitrohinolin N-oksidi) (10 mg/ml)

4-NQO (Sigma Aldrich, SAD)	10 mg
Sterilna destilovana voda	1 ml

Primarni stok BaP (benzo(a)piren) (10 mg/ml)

BaP (Sigma Aldrich, SAD)	10 mg
Dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma Aldrich, SAD)	1 ml

Primarni stok aflatoksin B1 (AFLB1) (10 mg/ml)

Aflatoksin B1 (Sigma Aldrich, SAD)	10 mg
DMSO (Sigma Aldrich, SAD)	1 ml

50 mM Etopozid

Etopozid (Sigma Aldrich, SAD)	29,4 mg
DMSO (Sigma Aldrich, SAD)	10 ml

S9 enzim

S9-SD jetre pacova indukovana alohlorom (Moltox, SAD). Koncentracija proteina u liofilizatu je 36,4 mg/ml.

B-pufer

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (Sigma, USA)	20,18 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Sigma, USA)	5,5 g
KCl (Zdravlje Leskovac)	0,75 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O (Sigma Aldrich, SAD)	0,25 g
Destilovana voda	1.000 ml
Betamerkaptoetanol (Sigma Aldrich, SAD)	20 ml
Natrijum dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, SAD)	1 g

Rastvoriti Na₂HPO₄ x 2H₂O, NaH₂PO₄ x H₂O, KCl i MgSO₄ x 7H₂O u destilovanoj vodi, podesiti pH na 7,0±0,2 i autoklavirati. Neposredno pre upotrebe rastvora dodati betamerkaptoetanol i SDS.

Reagens za prekidanje reakcije (1 M Na₂CO₃)

Na ₂ CO ₃ (Alkaloid Skoplje, Makedonija)	10,59 g
Bidestilovana voda	100 ml

Fosfatni pufer

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (Sigma, USA)	1,086 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Sigma, USA)	0,538 g
Destilovana voda	100 ml

Rastvoriti supstance u destilovanoj vodi, podesiti pH 7,0±0,2 i autoklavirati.

ONPG (2-nitrofenil-β-d-galaktopiranosid)

ONPG (Germany Boehringer wannhein GMBH, Nemačka)	45 mg
Fosfatni pufer	10 ml

Rastvoriti ONPG u fosfatnom puferu i čuvati na hladnom (4°C) i mračnom mestu.

1xPBS (Phosphate Buffered Saline)

Dulbecco's PBS (10x) (PAA The Cell Culture Company, Austrija)	10 ml
Sterilna destilovana voda	90 ml

0,01 g/ml DMEM HG

DMEM HG (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD)	6,69 g
Destilovana voda	500 ml

Rastvoriti DMEM u destilovanoj vodi i podesiti pH na 7,4. Nakon toga sterilisati filtriranjem.

9 mg/ml Ham's F12

Ham's F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD)	2,26 g
Destilovana voda	250 ml

Rastvoriti Ham's F12 u destilovanoj vodi i podesiti pH na 7,4. Nakon toga sterilisati filtriranjem.

0,07 g/ml NaHCO₃

NaHCO ₃ (Sigma Aldrich, SAD)	2,26 g
Destilovana voda	33,42 ml

Sterilisati rastvor filtriranjem.

0,1 % BSA (Bovine Serum Albumin)

BSA (Sigma Aldrich, SAD)	0,1 g
1xPBS	100 ml

250 µg/ml EGF (Epidermal Growth Factor from mouse)

EGF (Sigma Aldrich, SAD)	100 µg
1xPBS (PAA, Austrija)	100 µl
0,1 % BSA (Sigma Aldrich, SAD)	300 µl

0,1 % Tripsin

Tripsin (Gibco Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, SAD)	0,1 g
EDTA (Sigma Aldrich, SAD)	0,01 g
NaCl (Himedia, Indija)	0,8 g
Glukozaaminohidrat (Sigma Aldrich, SAD)	0,1 g
NaHCO ₃ (Sigma Aldrich, SAD)	0,084 g
Destilovana voda	100 ml

10 % Anestetik za ribe

Eterično ulje karanfilića 100 % (Probotanic, Srbija)	1 ml
Etanol (98 %)	9 ml

U posudu sa vodom sa lokaliteta dodaje se 1,1 ml anestetika na 1 l vode.

Heparin za oblaganje špriceva i igli

5000 IU heparin natrijuma u 1 ml (Galenika, Srbija)	1 ml
1xPBS (PAA, Austrija)	9 ml

Pre uzorkovanja krvi isprati igle i špriceve rastvorom heparina

Rastvor za lizu ćelija (Rastvor I)

NaCl (Himedia, Indija)	146,6 g
EDTA (Sigma Aldrich, SAD)	37,2 g
Tris (Sigma Aldrich, SAD)	1,21 g
Destilovana voda	1.000 ml

Nakon rastvaranja supstanci u destilovanoj vodi podestiti pH na 10. Neposredno pre izvođenja eksperimenta dodati 1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich, SAD). Za lizu ćelija krvi riba dodaje se i 10 % DMSO (Sigma Aldrich, SAD). Čuvati na +4 °C.

10 M NaOH

NaOH (Sigma Aldrich, SAD)	200 g
Destilovana voda	Do 500 ml

0,2 M EDTA

EDTA (Sigma Aldrich, SAD)	37,2 g
Destilovana voda	Do 500 ml

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu, pH 13 (Rastvor II)

10 M NaOH	30 ml
0,2 M EDTA	5 ml
Destilovana voda	965 ml

Nije potrebno dodatno podešavati pH vrednost. Čuvati na +4 °C.

Rastvor za neutralizaciju (Rastvor III)

Tris (Sigma Aldrich, SAD)	48,44 g
Destilovana voda	1.000 ml

Nakon rastvaranja Tris baze, podesiti pH na 7,5. Čuvati na +4 °C

1 % NMP (eng. *Normal Melting Point Agarose*)

NMP (Eurobio, Francuska)	1 g
Destilovana voda	99 ml

Zagrevati rastvor sve dok se agarozna ne rastvori.

1 % NMP u PBS

NMP (Eurobio, Francuska)	1 g
1xPBS (PAA, Austrija)	99 ml

Zagrevati rastvor sve dok se agarozna ne rastvori. Čuvati na +4 °C.

1 % LMP (eng. *Low Melting Point Agarose*)

LMP (Sigma Aldrich, SAD)	1 g
1xPBS (PAA, Austrija)	99 ml

Zagrevati rastvor na umerenoj temperaturi sve dok se agarozna ne rastvori. Čuvati na +4 °C.

Fpg enzim (Trevigen, Nemačka)

Primarni stok Fpg enzima je razblažen u 1xRec puferu (Trevigen, Nemačka), 500 U/ml. Za tretman eritrocita korišćen je enzim razblažen 300x u Fpg puferu.

Fpg pufer

HEPES (Sigma Aldrich, SAD)	2,383 g
KCl (Zdravlje, Srbija)	7,455 g
EDTA (Sigma Aldrich, SAD)	3,722 g
BSA (Sigma Aldrich, SAD)	0,1 g
Destilovana voda	1.000 ml

Podesiti pH vrednost na 7,2. Ovako pripremljen pufer koristi se za rastvaranje enzima. Za ispiranje mikroskopskih pločica koristi se rastvor koji sadrži sve supstance, osim BSA.

Ekstrakcioni pufer

TE pufer	1.134 µl
10 % SDS	60 µl
Proteinaza K (20 mg/ml)	20 µl

TE pufer

Tris (Sigma Aldrich, SAD)	0,036 g
0,5 M EDTA (Sigma Aldrich, SAD)	60 μ l
Destilovana voda	Do 30 ml

Podesiti pH na 7,6 i autoklavirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.

10 % SDS

SDS (Serva, Nemačka)	5 g
Destilovana voda	45 ml

Ne autoklavirati. Čuvati na sobnoj temperaturi

0,5 M EDTA (Etilendiaminosirćetna kiselina)

EDTA (Sigma Aldrich, SAD)	186,1 g
Destilovana voda	Do 1.000 ml

Podesiti pH na 8 i autoklavirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.

50 mM Tris

Tris (Sigma Aldrich, SAD)	0,3 g
Destilovana voda	50 ml

Podesiti pH na 8,0 i autoklavirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.

3 mM CaCl₂

CaCl ₂ (Moss & Hemoss, Srbija)	0,3 g
Destilovana voda	30 ml

Autoklavirati i čuvati na sobnoj temperaturi.

Proteinaza K (20 mg/ml)

Proteinaza K (Sigma Aldrich, SAD)	0,06 g
50 mM Tris (pH 8)	0,6 ml
3 mM CaCl ₂	0,6 ml
85 % Glicerol (Zorka Šabac, Srbija)	1,8 ml

Čuvati na -20 °C.

CTAB+PVP pufer

CTAB (Sigma Aldrich, SAD)	3 g
Tris (Sigma Aldrich, SAD)	1,21 g
NaCl (Sigma Aldrich, SAD)	8,2 g
0,5 M EDTA	4 ml
Destilovana voda	Do 100 ml
PVP (Sigma Aldrich, SAD)	3 g

Rastvoriti sve supstance osim PVP, podesiti pH na 8,0, zatim dodati PVP i autoklavirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.

5M C₂H₃NaO₂

C ₂ H ₃ NaO ₂ (Sigma Aldrich, SAD)	7,4 g
Destilovana voda	30 ml

Podesiti pH na 5, pa autoklavirati. Čuvati na sobnoj temperaturi.

RNaza A (10 mg/ml)

RNaza A (Thermo Fisher Scientific, SAD)	0,01 g
Sterilna destilovana voda	1 ml

Kuvati rastvor 15 min na 100 °C u vodenom kupatilu. Ohladiti i potom čuvati na -20 °C.

Kit za PCR reakciju

Qiagen Top Taq Master Mix (Qiagen, Nemačka).

Prajmeri za PCR reakciju

Za PCR reakciju korišćeno je 6 prajmera (Eurofins Genomics, Nemačka) koncentracije 25 μM (za razblaženje korišćena PCR voda).

Sekvence korišćenih prajmera (5'-3'): GGTGCGGGAA, GTTTCGCTCC, GTAGACCCGT, AAGAGCCCGT, AACGCGCAAC, CCCGTCAGCA

5xTBE pufer

Borna kiselina (Moss & Hemoss, Srbija)	27,4 g
Tris (Sigma Aldrich, SAD)	54 g
0,5 M EDTA (pH 8)	40 ml
Dejonizovana voda	960 ml

Čuvati na sobnoj temperaturi.

0,5xTBE pufer

5xTBE pufer	100 ml
Dejonizovana voda	900 ml

Čuvati na sobnoj temperaturi.

1,5 % agarozni gel za elektroforezu

Agaroz (Sigma Aldrich, SAD)	3,6 g
0,5xTBE pufer	240 ml
Etidijum bromid (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, SAD)	9,6 μl

Istopiti agarozu u 0,5xTBE puferu. Kada se rastvor ohladi (dostigne temperaturu oko 40 °C) dodati etidijum bromid. Nakon toga naliti rastvor agaroze u nosač gela sa češljevima. Kada se agaroz polimerizuje ukloniti češljeve i preneti u kadu za elektroforezu.

0,1 % boja tripan plavo

0,4 % tripan plavo (Thermo Fisher Scientific, SAD)	2,5 ml
1xPBS (PAA, Austrija)	7,5 ml

Akridin oranž/Etidijum bromid (AO/EtBr) (2 µg/ml)

Akridin oranž (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, SAD)	10 µl
Etidijum bromid (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, SAD)	10 µl
Destilovana voda	980 µl

Čuvati na tamnom i hladnom mestu.

MTS (2 mg/ml)

MTS (Sigma Aldrich, SAD)	42 mg
1xPBS (PAA, Austrija)	21 ml

Rastvoriti MTS supstancu u 1xPBS i podesiti pH na 6-6,5. Sterilisati filtracijom. Čuvati na -20 °C. Pre izvođenja eksperimenta napraviti razblaženje u 1× PBS da bi se dobila koncentracija 900 µg/ml.

PMS (9 mg/ml)

PMS (Sigma Aldrich, SAD)	90 mg
1xPBS (PAA, Austrija)	10 ml

Čuvati na -20° C. Pre izvođenja eksperimenta napraviti razblaženje u 1xPBS da bi se dobila koncentracija 900 µg/ml.

MTS/PMS boja

900 µg/ml MTS	2 ml
900 µg/ml PMS	100 µl

Rastvor boje pripremiti neposredno pre izvođenja eksperimenta.

GelRed (1:3,333)

GelRed Nucleic Acid Stain (10.000x in water) (Biotium, Sigma Aldrich, SAD)	3 ml
Destilovana voda	6 ml

Čuvati na tamnom mestu.

DAPI boja

DAPI (Sigma Aldrich, SAD)	1,5 µl
Triton X (Sigma Aldrich, SAD)	1 µl
1xPBS (PAA, Austrija)	999 µl

Napraviti rastvor Triton X u 1xPBS i potom dodati DAPI boju. Čuvati na tamnom mestu.

3.1.2 Medijumi**Colilert 18 System**

Uzorci vode sa medijumom Colilert 18 System (INDEXX, SAD) su razlivani u Quanty tray/2000 ploče (INDEXX, SAD) koje su zatvarane provlačenjem kroz Quanty tray zavarivač (INDEXX, SAD).

1xTGA medijum

Tripton (Lab M, UK)	10 g
NaCl (Himedia, Indija)	5 g
HEPES (Sigma Aldrich, SAD)	1,63 g
Bidestilovana voda	980 ml
D(+)-glukoza (dehidrirana) (Sigma Aldrich, SAD)	2 g

Tripton, NaCl i HEPES rastvoriti u destilovanoj vodi, podesiti pH na $7,0 \pm 0,2$ i sterilisati u autoklavu. Dehidriranu D(+)-glukoza i rastvoriti u 20 ml destilovane vode. Sterilisati u autoklavu pa je dodati u 1xTGA (980 ml). Nakon što se sterilisani 1xTGA ohladi dodaje se 50 mg ampicilina na 1000 ml 1xTGA. Ovako pripremljen 1xTGA čuva se na -20°C do 4 nedelje.

10xTGA medijum

10xTGA medijum se priprema na isti način kao 1xTGA medijum, ali u deset puta manjoj zapremini bidestilovane vode.

10xTGA medijum sa kofaktorima

10xTGA	80 ml
KCl (Zdravlje Leskovac, Srbija)	2,46 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Sigma Aldrich, SAD)	1,63 g

Neposredno pre izvođenja eksperimenta dodati 148 mg NADP (Carl Roth, Nemačka) i 76 mg glukoze-6-P (Sigma Aldrich, SAD) u 5 ml 10xTGA sa kofaktorima (KCl i MgCl₂ x 6H₂O). Ovako pripremljen medijum se dalje koristi u eksperimentu sa metaboličkom aktivacijom.

HepG2 medijum

Fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich, SAD)	7,5 ml
Penicilin i streptomycin (Sigma Aldrich, SAD)	500 µl
William's medium (Thermo Fisher Scientific, SAD)	42 ml

Korišćen je penicilin koncentracije 100 IU/ml i streptomycin 100 µg/ml (Sigma Aldrich, SAD). Ovako pripremljen medijum čuvati na $+4^{\circ}\text{C}$.

ZFL medijum

L-15 (ATCC 30-2008)	125 ml
0,01 g/ml DMEM HG	87,5 µl
Ham's F12	37,5 ml
0,07 g/ml NaHCO ₃	1,25 ml
HEPES (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD)	3,75 ml
Insulin (Sigma Aldrich, SAD)	250 µl
250 µg/ml EGF	50 µl

Ovako pripremljen medijum može se čuvati na $+4^{\circ}\text{C}$ najviše tri meseca. Neposredno pre izvođenja eksperimenta u 47,5 ml pripremljenog medijuma dodati 2,5 ml FBS (Sigma Aldrich, SAD) i 500 µl antibiotika penicilina 100 IU/ml i streptomicina koncentracije 100 µg/ml (Sigma Aldrich, SAD).

Medijum za kriprezervaciju uzoraka krvi u tečnom azotu

RPMI 1640 medijum (PAA, Austria)	37,5 ml
FBS (Sigma, USA)	12,5ml

U 1 ml medijuma (RPMI+25 % FBS) dodati kap krvi riba. Neposredno pre stavljanja uzorka u tečni azot dodati DMSO (Sigma Aldrich, SAD) u finalnoj koncentraciji 20 %.

Medijum za čuvanje uzoraka krvi na +4 °C

Medijum je pripreman na isti način kao medijum za krioprezervaciju, ali se u ovaj medijum nije dodavao krioprotektivni agens, DMSO.

3.1.3 *S. typhimurium* TA1535/pSK1002

Soj *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 (poreklo dr B. Žegura, Nacionalni institut za biologiju, Ljubljana, Slovenija) je standardizovani soj (ISO/CD 13829, 2000) koji poseduje multikopi plazmid sa fuzionisanim genima *umuC* i *lacZ*. Ovako konstruisana fuzija gena omogućava procenu nivoa DNK oštećenja, odnosno stepena ekspresije *umuC* gena na osnovu aktivnosti β -galaktozidaze (Hideo i sar., 1983). Pored navedene fuzije, soj sadrži i gen za rezistenciju za antibiotik ampicilin, a takođe je auksotrof za histidin i mutant je za *rfa* gen, zbog čega je narušena permeabilnost lipoplisaharidnog sloja, tj. povećana je propustljivost ovog sloja. Soj poseduje mutaciju za *uvrB* gen koji je odgovoran za nukleotidnu ekscizionu reparaciju, što uzrokuje povećanje stope ekspresije *error-prone* odgovora prilikom nastanka DNK lezije i nosi mutaciju za *lacZ*. Kada se aktivira SOS odgovor usled dejstva genotoksičnog agensa, dolazi do ekspresije *umuC* i *lacZ* gena i sinteze β -galaktozidaze koja razlaže supstrat orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) u žuto obojeni o-nitrofenol (ONP) (McDaniels i sar., 1990). Bakterijski soj se čuva na -80 °C u 1xTGA medijumu sa dodatkom 10 % DMSO.

3.1.4 Čelijske linije

3.1.4.1 HepG2 ćelijska linija

HepG2 ćelijska linija, izolovana iz tkiva jetre petnaestogodišnjeg dečaka obolelog od hepatokarcinoma, odlikuje se epitelijalnom morfologijom i rastom u agregatima. Nakon 48 h inkubacije pri optimalnim uslovima (37 °C, uz prisustvo 5 % CO₂) broj ćelija u kulturi se udvostručuje. HepG2 ćelije se čuvaju u tečnom azotu u HepG2 hranljivim medijumom sa dodatkom 5 % DMSO. U disertaciji je korišćena HepG2 ćelijska linija HB-8065 iz ATCC kolekcije (eng. *American Type Culture Collection*, ustupljeno od dr B. Žegura, Nacionalni institut za biologiju, Ljubljana, Slovenija).

3.1.4.2 ZFL ćelijska linija

ZFL ćelijsku liniju, dobijenu od normalnih ćelija jetre mužjaka zebrića, karakteriše epitelna morfologija i rast ćelija u agregatima. Broj ćelija u kulturi se udvostručuje nakon 72 h inkubacije u odgovarajućim uslovima (28 °C, u uslovima vlažne atmosfere). Da bi se postigli uslovi vlažnog vazduha, u inkubator je stavljena i sterilna destilovana voda kako bi isparavala i obogaćivala vazduh vodenom parom. ZFL ćelije se čuvaju u ZFL hranljivom medijumu sa 5 % DMSO u tečnom azotu. U disertaciji je korišćena ZFL ćelijska linija CRL-2634 iz ATCC kolekcije (ustupljeno od dr B. Žegura, Nacionalni institut za biologiju, Ljubljana, Slovenija).

3.2 Metode

3.2.1 Fizičko-hemijski i hemijski parametri u proceni ekološkog statusa reka

Osnovni fizičko-hemijski parametri: temperatura vode ($^{\circ}\text{C}$), elektroprovodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, zasićenost vode kiseonikom (%) i koncentracija kiseonika u vodi (mg/l) mereni su na svakom lokalitetu u momentu uzorkovanja (Slika 3.1) korišćenjem multiparametarske sonde Multi 3630 IDS (WTW, Nemačka). Na osnovu izmerenih vrednosti izvršena je indikacija ekološkog statusa lokaliteta u trenutku uzorkovanja.



Slika 3.1. Merenje osnovnih fizičko-hemijskih parametara parametara vode (foto: M. Kračun-Kolarević).

Podaci fizičko-hemijskih i hemijskih parametara dobijeni tokom godišnjeg nadzornog monitoringa preuzeti su iz baze mernih stanica Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije (SEPA; SEPA 2015, 2018) koje su bile najbliže ispitivanim lokalitetima i Gradskog zavoda za javno zdravlje Beograd (GZZJZ Beograd; podaci ustupljeni od kolega iz GZZJZ Beograd, nisu publikovani) (Tabela 3.1). U okviru JDS4 ekspedicije, hemijske analize rečne vode sa ispitivanih lokaliteta obuhvatile su analizu 2.239 organskih polarnih i semipolarnih jedinjenja dobijenih metodom ekstrakcije čvrste faze iz uzoraka velike zapremine (eng. *large volume sampling solid phase extraction*, LVSPE). Ovi podaci preuzeti su iz baze NORMAN udruženja (<https://www.norman-network.com/nds/empodat/chemicalSearch.php>) Podaci dobijeni tokom nadzornog monitoringa i analizom LVSPE uzoraka korišćeni su za procenu uticaja zagađenja na ispitivanim lokalitetima.

Tabela 3.1. Prikaz mernih stanica nadzornog monitoringa čiji su podaci fizičko-hemijskih i hemijskih parametara korišćeni za procenu ekološkog statusa ispitivanih lokaliteta.

	Lokalitet	Merna stanica	Baza podataka
Istraživanje sliva Velike Morave	RI	Batrage	SEPA (2015. godina)
	RS	Šabac	
	VM1	Bagrdan	
	VM2	Ljubičevski most	
	ZM1	Gugaljski most	
	ZM2	Kraljevo	
	ZM3	Maskare	
	JM1	Ristovac	
	JM2	Korvingrad	
	JM3	Mojsinje	
Istraživanje sliva Save	SZ	Zabran	GZZJZ Beograd (2017–2019 godina)
	UK	Most u Obrenovcu	
	UB	Barič	
Istraživanje sliva Dunava	JDS33	Titel	SEPA (2018. godina)
	JDS35	Jamena	
	JDS36	Ostružnica	
	JDS37	Zemun	
	JDS40	Banatska Palanka	
	JDS41	Radujevac	

U studiji sliva Velike Morave, da bi obezbedili najadekvatniji referentni lokalitet koji pripada ovom slivu, urađen je detaljni pregled hemijskih parametara (nitrata, nitrita, fostata, metala i metaloida, pesticida, itd.) preuzetih iz baze mernih stanica SEPA koji su deo nadzornog monitoringa, na osnovu čega se izdvojio lokalitet Batrage na Ibru (RI) kao najmanje zagađen. Iz tog razloga, ovaj lokalitet korišćen je kao kontrolni za procenu uticaja zagađenja ispitivanih lokaliteta. U prethodnom istraživanju (Kolarević i sar., 2016a) lokalitet Šabac na Savi (RS) je pokazao najmanji genotoksični potencijal. Da bi podaci dobijeni za lokalitet RS bili korišćeni kao bazalne vrednosti u genotoksikološkom delu istraživanja, izvršena je procena uticaja zagađenja ovog lokaliteta poređenjem detektovanih vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara sa odgovarajućim vrednostima dobijenim za lokalitet Batrage (RI).

Imajući u vidu da su sva tri ispitivana lokaliteta u slivu Save (SZ, UK, UB) pod uticajem različitih tipova zagađenja, te da se nijedan ne može posmatrati kao kontrolni, prosečne vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara sa ovih lokaliteta su poređene sa vrednostima istih parametara koje su dobijene na lokalitetima RS, koji je korišćen kao kontrolni lokalitet. Takođe, i u studiji sliva Dunava vršena je komparacija prosečnih vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara sa ispitivanih lokaliteta sa vrednostima dobijenim za RS.

3.2.1.1 Priprema LVSPE uzoraka rečne vode

Istraživanje sliva Dunava u okviru JDS4 ekspedicije obuhvatilo je analizu 2.239 organskih polarnih i semipolarnih jedinjenja ekstrahovanih metodom LVSPE. Uređaj za uzorkovanje velikih zapremina (eng. *large volume sampler*), Horizon field sampler, je korišćen na svakom lokalitetu za filtriranje 30 l vode. Uređaj sadrži su dva hidrogelna diska (Oasis HLB) koji sadrže polimere za koje se vezuju polarna i semipolarna jedinjenja prisutna u vodi, čak i u niskim koncentracijama ($\mu\text{g/l}$, ng/l) (Alygizakis i sar., 2020). U okviru JDS4 ekspedicije prilikom uzorkovanja rečne vode relativni faktor obogaćivanja uzorka (eng. *relative enrichment factor*, REF) iznosio je 25.000 (REF

25.000), odnosno koncentracija jedinjenja koja se nalazi na diskovima je veća 25.000 puta u odnosu na onu u nativnom uzorku. Diskovi su nakon uzorkovanja čuvani na $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u aluminijumskoj foliji).

Ekstrakcija jedinjenja sa diskova je vršena u dihlorometanu, nakon čega su uzorci čuvani do daljih analiza na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedan deo svakog uzorka je korišćen za identifikaciju i određivanje koncentracija ($\mu\text{g/l}$, ng/l) prisutnih jedinjenja metodom tečne hromatografije-masene spektrometrije (eng. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS/MS), dok je drugi deo korišćen za ispitivanje efekata u *in vitro* biotestovima. Pre početka analize biološke aktivnosti uzoraka dihlormetan je uparen, a sadržaj je rastvoren u DMSO. Za *in vitro* testove ekstrakti su razblaživani tako da finalna maksimalna koncentracija DMSO bude 0,4 %.

Podaci o koncentracijama detektovanih jedinjenja u uzorcima su preuzeti iz baze NORMAN udruženja (<https://www.norman-network.com/nds/empodat/chemicalSearch.php>).

3.2.2 Mikrobiološki parametri u proceni ekološkog statusa reka

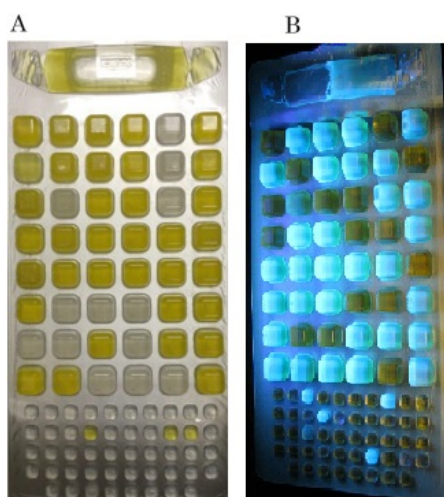
3.2.2.1 Uzorkovanje vode

Uzorkovanje vode za detekciju i kvantifikaciju mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja je vršeno u sterilnim staklenim bocama od 250 ml. Nakon otvaranja boce, otvor se postavlja upravno u odnosu na vodenu površinu i potapa se u vodu do dubine od 30 cm i postavlja prema toku. Kada se boca napuni, brzo se zatvara i čuva na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dolaska u laboratoriju.

3.2.2.2 Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja

Detekcija i kvantifikacija ukupnih koliforma (eng. *total coliforms*, TC) i/ili *E. coli* u uzorcima vode vršena je metodom enzimskog razlaganja definisanog supstrata pomoću Colilert 18 sistema (ISO 9308-2:2012). Ova metoda omogućava detekciju i kvantifikaciju ukupnih koliforma koji razlažu supstrat ONPG pomoću enzima β -galaktozidaza u žuto obojeni ONP i *E. coli* koja supstrat metilumberiferil- β -glukuronid (MUG) razlaže pomoću enzima glukuronidaze u fluorescentni 4-metilumbeliferon.

Za analizu indikatora fekalnog zagađenja uzorci vode sa lokaliteta su razblaženi deset puta u sterilnoj destilovanoj vodi. U razblaženi uzorak je dodat Colilert 18 supstrat. Nakon rastvaranja supstrata, uzorci sa supstratom su sipani u Quanta tray/2000 ploče koje se sastoje iz 49 velikih i 48 malih komora. Ploče se zatvaraju provlačenjem kroz Quanta tray zavarivač (INDEXX, SAD) i inkubiraju minimum 18 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije broje se žuto obojene komore koje su indikatori prisustva ukupnih koliforma (Slika 3.2 A) u uzorku i fluorescentne komore (korišćenjem UV svetla na talasne dužine 365 nm) kao indikatora *E.coli* (Slika 3.2 B). Dobijene vrednosti su upoređene sa vrednostima iz tabela koje je dao proizvođač na osnovu kojih je određen najverovatniji broj (eng. *most probable number*, MPN) ukupnih koliforma i *E. coli* u 100 ml uzorka.



Slika 3.2. Obojenost komora kao indikator prisustva ukupnih koliforma (A) i *E. coli* (B) u uzorku vode (foto: J. Jovanović Marić).

Na osnovu MPN vrednosti u 100 ml uzorka za ukupne koliforme i *E. coli* definisana je klasifikacija vode Pravilnikom („Službeni glasnik RS” broj 74/2011) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Klasifikacija kvaliteta vode na osnovu mikrobioloških parametara: ukupnih koliforma i *E. coli* („Službeni glasnik RS” broj 74/2011)

Parametri	Granice između klasa	I-II	II-III	III-IV	IV-V
Ukupni koliformi	100 ml	500	10.000	100.000	1.000.000
<i>E. coli</i>	100 ml	100	1.000	10.000	100.000

3.2.3 *Ex situ* i *in situ* pristup

Procena genotoksičnog potencijala vode vršena je u *ex situ* i *in situ* uslovima. U okviru *ex situ* istraživanja vršene su analize nativnih i koncentrovanih (LVSPE) uzoraka rečne vode sa ispitivanih lokaliteta u testovima *in vitro*, a *in situ* istraživanje obuhvatilo je *in vivo* biotestove na uzorcima krvi. Pored toga, u tkivima jedinki uklija analizirane su koncentracije metala i metaloida, a mišićno tkivo je korišćeno za DNK ekstrakciju i analizu genetičke sličnosti jedinki.

3.2.3.1 Procena citotoksičnog i genotoksičnog efekta

3.2.3.1.1 SOS/*umuC* test

Citotoksični i genotoksični potencijal nativnih uzoraka vode sa lokaliteta sliva Velike Morave ispitivan je u SOS/*umuC* testu sa i bez metaboličke aktivacije prema protokolu koji su opisali Žegura i sar., 2009. Dan pre izvođenja eksperimenta pripremljena je prekonocna bakterijska kultura *S. typhimurium* 1535/pSK1002: u 10 ml 1xTGA medijuma dodato je 50 µl bakterijske suspenzije koja je inkubirana maksimalno 16 h na 37 °C uz aeraciju (150 rpm). Narednog dana prekonocna kultura je razblažena 10 puta u 1xTGA medijumu i inkubirana 1,5 h 37 °C uz aeraciju

(250 rpm). Nakon inkubacije izmerena je optička gustina na 600 nm, a suspenzija je razblažena u svežem 1xTGA medijumu do postizanja optičke gustine vrednosti 0,2. 1xTGA medijum je korišćen kao slepa proba za merenje optičke gustine.

Neposredno pre izvođenja eksperimenta, uzorci vode su sterilisani filtriranjem kroz mikrobiološke filtere (dijametar pora 2 µm). U eksperimentu bez metaboličke aktivacije u mikrotitarske ploče sa 96 bunara dodavano je 180 µl uzorka vode, 20 µl 10xTGA medijuma i 70 µl bakterijske suspenzije. U eksperimentu sa metaboličkom aktivacijom u mikrotitarske ploče je dodavano 180 µl uzorka vode, 20 µl 10xTGA medijuma sa kofaktorima i 70 µl bakterijske suspenzije sa S9 frakcijom (u 15 ml suspenzije je dodato 450 µl S9 enzima). Sterilna bidestilovana voda je korišćena kao negativna kontrola, a pozitivna kontrola u testu bez metaboličke aktivacije je bio 4-NQO finalne koncentracije 0,5 µg/ml, dok je pozitivna kontrola u testu sa metaboličkom aktivacijom bio BaP finalne koncentracije 10 µg/ml. Ovako pripremljene mikrotitarske ploče su inkubirane 2h na 37 °C, 150 rpm. Nakon toga, pripremljena je nova serija mikrotitarskih ploča čiji bunari su sadržali 270 µl 1xTGA medijuma i 30 µl sadržaja odgovarajućeg bunara prethodno inkubirane ploče. Ove ploče su inkubirane pri istim uslovima (2h, 37 °C i 150 rpm). Nakon inkubacije merena je optička gustina na 600 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Multiskan FC, Thermo Scientific, Kina). Dobijene vrednosti optičke gustine su iskorišćene za određivanje stope rasta bakterija (G):

$$G = (OD_{600nm} \text{ uzorka} - OD_{600nm} \text{ slepe probe}) / (OD_{600nm} \text{ kontrole} - OD_{600nm} \text{ slepe probe})$$

Procena genotoksičnog potencijala uzoraka vode vršena je u narednom koraku. U bunare novih mikrotitarskih ploča dodato je 120 µl B-pufera, 30 µl sadržaja prethodno inkubiranih ploča i 30 µl ONPG-a. Ove ploče su inkubirane 30 min (37 °C i 150 rpm), a reakcija razlaganja ONPG-a je prekinuta dodavanjem 120 µl Na₂CO₃. Vrednosti dobijene merenjem optičke gustine na 405 nm iskorišćene su za određivanje stepena indukcije (IR):

$$IR = 1/G \times (OD_{405nm} \text{ uzorka} - OD_{405nm} \text{ slepe probe}) / (OD_{405nm} \text{ kontrole} - OD_{405nm} \text{ slepe probe})$$

Ukoliko su vrednosti stope rasta ispod 0,75 (75 %), smatra se da uzorak ima citotoksični efekat, dok vrednosti stopa indukcije iznad 1,5 ukazuju na genotoksični efekat testiranog uzorka.

SOS/*umuC* test sa i bez metaboličke aktivacije je rađen i za procenu citotoksičnog i genotoksičnog efekta LVSPE uzoraka površinskih voda sa lokaliteta u slivu Dunava. LVSPE uzorci su bili razblaženi 25 puta u destilovanoj vodi kako bi se dobio REF 1.000. Postupak izvođenja eksperimenta je bio sličan kao što je opisano u delu iznad, sa malim modifikacijama. Pre svega, u eksperimentima je korišćen medijum 1xTGA. Zatim, 90 µl ćelijske suspenzije je tretirano sa 10 µl uzorka finalne koncentracije REF 100. Sterilna bidestilovana voda je bila negativna kontrola, pozitivna kontrola u testu bez metaboličke aktivacije je bio 4-NQO koncentracije 0,5 µg/ml, a u testu sa metaboličkom aktivacijom AFLB1 koncentracije 20 µg/ml. Kontrola rastvarača je bio DMSO finalne koncentracije 0,4 %, jer je korišćen kao rastvarač testiranih ekstrakata, i kontrola procesa ekstrakcije (eng. *solid phase extraction control*, SPEC), dok je 1xTGA medijum je korišćen kao slepa proba. U ovom eksperimentu kao prag stope indukcije uzeta je vrednost 2.

3.2.3.1.2 HepG2 i ZFL ćelijske linije

3.2.3.1.2.1 Kultivacija ćelijskih linija

HepG2 i ZFL ćelijske linije zasejavane su u 5 ml odgovarajućeg medijuma (HepG2/ZFL medijum) u sterilne flaskove T25. Kada su ćelije popunile prostor flaska, ćelije su pasažirane, odnosno presejavane su u sveže pripremljen medijum. Prvo je uklonjen medijum iz flaska i ćelije su isprane sa 5 ml 1xPBS kako bi se uklonili svi inhibitori tripsina iz medijuma. Nakon toga, 1xPBS je

uklonjen i dodat je 0,1 % tripsin (1,5 ml za HepG2 i 1 ml za ZFL ćelije) i ćelije su inkubirane 5 min pri odgovarajućim uslovima (HepG2 na 37 °C, u uslovima atmosfere sa 5 % CO₂ i ZFL na 28 °C u uslovima vlažnog vazduha koji su postignuti dodavanjem u inkubator posude sa sterilnom destilovanom vodom). Korišćenjem invertnog svetlosnog mikroskopa je proveravano da li su se ćelije odvojile od površine flaska. Nakon toga, rastvor tripsina je neutralizovan dodavanjem 5 ml svežeg medijuma. Čelijske suspenzije su potom prebačene u sterilne epruvete i centrifugirane: HepG2 ćelije 5 min na 1.000 rpm, a ZFL 5 min na 1.200 rpm. Supernatant je nakon centrifugiranja odliven, a talog sa ćelijama je resuspendovan u 3,5 ml svežeg medijuma (HepG2/ ZFL medijum). Ovako pripremljene čelijske suspenzije su korišćene za određivanje broja ćelija u kulturi pomoću hemocitometra.

3.2.3.1.2.2 Određivanje broja HepG2 i ZFL ćelija hemocitometrom

Pre tretmana određen je broj vijabilnih ćelija u kulturi korišćenjem hemocitometra (Bürker komore) nakon bojenja tripan plavim (Strober, 1997). Boja tripan plavo ne može difundovati u žive ćelije, usled čega se ćelije sa intaktnom čelijskom membranom (žive ćelije) pod svetlosnim mikroskopom uočavaju kao prozirne, neobojene, strukture, dok su ćelije sa narušenom strukturom čelijske membranom (mrtve ćelije) plavo obojene.

Broj ćelija određivan je u suspenziji HepG2 i ZFL ćelija koje su pripremljene prema metodologiji opisanoj u delu 2.3.1.2.1. U 20 µl HepG2 čelijske suspenzije dodata je ista zapremina boje tripan plavo, nakon čega je 30 µl ove smeše dodato na hemocitometar. U slučaju ZFL ćelija, u 10 µl čelijske suspenzije dodato je 40 µl tripan plavo, nakon čega je 10 µl smeše ćelija i boje naneto na hemocitometar. Broj ćelija u 1 ml je određen primenom formule:

$$\text{Broj ćelija/ml} = 4 \times n \times 10^4 \times R$$

n je srednja vrednost broja neobojenih ćelija u četiri vidna polja i ta vrednost se množi sa brojem 4 kako bi se dobila vrednost u ukupnom broju malih kvadrata (16 malih kvadrata, koliko ih ima u obe komorice); 10^4 predstavlja ukupnu zapreminu dve komorice (1 cm³ odnosno 1 ml), R predstavlja faktor razblaženja čelijske suspenzije u boji (za HepG2 $R = 2$, a za ZFL $R = 5$).

3.2.3.1.2.3 Tretman čelijskih linija i priprema čelijske suspenzije za biotestove

HepG2 ćelije su zasejane u ploče sa 12 bunara u hranljivom medijumu u koncentraciji 10⁵ ćelija/bunaru i inkubirane su 24 h (37 °C i 5 % CO₂). Nakon 24 h medijum je lagano uklonjen i u ploče je dodat svež medijum i filtrirani nativni uzorci vode (30 % ukupne zapremine bunara, v/v) (Žegura i sar. 2009). Za pozitivnu kontrolu je odabran BaP finalne koncentracije 50 µM, a sterilna destilovana voda je bila negativna kontrola. Nakon tretmana od 24 h (37 °C i 5 % CO₂), medijum je uklonjen, ćelije su isprane sa 1 ml 1xPBS i u svaki bunar je dodato 100 µl 0,1 % tripsina. Nakon inkubacije (5 min na 37 °C) čelijska suspenzija je prebačena u mikrotube u koje je dodat 1 ml svežeg medijuma, suspenzija je centrifugirana (800 rpm, 5 min) i talog je resuspendovan u 100 µl supernatanta. Ovako pripremljeni uzorci su dalje korišćeni za određivanje vijabilnosti ćelija primenom diferencijalnog bojenja i za procenu genotoksičnog efekta alkalnim komet testom. Eksperiment je urađen u tri nezavisna ponavljanja, a u svakom eksperimentu su urađene tri replike po uzorku.

ZFL ćelije su zasejane u ploče sa 12 bunara u odgovarajućem hranljivom medijumu u koncentraciji 3x10⁴ ćelija/bunaru (28 °C, u uslovima vlažnog vazduha) (Gajski i sar., 2016). Nakon inkubacije (24 h), medijum je zamenjen svežim koji je sadržao LVSPE uzorak. Početna koncentracija LVSPE uzoraka je 25.000 REF, a u testovima za procenu citotoksičnog i genotoksičnog potencijala korišćeni su uzorci finalne koncentracije REF 12,5, REF 25, REF 50 i REF 100. Za razblaživanje ekstrakata korišćen je 0,4 % DMSO. Pored tretmana LVSPE uzorcima, eksperiment je uključio i negativnu kontrolu (netretirana grupa ćelija), kontrolu rastvarača (0,4 % DMSO), kontrola procesa ekstrakcije (SPEC) i pozitivne kontrole (BaP finalne koncentracije 50

μM i etopozid finalne koncentracije $33 \mu\text{M}$). Nakon 72 h inkubacije ($28 \text{ }^\circ\text{C}$, uslovi vlažnog vazduha) medijum je uklonjen, ćelije su isprane sa 1 ml 1xPBS, u svaki bunar dodato je $100 \mu\text{l}$ 0,1 % tripsina i ploče su inkubirane 5 min na $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Potom je ćelijska suspenzija prebačena u mikrotube u kojima je dodat 1 ml svežeg medijuma. Nakon centrifugiranja (1.200 rpm, 5 min) talog je resuspendovan u $100 \mu\text{l}$ supernatanta. Ovako pripremljena ćelijska suspenzija je dalje korišćena za određivanje vijabilnosti ćelija u MTS testu i za alkalni komet test, u kome su praćeni genotoksični efekti (Tabela 3.3). U svakom eksperimentu su urađene tri replike po tretmanu, a eksperimenti su izvedeni u tri nezavisna ponavljanja.

Tabela 3.3. Prikaz REF LVSPE uzoraka u proceni citotoksičnog i genotoksičnog efekta nakon tretmana ZFL ćelija.

REF/Lokaliteti	JDS33	JDS35	JDS36	JDS37	JDS40	JDS41
REF 100	✓	✓	✓	✓	✓	✓
REF 75		✓	✓	✓	✓	✓
REF 50		✓	✓	✓	✓	✓
REF 25		✓	✓	✓	✓	✓
REF 12,5				✓		✓

Analiza uticaja LVSPE uzoraka na ćelijski ciklus ZFL ćelija vršena je primenom protočne citometrije. Postupak je bio sledeći: u ploče sa šest bunara zasejano je $1,75 \times 10^5$ ZFL ćelija po bunaru u 5 ml ZFL medijuma i ploče su inkubirane (24 h, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, uslovi vlažnog vazduha) (Novak i sar., 2017). Nakon inkubacije, ćelije su tretirane LVSPE uzorcima koji nisu pokazali citotoksični efekat u MTS testu, a izazvale su najviši nivo DNK oštećenja u komet testu (za lokalitet JDS33 – 100 REF, lokalitet JDS37 – REF 12,5, lokalitet JDS40 – REF 50, lokalitet JDS41 – REF 12,5). U analizi ćelijskog ciklusa korišćene su sledeće kontrole: negativna kontrola (netretirana grupa ćelija), kontrola rastvarača (0,4 % DMSO), kontrola procesa ekstrakcije (SPEC) i pozitivna kontrola (etopozid finalne koncentracije $1 \mu\text{g/ml}$). Tretman ćelija je trajao 72h ($28 \text{ }^\circ\text{C}$, uslovi vlažnog vazduha). Nakon tretmana, medijum je prebačen u sterilnu epruvetu i ćelije su isprane sa 3 ml 1xPBS, potom je 1xPBS uklonjen u epruvetu sa medijumom i u svaki bunar je dodato 0,7 ml 0,25 % tripsina, nakon čega su ploče inkubirane (5 min, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, uslovi vlažnog vazduha). Tripsin je neutralisan prethodno uklonjenim medijumom i 1xPBS, nakon čega je suspenzija centrifugirana (12.000 rpm, 5 min). Supernatant je odliven, a talog je ispran hladnim rastvorom 1xPBS. Ovaj korak je ponovljen dva puta. Nakon toga, talog je rastvoren u $500 \mu\text{l}$ 1xPBS i mikrotuba sa suspenzijom je stavljena na led. U suspenziju je potom dodavano kap po kap 1,5 ml hladnog apsolutnog etanola, uz vorteksovanje. Mikrotube sa suspenzijom su ostavljene preko noći na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$, a potom su prebačene na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do dalje analize.

3.2.3.1.3 Uzorkovanje uklija

Jedinke uklija izlovljene su pomoću ručne mreže (dijametar okca 10 mm). Nakon što su jedinke anestetizirane (10 % ulje karanfilića), eutanazirane su udarcem u nivou glave. Izmerena je ukupna dužina i masa jedinki, na osnovu kojih je određen kondicioni indeks (eng. *condition index*, CI):

$$CI = 100 \times W/L^3$$

W označava masu jedinke izraženu u gramima, a L ukupnu dužinu (Fulton, 1911). Na osnovu kondicionog indeksa može se proceniti opšte stanje jedinki: ukoliko je masa jedinke određene dužine veća, stanje ribe je bolje i kondicioni indeks je viši.

Nakon žrtvovanja uklija uzeta je krv, a jedinke su čuvane na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ do dolaska u laboratoriju, a potom na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do daljih analiza.

3.2.3.1.3.1 Uzorkovanje i metode čuvanja ćelija krvi uklija

Krv uklija je uzeta direktno iz srca pomoću heparinizovane igle (21 G) i šprica. U zavisnosti od udaljenosti lokaliteta od laboratorije, uzorci krvi su čuvani na + 4 °C ili su krioprezervirani u tečnom azotu na terenu.

Krioprezervacija uzoraka krvi u tečnom azotu vršena je u studijama sliva Velike Morave i Dunava, jer su lokaliteti udaljeni od laboratorije, te nije bilo moguće istog dana uraditi dalje analize. Odmah nakon uzorkovanja, kap krvi je dodata u 1 ml hladnog rastvora RPMI sa 25 % FBS. Potom je dodat krioprotektivni agens – DMSO finalne koncentracije 20 % (Akcha i sar., 2003) i mikrotube sa uzorcima su odmah stavljene u tečni azot. Krioprezervirani uzorci čuvani su u tečnom azotu najduže tri nedelje od uzorkovanja.

Čuvanje uzoraka krvi na + 4 °C vršeno je u studiji sliva Save s obzirom da se lokaliteti nalaze na 30 km od Beograda, te su brzo mogli da se transportuju do laboratorije. Kap krvi odmah nakon uzorkovanja je dodata u 1 ml hladnog rastvora RPMI sa 25 % FBS i ovako pripremljeni uzorci su transportovani do laboratorije u rashladnim torbama. Odmah nakon dolaska u laboratoriju uzorci su dalje procesuirani.

3.2.3.1.3.2 Priprema ćelijske suspenzije krvi uklija

Neposredno pre izvođenja testova za procenu citotoksičnog i genotoksičnog efekta, uzorci krvi čuvani u tečnom azotu su držani u vodenom kupatilu (+ 21 °C) dok se uzorci nisu otopili. Sa druge strane, priprema ćelijske suspenzije uzoraka krvi koji nisu čuvani u tečnom azotu vršila se odmah po dolasku u laboratoriju.

Dalji koraci u pripremi ćelijske suspenzije su bili isti. U 1 ml hladnog 1xPBS je dodato 50 µl suspenzije krvi. Suspenzija je potom centrifugirana (5 min, 4 °C, 2000 rpm) i talog je resuspendovan u 300 µl supernatanta. Ovako pripremljena suspenzija je dalje korišćena za procenu citotoksičnog efekta diferencijalnim bojenjem AO/EtBr i genotoksičnog efekta mikronukleus testom. Za alkalni i Fpg-modifikovani komet test ćelijska suspenzija je dodatno razblažena u 1xPBS kako bi se dobilo 5×10^4 ćelija/ml.

3.2.3.1.4 Procena citotoksičnosti – diferencijalno bojenje i MTS test

Citotoksični efekat nativnih uzoraka vode na HepG2 i ćelijama krvi uklija određivan je diferencijalnim bojenjem (AO/EtBr), dok je citotoksični efekat LVSPE uzoraka određivan MTS testom.

U slučaju diferencijalnog bojenja, na mikroskopsku pločicu se nanosi 20 µl ćelijske suspenzije i 2 µl AO/EtBr. Korišćenjem fluorescentnog mikroskopa (Leica, DMLS, Nemačka, sa ekscitacionim filterom od 510 - 560 nm i emisionim filterom od 590 nm, pod 400x uveličanjem) uočavaju se zeleno obojene žive ćelije i crveno obojene mrtve. Za svaki uzorak, citotoksičnost je određena kao stopa mrtvih ćelija u ukupno analiziranih 100 ćelija.

MTS test se zasniva na konverziji žuto obojenih kristala soli tetrazolijuma (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, MTS) u ljubičasto obojeni formazan koji se rastvara u vodi. Metabolički aktivne ćelije u mitohondrijama prevode MTS jedinjenje do formazana. Spektrofotometrijskim merenjem na 490 nm se određuje količina nastalog formazana, što je proporcionalno broju živih ćelija. Dan pre izvođenja eksperimenta napravljen je MTS/PMS rastvor. Za određivanje broja živih ZFL ćelija nakon tretmana razblaženim ekstraktima površinskih voda sa lokaliteta dodato je u svaki bunar 40 µl rastvora MTS/PMS i ploče su inkubirane 3h na 28 °C. Nakon inkubacije očitane su vrednosti apsorpcije na 490 nm

(spektrofotometar SynergyMx, BioTek, Winooski, SAD). Vijabilnost ćelija je određena preko formule:

$$\% \text{ vijabilnih ćelija} = 100 \% \times (\text{vrednost } OD_{490nm} \text{ uzorka} / \text{vrednost } OD_{490nm} \text{ kontrole})$$

3.2.3.1.5 Procena genotoksičnosti

3.2.3.1.5.1 Alkalni i Fpg-modifikovani komet test

Alkalnim komet testom detektovani su jednolančani, dvolančani prekidi, kao i alkalno labilna mesta na DNK molekulu (procedure za pripremu ćelijskih su opisane u poglavljima 3.2.3.1.2.3 i 3.2.3.1.3.2). Dodatno, da bi se ispitao uticaj oksidativnog stresa na indukciju DNK oštećenja u ćelijama krvi uklija uzorkovanih u slivu Velike Morave urađen je i Fpg-modifikovani komet test

Prirodna svetlost može dovesti do indukcije DNK oštećenja i zbog toga su alkalni i Fpg-modifikovani komet test izvođeni mraku ili pod žutom svetlošću (Singh et al., 1988). Pre eksperimenta mikroskopske pločice su detaljno oprane deterdžentom, osušene i presvučene otopljenom 1 % NMP agarozom.

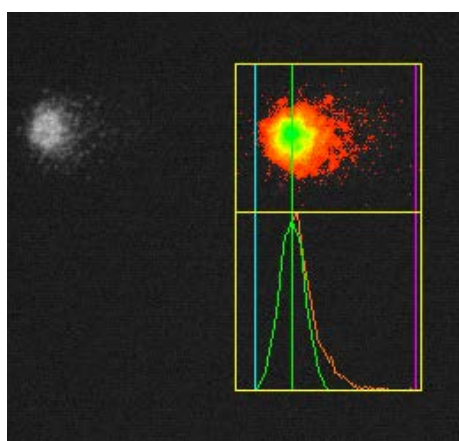
Od trenutka dobijanja ćelijskih suspenzija, sama metodologija alkalnog komet testa je ista za *in vitro* i *in vivo* istraživanja sprovedena u slivu Velike Morave i Save. Na dan eksperimenta, na dve polovine mikroskopske pločice koje su prethodno presvučene slojem 1 % NMP je dodato po 80 μ l otopljenog 1 % NMP i preko toga su stavljena pokrovna stakla da bi se agarozna ravnomerno rasporedila. Pločice su potom ostavljene 5 min na + 4 °C da bi gel očvrstnuo. Nakon toga, pokrovna stakla su uklonjena, a na agarozne gelove je dodat još jedan agarozni sloj koji sadržao 70 μ l 1 % LMP i suspenziju ćelija (u mikrotitarsku ploču se nanese 70 μ l 1 % LMP i 30 μ l ćelijske suspenzije koji se pomešaju i potom se na mikroskopsku pločicu nanosi 70 μ l) i gelovi su pokriveni pokrovnim staklima. Nakon sušenja pločica 5 min na + 4°C pokrovna stakla su uklonjena. Mikroskopske pločice prebačene su u kadice na +4 °C, prelivene sveže pripremljenim rastvorom za lizu i ostavljene preko noći kako bi se uklonile membrane ćelija. Narednog dana, pločice su izvađene iz rastvora za lizu i prebačene u kadicu za elektroforezu. U kadicu za elektroforezu lagano je dodat hladan rastvor za denaturaciju DNK i elektroforezu. U prvih 20 min vrši se denaturacija DNK, a nakon toga se u rastvor uvodi struja (0,75 V/cm, 300 mA) i u narednih 20 min sledi horizontalna elektroforeza. Zatim sledi proces neutralizacije u trajanju od 15 min, kada se pločice prebacuju u novi hladni rastvor. Nakon neutralizacije sledi 15 min fiksacije u ledeno-hladnom metanolu. Fiksirane pločice su zatim osušene preko noći na + 4 °C i nakon toga prebačene u kutijama za mikroskopske pločice sve do analize. Za svaki uzorak HepG2 i ZFL ćelija napravljene su 3 replike, a za uzorke ćelija krvi napravljene su dve replike.

Alkalni komet test na ćelijama krvi uklija uzorkovanih u slivu Dunava je rađen sa malim modifikacijama. Pre svega, u ovom eksperimentu na mikroskopske pločice nije dodavan drugi 1 % NMP sloj. Pored toga, smanjena je zapremina 1 % LMP gela sa ćelijskom suspenzijom, što je omogućilo da se na mikroskopske pločice nanosi više od dva gela. Drugim rečima, na mikroskopske pločice koje su prethodno presvučene sa 1 % NMP nanošeno je po 10 μ l ćelijske suspenzije sa 1 % LMP (pomešano je 30 μ l ćelijske suspenzije i 70 μ l 1 % LMP). Na ovaj način jedna mikroskopska pločica može sadržati do 18 gelova malog prečnika, odnosno mikrogelova. Ovom modifikacijom omogućeno je da se svaki uzorak uradi u većem broju ponavljanja, a istovremeno da se uradi elektroforeza u jednoj kadici za elektroforezu za preko 250 uzoraka. Nakon dodavanja svih 18 mikrogelova pločice su ostavljane 5 min na + 4 °C. Za svaki uzorak krvi je rađena serija razblaženja 1:4 i 1:12 i svako razblaženje je rađeno u duplikatu kako bi se dobio optimalan broj jedara na mikrogelovima. Uslovi u kojima su vršeni procesi lize, denaturacije, elektroforeze, neutralizacije i fiksacije su bili identični uslovima tokom klasičnog alkalnog testa (opisano u prethodnom pasusu).

Za izvođenje Fpg-modifikovanog komet testa za svaki uzorak je pripremano 2 mikroskopske pločice: jedna za praćenje aktivnosti Fpg enzima i druga za ispitivanje da li pufer u kome je enzim rastvoren izazva DNK oštećenja. Na osnovu prethodne studije (Kračun-Kolarević et al., 2016) utvrđena je optimalna koncentracija enzima razblaženja u puferu 1:300. Koraci u izvođenju eksperimenta su identični kao za alkalni komet test sve do koraka lize: na pločice presvučene 1 % NMP nanet je drugi sloj 1 % NMP, a potom je dodata suspenzija ćelija sa 1 % LMP. Nakon 1 h lize, mikroskopske pločice su tri puta ispirane hladnim Fpg puferom za ispiranje pločica. Na pločice za praćenje Fpg aktivnosti na svaku polovinu mikroskopske pločice dodato je po 45 μ l Fpg enzima i pokrivene su pokrovnim staklom, dok je na pločice za ispitivanje pufera dodato po 45 μ l Fpg pufera i pokrivene su pokrovnim staklom. Sve pločice su stavljene na inkubaciju 30 min na + 37 °C, pri vlažnim uslovima. Za svaki uzorak su pripremljene dve replike. Nakon inkubacije pločice su stavljene 10 min na + 4 °C i potom se skinuta pokrovna stakla. Koraci denaturacije, elektroforeze, neutralizacije i fiksacije su isti kao i za alkalni komet test.

Korišćenjem fluorescentnog mikroskopa (Leica, DMLS, Nemačka, ekscitacioni filter 510 - 560 nm, emisioni filter 590 nm, 400 \times uveličanje i mikroskop Eclipse 800, Nikon, Japan, ekscitacioni filter 510 - 560 nm, emisioni filter 590 nm, 400 \times uveličanje) vršena je analiza DNK oštećenja detektovanih u alkalnom i Fpg-modifikovanom komet testu nakon bojenja mikroskopskih preparata bojama AO ili GelRed. Na svaki agarozni gel je dodato po 20 μ l AO ili ista zapremina GelRed, a potom se kvantifikacija DNK oštećenja vršila pomoću programa Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK) (Slika 3.3). Parametar TI % je korišćen za kvantifikaciju DNK oštećenja. U okviru alkalnog komet testa analizirana je i učestalost jedara sa izuzetno oštećenim molekulom DNK, tzv. ježevi (eng. *hedgehogs*, HH).

U okviru istraživanja sliva Velike Morave analizirano je 300 jedara HepG2 ćelija po lokalitetu (100 jedara po mikroskopskom preparatu) i 100 jedara ćelija krvi uklija po lokalitetu (50 jedara po mikroskopskom preparatu). Istraživanje sliva Save takođe je obuhvatilo analizu 100 jedara ćelija krvi uklija po lokalitetu (50 jedara po mikroskopskom preparatu). U okviru istraživanja sliva Dunava analizirano je 150 jedara ZFL ćelija po lokalitetu (50 jedara po mikroskopskom preparatu) i 100 jedara ćelija krvi uklija po lokalitetu (50 jedara po mikroskopskom preparatu). S obzirom da su u alkalnom komet testu na ćelijama krvi uklija sa lokaliteta sliva Dunava korišćeni mikrogelovi, u ovom slučaju su analizirani mikroskopski preparati na kojima se nalazilo prosečno 4-5 jedara u okviru vidnog polja na uveličanju 400 x.



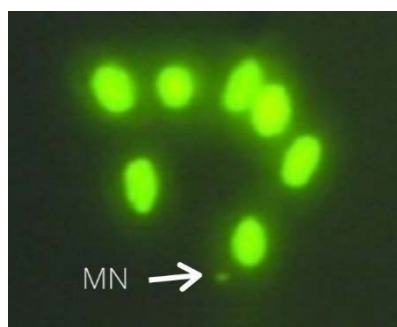
Slika 3.3. Izgled DNK molekula eritrocita uklija nakon elektroforeze (foto: J. Jovanović Marić).

3.2.3.1.5.2 Mikronukleus test

Kvantifikacija trajnih DNK oštećenja u eritrocitima uklija vršena je mikronukleus testom. Prema kriterijumima koje su opisali Fenech i sar. (2003) praćene su strukture jasno odvojene od

glavnog jedra i od 1/6 do 1/3 dijametra glavnog jedra, odnosno mikronukleusi (MN) (Slika 3.4) i ćelije sa više od 2 MN, tzv. ćelije sa iregularnim jedrima (IRR).

Pre izvođenja eksperimenta, mikroskopske pločice su oprane i osušene. Potom, na jedan kraj mikroskopske pločice naneto je 100 μ l suspenzije, a onda je pomoću pokrovnog stakla napravljen razmaz (Štraser i sar., 2011). Pločice su osušene i potom fiksirane 20 min u ledeno-hladnom metanolu. Pre analize, pločice sa razmazom su obojene sa 20 μ l AO i prekrivene pokrovnim staklom. Za vizuelizaciju ćelija je korišćen fluorescentni mikroskop (Leica, DMLS, Nemačka, sa ekscitacionim filterom od 510 - 560 nm i emisionim filterom od 590 nm, pod 1.000x uveličanje). Za procenu učestalosti MN i IRR analizirano je 1.000 ćelija po uzorku u istraživanju sliva Velike Morave, dok je u okviru istraživanja sliva Save i Dunava analizirano 2.000 ćelija po uzorku.



Slika 3.4. Jedro eritrocita ukljije sa mikronukleusom (foto: J. Jovanović Marić).

3.2.3.2 Protočna citometrija u analizi ćelijskog ciklusa

Uticaj LVSPE uzoraka na ćelijski ciklus ZFL ćelija ispitivan je pomoću protočne citometrije prema protokolu koji je opisao Novak i sar. (2017). Analiza ćelijskog ciklusa rađena je za one koncentracije koje su u alkalnom komet testu dovele do najvišeg stepena DNK oštećenja (za lokalitet JDS33 – 100 REF, lokalitet JDS37 – 12,5 REF, lokalitet JDS40 – 50 REF, lokalitet JDS41 – 12,5 REF). Neposredno pre analize, epruvete sa pripremljenim ćelijskim suspenzijama (opisano u Poglavlju 3.2.3.1.2.3) su ostavljene na sobnoj temperaturi 5 min i nakon toga je dodato po 2 ml ledeno-hladnog 1xPBS i sadržaj je prvo lagano promešan kružnim pokretima ruke, a potom centrifugiran (1.300 rpm, 10 min). Nakon centrifugiranja, usledio je korak ispiranja: supernatant je odliven, talog je resuspendovan vorteksovanjem u 3 ml ledeno-hladnog 1xPBS, suspenzija je ponovo centrifugirana (1.300 rpm, 5 min), a supernatant je odliven. Potom su ćelije obojene tako što je u svaku epruvetu dodato 100 μ l DAPI boje, a resuspendovane ćelije su inkubirane 30 min u mraku. Zatim je dodato 2 ml ledeno-hladnog 1xPBS i suspenzija je ponovo centrifugirana (1.300 rpm, 5 min). Talog nakon centrifugiranja je resuspendovan u 200 μ l hladnog 1xPBS i čuvan na ledu. Ovako pripremljena ćelijska suspenzija je uvedena u sistem protočnog citometra MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Nemačka) koji razvrstava ćelije na osnovu pobuđenog fluorescentnog signala, a potom se taj signal dalje analiziran u programu FlowJo (Biosciences, SAD). Za svaki uzorak analizirano je 10^4 ćelija i za njih je određeno u kojoj su se fazi ćelijskog ciklusa nalazile (G_0/G_1 , S i G_2/M).

3.2.3.3 RAPD test

RAPD omogućava umnožavanje DNK molekula pomoću nespecifičnih 10-mernih prajmera tokom PCR reakcije kako bi se detektovali genetički polimorfizmi (Welsh i McClelland, 1990; Williams i sar., 1990). U okviru disertacije RAPD metoda je primenjena na uzorcima mišićnog tkiva jednki ukljija uzorkovanih na lokalitetima sliva Save i Dunava.

Za izolaciju DNK je korišćen mišić ukljija prema protokolu Kolarevića i sar. (2018). Po 20 mg mišića je homogenizovano u 1.120 μ l ekstrakcionog pufera i ostavljen preko noći na 4 °C da se

tkivo dodatno degraduje. Narednog dana uzeto je 600 μ l homogenizata i dodato u 100 μ l 5 M NaCl i sadržaj je vorteksovan. U iste mikrotube je dodato 300 μ l 3 % CTAB+PVP pufera, sadržaj je vorteksovan i inkubiran 20 min na 65 °C. Potom je dodato 800 μ l 37 % hloroforma, sve je ponovo vorteksovano, a sadržaj je centrifugiran (10 min, 13.000 rpm, 4 °C). U supernatantu se sada nalaze DNK molekuli, pa se on prebacuje (oko 700 μ l) u nove mikrotube u koje se dodaje 1/10 5 M $C_2H_3NaO_2$ i ista zapremina (oko 750 μ l) ledeno-hladnog izopropanola. Mikrotube se vorteksuju i potom centrifugiraju (10 min, 13.000 rpm, 4 °C). Nakon centrifugiranja DNK molekuli se nalaze u talogu, pa supernatant treba pažljivo odliti, a talog se ispira ledeno-hladnim 96 % etanolom nakon čega sledi centrifugiranje (10 min, 13.000 rpm, 4 °C). Supernatant se odliva kako bi se u potpunosti uklonio etanol, nakon čega se vrši inkubacija na 37 °C sve dok se talog ne osuši u potpunosti. Po sušenju taloga, u mikrotube je dodato 50 μ l TE pufera sa dodatkom RNaze A (1 μ L RNaze A koncentracije 10 mg/ml se dodaje u 49 μ l TE pufera) i mikrotube su inkubirane na 37 °C, 15 min. Koncentracija izolovane DNK i njena čistoća je određena pomoću NanoPhotometer N60 (Implen, Nemačka). Po završetku procesa izolacije DNK uzorci su čuvani na -20 °C do dalje analize.

Za umnožavanje DNK odabrano je šest 10-mernih nespecifičnih prajmera (Tabela 3.4), a umnožavanje je rađeno pomoću TopTaq Master Mix Kit-a (Quiagen, Nemačka). Svaka PCR reakcija ukupne zapremine 25 μ l je sadržala 10,5 μ l ultra čiste vode, 12,5 μ l kita (sadrži Taq polimerazu, dNTP-ove, $MgCl_2$), 1 μ l 25 pM prajmera i 1 μ l 50 ng/ μ l genomske DNK.

Umnožavanje DNK je vršeno u Bio Rad T100 Thermal Cyler (Bio Rad Laboratories, SAD) pri sledećim ulovima: 1 ciklus 5 min na 94 °C za denaturaciju DNK, 45 ciklusa (1 min na 94 °C za denaturaciju DNK, 2 min na 36 °C za vezivanje prajmera, 2 min na 72 °C za elongaciju) i 1 ciklus 10 min na 72 °C za finalnu elongaciju. Dobijeni PCR produkti su čuvani na -20 °C do analize.

Umnoženi DNK fragmenti su razdvojeni tokom horizontalne elektroforeze propuštanjem struje (300 mA, 2,5 V/cm, 2 h) kroz rastvor za elektroforezu (0,5xTBE pufer) u koji je uronjen 1,5 % agarozni gel sa PCR produktima. Da bi se DNK fragmenti vizuelizovali, u agarozni gel je dodata fluorescentna boja EtBr, a gelovi su fotografisani pomoću Gel Doc XR (Bio Rad Laboratories, SAD).

Tabela 3.4. Prikaz sekvenci odabranih prajmera.

Šifra prajmera	Sekvenca (5'→3')
I	GGTGC GGGAA
II	GTTTCGCTCC
III	GTAGACCCGT
IV	AAGAGCCCGT
IV	AACGCGCAAC
VI	CCCGTCAGCA

Na osnovu prisustva/odsustva DNK fragmenata u RAPD profilima jedinki formirana je matrica koji je dalje korišćena u analizi za procenu sličnosti/razlike između jedinki. RAPD profili jedinki su međusobno poređeni. Ukoliko je fragment prisutan označavan je sa 1, a ukoliko je fragment u RAPD profilu nedostajao označavan je sa 0.

Indeks sličnosti između jedinki je dobijen primenom formule (Lynch, 1990):

$$S_{xy} = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$$

n_{xy} predstavlja broj fragmenata koji su prisutni kod obe jedinke, a n_x , n_y predstavlja ukupan broj fragmenata jedinke x/y. Prosečna vrednost ovog indeksa dobijena je na osnovu svih poređenja između jedinki, za sve prajmere.

Sličnost između jedinki istog lokaliteta predstavlja srednju vrednost svih S_{xy} dobijenih na osnovu poređenja svih jedinki unutar populacije, za sve prajmere.

Sličnost između jedinki sa različitih lokaliteta je dobijena primenom formule (Lynch, 1990):

$$S_{ij} = 1 + S'_{ij} - 0,5 \times (S_i + S_j)$$

S_i , S_j predstavljaju S vrednosti jedinki sa lokaliteta i/j , S'_{ij} prosečnu vrednost sličnosti između jedinki sa lokaliteta i i j .

Genetička distanca između jedinki sa različitih lokaliteta je dobijena na osnovu formule (Lynch, 1991):

$$D_{ij} = -\ln \times [S'_{ij}/\sqrt{(S_i \times S_j)}]$$

3.2.3.4 Određivanje koncentracije metala i metaloida u tkivima uklija

Određivanje koncentracija metala i metaloida u tkivima uklija vršeno je na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Pojedinačne jedinke ulovljene na lokalitetima sliva Velike Morave odmah po dolasku u laboratoriju su homogenizovane u Sterilmixer (International P.B.I. S.p.A., Italija) homogenizatoru. Ukupna masa homogenizata je izmerena i uzorci su čuvani u plastičnoj ambalaži na -20 °C do analize. Neposredno pre analize uzorci su liofilizirani (Christ Alpha 2-4 LD, Harz, Germany). U okviru studije u slivu Save korišćen je samo mišić riba za određivanje koncentracije metala i metaloida. Uzorkovane jedinke koje su čuvane na -20 °C su otopljene i potom je od svake jedinke disekovan i izmeren mišić. Mišići svih jedinki su potom liofilizirani pomoću Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrator, GAMMA 1–16 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Nemačka). Nakon liofilizacije, za svaki lokalitet napravljeno je po dva poduzorka od po 0,5 g (0,1 g mišića od 5 jedinki) u kojima je određena koncentracija metala i metaloida.

Digestija svih uzoraka je vršena, nakon dodavanja 10 ml 65 % azotne kiseline i 1 ml 30 % vodonik peroksida, u mikrotalasnoj pećnici (Advanced Microwave Digestion System ETHOS 1, Milestone, Italy) 20 min na 200 °C. Nakon digestije uzorci su razblaženi u ultra čistoj vodi do zapremine 25 ml provodljivosti 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Koncentracije Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sn i Zn određene su indukcijom spregnute plazme – optičko emisione spektroskopije (ICP-OES, Thermo Fisher Scientific iCAP 6500 Duo ICP, Cambridge, United Kingdom). Za kontrolu je odabran referentni materijal mišića DORM-4 (National Research Council of Canada).

Dobijene koncentracije elemenata su izražene po $\mu\text{g}/\text{g}$ suve mase (eng. *dry weight*, dw), koje su potom izražene u $\mu\text{g}/\text{g}$ vlažne mase (eng. *wet weight*, ww) kako bi mogle da se uporede sa MDK vrednostima u ribljem mesu koje su propisane u EU Direktivi (European Commission, 2006) i Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja („Službeni glasnik RS” broj 29/2014). Propisane maksimalno dozvoljene koncentracije za Pb iznosi 0,3 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww, za Cd 0,005 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww i Hg 0,05 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww (European Commission, 2006). Republika Srbija je propisala iste MDK vrednosti za ova tri elementa, a za As iznosi 2,0 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww, za Cu i Fe 30 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww i Zn 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ („Službeni glasnik RS” broj 29/2014).

3.2.4 *In silico* pristup

In silico pristup uključio je pretragu baza podataka jedinjenja detektovanih na ispitivanim lokalitetima tokom nadzornog monitoringa (podaci preuzeti od SEPA i GZZJZ Beograd) i baze NORMAN udruženja (<https://www.norman-network.com/>) iz koje su preuzeti podaci detektovanih jedinjenja u LVSPE uzorcima i jedinkama uklija na lokalitetima sliva Dunava.

Koncentracije jedinjenja detektovane tokom nadzornog monitoringa i u LVSPE uzorcima, kao i PNEC vrednosti koje su preuzete iz baze podataka NORMAN udruženja (<https://www.norman-network.com/nds/ecotox/>) i ECHA (<https://echa.europa.eu/>) korišćene su računanje SumTU (Sprague, 1970):

$$SumTU = \sum (C_i / \text{lowest } PNEC_i)$$

C_i predstavlja koncentraciju jedinjenja i koja je izmerena na lokalitetu, $\text{lowest } PNEC_i$ najnižu vrednost PNEC za dato jedinjenje koja je preuzeta iz NORMAN/ECHA baze podataka.

Sve organske prioritetne supstance koje su analizirane u tkivima uklija predstavljaju rizik po zdravlje riba i ostalih organizama i za njih su propisane MDK vrednosti (European Commission 2011; European Parliament & Council, 2013). Poređenjem detektovanih koncentracija preuzetih iz baze NORMAN udruženja (<https://www.norman-network.com/nds/empodat/chemicalSearch.php>) i MDK vrednosti izvršena je procena uticaja detektovanih jedinjenja na biotičku komponentu ispitivanih lokaliteta.

3.2.5 Statističke analize

Statistička obrada podataka rađena je u programima Statistica 7.0. (StatSoft, Inc., 2001) i SPSS 17.0 (SAD). Na početku statističke obrade podataka ispitan je tip raspodele podataka pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Rezultati mikronukleus testa koji su pokazali normalnu distribuciju dalje su analizirani parametrijskim testovima. Za testiranje razlika između lokaliteta korišćena je analiza one-way ANOVA, a Tukey's post-hoc test za poređenja između grupa (lokaliteta). Za sva poređenja nivo značajnosti je iznosio $p \leq 0,05$. Rezultati alkalnog i Fpg modifikovanog komet testa i dobijene koncentracije metala i metaloida nisu bili u saglasnosti sa normalnom raspodelom i za njihovu analizu su korišćeni neparametrijski testovi: Kruskal-Wallis H test za testiranje da li postoji značajna razlika između grupa. Ukoliko je utvrđenja statistički značajna rezlika, korišćen je Mann-Whitney U test za poređenje dve grupe, a vrednost statističke značajnosti (p) je korigovana u odnosu na broj poređenja ($p = 0,05 / \text{ukupan broj poređenja}$).

Korelacija između podataka je testirana pomoću Pearson testa (u slučaju normalne distribucije) i Spearman testa (u slučaju kada podaci nisu pokazali normalnu distribuciju). U oba slučaja statistička značajnost p iznosi $\leq 0,05$.

Indeks zagađenja metalima (eng. *metal pollution index*, MPI) korišćen je kako bi se jednostavnije izvršilo poređenje između različitih uzoraka, jer ovaj indeks govori o ukupnoj opterećenosti nekog tkiva ili organizma metalima i metaloidima. MPI se dobija na osnovu detektovanih koncentracija svih metala i metaloida (Usero et al., 1997):

$$MPI = (c_1 \times c_2 \times c_3 \times c_n)^{1/n}$$

c_n predstavlja koncentraciju određenog elementa u tkivu, a n ukupan broj analiziranih elemenata.

Primenom MPI formule vršena je i procena opterećenosti jedinki prioritetnim supstancama (eng. *organic pollution index*, OPI). Dobijanjem jedinstvene vrednosti na osnovu koncentracija

akumuliranih prioriternih supstanci omogućeno je jednostavnije poređenje između uzoraka, odnosno lokaliteta.

U okviru RAPD analize konstruisana su filogenetska stabla u programu Statistica 7.0. (StatSoft, Inc., 2001) primenom UPGMA metode (eng. *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) na osnovu matrice genetičke sličnosti, odnosno distance.

IBR je metoda koja objedinjuje odgovore biomarkera od interesa u jedan, generalni "indeks stresa", odnosno IBR vrednost (Beliaeff i Burgeot, 2002). Ova metoda podrazumeva i grafički prikaz koji se sastoji iz poligonalnih polja, koja predstavljaju površine IBR vrednosti za svaki parametar. U IBR analizi korišćeni su podaci kondicionog indeksa, vijabilnosti ćelija krvi uklija, TI % vrednosti dobijene u alkalnom i Fpg modifikovanom kome testu, učestačestalosti MN (%) i MPI/OPI vrednosti.

Da bi se izračunala ukupna IBR vrednost, potrebno je prvo standardizovati podatke:

$$Y_i = (X_i - \text{mean } X) / S$$

Y_i predstavlja standardizovanu vrednost biomarkera, X_i srednju vrednost biomarkera za određeni lokalitet, $\text{mean } X$ srednja vrednost datog biomarkera za sve lokalitete, S predstavlja standardnu devijaciju (SD) za svaki biomarker. U zavisnosti od toga da li je odgovor biomarkera na zagađenje indukcija ili inhibicija, Y vrednosti se dodaje predznak + ili -. Odnosno:

$$Z_i = - Y_i \text{ (u slučaju da je odgovor biomarkera na zagađenje inhibicija)}$$

ili

$$Z_i = Y_i \text{ (u slučaju da je odgovor biomarkera na zagađenje indukcija)}$$

Standardizovana vrednost Z_i se dalje koristi za izračunavanje S_i :

$$S_i = Y_i + | \min |$$

$S_i \geq 0$, a $| \min |$ predstavlja apsolutnu minimalnu vrednost koja je zabeležena na nekom od lokaliteta.

Za grafički prikaz korišćeni su radijalni dijagrami na kojima koordinate predstavljaju vrednosti biomarkera S_i dobijeni za svaki lokalitet. Površina polja između dve koordinate (A_i) je dobijena primenom sledeće formule:

$$A_i = (S_i \times S_{i+1} \times \sin \alpha) / 2$$

α predstavlja ugao koje zaklapaju dve susedne koordinate (S_i i S_{i+1}).

IBR vrednost za sve odabrane biomarkere obuhvata zbir svih A_i vrednosti:

$$IBR = A_1 + A_2 + A_n$$

A_n predstavlja površinu polja koje zauzimaju dve susedne koordinate. Vrednosti S_i ukazuju koji biomarker u najvećoj meri doprinosi povećanju, odnosno samanju IBR vrednosti.

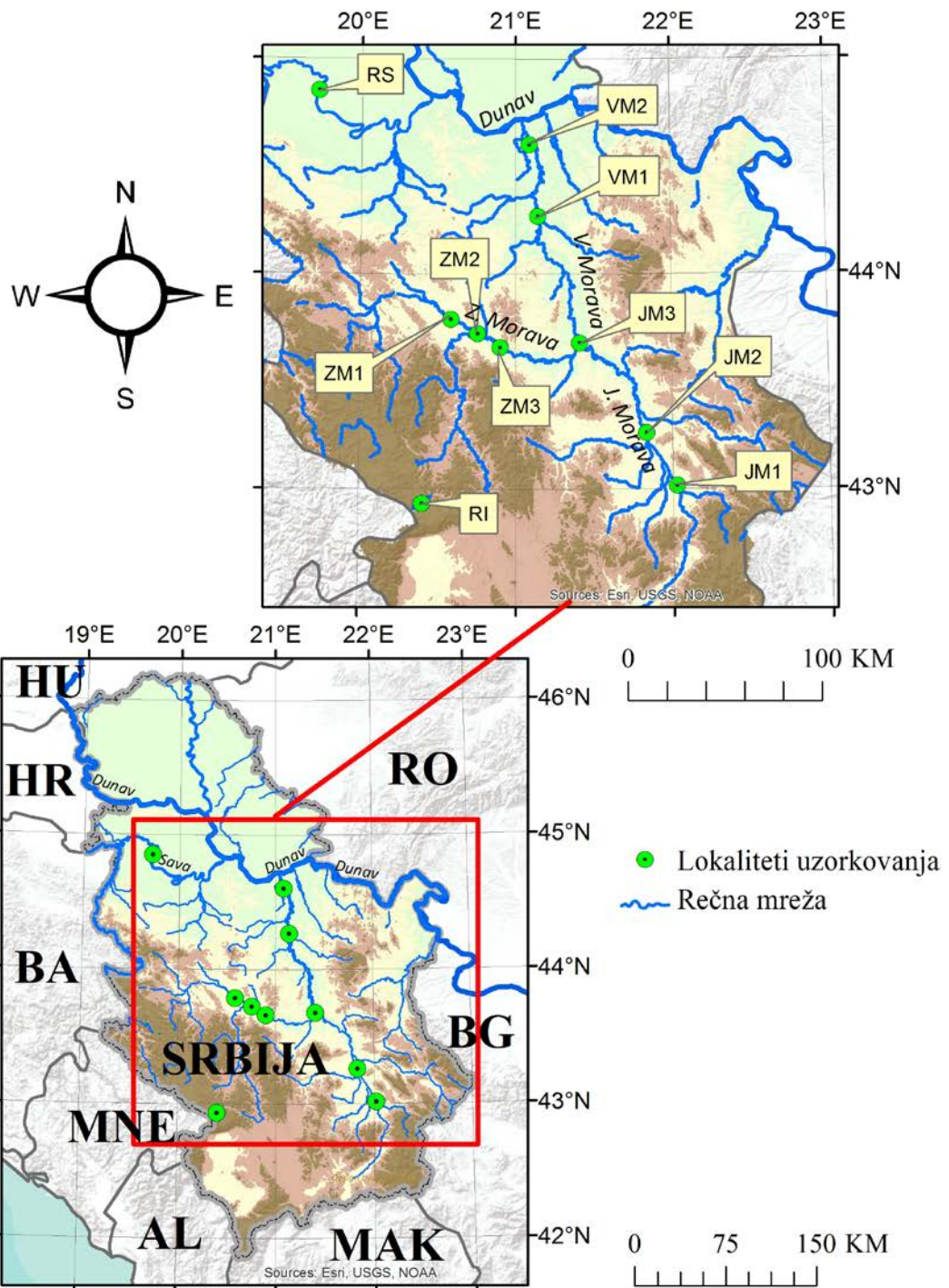
Na osnovu principa IBR metode urađena je i procena pritisaka zagađenja na lokalitetima (eng. *integrated pollution based response*, IPBR). Naime, u ovom slučaju su konstruisani radijalni dijagrami za svaki lokalitet u kojima vrednosti koordinata nisu predstavljale vrednosti odgovora biomarkera, već logaritmovane vrednosti fizičko-hemijskih, hemijskih i mikrobioloških parametara.

3.2.6 Opis područja istraživanja

3.2.6.1 Sliv Velike Morave

Istraživanje sliva Velike Morave sprovedeno je tokom avgusta i septembra 2016. godine i obuhvatilo je osam lokaliteta, od kojih dva lokaliteta na Velikoj Moravi i po tri lokaliteta na toku Zapadne i Južne Morave (Slika 3.5). Velika, Zapadna i Južna Morava su pod velikim antropogenim pritiscima usled čega nije bilo moguće obezbediti referentni („čist“) lokalitet na ovim rekama. Iz tog razloga, podaci iz baze SEPA dobijeni za lokalitet na Ibru (Batrage, RI) korišćeni su kao „referentne“ za procenu stepena zagađenja lokaliteta, a kao bazalne vrednosti DNK oštećenja u ćelijama krvi korišćeni su podaci iz studije Kolarević i sar. (2016a) za lokalitet Šabac 1 (RS). Opis odabranih lokaliteta dat je u tabeli 3.5.

Prema Pravilniku („Službeni glasnik RS“ broj 74/2011) gornji deo toka Velike Morave, na kome se nalazi lokalitet VM1, spada u tip 2 vodnog tela (velike reke sa dominacijom srednjeg nanosa), dok donji deo toka, na kome se nalazi lokalitet VM2, pripada vodnom telu tipa 1 (velike nizijske reke sa dominacijom finog nanosa). Sa druge strane, čitav tok Zapadne i Južne Morave pripada tipu 2 vodnog tela („Službeni glasnik RS“ broj 74/2011).



Slika 3.5. Mapa ispitivanih lokaliteta sliva Velike Morave i referentnog lokaliteta na reci Savi (RS) i Ibru (RI).

Tabela 3.5. Prikaz ispitivanih lokaliteta u slivu Velike Morave i referentnih lokaliteta na reci Savi (RS) i Ibru (RI).

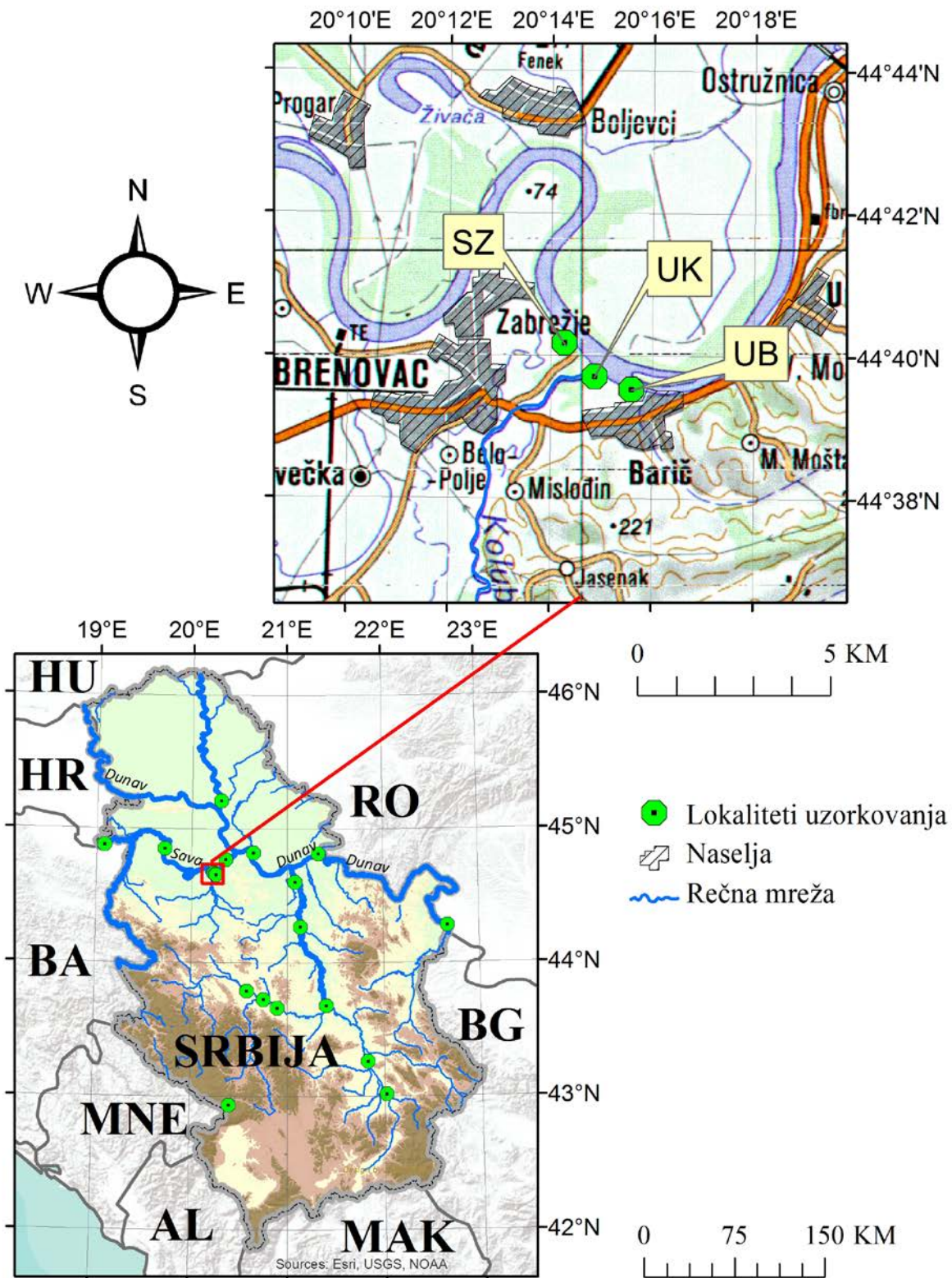
Reka	Šifra lokaliteta	Opis lokaliteta
Ibar	RI	- Referentni lokalitet za procenu zagađenja ostalih lokaliteta - U ataru sela Batrage
Sava	RS	- Referentni lokalitet u genotoksikološkom delu istraživanja - Nizvodno od Šapca
Velika Morava	VM1	- Nizvodno od Svilajncu (10.000 stanovnika) i uzvodno od Požarevca - Nalazi se u oblasti u kojoj je zastupljena poljoprivreda (uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi)
	VM2	- Nizvodno od Požarevca (50.000 stanovnika) - Uticaj nepreprađenih komunalnih otpadnih voda iz grada - Uticaj industrijskih otpadnih voda (poreklom iz postrojenja prehrambene, mašinske i metaloprerađivačke industrije)
Zapadna Morava	ZM1	- U ataru sela Obrva (< 1.000 stanovnika), oko 25 km nizvodno od Čačka - Uticaj nepreprađenih komunalnih otpadnih voda - Uticaj neprerađenih industrijskih otpadnih voda (poreklom iz postrojenja mašinske, elektroindustrije, prehrambene i tekstilne industrije) - Uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koji se koriste u poljoprivredi
	ZM2	- Nizvodno od Kraljeva (60.000 stanovnika) i nizvodno od ušća reke Ibar u Zapadnu Moravu - Uticaj nepreprađenih komunalnih otpadnih voda - Uticaj neprerađenih industrijskih otpadnih voda (poreklom iz postrojenja mašinske, prehrambene, industrije za proizvodnju vagona, metalurgije) - Uticaj zagađujućih supstanci prisutnih u vodi reke Ibar
	ZM3	- U ataru sela Ugljarevo (< 500 stanovnika), oko 25 km nizvodno od Kraljeva - Uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi
Južna Morava	JM1	- Nizvodno od Leskovca (60.000 stanovnika) - Uticaj neprerađenih komunalnih otpadnih voda - Uticaj nepreprađenih industrijskih otpadnih voda (poreklom iz postrojenja tekstilne, automobilske, farmaceutske, elektroindustrije, industrije za proizvodnju sredstava za čišćenje i dezinfekciju, kozmetičke proizvode, itd.)
	JM2	- U ataru sela Batušinac (< 1.000 stanovnika), uzvodno od Niša - Uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi
	JM3	- U blizini Stalaća (1.500 stanovnika) - Uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi - Uticaj neprerađenih otpadnih voda iz domaćinstava

3.2.6.2 Sliv Save

Istraživanje sliva Save sprovedeno je u aprilu 2019. godine na tri lokaliteta (Slika 3.6). Lokalitet Sava Zabran (SZ, na mapi označen brojem 1) se nalazi na Savi u okviru obrenovačkog izletišta Zabran, 28 rečnih km (rkm) uzvodno od Beograda. Uzvodno (43 rkm) od lokaliteta Zabran nalazi se najveća termoelektrana u Srbiji, „Nikola Tesla A“ čije pepelište predstavlja značajnog zagađivača ovog dela toka reke Save, kao i okolnih poljoprivrednih površina. Na 1,1 rkm nizvodno

od Zabrana, na ušću Kolubare u Savu nalazi se lokalitet Ušće Kolubare (UK, na mapi označen brojem 2). Jedan od glavnih izvora zagađenja ovog dela toka Kolubare predstavljaju komunalne otpadne vode iz Obrenovca (oko 70.000 stanovnika) koje se ulivaju direktno u Kolubaru 1,5 km uzvodno od ispitivanog lokaliteta. Lokalitet Ušće Baričke (UB, na mapi označen brojem 3) se nalazi na ušću Baričke reke u Savu, odnosno 0,98 km nizvodno od ušća Kolubare i Save. Na ovom lokalitetu je izražen difuzni tip zagađanja poreklom od otpadnih voda iz domaćinstava koje se direktno ulivaju u Baričku reku. Pored toga, neposredno uzvodno od lokaliteta nalazi se industrijski kompleks (fabrika za proizvodnju automobilskih delova, delova motora i opštih industrijskih delova, fabrika kartona) čije se otpadne vode ispuštaju direktno u Savu.

Prema Pravilniku („Službeni glasnik RS” broj 74/2011), deo toka Save koji protiče kroz teritoriju Republike Srbije pripada vodnom telu tipa 1. Kolubara je značajna desna pritoka Save koja se u ovu reku uliva kod Obrenovca i pripada tipu 2 vodnog tela („Službeni glasnik RS” broj 74/2011). Barička reka je jedna od manjih desnih pritoka Save, čije se ušće nalazi u naselju Barič. Barička reka spada u tip 3 vodnog tela (mali i srednji vodotoci sa dominacijom krupne podloge i nadmorskom visinom do 500 m) („Službeni glasnik RS” broj 74/2011).

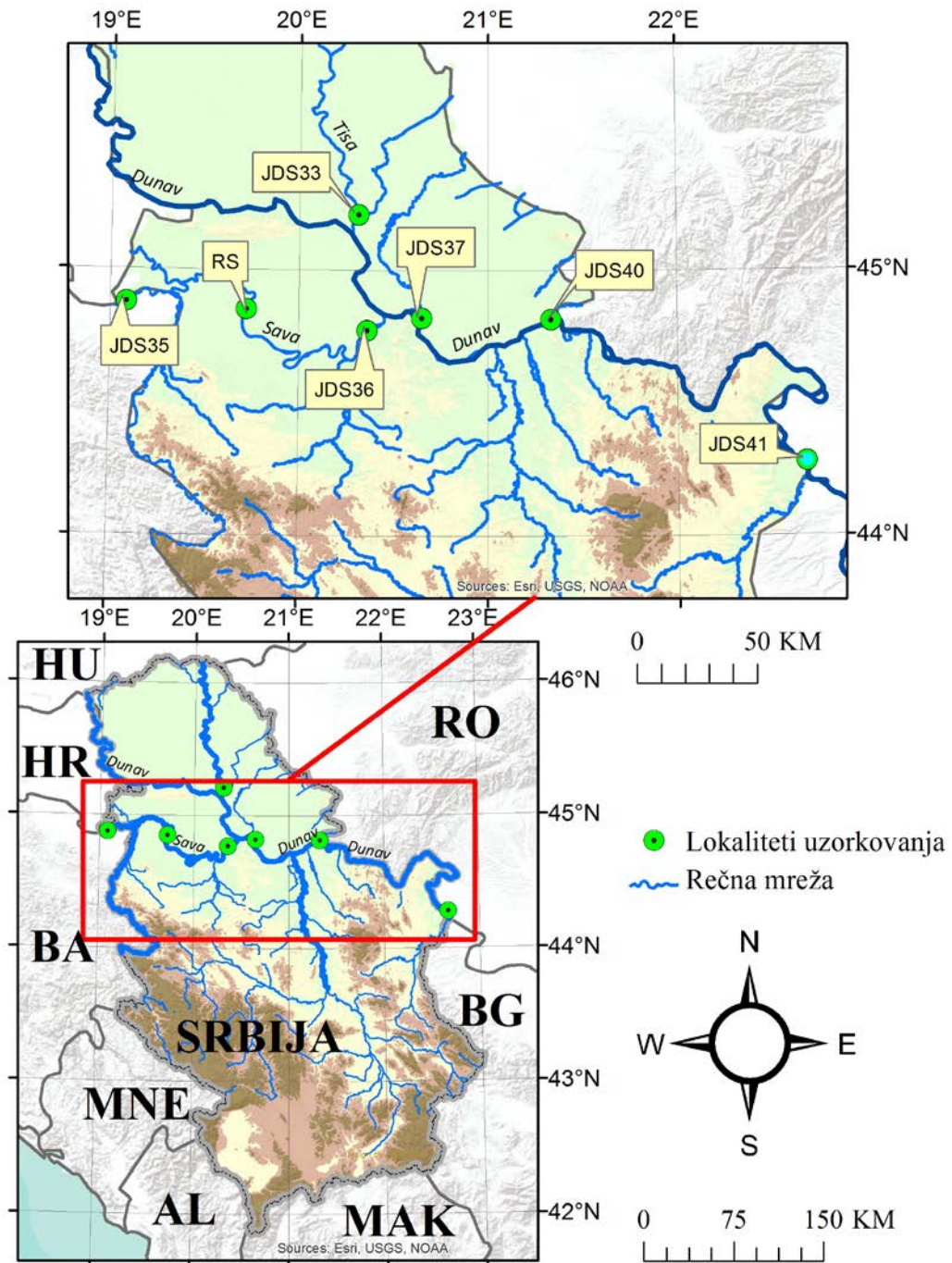


Slika 3.6. Mapa lokaliteta u slivu Save.

3.2.6.3 Sliv Dunava

Istraživanje sliva Dunava vršeno je u okviru međunarodne JDS4 ekspedicije tokom jula 2019. godine. U okviru ove studije, istraživanje je rađeno na šest lokaliteta, od kojih je jedan

lokalitet na reci Tisi, dva na Savi i tri lokaliteta na Dunavu, u delu toka koji protiče kroz teritoriju Republike Srbije (Slika 3.7). Opis odabranih lokaliteta dat je u tabeli 3.6. Prema Pravilniku („Službeni glasnik RS” broj 74/2011), svi odabrani lokaliteti se nalaze na rekama koja pripadaju tipu 1 vodnog tela.



Slika 3.7. Mapa ispitivanih lokaliteta sliva Dunava i referentni lokalitet na Savi (RS).

Tabela 3.6. Prikaz ispitivanih lokaliteta sliva Dunava.

Reka	Šifra lokaliteta	Opis lokaliteta
Tisa	JDS33	<ul style="list-style-type: none"> - 10 rkm uzvodno od ušća Tise u Dunav, kod Titela (5.000 stanovnika) - U priobalnom delu se nalazi nekoliko restorana i splavova čije se komunalne otpadne vode direktno ulivaju u Tisu - Uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi
Sava	JDS35	<ul style="list-style-type: none"> - Jamena, u blizini granice Srbije sa Bosnom i Hercegovinom i Hrvatskom - Najveći pritisak zagađenja potiče od organskih i neorganskih jedinjenja poreklom od poljoprivrednih aktivnosti
	JDS36	<ul style="list-style-type: none"> - Makiš, 11 rkm uzvodno od ušća Save u Dunav - Uticaj difuznog zagađenja poreklom iz otpadnih voda domaćinstava iz naselja Ostružnica i velikog broja privatnih splavova i restorana koji su smešteni u priobalnom delu - U blizini lokaliteta se nalazi marina, zbog čega u vodenu sredinu može dospeti nafta i motorno ulje iz čamaca i brodova za rekreaciju - Pritisak neprerađenih industrijskih otpadnih voda iz fabrike za proizvodnju i preradu kartonske ambalaže
Dunav	JDS37	<ul style="list-style-type: none"> - Nizvodno od Pančeva (77.000 stanovnika) - Uticaj neprerađenih komunalnih otpadnih voda iz Pančeva; neposredno uzvodno od lokaliteta nalazi se industrijski kompleks (fabrika za proizvodnju veštačkog đubriva, rafinerija nafte, fabrika za proizvodnju hemijskih sredstava za domaćinstvo, fabrika za proizvodnju plastičnih masa) čije se otpadne vode ulivaju u Dunav
	JDS40	<ul style="list-style-type: none"> - Ram (250 stanovnika), 15 km nizvodno od TE „Kostolac“ (zagađivač svih tipova ekosistema uzimajući u obzir štetna jedinjenja koja nastaju sagorevanjem lignita, ali i čestice pepela koje se skladište u nedovoljno obezbeđenim pepelištima) - Uticaj zagađenja poreklom od poljoprivrednih aktivnosti (neorganskih i organskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi)
	JDS41	<ul style="list-style-type: none"> - Radujevac (1.500 stanovnika) - Intenzivna poljoprivredna aktivnost u ovoj oblasti (povrtarstvo, vinogradarstvo, voćarstvo) - uticaj organskih i neorganskih jedinjenja koje se koriste u poljoprivredi - Otpadne vode poreklom iz hemijske industrije (proizvodnja mineralnih đubriva i fosforne kiseline) u naselju Prahovo (10 km uzvodno) takođe predstavljaju jedan od izvora zagađenja

REZULTATI I DISKUSIJA

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Istraživanje sliva Velike Morave

Uzorkovanje rečne vode i jedinki uklija vršeno je tokom avgusta i septembra 2016. godine na lokalitetima na Velikoj, Zapadnoj i Južnoj Moravi. Na Velikoj Moravi su odabrana dva lokaliteta (nizvodno od Svilajнца - VM1 i nizvodno od Požarevca - VM2), na Zapadnoj Moravi tri (lokalitet u ataru sela Obrve - ZM1, zatim nizvodno od Kraljeva - ZM2 i u ataru sela Ugljarevo - ZM3) i na toku Južne Morave takođe je odabrano tri lokaliteta (nizvodno od Leskovca - JM1, u ataru sela Batušinci - JM2 i kod Stalaća - JM3). S obzirom da su prema podacima monitoringa (SEPA) ispitivani lokaliteti bili pod većim ili manjim pritiskom zagađenja, uvedeni su kontrolni, odnosno „referentni“ lokaliteti. Lokalitet Batrage na Ibru (RI), koji pripada slivu Velike Morave, je korišćen kao kontrolni lokalitet za procenu stepena zagađenja. Kao bazalne („referentne“) vrednosti genotoksičnog odgovora kod uklija korišćeni su podaci iz studije Kolarević i sar. (2016a) koji su dobijeni za lokalitet uzvodno od Šapca na Savi (RS), obzirom da je u datom slučaju utvrđen najniži nivo genotoksičnog odgovora kod ove vrste.

4.1.1 Analiza fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode na lokalitetima u slivu Velike Morave

4.1.1.1 Fizičko-hemijski parametri

Na ispitivanim lokalitetima osnovni fizičko-hemijski parametri mereni su u isto vreme kada su uzeti uzorci vode i uzorkovane jedinice uklija (Tabela 4.1). Izmerene vrednosti temperature vode su bile očekivane za doba godine i varirale su od 20,7 °C, koliko je zabeleženo na lokalitetu VM1, do 24,2 °C, koliko je izmereno na lokalitetu ZM3. Najviša vrednost elektroprovodljivosti zabeležena je na lokalitetu JM3 (520 µS/cm), a najniža na lokalitetu ZM2 (403 µS/cm). Najviša vrednost tvrdoće vode je zabeležena na lokalitetu JM3 (260 mg/l), a najniža je detektovana na lokalitetu ZM2 (203 mg/l). Na svim lokalitetima pH vrednosti su bile blago alkalne do alkalne (7,51-8,41). Takođe, zabeležene su visoke koncentracije rastvorenog kiseonika, izuzev na VM2 (6,78 mg/l) i ZM1 (7,19 mg/l).

Tabela 4.1. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara i prosečni vodostaji u avgustu/septembru 2016. godine (podaci preuzeti od RHMZ-a).

Lokaliteti	T (°C)	Elektroprovodljivost (µS/cm)	Tvrdoća (mg/l)	pH	O ₂ (mg/l)	O ₂ (%)	Vodostaj (RHMZ) Avgust/Septembar (cm)
VM1	20,7	460	230	8,16	9,41	106,5	21/6
VM2	21,4	470	213	7,51	6,78	76,7	-312/-341
ZM1	22,6	407	204	7,90	7,19	84,5	240/212
ZM2	23,9	403	203	8,28	9,64	116,9	93/66
ZM3	24,2	407	204	8,41	10,64	130,4	-7/-17
JM1	20,9	413	240	7,56	10,10	121,1	-169/-170
JM2	21,3	456	251	7,80	9,90	114,8	-198/-204
JM3	21,3	520	260	7,90	9,70	110,5	32/24

S obzirom da se lokalitet VM2 nalazi nizvodno od Požarevca (50.000 stanovnika) oksidacija jedinjenja prisutnih u komunalnim i industrijskim otpadnim vodama mogla bi da bude razlog

sniženja koncentracije kiseonika u vodi (Sánchez i sar., 2007). Sa druge strane, na lokalitetu ZM1 moguć je upliv organskih i neorganskih đubriva koje se koriste u poljoprivredi, pa njihova oksidacija može da bude razlog snižene koncentracije kiseonika (Capblancq, 1989).

Ukoliko bi se izvršila indikacija ekološkog statusa površinskih voda na osnovu pH vrednosti i koncentracije rastvorenog kiseonika u trenutku uzorkovanja lokaliteti VM1, ZM2, ZM3, JM1, JM2, JM3 svrstali bi se u klasu I (ocena ekološkog statusa – odličan), lokalitet ZM1 u klasu II (ocena ekološkog statusa – dobar) i lokalitet VM2 u klasu III kvaliteta (ocena ekološkog statusa – umeren) („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Prema podacima Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ) za 2016. godinu (RHMZ, 2016), na svim lokalitetima, izuzev ZM1 i ZM2, zabeležen je izuzetno nizak prosečan vodostaj tokom avgusta i septembra (Tabela 4.1). Vodostaj u značajnoj meri može uticati na koncentraciju hemijskih agenasa u akvatičnoj sredini. Zbog smanjenog dilucionog kapaciteta, u periodu niskog vodostaja očekivano je narušavanje kvaliteta vode koje je posledica značajnog uticaja otpadnih voda i agenasa poreklom od poljoprivredne aktivnosti (Chen i sar., 2010; Huang i sar., 2014).

4.1.1.2 *In silico* analiza

4.1.1.2.1 Analiza podataka nadzornog monitoringa

In silico pristup obuhvatio je analizu 68 fizičko-hemijskih i hemijskih parametara koji su preuzeti iz baze SEPA za 2015. godinu. Prema podacima prosečnih koncentracija amonijum jona, svi lokaliteti pripadali su klasi III kvaliteta površinskih voda (ocena ekološkog statusa – umeren). Takođe, prema koncentraciji ukupnog organskog ugljenika (eng. *total organic carbon*, TOC) svi lokaliteti pripadali su klasi III kvaliteta površinskih voda, izuzev ZM1 i JM2 koji su pripadali klasi II kvaliteta (ocena ekološkog statusa – dobar). Prema svim ostalim hemijskim parametrima (pH vrednost, koncentracija rastvorenog kiseonika, BPK, nitrati, ortofosfati i ukupni fosfor), kvalitet vode je varirao između klase I i II (ocena ekološkog statusa – odličan/dobar), osim u slučaju koncentracije rastvorenog kiseonika na osnovu koje je lokalitet JM1 pripadao klasi III kvaliteta površinskih voda. Uzimajući u obzir koncentracije svih navedenih parametara na osnovu kojih je vršena ocena ekološkog statusa, svi lokaliteti su pripadali klasi III kvaliteta površinskih voda („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Na osnovu podataka hemijskih parametara uočeno je da su metali, metaloidi, pesticidi i organska jedinjenja imala najveći uticaj na narušavanje kvaliteta vode na ispitivanim lokalitetima (Prilog 1, tabela 1). Prema studiji Tuna i sar. (2007) prisustvo metala i metaloida u vodi može biti posledica upliva industrijskih otpadnih voda. Iako su sve koncentracije bile ispod graničnih vrednosti („Službeni glasnik RS“, broj 67/20011, 48/2012, 1/2016), na lokalitetima VM1, VM2, ZM2 i JM1, koji se nalaze neposredno nizvodno od industrijskog postrojenja, detektovane su povišene koncentracije različitih metala i metaloida u odnosu na ostale lokalitete (na lokalitetu VM1 detektovane su povišene koncentracije Cd, Cr i Cu, na VM2 Cd, Cu, Ni, As, Al, na ZM2 Hg, Ni i na JM1 Pb, As, Co, Mn). Prisustvo metala i metaloida na lokalitetima VM1 (nizvodno od Svilajнца, 10.000 stanovnika), VM2 (nizvodno od Požarevca, 50.000 stanovnika), ZM2 (nizvodno od Kraljeva, 60.000 stanovnika), JM1 (nizvodno od Leskovca, 80.000 stanovnika) i JM3 (nizvodno od Stalaća, 1.500 stanovnika) ukazuju na pritiske zagađenja kao što su fabrika metaloindustrije i fabrika za proizvodnju električnih kablova u Svilajncu, „Termoelektrane i kopovi“ Kostolac koja se nalazi u blizini Požarevca, zatim metarluška, mašinska i industrija za proizvodnju vagona koja se nalazi u Kraljevu, automobilska, elektroindustrija i tekstilna industrija čija se postrojenja nalaze u Leskovcu. Sa druge strane, lokaliteti ZM1, ZM3 i JM3 se nalaze nekoliko desetina kilometara nizvodno od industrijskih postrojenja. Iako su na ovim lokalitetima koncentracije metala i metaloida

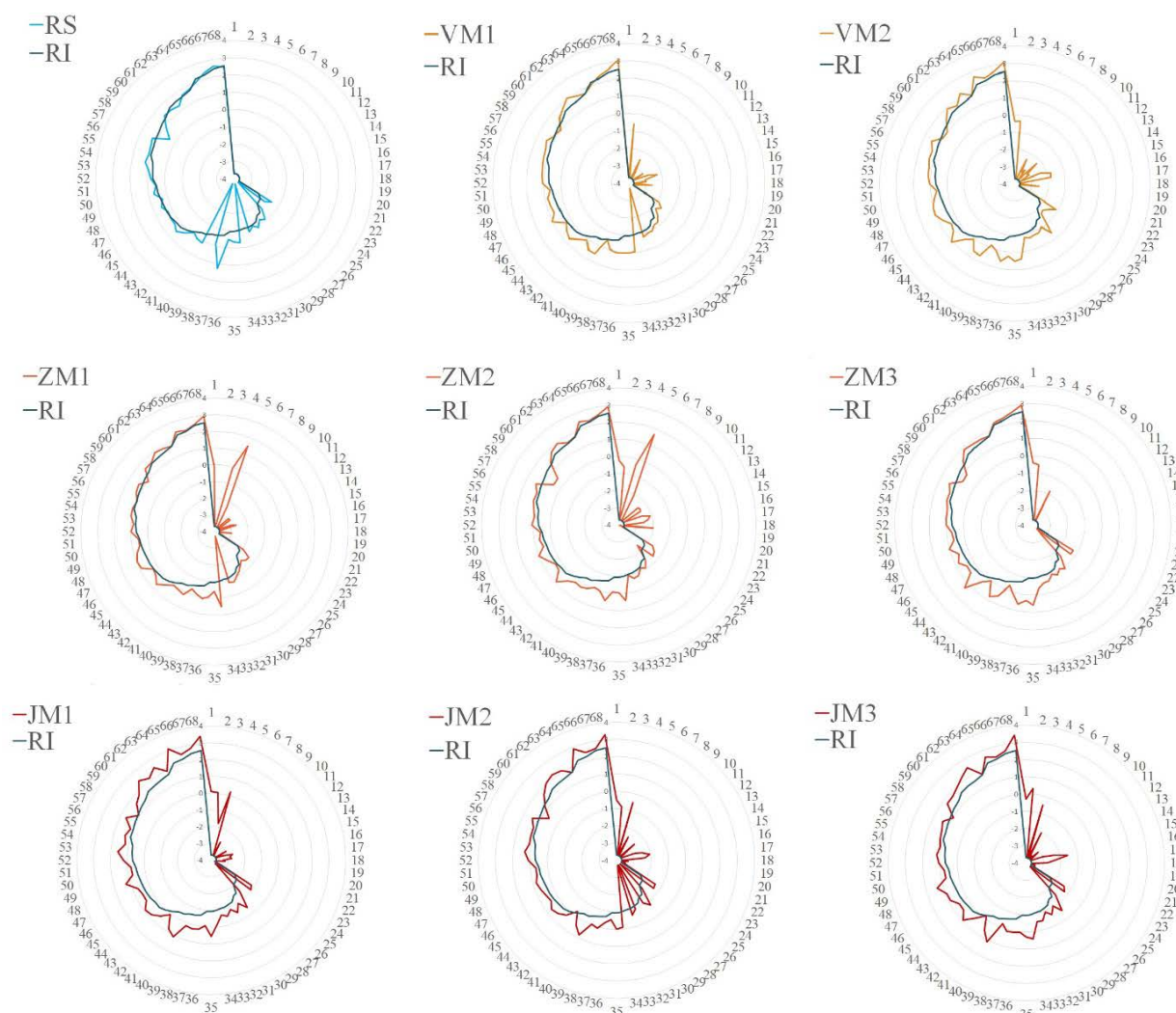
uglavom bile niže u odnosu na one koje su detektovane na lokalitetima VM2, ZM2 i JM1, njihovo prisustvo u vodi može biti posledica uticaja industrijskih otpadnih voda tekstilne, hemijske industrije i fabrike za proizvodnju vojnih prizvoda u Čačku, 25 km uzvodno od lokaliteta ZM1, industrijskih otpadnih voda iz Kraljeva koje se nalaze 25 km uzvodno od ZM3 i jalovišta rudnika mrkog uglja koji se nalazi kod Aleksinca, uzvodno od lokaliteta JM3. Sa druge strane, lokalitet JM2 se nalazi u ruralnom području, zbog čega su detektovani metali i metaloidi na ovom lokalitetu najverovatnije posledica poljoprivredne aktivnosti (Elrashidi i sar., 2007).

Na svim lokalitetima detektovani su indikatori organskog zagađenja: nitrati, nitriti, ukupni azot, ortofosfati, itd. U vodenu sredinu ova jedinjenja najčešće dospevaju uplivom komunalnih otpadnih voda i spiranjem poljoprivrednog zemljišta (Madhav i sar., 2020). Najviše koncentracije ovih parametara zabeležene su na lokalitetima nizvodno od većih naseljenih mesta (VM2, ZM2, JM1), zbog čega se može pretpostaviti da njihovo prisustvo u vodi ukazuje na uticaj komunalnih otpadnih voda. Međutim, iako su zabeležene koncentracije više u odnosu na ostale lokalitete, važno je napomenuti da su detektovane koncentracije bile ispod graničnih vrednosti (Službeni glasnik RS“ 67/20011, 48/2012, 1/2016). Sa druge strane, na ostalim lokalitetima prisustvo ovih parametara se može povezati sa otpadnim vodama domaćinstava i poljoprivredom.

Iako su detektovani u niskim koncentracijama, prisustvo pesticida (atrazin, simazin, terbutilazin, acetohlor, izproturon) na svim lokalitetima, izuzev ZM3, u vodi može biti indikator poljoprivredne aktivnosti (Leonard, 1990).

Na osnovu podataka godišnjeg monitoringa (SEPA), jasno je da su svi ispitivani lokaliteti pod određenim stepenom zagađenja. Iz tog razloga, analizirani su podaci ostalih mernih stanica u okviru sliva Velike Morave kako bi se pronašao odgovarajući referentni lokalitet. Na osnovu ove pretrage, merna stanica Batrage na Ibru (RI) se izdvojila po najnižim koncentracijama analiziranih parametara iz SEPA baze podataka (Prilog 1, tabela 1), te je ovaj lokalitet dalje korišćen kao kontrolni za komparaciju uticaja hemijskog zagađenja sa ispitivanim lokalitetima. Međutim, na ovom lokalitetu iz tehničkih razloga nije bilo moguće uzorkovanje uklija, zbog čega je bilo neophodno pronaći kontrolnu grupu uklija u kojima je detektovan najniži nivo DNK oštećenja. Analizom ekogenotoksikoloških studija u kojima su uklije korišćene kao bioindikator na velikim ravničarskim rekama istakla se studija Kolarevića i sar. (2016a) u kojoj je na lokalitetu na Savi, uzvodno od Šapca (RS), zabeležen najniži odgovor biomarkera u uklijama. Iz tog razloga, vrednosti dobijene na lokalitetu RS u genotoksikološkom delu istraživanja korišćene su kao bazalne.

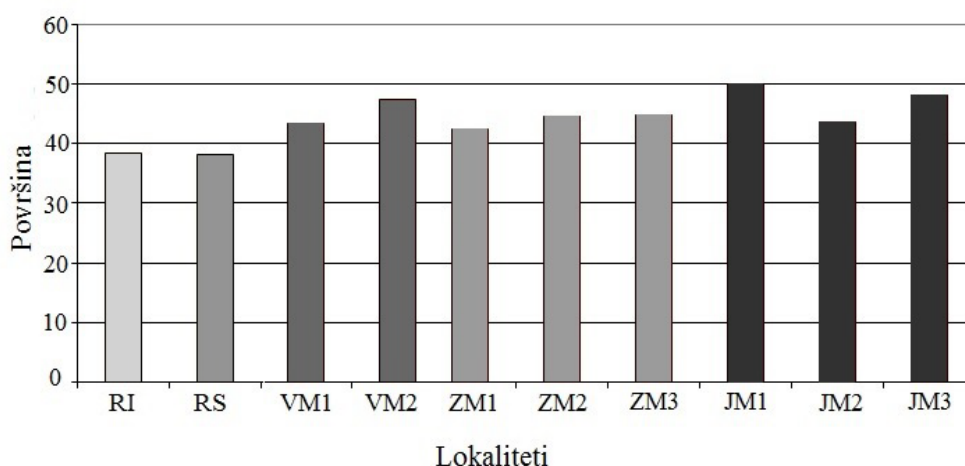
Na slici 4.1 dat je grafički prikaz logaritmovanih vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara praćenih tokom monitoringa 2015. godine na ispitivanim lokalitetima u slivu Velike Morave, kao i na kontrolnim (RI i RS). Podaci za RI na radijalnom dijagramu su organizovani prema rastućem trendu kako bi se jednostavnije uočile razlike u koncentracijama, pre svega onih jedinjenja koja su u vodi prisutna u niskim koncentracijama ($\mu\text{g/l}$). Kao što se sa grafika može uočiti, postoji sličan trend u vrednostima parametara koji su izmereni na lokalitetima RS i RI. Najveće razlike u vrednostima su uočene za koncentracije parametra 25 (ukupna Hg), kao i za 32 i 39 (ukupni i rastvoreni Co) koji nisu detektovani na lokalitetu RS, a detektovane su na RI.



Slika 4.1. Poređenje koncentracija hemijskih parametara referentnog lokaliteta RI na Ibru sa lokalitetom na Savi (RS) i lokalitetima sliva Velike Morave (podaci preuzeti od SEPA).

Na listi analiziranih hemijskih parametara nalaze se supstance koje su definisane kao prioritete (Hg, Cd, Ni, Pb, atrazin, fluoranten, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, diuron, simazin, izoproturon) (European Parliament & Council, 2013; „Službeni glasnik RS“ 24/2014). Većina ovih parametara su detektovana na lokalitetima na Velikoj, Zapadnoj i Južnoj Moravi. Sa druge strane, na lokalitetu RS ovi parametri su bili u koncentracijama ispod limita detekcije čime se, pored toga što su vrednosti genotoksičnog odgovora kod uklija bile niske, takođe opravdava da se ovaj lokalitet koristi kao “referentni”.

Na osnovu površine radijalnih dijagrama (Slika 4.2), utvrđen je najveći stepen zagađenja na lokalitetima VM2, JM1 i JM3, a najmanji na lokalitetima JM2 i ZM1. Analizirajući podatke hemijskih parametara koji su preuzeti iz baze SEPA utvrđeno je da se broj detektovanih parametara nije značajno razlikovao između lokaliteta, i da je broj varirao od 58 za VM1, do 54, za ZM1. Kao što je već opisano, u zavisnosti od lokaliteta zabeležen je različit uticaj izvora zagađenja, zbog čega su se i razlikovale koncentracije parametara, pre svega metala, metaloida i organskih jedinjenja na lokalitetima (Prilog 1, tabela 1).



Slika 4.2. Površina radijalnih dijagrama prikazanih na slici 4.1. Veća površina ukazuje na veći stepen zagađenosti lokaliteta.

Pored toga što podaci o prisustvu određenih hemijskih parametara u vodi imaju važnu ulogu u identifikaciji izvora zagađenja, oni su važni i sa stanovišta eko/genotoksikologije. Bez obzira što su u vodenoj sredini koncentracije metala i metaloida bile niže od MDK vrednosti, hronično izlaganje čak i niskim koncentracijama Cr, As, Al, Zn, Fe, Pb, Cu, Hg, Ni, Mn može narušiti imuni odgovor, indukovati oksidativni stres i dovesti do fizioloških, kao i histopatoloških promena u akvatičnim organizmima (Bly i sar., 1997; Eroglu i sar., 2015; Rajeshkumar i sar., 2017). Takođe, izlaganje akvatičnih organizama smešama agenasa poreklom iz komunalnih otpadnih voda može dovesti do promena u njihovom metabolizmu, hormonskom statusu, kao i indukcije oksidativnog stresa, itd. (Cazenave i sar., 2014; Bahamonde i sar., 2015; Du i sar., 2019). Pored toga, prisustvo pesticida i ostalih agenasa koji se koriste kao agrotehničke mere u poljorivredi u vodi takođe može uzrokovati različite efekte u organizmima: oksidativni stres, aktivaciju imunog odgovora, narušavanje hormonskog balansa u organizmima (Ullah i Zorriehzakra, 2015).

4.1.1.2.2 SumTU analiza

Procena ukupnog uticaja jedinjenja i elemenata koji mogu biti toksični u određenim koncentracijama izvršena je na osnovu SumTU analize. Od 68 hemijskih i fizičko-hemijskih parametara koji su detektovani tokom monitoringa (SEPA) 2015. godine, za 28 hemijskih parametara je utvrđen toksični potencijal (Prilog 1, tabela 2). Među elementima/jedinjenjima koja imaju toksični potencijal spadaju metali, metaloidi, pesticidi i specifične organske zagađujuće supstance (PAH-ovi i 4-nonilfenol). Najniže PNEC vrednosti organskih zagađujućih supstanci preuzete su iz baze NORMAN udruženja, dok su PNEC vrednosti metala i metaloida preuzete iz ECHA baze.

Analizirajući prosečne detektovane koncentracije parametara i odgovarajuće PNEC vrednosti, jedino su koncentracije rastvorenog Zn i Mn na lokalitetima JM1 i JM3 bile iznad PNEC vrednosti. PNEC vrednost za Zn iznosi 17 µg/l, odnosno 34 µg/l za Mn a na lokalitetima JM1 i JM3 su zabeležene nešto više prosečne koncentracije (sr. vrednost ± standardna greška, SE, za Zn iznosile su 18,627 ± 12,388 µg/l, odnosno 23,386 ± 28,053 µg/l, a za Mn 38,242 ± 65,551 µg/l, odnosno 52,40 ± 118,631 µg/l). Kao što se može uočiti na osnovu SE vrednosti, postojalo je variranje u koncentracijama datih elemenata u zavisnosti od perioda uzorkovanja.

Na toksični potencijal, odnosno SumTU vrednosti, uticale su i koncentracije onih parametara koje su bile nešto niže od PNEC vrednosti. Na povećanje SumTU vrednosti za lokalitet VM1 uticale su koncentracije terbutilazina i metali i metaloidi: Fe, Mn, Cr, Ni, Co, As, na povećanje vrednosti ovog indeksa za lokalitet VM2 uticali su terbutilazin, fluoranten, i veći broj rastvorenih

metala i metaloida: Mn, Zn, Cu, Cr, Pb, Cd, Co, As. U slučaju lokaliteta ZM1, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni i Co uticali su na povećanje SumTU vrednosti, zatim Zn, Cu, Cr, Pb, Cd, Ni, Co i As za lokalitet ZM2 i za ZM3 Mn, Zn, Cr, Pb, Cd, Ni, Co i As. Detektovane koncentracije Cr, Hg, Fe, Pb, Cd, Ni, Co, As uticale su na povećanje SumTU vrednosti za lokalitet JM1, zatim Fe, Mn, Zn, Cd, Co i As uzrokovali su povećanje vrednosti ovog indeksa za lokalitet JM2 i za JM3 koncentracije Fe, Cu, Cr, Pb, Ni, Co, As imali su značajan doprinos u povećanju SumTU vrednosti.

Najviša vrednost SumTU je dobijena za lokalitete JM3 (6,91), VM2 (5,16) i JM1 (5,18), dok je najniža zabeležena na lokalitetu ZM1 (3,10) (Tabela 4.2). Broj detektovanih toksičnih parametara varirao je od 21, koliko je zabeleženo na JM2, do 13, koliko je zabeleženo na ZM3, što ukazuje da su na povećanje vrednosti SumTU imale uticaj koncentracije, pre svega one koje su prevazilazile ili bile blizu PNEC vrednosti (Prilog 1, tabela 2).

Tabela 4.2. Prikaz SumTU vrednosti dobijenih na osnovu podataka nadzornog monitoringa za 2015. godinu (podaci preuzeti od SEPA).

	VM1	VM2	ZM1	ZM2	ZM3	JM1	JM2	JM3
SumTU	3,25	5,16	3,10	3,20	4,72	5,18	3,17	6,91

Važno je naglasiti da je uočen sličan trend u vrednostima površina radijalnog dijagrama, koje ukazuju na ukupan uticaj zagađenja na lokalitetima, i SumTU vrednostima, koje ukazuju na toksični potencijal na lokalitetima. Takođe, za sve hemijske parametre za koje je utvrđen toksični potencijal, utvrđen je i genotoksični, a indukcija oksidativnog stresa predstavlja najčešći mehanizam nastanka promena na genetičkom materijalu.

4.1.2 *Ex situ/in vitro* pristup

4.1.2.1 Citotoksični i genotoksični efekat u SOS/*umuC* testu

Rezultati SOS/*umuC* testa sa (S9+) i bez metaboličke aktivacije (S9-) prikazani su u tabeli 4.3. Prema vrednostima stope rasta i indukcije, citotoksični i genotoksični efekat nije detektovan ni za uzorke sa lokaliteta VM2, JM1 i JM3 za koje su dobijene visoke SumTU vrednosti. Navedeni efekti nisu detektovani ni u studiji Kolarević i sar. (2016a) na referentnom lokalitetu RS. Za sve tretmane stopa rasta je iznosila preko 0,75, osim u slučaju pozitivne kontrole (4-NQO) u eksperimentu bez metaboličke aktivacije. Vrednosti stope indukcije nisu prelazile graničnu vrednost (1,5), sa izuzetkom pozitivnih kontrola, BaP i 4-NQO.

Tabela 4.3. Stopa rasta i indukcije nakon tretmana *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 nativnim uzorcima vode i pozitivnim kontrolama (BaP i 4-NQO) (sr. vrednost \pm SE); crvenom bojom su označeni uzorci koji su pokazali citotoksični/genotoksični efekat.

	S9-		S9+	
	Stopa rasta	Stopa indukcije	Stopa rasta	Stopa indukcije
RS	1,26 \pm 0,16	1,0 \pm 0,1	1,48 \pm 0,05	1,2 \pm 0,2
VM1	1,13 \pm 0,06	1,05 \pm 0,07	0,81 \pm 0,05	0,83 \pm 0,14
VM2	1,25 \pm 0,24	1,02 \pm 0,15	0,90 \pm 0,07	0,92 \pm 0,37
ZM1	0,98 \pm 0,16	1,10 \pm 0,16	0,89 \pm 0,07	0,71 \pm 0,19
ZM2	0,88 \pm 0,09	1,28 \pm 0,09	0,86 \pm 0,05	1,01 \pm 0,65
ZM3	0,77 \pm 0,29	1,45 \pm 0,28	0,88 \pm 0,11	0,68 \pm 0,15
JM1	0,96 \pm 0,14	1,26 \pm 0,09	1,08 \pm 0,02	0,67 \pm 0,18
JM2	1,37 \pm 0,21	0,84 \pm 0,40	1,24 \pm 0,05	0,91 \pm 0,08
JM3	1,43 \pm 0,09	0,64 \pm 0,09	1,26 \pm 0,12	0,96 \pm 0,05
Neg. kontrola	1,00 \pm 0,15	1,02 \pm 0,25	1,00 \pm 0,09	0,99 \pm 0,21
4-NQO (0,5 μ g/ml)	0,66 \pm 0,06	12,13 \pm 4,12	/	/
BaP (10 μ g/ml)	/	/	0,99 \pm 0,05	1,82 \pm 0,34

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da u SOS/*umuC* testu nije detektovan citotoksični i genotoksični efekat ispitivanih nativnih uzoraka. Slični rezultati dobijeni su i u studiji Kolarević i sar. (2016a) u kojoj takođe nije detektovan citotoksični i genotoksični efekat ispitivanih nativnih uzoraka sa lokaliteta u slivu Save, dok je u ostalim biotestovima zabeležen genotoksični efekat. Takođe, u studiji Kittinger i sar. (2015) testirano je 68 nativnih uzoraka sa Dunava, a za samo četiri uzorka je detektovan genotoksični efekat u ovom testu.

Osetljivost SOS/*umuC* testa korišćenog za detekciju citotoksičnog i genotoksičnog efekta nativnih uzorka vode se može dovesti u pitanje i kada se uporede koncentracija BaP koja je korišćena kao pozitivna kontrola testa i MDK vrednosti ovog jedinjenja. Naime, BaP se nalazi na listi prioriternih supstanci i za ovo jedinjenje propisana MDK vrednost u površinskim vodama iznosi 0,027 μ g/ml (European Parliament & Council, 2013), dok je preporučena koncentracija u SOS/*umuC* testu 10 μ g/ml. Iz datog se vidi da je preporučena koncentracija date pozitivne kontrole više od 300 puta veća od relevantne MDK vrednosti, odnosno koncentracije koja se može očekivati u životnoj sredini.

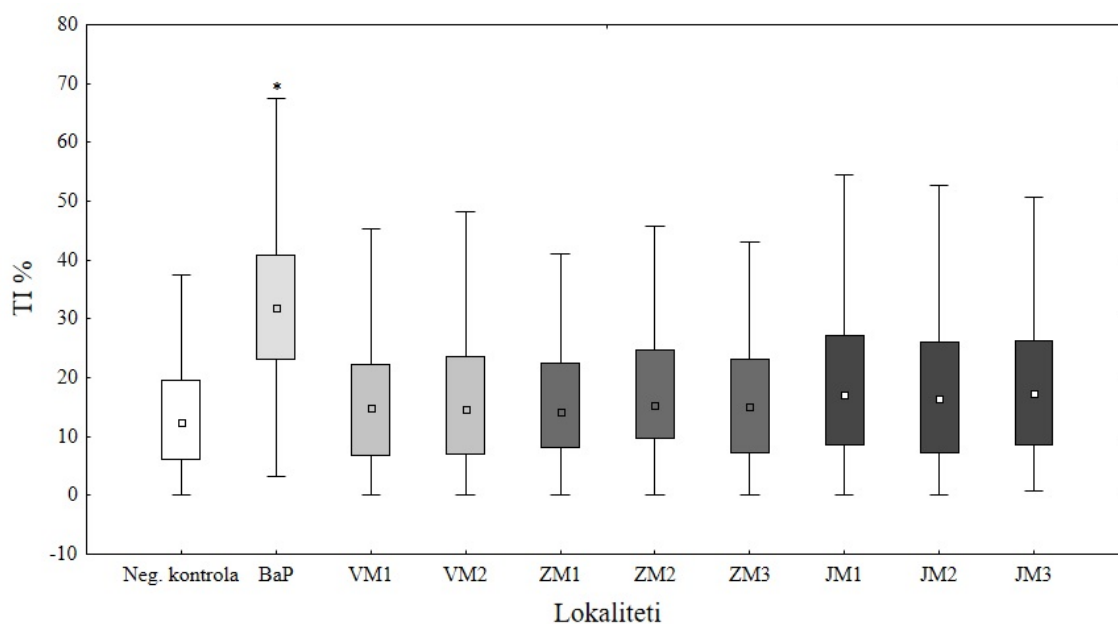
4.1.2.2 Citotoksični i genotoksični efekat kod HepG2 ćelijske linije

Pre izvođenja alkalnog komet testa na HepG2 ćelijskoj liniji utvrđena je vijabilnost ovih ćelija nakon tretmana nativnim uzorcima vode diferencijalnim bojenjem AO/EtBr. Kao što je prikazano u tabeli 4.4, vijabilnost je u svim uzorcima iznosila preko 95 %.

Tabela 4.4. Vijabilnost HepG2 ćelija nakon 24 h tretmana nativnim uzorcima vode (sr. vrednost \pm SE).

	Vijabilnost (%)
VM1	99,0 \pm 1,4
VM2	96,0 \pm 1,7
ZM1	97,5 \pm 0,7
ZM2	94,5 \pm 2,1
ZM3	96,5 \pm 2,1
JM1	97,0 \pm 1,4
JM2	95,5 \pm 2,1
JM3	94,5 \pm 0,7
Neg. kontrola	95,5 \pm 2,1
BaP	95,5 \pm 2,1

Grafički prikaz stepena DNK oštećenja HepG2 ćelija nakon 24 h tretmana nativnim uzorcima vode dat je na slici 4.3. Najviši nivo DNK oštećenja je zabeležen u tretmanu ćelija sa pozitivnom kontrolom, BaP (35,33 \pm 0,82; sr. vrednost \pm SE). Statistički značajna razlika u nivou DNK oštećenja HepG2 ćelija i utvrđena je samo između pozitivne i negativne kontrole.



Slika 4.3. Nivo DNK oštećenja HepG2 ćelija nakon 24 h tretmana nativnim uzorcima vode sa ispitivanih lokaliteta; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na negativnu kontrolu (korišćeni test: Mann-Whitney *U* test sa Dunn-Boniferonni korekcijom; $p < 0,006$); istom bojom su označeni lokaliteta sa iste reke.

Kao i u slučaju SOS/*umuC* testa, u alkalnom komet testu na HepG2 ćelijama nije detektovan genotoksični efekat ispitivanih nativnih uzoraka. Razlog za to može biti sama metodologija prema kojoj uzorci vode moraju biti razblaženi u medijumu za gajenje ćelija čime se, na samom početku tretmana, dobija REF 0,3. Pregledom literature utvrđeno je da je ova ćelijska linija može detektovati genotoksični efekat koncentrovanih uzoraka površinskih voda (REF 200, REF 400, REF 600) (Feretti i sar., 2020), ili nativnih uzoraka sa lokaliteta koji su pod visokim pritiskom zagađenja

(Žegura i sar., 2009). U skladu sa tim, može se pretpostaviti da bi testiranje koncentrisanih uzoraka vode uticalo na povećanje nivoa osetljivosti HepG2 ćelijske linije u detekciji genotoksičnog efekta.

4.1.3 *In situ* pristup

4.1.3.1 Opšte fiziološko stanje uzorkovanih jedinki uklija

Podaci o broju uzorkovanih jedinki, prosečnoj dužini, masi i kondicionom indeksu uklija (sr. vrednost \pm SE) prikazane su u Prilogu 1, u tabeli 3. Najmanja prosečna dužina jedinki zabeležena je na lokalitetu JM2 ($9,5 \pm 2,3$ cm), dok je najveća zabeležena na VM1 ($13,7 \pm 2,4$ cm). Najniža vrednost prosečne mase jedinki je zabeležena na lokalitetu ZM2 ($10,7 \pm 0,8$ g), a najviša na lokalitetu VM2 ($12,9 \pm 0,5$ g). Kada se analiziraju srednje vrednosti kondicionog indeksa, može se uočiti da su najniže vrednosti zabeležene za lokalitete na Velikoj Moravi (VM1: $0,56 \pm 0,05$; VM2: $0,55 \pm 0,07$), a najviša vrednost je dobijena za jedinke uzorkovane sa lokaliteta JM2 ($0,75 \pm 0,1$), ukoliko se izuzme referentni RS lokalitet ($0,89 \pm 0,09$). Statistički značajna razlika u vrednostima kondicionog indeksa utvrđena je poređenjem lokaliteta VM1 sa ZM1 i JM2, zatim poređenjem VM2 sa ZM1, ZM3 i JM3 i poređenjem JM3 sa ZM1 i JM2.

Kondicioni indeks odražava opšte stanje riba i njegove vrednosti mogu ukazati na stepen uhranjenosti jedinki. Na lokalitetima za koje su dobijene najniže vrednosti ovog indeksa prosečna dužina jedinki nije značajno odstupala od prosečne dužine na ostalim lokalitetima. Međutim, razlika je uočena u masi jedinki, što može biti pokazatelj nedostatka izvora hrane. Pored toga, niske vrednosti kondicionog indeksa kod riba mogu biti pokazatelji uticaja zagađenja (Bervoets i Blust, 2003; Linde-Arias i sar., 2008). Na osnovu vrednosti SumTU zabeležen je visok pritisak zagađenja toksičnim agensima na lokalitetima VM2 i JM3, pa je uticaj zagađenja mogao da se odrazi na fiziološki status jedinki, na šta ukazuju i niže vrednosti kondicionog indeksa na datim lokalitetima.

4.1.3.2 Citotoksični efekat na ćelijma krvi uklija

Kako uzorci krvi za genotoksikološke analize nisu mogli biti dopremljeni u laboratoriju i procesuirani istog dana, rađena je njihova krioprezervacija u tečnom azotu na terenu. Nakon diferencijalnog bojenja AO/EtBr ćelija krvi uklija utvrđeno je da je prosečna vijabilnost svih uzoraka bila iznad 75 % (Tabela 4.5), što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Kolarević i sar., 2016a; Kračun-Kolarević i sar., 2016) u kojima je utvrđeno da krioprezervacija ne utiče na vijabilnost ćelija i indukciju DNK oštećenja.

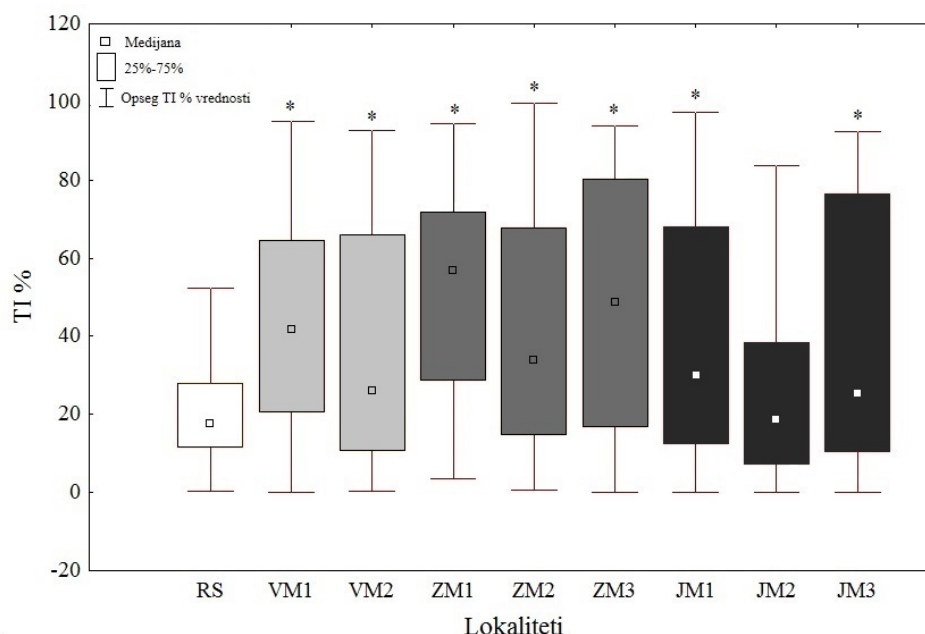
Tabela 4.5. Vijabilnost ćelija krvi uklija (sr. vrednost \pm SE).

Lokaliteti	Vijabilnost (%)
RS	78,00 \pm 4,00
VM1	91,50 \pm 2,64
VM2	85,17 \pm 7,52
ZM1	92,60 \pm 7,60
ZM2	91,50 \pm 8,89
ZM3	84,83 \pm 16,39
JM1	86,50 \pm 11,26
JM2	91,33 \pm 9,07
JM3	95,17 \pm 7,36

4.1.3.3 Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija

4.1.3.3.1 Alkalni i Fpg-modifikovani komet test

Na slici 4.4 prikazan je nivo DNK oštećenja detektovan u ćelijama krvi uklija. Najviši nivo DNK oštećenja (sr. vrednost \pm SE) zabeležen je na lokalitetima ZM1 (52,07 \pm 3,65) i ZM3 (48,38 \pm 0,14), dok je najniži stepen oštećenja DNK zabeležen na lokalitetu JM2 (24,85 \pm 0,02). Statistički značajno povećanje nivoa DNK oštećenja uočeno je na lokalitetima sliva Velike Morave u odnosu na referentni lokalitet RS, izuzetak je bio lokalitet JM2 (Slika 4.4).



Slika 4.4. Nivo DNK oštećenja ćelija krvi uklija na osnovu parametra TI %; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na lokalitet RS; (korišćeni testovi: Kruskal Wallis i Mann Whitney *U* test sa Dunn-Boniferroni korekcijom; $p < 0,006$); istom bojom su označeni lokaliteti sa iste reke.

Najviše TI % vrednosti zabeležene su u ćelijama krvi uklija sa lokaliteta za koje je utvrđeno da nisu pod uticajem visokog stepena zagađenja prema vrednostima površina radijalnih dijagrama hemijskih parametara (Slika 4.2) i SumTU vrednosti (Tabela 4.2). To se, pre svega, odnosi na lokalitete ZM1 i ZM3 koji se ne nalaze neposredno nizvodno od gradskih naselja. Iz tog razloga

može se pretpostaviti da su na indukciju detektovanog DNK oštećenja učestvovali i agensi koji nisu praćeni u okviru monitoringa. Slični rezultati su dobijeni i u studiji Jovanović Marić i sar. (2020) u kojoj je, u odnosu na kontrolnu grupu, detektovan statistički značajno viši nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi šarana (*Cyprinus carpio*) i hemocitama *Sinanodonta woodiana* na lokalitetu koji se nalazi uzvodno od ispusta otpadnih voda Novog Sada, što je ukazalo na to da su i na lokalitetu uzvodno prisutni genotoksični agensi koji su najverovatnije poreklom od drugog izvora zagađenja, a ne iz otpadnih voda.

U tabeli 4.6 prikazan je broj detektovanih HH. Rezultati neparametrijskog Kruskal-Wallis testa pokazali su da se učestalost HH (%) nije značajno razlikovala između lokaliteta u slivu Velike Morave. Međutim, poređenjem učestalosti HH i vijabilnosti ćelija krvi primenom Pearson testa nije utvrđena značajna korelacija ($r = -0,13$, $p = 0,39$).

Tabela 4.6. Učestalost HH (%) u ćelijama krvi uklija (srednja vrednost \pm SE).

Lokaliteti	HH %
VM1	1,00 \pm 0,37
VM2	0,5 \pm 0,5
ZM1	1,40 \pm 1,17
ZM2	1,67 \pm 1,28
ZM3	2,83 \pm 0,98
JM1	0,50 \pm 0,34
JM2	0
JM3	1,17 \pm 1,17

Parametar HH predstavlja izuzetno oštećene DNK molekule i mogu se smatrati indikatorom apoptoze (Olive i Banáth, 1995; Kumaravel i sar., 2009) s obzirom da veličina oštećenja najverovatnije premašuje reparacione mogućnosti ćelije. U skladu sa tim, ispitivana je korelacija između učestalosti HH i vijabilnosti ćelija krvi uklija. Odsustvo statistički značajne korelacije između učestalosti HH i vijabilnosti u skladu je sa studijama Collins (2004) i Lorenzo i sar. (2013). U navedenim studijama je pokazano da HH predstavljaju jedra sa velikim brojem DNK oštećenja, ali da se ta oštećenja mogu ispraviti, za razliku od trajnih oštećenja koja su uzrokovana apoptozom. Lorenzo i sar. (2013) pokazali su da nakon izlaganja ćelija vodonik peroksidom nastaju HH. Međutim, nakon kraće inkubacije tretiranih ćelija, HH se više na gelu ne uočavaju, što nije posledica potpune degradacije DNK i apoptoze, već je utvrđeno da su indukovana DNK oštećenja ispravljena reparacionim mehanizmima.

Uticaj oksidativnog stresa na indukciju DNK oštećenja praćen je pomoću Fpg-modifikovanog komet testa. Statistički značajna razlika u nivou DNK oštećenja utvrđena je između uzoraka krvi tretiranih Fpg enzimom i puferom za lokalitete RS, VM1, VM2, ZM2, JM1 (Tabela 4.7). Iako su zabeležene relativno niske prosečne TI % vrednosti, najveći udeo 8-oxoG DNK oštećenja zabeležen je u ćelijama krvi jedinki uzorkovanih na lokalitetima RS i JM1, dok je najmanji udeo zabeležen na lokalitetu JM2.

Tabela 4.7. Vrednosti TI % parametra dobijene nakon tretmana ćelija krvi puferom i Fpg enzimom (srednja vrednost \pm SE) i neto 8-oxoG; * - označava statistički značajnu razliku između vrednosti dobijenih nakon tretmana Fpg enzimom i puferom (korišćeni testovi: Kruskal Wallis i Mann-Whitney *U* test sa Dunn-Boniferroni korekcijom; $p < 0,002$).

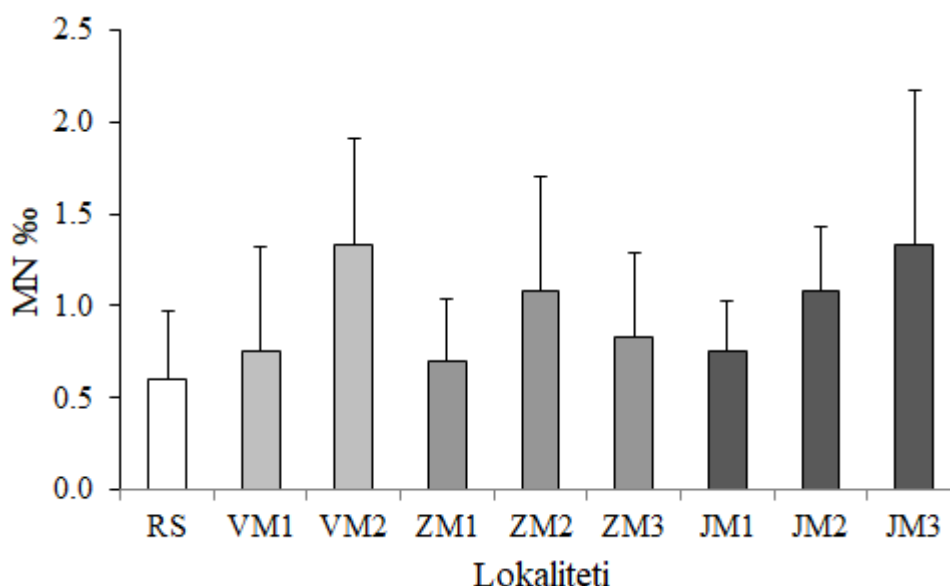
Lokaliteti	Fpg enzim	Pufer	Neto 8-oxoG
RS	31,50 \pm 1,00*	20,00 \pm 1,00	11,50
VM1	44,33 \pm 1,54*	38,54 \pm 1,44	5,79
VM2	33,00 \pm 1,24*	33,65 \pm 1,60	0
ZM1	57,78 \pm 1,85	56,13 \pm 1,42	1,65
ZM2	51,39 \pm 1,34*	46,06 \pm 1,43	5,33
ZM3	37,26 \pm 1,42	38,44 \pm 1,52	0
JM1	33,96 \pm 1,41*	23,48 \pm 1,32	10,48
JM2	28,57 \pm 1,43	28,43 \pm 1,49	0,14
JM3	38,26 \pm 1,62	35,56 \pm 1,21	2,71

U studiji Collins i Dušinská (2002) utvrđeno je da se u zavisnosti od vrednosti neto 8-oxoG u Fpg modifikovanom komet testu može detektovati uticaj oksidativnog stresa na narušavanje integriteta DNK molekula. U skladu sa tim, na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je oksidativni stres imao značajnu ulogu u indukciji DNK oštećenja u ćelijama krvi ukljija sa lokaliteta JM1.

Poređenjem TI % vrednosti dobijenih u alkalnom i Fpg-modifikovanom komet testu nije utvrđena statistički značajna korelacija primenom Spearman testa ($r = -0,08$, $p = 0,84$). Iako je na lokalitetima detektovan veliki broj agenasa koji mogu indukovati oksidativni stres (pesticidi, metali, metaloidi, PCB, itd.), odsustvo korelacije između ova dva parametara ukazuje da je oksidativni stres samo jedan od mehanizama koji uzorkuju DNK oštećenja što je u skladu sa studijama Kolarević i sar. (2016a, 2018).

4.1.3.3.2 Mikronukleus test

Oštećenja na nivou hromozoma ćelija krvi riba praćena su mikronukleus testom. Učestalost MN (‰) prikazana je na slici 4.5. Najveća učestalost MN (sr. vrednost \pm SE) je zabeležena na lokalitetima VM2 (1,33 \pm 0,57) i JM3 (1,33 \pm 0,84). Sa druge strane, na lokalitetu ZM1 zabeležene su najniže vrednosti (0,70 \pm 0,34). Poređenjem dobijenih vrednosti učestalosti MN u jedinkama istraživanih lokaliteta u odnosu na referentne vrednosti MN na lokalitetu RS nije utvrđena statistički značajna razlika.



Slika 4.5. Nivo DNK oštećenja ćelija krvi uklija na osnovu učestalosti mikronukleusa (MN %) (sr. vrednost ± SE); korišćen test: one-way ANOVA; $p < 0,05$; istom bojom označeni su lokaliteti sa iste reke.

Slični rezultati dobijeni su u studiji Deutschmann i sar. (2016) u kojoj je određivan broj MN u ćelijama krvi uklija uzorkovanih sa 18 lokaliteta na Dunavu, gde je statistički značajna razlika u učestalosti MN u odnosu na referentne vrednosti dobijena u samo jednom slučaju.

Pikaz učestalosti IRR (%) u ćelijama krvi uklija dat je u tabeli 4.8. Najviša vrednost učestalosti (sr. vrednost ± SE) dobijena je na lokalitetu ZM1 ($28,80 \pm 33,38$), a najniža na lokalitetu ZM3 ($7,83 \pm 7,29$). Jedino u slučaju ova dva lokaliteta je utvrđena statistički značajna razlika.

Prema studiji Fenech i sar. (2003), IRR mogu biti indikatori apoptoze, zbog čega je u ovoj studiji urađena korelacija između vijabilnosti ćelija krvi i učestalosti IRR. Međutim, Person-ov test korelacije nije pokazao statistički značajnu korelaciju između učestalosti između ova dva parametra ($r = 0,27$, $p = 0,07$).

Tabela 4.8. Učestalost IRR u ćelijama krvi uklija (srednja vrednost ± SE); različita slova označavaju statistički značajnu razliku (korišćen testovi: one-way ANOVA i Tukey's post-hoc; $p < 0,05$).

Lokaliteti	IRR %
VM1	$21,33 \pm 20,69^{ab}$
VM2	$40,67 \pm 27,21^a$
ZM1	$28,80 \pm 33,38^{ab}$
ZM2	$14,50 \pm 13,85^{ab}$
ZM3	$7,83 \pm 7,29^b$
JM1	$22,00 \pm 28,15^{ab}$
JM2	$15,41 \pm 12,59^{ab}$
JM3	$28,00 \pm 32,97^{ab}$

Odsustvo korelacije između vijabilnosti ćelija krvi i učestalosti IRR na lokalitetima u slivu Velike Morave u skladu je sa studijom Baršienė i sar. (2006) u kojoj je pokazano da je apoptoza

zrelih ćelija krvi relativno redak proces i da su ćelije krvi sa visoko oštećenom DNK signal za aktivaciju imunog odgovora, odnosno makrofaga koji vrše fagocitozu ovih ćelija. Samim tim, ćelije u apoptozi su dezintegrisane, pa se ne mogu uočiti na mikroskopskim preparatima.

Primenom Pearson testa nije utvrđena statistički značajna korelacija između TI % vrednosti dobijenih u alkalnom komet testu i učestalosti MN ($r = -0,58$, $p = 0,13$). Iako su dobijeni rezultati u skladu sa studijom Kračun-Kolarević i sar. (2016) u kojoj takođe nije dobijena korelacija između ova dva parametra, u više studija (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Rodriguez-Cea et al., 2003; Deutschmann i sar., 2016) se može videti da ova dva parametra pokazuju pozitivne statistički značajne korelacije. Jedan od razloga zbog koga, u ovoj studiji, nije utvrđena statistički značajna korelacija između TI % i MN može biti tip oštećenja koje se detektuje mikronukleus testom, odnosno trajnim oštećenjima (klastogene i/ili aneugene promene). U skladu sa tim, može se pretpostaviti da je nastanak MN u ćelijama krvi uklija sa ispitivanih lokaliteta redak događaj jer su, u većini slučajeva, oštećena nastala na genetičkom materijalu bila uspešno ispravljena. Najveći broj hemijskih parametara koja su detektovana u okviru nadzornog monitorniga mogu izazvati oksidativni stres, zbog čega relativno retko dovode do oštećenja na nivou hromozoma, te ne mogu biti detektovana u mikronukleus testu.

4.1.3.4 Analiza akumuliranih metala i metaloida u jedinkama uklija

Prikaz koncentracije akumuliranih metala i metaloida u jedinkama uklija za koje su propisane MDK vrednosti (European Commission, 2006; Službeni glasnik RS” broj 29/2014) dat je u tabeli 4.9. Poređenjem detektovanih koncentracija i MDK vrednosti uvrđene su povišene koncentracije Fe u jedinkama uzorkovanih na lokalitetima VM1 (sr. vrednost \pm standardna devijacija, SD: $70,41 \pm 139,06$), ZM1 ($33,74 \pm 21,43$) i JM2 ($46,42 \pm 44,56$). Svi ostali elementi su u bili prisutni u nižim koncentracijama u odnosu na propisane MDK.

Analizirajući koncentracije ispitivanih metala i metaloida u jedinkama uklija može se uočiti da postoji variranje u koncentracijama između lokaliteta (podaci su prikazani u Prilogu 1, u tabeli 4). Od svih elemenata, najviše koncentracije su dobijene za Fe (vrednosti su varirale između $11,01 \pm 3,43$ i $70,41 \pm 139,06$ mg/kg vlažne mase, wbc), i Zn (vrednosti su varirale između 23,24 i 58,37 mg/kg wbc). Najniža koncentracija je dobijena za elemente: Cd (vrednosti varirale između 0,001 i 0,011 mg/kg wbc) i Co (vrednosti su varirale između 0, i 0,12 mg/kg wbc). Elementi As i Hg nisu detektovani ni na jednom od ispitivanih lokaliteta u slivu Velike Morave. Na osnovu SD vrednosti uočava se i varijabilnost u koncentracijama akumuliranih metala i metaloida između jedinki sa istog lokaliteta.

Elementi Al, Co, Mn i Zn nisu pokazali značajnu varijabilnost u koncentracijama između ispitivanih lokaliteta. Sa druge strane, utvrđena je statistički značajna razlika između lokaliteta u koncentracijama Cr, Cd, Fe, Cu, Ni, Pb, Se i Sn. Od ovih elemenata, najviše koncentracije Cr, Fe, Ni i Sn su detektovane u mišiću jedinki uzorkovanih sa lokaliteta VM1, dok su najviše vrednosti Cu i Se zabeležene u jedinkama sa lokaliteta ZM1. Na osnovu MPI vrednosti (podaci su prikazani u Prilogu 1, u tabeli 4.), najviši nivo akumuliranih metala i metaloida detektovan je u jedinkama upravo sa lokaliteta VM1 (0,99) i ZM1 (0,77), dok su najniže vrednosti ovog indeksa dobijene za lokalitete RS (0,16) i VM2 (0,27).

Tabela 4.9. Pregled propisanih MDK vrednosti i koncentracija detektovanih metala i metaloida u jedinkama uklija izraženih u mg/kg wbc (srednja vrednost \pm SD); n.d. – nije detektovano u uzorku; različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta (korišćeni testovi: Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U sa Dunn-Boniferroni korekcijom; $p < 0,001$); crveno označene koncentracije – vrednosti iznad MDK.

	MDK	RS	VM1	VM2	ZM1	ZM2	ZM3	JM1	JM2	JM3
As	2	0,066 \pm 0,069	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cd	0,05	0,001 \pm 0,001 ^a	0,006 \pm 0,008 ^{ab}	0,001 \pm 0,002 ^a	0,009 \pm 0,009 ^b	0,010 \pm 0,010 ^b	0,004 \pm 0,004 ^{ab}	0,011 \pm 0,014 ^b	0,010 \pm 0,004 ^b	0,005 \pm 0,005 ^{ab}
Cu	30	0,49 \pm 0,07 ^{ab}	1,13 \pm 0,38 ^c	1,07 \pm 0,33 ^c	1,35 \pm 0,84 ^c	0,76 \pm 0,28	0,47 \pm 0,13 ^{abc}	0,26 \pm 0,09 ^{ab}	0,51 \pm 0,13 ^{ab}	0,65 \pm 0,13 ^{abc}
Fe	30	11,01 \pm 3,43 ^{ab}	70,41 \pm 139,0^c	11,78 \pm 13,37 ^c	33,74 \pm 21,43^c	12,04 \pm 4,79 ^a	18,55 \pm 28,51 ^{bc}	29,86 \pm 15,92 ^{ab}	46,42 \pm 44,56^{ab}	21,21 \pm 8,23 ^{abc}
Hg	0,5	0,04 \pm 0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pb	0,3	0,014 \pm 0,014 ^a	0,100 \pm 0,210	0,020 \pm 0,040	0,120 \pm 0,160 ^{ab}	0,245 \pm 0,232 ^b	0,145 \pm 0,100 ^b	0,077 \pm 0,059 ^{ab}	0,070 \pm 0,070 ^{ab}	0,018 \pm 0,021 ^a
Zn	100	35,42 \pm 13,87 ^a	39,60 \pm 7,46 ^a	46,53 \pm 10,03 ^a	52,40 \pm 8,61 ^a	46,4 \pm 7,90 ^a	44,63 \pm 8,38 ^a	58,37 \pm 15,12 ^a	44,14 \pm 18,28 ^a	23,24 \pm 12,63 ^a

*n.d. –nije detektovano

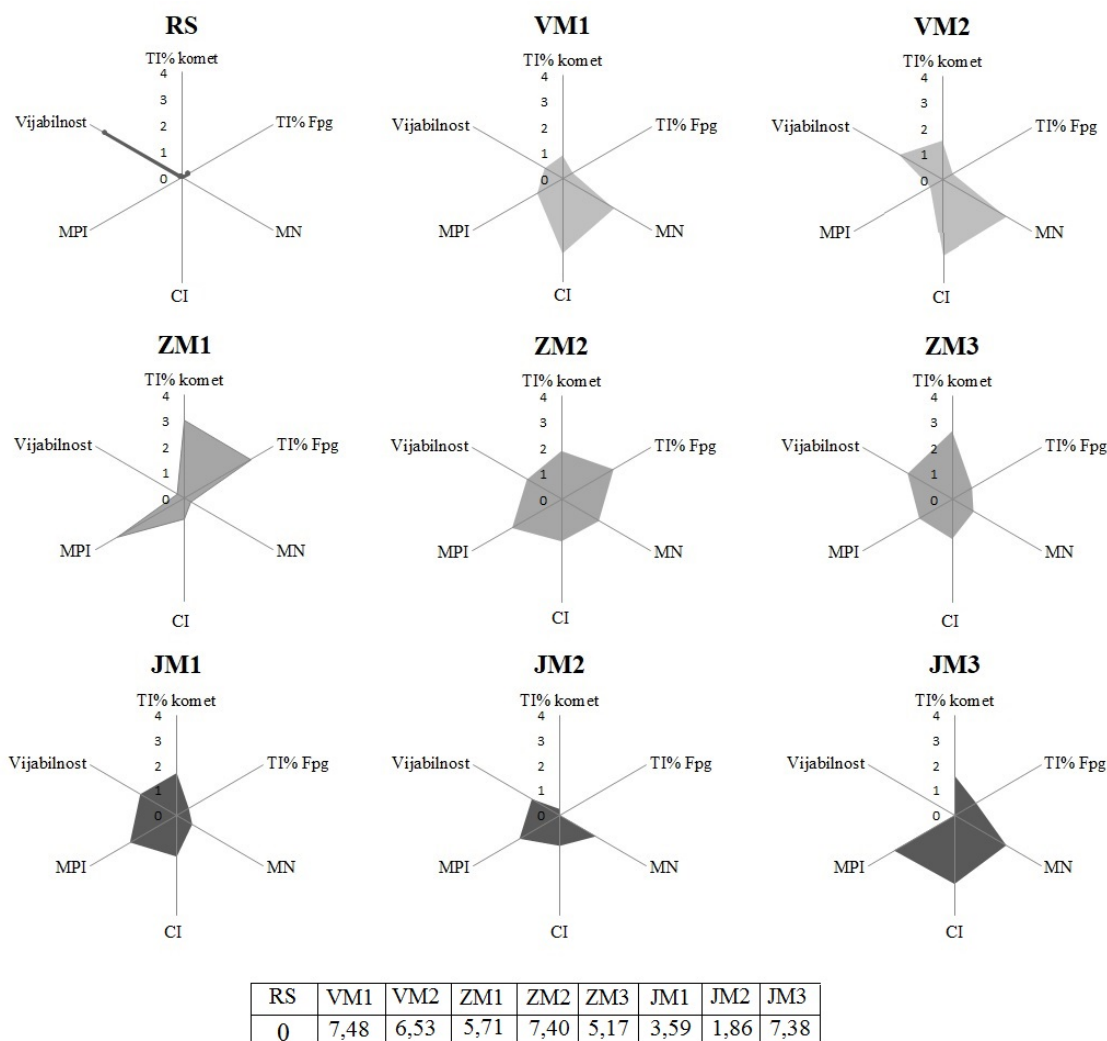
Uklja je veoma agilna vrsta koja se odlikuje brzim metabolizmom, zbog čega u jedinkama ove vrste može doći do većeg stepena akumulacije metala i metaloida u odnosu na vrste nižom metaboličkom aktivnošću (Kalay i sar., 1999; Canli i Atli, 2003; Merciai i sar., 2014). Takođe, pošto se radi o epipelagijskoj vrsti, izložena je zagađujućim supstancama iz celog vodenog stuba. Iako ukljeje nisu konzumne vrste, njima se hrane predatorske vrste riba koje se koriste u ishrani ljudi. Akumulirana jedinjenja u ukljama mogu ući u lanac ishrane i tako se biomagnifikovati, te predstavljaju rizik ne samo po zdravlje akvatičnih organizama, već i ljudi (Beyer i Biziuk, 2009; Liao i sar., 2016).

Dobijene MPI vrednosti na osnovu koncentracija metala i metaloida u jedinkama uklija su u skladu sa MPI vrednostima iz studije Milošković i sar. (2016) u kojoj su na lokalitetima na Velikoj, Zapadnoj i Južnoj Moravi korišćene vrste *Barbus barbus*, *Squalus cephalus* i *Chondrostoma nasus* kao bioindikator zagađenja metalima i metaloidima. U oba istraživanja najviše MPI vrednosti su zabeležene na lokalitetima na Zapadnoj Moravi, što je još jedan pokazatelj da se ovaj vodotok nalazi pod uticajem zagađenja metalima i metaloidima.

Prema MPI vrednostima, na većini lokaliteta u slivu Velike Morave zabeležen je veći nivo zagađenja uklija metalima i metaloidima u odnosu na studiju Kolarević i sar. (2016a) gde je istraživanje rađeno na istoj vrsti ribe na 12 lokaliteta na Savi. U obe studije uočen je uticaj industrije i poljoprivrede na zagađenje lokaliteta, ali su povišene MPI vrednosti u slivu Velike Morave najverovatnije posledica nižeg protoka Velike, Južne i Zapadne Morave u odnosu na Savu, usled čega se očekuje i veća izloženost organizama različitim agensima.

4.1.3.5 IBR analiza

Prikaz IBR dijagrama, kao i vrednosti površine dijagrama za odabrane lokalitete predstavljeni su na slici 4.6.



Slika 4.6. IBR vrednosti odabranih biomarkera: CI, vijabilnosti ćelija krvi, TI % alkalnog i Fpg-modifikovanog komet testa, učestalost MN (‰), MPI.

Na osnovu slike 4.6. uočava se da u zavisnosti od lokaliteta, različite koordinate, tj. odgovori biomarkera, utiču na povećanje površine IBR dijagrama i da su specifični za lokalitet. U slučaju lokaliteta VM1, najveći uticaj na povećanje površine dijagrama imali su kondicioni indeks i učestalost MN, dok su za lokalitet VM2, pored navedenih parametara, uticali i vijabilnost ćelija krvi i TI % dobijen alkalnim komet testom. Povećanju površine dijagrama za lokalitet ZM1 su doprineli parametri TI % dobijeni alkalnim i Fpg-modifikovanim komet testom i MPI, a na lokalitetima ZM2 i ZM3 svi parametri su gotovo podjednako doprineli povećanju površine dijagrama. Parametri MPI, kondicioni indeks i vijabilnost su doprineli povećanju površine dijagrama za lokalitet JM1, a za JM2 uočen je najveći uticaj istih parametara i MN, dok je za JM3 uočen uticaj svih parametara, izuzev vijabilnosti.

Računanjem površina radijalnih dijagrama dobijene su IBR vrednosti. Najviše IBR vrednosti zabeležene su za lokalitete VM1 (7,48) i ZM2 (7,40), dok su najniže dobijene za lokalitete JM2 (1,86) i referentni RS lokalitet (0).

Poređenjem vrednosti površina radijalnog dijagrama dobijenih za hemijske parametre (Slika 4.2) i IBR vrednosti (Slika 4.6) primenom Pearson testa dobijena je visoka, ali ne i statistički značajna korelacija ($r = 0,54$, $p = 0,13$). Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija između IBR i SumTU vrednosti ($r = 0,18$, $p = 0,66$).

Interesantno je da su najviše IBR vrednosti dobijene za lokalitete VM1 i ZM2, za koje, prema podacima monitoringa, nije utvrđen visok stepen zagađanja i visoke SumTU vrednosti

(Poglavlje 4.1.1.2.2). Prema brojnim studijama (Oliveira i sar., 2010; Wang i sar., 2010; Tsangaris i sar., 2011; Samanta i sar., 2018), IBR indeks predstavlja indikator sredinskog stresa na organizme koji je najčešće povezan sa zagađenjem. U skladu sa navedenim studijama, visoke IBR vrednosti na lokalitetim VM1 i ZM2 mogu ukazati da su na ovim lokalitetima prisutni agensi koji su doprineli odgovoru biomarkera, a koji nisu praćeni u okviru monitoringa. Odustvo korelacije između IBR vrednosti, površina dijagrama dobijenih za parametre o hemijskom zagađenju i SumTU takođe može biti pokazatelj da se *in silico* analizom ne može u potpunosti predvideti odgovor biomarkera. Jedino u slučaju lokaliteta JM2 dobijene su najniže vrednosti površina dijagrama hemijskih parametara, SumTU vrednosti i najniži odgovor biomarkera.

Veličina seta podataka može biti jedan od razloga zbog čega se ne može utvrditi jasna veza između „pretpostavljenog“ toksičnog/genotoksičnog potencijala dobijenog na osnovu *in silico* analize i efekata koji su detektovani u biotestovima. Pored toga, treba imati u vidu da su korišćene najniže PNEC vrednosti za organska jedinjenja iz baze NORMAN, dobijene u najvećem broju testiranjem na *Selenastrum capricornutum* i *Daphnia magna*, kao i primenom QSAR metode. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji u saglasnosti su sa činjenicom da različiti organizmi nemaju isti nivo ostljivosti prema toksičnim agensima i samim za svaku grupu organizama postoji specifična PNEC vrednost (Ferrari i sar., 2003; de Jesus Azevedo i sar., 2021). Na osnovu dostupne literature, za veliki broj supstanci koje se mogu naći u vodenoj sredini nisu uvrđene toksične koncentracije i PNEC vrednosti za ribe. Jedna od metoda koja se može koristiti za ispitivanje toksičnih koncentracija i efekata na ribama, a koja isključuje žrtvovanje adultnih jedinki, je test akutne toksičnosti embriona riba (eng. *fish embryo acute toxicity*, FET). Na osnovu rezultata ovog testa može se formirati baza podataka o toksičnim koncentracijama i PNEC vrednostima za ribe, a ti podaci se zatim mogu koristiti u *in silico* analizi. Takođe, ograničenje *in silico* analize ogleda se i u tome što podrazumeva predikciju toksičnog/genotoksičnog potencijala na osnovu zbira toksičnog/genotoksičnog potencijala pojedinačnih agenasa, te iz tog razloga ova analiza ne može „predvideti“ efekte na biološkim sistemima koji su posledica međusobne interakcije agenasa (kumulativni, antagonistički, aditivni efekti).

Pored PNEC vrednosti, za računanje SumTU se mogu koristiti prosečne koncentracije bez štetnog efekta (eng. *no observed effect concentration*, NOEC) koja je zasnovana na NOEC vrednostima dobijenim za alge, *D. magna* i ribe (Posthuma i sar., 2019; Tenji i sar., 2020). Međutim, u studiji Tenji i sar. (2020) utvrđeno je da SumTU vrednosti dobijene na osnovu koncentracija agenasa u vodi i NOEC vrednosti i u ovom slučaju nisu mogle da u potpunosti predvide odgovore biomarkera ističući da odgovor biomarkera zavisi i od fiziološkog stanja organizma, ali i sposobnosti organizama da se adaptiraju na hronično izlaganje toksičnim agensima.

Imajući u vidu rezultate svih analiza, ova je studija pružila sveobuhvatane podatke o genotoksičnom potencijalu sliva Velike Morave. Prema podacima hemijskih parametara merenih u okviru nacionalnog monitoringa uočeno je narušavanje kvaliteta vode usled ispuštanja komunalnih i industrijskih otpadnih voda u rečne tokove.

Komparacijom SumTU vrednosti i rezultata dobijenih u biotestovima uočeno je da u pojedinim slučajevima *in silico* analiza ne može predvideti nivo biološkog odgovora na dejstvo smeša genotoksičnih agenasa koji su prisutni u vodi. Na osnovu *ex situ/in vitro* i *in situ/in vivo* istraživanja pokazano je da odabrani *in vitro* testovi nisu pokazali visok stepen osetljivosti u detekciji toksičnog i genotoksičnog potencijala nativnih uzoraka vode. Iz tog razloga, dobijene rezultate ovih testova treba uzeti sa oprezom prilikom predikcije toksičnog/genotoksičnog potencijala lokaliteta. Sa druge strane, primena baterije *in vivo* testova pružila je kompletniji uvid u genotoksične efekte u uklijama, a alkalni komet test pokazao je najveći stepen osetljivosti u diskriminaciji lokaliteta. Objedinjavanjem pojedinačnih odgovora biomarkera u jedinstvenu IBR vrednost omogućilo je jednostavniju komparaciju između lokaliteta. Takođe, rezultati iz ove studije predstavljali su važnu osnovu za plan istraživanja u slivu Save i Dunava.

4.2 Istraživanje sliva Save

U aprilu 2019. godine uzorkovane su jedinke uklija sa tri lokaliteta u slivu Save: lokalitet Sava Zabran (SZ, nalazi se na obali obrenovačkog izletišta Zabran), ušće Kolubare (UK, nalazi se nizvodno od lokaliteta SZ) i ušće Baričke reke (UB, nalazi se nizvodno od lokaliteta UK). S obzirom da je prema podacima GZZJZ Beograd na lokalitetima zabeležen relativno visok stepen zagađenja organskim jedinjenjima, za procenu uticaja ovog tipa zagađenja korišćeni su podaci iz studije Kolarević i sar. (2016a) koji su dobijeni za lokalitet uzvodno od Šapca na Savi (RS), za koji je potvrđen nizak stepen zagađenja, kao i podaci za lokalitet nizvodno od Svilajнца (VM1) iz studije sliva Velike Morave, za koji je utvrđeno da je pod većim pritiskom zagađenja.

4.2.1 Analiza fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode na lokalitetima u slivu Save

4.2.1.1 Fizičko-hemijski parametri

Osnovni fizičko-hemijski parametri mereni su u isto vreme kada su uzorkovane jedinke uklija (Tabela 4.10).

Temperatura vode nije značajno varirala između lokaliteta (13,2-12,3 °C), a vrednosti su bile očekivane za taj period godine. Najviša vrednost elektroprovodljivosti zabeležena je na lokalitetu UK (521 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dok su identične vrednosti (442 $\mu\text{S}/\text{cm}$) zabeležene na lokalitetima SZ i UB. Na svim lokalitetima su zabeležene blago alkalne pH vrednosti. Takođe, na svim lokalitetima su zabeležene visoke koncentracije rastvorenog kiseonika (9,63-10,86 mg/l), što je karakteristično za prolećnu sezonu. Naime, u toku proleća dolazi do povećanja proticaja koje je posledica padavina i topljenja snežnog pokrivača na višim nadmorskim visinama koje preko manjih vodotokova dospeva u Savu. Veći proticaj dovodi do mešanja vode i obogaćivanja kiseonikom. Takođe, relativno niske vrednosti temperature vode i vazduha doprinose visokim koncentracijama kiseonika u vodi.

Indikacija ekološkog statusa na osnovu pH vrednosti i koncentracije rastvorenog kiseonika u vodi, ukazuje da su svi lokaliteti pripadali kategoriji I kvaliteta (ocena ekološkog statusa - odličan) u trenutku uzorkovanja („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Tabela 4.10. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara u na lokalitetima u slivu Save.

Lokaliteti	pH	Temperatura (°C)	Elektroprovodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	O ₂ (mg/l)	O ₂ (%)
SZ	8,04	13,2	442	10,86	105,2
UK	7,95	12,6	521	9,82	98,4
UB	8,04	12,3	442	9,63	98,2

4.2.1.2 *In silico* analiza

4.2.1.2.1 Analiza podataka nadzornog monitoringa

Podaci koji su dobijeni iz baze GZZJZ Beograd za period u april/maj 2019. godine prikazani su u Prilogu 2, tabela 1. Parametri BPK₅, HPK, amonijačni azot, nitriti, nitrati, hloridi, sulfati, ukupni azot i ukupni fosfor mereni su u aprilu. Najviše vrednosti ovih hemijskih kvaliteta zabeležene su na lokalitetu UB, dok su najniže vrednosti za najveći broj parametara detektovane na

lokalitetu SZ (Prilog 2, tabela 1). Visoke koncentracije azotnih jedinjenja, fosfata i sulfata, BPK_5 , HPK ukazuju na visok stepen zagađenja organskim materijama, što može biti indikator uticaja komunalnih otpadnih voda (Preisner, 2020). Imajući u vidu da je Kolubara glavni recipijent otpadnih voda Obrenovca (50.000 stanovnika), a da se u Baričku reku ispuštaju otpadne vode naselja Barič (7.000 stanovnika), visoke koncentracije navedenih parametara ukazuju na narušavanje kvaliteta vode ovih lokaliteta usled upliva otpadnih voda.

Određivanje koncentracije šest metala i metaloida (As, Cu, Zn, Cr, Fe, Ni) u vodi vršeno je u maju iste godine od strane GZZJZ Beograd. Na osnovu podataka monitoringa, najviše koncentracije As i Ni u vodi su detektovane na lokalitetu UB, dok je najniža koncentracija Ni zabeležena na lokalitetu SZ (Prilog 2, tabela 1). Pored ova dva elementa, na svim lokalitetima je zabeležen Zn, dok su koncentracije ostalih metala i metaloida bile ispod limita detekcije. S obzirom da su Zn, Ni i As elementi koji se koriste u industriji, njihovo prisustvo u vodenoj sredini može biti indikator uticaja industrijskih otpadnih voda (Vystavna i sar., 2013). Osim otpadnih voda iz domaćinstava Obrenovca, u Kolubaru se ulivaju i otpadne vode različitih industrija (metaloindustrija, hemijska industrija, itd.), što bi mogao biti izvor As i Zn na lokalitetu UK. Na lokalitetu UB, detektovani As i Zn mogu biti u vezi sa otpadnim vodama iz postrojenja hemijske industrije i iz fabrike automobilskih delova koje se nalaze u blizini lokaliteta.

Da bi se dobila kompletnija slika uticaja zagađenja na ispitivanim lokalitetima analizirani su podaci monitoringa za period 2017 - 2019 godine koji su preuzeti iz baze GZZJZ Beograd. Prosečne koncentracije hemijskih parametara za ovaj period prikazane su u Prilogu 2, u tabeli 2. Kao što se vidi iz tabele, za najveći broj analiziranih parametara najviše prosečne vrednosti indikatora organskog zagađenja su zabeležene na lokalitetu UB. Takođe, zabeležene su visoke koncentracije parametara koji ukazuju na zagađenje organskim jedinjenjima i na lokalitetu UK. Kada se analiziraju podaci metala i metaloida, na lokalitetu UK detektovane su najviše koncentracije većine praćenih elemenata (As, Cu, Cr, Fe i Ni), što ukazuje da je ovaj lokalitet pod većim uticajem zagađenja metalima i metaloidima u odnosu na ostala dva lokaliteta. Međutim, iako su koncentracije metala i metaloida bile značajno više u odnosu na ostala dva lokaliteta, bile su ispod graničnih vrednosti (Službeni glasnik RS“ 67/20011, 48/2012, 1/2016).

Koncentracije hemijskih parametara u vodi zavise od brojnih faktora: vodostaja, padavina, količine agenasa u otpadnim vodama, itd. te nije iznenađujuće što se uočava varijabilnost u koncentracijama hemijskih parametara iz aprila/maja 2019. godine i prosečnih vrednosti za period 2017 - 2019 godine. Imajući u vidu da podaci iz aprila/maja 2019. godine pokazuju trenutno stanje lokaliteta, u trenutku merenja, dok prosečne koncentracije za period 2017 - 2019 godine uzimaju u obzir veći broj merenja, tokom različitih sezona, može se zaključiti da prosečne koncentracije pružaju jasniji uvid o pritisku zagađenja na lokalitetima tokom dužeg vremenskog perioda, u toku različitih sezona.

S obzirom da je uočen visok pritisak zagađenja organskim jedinjenjima, izvršena je procena ekološkog statusa lokaliteta na osnovu ovih parametara (GZZJZ Beograd podaci za period 2017 - 2019 godine). Koncentracije parametara: biološka potrošnja kiseonika (BPK_5), koncentracija amonijačnog azota, nitrata, hlorida, ortofosfata i ukupnih rastvorenih fosfata izmerenih u periodu 2017 - 2019 godine na lokalitetu SZ ukazuju na klasu I kvaliteta površinskih voda. Na lokalitetu UK koncentracije nitrita, hlorida i ortofosfata indikovalе su klasu I kvaliteta, prosečna vrednost BPK_5 indikovala je klasu II kvaliteta, koncentracije amonijačnog azota i ukupnih rastvorenih fosfata klasu III. Na lokalitetu UB koncentracija nitrata indikovala je klasu I, koncentracija hlorida klasu II, prosečna vrednost BPK_5 klasu IV kvaliteta, a koncentracije amonijačnog azota, ortofosfata i ukupno rastvorenih fosfata klasu V kvaliteta („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Ukoliko se procena ekološkog statusa vrši na osnovu prosečnih vrednosti svih navedenih parametara za period 2017 – 2019, lokalitet SZ pripada klasi I kvaliteta (ocena ekološkog statusa – odličan), lokalitet UK klasi III (ocena ekološkog statusa – umeren) i lokalitet UB klasi V kvaliteta

(ocena ekološkog statusa - loš) („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011). Prema ovoj proceni, kvalitet vode na lokalitetu UB je veoma narušen.

Podaci o koncentracijama specifičnih organskih zagađujućih jedinjenja (pesticidi, PAH-ovi, PCB, lako isparljiva organska jedinjenja) za period 2017 – 2019 godine preuzeti su takođe iz baze GZZJZ Beograd, a prosečne vrednosti merenja su date u Prilogu 2, u tabeli 3. Monitoring organskih zagađujućih jedinjenja vršen je dva puta godišnje, u maju i septembru.

Prema podacima GZZJZ Beograd, broj praćenih organskih zagađujućih jedinjenja varirao je između lokaliteta. Na lokalitetu SZ praćeno je pet organskih zagađujućih jedinjenja (acetohlor, desetilterbutilazin, metolahlor, terbutilazin, ukupni PCB) i tokom dvogodišnjeg monitoringa minimum jednom su detektovani pesticidi desetilterbutilazin, metolahlor, terbutilazin. Na lokalitetu UK vršena su merenja sedam jedinjenja (acetohlor, desetilterbutilazin, metolahlor, terbutilazin, ukupni PAH-ovi ukupni PCB, fenantren), od kojih su detektovani minimum jednom acetohlor, desetilterbutilazin, metolahlor, terbutilazin, fenantren i ukupni PAH-ovi. Na lokalitetu UB je merene su koncentracije 18 jedinjenja (acetohlor, DEET, metolahlor, metalaksil terbutilazin, piperonil butoksid, terbutilazin-desetil, tiametoksan, imidaklopid, ukupni PAH-ovi, ukupni PCB, fenantren, flouranten, naftalen, piren, hloroform, tolulol), a minimum jednom su detektovani DEET, metolahlor, metalaksil, terbutilazin, terbutilazin-desetil, piperonil butoksid, tiametoksan, imidaklopridenantren, flouranten, naftalen, piren, ukupni PAH, hloroform, tolulol. Prisustvo pesticida na sva tri lokaliteta ukazuje na to da je poljoprivreda, odnosno spiranje sa poljoprivrednih površina, predstavlja još jedan izvor zagađenja na ispitivanim lokalitetima. Pored pesticida, na lokalitetima SZ i UK su detektovani i ukupni PCB. Zbog hemijske strukture i stabilnosti, ova grupa jedinjenja ima široku primenu u gotovo svim granama industrije (sastavni su deo boja, lakova, različitih vrsta ambalaže, mašinskim uljima, itd.) zbog čega su često prisutni u industrijskim i komunalnim otpadnim vodama (Sánchez-Avila i sar., 2009). Dodatno, toluol, hloroform i naftalen su detektovani na lokalitetu UB ukazuju na uticaj industrijskih otpadnih voda (Nikolaou i sar., 2002).

Ukoliko merenja nisu vršena tokom svih sezona, prilikom interpretacije rezultata treba imati u vidu da oni, generalno, ne moraju dati pravi uvid o stanju akvatičnih ekosistema tokom cele godine. Naime, na biološke elemente za ocenu ekološkog statusa/potencijala, kao i na fizičko-hemijske, hemijske i mikrobiološke parametare kvaliteta vode utiču brojni faktori, među kojima su i faktori koji su uslovljeni sezonskim varijacijama (temperatura vode, količina padavina, antropogene aktivnosti koje su vezane za određene sezone, itd.). Na primer, najveći broj pesticida, PAH-ova i/ili PCB-a dospeva u vodu sredinom spiranjem okolnog zemljišta. Upotreba pesticida zavisi od vegetativnog perioda gajene kulture, zbog čega i koncentracija ovih jedinjenja u akvatičnoj sredini varira tokom sezona. Samim tim, monitoring hemijskih agenasa koji uključuje redovne mesečne analize pruža informaciju da li i kada dolazi do povećanja koncentracija analiziranih parametara, na osnovu čega se dobija kompletnija slika o doprinosu pojedinačnih ksenobiotika, ali i njihovih smeša, na ukupni pritisak zagađenja.

Kada se na osnovu podataka monitoringa uporede prosečne koncentracije hemijskih parametara izmerenih na lokalitetima u slivu Velike Morave, Save i Dunava (Prilog 1, tabela 1; Prilog 2, tabele 1 i 2; Prilog 3, tabela 1), uočava se da su najveće koncentracije većine parametara detektovane na lokalitetima UK i UB. Razlog za to može biti relativno mali protok Kolubare i Baričke reke (prosečne vrednosti protoka za april 2019. godine (RHMZ, 2019): Barička reka - nema podataka, Kolubara - 6 m³/s), a pri tom su recipijenti komunalnih i industrijskih otpadnih voda iz Obrenovca i naselja Barič. Sa druge strane, velike reke se odlikuju i većim protocima vode, što može značajno uticati na koncentraciju analiziranih parametara. Tako, na ispitivanim lokalitetima u slivu Velike Morave (prosečne vrednosti protoka za avgust/septembar 2016 (RHMZ, 2016): Velika Morava - 99/75 m³/s; Zapadna Morava - 36/24 m³/s, Južna Morava - 10,5/12 m³/s) i Dunava (prosečne vrednosti protoka za jul 2019. godine (RHMZ, 2019): Tisa: 345 m³/s, Sava: 588 m³/s, Dunav: 2700 m³/s) detektovane su niže koncentracije hemijskih parametara u odnosu na UK i UB.

4.2.1.2.2 SumTU analiza

Ukupan uticaj jedinjenja i elemenata koji pri određenim koncentracijama imaju toksične efekte i koji su praćeni od strane GZZJZ Beograd u okviru dvogodišnjeg nadzornog monitoringa (2017-2019 godine) procenjen je računanjem SumTU vrednosti.

U okviru monitoringa nisu praćeni isti hemijski parametri na lokalitetima SZ, UK i UB. Iz potrebe da set podataka bude balansiran, procena toksičnog potencijala vršena je na osnovu hemijskih parametara koji su praćeni na sva tri lokaliteta. Toksični potencijal utvrđen je za osam parametara koji su detektovani na minimum jednom lokalitetu tokom dvogodišnjeg monitoringa. U grupu toksičnih elemenata/jedinjenja koja su detektovana u vodi spadaju metali i metaloidi koji se često koriste u industrijskim procesima i kao sastavni deo agrotehničkih mera (As, Cu, Zn, Fe, Ni) i herbicidi koji se intenzivno koriste u poljoprivredi (acetohlor, metalohlor, terbutilazin). Podaci o PNEC vrednostima pesticida (herbicida) preuzete su iz baze NORMAN udruženja, a iz ECHA baze su preuzete PNEC vrednosti metala i metaloida.

Najveći uticaj na toksični potencijal, odnosno na povećanje SumTU vrednosti, imali su hemijski parametri koji su detektovani u koncentracijama iznad PNEC vrednosti (Prilog 2, tabela 4). Na lokalitetu UK zabeležene su koncentracije metala i metaloida Cu ($16,4 \pm 3,4 \mu\text{g/l}$), Zn ($19,8 \pm 5,4 \mu\text{g/l}$), Ni ($6,9 \pm 1,3 \mu\text{g/l}$) i pesticida acetohlora ($0,023 \pm 0,02 \mu\text{g/l}$), metolahlora ($1,464 \pm 1,386 \mu\text{g/l}$) i tebutilazina ($0,868 \pm 0,797 \mu\text{g/l}$) iznad PNEC vrednosti ($11 \mu\text{g/l}$, $17 \mu\text{g/l}$, $6 \mu\text{g/l}$, $0,013 \mu\text{g/l}$, $0,2 \mu\text{g/l}$, $0,06 \mu\text{g/l}$), a na lokalitetu UB Zn ($40,1 \pm 18,0 \mu\text{g/l}$) i terbutilazin ($0,100 \pm 0,503 \mu\text{g/l}$) su prevazilazile PNEC vrednosti.

Pored parametara koji su detektovani u koncentracijama iznad PNEC vrednosti, na toksični potencijal uticali su i hemijski parametri čije su koncentracije bile nešto ispod PNEC vrednosti. Koncentracije Cu, Zn, Ni, metolahlora i terbutilazina imale su značajan uticaj na povećanje toksičnog potencijala za lokalitet SZ, As i Fe za lokalitet UK i As, Cu, Ni i metalohlor za lokalitet UB.

Da bi se izvršila procena kumulativnog efekta toksičnih agenasa izračunate su SumTU vrednosti (Prilog 2, tabela 4). Najviša SumTU vrednost je dobijena za lokalitet UK (28,98), dok je za SZ dobijena najniža (3,22) (Tabela 4.11).

Tabela 4.41. Prikaz SumTU vrednosti na osnovu podataka nadzornog monitoringa za period 2017-2019 godine (podaci preuzeti od GZZJZ Beograd)

	SZ	UK	UB
SumTU	3,22	28,98	5,99

Za sve hemijske parametre za koje je utvrđen toksični potencijal, utvrđen je i genotoksični. Najveći broj detektovanih hemijskih parametara može indukovati oksidativni stres i na taj način dovesti do promena u genetičkom materijalu.

4.2.2 Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja

Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja obuhvatila je analizu iz aprila 2019. godine, kada je vršeno uzorkovanje za ekogenotoksikološka ispitivanja, i prosečne vrednosti iz perioda 2018 - 2020 godine koje su obuhvatile analize tokom četiri sezone. Brojnost mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja u aprilu 2019. i u periodu 2018 - 2020 godine prikazana je u tabeli 4.12. Ukoliko bi se izvršila indikacija ekološkog statusa na osnovu MPN vrednosti ukupnih koliforma i *E. coli* detektovanih u trenutku realizacije ovog istraživanja (aprilu 2019. godine), sva tri lokaliteta bi pripadala klasi II kvaliteta (ocena ekološkog potencijala – dobar) („Službeni glasnik

RS“, broj 74/2011). Međutim, kada se uzmu u obzir prosečne MPN vrednosti *E. coli* za period 2018 - 2020 godine, kvalitet vode je varirao od klase II, do klase V kvaliteta voda (ocena ekološkog statusa – loš) („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011). Slični rezultati dobijeni su i za prosečne MPN vrednosti ukupnih koliforma za period 2018-2020 (podaci nisu prikazani).

Korelacionom analizom ispitan je odnos broja mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja i agenasa koji mogu ukazati na uticaj komunalnih i industrijskih otpadnih voda na lokalitetima. Primenom Spearman testa nije utvrđena statistički značajna korelacija između MPN vredosti ukupnih koliforma, odnosno *E. coli*, detektovanih tokom četiri sezone u periodu 2018 – 2020 godine i hemijskih parametara izmerenih tokom sezona u periodu 2017 – 2019 godine. Ovakvi rezultati ukazuju da detektovani ukupni koliformi i *E. coli* najverovatnije potiču iz više različitih izvora zagađenja.

Tabela 4.12. Prikaz MPN vrednosti ukupnih koliforma i *E. coli* detektovanih u aprilu 2019. godine, i u periodu 2018 – 2020 godine (sr. vrednost \pm SE) i prikaz klasifikacije kvaliteta vode („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Lokaliteti	Ukupni koliformi		<i>E. coli</i>			
	April 2019.	Klasa	April 2019.	Klasa	2018 – 2020	Klasa
SZ	2282	II	504	II	255 \pm 95,42	II
UK	1658	II	538	II	12341,25 \pm 6844,37	V
UB	839	II	269	II	8185,50 \pm 5606,14	IV

Za razliku od *E. coli* koja je deo crevne flore toplokrvnih organizama, grupa ukupnih koliforma obuhvata i vrste koje naseljavaju zemljište, zbog čega ukupni koliformi nisu isključivo indikatori fekalnog zagađenja. Međutim, dobijene MPN vrednosti ukupnih koliforma i *E. coli* pokazuju sličan trend, odnosno na lokalitetima UB i UK na kojima su dobijene visoke MPN vrednosti ukupnih koliforma, uočavaju se i visoke MPN vrednosti *E. coli*. Sa druge strane, za lokalitet SZ dobijene su najniže MPN vrednosti ova dva parametra mikrobiološkog kvaliteta vode. Takođe, primenom Pearson testa korelacije utvrđena je statistički značajna korelacija između MPN vrednosti ukupnih koliforma i *E. coli* ($r = 0,9$, $p = 0,000$), što ukazuje da ove dve grupe indikatora mikrobiološkog zagađenja potiču iz istih izvora zagađenja.

Komparacijom rezultata za *E. coli* dobijenih u aprilu 2019. godine sa onim za period 2018 - 2020 godine uočavaju se razlike u kvalitetu vode na lokalitetima UK i UB. Ovakva razlika u kvalitetu vode na osnovu mikrobioloških indikatora ukazuje da je za uvid u pravo stanje pritiska ovog tipa zagađenja neophodno da analize obuhvate merenja tokom minimum četiri sezone. Naime, mikrobiološki pritisak u površinskim vodama može značajno da se razlikuje u zavisnosti od uslova koji vladaju u životnoj sredini (visoki/niski vodostaji, temperatura vode, itd.), odnosno od sezone. Upravo sredinski faktori, a pre svega visok vodostaj, najverovatnije je uticao na bolji mikrobiološki kvalitet vode u aprilu u odnosu na prosečni godišnji. U prilog ovoj tvrdnji su i podaci prethodnih studija koje su sprovedene na Savi i koje su ukazale na narušen kvalitet vode prema mikrobiološkim parametrima na ovom sektoru reke (Vuković i sar., 2011; Vrzal i sar., 2016). Takođe, u drugim studijama (Rodgers i sar., 2003; Kacar, 2011; Nnane i sar., 2011) je uočen različit nivo fekalnog zagađenja na lokalitetima ravničarskih reka u zavisnosti od sezone. Pored antropogenog uticaja, bitni faktori koji su uticali na sezonsku varijabilnost broja indikatora fekalnog zagađenja na lokalitetima ravničarskih reka, su variranje vodostaja, što može uticati na koncentraciju bakterija u vodi, odnosno temperature vode koja utiče na vijabilnost mikroorganizama nakon njihovog dospevanja u akvatičnu sredinu.

4.2.3 *In situ/in vivo* pristup

4.2.3.1 Opšte fiziološko stanje izlovljenih uklija

Na lokalitetima je uzorkovano po 10 jedinki uklija. U Prilogu 2, u tabeli 5 prikazane su srednje vrednosti ukupne dužine, mase i kondicionog indeksa. Najniža prosečna dužina i masa jedinki zabeležena je na lokalitetu UK ($11,95 \pm 0,15$ cm; $8,18 \pm 0,07$ g), a najviše vrednosti su zabeležene na lokalitetu UB ($12,75 \pm 0,65$ cm; $9,94 \pm 0,18$ g). Najniža prosečna vrednost kondicionog indeksa je bila za lokalitet SZ ($0,43 \pm 0,03$), dok je slična vrednost kondicionog indeksa dobijena za UK i UB ($0,48 \pm 0,2$; $0,48 \pm 0,13$).

Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u kondicionom indeksu između lokaliteta, njihove vrednosti su niže u odnosu na vrednosti kondicionog indeksa dobijenih u studiji na Velikoj Moravi i drugim studijama (Kolarević i sar., 2016a; Milošković i sar., 2018). S obzirom da je dužina jedinki u svim studijama bila slična, uočava se da je masa glavni faktor koji doprinosi sniženju vrednosti ovog indeksa na lokalitetima SZ, UK i UB u odnosu na lokalitete iz navedenih studija. Različiti periodi uzorkovanja može biti glavni razlog za utvrđene razlike u masi jedinki. Tokom zimskog perioda očekivana je redukcija mase uklija usled smanjenja dostupnosti hrane u vodenom stubu (Almeida i sar., 2014). S obzirom da je uzorkovanje uklija na lokalitetima SZ, UK i UB bilo u aprilu, pretpostavka je da jedinke nisu uspele da nadoknade izgubljenju masu tokom zime. Sa druge strane, u ostalim studijama uzorkovanje je vršeno u avgustu i septembru, u periodu kada se očekuje da su jedinkama dostupne veće količine hrane.

4.2.3.2 Citotoksični efekat na ćelijama krvi uklija

Lokaliteti u slivu Save su udaljeni od Beograda 30 km i s obzirom da su uzorci krvi za relativno kratko vreme transportovani do laboratorije i procesuirani, čuvani su na $+4$ °C do dolaska u laboratoriju.

Pre izvođenja testova za procenu genotoksičnog potencijala određena je vijabilnost ćelija krvi uklija diferencijalnim bojenjem AO/EtBr. Prosečna vijabilnost krvi jedinki uzorkovanih na lokalitetima SZ i UB bila je preko 75 %, dok je kod jedinki sa lokaliteta UK bila niža ($59,56 \pm 12,88$) (Tabela 4.13). Analizirajući vijabilnost ćelija svakog uzorka, citotoksični efekat je zabeležen za dva uzorka (dve jedinke) sa lokaliteta SZ i četiri sa lokaliteta UK, zbog čega su isključeni iz daljih genotoksikoloških analiza.

Tabela 4.2. Vijabilnost ćelija krvi uklija (srednja vrednost \pm SE).

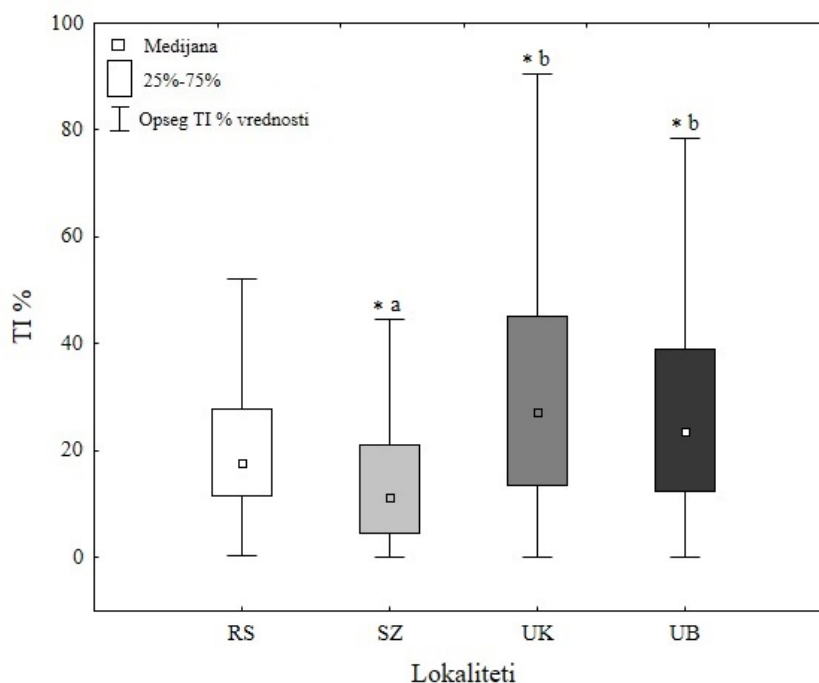
Lokaliteti	Vijabilnost (%)
SZ	$77,20 \pm 10,85$
UK	$59,56 \pm 12,88$
UB	$79,80 \pm 9,70$

4.2.3.3 Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija

4.2.3.3.1 Alkalni komet test

Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi jedinki uklija detektovanih alkalnim komet testom varirao je između lokaliteta (Slika 4.7). Najviše vrednosti parametra TI % (sr. vrednost \pm SE)

zabeležene su na lokalitetu UK ($30,00 \pm 1,09$) i UB ($28,11 \pm 0,71$) dok je na lokalitetu SZ detektovan najniži nivo DNK oštećenja ($15,92 \pm 0,61$). Statistički značajna razlika dobijena je poređenjem TI % vrednosti sa lokaliteta UK i UB sa SZ, dok se lokaliteti UK i UB nisu značajno razlikovali. Takođe, vrednosti TI % sa lokaliteta UK i UB bile su statistički značajno više u odnosu na TI % sa lokaliteta RS. Sa druge strane, na lokalitetu SZ zabeležene su statistički značajno niža TI % vrednost u odnosu na RS.



Slika 4.7. Nivo DNK oštećenja ćelija krvi uklija na osnovu parametra TI %; različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta, * - označava statistički značajno veće ili manje TI % vrednosti u odnosu na RS (korišćeni testovi: Kruskal Wallis i Man Whitney U sa Dunn-Boniferroni korekcijom; $p < 0,006$).

U studiji sliva Velike Morave kao bazalne vrednosti DNK oštećenja korišćeni su podaci za lokalitet RS iz studije Kolarević i sar. (2016a). Međutim, u ovoj studiji, za lokalitet SZ utvrđene su niže vrednosti DNK oštećenja u alkalnom komet i mikronukleus testu u odnosu na podatke za lokalitet RS. Iz tog razloga, nivo DNK oštećenja koji je zabeležen u ćelijama krvi uklija sa lokaliteta SZ dalje su korišćene kao bazalne.

Pored visokog stepena DNK oštećenja na lokalitetima UK i UB, na ovim lokalitetima zabeležene su i više SumTU vrednosti u odnosu na SZ. Na osnovu navedenog može se zaključiti da su hemijski parametri za koje je utvrđen toksični potencijal i koji su detektovani tokom monitoringa GZZJZ Beograd verovatno uticali i na indukciju DNK oštećenja u ćelijama krvi uklija. Takođe, na ovim lokalitetima je na osnovu visokih koncentracija organskog zagađenja zabeležen uticaj komunalnih otpadnih voda. Prema rezultatima alkalnog komet testa iz studije Rajaguru i sar. (2003), visok nivo DNK oštećenja zabeležen je u ćelijama krvi šarana (*C. carpio*) na lokalitetu u blizini kolektora otpadnih voda u odnosu na lokalitete koji su se nalazili uzvodno od ispusta.

Učestalost HH (%) je takođe varirala između lokaliteta (Tabela 4.14). Iako je najniža vrednost HH zabeležena na lokalitetu SZ, između ispitivanih lokaliteta nije utvrđena statistički značajna razlika.

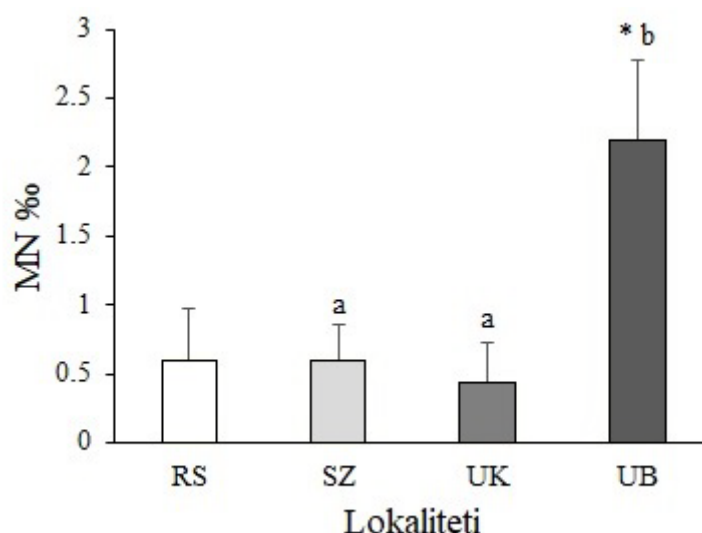
Tabela 4.14. Učestalost HH u ćelijama krvi jedinki uklija (sr. vrednost \pm SE); korišćeni test: one-way ANOVA, $p < 0,05$.

Lokaliteti	HH (%)
SZ	2,70 \pm 0,45
UK	3,55 \pm 0,50
UB	3,40 \pm 0,62

Poređenjem dobijenih vrednosti učestalosti HH i vijabilnosti ćelija krvi uklija, nije utvrđena statistički značajna Spearman korelacija između ovih parametara ($r = -0,05$, $p = 0,81$).

4.2.3.3.2 Mikronukleus test

Za analizu učestalosti MN (%) i IRR (%) korišćeni su isti uzorci kao u alkalnom komet testu. Najveći broj MN (%) u 2.000 analiziranih ćelija krvi je detektovan na lokalitetu UB (2,20 \pm 0,57), dok su slične vrednosti zabeležene na lokalitetima SZ (0,60 \pm 0,26) i UK (0,44 \pm 0,29) (Slika 4.8). Značajno veća učestalost MN zabeležena je u ćelijama krvi uklija sa lokaliteta UB u odnosu na RS, SZ i UK, koji se nisu statistički značajno razlikovali.



Slika 4.8. Učestalost MN (%) u ćelijama krvi uklija (srednja vrednost \pm SE); različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta, * označava statistički značajno višu učestalost MN u odnosu na RS (korišćeni testovi: one-way ANOVA i Tukey's post-hoc; $p < 0,05$).

Varijabilnost učestalosti MN u ćelijama krvi uklija ukazuje da je lokalitet UB pod najvećim uticajem agenasa koji mogu uzrokovati strukturne promene hromozoma.

Stopa učestalosti MN (%) na lokalitetu UB nije bila veća samo u odnosu na lokalitete SZ i UK, već i u odnosu na rezultate drugih studija u kojima su uklije korišćene kao bioindikatori (Deutschmann i sar., 2016; Kolarević i sar., 2016a; Jovanović i sar., 2018). Analizirajući rezultate mikronukleus testa, stopa učestalosti MN na lokalitetu UB je bila viša u odnosu na 35, od ukupno ispitivanih 38 lokaliteta koje su obuhvatile navedene tri studije. Više vrednosti učestalosti MN zabeležena je na Savi nizvodno od Zagreba, na lokalitetu koji je pod uticajem otpadnih voda iz ovog grada, zatim na lokalitetu Vrhovo na kome je zabeležena najviša IBR vrednost (Kolarević i sar., 2016a) i na lokalitetu JDS60 (Chiciu/Silistra) na kome je uočen uticaj otpadnih voda iz Bukurešta (Deutschmann i sar., 2016).

Najveći broj IRR (‰) je detektovan u ćelijama krvi na lokalitetu UB, a najmanji na lokalitetu SZ (Tabela 4.15). Statistički značajna razlika u učestalosti IRR dobijena je poređenjem lokaliteta SZ sa UK i UB, dok značajna razlika nije utvrđena između lokaliteta UK i UB. Povećana učestalost IRR na lokalitetima UK i UB koji su pod većim pritiskom zagađenja u skladu je sa studijama u kojima je ispitivan uticaj otpadnih voda na učestalost pojave MN i IRR u tkivima riba (Smith, 1990; Talapatra i Banerjee, 2007).

Primenom Pearson testa nije utvrđena statistički značajna korelacija između između vijabilnosti i učestalosti IRR ($r = -0,33$, $p = 0,13$). Slični rezultati su dobijeni i u studijama sliva Velike Morave i Dunava, ukazujući da detektovani IRR nisu posledica apoptoze ćelija.

Tabela 4.45. Učestalost IRR (‰) u ćelijama krvi uklija (srednja vrednost \pm SE); različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta (korišćeni testovi: one-way ANOVA i Tukey's post-hoc; $p < 0,05$).

Lokaliteti	IRR (‰)
SZ	$2,12 \pm 0,58^a$
UK	$4,86 \pm 1,08^b$
UB	$8,18 \pm 1,38^b$

Primenom Pearson testa nije utvrđena statistički značajna korelacija između parametara TI % i MN ($r = 0,09$, $p = 0,68$), a slični rezultati su dobijeni u studiji u slivu Velike Morave, slivu Dunava i u studiji Kračun-Kolarević i sar. (2016).

4.2.3.4 Analiza akumuliranih metala i metaloida u mišiću jedinki uklija

U tabeli 4.16 prikazane su koncentracije metala i metaloida u mišiću jedinki uklija za koje su propisane MDK vrednosti. Koncentracije svih ispitivanih elemenata bile su ispod MDK vrednosti (European Commission, 2006; „Službeni glasnik RS” broj 29/2014). Zbog male veličine uzorka (za svaki lokalitet urađena su analize dva poduzorka) podaci o koncentracijama elemenata nisu statistički obrađene. U Prilogu 2, u tabeli 6, prikazane su koncentracije 14 metala i metaloida koji su analizirani u mišiću uklija. Elementi Al, As i Co nisu detektovani u jedinkama ispitivanih lokaliteta.

MPI indeks je izračunat kako bi se izvršilo poređenje u ukupnom sadržaju metala i metaloida u mišićima jedinki. Prema ovom indeksu, najveći nivo zagađenja metalima je zabeležen u jedinkama sa lokaliteta UB (0,044), a za lokalitete SZ i UK dobijene su gotovo dvostruko niže vrednosti u odnosu na UB (Prilog 2, tabela 6).

Tabela 4.16. Pregled propisanih MDK vrednosti i detektovanih koncentracija metala i metaloida u mišiću jedinki uklija izraženih u mg/kg wbc (srednja vrednost \pm SE); n.d. – nije detektovano u uzorku.

Koncentracija (mg/kg wbc)	MDK (mg/kg wbc)	Lokaliteti		
		SZ	UK	UB
As	2	n.d.	n.d.	n.d.
Cd	0,05	0,014 \pm 0,004	0,004 \pm 0,001	0,003 \pm 0,000
Cu	30	0,342 \pm 0,039	0,360 \pm 0,025	0,453 \pm 0,003
Fe	30	3,130 \pm 0,029	3,192 \pm 0,080	3,574 \pm 0,079
Hg	0,5	0,009 \pm 0,009	0,039 \pm 0,019	0,050 \pm 0,008
Pb	0,3	0,032 \pm 0,011	0,038 \pm 0,022	0,025 \pm 0,005
Zn	100	12,908 \pm 0,879	14,078 \pm 0,819	14,740 \pm 0,312

* n.d. – nije detektovano

Akumulacija metala i metaloida u tkivima ove vrste riba zavisi od koncentracija ovih elemenata u vodenoj sredini, ali i od fizičko-hemijskih i hemijskih karakteristika vode i fiziološkog stanja ribe. Iz tog razloga nije iznenađujuće što su u uklijama zabeležene niske koncentracije većine metala i metaloida, uprkos tome što su ovi elementi, prema podacima iz baze GZZJZ Beograd, u vodenom stubu bili prisutni u visokim koncentracijama. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Yi i Zhang (2012), u kojoj takođe nije pronađena direktna uzročno-posledična veza između koncentracije metala i metaloida u tkivima i u vodi. Kada se uporede MPI vrednosti iz studije sliva Velike Morave i Save, uočava se da su dobijene veće MPI vrednosti u studiji sliva Velike Morave, u kojoj su korišćene čitave jedinke za određivanje koncentracije metala i metaloida, u odnosu MPI vrednosti iz studije sliva Save, u kojoj je korišćeno samo mišićno tkivo. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijama Eneji i sar. (2011) i Maurya i Malik (2019) u kojima je pokazano da se metali i metaloidi akumuliraju u različitim koncentracijama u organima. Generalno, škrge i jetra se pokazuju veći afinitet za akumulacijom većine metala i metaloida u odnosu na mišić (Yilmaz i sar., 2007; Kostić-Vuković, 2018). Samim tim, nije iznenađujuće zašto su u mišićnom tkivu detektovane niže koncentracije metala i metaloida u odnosu na one u homogenatu jedinki koji je analiziran u studijama Kolarević i sar. (2016a), Milošković i sar. (2018), kao i u studiji na slivu Velike Morave (Jovanović i sar., 2018). Međutim, zbog značaja u ljudskoj ishrani mišićno tkivo se često koristi u istraživanjima za procenu uticaja zagađenja metalima i metaloidima (Shinn i sar., 2009; Korkmaz i sar., 2019).

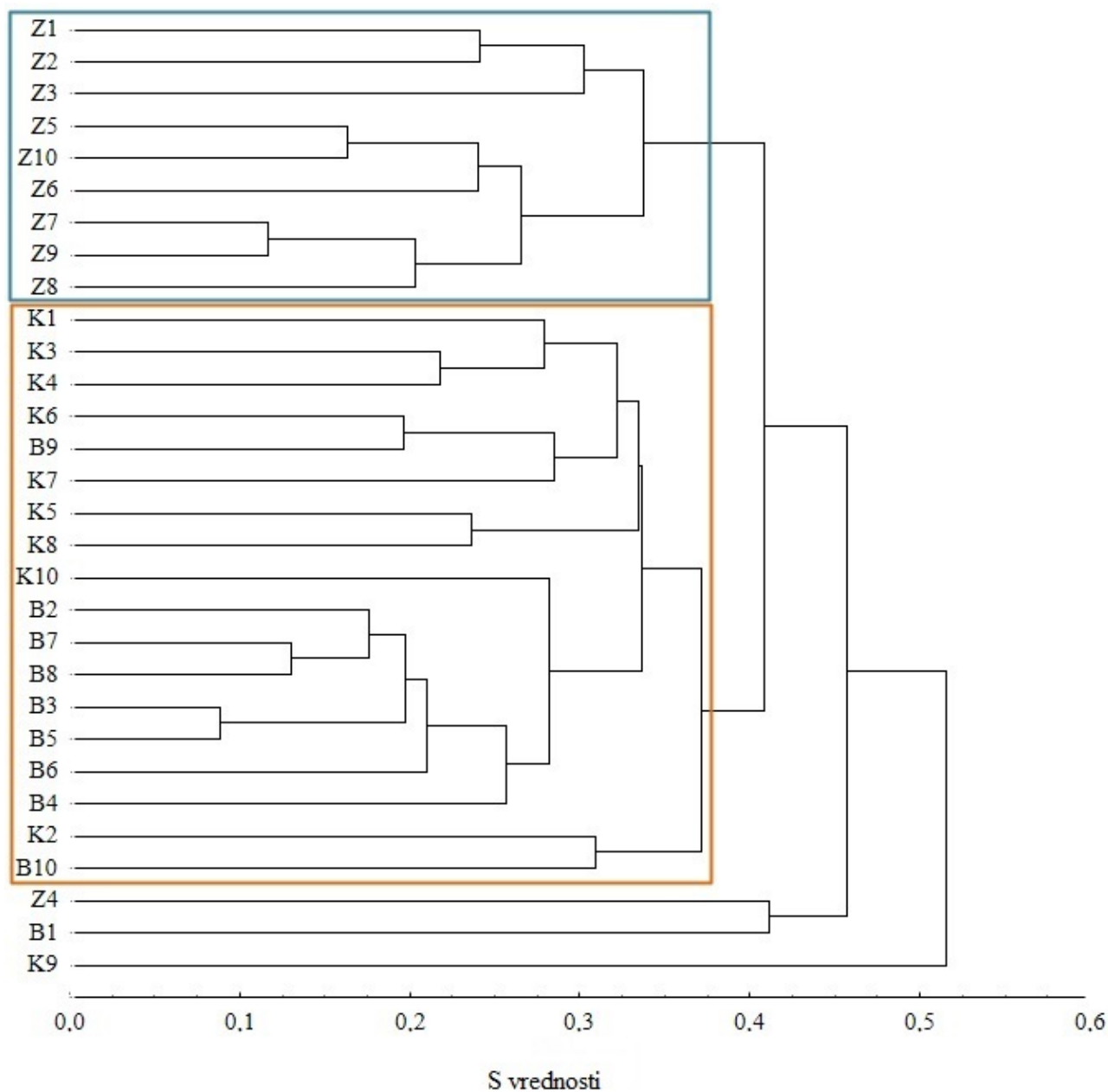
4.2.3.5 RAPD analiza

Na osnovu odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm (1,75 – 1,96) utvrđeno je da su uzorci čisti, odnosno da sadrže isključivo DNK molekule (Prilog 2, tabela 7).

U zavisnosti od sekvence prajmera, umnožen je različit broj fragmenata. Prajmerom I umnoženo je 58, prajmerom II 57, prajmerom III 109, prajmerom IV 90, prajmerom V 94 i prajmerom VI 153 fragmenta (Prilog 2, slika 1).

Prosečne S vrednosti za sve prajmere koje su dobijene poređenjem jedinki sa sva tri lokaliteta iskorišćene su za konstrukciju filogenetskog stabla UPGMA metodom. Kao što je prikazano na slici 4.9., mogu se uočiti dve glavne klade (grane) filogenetskog stabla. Jedinka K9 je izdvojena na jednoj kladi, dok su ostale jedinke podeljene na dve klade, gde se može uočiti izdvajanje jedinki B1 i Z4 u odnosu na ostale jedinke. Dalje, možemo uočiti grupisanje najvećeg

broja jedinki sa lokaliteta SZ (jedinke Z1, Z2, Z3, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9 i Z10) dok su u okviru druge klade grupisane jedinice sa lokaliteta UK i UB (jedinke K1, K2, K3, K4, K7, K8, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 i B10).



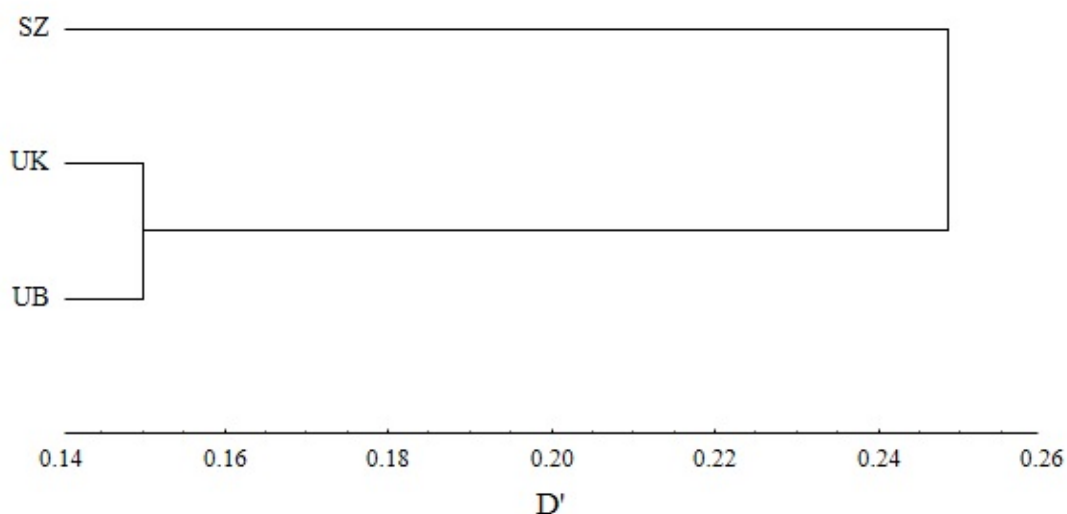
Slika 4.9. Filogenetsko stablo konstruisano primenom UPGMA metode na osnovu prosečnih S vrednosti između jedinki.

Varijacija u S vrednostima između jedinki istog lokaliteta prikazana je u tabeli 4.17. Najniža vrednost ovog indeksa, odnosno najniži stepen sličnosti je dobijena za jedinice sa lokaliteta UK, dok su približne vrednosti dobijene za lokalitete SZ i UB. Poređenjem S vrednosti između jedinki sa različitih lokaliteta (S_{ij} indeks) najveći stepen sličnosti je dobijen za jedinice sa UK i UB, dok je najniža vrednost S_{ij} indeksa dobijena za jedinice sa SZ i UB.

Tabela 4.17. Prosečna sličnost jedinki u okviru istog lokaliteta (S indeks) dobijena na osnovu S vrednosti šest prajmera i prosečna sličnost između jedinki sa različitim lokaliteta (S_{ij} indeks) dobijena na osnovu S_{ij} vrednosti šest prajmera.

Prajmer/Lokalitet	S indeks u okviru lokaliteta (S)			S indeks između lokaliteta (S_{ij})		
	SZ	UK	UB	SZ/UK	SZ/UB	UK/UB
I	0,87	0,85	0,87	0,97	0,82	0,82
II	0,64	0,76	0,67	0,91	0,89	0,94
III	0,81	0,65	0,67	0,87	0,94	0,87
IV	0,76	0,68	0,89	0,97	0,96	0,92
V	0,62	0,59	0,63	0,69	0,70	0,92
VI	0,73	0,71	0,91	0,79	0,71	0,83
Sr. vrednost \pm SE	0,74 \pm 0,05	0,71 \pm 0,05	0,77 \pm 0,06	0,88 \pm 0,05	0,71 \pm 0,05	0,84 \pm 0,03

Da bi se utvrdio odnos između lokaliteta konstruisano je filogenetsko stablo na osnovu vrednosti distance (D') koja je dobijena uzimajući u obzir prosečne S'_{ij} vrednosti (vrednosti sličnosti između različitih lokaliteta) i prosečne S vrednosti unutar lokaliteta (Slika 4.10). Na osnovu filogenetskog stabla uočava se izdvajanje jedinki sa lokaliteta SZ u odnosu na jedinke UK i UB.

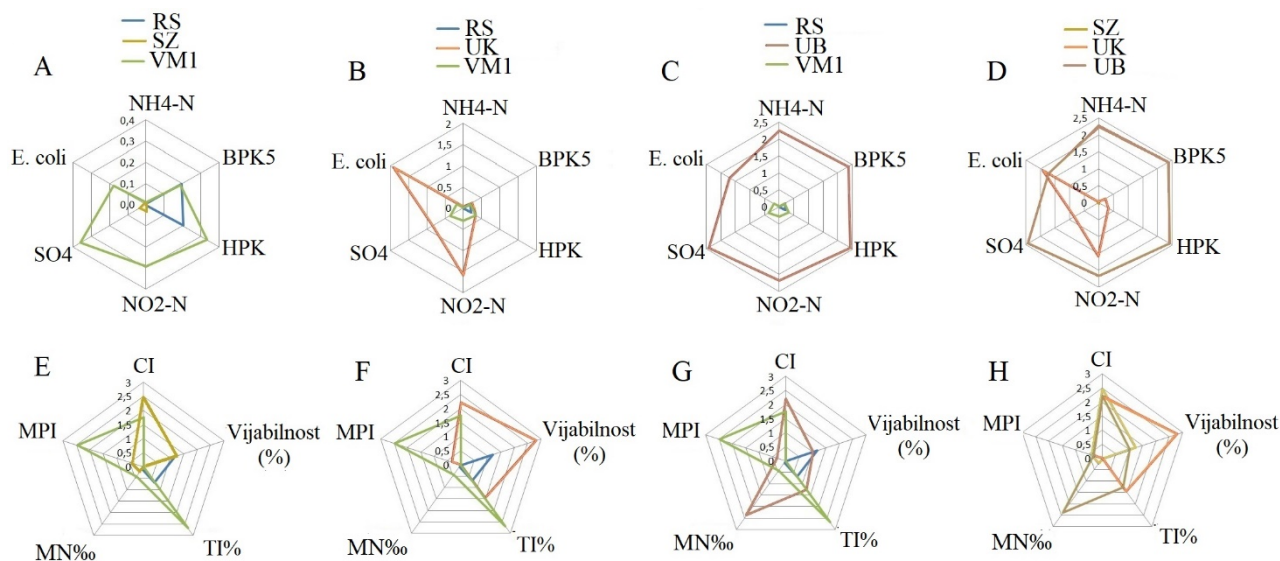


Slika 4.10. Filogenetsko stablo konstruisano primenom UPGMA metode na osnovu D' vrednosti između lokaliteta.

Na osnovu RAPD analize lokaliteta su razdvojeni na sličan način kao u slučaju alkalnog komet testa. Rezultati oba testa diskriminirali su lokalitete UK i UB od SZ. Prema podacima GZZJZ Beograd, lokaliteta UK i UB su pod značajnim pritiscima zagađenja, zbog čega se može pretpostaviti da dobijena sličnost/razlike između jedinki sa ova dva lokaliteta i SZ mogu biti posledica različitog pritiska zagađenja. Prema rezultatima studija Atienzar i Jha, (2006) i Jin i sar. (2009) utvrđeno je da prisustvo/odsustvo fragmenata u RAPD profilima može biti posledica jednolančanih i/ili dvolančanih prekida. S obzirom da se ovakav tip DNK oštećenja detektuje i u alkalnom komet testu, nije iznenađujuće što su dobijeni slični rezultati u ova dva testa.

4.2.3.6 IPBR i IBR analiza

Prema podacima monitoringa (GZZJZ Beograd), lokaliteti UK i UB su pod pritiskom organskog zagađenja koje potiče iz otpadnih voda. Iz tog razloga, rangiranje lokaliteta na osnovu IPBR obuhvatilo je rezultate prosečnih vrednosti parametara: BPK₅, HPK (KMnO₄), koncentracija nitrita (NO₂⁻/N), sulfata (SO₄⁻²), amonijačni azot (NH₄-N), *E. coli* MPN (Slika 4.11 A-D). Pored tri ispitivana lokaliteta, IPBR i IBR analize su obuhvatile i referentni lokalitet RS i lokalitet VM1 iz istraživanja u slivu Velike Morave. Najniža IPBR vrednost je dobijena za lokalitet SZ (0,002) dok je najviša zabeležena za lokalitet UB (29,652) (Tabela 4.18). Dominantan uticaj organskog zagađenja dobijen je za lokalitete UK i UB, za koje su pokazane su više IPBR vrednosti u odnosu na lokalitet VM1 (0,332), na kome je potvrđen veliki pritisak zagađenja (Slika 4.11. A-D).



Slika 4.11. Grafički prikaz IPBR (A-D) i IBR (E-H) površina.

Tabela 4.18. IPBR i IBR vrednosti dobijene na osnovu standardizovanih parametara.

	RS	SZ	UK	UB	VM1
IPBR	0,040	0,002	3,641	29,652	0,332
IBR	0,858	4,179	10,978	8,087	6,532

Na osnovu grafičkog IBR prikaza može se uočiti je odgovor biomarkera specifičan za lokalitet (Slika 4.9 E-H). Za lokalitet SZ povećanju površine IBR dijagrama najviše su doprineli kondicioni indeks i vijabilnost, za lokalitet UK, pored vijabilnosti ćelija krvi i kondicionog indeksa, parametar TI %, a za lokalitet UB na povećanje površine IBR dijagrama najviše su uticali kondicioni indeks, vijabilnost, TI % i učestalost MN. U poređenju sa lokalitetom RS, za sva tri ispitivana lokaliteta su dobijene više IBR vrednosti (Tabela 4.18), što ukazuje da, iako je na lokalitetu SZ zabeležen najniži nivo DNK oštećenja u alkalnom komet i mikronukleus testu, kondicioni indeks i vijabilnost mogu biti indikatori narušenog fiziološkog statusa uklija sa ovog lokaliteta. Sa druge strane, lokaliteti UK i UB su imali više IBR vrednosti i u odnosu na lokalitet VM1.

Poređenjem između tri ispitivana lokaliteta, SZ je imao najniže IBR i IPBR vrednosti, dok je najviša IPBR vrednost zabeležena za lokalitet UB, a IBR vrednost za lokalitet UK. Pearson korelacionom analizom nije utvrđena značajna korelacija između IPBR i IBR vrednosti ($r = 0,38$; $p = 0,53$). Odsustvo korelacije između ova dva indeksa ukazuje da su na odgovor biomarkera uticali i

agensi koji nisu poreklom iz otpadnih voda. Na osnovu podataka monitoringa, na lokalitetima su detektovani i pesticidi, među kojima se nalaze i genotoksična jedinjenja, koja su takođe mogla da doprinesu u povećanju odgovora biomarkera.

Prema Baudou i sar. (2019), IBR vrednosti mogu se tumačiti kao jedinstven odgovor biomarkera na sredinsko zagađenje. U skladu sa tim, u našoj studiji najviša IBR vrednost dobijena je za lokalitet UK, što može ukazati na najveći nivo zagađenja genotoksičnih agenasa na ovom lokalitetu, u odnosu na SZ i UB. Međutim, na osnovu IBR vrednosti i lokalitet UB je pod većim pritiskom zagađenja u odnosu na SZ. Ovi rezultati su u skladu i sa podacima GZZJZ Beograd i SumTU vrednostima prema kojima je takođe potvrđeno da je SZ pod najmanjim pritiskom zagađenja u odnosu na ostala dva lokaliteta.

U skladu sa tim možemo zaključiti da su lokaliteti UK i UB pod značajnim pritiskom zagađenja, što je potvrđeno na osnovu podataka dobijenih tokom monitoringa koje je sproveo GZZJZ Beograd i SumTU vrednosti.

U ovom istraživanju, IPBR vrednosti ukazale su na značajano narušavanje kvaliteta vode na UK i UB usled uticaja otpadnih voda Obrenovca i naselja Barič, a na osnovu visokih koncentracija parametara BPK₅, HPK (KMnO₄), nitrita, sulfata, amonijačnog azota, i MPN *E. coli*.

Uzimajući u obzir sve rezultate ove studije, jasno se uočava izdvajanje lokaliteta na Savi koji je pod najnižim uticajem zagađenja u odnosu na lokalitete koji trpe visoke pritiske zagađenja. Kao i u studiji sliva Velike Morave, i u ovoj studiji su hemijske analize vode, kao i analize mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja, ukazale da najveći uticaj na narušavanje kvaliteta vode imaju komunalne i industrijske vode. Imajući u vidu male protoke Kolubare i Baričke reke, visok stepen zagađenja ovih vodotokova može negativno uticati na akvatične organizme i dovesti do narušavanja ekosistema.

U studiji Williams (1965) utvrđeno je da uklije imaju relativno mali areal kretanja. Prema navedenoj studiji, 57 % uklija koje su obeležene na lokalitetima na Temzi ponovo su uhvaćene nakon sedam nedelja na udaljenosti do 225 m u odnosu na prvo uzorkovanje. Dobijeni rezultati ukazali su da uklija može biti dobar bioindikator i da praćenje odgovora biomarkera može biti specifičan za lokalitet, a ne samo za određeni sektor reke, što je potvrđeno u studiji sliva Save. Prema našim saznanjima, studija u slivu Save je prvo ekogenotoksikološko istraživanje u kome je pokazano da uklija može biti pouzdan bioindikator u diskriminaciji prostorno bliskih lokaliteta koji su pod različitim uticajem zagađenja.

U *in silico* analizi potvrđen je pritisak toksičnih i genotoksičnih agenasa na lokalitetima, što je pokazano dobijanjem visokih SumTU vrednosti. Odgovori biomarkera u *in vivo* istraživanju pokazali su da su specifični i da zavise od pritiska zagađenja na lokalitetima. Takođe, u ovoj studiji je, prema našim saznanjima, prvi put primenjena IPBR analiza koja je objedinila pojedinačna merenja hemijskih parametara i mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja koji ukazuju na uticaj komunalnih otpadnih voda na narušavanje kvaliteta vode. Ovaj integrisani pristup, kao i IBR analiza omogućili su lakše poređenje ispitivanih lokaliteta.

4.3 Istraživanje sliva Dunava

Istraživanje sliva Dunava sprovedeno je u okviru međunarodne ekspedicije JDS4 u julu 2019. godine i obuhvatilo je šest lokaliteta na Dunavu i njegovim pritokama. Na Tisi je odabran jedan lokalitet (kod Titela, JDS33), na Savi dva lokaliteta (Jamena - JDS35, Makiš - JDS36), a na Dunavu tri lokaliteta (nizvodno od Pančeva - JDS37, kod Rama - JDS40 i kod Radujevca - JDS41). Analizom podataka hemijskih i fizičko-hemijskih parametara nadzornog monitoringa (SEPA) utvrđeno je da su svi ispitivani lokaliteti pod određenim stepenom zagađenja. Iz tog razloga, kao i u

slučaju prethodne dve studije, podaci hemijskih parametara iz 2015. godine za lokalitet na Savi uzvodno od Šapca (RS) korišćeni su kao referentni u proceni stepena zagađenja.

4.3.1 Analiza fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode na lokalitetima u slivu Dunava

4.3.1.1 Fizičko-hemijski parametri

U tabeli 4.19 prikazane su vrednosti osnovnih fizičko-hemijskih parametara izmerenih u trenutku uzorkovanja jedinki uklija. Najniža temperatura vode je zabeležena na lokalitetu JDS40 (25,4 °C), a najviša je izmerena na lokalitetu JDS36 (27 °C). Najniža vrednost elektroprovodljivosti zabeležena je na lokalitetu JDS41 (358 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dok je najviša vrednost detektovana na lokalitetu JDS35 (562 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Najniže vrednosti ukupnih rastvorenih čestica (eng. *total dissolved solids*, TDS) su zabeležene na lokalitetima JDS37 i JDS40 (181 ppm), dok je najviša vrednost zabeležena na lokalitetu JDS35 (282 ppm). Vrednosti pH na svim lokalitetima su bile blago alkalne i nisu značajno varirale između lokaliteta. Najniža koncentracija rastvorenog kiseonika je zabeležena na lokalitetu JDS33 (5,9 mg/l), dok je najviša detektovana na lokalitetu JDS40 (7,6 mg/l).

Prema izmerenim pH vrednostima i koncentracijama rastvorenog kiseonika u trenutku uzorkovanja, lokaliteti JDS35, JDS40 i JDS41 pripadali su klasi II kvaliteta vode (ocena ekološkog statusa - dobar), dok su lokaliteti JDS33, JDS36, JDS37 pripadali klasi III (ocena ekološkog statusa - umeren) („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Prema RHMZ podacima za 2019. godinu, prosečne vrednosti vodostaja u julu su varirale između lokaliteta (Tabela 4.19). Najniži vodostaj zabeležen je na lokalitetu JDS41 (134 cm), a najviši na lokalitetu JDS40 (688 cm). Uzimajući u obzir višegodišnji prosek, vodostaj na svim lokalitetima u julu 2019. godine je bio niži u odnosu na prosečne vrednosti za ovaj period.

Tabela 4.19. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara merenih u trenutku uzorkovanja i prosečni vodostaji za jul 2019. godine (podaci preuzeti od RHMZ).

Lokaliteti		T (°C)	Elektroprovodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	TDS (ppm)	pH	O ₂ (mg/l)	Vodostaj (RHMZ) (cm)
Tisa	JDS33	26,2	438	218	7,83	5,9	193
Sava	JDS35	26,5	562	282	7,87	7,2	257
	JDS36	27	425	212	7,95	5,7	215
	JDS37	26,3	370	181	7,94	6,1	288
Dunav	JDS40	25,4	364	181	8,02	7,6	688
	JDS41	25,7	358	192	7,41	7,8	134

4.3.1.2 *In silico* analiza

4.3.1.2.1 Analiza podataka nadzornog monitoringa

In silico analiza obuhvatila je podatke monitoringa (SEPA) iz 2018. godine, zatim podatke analize LVSPE uzoraka i analize akumuliranih prioriternih supstanci u uklijama koji su preuzeti iz baze podataka NORMAN udruženja.

Podaci 68 fizičko-hemijskih i hemijskih parametara koji su praćeni na lokalitetima tokom 2018. godine preuzetih iz baze SEPA dati su u Prilogu 3, u tabeli 1. Prema koncentracijama nitrata i hlorida, svi lokaliteti pripadali su klasi I kvaliteta voda (ocena ekološkog statusa – odličan), na osnovu pH vrednosti svi lokaliteti pripadali su klasi I, izuzev JDS37 i JDS40 koji su pripadali klasi II kvaliteta (ocena ekološkog statusa – dobar), zatim na osnovu koncentracija TOC, amonijum jona, ortofosfata i ukupnog fosfora svi lokaliteti su pripadali klasi II kvaliteta, a koncentracije rastvorenog kiseonika na lokalitetima JDS35, JDS36 i JDS41 ukazale su na klasu II kvaliteta, dok su za lokalitete JDS33, JDS37 i JDS40 ukazale na klasu III kvaliteta površinskih voda (ocena ekološkog statusa – umeren). Uzimajući u obzir koncentracije svih parametara, lokaliteti JDS35, JDS36 i JDS41 pripadali su klasi II kvaliteta površinskih voda (ocena ekološkog statusa – dobar), a lokaliteti JDS33, JDS37 i JDS40 klasi III kvaliteta voda (ocena ekološkog statusa – umeren) („Službeni glasnik RS“, 74/2011).

Na osnovu podataka hemijskih parametara koji su detektovani tokom godišnjeg monitoringa izdvajaju se tri dominantne grupe koje mogu narušiti kvalitet vode na lokalitetima: metali i metaloidi, pesticidi i organska jedinjenja. Na lokalitetu JDS33 detektovane su nekoliko puta više koncentracije Zn, Cu i Al u odnosu na većinu ostalih lokaliteta. Generalno, čitav tok Tise je pod značajnim uticajem zagađenja metalima i metaloidima usled intenzivne industrijske i poljoprivredne aktivnosti (Nguyen i sar., 2009; Sakan i sar., 2009). Lokalitet JDS33 se nalazi nizvodno od Titela u kome se nalazi fabrika za proizvodnju plastičnih masa i proizvoda od metala i fabrika za proizvodnju čamaca, tako da otpadne vode iz ovih fabrika mogu biti jedan od izvora zagađenja metalima i metaloidima. Prisustvo metala i metaloida usled industrijske i poljoprivredne aktivnosti zabeleženo je i na ostalim lokalitetima. Detektovani metali i metaloidi na lokalitetu JDS35 mogu biti posledica industrijskih otpadnih voda iz fabrika koje se nalaze 20 km uzvodno, u Brčkom (fabrika boja, mašinskih ulja, akumulatora i olovnih legura). Lokalitet JDS36 se nalazi nizvodno od pepelišta TE „Nikola Tesla“ kod Obrenovca i industrijskih postrojenja u Bariču (fabrika automobilskih delova i hemijske industrije), te je njihov uticaj mogao da se odrazi i na prisustvo metala i metaloida na ovom lokalitetu. Na lokalitetu JDS37 detektovane su povišene koncentracije Cr i Al u odnosu na većinu ispitivanih lokalita. S obzirom da se nalazi nizvodno od industrijskih postrojenja u Pančevu (proizvodnju petrohemijskih proizvoda i hemikalija, preradu nafte, za proizvodnju veštačkog đubriva i metaloindustrija) metali i metaloidi mogu biti posledica otpadnih voda iz ovih fabrika (Nadal i sar., 2004). Takođe, na lokalitetu JDS40 zabeležene su više koncentracije Al i Zn u odnosu na većinu lokaliteta. Ovaj lokalitet se nalazi nizvodno od TE i pepelišta „Kostolac“, koji su jedan od najvećih izvora zagađenja ovog dela Srbije. Spiranjem pepelišta i okolnog zemljišta u vodenu sredinu mogu dospeti metali i metaloidi poput Al, Ca, Fe, Zn, Mn (Kermer i sar., 2017), a uticaj ovog izvora zagađenja je mogao da se odrazi i na kvalitet vode na lokalitetu JDS40.

Iako postoje indicije da na zagađenje metalima i metaloidima utiču otpadne vode iz postrojenja u blizini lokaliteta, važno je naglasiti da su sve koncentracije ovih elemenata bile ispod propisanih graničnih vrednosti („Službeni glasnik RS“ 67/20011, 48/2012, 1/2016).

Na svim lokalitetima su detektovani nitrati, nitriti, ukupni azot, ortofosfati i ukupni fosfor. Značajan udeo ovih jedinjenja na lokalitetima JDS33, JDS35, JDS36 i JDS37 najverovatnije potiče iz komunalnih otpadnih voda naselja koja se nalaze u neposrednoj blizini lokaliteta (Titel - 5.000 stanovnika, Brčko – 34.000 stanovnika, Ostružnica – 4.000 stanovnika, Pančevo – 77.000 stanovnika). Sa druge strane, za lokalitet JDS40 može se pretpostaviti da zagađenje navedenim jedinjenjima potiče iz seoskih domaćinstava i sredstava koja se koriste u poljoprivredi. Lokalitet JDS41 nalazi se nizvodno od Prahova u kome se nalazi fabrika za proizvodnju mineralnih đubriva, te detektovana organska jedinjenja mogu biti posledica uticaja otpadnih voda iz ove fabrike. Međutim, kao i u slučaju metala i metaloida, i koncentracije navedenih parametara nisu prevazilazile propisane granične vrednosti („Službeni glasnik RS“ 67/20011, 48/2012, 1/2016).

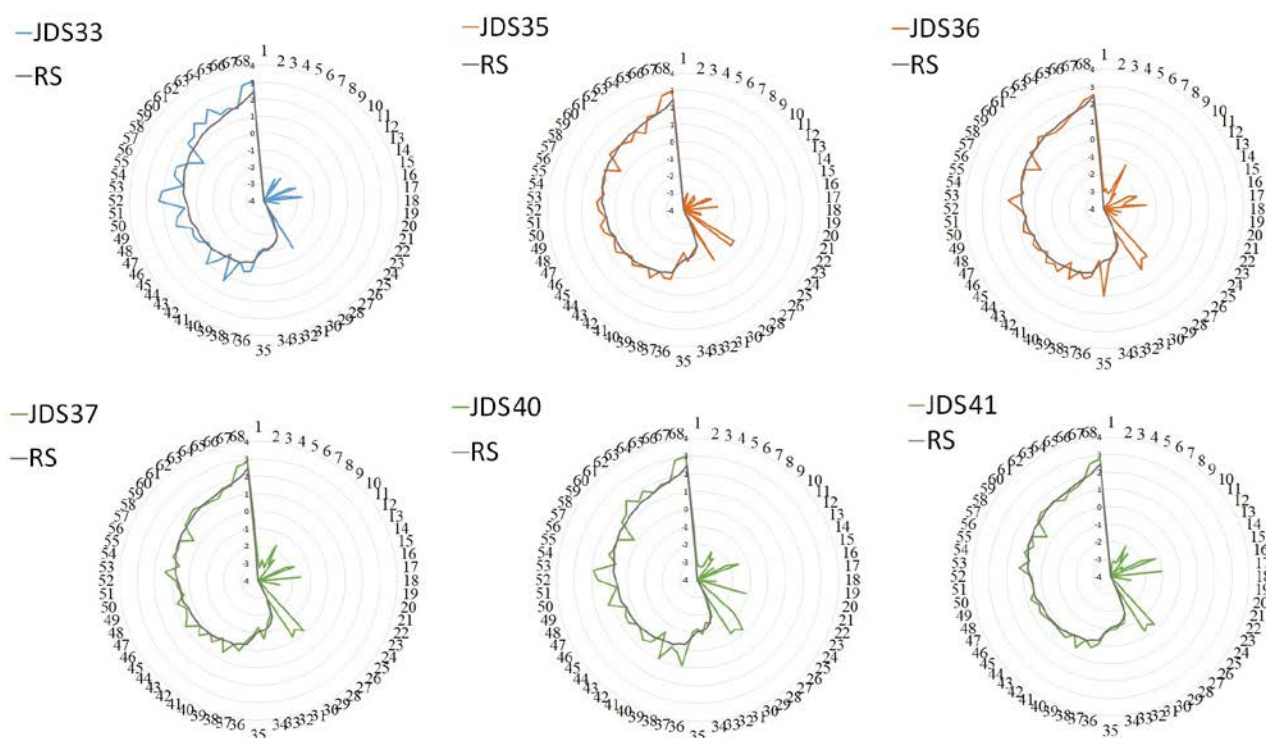
Herbicidi atrazin, desetilterbutilazin, terbutilazin, metolahlor i izoproturon detektovani su na svim lokalitetima, što ukazuje da je u blizini svih lokaliteta prisutna poljoprivredna aktivnost

(Leonard, 1990). Ipak, za najveći broj ovih jedinjenja najviše koncentracije su zabeležene na lokalitetima JDS40 i JDS41, što nije iznenađujuće s obzirom da se nalaze u ruralnim oblastima (Ram i Radujevac).

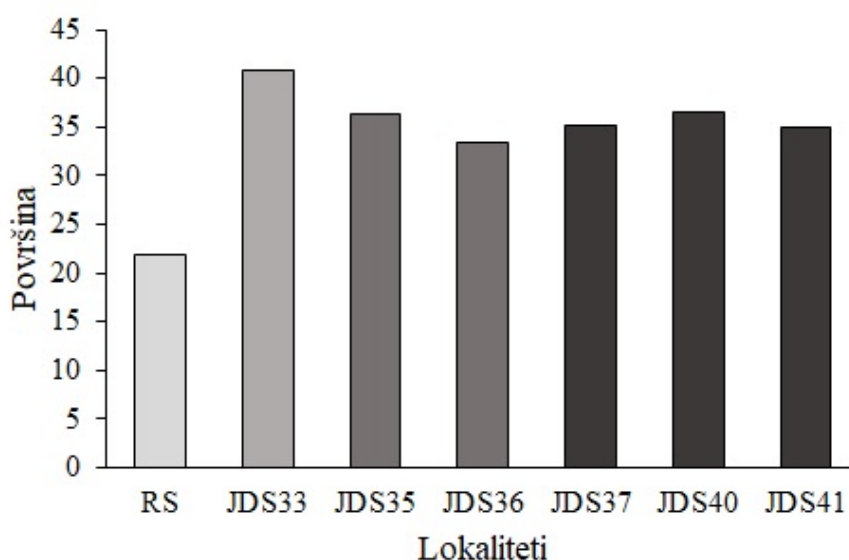
Podaci monitoringa (SEPA) ukazuju da su svi ispitivani lokaliteti pod većim ili manjim pritiskom zagađenja, te je bilo neophodno pronaći odgovarajući kontrolni, odnosno lokalitet koji ispunjava osobine „referentnog uslova“ (Stoddard i sar., 2006). S obzirom da se lokalitet RS iz studije Kolarević i sar. (2016a) pokazao kao odgovarajući referentni u studiji u slivu Velike Morave, odabran je i u ovom istraživanju kao kontrolni lokalitet za procenu stepena zagađenja. U skladu sa tim, za lokalitet RS preuzeti su podaci monitoringa za 2015. godinu (SEPA), korišćeni i u studiji u slivu Velike Morave i Save.

Na slici 4.12 dat je grafički prikaz poređenja logaritmovanih vrednosti 68 parametara sa lokaliteta RS i ispitivanih lokaliteta u slivu Dunava. Podaci za lokalitet RS su organizovani prema rastućem trendu da bi se lakše uočile razlike. Niske koncentracije su zabeležene za parametre 1-22, među kojima se nalaze i prioritetne supstance (Hg, Cd, Ni, Pb, atrazin, fluoranten, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, diuron, simazin, izoproturon). Za data 22 parametra koncentracije na lokalitetu RS su bile ispod limita detekcije analitičkog uređaja. Najveći broj pomenutih parametara praćenih tokom 2018. godine je detektovano na lokalitetu JDS40 (15), dok je najmanji broj detektovan na lokalitetu JDS33 (9). U slučaju lokaliteta JDS35, za najveći broj parametara 1-22 koncentracije su bile niže u odnosu na one koje su detektovane na ostalim lokalitetima u slivu Dunava.

Poređenjem površina radijalnih dijagrama uočena je razlika između referentnog, RS lokaliteta, i lokaliteta u slivu Dunava (Slika 4.13). Ukoliko se uporede površine dijagrama lokaliteta u slivu Dunava, najviša vrednost je dobijena za lokalitet JDS33, a najniža za JDS36. Na lokalitetu JDS33 detektovane su najviše koncentracije velikog broja hemijskih parametara (pre svega metala i metaloida), što ukazuje na visok pritisak zagađenja, dok su na JDS36 zabeležene najniže koncentracije za najveći broj hemijskih parametara (Prilog 3, tabela 1).



Slika 4.12. Poređenje koncentracija 68 hemijskih parametara dobijenih na lokalitetu na Savi (RS) i lokalitetima u slivu Dunava (podaci preuzeti od SEPA).



Slika 4.13. Površina radijalnih dijagrama prikazanih na slici 4.12. Veća površina ukazuje na veći stepen zagađenosti lokaliteta.

4.3.1.2.2 Analiza podataka iz NORMAN baze

Hemijska analiza LVSPE uzoraka obuhvatila je detekciju 2.239 polarnih i semipolarnih jedinjenja koja spadaju u grupu novosintetisanih zagađujućih supstanci koje nisu uključene u redovan nadzorni monitoring. Na lokalitetu JDS33 detektovano je 44 jedinjenja, na JDS35 49 jedinjenja, dok je na JDS36 detektovano 36. Na lokalitetima na Dunavu detektovana su 42 jedinjenja na lokalitetima JDS37 i JDS40, odnosno 41 na lokalitetu JDS41. Na svim ispitivanim lokalitetima uočeno je dominantno prisustvo pesticida (herbicidi, fungicidi, insekticidi), njihovih metaboličkih produkata, kao i različitih farmaceutika (lekovi za regulisanje krvnog pritiska, antidepresivi, antiepileptici, itd.) (Tabela 4.20). Preko 40 % detektovanih jedinjenja na lokalitetima JDS33, JDS36, JDS40 i JDS41 su iz grupe pesticida, što ukazuje na poljoprivrednu aktivnost u njihovoj blizini. Sa druge strane, farmaceutici, antibiotici i njihovi metabolički produkti ukazuju na upliv komunalnih otpadnih voda u površinske vode (Daughton i Ternes, 1999). Najveći broj jedinjenja koji se koriste u industriji ili su produkti industrijskog procesa (ulaze u sastav boja, lakova, koriste se u procesima obrade metala, plastifikatori, itd.) je detektovano na lokalitetima na Dunavu, JDS37 i JDS41, što ukazuje na direktni uticaj industrije na ove lokalitete.

Tabela 4.20. Prikaz zastupljenosti detektovanih jedinjenja prema nameni na ispitivanim lokalitetima u slivu Dunava.

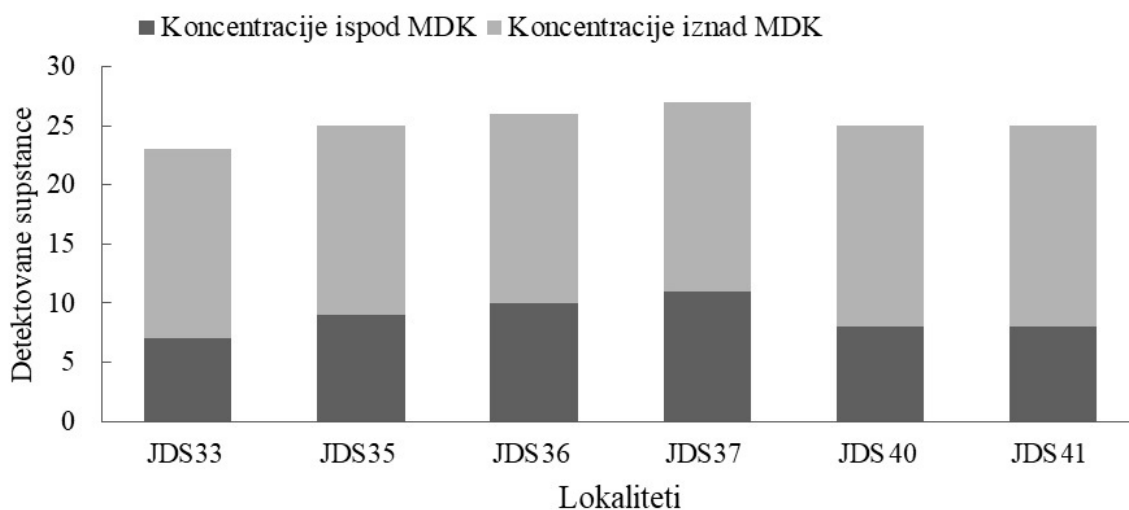
	Lokaliteti	Pesticidi (%)	Industrija (%)	Farmaceutici (%)	Antibiotici (%)	Ostalo (%)
Tisa	JDS33	43,18	18,18	27,27	9,09	2,27
	JDS35	33,33	18,45	31,25	10,42	6,25
Sava	JDS36	44,44	16,67	27,78	8,33	2,78
	JDS37	38,09	19,05	23,81	11,90	7,14
Dunav	JDS40	45,23	16,67	26,19	9,52	2,38
	JDS41	41,46	19,51	29,27	9,76	0

S obzirom da su LVSPE uzorci koncentrisani 25.000 x, omogućena je detekcija polarnih i semipolarnih jedinjenja koji se u vodenoj sredini nalaze u niskim koncentracijama (najčešće ng/l), te da zbog ograničenja dostupnosti novih analitičkih uređaja sa visokom osetljivošću, ona

najverovatnije ne bi mogla biti detektovana tokom nadzornog monitoringa u nativnim uzorcima vode. Dobijeni set podataka o prisustvu ksenobiotika u ng/l i µg/l koncentracijama omogućilo je potpuniji uvid u izvore, kao i stepen zagađenja lokaliteta. Komparacijom seta podataka hemijskih parametara dobijenih tokom nacionalnog monitoringa i podataka dobijenih hemijskom analizom LVSPE uzoraka uočeno je da se, u zavisnosti od veličine seta podataka i raznovrsnosti praćenih hemijskih grupa, mogu prevideti ili, sa druge strane, jasnije identifikovati pritisci zagađenja različitih hemijskih agenasa na lokalitetima.

Za razliku od nadzornog monitoringa gde se analizira manji broj agrotehničkih proizvoda (atrazin, simazin, terbutrin, desetilatrazin, propazin, desetilterbutilazin, terbutilazin, desizoprilatrazin, acetohlor, metalohlor, metalohlor, izoproturon), analiza LVSPE uzoraka pokazala je prisustvo velikog broja pesticida na lokalitetima (ukupno 30 različitih pesticida i njihovih produkata metabolizma), ukazujući na prisustvo velikog broja pesticida na lokalitetima. Bitna grupa hemijskih agenasa sa stanovišta eko/genotoksikologije su farmaceutici pošto mogu nespecifično delovati i na organizme koji nisu ciljni i to u niskim genotoksičnim koncentracijama. Farmaceutici poput azitromicina, karbamazepina, bromazepama i tiagabina, koji nisu obuhvaćeni nacionalnim nadzornim monitoringom, a detektovani su u LVSPE uzorcima, mogu uzrokovati oksidativni stres, hormonski disbalans i promena u ponašanju u akvatičnim organizmima usled njihovog izlaganja subtoksičnim koncentracijama (Berghmans i sar., 2007; Li i sar., 2011; Shiogiri i sar., 2017; Cunha i sar., 2019). Takođe, na lokalitetima su bila prisutna jedinjenja koja se koriste u različitim granama industrije (perfluorooktan sulfoniska kiselina (PFOS), derivati 1-feniletil i benzotiazola, itd.) za koje je utvrđeno da mogu, i pri niskim koncentracijama, dovesti do narušavanja integriteta DNK molekula različitih grupa organizama (Shi i sar., 2008; Irving i Elfarra; 2012; Sun i sar., 2012).

U okviru JDS4 ekspedicije ispitivane su i koncentracije akumuliranih prioriternih supstanci u jedinkama uklija. Prema podacima iz baze NORMAN udruženja, analize su obuhvatile organske prioritne supstance i Hg. Od ispitivanih 50 supstanci, 29 je detektovano u jedinkama na minimum jednom lokalitetu. Kako bi se utvrdio rizik akumuliranih supstanci na akvatične organizme, pre svega ribe, detektovane koncentracije ispitivanih supstanci su upoređene sa propisanim MDK vrednostima (European Commission, 2011; European Parliament & Council, 2013). Broj prioriternih supstanci koje su detektovane u jedinkama uklija je varirao (Slika 4.14). Na lokalitetu JDS33 detektovane su 23, na lokalitetu JDS35 25, zatim na JDS37 27, a u jedinkama sa lokaliteta JDS40 i JDS41 po 25 prioriternih supstanci. Pri tome, koncentracije 16 supstanci u jedinkama sa JDS33, JDS35, JDS36 i JDS37 i 17 sa lokaliteta JDS40 i JDS41 su prevazilazile propisane MDK vrednosti. Najveći broj jedinjenja za koje su zabeležene povišene koncentracije pripadaju grupi PCB jedinjenja. Dodatno, na svim lokalitetima koncentracija Hg u jedinkama je bila nekoliko puta veća u odnosu na MDK vrednosti.



Slika 4.14. Prikaz broja detektovanih prioriternih supstanci u jedinkama uklija i prikaz broja jedinjenja čije su koncentracije iznad ispod MDK.

PCB je grupa jedinjenja koja se intenzivno koristi u industrijskim procesima (komponenta u mašinskim uljima, sastavni deo fluida za grejanje i hlađenje, plastifikatori u bojama, lakovima, proizvodnji plastike, itd.) (Godish, 2001; Grossman, 2013; Pivnenko i sar., 2016). Za mnoga od detektovanih PCB jedinjenja (PCB 28, PCB 52, PCB 105, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180) pokazano je da imaju bioakumulativnu sposobnost i toksični efekat (Borgå i sar., 2005). Posebno je zabrinjavajuće to da je većina detektovanih jedinjenja, pre svega iz grupe PCB-a i Hg, koja su u vodi na većini lokaliteta bila u koncentracijama ispod limita detekcije uređaja, u uklijama su bila prisutna u koncentracijama iznad MDK na svim lokalitetima. Razlike u koncentraciji Hg i ukupnih PCB-a u vodi (podaci iz SEPA baze podataka za 2018. godinu) i u tkivima uklija nisu iznenađujuće s obzirom da ovi agensi pokazuju bioakumulativni potencijal. Takođe, i u drugim studijama su utvrđene povišene koncentracije Hg i PCB u tkivima riba u poređenju sa koncentracijama u vodenom stubu i sedimentu (Willman i sar., 1997; Ward i sar., 2010; Ackerman i Eagles-Smith, 2010; Kidd i sar., 2012). Sa druge strane, hronično izlaganje riba i niskim koncentracijama ovih agenasa može dovesti do promena u hormonskom statusu jedinki, narušavanja imunog odgovora i indukcije oksidativnog stresa (King-Heiden i sar., 2012; Henry, 2015; Cappello i sar., 2016).

Da bi se izvršila procena ukupnog sadržaja prioriternih supstanci u tkivima uklija izračunate su OPI vrednosti (tabela 4.21). Najviša vrednost ovog indeksa zabeležena je na lokalitetu JDS37, dok su najniže OPI vrednosti dobijene za lokalitete JDS33 i JDS41.

Tabela 4.21. Prikaz OPI vrednosti dobijenih na osnovu koncentracija organskih prioriternih supstanci detektovanih u jedinkama uklija.

Lokaliteti	JDS33	JDS35	JDS36	JDS37	JDS40	JDS41
OPI	0,021	0,031	0,031	0,057	0,034	0,022

Visoka vrednost OPI indeksa za lokalitet JDS37 nije iznenađujuća s obzirom da se nalazi pod uticajem komunalnih otpadnih voda grada Pančeva, mešoviti komunalnih i industrijskih otpadnih voda dela grada Vojlovica, kao i više različitih industrija (petrohemija, azotara, industrija stakla, itd.).

4.3.1.2.3 SumTU analiza

U okviru ove studije, SumTU analiza obuhvatila je parametre koji imaju toksični potencijal a detektovani su tokom monitoringa 2018. godine (podaci preuzeti iz baze SEPA) i parametre detektovane u LVSPE uzorcima (podaci preuzeti iz udruženja NORMAN).

U Prilogu 3 (tabela 2) prikazano je 35 hemijskih parametara sa toksičnim potencijalom koji su detektovani 2018. godine tokom monitoringa (metali, metaloidi, pesticidi i organske zagađujuće supstance: PAH-ovi, PCB, bisfenol A i para-terc-oktilfenol). Podaci o najnižim PNEC vrednostima metala i metaloida preuzeti su iz ECHA baze podataka, dok su iz NORMAN baze preuzeti podaci o PNEC vrednostima organskih jedinjenja. Na osnovu koncentracija svih detektovanih hemijskih parametara i PNEC vrednosti, najviša SumTU vrednost dobijena je za lokalitet JDS33 (17,49), a najniža je zabeležena na lokalitetu JDS37 (4,84) (Tabela 4.22).

Na osnovu podataka iz baze monitoringa, broj detektovanih hemijskih parametara sa toksičnim potencijalom je varirao od 20, na lokalitetu JDS33, do 27 na lokalitetu JDS36. Najviša SumTU vrednost dobijena je za lokalitet JDS33 što ukazuje da na toksični potencijal nije značajno uticao broj detektovanih parametara već njihove koncentracije, pre svega povišene ili blizu PNEC vrednosti.

U odnosu na PNEC vrednosti, zabeležene su povišene koncentracije Zn, Cu, Mn i Ni na lokalitetu JDS33, Zn i Cr na JDS40, zatim koncentracije metoksihlor na JDS35 i JDS40 i terbutilazina na JDS41. Najniža PNEC vrednost za Zn iznosi 17 µg/l, a na lokalitetima JDS33 i JDS40 detektovane su višestruko veće koncentracije (sr. vrednost ± SE: 167,5 ± 31,48 µg/l; 42,87 ± 10,33 µg/l). PNEC vrednost za Cu iznosi 11 µg/l, za Mn 34 µg/l i Ni 6 µg/l, a na lokalitetu JDS33 prosečne koncentracije su prevazilazile ove vrednosti (20,22 ± 5,80 µg/l, 35,74 ± 3,68 µg/l, odnosno 12,23 ± 2,90 µg/l). PNEC vrednost za Cr iznosi 3,4 µg/l, a na lokalitetu JDS40 je prosečna koncentracija bila trostruko veća (9,1 ± 8,36 µg/l). Na lokalitetima JDS35 i JDS40 koncentracije metoksihlor (0,0012 ± 0,0007/0,0736 ± 0,0637 µg/l) su bile iznad PNEC vrednosti (0,00078 µg/l). PNEC vrednost za terbutilazin iznosi 0,06 µg/l, a na lokalitetu JDS41 prosečna vrednost je bila nešto viša (0,0607 ± 0,0473 µg/l).

Pored hemijskih parametara čije su koncentracije prevazilazile PNEC vrednosti, značajan doprinos toksičnom potencijalu vode na svim lokalitetima imali su metali i metaloidi čije su koncentracije bile nešto niže u odnosu na odgovarajuće PNEC vrednosti. Za lokalitet JDS33, povećanju SumTU vrednosti doprineli su Fe, Cr, Ni, Al, As, dok za JDS35, JDS36, JDS37 i JDS40 Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, As, Pb, Cd i Co, zatim za JDS41 Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, As, Pb, Cd, Fe i Co. Pored ovih elemenata, povećanju SumTU vrednosti za lokalitete JDS33 i JDS40 doprineo je terbutilazin, za lokalitet JDS35 fluoranten, za JDS36 terbutilazin, metoksihlor, metolahlor, fluoranten i bisfenol A, za lokalitet JDS37 terbutilazin i fluoranten i za JDS41 metoksihlor.

Da bi mogle da se uporede SumTU vrednosti dobijene u na osnovu podataka monitoringa i podataka hemijske analize LVSPE uzoraka, izračunate su SumTU vrednosti na osnovu koncentracija organskih jedinjenja detektovanih u okviru monitoringa. Prema podacima preuzetim iz baze SEPA za 2018. godinu, u nativnim uzorcima rečne vode sa ispitivanih lokaliteta iz sliva Dunava detektovano je prisustvo 22 organska jedinjenja (Prilog 3, tabela 2). Uzimajući u obzir prosečne koncentracije i PNEC vrednosti detektovanih jedinjenja (preuzete iz baze NORMAN udruženja) dobijene su sume toksičnih jedinica organskih jedinjenja (SumTU organska jedinjenja). Najviša vrednost ovog indeksa je dobijena za lokalitet JDS41 (2,23), dok je najniža vrednost dobijena za lokalitet JDS33 (1,07) (Tabela 4.22). Kao što je prethodno navedeno, prema podacima SEPA, na lokalitetu JDS41 uočen je dominantan uticaj zagađenja pesticidima u odnosu na ostale lokalitete, što se odrazilo i na vrednost SumTU organskih jedinjenja. Sa druge strane, na lokalitetu JDS33 izraženiji je uticaj zagađenja metalima i metaloidima.

Procena toksičnog potencijala LVSPE uzoraka vršena je i na osnovu toksičnih jedinjenja detektovanih u LVSPE uzorcima. Za 77 jedinjenja koja su detektovana u ovim uzorcima utvrđen je toksični potencijal. Broj detektovanih toksičnih jedinjenja je varirao između lokaliteta. Najveći broj je detektovan na lokalitetu JDS35 - 48, a najmanje na JDS36 - 36, što ukazuje da su na povećanje toksičnog potencijala uticale koncentracije, a ne broj detektovanih jedinjenja.

Na svim lokalitetima uočen je značajan uticaj pesticida na toksični potencijal vode. Analizom LVSPE uzoraka pokazano je da su koncentracije različitih pesticida (herbicidi, fungicidi, insekticidi) bili iznad PNEC vrednosti. Koncentracije iznad PNEC pokazane su za insekticide imidakloprid (lokalitet JDS33), metopren (lokalitet JDS35), metopren i imidakloprid (lokalitet JDS37), ometoat (lokalitet JDS41) i herbicide atrazin i petoksamid (lokalitet JDS36).

Pored pesticida, na lokalitetima su detektovana i druga jedinjenja čije su koncentracije bile iznad PNEC vrednosti. Na primer, PFOS je na svim lokalitetima detektovan u koncentracijama iznad PNEC vrednosti. Ovo jedinjenje se intenzivno koristi u raznim granama industrije (metalurgija, proizvodnja električnih kablova, tekstilna industrija, itd.) (Zareitalabad i sar., 2013). Na lokalitetu JDS35 detektovan je antibiotik azitromicin iznad PNEC vrednosti. Ovaj antibiotik se najčešće koristi za suzbijanje bakterijskih infekcija nosa i grla i lečenja upale pluća.

Uticaj na toksični potencijal LVSPE uzoraka imala su i jedinjenja koja su detektovana u koncentracijama nešto nižim od PNEC. U slučaju lokaliteta JDS33 to su bili pesticidi atrazin, metkosihtlor, imidakloprid i farmaceutici zopiklon i karbamazepin. Na povećanje vrednosti SumTU za JDS35 uticali su pesticidi imidakloprid, metalohlor, terbutrin, prohloraz i farmaceutici candestran, karbamazepin, venlafaksin, zopiklon, a za JDS36 značajan uticaj su imali pesticidi prohloraz, terbutrin i farmaceutici azitromicin, karbamazepin, terbutrin i zopiklon. Na povećanje vrednosti SumTU organskih jedinjenja za lokalitet JDS37 značajno su uticali pesticidi atrazin, karbendazim, metopren, metolahlor, farmaceutici azitromicin, karbamazepin, tiagabin, zopiklon, i metabolički produkt farmaceutika mirtazapina, 8-hidroksi mirtazapin, za JDS40 pesticidi atrazin, metolahlor, prohloraz, terbutrin i farmaceutici azitromicin, karbamazepin, zopiklon i za JDS41 pesticidi atrazin, ometoat, prohloraz i farmaceutici azitromicin, karbamazepin, zopiklon doprineli su povećanju vrednosti SumTU organskih jedinjenja.

Na osnovu detektovanih koncentracija i PNEC vrednosti izračunate su SumTU organskih jedinjenja LVSPE uzoraka. Za lokalitet JDS37 je dobijena najviša vrednost ovog indeksa (13,11), dok je najniža utvrđena za lokalitet JDS33 (4,91) (Tabela 4.22).

Tabela 4.22. Prikaz vrednosti SumTU dobijenih na osnovu koncentracija jedinjenja u nativnim (SEPA nadzorni monitoring) i LVSPE uzorcima rečne vode.

	Lokaliteti	SumTU (SEPA)	SumTU organska jedinjenja (SEPA)	SumTU organska jedinjenja (LVSPE)
Tisa	JDS33	17,49	1,07	4,91
Sava	JDS35	5,06	2,21	11,59
	JDS36	5,22	2,05	17,79
Dunav	JDS37	4,84	1,61	13,11
	JDS40	9,99	1,48	5,28
	JDS41	5,20	2,23	5,58

Veći broj podataka hemijskih parametara u LVSPE uzorcima omogućilo je dobijanje SumTU vrednosti koje pružaju kompletniji uvid u toksični potencijal ispitivanih lokaliteta. Za razliku od monitoringa gde nisu praćeni npr. pojedini pesticidi (imidakloprid, prohloraza, ometoat, petoksamid, metopren), na osnovu detektovanih koncentracija u LVSPE uzorcima utvrđeno je da ova jedinjenja u velikoj meri doprinose povećanju toksičnog potencijala vode. Takođe, podaci

hemijske analize LVSPE uzoraka ukazali su da na toksični potencijal utiču i farmaceutici, koji nisu praćeni u okviru nacionalnog monitoringa.

Na osnovu podataka dobijenih u okviru nacionalnog monitoringa, za sve hemijske parametre za koje je utvrđen toksični potencijal, utvrđen je i genotoksični. Sa druge strane, za 30 % toksičnih hemijskih parametara detektovanih u LVSPE uzorcima utvrđeno je da imaju i genotoksični potencijal (Kolarević i sar., 2021). Kao i u slučaju studije u slivu Velike Morave i Save, najveći broj detektovanih genotoksičnih agenasa može dovesti do nastanka DNK oštećenja indukcijom oksidativnog stresa.

4.3.2 Analiza mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja

MPN vrednosti *E. coli* u 100 ml uzorka vode uzorkovane u julu 2019. godine varirale su od 52,1 do 1986 (Tabela 4.23). Ukoliko bi se izvršila indikacija ekološkog statusa („Službeni glasnik RS“, broj 74/2011) na osnovu dobijenih MPN vrednosti za *E. coli*, većina ispitivanih lokaliteta bi pripadala klasi I kvaliteta vode (ocena ekološkog statusa – odličan), lokalitet JDS36 klasi II kvaliteta ocena ekološkog statusa – dobar), odnosno JDS37 klasi III kvaliteta (ocena ekološkog statusa – umeren) (Tabela 4.23).

Primenom korelacionih analiza ispitivan je odnos koncentracija mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja i hemijskih parametara čije prisustvo u vodenoj sredini može ukazati na uticaj otpadnih voda. Statistički značajna korelacija između MPN *E. coli* i benzo (b) fluorantena ($p = 0,896$; $p = 0,039$), ukupnog olova ($p = 0,949$; $p = 0,013$), ukupnog hroma ($p = 0,91$; $p = 0,003$) i amonijum jona ($p = 0,969$; $p = 0,006$) utvrđena je Pearson testom.

Tabela 4.23. MPN *E. coli* i prikaz klasifikacije kvaliteta vode.

	Lokaliteti	<i>E. coli</i>	Klasa
Tisa	JDS33	52,1	I
Sava	JDS35	n.m.	n.m.
	JDS36	517	II
Dunav	JDS37	1986	III
	JDS40	61,3	I
	JDS41	56,3	I

* n.m. – nije mereno

Povišene MPN vrednosti na lokalitetu JDS37 su očekivane s obzirom da se ovaj lokalitet nalazi neposredno nizvodno od Pančeva (77.000 stanovnika), čime je potvrđen uticaj komunalnih otpadnih voda ovog grada. Takođe, uticaj komunalnih otpadnih voda potvrđen je i na lokalitetu JDS36 koji se nalazi na Savi, na teritoriji grada Beograda. Analizom mikrobioloških rezultata ekspedicije JDS3 (Kirschner i sar., 2017) sektor Dunava, nizvodno od Novog Sada do 3 km nizvodno od ušća Velike Morave u Dunav, je okarakterisan kao jedan od najzagađenijih, što je potvrđeno i u ovoj studiji. Ovi rezultati ukazuju da se dati potez Dunava tokom perioda od šest godina, koliki je period između dve JDS ekspedicije, nalazi pod konstantnim uticajem neprerađenih otpadnih voda. Međutim, treba imati na umu da je u okviru ove studije analiza mikrobioloških parametara kvaliteta vode rađena je u julu, te je neophodno sprovesti dodatna merenja tokom različitih sezona kako bi se dobio kompletan uvid o uticaju mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja na kvalitet vode ispitivanih lokaliteta.

Kao i u slučaju studije u slivu Save, rezultati korelacione analize između MPN vrednosti *E. coli* i hemijskih parametara vode ukazuju da su lokaliteti najverovatnije pod uticajem mešavine komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Da bi se ova pretpostavka potvrdila, neophodno je da se urade dodatne analize.

4.3.3 Ex situ/in vitro pristup

4.3.3.1 Citotoksični i genotoksični efekat u SOS/umuC testu

U SOS/umuC testu ispitivani LVSPE uzorci (REF 100) nisu pokazali citotoksični niti genotoksični efekat bez (S9-) i sa metaboličkom aktivacijom (S9+) (Tabela 4.24). Za sve LVSPE tretmane stopa rasta je iznosila preko 0,95, dok je citotoksični efekat zabeležen jedino za pozitivnu kontrolu AFB1 (20 µg/ml). Takođe, vrednosti stope indukcije nisu prevazilazile graničnu vrednost (2) nakon tretmana LVSPE uzorcima, a vrednosti iznad graničnih su zabeležene samo za pozitivne kontrole, AFB1 (20 µg/ml) i 4-NQO (0,5 µg/ml). Citotoksični i genotoksični efekat nisu pokazale ni kontrola rastvarača (DMSO) i kontrola procesa ekstrakcije (SPEC).

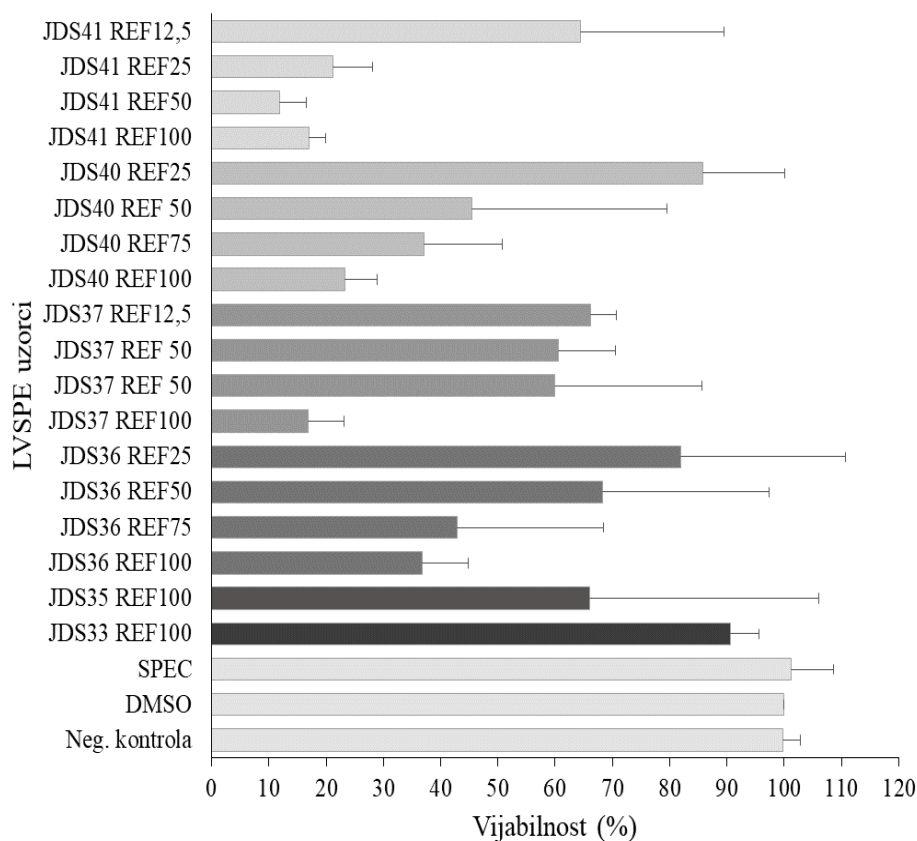
Tabela 4.24. Stopa rasta i stopa indukcije nakon tretmana *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 LVSPE uzorcima (REF 100), kontrolom rastvarača (DMSO), kontrolom procesa ekstrakcije (SPEC) i pozitivnim kontrolama (AFB1 i 4-NQO) (sr. vrednost ± SD); crveno označene vrednosti stope rasta/indukcije ukazuju na citotoksični/genotoksični efekat.

Uzorci	S9-		S9+	
	Stopa rasta	Indukcija	Stopa rasta	Indukcija
JDS33 REF100	0,95 ± 0,04	0,96 ± 0,13	0,94 ± 0,12	0,93 ± 0,32
JDS35 REF100	0,95 ± 0,04	0,94 ± 0,12	0,91 ± 0,20	1,04 ± 0,28
JDS36 REF100	0,97 ± 0,01	0,90 ± 0,13	0,90 ± 0,06	0,95 ± 0,40
JDS37 REF100	1 ± 0,05	0,95 ± 0,14	0,91 ± 0,02	1,09 ± 0,50
JDS40 REF100	1,01 ± 0,05	0,83 ± 0,14	1,06 ± 0,22	1,28 ± 0,16
JDS41 REF100	1 ± 0,01	0,82 ± 0,13	1,80 ± 0,24	1,40 ± 0,53
Neg. kontrola	0,98 ± 0,01	1,02 ± 0,04	1,2 ± 0,16	0,64 ± 0,28
DMSO	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,02 ± 0,02
(0,4 %)				
SPEC	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,04	1,09 ± 0,05	0,75 ± 0,24
4-NQO	1,00 ± 0,05	8,51 ± 1,5	/	/
(0,5 µg/ml)				
20 µg/ml	/	/	0,14 ± 0,03	20,18 ± 3,45
(AFB1)				

Dobijeni rezultati ukazuju da testirani koncentrisani uzorci (REF 100) nisu indukovali citotoksični i genotoksični efekat na soju *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Takođe, niska osetljivost ovog testa utvrđena je i pri testiranju koncentrisanih uzoraka komunalnih, otpadnih voda iz bolnica i uzoraka rečne vode u studiji Abbas i sar. (2019) u kojoj je detekovan genotoksični potencijal samo za koncentrisani uzorak otpadnih voda iz bolnice (REF 300). Slični rezultati su dobijeni u studiji Shao i sar. (2019) u kojoj su testirani LVSPE uzorci (REF 62,5 – 1.000) uzorkovani sa 22 lokaliteta tokom ekspedicije JDS3. U studiji Shao i sar. (2019) zabeležen je genotoksični efekat na soju *S. typhimurium* TA98 samo jednog uzorka pri REF vrednostima manjim od 100 (REF 31,25).

4.3.3.2 Citotoksični i genotoksični efekat kod ZFL ćelijske linije

Citotoksični efekat LVSPE uzoraka opsega REF: 12,5, 25, 50, 75, 100 na ZFL ćelije ispitivan je MTS testom. Vijabilnost ZFL ćelija bila je ispod 70 % nakon tretmana LVSPE uzorcima JDS36 (REF 75, 100), JDS37 (REF 50, 75, 100), JDS40 (REF 50, 75, 100) i JDS41 (REF 25, 50, 75, 100). Sa druge strane, citotoksičan efekat nije zabeležen za LVSPE uzorke JDS33 i JDS35 (Slika 4.15).



Slika 4.15. Vijabilnost ZFL ćelija nakon 72 h tretmana LVSPE uzorcima, negativnom kontrolom (netretirana grupa ćelija), kontrolom rastvarača (DMSO) i kontrolom ekstrakcije čvrste faze (SPEC) (sr. vrednost ± SD).

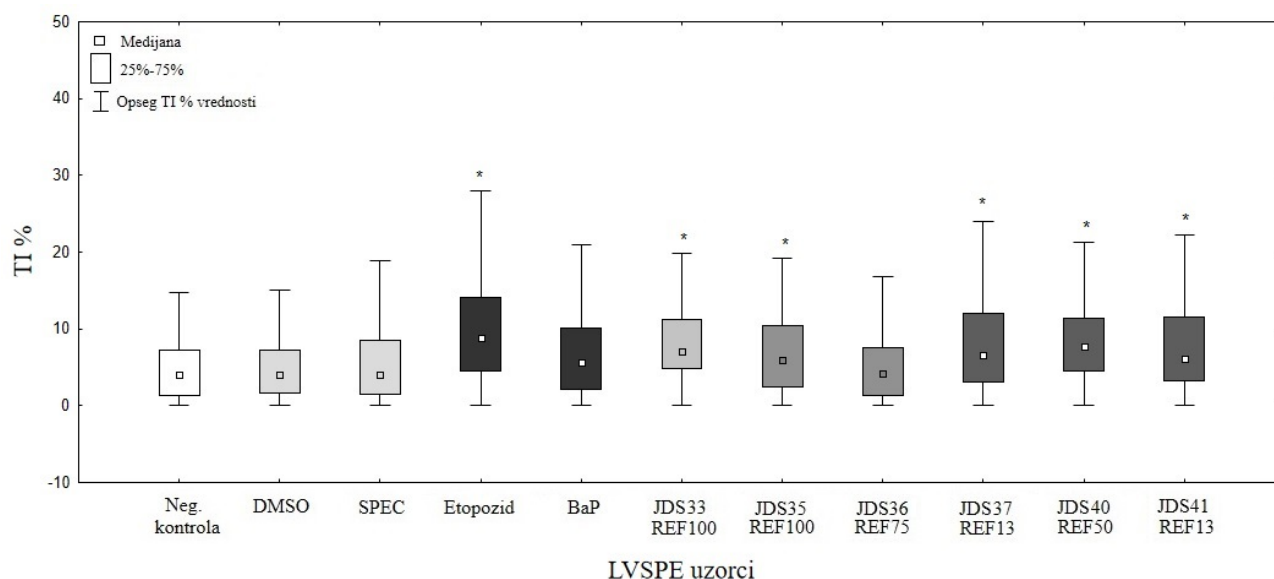
Na osnovu dobijenih rezultata najveći citotoksični potencijal je dobijen za LVSPE uzorak sa lokaliteta JDS41 s obzirom da je uzrokovao citotoksični efekat pri najmanjoj koncentraciji (REF 25) u odnosu na ostale testirane uzorke. Sa druge strane, LVSPE uzorci sa lokaliteta JDS33 i JDS35 nisu uticali na smanjenje vijabilnosti ZFL ćelija ni pri koncentracijama koje su bile 100 x više u odnosu na native uzorke.

Najveći citotoksični efekat nisu pokazali LVSPE uzorci sa lokaliteta JDS36 i JDS37, za koje su dobijene najviše SumTU vrednosti. Jedan od razloga može biti taj što su za računanje SumTU vrednosti korišćene najniže PNEC vrednosti, koje su najveći broj jedinjenja dobijene nakon tretmana model organizama *D. magna* i *S. capricornutum*. Rezultati studija Martins i sar. (2012) i Wang i sar. (2015), u kojima je određivanje PNEC vrednosti obuhvatilo različite biljne i životinjske vrste, ukazale su da vrste pokazuju različit nivo osetljivosti na toksične agense. Na osnovu ovih studija može se pretpostaviti i da ZFL ćelije pokazuju različitu osetljivost u odnosu na model organizme za koje su utvrđena PNEC vrednosti koje su korišćene za računanje SumTU vrednosti.

Analiza uticaja LVSPE uzoraka (različiti REF) na integritet DNK molekula ZFL ćelija rađena je za one koncentracije za koje je potvrđena vijabilnost iznad 75 % MTS testom. Grafički prikaz nivoa DNK oštećenja ZFL ćelija dat je na slici 4.16. Na osnovu parametra TI %, najviši nivo indukcije DNK oštećenja (sr. vrednost ± SE) zabeležen je nakon tretmana ćelija ekstraktima JDS40 REF 50 ($9,36 \pm 0,63$), JDS33 REF 100 ($8,46 \pm 0,49$), i JDS37 REF 13 ($8,11 \pm 0,53$), dok je najniži stepen DNK oštećenja zabeležen nakon tretmana ekstraktom JDS36 REF 75 ($5,28 \pm 0,41$).

Poređenjem TI % vrednosti, utvrđena je statistički značajna razlika u nivou DNK oštećenja netretiranih ćelija (negativne kontrole) i ćelija tretiranih pozitivnom kontrolom (etopozidom) i LVSPE uzorcima: JDS33 REF 100, JDS35 REF 100, JDS37 REF 13, JDS40 REF 50 i JDS41 REF 13. Sa druge strane, LVSPE uzorak JDS36 REF 75, kontrola rastvarača (0,4 % DMSO) i kontrola

procesa ekstrakcije (SPEC) nisu indukovali viši nivo DNK oštećenja u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 4.16).

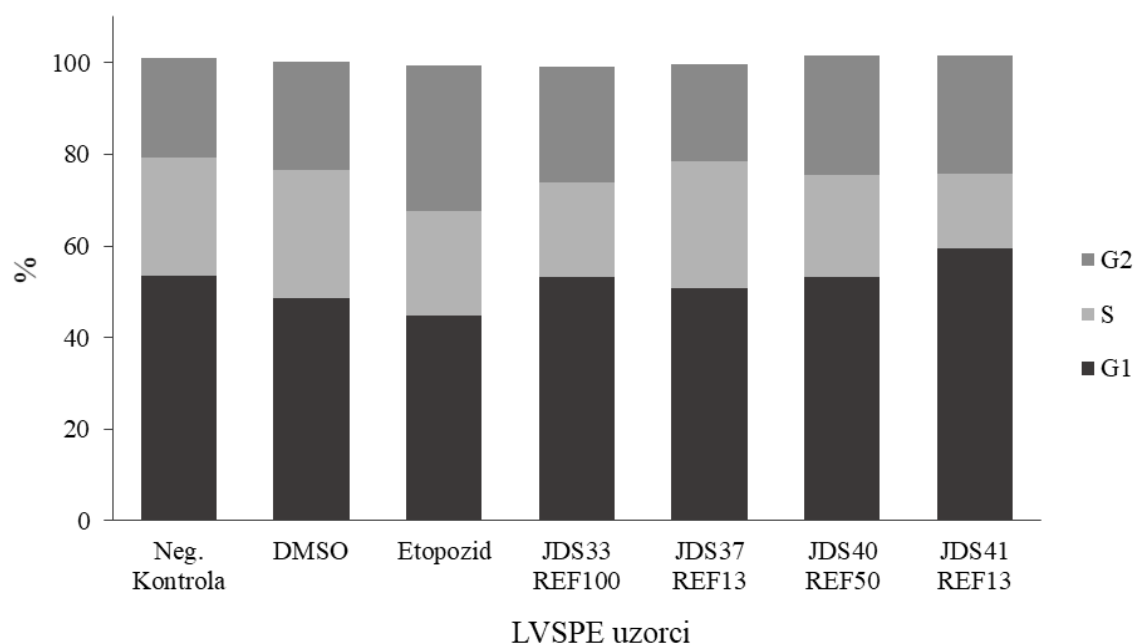


Slika 4.16. Nivo DNK oštećenja ZFL ćelija nakon 72 h tretmana netoksičnim koncentracijama LVSPE uzoraka, kontrolom rastvarača (DMSO), kontrolom procesa ekstrakcije (SPEC), pozitivnim kontrolama (etopozid i BaP); * statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana grupa ćelija) (korišćeni testovi: Kruskal Wallis i Man Whitney sa Dunn-Boniferroni korekcijom; $p < 0,004$); istom bojom označene su pozitivne i negativne kontrole i uzorci sa iste reke.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se različit stepen genotoksičnog potencijala LVSPE uzoraka. LVSPE uzorci sa lokaliteta JDS37 i JDS41 indukovali su statistički značajno povećanje nivoa DNK oštećenja u odnosu na negativnu kontrolu pri najnižim testitanim REF (REF 13), što ukazuje na visok genotoksični potencijal ovih uzoraka. Genotoksični potencijal je utvrđen i za ostale LVSPE uzorke, izuzev sa JDS35. Iako je na ovom lokalitetu zabeležena najviša SumTU vrednost na osnovu hemijske analize LVSPE uzoraka, ovakvi rezultati ukazuju da nisu sva jedinjenja za koja je utvrđen toksični potencijal pokazuju i genotoksična, što je u skladu sa JDS4 izveštajem Kolarević i sar., (2021) u kome je pokazano da je u ovom LVSPE uzorku detektovan najmanji broj genotoksičnih jedinjenja (11) u odnosu na ostale uzorke koji su ispitivani u našoj studiji.

4.3.4 Efekat LVSPE uzoraka na ćelijski ciklus ZFL ćelija

Analizom ćelijskog ciklusa ZFL ćelija ispitivano je da li su DNK oštećenja koja su detektovana alkalnim komet testom ispravljena, što bi omogućilo neometan tok ćelijskog ciklusa, ili oštećenja nisu mogla biti ispravljena reparacionim mehanizmima, zbog čega su ćelije zaustavljene u određenoj fazi ćelijskog ciklusa. Iz tog razloga, u daljem radu su testirani LVSPE uzorci sa lokaliteta koji su u alkalnom komet testu pokazali genotoksični efekat: JDS33 (REF 100), JDS37 (REF 13), JDS40 (REF 50) i JDS41 (REF 13). Zaustavljanje ZFL ćelija (sr. vrednost \pm SD) u G_1 fazi je uočeno nakon 72 h u prisustvu uzorka JDS41 REF 13 ($59,6 \% \pm 0,7 \%$ ćelija se nalazilo u G_1 fazi ćelijskog ciklusa, $16,1 \% \pm 9,0 \%$ u S fazi i $25,8 \% \pm 12,3 \%$ u G_2 fazi) (Slika 4.17). Ostali ispitivani LVSPE uzorci nisu značajno uticali na zaustavljanje ćelijskog ciklusa.



Slika 4.17. Uticaj LVSPE uzoraka na ćelijski ciklus ZFL ćelija.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se povećanje broja ćelija koje su zaustavljene u G₂ fazi nakon tretmana pozitivnom kontrolom, etopozidom. Za razliku od mehanizma dejstva etopozida koji indukuje dvolančane DNK prekide, što kao posledicu ima zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₂ fazi (Schonn i sar., 2010), za uzorak JDS41 (REF 13) uočava se drugi mehanizam dejstva koji dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G₁ fazi, što je karakteristično za agense koji poseduju citotoksični potencijal (Un, 2007). Prema studijama (Bortolotto i sar., 2017; Abd Razak i sar., 2019) zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₁ fazi jedan je od indikatora citotoksičnog potencijala testiranih agenasa. Na osnovu toga se može zaključiti da DNK oštećenja ZFL ćelija nastala nakon tretmana uzorkom sa lokaliteta JDS41 nisu ispravljena, što je uslovalo zaustavljanje ćelijskog ciklusa.

Dobijeni rezultati ukazuju da analiza ćelijskog ciklusa može imati važnu ulogu u ekogenotoksikološkim studijama s obzirom da ukazuje na fazu ciklusa na koju testirani uzorci deluju. Dodatno, praćenjem ekspresije gena koji su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa, u okviru ove analize, mogu se dobiti kompletnije informacije o mehanizmu dejstva agenasa na ćelijski ciklus.

4.3.5 *In situ/in vivo* pristup

4.3.5.1 Opšte fiziološko stanje uzorkovanih jedinki uklija

Prosečne vrednosti dužine, mase i kondicionog indeksa izlovljenih jedinki date su u Prilogu 3, tabeli 3. Najveća prosečna dužina i masa jedinki (sr. vrednost \pm SE) zabeležena je na lokalitetu JDS35 ($11,13 \pm 0,54$ cm; $10,20 \pm 1,77$ g). Najniža prosečna dužina je zabeležena na lokalitetu JDS40 ($8,78 \pm 0,14$ cm), a najniža prosečna masa jedinki je zabeležena na lokalitetu JDS41 ($4,70 \pm 0,33$ g). Prosečne vrednosti kondicionog indeksa (sr. vrednost \pm SE) varirale su od $0,54 \pm 0,02$ (lokalitet JDS36) do $0,71 \pm 0,06$ (lokalitet JDS40). Poređenjem vrednosti kondicionog indeksa utvrđena je statistički značajna razlika u vrednostima ovog indeksa između lokaliteta JDS36 i JDS40.

Tokom letnje sezone očekivano je da postoji dovoljno hrane za ovu vrstu riba, te je nizak kondicioni indeks uklija sa lokaliteta JDS36 najverovatnije posledica pritiska zagađenja. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Bervoets i Blust (2003) u kojoj je takođe dobijen niži kondicioni

indeks riba na zagađenim u odnosu na nezagađene lokalitete. Na osnovu SumTU LVSPE uzoraka, lokalitet JDS36 je pod najvećim pritiskom zagađenja polarnih i semipolarnih jedinjenja, pa se može pretpostaviti da je uticaj ovih jedinjenja iz akvatične sredine mogao da se odrazi i na opšte fiziološko stanje jedinki.

4.3.5.2 Citotoksični efekat na ćelijama krvi uklija

Imajući u vidu udaljenost lokaliteta i nemogućnost brze obrade uzoraka u laboratoriji, uzorci krvi su krioprezervirani u tečnom azotu na terenu.

Vijabilnost ćelija krvi uklija određena je diferencijalnim bojenjem AO/EtBr. Prosečna vrednost ispod 70 % je zabeležena jedino za lokalitet JDS40 (Tabela 4.25). Niska vijabilnost ćelija krvi (< 70 %) detektovana je kod jedne jedinke sa lokaliteta JDS33 i JDS41, odnosno po četiri jedinke sa lokaliteta JDS36, JDS37, JDS40, usled čega su one bile isključene iz daljih genotoksikoloških analiza. U prethodnim studijama (Kračun-Kolarević i sar., 2016; Kolarević i sar., 2016a, Jovanović i sar., 2018) je utvrđeno da krioprezervacija ne utiče na vijabilnost i na povećanje DNK oštećenja, te se može pretpostaviti da je niska vijabilnost u navedenim uzorcima posledica lošeg fiziološkog stanja jedinki.

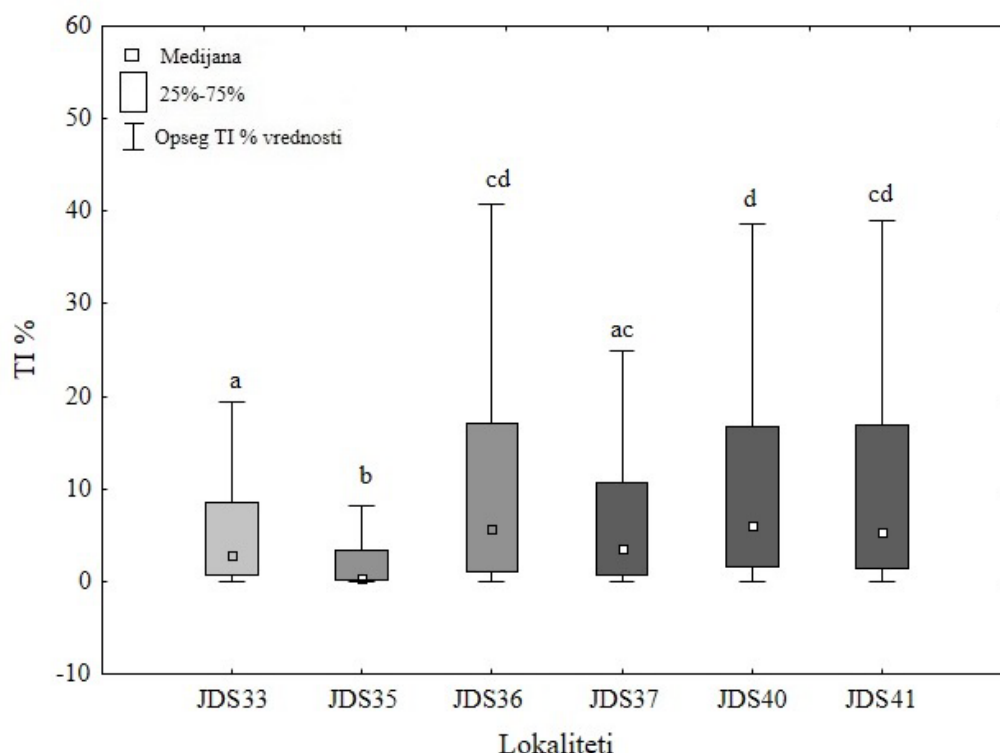
Tabela 4.25. Vijabilnost ćelija krvi jedinki uklija (sr. vrednost \pm SE).

	Lokaliteti	Vijabilnost (%)
Tisa	JDS33	80,00 \pm 2,62
Sava	JDS35	87,50 \pm 3,55
	JDS36	72,20 \pm 2,64
Dunav	JDS37	70,50 \pm 2,00
	JDS40	67,70 \pm 3,09
	JDS41	73,40 \pm 2,44

4.3.5.3 Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija

4.3.5.4 Alkalni komet test

Prikaz DNK oštećenja u ćelijama krvi uklija dat je na slici 4.18. Na osnovu parametra TI %, najviši nivo DNK oštećenja (sr. vrednost \pm SE) je zabeležen na lokalitetima JDS41 (14,01 \pm 1) i JDS36 (13,93 \pm 1,21), a najniži je utvrđen za lokalitet JDS35 (6,79 \pm 0,79). Statistički značajna razlika je utvrđena poređenjem TI % vrednosti sa lokaliteta JDS33 i svih ostalih, izuzev lokaliteta JDS37. Takođe, značajna razlika je dobijena između TI % vrednosti sa lokaliteta JDS35 i svih ostalih lokaliteta, kao i između lokaliteta JDS37 i JDS40.



Slika 4.18. Nivo DNK oštećenja ćelija krvi jedinki uklija na osnovu vrednosti parametra TI %; različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta (korišćeni testovi: Kruskal-Wallis i Mann Whitney U sa Boniferroni korekcijom; $p < 0,003$); istom bojom označeni su lokaliteti sa iste reke.

S obzirom da je na lokalitetu JDS35 zabeležen visok stepen vijabilnosti i da je detektovan nizak nivo DNK oštećenja u alkalnom i u mikronukleus testu, vrednosti koje su dobijene za ovaj lokalitet dalje su korišćene kao bazalne vrednosti u *in situ* delu genotoksikološkog istraživanja.

Takođe, u prethodnoj ekspediciji, JDS3, je utvrđen genotoksični efekat u ćelijama krvi uklija (Deutschmann i sar., 2016) i hemocitama školjki (Kolarević i sar., 2016b) u sektoru Dunava koji protiče kroz Srbiju. Ovakvi rezultati ukazuju da i nakon šest godina, koliko je prošlo od ekspedicije JDS3, i dalje postoji uticaj genotoksičnih agenasa na genetički materijal akvatičnih organizama.

Učestalost HH (%) u ćelijama krvi uklija prikazana je u tabeli 4.26. Najviše vrednosti ovog parametra dobijene su na lokalitetima JDS36 i JDS41, a najniža na lokalitetu JDS35, ali dobijene razlike nisu bile statistički značajne.

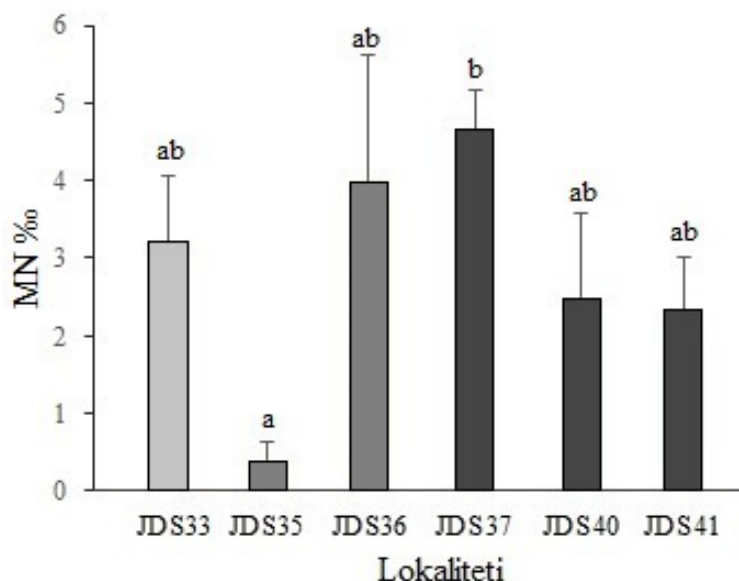
Tabela 4.26. Učestalost HH (%) u ćelijama krvi jedinki uklija (sr. vrednost \pm SE); korišćen test: one-way ANOVA, $p < 0,05$.

	Lokaliteti	HH %
Tisa	JDS33	1,1 \pm 0,31
	JDS35	0,6 \pm 0,16
Sava	JDS36	1,85 \pm 0,55
	JDS37	1,0 \pm 0,44
Dunav	JDS40	1,33 \pm 0,33
	JDS41	1,56 \pm 0,41

Kao i u studiji sliva Velike Morave i Save, primenom Pearson korelacione analize nije utvrđena statistički značajna korelacija između vijabilnosti i učestalosti HH ($r = -0,23$, $p = 0,13$).

4.3.5.5 Mikronukleus test

Najviša učestalost MN (%) u ćelijama krvi uklija je zabeležena na lokalitetu JDS37 (sr. vrednost \pm SE: $4,67 \pm 0,49$), dok je na lokalitetu JDS35 zabeležena najniža učestalost ($0,40 \pm 0,22$) (Slika 4.19). Podaci o učestalosti MN na lokalitetu JDS35 nisu pokazali normalnu distribuciju, pa je neparametrijskim testovima utvrđena statistički značajna razlika učestalosti MN između JDS35 i JDS37.



Slika 4.19. Učestalost MN (%) u ćelijama krvi jedinki uklija (sr. vrednost \pm SE); različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta (korišćeni testovi: Kruskal Wallis sa Dunn-Boniferroni korekcijom $p < 0,003$); istom bojom označeni su lokaliteti sa iste reke.

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su na lokalitetu JDS37 klastogeni i/ili aneugeni agensi indukovali najveći broj MN u ćelijama krvi uklija, što nije iznenađujuće imajući u vidu da se ovaj lokalitet nalazi nizvodno od Pančeva, te da je pod uticajem komunalnih i industrijskih otpadnih voda ovog grada. Poređenjem rezultata dobijenih u mikronukleus i alkalnom komet testu, uzorci sa lokaliteta JDS35 su imali mali broj MN i nisku vrednost TI %. Sa druge strane, za lokalitet JDS37 je dobijen najveći broj MN, ali su, u poređenju sa većinom ispitivanih lokaliteta, TI % vrednosti su bile niže.

Učestalost IRR (%) ćelijama krvi uklija prikazana je u tabeli 4.27. Najviša vrednost je zabeležena na lokalitetu JDS37, a najniža na lokalitetu JDS35. Međutim, na osnovu učestalosti IRR nije utvrđena statistički značajna razlika između lokaliteta. Pored toga, primenom Pearson testa nije utvrđena značajna korelacija između vijabilnosti ćelija krvi i učestalost IRR ($r = -0,26$, $p = 0,08$). Slični rezultati su dobijeni i u studiji sliva Velike Morave i Save.

Tabela 4.27. Učestalost IRR (%) u ćelijama krvi uklija (sr. vrednost \pm SE); korišćeni test: one-way ANOVA; $p < 0,05$.

	Lokaliteti	IRR ‰
Tisa	JDS33	9,11 \pm 1,95
	JDS35	3,70 \pm 1,71
Sava	JDS36	14,50 \pm 2,57
	JDS37	17,67 \pm 5,53
Dunav	JDS40	14,83 \pm 4,83
	JDS41	7,89 \pm 0,67

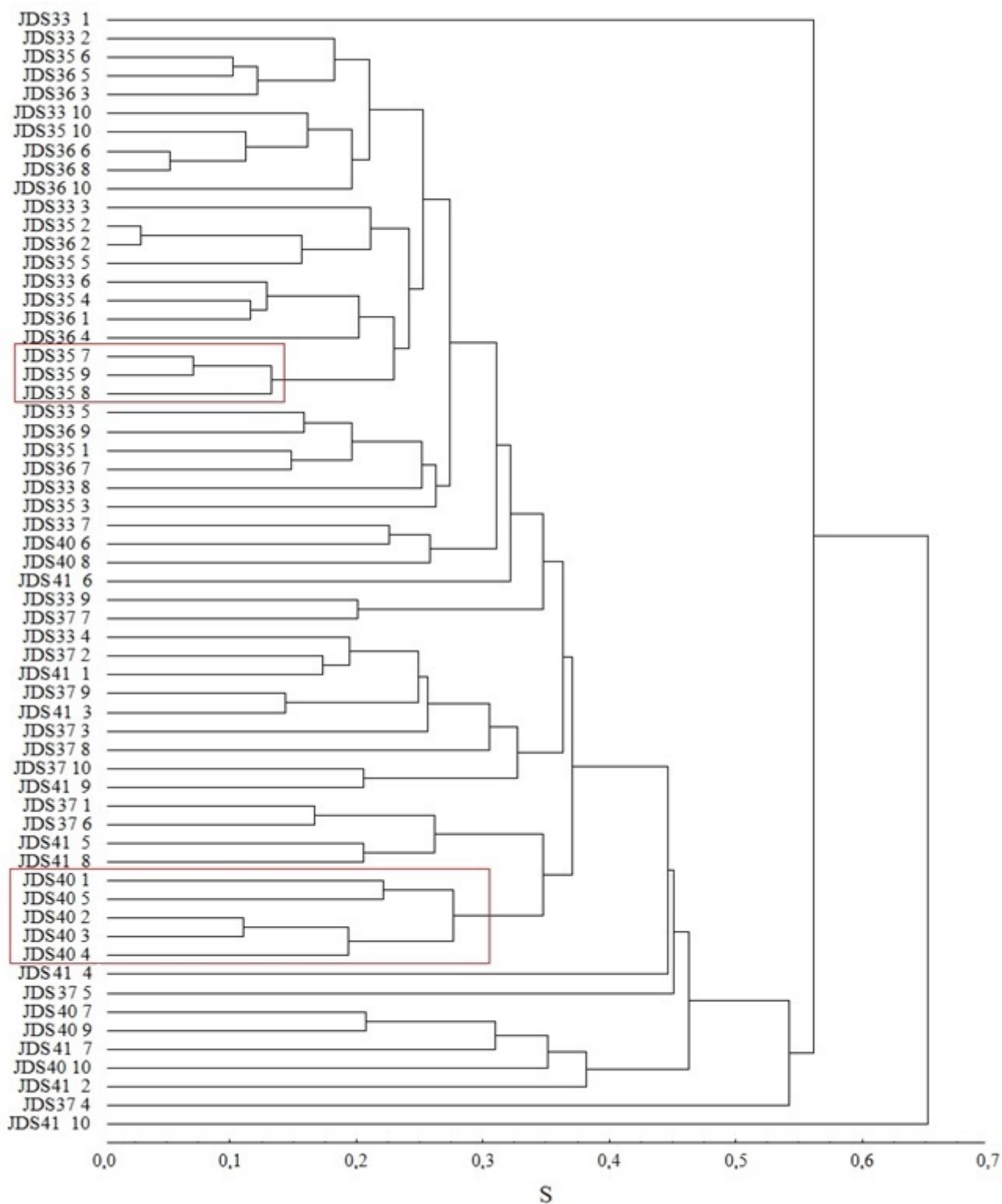
Pearson analizom nije utvrđena korelacija za parametre MN (%) i TI % ($r = 0,16$, $p = 0,30$), što je u skladu sa rezultatima koji su dobijeni u studiji u slivu Velike Morave i Save, ali i u drugim studijama u kojima su odabrana ova dva parametra za procenu genotoksičnog potencijala akvatičnih ekosistema (De Andrade i sar., 2004; Deguchi i sar., 2007; Kračun-Kolarević i sar., 2016).

4.3.5.6 RAPD analiza

Prema vrednostima odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm (1,78 – 2,01), svi analizirani uzorci su pokazali visok stepen čistoće (Prilog 3, tabela 4).

Ukupan broj umnoženih fragmenata je varirao u zavisnosti od prajmera. Prajmer I umnožio je ukupno 99 fragmenata, prajmer II 108, prajmer III 175, prajmer IV 130, prajmer V 232 i prajmer VI 365 fragmenata (Prilog 3, slika 1).

Prosečne S vrednosti za sve prajmere, dobijene na osnovu međusobnog poređenja jedinki sa svih lokaliteta, korišćene su za konstrukciju filogenetskog stabla primenom UPGMA metode (Slika 4.20). Na osnovu analize filogenetskog stabla ne može se uočiti značajno grupisanje jedinki sa istog lokaliteta, osim za jedinke sa lokaliteta JDS35 (jedinke 7, 8, 9) i JDS40 (jedinke 1, 2, 3, 4, 5).



Slika 4.20. Filogenetsko stablo konstruirano primenom UPGMA metode na osnovu prosečne S vrednosti između jedinki; uokvirene jedinke predstavljaju jedinke sa istog lokaliteta koje su pokazale grupisanje na osnovu prosečne S vrednosti.

Vrednosti S indeksa za sve prajmere dobijenih na osnovu poređenja jedinki sa istog lokaliteta prikazane su u tabeli 4.28. Na osnovu prosečnih vrednosti za sve prajmere (S indeks) najveći stepen genetičke sličnosti su pokazale jedinke sa lokaliteta JDS35 ($0,80 \pm 0,03$) i JDS36 ($0,81 \pm 0,03$), a najniži jedinke sa lokaliteta JDS37 ($0,66 \pm 0,04$) i JDS41 ($0,66 \pm 0,07$).

Tabela 4.28. Sličnost jedinki sa istog lokaliteta dobijena na osnovu S vrednosti šest prajmera.

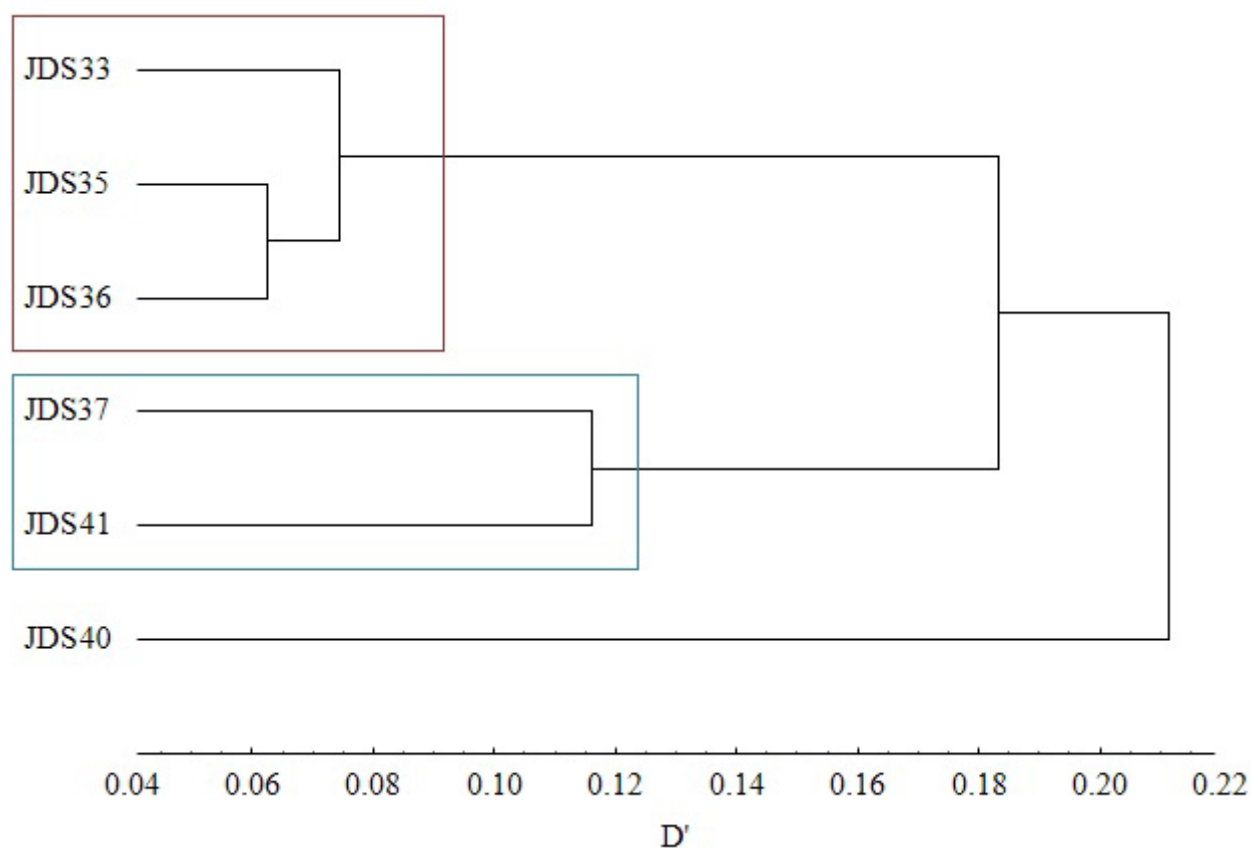
Prajmer/Lokalitet	S indeks unutar lokaliteta (S)					
	JDS33	JDS35	JDS36	JDS37	JDS40	JDS41
I	0,77	0,83	0,83	0,82	0,87	0,94
II	0,61	0,75	0,90	0,64	0,61	0,63
III	0,60	0,80	0,78	0,59	0,69	0,44
IV	0,70	0,73	0,75	0,76	0,65	0,75
V	0,66	0,77	0,71	0,54	0,70	0,59
VI	0,90	0,93	0,86	0,62	0,84	0,60
Sr. vrednost \pm SE	0,71 \pm 0,05	0,80 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03	0,66 \pm 0,04	0,72 \pm 0,04	0,66 \pm 0,07

Vrednosti S_{ij} indeksa svih prajmera dobijene su na osnovu poređenja jedinki sa različitim lokaliteta (Tabela 4.29). Najveći stepen sličnosti je dobijen za lokalitete JDS35 i JDS36 ($0,95 \pm 0,01$), a najniži za lokalitete JDS35 i JDS40 ($0,84 \pm 0,04$).

Tabela 4.29. Sličnost populacija (S_{ij} indeks) dobijena na osnovu S_{ij} vrednosti za šest prajmera.

Lokalitet/ Prajmer	S indeks između lokaliteta (S_{ij})						Sr. vrednost \pm SE
	I	II	III	IV	V	VI	
JDS33/ JDS35	0,94	0,97	0,92	0,93	0,94	0,96	0,94 \pm 0,01
JDS33/ JDS36	0,95	0,96	0,96	0,93	0,93	0,94	0,94 \pm 0,01
JDS33/ JDS37	0,91	0,97	0,84	0,96	0,77	0,92	0,90 \pm 0,03
JDS33/ JDS40	1,40	0,90	0,92	0,84	0,96	0,91	0,94 \pm 0,1
JDS33/ JDS41	0,85	0,94	0,89	0,96	0,66	0,96	0,88 \pm 0,03
JDS35/ JDS36	0,98	0,93	0,94	0,96	0,95	0,95	0,95 \pm 0,01
JDS35/ JDS37	0,89	0,92	0,78	0,95	0,80	0,90	0,87 \pm 0,03
JDS35/ JDS40	0,90	0,88	0,89	0,83	0,66	0,87	0,84 \pm 0,04
JDS35/ JDS41	0,81	0,91	0,82	0,90	0,73	1,42	0,93 \pm 0,1
JDS36/ JDS37	0,89	0,93	0,82	0,91	0,82	0,92	0,89 \pm 0,02
JDS36/ JDS40	0,89	0,78	0,94	0,88	0,75	0,91	0,86 \pm 0,03
JDS36/ JDS41	0,81	0,88	0,86	0,95	0,79	0,97	0,88 \pm 0,03
JDS37/ JDS40	0,98	0,89	0,86	0,79	0,85	0,89	0,88 \pm 0,02
JDS37/ JDS41	0,97	0,95	0,92	0,96	0,83	0,93	0,93 \pm 0,02
JDS40/ JDS41	0,98	0,88	0,91	0,80	0,70	0,93	0,87 \pm 0,04

Odnos između lokaliteta je analiziran na osnovu D' vrednosti, dobijen na osnovu prosečnih S'_{ij} (sličnost između jedinki različitih lokaliteta) za sve prajmere i prosečne S vrednosti unutar lokaliteta. Dobijene D' vrednosti iskorišćene su za konstrukciju filogenetskog stabla primenom UPGMA metode (Slika 4.21). Na filogenetskom stablu uočava se grupisanje lokaliteta sa Tise (JDS33) i Save (JDS35 i JDS36) na jednoj kladi, dok se na drugoj kladi grupišu dva lokaliteta sa Dunava (JDS37 i JDS41). Takođe, uočava se izdvajanje lokaliteta JDS40 u odnosu na ostale.



Slika 4.21. Filogenetsko stablo konstruisano primenom UPGMA metode na osnovu D' vrednosti svih prajmera.

Na osnovu D' vrednosti može se uočiti izdvajanje lokaliteta sa pritoka (Savi i Tisi) u odnosu na lokalitete sa Dunava. Takođe, uočen je najveći stepen sličnosti između lokaliteta sa Save (JDS35 i JDS36). Sa druge strane, lokalitet JDS40 izdvaja se u odnosu na ostala dva na Dunavu (JDS37 i JDS41), a da bi se utvrdilo koji su faktori uzrokovali izdvajanje ovog lokaliteta potrebno je sprovesti dodatne analize.

Na osnovu rezultata RAPD analize u ovoj studiji uočava se da su na sličnost, odnosno razlike između jedinki sa različitih lokaliteta, pred genotoksičnih agenasa, uticali i drugi faktori. Ukoliko se analiziraju TI % vrednosti iz studije slivova Save i Dunava, uočava se da su u slivu Dunava zabeležene niže TI % u odnosu na sliv Save, što može biti pokazatelj manjeg genotoksičnog potencijala na datim lokalitetima.

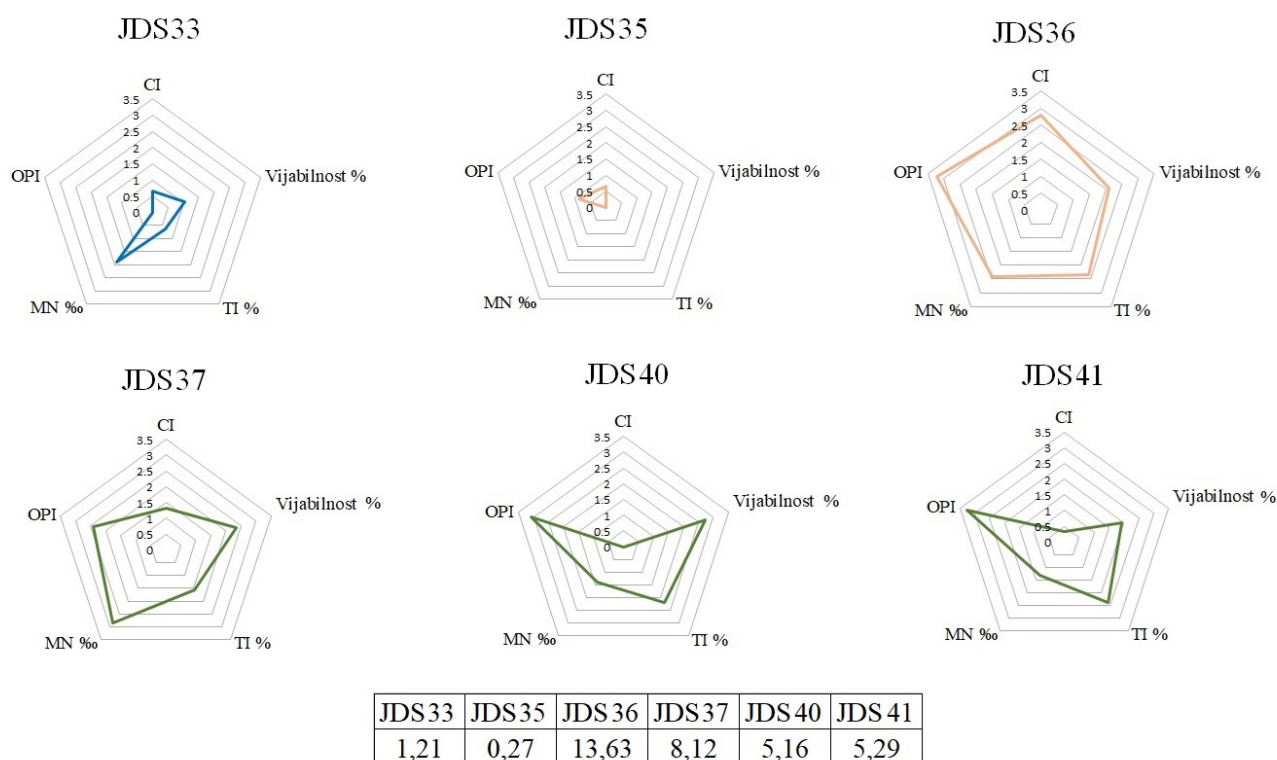
4.3.5.7 IBR analiza

Prikaz IBR dijagrama i IBR vrednosti dat je na slici 4.22. Kao što se sa slike može uočiti, na povećanje površine dijagrama uticali su različiti odgovori biomarkera. Za lokalitet JDS33 najveći uticaj su imali vijabilnost i učestalost MN. Za lokalitet JDS35 parametar OPI je uticao na blago povećanje površine dijagrama, dok su za lokalitet JDS36 svi parametri imali uticaj. Na povećanje površine dijagrama za lokalitet JDS37 najveći uticaj su imali vijabilnost, učestalost MN i OPI, a za lokalitete JDS40 i JDS41 imali su parametri vijabilnost, TI % i OPI.

Na osnovu površina dijagrama, najviše IBR vrednosti su zabeležene za lokalitet JDS36 (13,63), dok je najniža vrednost zabeležena za lokalitet JDS35 (0,27).

Pearson korelacionom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija između vrednosti površina dijagrama dobijenih za hemijske parametre (Slika 4.13) i biomarkere (Slika 4.22) ($r = -0,79$; $p = 0,06$). Takođe, statistički značajna korelacija nije utvrđena ni između IBR i

SumTU vrednosti dobijenih na osnovu podataka monitoringa (SEPA), odnosno analize LVSPE uzoraka ($r = -0,45$; $p = 0,36$; $r = 0,68$; $p = 0,14$).



Slika 4.22. IBR vrednosti odabranih biomarkera: kondicionog indeksa, vijabilnosti ćelija krvi, TI % komet testa, učestalosti MN i OPI indeks.

Ukoliko se IBR indeks posmatra kao generalni odgovor biomarkera na pritisak zagađenja sredine (Samanta i sar., 2018), onda možemo pretpostaviti da su lokaliteti JDS36 i JDS37 pod najvećim pritiskom zagađenja. Odgovor biomarkera na lokalitetima JDS36 i JDS37 u skladu su sa dobijenim SumTU vrednostima na osnovu podataka LVSPE analize, što ukazuje na to da su polarna i semipolarna jedinjenja koja su detektovana u LVSPE uzorcima mogla u velikoj meri da utiču na indukciju odgovora biomarkera u ukljama sa ovih lokaliteta. Sa druge strane, na lokalitetu JDS35 zabeležen je najniži odgovor biomarkera u odnosu na ostale lokalitete, čime je opravdan odabir ovog lokaliteta kao referentnog u genotoksikološkom delu istraživanja. Međutim, za ovaj lokalitet utvrđena je relativno visoka vrednost SumTU LVSPE uzorka, što ukazuje da uprkos tome što je zabeležen relativno visok stepen zagađenja, to ne mora nužno da znači da će agensi iz sredine indukovati i visok stepen odgovora biomarkera.

Odsustvo korelacije između SumTU vrednosti, dobijene na osnovu podataka hemijskih parametara merenih tokom monitoringa i u LVSPE uzorcima, i IBR vrednosti ukazuje da se na osnovu *in silico* analize ne mogu u potpunosti predvideti odgovori biomarkera. Kao što je navedeno u studiji sliva Velike Morave, veličina seta podataka hemijskih parametara i korišćenje odgovarajućih PNEC vrednosti može značajno uticati na predikciju toksičnog/genotoksičnog potencijala. Razlika između „pretpostavljenog“ toksičnog potencijala na osnovu *in silico* analize i detektovanih odgovora biomarkera su dobijeni u i studiji Tousova i sar. (2017) u kojoj su testirani LVSPE uzorci rečne vode sa 18 lokaliteta primenom biotestova u kojima su praćeni različiti biomarkeri (toksičnost na algama, embrionima zebrića, neurotoksičnost, uticaj endokrinih disruptora, itd.). Takođe, u studiji Neale i sar. (2015) na osnovu *in silico* analize detektovanih jedinjenja u LVSPE uzorcima sa Dunava mogao je da se objasni samo jedan deo efekata koji su detektovani u toksikološkim biotestovima.

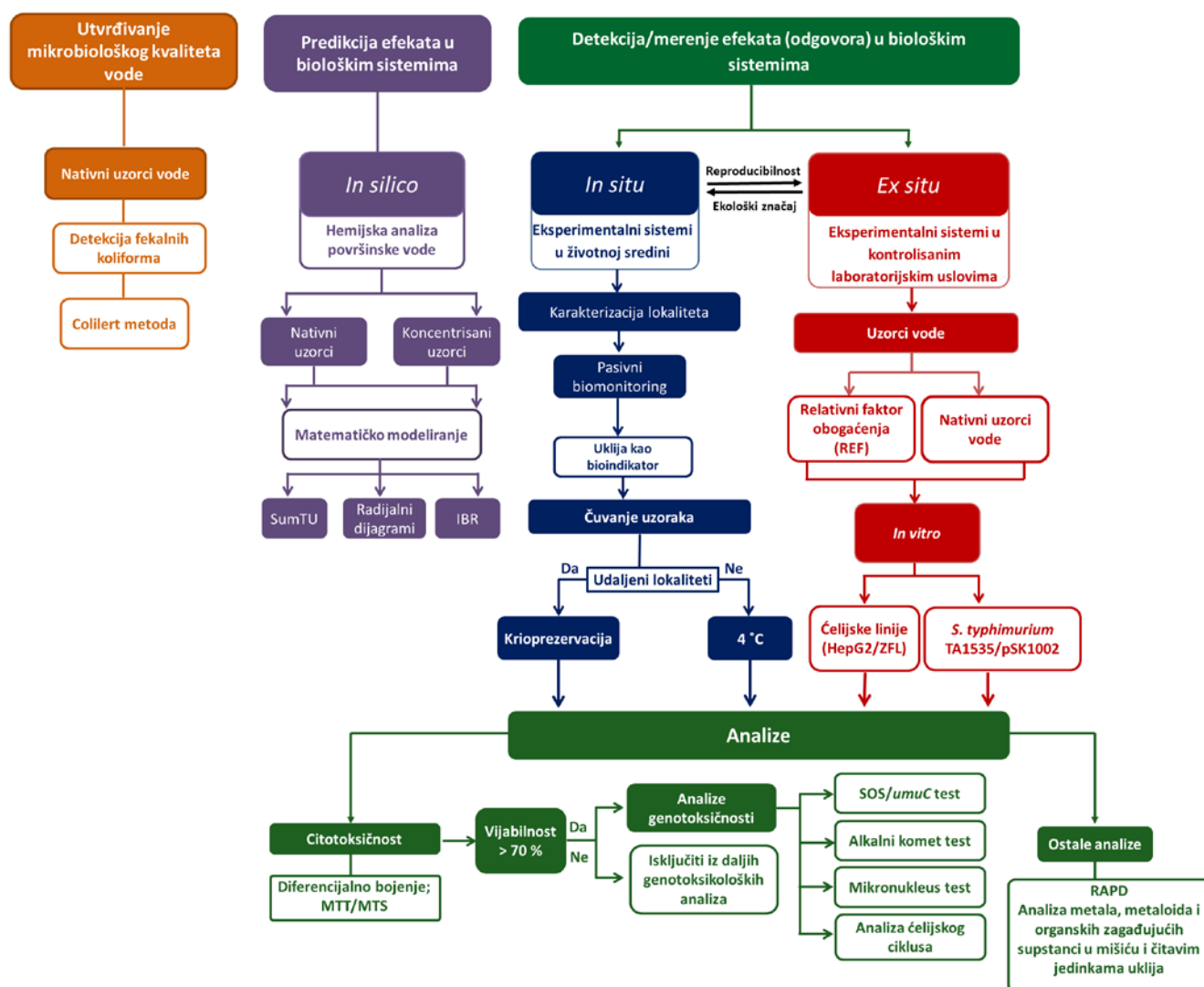
Uzimajući u obzir rezultate svih analiza iz ove studije, uočava se da ispitivani lokaliteti sliva Dunava pokazuju različit stepen genotoksičnog potencijala. Istraživanje je sprovedeno u okviru JDS4 ekspedicije, pa je pored podataka hemijskih analiza dobijenih u okviru nacionalnog monitoringa, bio dostupan i kompleksan set podataka hemijske analize LVSPE uzoraka u kojima su praćena polarna i semipolarna jedinjenja koja nisu deo nacionalnog monitoringa. Na osnovu ovog seta podataka dobijen je kompletniji uvid u stepen i izvore zagađenja lokaliteta. Prema hemijskim parametrima koji su detektovani tokom monitoringa i u LVSPE uzorcima, ispitivani lokaliteti su pod uticajem zagađenja poreklom iz komunalnih i industrijskih voda, kao i zagađenja koje je posledica poljoprivredne aktivnosti.

Na osnovu *in silico* analize nije bilo moguće u potpunosti izvršiti predikciju odgovora biomarkera. Međutim, ovaj tip analize ima važnu ulogu u identifikaciji genotoksičnih agenasa koji su detektovani u hemijskim analizama, zbog čega je važno imati pristup bazama koje sadrže obiman set podataka hemijskih parametara. Rezultati *in vitro* istraživanja su pokazali da je ZFL ćelijska linija osetljiv model sistem za detekciju toksičnog i genotoksičnog potencijala koncentrisanih uzoraka rečne vode i da analiza ćelijskog ciklusa može ukazati na mehanizam dejstva smeša genotoksičnih agenasa koje su prisutni u vodenoj sredini. *In vivo* testovi na ćelijama krvi uklija pokazali su različitu osetljivost u detekciji genotoksičnog potencijala, zbog čega je i u ovoj studiji potvrđen značaj primene integrisanog pristupa, odnosno primena IBR metode.

4.4 Formulisanje smernica za primenu *in vitro* i *in vivo* testova u ekogenotoksikologiji u istraživanjima na velikim ravničarskim rekama

Zagađenje velikih ravničarskih reka predstavlja kompleksan problem i zahteva interdisciplinarni pristup kako bi se izvršila procena uticaja zagađujućih agenasa na akvatične organizme i akvatične ekosisteme. Zbog dilucionog kapaciteta velikih ravničarskih reka može se desiti da se hemijskim analizama i praćenjem promena na nivou jedinki i zajednica previdi stvarni uticaj zagađenja na organizme. Jedan od načina da se ti problemi prevaziđu je uvođenje efektima uslovljenog monitoringa i EBM u programe monitoringa.

U studijama koje su predstavljene u ovoj doktorskoj disertaciji primenjeni su *in silico*, *in situ/in vivo* i *ex situ/in vitro* pristupi u proceni genotoksičnog potencijala nativnih i koncentrisanih uzoraka rečne vode koji su uzorkovani sa različitih lokaliteta. Šematski prikaz urađenih analiza u okviru disertacije dat je na slici 4.23.



Slika 4.13. Pristupi i analize korišćene u disertaciji.

Na osnovu rezultata studija koje su predstavljene u disertaciji, ali i prethodnih studija, može se uočiti da odabrane analize imaju prednosti i nedostatke, kao i da biotestovi nisu pokazali isti nivo osetljivosti u detekciji genotoksičnog potencijala.

Dobijeni rezultati pokazali su da detekcija i kvantifikacija **mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja** može ukazati na narušavanje kvaliteta vode, zbog čega ima važnu ulogu u proceni ekološkog statusa/potencijala površinskih voda. Primenom Colilert metode može se na jednostavan način izvršiti kvantifikacija ukupnih koliforma i *E. coli* u nativnim uzorcima vode. Pored toga, ovi podaci mogu ukazati na uticaj komunalnih otpadnih voda, kao i mešavine komunalnih i industrijskih otpadnih voda na narušavanje kvaliteta vode ispitivanih lokaliteta.

Hemijske analize vode sa ispitivanih lokaliteta predstavljaju važan segment ekogenotoksikološkog istraživanja jer podaci o detektovanim agensima u vodi mogu ukazati, pre svega, na izvore zagađenja lokaliteta, ali i potencijalne uzročnike promena u genetičkom materijalu. U okviru nacionalnog monitoringa prati se ograničen broj hemijskih parametara koji mogu pružiti samo delimičnu sliku stepena zagađenja površinskih voda. Takođe, uočava se razlika u obimu hemijskih analiza u zavisnosti od mernih stanica, što dovodi do nebalansiranih SumTU vrednosti, zbog čega u pojedinim slučajevima nije moguće izvršiti komparaciju između različitih lokaliteta. Sa druge strane, uvođenje hemijske analize koncentrisanih, LVSPE uzoraka rečne vode, kao i primena osetljivih analitičkih uređaja pružila je informacije o polutantima koji su u vodenoj sredini prisutni u niskim koncentracijama (ng/l, µg/l). Povećanjem obima seta podataka o agensima koji su prisutni

u vodi obzbeđena je pouzdanija predikcija citotoksičnog/genotoksičnog potencijala ispitivanih uzoraka vode u *in silico* analizi. Na osnovu rezultata utvrđeno je da, pored veličine seta podataka o detektovanim hemijskim parametrima, važan deo *in silico* analize je i odabir odgovarajućih „referentnih“ vrednosti, odnosno koncentracija pri kojima agensi ne uzrokuju efekte u organizmima (PNEC, NOEC vrednosti).

U zavisnosti od analiza koje se koriste u istraživanju, važno je na adekvatan način čuvati uzorke i tkiva. Kada su u pitanju uzorci krvi, ukoliko nije moguće dostaviti uzorke u laboratoriju i uraditi analize istog dana, neophodno je nakon uzorkovanja krv krioprezervirati u tečnom azotu na terenu. Sa druge strane, u slučaju da se uzorci mogu analizirati istog dana kada su uzorkovani, oni se mogu transportovati do laboratorije na + 4°C i po dolasku odmah procesuirati. Tkiva takođe moraju biti čuvana na adekvatan način u zavisnosti od planiranih analiza. Na primer, za analize metala, metaloida i organskih zagađujućih supstanci, tkiva i/ili čitave jedinke treba čuvati na + 4 °C u plastičnoj ambalaži do dolaska u laboratoriju, a potom na – 20 °C do analiza.

Za razliku od *in silico* analize na osnovu koje se može izvršiti predikcija efekata u biološkim sistemima, korišćeni **biotestovi** su pružili informaciju o indukovanim, odnosno izmerenim efektima u biološkim sistemima. Pri tome, primena baterije biotestova omogućila je detekciju oštećenja na nivou DNK molekula i hromozoma. U okviru studije, ispitivanja su vršena u *ex situ* i *in situ* uslovima.

Bez obzira da li se istraživanja sprovode u *ex situ* ili *in situ* uslovima, pre izvođenja genotoksikoloških testova, neophodno je ispitati da li postoji citotoksični efekat. Ispitivanje citotoksičnog potencijala se pokazao kao veoma značajan korak prilikom testiranja LVSPE uzoraka na ZFL ćelijskoj liniji, jer su na taj način za detekciju genotoksičnog potencijala korišćeni uzorci bez toksičnog efekta. Takođe, podaci o vijabilnosti ćelija krvi uklija su bili značajni i u studijama sliva Save i Dunava, jer je za pojedine jedinke utvrđena vijabilnost ćelija krvi ispod 70 %. Samim tim, utvrđivanje broja vijabilnih ćelija omogućilo je isključivanje iz genotoksikoloških analiza onih uzoraka za koje je utvrđen citotoksični efekat.

Ex situ istraživanje omogućilo je primenu eksperimentalnih model sistema, u kontrolisanim uslovima, u većem broju ponavljanja. U okviru *ex situ* istraživanja, na osnovu rezultata SOS/*umuC* testa, utvrđeno su da ova metoda nije pokazala osetljivost u detekciji citotoksičnog i genotoksičnog efekta ispitivanih nativnih i koncentrisanih uzoraka vode i na osnovu toga se može zaključiti da ovaj test ne mora biti deo osnovne baterije biotestova u budućim istraživanjima. Takođe, citotoksični i genotoksični efekat nije detektovan ni u testiranju nativnih uzoraka vode na HepG2 ćelijskoj liniji. Sa druge strane, visok stepen osetljivosti pokazala je ZFL ćelijska linija u ispitivanju citotoksičnog i genotoksičnog efekta LVSPE uzoraka, te se može zaključiti da su koncentrisani uzorci vode pogodni za testiranje na ćelijskim linijama. Takođe, rezultati ispitivanja uticaja LVSPE uzoraka na ćelijski ciklus ZFL ćelija pokazali su da ovaj test može pružiti informacije o mehanizmima dejstva smeša hemijskih agenasa koji se nalaze u vodenoj sredini.

U okviru pasivnog monitoringa, u *in situ* delu istraživanja, pokazano je da uklija može biti pouzdan bioindikator i da se može koristiti u ispitivanju citotoksičnog i genotoksičnog potencijala kako udaljenih, tako i prostorno bliskih lokaliteta. Primenom baterije ekogenotoksikoloških testova utvrđena je različita osetljivost odabranih biotestova. Prema dobijenim rezultatima, najviši nivo osetljivosti u diskriminaciji lokaliteta pokazao je alkalni komet test. Iako Fpg modifikovani komet test može ukazati na doprinos oksidativnog stresa na indukciju DNK oštećenja, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ovaj test nije informativniji u odnosu na klasični alkalni komet test, zbog čega ovaj test ne mora biti deo osnovne baterije biotestova u ekogenotoksikološkim istraživanjima. Mikronukleus test može biti odgovarajuća metoda za detekciju oštećenja na nivou hromozoma. Međutim, imajući u vidu da je pojava mikronukleusa u ćelijskim linijama ili u organizmima relativno redak događaj u slučaju izlaganja nativnim uzorcima vode, veći nivo diskriminacije između lokaliteta može se postići povećanjem broja analiziranih ćelija. Jedan od načina za to je primena protočne citometrije pomoću koje se može analizirati preko 10.000

dogadaja i izbeći potencijalna greška istraživača prilikom detekcije MN. Dobijeni rezultati ukazuju da RAPD analiza može biti korisna metoda u diskriminaciji lokaliteta koji su pod velikim pritiskom zagađenja u odnosu na manje zagađene lokalitete. Međutim, svakako je neophodno sprovesti dodatne studije i uvođenje novih prajmera kako bi se utvrdilo koliko je ova metoda odgovarajuća u analizi genotoksičnog potencijala u *in situ* uslovima. Sa druge strane, na osnovu dostupne literature, ova metoda može biti korisna u *ex situ* uslovima u proceni genotoksičnog efekta nakon tretmana ćelijskih linija nativnim i/ili koncentrisanim uzorcima u odnosu na kontrolnu grupu.

U skladu sa rezultatima studija u slivu Velike Morave, Save i Dunava mogu se definisati sledeće smernice za buduća ekogenotoksikološka istraživanja na velikim ravničarskim rekama:

1. Istraživanje može uključiti **analizu mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja**, jer ovi podaci mogu ukazati na uticaj otpadnih voda (komunalnih, ali i mešavine komunalnih i industrijskih otpadnih voda).
2. Istraživanja treba da uključe opsežne **hemijske analize** nativnih i koncentrisanih uzoraka vode, pre svega uzoraka sa lokaliteta za koje je detektovan odgovor biomarkera u biotestovima. Primena *in silico* analize omogućava predikciju toksičnog/genotoksičnog potencijala nativnih i koncentrisanih uzoraka vode, ali treba posebnu pažnju obratiti na odabir „referentnih vrednosti“ (PNEC, NOEC).
3. **Baterija biotestova** treba da obuhvati različite testove u *ex situ* i *in situ* uslovima u kojima se mogu pratiti različiti biomarkeri.
4. U okviru ***ex situ* pristupa**, na ćelijskim linijama može se testirati citotoksični/genotoksični potencijal koncentrisanih uzoraka rečne vode. Izbor ćelijskih linija zavisi, pre svega, od ciljeva istraživanja. Ukoliko je u pitanju ekološka studija, istraživanje bi trebalo da obuhvati, pored životinjske (relevantne), takođe i humane ćelijske linije. Sa druge strane, studije za procenu rizika po zdravlje ljudi trebalo bi da obuhvate testiranje na humanim ćelijskim linijama.
5. U okviru ***in situ* istraživanja** neophodna je karakterizacija lokaliteta, što zahteva iskustvo istraživača koje mu može pomoći da na osnovu glavnih osobina lokaliteta pretpostavi potencijalne izvore zagađenja (u zavisnosti od toga da li se u blizini nalazi naselje, industrijska postrojenja, poljoprivredne površine, da li se u blizini nalazi ušće pritoke koja bi mogla da doprinese zagađenju, itd.). U slučaju ispitivanja većeg broja lokaliteta, istraživanje je potrebno sprovesti u što kraćem vremenskom periodu kako bi se smanjila varijabilnost sredinskih faktora poput promena temperature, vodostaja, itd. koji mogu uticati na rezultate studije. Pored toga, prilikom odabira lokaliteta treba imati na umu i logističke zahteve: međusobna udaljenost lokaliteta, da li postoji prilaz lokalitetu, itd. Iako je u distertaciji *in situ* istraživanje obuhvatilo pasivni monitoring, ekogenotoksikološka istraživanja bi trebalo da uključe i/ili aktivni monitoring. U oba tipa monitoringa neophodno je odabrati odgovarajući bioindikator ili grupu bioindikatora. Ukoliko je u pasivnom monitoringu odabrana određena vrsta riba kao bioindikatora, važno je poznavati kvalitativno i kvantitativno stanje ribljeg fonda kako se izlovljavanjem ne bi narušila struktura populacije, ali isto tako i omogućilo izlovljavanje dovoljnog broja jedinki za istraživanje. Takođe, ovakav tip istraživanja zahteva određeno iskustvo u prepoznavanju uzrasnih kategorija jedinki, jer je zbog komparacije rezultata između lokaliteta važno da izlovljene jedinke na lokalitetima budu slične uzrasne kategorije. U slučaju aktivnog monitoringa, na lokalitetima se mogu izlagati laboratorijske životinje ili organizmi iz životne sredine koji su uzorkovani sa referentnih lokaliteta ili su prošli proces aklimacije u kontrolisanim uslovima. Prilikom izlaganja treba imati u vidu da određen broj jedinki može uginuti, zbog čega je neophodno uzeti u obzir i „rezervne“, odnosno potrebno je izlagati više od pet jedinki po

lokalitetu, zbog dalje statističke obrade podataka. Takođe, treba odabrati odgovarajuću veličinu kaveza u zavisnosti od izložene vrste tako da se smanji stres na najmanji mogući nivo. Na osnovu iskustva istraživača ili na osnovu drugih studija potrebno je odrediti optimalno vreme izlaganja kako bi se u jedinkama ispoljio odgovor biomarkera na uslove sredine.

6. Bez obzira na to da li se istraživanje sprovodi u *in situ* ili *ex situ* uslovima, procena genotoksičnog efekta trebalo bi da obuhvati više **analiza**. Pre svega, neophodno je izvršiti procenu citotoksičnog potencijala diferencijalnim bojenjem ili MTS/MTT testom, u zavisnosti od tipa ćelija koje se analiziraju. Zatim, baterija testova trebalo bi da uključi alkalni komet i mikronukleus test u *in vitro* i u *in vivo* istraživanjima. Pri tome, detekcija mikronukleusa se može vršiti primenom protočne citometrije koja omogućava analizu velikog broja događaja. Analiza uticaja agenasa na ćelijski ciklus može pružiti informacije o mehanizmu dejstva agenasa. Iz tog razloga, ova metoda može biti značajna u analizi citotoksičnog i/ili genotoksičnog efekta nativnih i koncentrisanih uzoraka u *ex situ* uslovima.

Pored pristupa i analiza koji su korišćeni u okviru disertacije, rezultati drugih studija su pokazale da i druge analize mogu pružiti informacije o toksičnim i genotoksičnim efektima agenasa prisutnih u vodi na akvatične organizme. Iz tog razloga, da bi se dobila kompletnija slika uticaja zagađenja, buduća istraživanja bi trebalo da uključe i:

1. Korišćenje grupa bioindikatora koji pripadaju različitim trofičkim nivoima.
2. Korišćenje više tipova ćelijskih linija (životinjskih i humanih).
3. Uvođenje *ex situ/in vivo* istraživanja koje podrazumeva korišćenje npr. embriona zebrića ili drugih organizama u kontrolisanim laboratorijskim uslovima.
4. Primena različitih analiza u kojima se prate biomarkeri efekta kao što su ekspresija gena koji su uključeni u regulisanje oksidativnog stresa, u procesima detoksifikacije metala i metaloida, koji mogu ukazati na efekte dejstva endokrinih disruptora, zatim histopatološke analize, imunohistohemija, analiza organskih polutanata, metala i metaloida u tkivima ogleđnih životinja.

ZAKLJUČCI

5 ZAKLJUČCI

U skladu sa definisanim ciljevima i rezultatima dobijenim ovoj doktorskoj disertaciji koja je obuhvatila studiju na velikim ravničarskim rekama izvedeni su sledeći zaključci i smernice:

Sliv Velike Morave

- Na osnovu prosečnih godišnjih vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara, svi lokaliteti pripadali su III klasi kvaliteta površinskih voda. Prema merenjima osnovnih fizičko-hemijskih parametara izmerenih tokom avgusta i septembra, kvalitet vode na lokalitetima varirao je od I do III klase.
- Na osnovu *in silico* analize utvrđeno je da su hemijski agensi poreklom iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda imali najveći uticaj na narušavanje kvaliteta vode na lokalitetima.
- Najviša SumTU vrednost dobijena je za lokalitet JM3, što ukazuje na njegov najveći toksični potencijal.
- U okviru *ex situ* pristupa, u SOS/*umuC* testu nije detektovan citotoksični niti genotoksični efekat nativnih uzoraka vode.
- Citotoksični i genotoksični efekat ispitivanih nativnih uzoraka vode nije detektovan ni na HepG2 ćelijskoj liniji.
- U okviru *in situ* pristupa, citotoksični efekat nije detektovan za ispitivane uzorke krvi uklija.
- U alkalnom komet testu najveći genotoksični efekat je detektovan na ćelijama krvi jedinki uzorkovanih sa lokaliteta ZM1.
- U Fpg-modifikovanom komet testu najveći udeo 8-oxo-G detektovan je u ćelijama krvi jedinki sa lokaliteta JM1.
- Korelacionom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija između TI % vrednosti dobijene u alkalnom i Fpg-modifikovanom komet testu, što ukazuje da je oksidativni stres samo jedan od uzročnika nastanka DNK oštećenja u ćelijama krvi uklija.
- U mikronukleus testu najveći genotoksični efekat detektovan je na ćelijama krvi jedinki uzorkovanih na lokalitetima VM2 i JM3.
- U jedinkama uklija koncentracije svih metala i metaloida su bile ispod MDK vrednosti, osim Fe čija je koncentracija bila viša od MDK vrednosti u jedinkama sa lokalitetima VM1, ZM1 i JM2. Na osnovu MPI vrednosti, najveći stepen zagađenja uklija metalima i metaloidima detektovan je na lokalitetu VM1.
- Najviša IBR vrednost dobijena je za lokalitete VM1 i ZM2.

Sliv Save

- Prema prosečnim godišnjim vrednostima fizičko-hemijskih i hemijskih parametara, kvalitet vode na lokalitetima je varirao od I do III klase. Na osnovu merenja osnovnih fizičko-hemijskih parametara izmerenih tokom aprila, sva tri lokaliteta su pripadala I klasi kvaliteta površinskih voda.

- U okviru in silico analize, najveći uticaj na narušavanje kvaliteta vode na lokalitetima imali su hemijski agensi poreklom iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda.
- Na osnovu SumTU vrednosti, najveći toksični potencijal vode dobijen je za lokalitet UK.
- Prema prosečnim MPN vrednostima koje su dobijene na osnovu MPN vrednosti E. coli koje su merene tokom četiri sezone indikovale su kvalitet vode na lokalitetima koji je varirao između I i V klase kvaliteta. Sa druge strane, na osnovu MPN vrednosti ukupnih koliforma i E. coli koje su izmerene tokom aprila, lokaliteti su pripadali II klasi površinskih voda.
- Odsustvo statistički značajne korelacije između MPN vrednosti ukupnih koliforma, odnosno E. coli, i hemijskih parametara detektovanih tokom sezona ukazuje da postoji više različitih izvora mikrobiološkog zagađenja.
- U okviru in situ istraživanja, citotoksični efekat je utvrđen na ćelijama krvi dve jedinke sa lokaliteta SZ i četiri sa lokaliteta UK.
- U alkalnom komet testu najveći genotoksični efekat je zabeležen na ćelijama krvi jedinki sa lokaliteta UK.
- U mikronukleus testu najveći genotoksični efekat detektovan je na ćelijama krvi jedinki uzorkovanih sa lokaliteta UB.
- U mišiću uklija koncentracije svih ispitivanih metala i metaloida bile su ispod MDK vrednosti. Prema MPI vrednostima, najveći stepen zagađenja metalima i metaloidima zabeležen je u mišiću uklija sa lokaliteta UB.
- Na osnovu RAPD analize, utvrđen je viši stepen sličnosti jedinki sa lokaliteta koji su pod visokim stepenom zagađenja, UK i UB, u odnosu na jedinke sa manje zagađenog lokaliteta, SZ. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima alkalnog komet testa.
- Najviša IBR vrednosti dobijena je za lokalitet UK.
- Najviša IPBR vrednost dobijena je za lokalitet UB koja ukazuje da je ovaj lokalitet pod najvećim pritiskom organskog zagađenja poreklom iz komunalnih otpadnih voda.

Sliv Dunava

- Na osnovu prosečnih godišnjih vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara vrednosti, kao i na osnovu osnovnih fizičko-hemijskih parametara merenih u julu, kvalitet vode na lokalitetima je varirao od II do III klase.
- In silico analiza obuhvatila je analizu podataka godišnjeg monitoringa, na osnovu kojih je utvrđeno da su hemijski agensi iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda najviše uticali na narušavanje kvaliteta vode na lokalitetima, kao i podatke hemijske analize LVSPE uzoraka, na osnovu kojih je utvrđeno da su na narušavanje kvaliteta vode lokaliteta uticali hemijski agensi iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda, kao i agensi koji se koriste u poljoprivredi.
- Prema podacima hemijskih parametara praćenih tokom godišnjeg monitoringa, najveći toksični potencijal, odnosno najviša SumTU vrednost je zabeležena za lokalitet JDS33. Na osnovu podataka hemijske analize LVSPE uzoraka, najviša SumTU vrednost dobijena je za lokalitet JDS36.

- U jedinkama poreklom sa svih obrađenih lokaliteta, detektovane su povećane koncentracije Hg i velikog broja PCB-a u poređenju sa MDK vrednostima. Najviša OPI vrednost dobijena je za lokalitet JDS37, što ukazuje da su u jedinkama sa ovog lokaliteta akumulirane najviše koncentracije analiziranih prioritetnih supstanci.
- Na osnovu MPN vrednosti E. coli izmerenih u julu, kvalitet vode na lokalitetima je varirao između klase I i III.
- Korelacionom analizom utvrđena je pozitivna zavisnost između MPI vrednosti E. coli i amonijum jona, benzo (b) fluorantena, ukupnog Pb i ukupnog Cr, je indikator uticaja mešavine komunalnih i industrijskih otpadnih voda na lokalitetima.
- U okviru ex situ istraživanja nije detektovan citotoksični i genotoksični efekat u SOS/umuC testu ni za jedan LVSPE uzorak.
- Citotoksični efekat na ZFL ćelijskoj liniji pokazali su LVSPE uzoci sa lokaliteta JDS36 (REF 75), JDS37 (REF 50), JDS40 (REF 50) i JDS41 (REF 25).
- U alkalnom komet testu najveći genotoksični efekat na ZFL ćelijskoj liniji pokazali su LVSPE uzorci sa lokaliteta JDS37(REF13) i JDS41 (REF13).
- LVSPE uzorak sa lokaliteta JDS41 (REF 13) zaustavlja ćelijski ciklus u ZFL ćelijama u G1 fazi.
- U okviru in situ istraživanja, citotoksični efekat je zabeležen na ćelijama krvi jedne jedinke sa lokaliteta JDS33 i JDS41, kao i četiri sa lokaliteta JDS36, JDS37, JDS40.
- U alkalnom komet testu najveći genotoksični efekat zabeležen je na ćelijama krvi jedinki sa lokaliteta JDS36 i JDS41.
- U mikronukleus testu detektovan je najveći genotoksični efekat na ćelijama krvi jedinki sa lokaliteta JDS37.
- Na osnovu RAPD analize utvrđen je veći stepen sličnosti između jedinki sa lokaliteta na pritokama, JDS33, JDS35 i JDS36, u odnosu na jedinke sa lokaliteta na Dunavu, JDS37, JDS40 i JDS41. Takođe, uočava se izdvajanje jedinki sa lokaliteta JDS40 u odnosu na ostala dva na Dunavu.
- Najviša IBR vrednost je zabeležena za lokaliet JDS36.

Imajući u vidu rezultate sve tri studije mogu se izvesti sledeći zaključci o **osetljivosti odabranih pristupa i analiza:**

- Predikcija genotoksičnog potencijala na osnovu in silico pristupa, radijalnim dijagramima hemijskih parametara i SumTU vrednosti, nije uvek moguća. Dobijeni rezultati, u pojedinim slučajevima (npr. za lokalitete ZM1, ZM3, JM3, JDS35) ukazuju na razliku između in silico procenjenog genotoksičnog potencijala i genotoksičnog odgovora u primenjenim biotestovima. Zbog toga, potrebno je uraditi modifikacije koje se odnose na formiranje posebnih baza podataka o prisustvu genotoksičnih agenasa u površinskim vodama. Takođe, neophodno je formiranje baza PNEC vrednosti dobijenih za različite grupe test/model sistema, kao i PNEC vrednosti koje uključuju pojedinačne PNEC vrednosti za veći broj test/model sistema.
- Standardizovani prokariotski SOS/umuC test, kao i eukariotski model, HepG2 ćelijska linija, pokazali su nizak nivo osetljivosti u in vitro ispitivanju citototoksičnog/genotoksičnog

potencijala nativnih uzoraka površinske vode. U *in vitro* ispitivanju citotoksičnog/genotoksičnog potencijala koncentrisanih uzoraka vode, SOS/umuC test pokazao je nizak nivo osetljivosti, dok eukariotski model, ZFL ćelijska linija, pokazao visok nivo osetljivosti.

- Jedinke uklija pokazuju specifičan odgovor u zavisnosti od tipa pritiska sredinskog zagađenja koji je prisutan na ispitivanim lokalitetima, kako u istraživanjima prostorno udaljenih lokaliteta (studija u slivu Velike Morave i Dunava), tako i prostorno bliskih lokaliteta (studija u slivu Save).
- Pokazano je da krioprezervacija krvi uklija na terenu ne utiče na smanjenje vijabilnosti ćelija.
- Nije utvrđena statistički značajna korelacija između TI % vrednosti detektovanih u alkalnom komet testu i učestalosti MN, kao i između vijabilnosti ćelija krvi i učestalosti HH i IRR.
- U okviru *in situ* istraživanja, primenjeni *in vivo* eko/genotoksikološki testovi na ćelijama krvi uklija su pokazali različit nivo osetljivosti u detekciji genotoksičnog efekta. Alkalni komet test pokazuje veći stepen osetljivosti u odnosu na mikronukleus test i RAPD analizu.

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu se formirati sledeće **smernice** za primenu *in vitro* i *in vivo* testova u ekogenotoksikološkim istraživanjima velikih ravničarskih reka:

- U okviru *in silico* pristupa, na osnovu hemijskih parametara i odgovarajućih PNEC/NOEC vrednosti, može se izvršiti predikcija toksičnog/genotoksičnog potencijala testiranih uzoraka vode.
- *Ex situ* istraživanje treba da uključi testiranje citotoksičnog/genotoksičnog potencijala koncentrisanih uzoraka vode na različitim organizmima i humanim ćelijskim linijama, kao i njihov uticaj na ćelijski ciklus.
- *In situ* istraživanje treba da uključi aktivni i/ili pasivni monitoring. U slučaju aktivnog monitoringa mogu se izlagati laboratorijski organizmi, organizmi uzorkovani sa „referentnih lokaliteta“ ili koji su prošli aklimaciju u kontrolisanim uslovima. Prilikom pasivnog monitoringa, za odabir indikatorske vrste riba neophodno je iskustvo istraživača u poznavanju kvalitativnog i kvantitativnog stanja ribljeg fonda i iskustvo u prepoznavanju uzrasnih kategorija jedinki.
- Neophodno je da se uzorci na adekvatan način čuvaju do analiza.
- Pre genotoksikoloških analiza neophodno je ispitati citotoksični efekat primenom odgovarajućeg testa.
- Baterija biotestova za procenu genotoksičnog potencijala u *ex situ* i/ili *in situ* uslovima treba da sadrži alkalni komet test, kao i mikronukleus test u kome se analizira veći broj jedara i ćelija.
- Poželjno je uključiti više bioindikatora na različitim trofičkim nivoima, više različitih ćelijskih linija i testiranje u *ex situ*/*in vivo* uslovima na embrionima ili laboratorijskim organizmima.
- Pored genotoksikoloških analiza, poželjno je raditi dodatne analize u kojima se prate biomarkeri efekta: ekspresija gena uključenih u regulaciju oksidativnog stresa, gena koji su uključeni u proces detoksifikacije metala, koji mogu ukazati na uticaj endokrinih disruptora,

kao i imunohistohemijske, histopatološke i analize organskih polutanata, metala i metaloida u različitim tkivima.

- Istraživanja treba da obuhvate opsežne hemijske analize nativnih i koncentrisanih uzoraka vode sa onih lokaliteta za koje je zabeležen odgovor biomarkera.

LITERATURA

6 LITERATURA

- Abbas, A., Schneider, I., Bollmann, A., Funke, J., Oehlmann, J., Prasse, C., Schulte-Oehlmann, U., Seitz, W., Ternes, T., Weber, M., Wesely, H., Wagner, M. (2019). What you extract is what you see: Optimising the preparation of water and wastewater samples for in vitro bioassays. *Water Research*, 152, 47-60.
- Abd Razak, N., Abu, N., Ho, W. Y., Zamberi, N. R., Tan, S. W., Alitheen, N. B., Lung, K., Yeap, S. K. (2019). Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., Nakano, Y. (2001). Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, 45(4-5), 487-495.
- Aborgiba, M., Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Elbahi, S., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Paunović, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2016). Flooding modifies the genotoxic effects of pollution on a worm, a mussel and two fish species from the Sava River. *Science of the Total Environment*, 540, 358-367.
- Ackerman, J., Eagles-Smith, C. (2010). Agricultural wetlands as potential hotspots for mercury bioaccumulation: experimental evidence using caged fish. *Environmental Science and Technology*, 44(4), 1451-1457.
- Adams, S. M., Ham, K. D., Greeley, M. S., LeHew, R. F., Hinton, D. E., Saylor, C. F. (1996). Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(10), 2177-2187.
- Akcha, F., Hubert, F. V., Pfohl-Leszkowicz, A. (2003). Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534, 21-32.
- Almeida, D., Stefanoudis, P. V., Fletcher, D. H., Rangel, C., da Silva, E. (2014). Population traits of invasive bleak *Alburnus alburnus* between different habitats in Iberian fresh waters. *Limnologica*, 46, 70-76.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2-3), 121-135.
- Alvim, T. T., dos Reis Martinez, C. B. (2019). Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85-93.
- Alygizakis, N. A., Urík, J., Beretsou, V. G., Kampouris, I., Galani, A., Oswaldova, M., Berendonk, T., Oswald, P., Thomaidis, N.S., Slobodnik, J., Vrana, B. Fatta-Kassinou, D. (2020). Evaluation of chemical and biological contaminants of emerging concern in treated wastewater intended for agricultural reuse. *Environment International*, 138, 105597.
- American Public Health Association, APHA (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed, American Public Health Association, Washington, D.C.

- Ashraf, W., Seddigi, Z., Abulkibash, A., Khalid, M. (2006). Levels of selected metals in canned fish consumed in Kingdom of Saudi Arabia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 117(1-3), 271-279.
- Aston, N. S., Watt, N., Morton, I. E., Tanner, M. S., Evans, G. S. (2000). Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Human and Experimental Toxicology*, 19(6), 367-376.
- Asuquo, F. E., Ewa-Oboho, I., Asuquo, E. F., Udo, P. J. (2004). Fish species used as biomarker for heavy metal and hydrocarbon contamination for Cross River, Nigeria. *Environmentalist*, 24(1), 29-37.
- Atanacković, A. (2015). Akvatične oligohete (Annelida, Clitellata, Oligochaeta) u različitim tipovima tekućih voda u Srbiji. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies. A critical review. *Mutation Research*. 613, 76–102.
- Atienzar, F. A., Cheung, V. V., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2001). Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences*, 59(2), 241-250.
- Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D., Depledge, M. (2000). Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *Biotechniques*, 28(1), 52-54.
- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 177-186.
- Bahamonde, P. A., McMaster, M. E., Servos, M. R., Martyniuk, C. J., Munkittrick, K. R. (2015). Molecular pathways associated with the intersex condition in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part B. *Aquatic Toxicology*, 159, 302-316.
- Banday, U. Z., Swaleh, S. B., Usmani, N. (2020). Heavy metal toxicity has an immunomodulatory effect on metallothionein and glutathione peroxidase gene expression in *Cyprinus carpio* inhabiting a wetland lake and a culture pond. *Chemosphere*, 126311.
- Baršienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Andreikėnaitė, L., Andersen, O. K. (2006). Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, 78, S99-S104.
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., Núñez, A. A. G., Palacio, M. J., Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment*, 650, 1779-1786.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(6), 1316-1322.

- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., Goldsmith, P. (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research*, 75(1), 18-28.
- Bervoets, L., Blust, R. (2003). Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution*, 126(1), 9-19.
- Beyer, A., Biziuk, M. (2009). Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 201, 137-158.
- Bhatia, S., Schultz, T., Roberts, D., Shen, J., Kromidas, L., Api, A. M. (2015). Comparison of cramer classification between toxtree, the OECD QSAR toolbox and expert judgment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(1), 52-62.
- Bihari, N., Vukmirović, M. I. L. E. N. A., Batel, R., Zahn, R. K. (1990). Application of the SOS umu-test in detection of pollution using fish liver S9 fraction. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 95(1), 15-18.
- Bly, J. E., Quiniou, S. M., Clem, L. W. (1997). Environmental effects on fish immune mechanisms. *Developments in Biological Standardization*, 90, 33-43.
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Soares Rocha, P., Hollert, H., 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(1-2), 11-17.
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P., Rossi, C. (2004). Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment*, 333(1-3), 127-136.
- Bonde, G. J. (1977). Bacterial indication of water pollution. *Advances in aquatic microbiology*, 273-364. Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA.
- Borgå, K., Wolkers, H., Skaare, J. U., Hop, H., Muir, D. C., Gabrielsen, G. W. (2005). Bioaccumulation of PCBs in Arctic seabirds: influence of dietary exposure and congener biotransformation. *Environmental Pollution*, 134(3), 397-409.
- Bortolotto, L. F. B., Barbosa, F. R., Silva, G., Bitencourt, T. A., Belebony, R. O., Baek, S. J., Marins, M., Fachin, A. L. (2017). Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 85, 425-433.
- Brack, W., Aissa, S. A., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B. I., Faust, M., Hilscherova, K., Hollendet, J., Hollert, H., Müller, C., Munthe, J., Posthuma, L., Seiler, B., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Tindall, A.J., de Aragão Umbuzeiro, G., Zhang, X., Altenburger, R. (2019). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-6.
- Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R. M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B. I., Hewitt, L. M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschke, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., Schymanski, E.

- L., Schulze, T., Seiler, T. B., Tindall, A. J., De Aragão Umbuzeiro, G., Vrana, B., Krauss, M. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments—an in-depth overview. *Science of the Total Environment*, 544, 1073-1118.
- Brack, W., Govender, S., Schulze, T., Krauss, M., Hu, M., Muz, M., Hollender, J., Schirmer, K., Schollee, J., Hidasi, A., Slobodnik, J., Rabova, Z., Ait-Aissa, S., Sonavane, M., Carere, M., Lamoree, M., Leonards, P., Tufi, S., Ouyang, X., Schriks, M., Thomas, K., de Almeida, A.C., Froment, J., Hammers-Wirtz, M., Ahel, M., Koprivica, S., Hollert, H., Seiler, T. B., Di Paolo, C., Tindall, A., Spirhanzlova, P. (2013). EDA-EMERGE: an FP7 initial training network to equip the next generation of young scientists with the skills to address the complexity of environmental contamination with emerging pollutants. *Environmental Sciences Europe*, 25(1), 1-7.
- Buffagni, A., Erba, S., Cazzola, M., Kemp, J. L. (2004). The AQEM multimetric system for the southern Italian Apennines: assessing the impact of water quality and habitat degradation on pool macroinvertebrates in Mediterranean rivers. In *Integrated Assessment of Running Waters in Europe*, pp. 313-329. Springer, Netherlands.
- Bundschuh, M., Goedkoop, W., Kreuger, J. (2014). Evaluation of pesticide monitoring strategies in agricultural streams based on the toxic-unit concept—experiences from long-term measurements. *Science of the Total Environment*, 484, 84-91.
- Cadet, J., Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a012559.
- Campbell, N., D'Arcy, B., Frost, A., Novotny, V., Sansom, A. (Eds.). (2005). *Diffuse pollution*. IWA publishing.
- 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.
- Capblancq, J. (1989). Special features of lake ecosystems. In: Boudo, A., Ribeyre, F. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 21–34
- Cappello, T., Pereira, P., Maisano, M., Mauceri, A., Pacheco, M., Fasulo, S. (2016). Advances in understanding the mechanisms of mercury toxicity in wild golden grey mullet (*Liza aurata*) by 1H NMR-based metabolomics. *Environmental Pollution*, 219, 139-148.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J. (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a APHA caging study. *Ecological Indicators*, 38, 104-112.
- Cederbaum, A. I., Wu, D., Mari, M., Bai, J. (2001). CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(12), 1539-1543.
- Chen, D., Lu, J., Wang, H., Shen, Y., Kimberley, M. O. (2010). Seasonal variations of nitrogen and phosphorus retention in an agricultural drainage river in East China. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2), 312-320.
- Chiang, H. C., Wang, C. Y., Lee, H. L., Tsou, T. C. (2011). Metabolic effects of CYP2A6 and CYP2A13 on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced gene mutation—a mammalian cell-based mutagenesis approach. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(2), 145-152.

- Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F. (2003). Fish as bioindicators. Trace Metals and Other Contaminants in the Environment, 6, 639-676.
- 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.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology, 26(3), 249-261.
- Collins, A. R., Dušinská, M. (2002). Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. In Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols, Humana Press, 147-159.
- Conney, A.H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Research 42: 4875-4917.
- Cooman, K., Gajardo, M., Nieto, J., Bornhardt, C., Vidal, G. (2003). Tannery wastewater characterization and toxicity effects on *Daphnia* spp. Environmental Toxicology: An International Journal, 18(1), 45-51.
- Costa, P. M., Costa, M. H. (2007). Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. Journal of Fish Biology, 71, 148-151.
- Cunha, D. L., Mendes, M. P., Marques, M. (2019). Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment. Environmental Science and Pollution Research, 26(1), 78-90.
- Dar, S. A., Yousuf, A. R., Balkhi, M. H. (2016). An introduction about genotoxicology methods as tools for monitoring aquatic ecosystem: present status and future perspectives. Fisheries and Aquaculture Journal, 7(158), 2.
- Daughton, C. G.; Ternes, T. A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. Environmental Health Perspective, 107, 907-938.
- 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 Jesus Azevedo, C. C., de Oliveira, R., Soares-Rocha, P., Sousa-Moura, D., Li, A. T., Grisolia, C. K., de Aragão Umbuzeiro, G., Montagner, C. C. (2021). Auramine dyes induce toxic effects to aquatic organisms from different trophic levels: an application of predicted non-effect concentration (PNEC). Environmental Science and Pollution Research, 28(2), 1866-1877.
- De Lemos, C. T., Rödel, P. M., Terra, N. R., de Oliveira, N. C. D. A., Erdtmann, B. (2007). River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66(3), 391-401.
- De Wit, M., Meinardi, C., Wendland, F., Kunkel, R. (2000). Modelling water fluxes for the analysis of diffuse pollution at the river basin scale. Hydrological Processes, 14(10), 1707-1723.
- Deguchi, Y., Toyozumi, T., Masuda, S., Yasuhara, A., Mohri, S., Yamada, M., Inoue, Y., Kinae, N. (2007). Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus

test and comet assay using goldfish. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 178-185.

- Deutschmann, B., Kolarevic, S., Brack, W., Kaisarevic, S., Kostic, J., Kracun-Kolarevic, M., Liska, I., Paunović, M., Seiler, B.-T., Shao, Y., Sipos, S., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Vukovic-Gacic, B., Hollert, H. (2016). Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. *Science of the Total Environment*, 573, 1441-1449.
- Du, S. N., Choi, J. A., McCallum, E. S., McLean, A. R., Borowiec, B. G., Balshine, S., Scott, G. R. (2019). Metabolic implications of exposure to wastewater effluent in bluegill sunfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 24, 108562.
- Dulio, V., van Bavel, B., Brorström-Lundén, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., Slobodnik, J., Thomas, K., Koschorreck, J. (2018). Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1-13.
- Eneji, I. S., Sha'Ato, R., Annune, P. A. (2011). Bioaccumulation of Heavy Metals in Fish (*Tilapia Zilli* and *Clarias Gariepinus*) Organs from River Benue, North-Central Nigeria. *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 12(1&2).
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G., Canli, M. (2015). Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(5), 3229-3237.
- Elrashidi, M. A., Hammer, D., Fares, A., Seybold, C. A., Ferguson, R., Peaslee, S. D. (2007). Loss of heavy metals by runoff from agricultural watersheds. *Soil Science*, 172(11), 876-894.
- European Parliament & Council (2013). Commission Regulation 2013/39/EC amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*. L226:12-17.
- European Commission (2011). Commission Regulation 2011/1259/EC. Amending regulation No 1881/2006/EC as regards maximum levels for dioxines, dioxin-like PCBs, and non-dioxin like PCBs in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L320: 18- 23.
- European Commission (2008). Commission Regulation 2008/105/EC. On environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*. L 348:84-97.
- European Commission (2006). Commission Regulation 2006/1881/EC. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L364:10-28.
- European Commission (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, L 327:1-72.
- European Commission (1998). Council Directive 1998/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Union*. 10-23.

- Fallah A.A., Saei-Dehkordi S.S., Nematollahi A., Jafari T. (2011). Comparative study of heavy metal and trace element accumulation in edible tissues of farmed and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using ICP-OES technique. *Microchemical Journal*, 98: 275-279.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534, 65-75.
- Fent, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology In Vitro*, 15(4-5), 477-488.
- Feretti, D., Acito, M., Dettori, M., Ceretti, E., Fatigoni, C., Posadino, S., Zerbini, I., Villarini, M., Moretti, M., Castiglia, P., Azara, A. (2020). Genotoxicity of source, treated and distributed water from four drinking water treatment plants supplied by surface water in Sardinia, Italy. *Environmental Research*, 185, 109385.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359-370.
- Field, K. G., Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research*, 41(16), 3517-3538.
- Franco, S. G., Dominguez, G., Pico, J. C. (1999). Alternatives in the induction and preparation of phenobarbital/naphthoflavone-induced S9 and their activation profiles. *Mutagenesis*, 14(3), 323-326.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 80-92.
- Fulton, T. W. (1911). *The Sovereignty of the Sea: An Historical Account of the Claims of England to the Dominion of the British Seas, and of the Evolution of the Territorial Waters, with Special Reference to the Rights of Fishing and the Naval Salute*. William Blackwood and Sons, Edinburgh, 1911.
- Gajski, G., Gerić, M., Žegura, B., Novak, M., Nunić, J., Bajrektarević, D., Garaj-Vrhovac, V., Filipič, M. (2016). Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14739-14750.
- Gavrilović Lj., Dukić D. (2002). *Reke Srbije, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, Srbija*.
- Ghosh, C., Zhou, Y. L., Collodi, P. (1994). Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biology and Toxicology*, 10(3), 167-176.
- Godish, T. (2001). *Indoor environmental quality (1st ed.)*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers. 110-30.
- Grossman, E. (2013). Nonlegacy PCBs: pigment manufacturing by-products get a second look. *Environmental Health Perspectives*. 121 (3): a86-a93.

- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1(1), 55-63.
- Hagger, J. A., Atienzar, F. A., Jha, A. N. (2005). Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 205-217.
- Hecker, M., Hollert, H. (2009). Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 16:607–613.
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, Ph., MacGregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), 277-291.
- Heddle, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 18(2), 187-190.
- Henrikus, S. S., van Oijen, A. M., Robinson, A. (2018). Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways. *Current Genetics*, 64(6), 1189-1196.
- Henry, T. B. (2015). Ecotoxicology of polychlorinated biphenyls in fish—a critical review. *Critical Reviews in Toxicology*, 45(8), 643-661.
- Hideo, S., Takeshi, K., Tsuneo, I., Kozo, M., Atsuo, N. (1983). Cloning and characterization of the umu operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Gene*, 23(2), 167-174.
- Higley, E., Grund, S., Jones, P. D., Schulze, T., Seiler, T. B., Varel, U. L. V., Brack, W., Wolz, J., Ziekle, H., Giesy, J. P., Hollert, H., Hecker, M. (2012). Endocrine disrupting, mutagenic, and teratogenic effects of upper Danube River sediments using effect-directed analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(5), 1053-1062.
- Hooftman, R. N., De Raat, W. K. (1982). Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research Letters*, 104(1-3), 147-152.
- <https://echa.europa.eu/>
- <https://www.ifiske.se/en/fish-common-bleak.htm>
- <https://www.norman-network.com>
- <https://www.norman-network.com/nds/ecotox/>
- <https://www.norman-network.com/nds/empodat/chemicalSearch.php>
- Huang, G. Y., Liu, Y. S., Chen, X. W., Liang, Y. Q., Liu, S. S., Yang, Y. Y., Hu, L.-X., Shi, W. – J., Tian, F., Zhao, J.-L., Chen, J., Ying, G.-G. (2016). Feminization and masculinization of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) observed in rivers impacted by municipal wastewaters. *Scientific Reports*, 6, 20884.
- Huang, J., Huang, Y., Zhang, Z. (2014). Coupled effects of natural and anthropogenic controls on seasonal and spatial variations of river water quality during baseflow in a coastal watershed of Southeast China. *PloS One*, 9(3), e91528.

- Ionescu, P., Deak, G., Diacu, E., Radu, V. M. (2016). Assessment of heavy metal levels in water, sediment and fish from Plumbuita Lake, Romania. *Revista de Chimie (Bucharest)*, 67(11), 2148-2150.
- Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J. I., Gil, J., Millan, T. (2002). Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4), 643-651.
- Irving, R. M., Elfarra, A. A. (2012). Role of reactive metabolites in the circulation in extrahepatic toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 8(9), 1157-1172.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Russo, C., Kundi, M., Žegura, B., Novak, M., Filipič, M., Mišik, M., Knasmueller, S., de Alda, M. L., Barceló, D., Žonja, B., Česen, M., Ščančar, J., Kosjek, T., Heat, E. (2016). Chemical and toxicological characterisation of anticancer drugs in hospital and municipal wastewaters from Slovenia and Spain. *Environmental Pollution*, 219, 275-287.
- ISO 9308-2 (2012) Water Quality - Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria - Part 2: Most Probable Number Method. Geneva: International Standards Organization.
- ISO/CD, 13829 (2000). Water Quality – Determination of the Genotoxicity of Water and Waste Water Using Umu-Test.
- Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 338.
- Jaszczur, M., Bertram, J. G., Robinson, A., van Oijen, A. M., Woodgate, R., Cox, M. M., Goodman, M. F. (2016). Mutations for worse or Better: Low-Fidelity DNA synthesis by SOS DNA polymerase V is a tightly regulated Double-Edged sword. *Biochemistry*, 55(16), 2309-2318.
- Javed, M., Ahmad, I., Usmani, N., Ahmad, M. (2016). Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. *Chemosphere*, 151, 210-219.
- Jin, X., Chen, Q., Tang, S. S., Zou, J. J., Chen, K. P., Zhang, T., Xiao, X. L. (2009). Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. *Toxicology In Vitro*, 23(7), 1209-1214.
- Jovanović Marić, J. J., Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Sunjog, K., Kostić-Vuković, J., Deutschmann, B, Hollert, H., Tenji, D., Paunović, M., Vuković-Gačić, B (2020). Selection of assay, organism, and approach in biomonitoring significantly affects the evaluation of genotoxic potential in aquatic environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(27), 33903-33915.
- Jovanović, J., Kolarević, S., Milošković, A., Radojković, N., Simić, V., Dojčinović, B., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Kostić, J., Sunjog, K., Timiljić, J., Djordjević, J., Gačić, Z., Žegura, B., Vuković-Gačić, B. (2018). Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin *in vitro* and *in situ*. *Science of the Total Environment*, 621, 1289-1299.
- Kacar, A. (2011). Analysis of spatial and temporal variation in the levels of microbial fecal indicators in the major rivers flowing into the Aegean Sea, Turkey. *Ecological Indicators*, 11(5), 1360-1365.

- 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.
- Kamataki, T., Fujita, K. I., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Miyamoto, M., Ariyoshi, N. (2002). Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: application of genetically engineered *Salmonella* expressing human CYP. *Drug Metabolism Reviews*, 34(3), 667-676.
- Kang, J. H., Aasi, D., Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(7), 607-625.
- Katagi, T. (2010). Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-132.
- Kaur, R., Dua, A. (2015). 96 h LC50, behavioural alterations and histopathological effects due to wastewater toxicity in a freshwater fish *Channa punctatus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 5100-5110.
- Kaushik, P., Kaushik, G. (2007). An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides. *Journal of Hazard Mater*, 143:102–111.
- Kermer, R., Hedrich, S., Bellenberg, S., Brett, B., Schrader, D., Schoenherr, P., Köpcke, M., Siewer, K., Günther, N., Gehrke, T., Sand, W., Räuchle, K., Bertau, M., Heide, G., Weitkämper, L., Wotruba, H., Ludwig, H. M., Partusch, R., Schippers, A., Reichel, S., Glombitza, F., Janneck, E. (2017). Lignite ash: Waste material or potential resource- Investigation of metal recovery and utilization options. *Hydrometallurgy*, 168, 141-152.
- Khan, S., Anas, M., Malik, A. (2019). Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. *Toxicology Reports*, 6, 193-201.
- Kidd, K., Clayden, M., Jardine, T. (2012). Bioaccumulation and biomagnification of mercury through food webs. *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*. Wiley, Hoboken, 455-499.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), 370-375.
- King-Heiden, T. C., Mehta, V., Xiong, K. M., Lanham, K. A., Antkiewicz, D. S., Ganser, A., Heideman, W., Peterson, R. E. (2012). Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1-2), 121-138.
- Kirschner, A. K. T., Reischer, G. H., Jakwerth, S., Savio, D., Ixenmaier, S., Toth, E., Sommer, R., Mach, R. L., Elier, A., Kolarević, S., Farnleitner, A. H. (2017). Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. *Water Research*, 124, 543-555.
- Kirschner, A. K., Kavka, G. G., Velimirov, B., Mach, R. L., Sommer, R., Farnleitner, A. H. (2009). Microbiological water quality along the Danube River: integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network. *Water Research*, 43(15), 3673-3684.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M.,

- Kirschner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153-163.
- Kittinger, C., Baumert, R., Folli, B., Lipp, M., Liebmann, A., Kirschner, A., Farnleitner, A. H., Grisold, A. J., Zarfel, G. E. (2015). Preliminary toxicological evaluation of the River Danube using *in vitro* bioassays. *Water*, 7(5), 1959-1968.
- Kleinow, K. M., Melancon, M. J., Lech, J. J. (1987). Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives*, 71, 105.
- Kolarević S., Kračun-Kolarević M., Jovanović Marić, J., Oswald, P., Oswaldova, M., Slobodnik, J., Divac Rankov, A., Paunović, M., Vuković-Gačić, B., Kološa, K., Žegura, B. (2021). Analysis of genotoxic activity of the JDS4 surface water samples collected by Horizon large volume solid-phase extraction technique. In: Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodník, J., Paunovic, M. (eds.) (2021). *Joint Danube Survey 4 Scientific Report: A Shared Analysis of the Danube River*. International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, pp. 457-464.
- Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Kostić-Vuković, J., Jovanović, J., Simonović, P., Simić, V., Piria, M., Gačić, Z., Lendhardt, M., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2018). The Genetic Variability (RAPD) and Genotoxicity In Vivo (Alkaline and Fpg-Modified Comet Assay) in Chub (*Squalius cephalus*): The Sava River Case Study. *International Journal of Environmental Research*, 12(5), 703-712.
- Kolarević, S., Aborgiba, M., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Simonović, P., Simić, V., Milošković, A., Reischer, G., Farnleitner, A., Gačić, Z., Milačić, R., Zuliani, T., Vidmar, J., Pergal, M., Piria, M., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2016a). Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. *PloS one*, 11(9).
- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2016b). Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Science of the Total Environment*, 540, 377-385.
- Kolarević, S. (2014). Primena komet testa na slatkovodnim školjkama *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758), *Unio timidus* (Philipsson, 1788) i *Sinanodnonta woodiana* (Lea, 1834) u ekogenotoksikološkoj proceni akvatičnih ekosistema. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Korkmaz, C., Ay, Ö., Ersoysal, Y., Köroğlu, M. A., Erdem, C. (2019). Heavy metal levels in muscle tissues of some fish species caught from north-east Mediterranean: Evaluation of their effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 81, 1-9.
- Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Aborgiba, M., Gačić, Z., Paunović, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Rašković, B., Poleksić, V., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2017). The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. *Science of the Total Environment*, 601, 1670-1681.
- Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Aborgiba, M., Gačić, Z., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2016). Genotoxicity assessment of the Danube River using tissues of freshwater bream (*Abramis brama*). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20783-20795.

- Kostić-Vuković, J. (2018). Procena kvaliteta površinske vode na osnovu mikrobioloških parametara i ekogenotoksikoloških i histopatoloških analiza tkiva deverike *Abramis brama* (L., 1758), krupatice *Blicca bjoerkna* (L., 1758) i crnooke deverike *Ballerus sapa* (P., 1814). Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Kottelat, M., Freyhof, J. (2007). Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 646.
- Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Jovanović, J., Marković, V., Ilić, M., Simonović, P., Simić, V., Gačić, Z., Diamantini, E., Stella, E., Petrović, M., Majone, B., Bellin, A., Paunović M., Vuković-Gačić (2016). Evaluation of genotoxic potential throughout the upper and middle stretches of Adige river basin. *Science of the Total Environment*, 571, 1383-1391.
- Kumar, A., Kesari, V. P., Khan, P. K. (2013). Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals*, 26(2), 337-346.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53-64.
- Lachner, D., Oliveira, L. F., Martinez, C. B. (2015). Effects of the water soluble fraction of gasoline on ZFL cell line: Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress. *Toxicology In Vitro*, 30(1), 225-230.
- Langton, C. G. (1989). Artificial life: Proceedings of an Interdisciplinary Workshop on the Synthesis and Simulation of Living Systems. Santa Fe Institute Studies in the Science of Complexity. Proceedings, 10, Redwood City, California, Addison-Wesley.
- Leonard, R. A. (1990). Movement of pesticides into surface waters. *Pesticides In the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling*, 2, 303-349.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 319-327.
- Li, L., Zheng, B., Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences* 2, 1510-1524.
- Liao, P. Y., Liu, C. W., Liu, W. Y. (2016). Bioaccumulation of mercury and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in salty water organisms. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(1), 1-15.
- Libralato, G., Annamaria, V. G., Francesco, A. (2010). How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1602-1611.
- Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., Novo, L. A., de Albuquerque, C., Moreira, J. C. (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental Pollution*, 156(3), 974-979.
- Linden, E., Bengtsson, B. E., Svanberg, O., Sundström, G., Board, N. S. E. P. (1979). The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, 8(11-12), 843-851.

- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 209-214.
- Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R., Azqueta, A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 28(4), 427-432.
- Lu, W. Q., Chen, D., Wu, X. J., Liu, A. L., Liu, H., Wu, J. J., Mersch-Sundermann, V. (2004). DNA damage caused by extracts of chlorinated drinking water in human derived liver cells (HepG2). *Toxicology*, 198(1-3), 351-357.
- Lynch, M. (1991). Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*, 113-126.
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7(5), 478-484.
- Macey, M. G. (2007). Principles of Flow cytometry. *Flow Cytometry*, 1-17. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Madhav, S., Ahamad, A., Singh, A. K., Kushawaha, J., Chauhan, J. S., Sharma, S., Singh, P. (2020). Water pollutants: sources and impact on the environment and human health. In *Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material*, 43-62. Springer, Singapore.
- Marabini, L., Frigerio, S., Chiesara, E., Radice, S. (2006). Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells. *Water Research*, 40(2), 267-272.
- Marković V., Tomović J., Atanacković A., Kračun-Kolarević M., Ilić M., Nikolić V., Paunović M. (2014). Macroinvertebrate communities along the Velika Morava River. *Turkish Journal of Zoology* 39: 210-224.
- Marković V., Atanacković A., Tubić B., Vasiljević B., Simić V., Tomović J., Nikolić V., Paunović M. (2011). Indicative status assessment of the Velika Morava River based on aquatic macroinvertebrates. *Water Research and Management* 1(3): 47- 53.
- Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., Marques, C. R. (2012). Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 1167-1176.
- Masese, F. O., Omukoto, J. O., Nyakeya, K. (2013). Biomonitoring as a prerequisite for sustainable water resources: a review of current status, opportunities and challenges to scaling up in East Africa. *Ecohydrology and Hydrobiology*, 13(3), 173-191.
- Maslowska, K. H., Makiela-Dzubska, K., Fijalkowska, I. J (2019). The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(4), 368-384.
- Maurya, P. K., Malik, D. S. (2019). Bioaccumulation of heavy metals in tissues of selected fish species from Ganga river, India, and risk assessment for human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(4), 905-923.
- McDaniels, A. E., Reyes, A. L., Wymer, L. J., Rankin, C. C., Stelma, G. N. (1990). Comparison of the Salmonella (Ames) test, umu tests, and the SOS chromotests for detecting genotoxins. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16(3), 204-215.

- Merciai, R., Guasch, H., Kumar, A., Sabater, S., García-Berthou, E. (2014). Trace metal concentration and fish size: variation among fish species in a Mediterranean river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 154-161.
- Milošković, A., Milošević, Đ., Radojković, N., Radenković, M., Đuretanić, S., Veličković, T., Simić, V. (2018). Potentially toxic elements in freshwater (*Alburnus* spp.) and marine (*Sardina pilchardus*) sardines from the Western Balkan Peninsula: An assessment of human health risk and management. *Science of the Total Environment*, 644, 899-906.
- Milošković, A., Dojčinović, B., Kovačević, S., Radojković, N., Radenković, M., Milošević, D., Simić, V. (2016). Spatial monitoring of heavy metals in the inland waters of Serbia: a multispecies approach based on commercial fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9918-9933.
- Minguez, L., Halm-Lemeille, M. P., Costil, K., Bureau, R., Lebel, J. M., Serpentine, A. (2014). Assessment of cytotoxic and immunomodulatory properties of four antidepressants on primary cultures of abalone hemocytes (*Haliotis tuberculata*). *Aquatic Toxicology*, 153, 3-11.
- Møller, P., Möller, L., Godschalk, R. W., Jones, G. D. (2010). Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis*, 25(2), 109-111.
- Moutschen, J. (1985) Introduction to genetic toxicology, John Wiley and Sons Press, New-York.
- Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J. L. (2004). Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry. *Science of the Total Environment*, 321(1-3), 59-69.
- Naji-Ali, F., Hasspieler, B. M., Haffner, D., Adeli, K. (1994). Human bioassays to assess environmental genotoxicity: development of a DNA repair assay in HepG2 cells. *Clinical Biochemistry*, 27(6), 441-448.
- Nakamura, S. I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., Sugimoto, K. (1987). SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutation Research Letters*, 192(4), 239-246.
- Neale, P. A., Ait-Aissa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M. S., Deutschmann, B., Hilscherová, K., Hollert, H., Krauss, M., Novák, J., Schulze, T., Seiler, T.B., Serra, H., Shao, Y., Escher, B. I. (2015). Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. *Environmental Science and Technology*, 49(24), 14614-14624.
- Nguyen, H. L., Braun, M., Szaloki, I., Baeyens, W., Van Grieken, R., Leermakers, M. (2009). Tracing the metal pollution history of the Tisza River through the analysis of a sediment depth profile. *Water, Air, and Soil Pollution*, 200(1), 119-132.
- Nikolaou, A. D., Golfinopoulos, S. K., Kostopoulou, M. N., Kolokythas, G. A., Lekkas, T. D. (2002). Determination of volatile organic compounds in surface waters and treated wastewater in Greece. *Water Research*, 36(11), 2883-2890.
- Nnane, D. E., Ebdon, J. E., Taylor, H. D. (2011). Integrated analysis of water quality parameters for cost-effective faecal pollution management in river catchments. *Water Research*, 45(6), 2235-2246.

- Novak, M., Žegura B., Modic B., Heath E., Filipič M. (2017). Cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drug residues and their mixtures in experimental model with zebrafish liver cells. *Science of The Total Environment*, 601, 293-300.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W. S. (2011). Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(2), 314-322.
- Ocokoljić M. (1997). Visinsko zoniranje voda u slivu Velike Morave i neki aspekti njihove zaštite. Srpsko geografsko društvo, Beograd.
- Olive, P. L., Banáth, J. P. (1995). Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research*, 221(1), 19-26.
- Oliveira, M., Ahmad, I., Maria, V. L., Pacheco, M., Santos, M. A. (2010). Monitoring pollution of coastal lagoon using *Liza aurata* kidney oxidative stress and genetic endpoints: an integrated biomarker approach. *Ecotoxicology*, 19(4), 643-653.
- 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.
- Palsson, B. (2000). The challenges of in silico biology. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1147-1150.
- Pandey, G. (2013). Overview of fish cell lines and their uses. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2, 580-590.
- Pandey, R. K., Singh, R. N., Singh, S., Singh, N. N., Das, V. K. (2009). Acute toxicity bioassay of dimethoate on freshwater airbreathing catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Environmental Biology* 30(3):437–440.
- Paunović M., Tomović J., Kovačević S., Zorić K., Žganec K., Simić V., Atanacković A., Marković V., Kračun M., Hudina S., Lajtner J., Gottstein S., Lucić A. (2012). Macroinvertebrates of the Natural Substrate of the Sava River – Preliminary Results. *Water Research and Management* 2(4): 33-39.
- Paunović, M., Jakovčev-Todorović, D., Simić, V., Stojanović, B., Cakić, P. (2007). Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429-925), *Biologia*, Bratislava, 62, 1-9.
- Pezdirč, M., Žegura, B., Filipič, M. (2013). Genotoxicity and induction of DNA damage responsive genes by food-borne heterocyclic aromatic amines in human hepatoma HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 386-394.
- Phillips, D. J., Philip, S. (1994). *Rainbow, Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Environmental Management Series, Chapman and Hall, London.
- Pivnenko, K., Olsson, M. E., Götze, R., Eriksson, E., Astrup, T. F. (2016). Quantification of chemical contaminants in the paper and board fractions of municipal solid waste. *Waste Management*, 51, 43-54.
- Posthuma, L., van Gils, J., Zijp, M. C., van de Meent, D., de Zwart, D. (2019). Species sensitivity distributions for use in environmental protection, assessment, and management of aquatic

- ecosystems for 12 386 chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 905-917.
- Pozarowski, P., Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Checkpoint Controls and Cance*, 301-311. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Preisner, M. (2020). Surface water pollution by untreated municipal wastewater discharge due to a sewer failure. *Environmental Processes*, 7(3), 767-780.
- Radetski, C. M., Ferrari, B., Cotellet, S., Masfaraud, J. F., Ferard, J. F. (2004). Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment*, 333(1-3), 209-216.
- Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, 355-367.
- 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.
- Rajeshkumar, S., Liu, Y., Ma, J., Duan, H. Y., Li, X. (2017). Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish and Shellfish Immunology*, 70, 461-472.
- RHMZ (2016). Hidrološki godišnjak. Površinske vode za 2016. godinu. Republički hidrometeorološki zavod Republike Srbije.
- RHMZ (2019). Hidrološki godišnjak. Površinske vode za 2019. godinu. Republički hidrometeorološki zavod Republike Srbije.
- Rocha, P. S., Deutschmann, B., Hollert, H. (2019). In situ determination of genotoxic effects in fish erythrocytes using comet and micronucleus assays. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. DOI 10.1007/7653_2019_40
- Rodgers, P., Soulsby, C., Hunter, C., Petry, J. (2003). Spatial and temporal bacterial quality of a lowland agricultural stream in northeast Scotland. *Science of the Total Environment*, 314, 289-302.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(3), 442-448.
- Rosenberg, D.M. (1998). A national aquatic ecosystem health program for Canada: We should go against the flow. *Bulletin of Entomology Society, Canada*, 30(4), 144-152.
- Rosenberg, D.M., Resh, V. H. (1993). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York
- Runnalls, T. J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A. P., Sumpter, J. P. (2013). Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environmental Science and Technology*, 47(4), 2077-2084.
- Rygg, B. (1986). Heavy-metal pollution and log-normal distribution of individuals among species in benthic communities. *Marine Pollution Bulletin*, 17(1), 31-36.

- Sakan, S., Đorđević, D., Manojlović, D., Predrag, P. (2009). Assessment of heavy metal pollutants accumulation in the Tisza river sediments. *Journal of environmental management*, 90(11), 3382-3390.
- 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.
- Samanta, P., Im, H., Na, J., Jung, J. (2018). Ecological risk assessment of a contaminated stream using multi-level integrated biomarker response in *Carassius auratus*. *Environmental Pollution*, 233, 429-438.
- Samardžić, M. (2013). Vremensko i prostorno rasprostranjenje zagađivača u slivu Velike Morave. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Sánchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S. (2009). Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Science of the Total Environment*, 407(13), 4157-4167.
- Sánchez, E., Colmenarejo, M. F., Vicente, J., Rubio, A., García, M. G., Travieso, L., Borja, R. (2007). Use of the water quality index and dissolved oxygen deficit as simple indicators of watersheds pollution. *Ecological Indicators*, 7(2), 315-328.
- Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology*, 35(6), 461-478.
- Schmidt, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research* 31:9-15.
- Schnurstein, A., Braunbeck, T. (2001). Tail moment versus tail length—application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2), 187-196.
- Schonn, I., Hennesen, J., Dartsch, D. C. (2010). Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis*, 15(2), 162-172.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*, 158(5), 1461-1466.
- Segner, H. (1998). Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *Fish Ecotoxicology*, 1-38. Birkhäuser, Basel.
- SEPA (2015). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2015. godinu. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine.
- SEPA (2018). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2018. godinu. Ministarstvo zaštite životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(11), 537-546.
- Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental Research*, 137, 246-255.

- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., Paules, R. S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environmental Health Perspectives*, 107(suppl 1), 5-24.
- Shao, Y., Hollert, H., Tarcai, Z., Deutschmann, B., Seiler, T. B. (2019). Integrating bioassays, chemical analysis and in silico techniques to identify genotoxicants in surface water. *Science of The Total Environment*, 650, 3084-3092.
- Shi, X., Du, Y., Lam, P. K., Wu, R. S., Zhou, B. (2008). Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(1), 23-32
- Shinn, C., Dauba, F., Grenouillet, G., Guenard, G., Lek, S. (2009). Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river lot in southern France. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1957-1965.
- Shiogiri, N. S., Ikefuti, C. V., Carraschi, S. P., da Cruz, C., Fernandes, M. N. (2017). Effects of azithromycin on tilapia (*Oreochromis niloticus*): health status evaluation using biochemical, physiological and morphological biomarkers. *Aquaculture Research*, 48(7), 3669-3683.
- Shugart, L., Theodorakis, C. (1998). New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy*, 11(2-3), 119-127.
- Simonović, P. (2001). Ribe Srbije. NNK International, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Zavod za zaštitu prirode Srbije. pp 131-133.
- 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(1), 184-191.
- Službeni glasnik RS (2016). Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje br. 67/2011, 48/2012, 1/2016.
- Službeni glasnik RS (2014). Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja br. 29/2014.
- Službeni glasnik RS (2014). Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje br. 24/2014.
- Službeni glasnik RS (2012). Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sediment i rokovima za njihovo dostizanje br. 50/2012.
- Službeni glasnik RS (2011). Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda br. 74/2011.
- Smith, I. R. (1990). Erythrocytic micronuclei in wild fish from Lakes Superior and Ontario that have pollution-associated neoplasia. *Journal of Great Lakes Research*, 16(1), 139-142.
- SPSS Inc. (2011). IMB SPSS statistics for Windows, version 20.0. Inc., Chicago, IL, USA
- Sprague, J. B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research*, 4(1), 3-32.
- Sprague, J. B., Ramsay, B. A. (1965). Lethal levels of mixed copper–zinc solutions for juvenile

salmon. Journal of the Fisheries Board of Canada, 22(2), 425-432.

- StatSoft Inc. (2007) STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa OK: StatSoft, Inc. <http://www.statsoft.com>.
- Stammers, M., Harris, J., Evans, G. M., Hayward, M. D., Forster, J. W. (1995). Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity*, 74(1), 19-27.
- Stein, J. E., Collier, T. K., Reichert, W. L., Casillas, E., Hom, T., Varanasi, U. (1992). Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 11(5), 701-714.
- Stoddard, J., Larsen, D., Hawkins, C., Johnson, R., Norris, R. (2006). Setting expectations for the ecological condition of streams: the concept of reference condition. *Ecological Applications*, 16(4), 1267-1276.
- Štraser, A., Filipič, M., Novak, M., Žegura, B. (2013). Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells. *Marine Drugs*, 11(8), 3077.
- Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B. (2011). Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Archives of Toxicology*, 85(12), 1617-1626.
- Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1), A-3B.
- Sun, Y., Ji, F., Liu, R., Lin, J., Xu, Q., Gao, C. (2012). Interaction mechanism of 2-aminobenzothiazole with herring sperm DNA. *Journal of Luminescence*, 132(2), 507-512.
- 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 metalloids concentration (ICP-OES) and genotoxicity (comet assay). *Environmental Pollution*, 213, 600-607.
- 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>.
- Talapatra, S. N., Banerjee, S. K. (2007). Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food and Chemical Toxicology*, 45(2), 210-215.
- Tenji, D., Micic, B., Sipos, S., Miljanovic, B., Teodorovic, I., Kaisarevic, S. (2020). Fish biomarkers from a different perspective: evidence of adaptive strategy of *Abramis brama* (L.) to chemical stress. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 1-15.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.

- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., di Paolo, C., Tarcai, Z., Seiler, T. B., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, A., Schollée, J. E., Hollender, J., Suter, M. J. F., Hidasi, A. O., Schirmer, K., Sonavane, M., Ait-Aissa, S., Creuso, N., Brion, F., Fromen, J., Almeida, A. C., Thomas, K., Tollefsen, K. E., Tuf, S., Ouyang X., Leonards, P., Lamoree, M., Torrens V. O., Kolkman, A., Schriks, M., Spirhanzlova, P., Tindall, A., Schulze, T. (2017). European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Science of the Total Environment*, 601, 1849-1868.
- Tsangaris, C., Hatzianestis, I., Catsiki, V. A., Kormas, K. A., Stroglyoudi, E., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F. (2011). Active biomonitoring in Greek coastal waters: application of the integrated biomarker response index in relation to contaminant levels in caged mussels. *Science of the Total Environment*, 412, 359-365.
- Tuna, A. L., Yilmaz, F., Demirak, A., Ozdemir, N. (2007). Sources and distribution of trace metals in the Saricay stream basin of southwestern Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 125(1), 47-57.
- Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201-204.
- Ullah, S., Zorriehzahra, M. J. (2015). Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(1), 40-57.
- Un, F. (2007). G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anti-cancer Drugs*, 18(4), 411-417.
- Usero, J., Gonzalez-Regalado, E., Gracia, I. (1997). Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Environment International*, 23(3), 291-298.
- Vargas, V. M. F., Migliavacca, S. B., de Melo, A. C., Horn, R. C., Guidobono, R. R., de Sá Ferreira, I. C. F., Pestana, M. H. D. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490(2), 141-158.
- Von der Ohe, P. C., De Zwart, D. (2013). Toxic units (TU) indicators. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, 2, 1161e1170.
- Vrzel, J., Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Gačić, Z., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Aborgiba., M., Farnleitner, A., Reischer, G., Linke, R., Ogrinc, N. (2016). Determination of the sources of nitrate and the microbiological sources of pollution in the Sava River Basin. *Science of the Total Environment*, 573, 1460-1471.
- Vuković, Ž., Marković, L., Radenković, M., Vuković, D., Stanković, S. (2011). Heavy metal and bacterial pollution of the Sava River in Serbia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 62(1), 11-15.
- Vystavna, Y., Le Coustumer, P., Huneau, F. (2013). Monitoring of trace metals and pharmaceuticals as anthropogenic and socio-economic indicators of urban and industrial impact on surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 3581-3601.
- Wang, X., Liu, Z., Wang, W., Zhang, C., Chen, L. (2015). Derivation of predicted no effect concentration (PNEC) for HHCB to terrestrial species (plants and invertebrates). *Science of*

the Total Environment, 508, 122-127.

- Wang, C., Lu, G. H., Song, W. T., Xu, S., Wang, P. F. (2010). Integrated biomarker response index for the assessment of environmental stress of the Yangtze River (Nanjing section). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), 1069-1078.
- Ward, D., Nislow, K., Folt, C. (2010). Bioaccumulation syndrome: identifying factors that make some stream food webs prone to elevated mercury bioaccumulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195, 62.
- Waters, M. D., Stack, H. F., Jackson, M. A. (1999). Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 437(1), 21-49.
- Weiss, J. M., Simon, E., Stroomberg, G. J., de Boer, R., de Boer, J., van der Linden, S. C., Leonards, P. E. G., Lamoree, M. H. (2011). Identification strategy for unknown pollutants using high-resolution mass spectrometry: Androgen-disrupting compounds identified through effect-directed analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(9), 3141-3149.
- Weis, J. S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P. (2001). Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences: killifish from a contaminated site are slow to capture prey and escape predators; altered neurotransmitters and thyroid may be responsible for this behavior, which may produce population changes in the fish and their major prey, the grass shrimp. *AIBS Bulletin*, 51(3), 209-217.
- Weller, M. G. (2012). A unifying review of bioassay-guided fractionation, effect-directed analysis and related techniques. *Sensors*, 12(7), 9181-9209.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24), 7213-7218.
- Wernersson, A. S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, DG, J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C. D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R. N., Gawlik, B. M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., Kase, R., Buchinger, S. (2015). Technical report on aquatic effect-based monitoring tools. European Commission.
- WHO (1958). International standards for drinking-water. World Health Organisation, Geneva (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43845/1/a91160.pdf?ua=1>).
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(8), 1035-1042.
- Willman, E. J., Manchester-Neesvig, J. B., Armstrong, D. E. (1997). Influence of ortho-substitution on patterns of PCB accumulation in sediment, plankton, and fish in a freshwater estuary. *Environmental Science and Technology*, 31(12), 3712-3718.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.

- Williams, W. P. (1965). The population density of four species of freshwater fish, roach (*Rutilus rutilus* (L.)), bleak (*Alburnus alburnus* (L.)), dace (*Leuciscus leuciscus* (L.)) and perch (*Perca fluviatilis* L.) in the River Thames at Reading. *The Journal of Animal Ecology*, 173-185.
- Yi, Y. J., Zhang, S. H. (2012). Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(9), 3989-3996.
- Yilmaz F., Özdemir N., Demirak A., Tuna L. (2007). Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry*, 100: 830-835.
- Zakhama-Sraieb, R., Sghaier, Y. R., Hmida, A. B., Cappai, G., Carucci, A., Charfi-Cheikhrouha, F. (2016). Variation along the year of trace metal levels in the compartments of the seagrass *Posidonia oceanica* in Port El Kantaoui, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1681-1690.
- Zareitalabad, P., Siemens, J., Hamer, M., Amelung, W. (2013). Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater—A review on concentrations and distribution coefficients. *Chemosphere*, 91(6), 725-732.
- Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipič, M. (2009). Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*, 75(11), 1453-1460.
- Zhang, G., Pan, Z., Wang, X., Mo, X., Li, X. (2015). Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(4), 173.
- Zhou, L., Li, J., Lin, X., Al-Rasheid, K. A. (2011). Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). *Aquatic Toxicology*, 103(3-4), 225-232.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 135-150.
- Zhou, Q., Xiao, J., Wang, W., Liu, G., Shi, Q., Wang, J. (2006). Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector. *Talanta*, 68(4), 1309-1315.

PRILOZI

7 PRILOZI

PRILOG 1

Tabela 1. Prikaz hemijskih parametara detektovanih na odabranim lokalitetima u slivu Velike Morave tokom 2015. godine (sr. vrednost \pm SD). Podaci su preuzeti iz SEPA baze.

Hemijski parameteri/ Lokaliteti	Jedinica	RS	RI	VM1	VM2	JM1	JM2	JM3	ZM1	ZM2	ZM3
Antimon (Sb)	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,413 \pm 0,764$	$1,20 \pm 1,178$	0,300	$0,517 \pm 0,801$	0,829	$0,588 \pm 0,564$	$0,380 \pm 0,850$
Olovo (Pb) - rastvoreno	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,233 \pm 0,572$	$0,464 \pm 0,727$	$1,142 \pm 1,641$	$0,133 \pm 0,400$	$2,24 \pm 4,716$	n.d.	$0,245 \pm 0,618$	$0,300 \pm 0,735$
Živa (Hg) - rastvoreno	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,017 \pm 0,058$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Antimon (Sb) - rastvoreno	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$1,667 \pm 1,422$	$0,300 \pm 0,671$	$0,3 \pm 0,671$	$0,867 \pm 0,619$	$0,450 \pm 0,000$	n.d.
Bor (B) - rastvoreno	$\mu\text{g/l}$	33,10	n.d.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	$30,07 \pm 40,87$	$47,10 \pm 66,61$	n.m.
Ugljovodonici iz nafte	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,003 \pm 0,007$	$0,004 \pm 0,007$	$0,002 \pm 0,005$	$0,003 \pm 0,007$	$0,009 \pm 0,007$	0,004	0,008	$0,016 \pm 0,022$
Fenolni indeks	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,001 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0,001$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
para-terc- oktilfenol	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,001 \pm 0,002$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-n-nonilfenol	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,001 \pm 0,002$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Atrazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,006 \pm 0,006$	n.d.	$0,003 \pm 0,003$	$0,001 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0,002$	$0,003 \pm 0,003$	n.d.
Simazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	0,001	n.d.	n.d.	n.d.	$0,001 \pm$	$0,004 \pm$	n.d.

									0,003	0,003	
Terbutrin	µg/l	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,003	n.d.	n.d.	n.d.	0,003 ± 0,003	n.d.
Deetilatrazin	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dezetilterbuti- lazin	µg/l	n.d.	n.d.	0,002 ± 0,002	0,004 ± 0,005	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,002	n.d.
Terbutilazin	µg/l	n.d.	n.d.	0,005 ± 0,002	0,018 ± 0,04	0,002 ± 0,003	0,004 ± 0,006	0,004 ± 0,007	0,002 ± 0,002	0,008 ± 0,012	n.d.
Acetohlor	µg/l	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,002	0,015 ± 0,037	0,001 ± 0,005	0,009 ± 0,013	0,028 ± 0,066	n.d.	0,005 ± 0,014	n.d.
Metolahlor	µg/l	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,002	n.d.	0,002 ± 0,002	0,005 ± 0,005	0,004 ± 0,005	n.d.	0,002 ± 0,003	n.d.
Diuron	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,002	n.d.	0,002 ± 0,004	n.d.	n.d.	n.d.
Izoproturon	µg/l	n.d.	n.d.	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,001	n.d.	0,001	0,010	n.d.
o,p'-DDT	µg/l	n.d.	n.d.	0,0001 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo (k) fluoranten	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fluoranten	µg/l	n.d.	n.d.	0,0001 ± 0,001	0,001	n.d.	0,001 ± 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kadmium (Cd) - rastvoren	µg/l	0,034 ± 0,029	0,004 ± 0,010	0,012 ± 0,027	0,073 ± 0,056	0,064 ± 0,049	0,042 ± 0,030	0,036 ± 0,028	0,011 ± 0,000	0,020 ± 0,020	0,057 ± 0,029
Nitriti (NO ₂ - N)	mg/l	0,015 ± 0,007	0,008 ± 0,005	0,025 ± 0,010	0,031 ± 0,016	0,085 ± 0,011	0,050 ± 0,007	0,062 ± 0,016	0,037 ± 0,040	0,036 ± 0,024	0,055 ± 0,010
Živa (Hg)	µg/l	n.d.	0,008 ± 0,029	0,014 ± 0,038	0,018 ± 0,06	n.d.	n.d.	n.d.	0,033 ± 0,079	0,050 ± 0,00	n.d.

Aktivne anjonske subs.	µg/l	0,023 ± 0,028	0,009 ± 0,014	0,034 ± 0,051	0,021 ± 0,017	0,031 ± 0,042	0,015 ± 0,021	0,031 ± 0,029	0,023 ± 0,026	0,004 ± 0,000	0,025 ± 0,027
Kadmijum (Cd)	µg/l	0,083 ± 0,104	0,029 ± 0,034	0,064 ± 0,070	0,392 ± 0,739	0,349 ± 0,195	0,180 ± 0,100	0,282 ± 0,544	0,036 ± 0,044	0,036 ± 47,466	0,130 ± 0,115
Ortofosfati (PO ₄ -P)	mg/l	0,060 ± 0,031	0,031 ± 0,009	0,067 ± 0,027	0,094 ± 0,039	0,108 ± 0,012	0,079 ± 0,01	0,086 ± 0,018	0,061 ± 0,030	0,090 ± 0,033	0,082 ± 0,019
Ukupna beta radioaktivnost	µg/l	0,139 ± 0,078	0,058 ± 0,026	0,113 ± 0,000	0,153 ± 0,000	0,305 ± 0,047	n.m.	0,222 ± 0,000	0,097 ± 0,000	0,066 ± 0,005	0,148 ± 0,000
Amonijum joni (NH ₄ -N)	mg/l	0,084 ± 0,036	0,069 ± 0,089	0,121 ± 0,068	0,159 ± 0,069	0,139 ± 0,030	0,104 ± 0,038	0,112 ± 0,028	0,169 ± 0,159	0,153 ± 0,089	0,101 ± 0,023
Ukupni fosfor (P)	mg/l	0,157 ± 0,114	0,082 ± 0,044	0,171 ± 0,041	0,184 ± 0,055	0,294 ± 0,074	0,199 ± 0,071	0,304 ± 0,237	0,148 ± 0,094	0,169 ± 0,164	0,212 ± 0,132
Kobalt (Co) - rastvoren	µg/l	n.d.	0,083 ± 0,204	n.d.	0,150 ± 0,278	0,213 ± 0,403	n.d.	0,300 ± 0,335	n.d.	0,100 ± 0,000	0,240 ± 0,336
Bakar (Cu) - rastvoren	µg/l	0,483 ± 0,755	0,100 ± 0,346	0,883 ± 0,731	2,356 ± 3,217	0,700 ± 1,067	0,767 ± 0,758	2,730 ± 4,485	3,336 ± 3,516	2,660 ± 3,057	0,450 ± 1,102
Arsen (As) - rastvoren	µg/l	0,433 ± 0,404	0,111 ± 0,220	1,075 ± 1,242	3,250 ± 2,581	3,530 ± 3,288	0,967 ± 1,471	1,875 ± 1,746	0,390 ± 0,468	0,956 ± 0,980	3,933 ± 3,763
Hrom (Cr) - ukupno rastvoren	µg/l	0,325 ± 0,650	0,117 ± 0,286	1,050 ± 1,104	1,627 ± 1,755	0,808 ± 1,908	0,278 ± 0,376	1,100 ± 2,178	0,875 ± 1,288	0,855 ± 0,735	2,133 ± 2,589
Nikl (Ni) - rastvoren	µg/l	18,367	0,208 ± 0,150	1,100 ± 1,027	3,827 ± 1,967	1,575 ± 1,064	0,478 ± 0,476	1,280 ± 1,346	1,217 ± 1,402	3,000 ± 2,470	4,000 ± 1,637
Nitrati (NO ₃ -N)	µg/l	0,791 ± 0,207	0,250 ± 0,198	0,900 ± 0,340	1,167 ± 0,494	1,767 ± 0,436	1,225 ± 0,176	1,283 ± 0,259	0,758 ± 0,417	1,018 ± 0,525	1,300 ± 0,209
Kobalt (Co)	µg/l	n.d.	0,288 ± 0,323	0,300 ± 0,356	0,700 ± 0,896	1,525 ± 0,403	0,900 ± 1,093	0,600 ± 0,540	0,488 ± 0,000	0,820 ± 0,473	0,500 ± 0,574
Olovo (Pb)	µg/l	1,367 ± 2,052	0,400 ± 0,757	3,271 ± 2,698	4,536 ± 3,971	13,042 ± 7,316	6,756 ± 5,813	12,790 ± 25,548	1,625 ± 2,448	1,358 ± 48,729	3,417 ± 4,311

Arsen (As)	µg/l	1,150 ± 0,164	0,433 ± 0,700	3,171 ± 2,085	4,185 ± 1,199	6,550 ± 2,433	2,733 ± 1,246	4,020 ± 4,660	1,250 ± 0,912	1,750 ± 0,960	6,183 ± 1,524
Organski azot (N)	mg/l	0,727 ± 0,672	0,683 ± 0,467	1,210 ± 0,725	1,117 ± 0,554	1,133 ± 0,781	0,525 ± 0,454	0,692 ± 0,309	1,058 ± 0,444	1,525 ± 0,597	1,041 ± 0,275
Ukupni azot (N)	mg/l	1,627 ± 0,709	1,050 ± 0,472	2,280 ± 0,529	2,467 ± 0,448	3,142 ± 1,201	1,917 ± 0,455	2,158 ± 0,417	2,033 ± 0,284	2,658 ± 0,309	2,483 ± 0,286
Nikl (Ni)	µg/l	3,283 ± 2,897	1,458 ± 2,130	5,357 ± 2,666	11,518 ± 5,441	6,733 ± 3,376	3,744 ± 2,243	8,600 ± 13,161	4,945 ± 3,306	8,683 ± 3,220	22,367 ± 39,928
Kalijum (K +)	mg/l	2,056 ± 1,165	1,518 ± 0,676	3,860 ± 1,383	3,510 ± 1,425	8,250 ± 4,718	5,140 ± 2,658	3,489 ± 1,046	2,450 ± 1,241	2,508 ± 1,355	3,144 ± 1,229
Biološka potrošnja kiseonika (BPK ₅)	mg/l	2,127 ± 0,759	1,850 ± 0,438	2,090 ± 0,899	2,658 ± 0,941	3,567 ± 0,446	2,758 ± 0,443	3,375 ± 1,046	2,042 ± 0,530	2,117 ± 0,430	2,917 ± 0,801
Hrom (Cr) - ukupni	µg/l	1,867 ± 3,071	2,042 ± 4,751	10,414 ± 12,937	5,609 ± 3,871	3,692 ± 3,632	3,456 ± 2,946	8,000 ± 15,597	7,750 ± 12,503	4,442 ± 2,847	6,433 ± 10,269
Bakar (Cu)	µg/l	3,150 ± 1,420	2,217 ± 1,325	5,000 ± 3,098	11,727 ± 22,483	4,750 ± 2,426	4,889 ± 2,723	8,380 ± 9,137	9,125 ± 3,937	9,775 ± 31,215	3,933 ± 3,008
Cink (Zn) - rastvoren	µg/l	1,950 ± 2,758	2,425 ± 2,677	5,920 ± 8,955	11,000 ± 8,139	18,627 ± 12,388	6,478 ± 9,670	23,386 ± 28,053	6,250 ± 0,000	3,775 ± 4,876	10,600 ± 7,388
Ukupni organski ugljenik (TOC)	mg/l	5,073 ± 2,295	2,908 ± 1,194	7,230 ± 2,669	7,225 ± 3,913	5,758 ± 3,059	4,792 ± 2,120	5,600 ± 2,879	3,575 ± 1,287	5,058 ± 2,092	4,483 ± 1,596
Hemijska potrošnja kiseonika (KMnO ₄)	mg/l	3,527 ± 1,186	3,242 ± 0,436	4,250 ± 1,386	4,492 ± 1,553	6,183 ± 0,57	4,733 ± 0,810	5,900 ± 2,526	3,725 ± 0,519	3,792 ± 0,380	4,983 ± 1,248
Rastvoreni silikati (SiO ₂)	mg/l	6,633 ± 1,240	4,956 ± 1,138	11,900 ± 4,395	11,100 ± 3,603	17,125 ± 2,869	12,644 ± 1,988	11,656 ± 5,121	9,938 ± 1,166	12,056 ± 1,767	10,422 ± 4,261
Natrijum	mg/l	8,800 ±	5,282 ±	13,850 ±	14,500 ±	37,083 ±	20,550 ±	15,900 ±	7,075 ±	8,900 ±	10,422 ±

(Na ⁺)		3,086	3,191	4,367	4,773	21,075	10,434	7,799	3,912	3,531	3,233
Hloridi (Cl ⁻)	µg/l	16,270 ± 7,799	5,892 ± 4,161	14,960 ± 4,467	14,675 ± 6,283	15,775 ± 5,290	13,475 ± 5,038	11,458 ± 3,293	11,592 ± 11,665	11,150 ± 2,484	10,967 ± 2,108
Magnezijum (Mg ²⁺)	mg/l	13,091 ± 3,807	9,750 ± 3,166	15,800 ± 4,894	19,000 ± 4,748	22,583 ± 6,868	13,750 ± 3,671	14,833 ± 3,689	11,909 ± 3,807	14,667 ± 4,658	14,917 ± 3,450
Hemijska potrošnja kiseonika (K ₂ Cr ₂ O ₇)	mg/l	14,818 ± 6,493	9,917 ± 6,171	17,556 ± 8,308	17,667 ± 13,310	14,545 ± 3,778	14,167 ± 5,016	17,583 ± 7,051	9,417	13,417 ± 3,801	14,583 ± 4,582
Sulfati (SO ₄)	mg/l	18,364 ± 3,414	11,917 ± 5,600	26,000 ± 7,888	32,833 ± 7,882	46,250 ± 25,111	27,667 ± 8,026	24,500 ± 5,266	16,750 ± 3,745	24,167 ± 6,118	25,917 ± 4,757
Aluminijum (Al) - rastvoren	µg/l	2,340 ± 5,232	13,171 ± 13,295	14,233 ± 13,560	10,625 ± 18,490	12,500 ± 19,421	3,900 ± 8,721	9,267 ± 10,681	20,588 ± 17,825	3,014 ± 0,000	6,220 ± 9,291
Mangan (Mn) - rastvoren	µg/l	8,569 ± 13,435	17,167 ± 19,899	10,417 ± 12,737	9,745 ± 18,849	38,242 ± 65,551	14,556 ± 20,887	52,400 ± 118,631	9,142 ± 10,332	2,990 ± 0,000	6,333 ± 25,720
Cink (Zn)	µg/l	26,367 ± 35,029	20,397 ± 20,284	33,400 ± 28,105	30,882 ± 23,619	62,783 ± 50,15	44,956 ± 32,361	54,720 ± 72,325	38,025 ± 33,555	24,442 ± 15,669	29,317 ± 30,527
Bor (B)	µg/l	25,460± 6,266	34,850 ± 23,053	56,750 ± 13,821	82,113 ± 34,161	250,250 ± 94,969	110,720 ± 23,308	85,383 ± 45,274	38,525 ± 30,726	63,538 ± 38,018	75,980 ± 19,133
Gvožđe (Fe) - rastvoreno	µg/l	18,900 ± 27,293	38,183 ± 31,425	118,067 ± 195,192	47,936 ± 73,556	127,750 ± 205,820	155,189 ± 75,756	157 ± 261,113	84,092 ± 148,680	92 ± 154,116	61,150 ± 115,542
Mangan (Mn)	µg/l	47,283 ± 65,754	41,192 ± 23,992	73,443 ± 39,329	146,536 ± 69,578	308,367 ± 159,809	122,289 ± 75,756	324,910 ± 648,022	68,233 ± 77,620	45,592 ± 29,603	62,567 ± 53,030
Kalcijum (Ca ²⁺)	mg/l	62,273 ± 12,330	52,333 ± 6,906	52,700 ± 9,358	56,750 ± 13,081	82,083 ± 25,914	51 ± 15,545	53,833 ± 14,540	52,500 ± 10,492	58,917 ± 6,960	55,500 ± 7,728

Aluminijum (Al)	mg/l	102,720 ± 22,587	157,575 ± 145,391	118,925 ± 98,189	492,90 ± 526,271	1280,1 ± 1162,585	808,960 ± 1275,695	378,983 ± 357,255	252,113 ± 473,530	286,375 ± 445,562	199,400 ± 220,253
Ukupno rastvorene materije	mg/l	234,818 ± 32,363	177,250 ± 41,286	239,200 ± 30,432	254,250 ± 41.707	363,667 ± 109,665	302,958 ± 54,767	243,417 ± 59,534	199 ± 44,167	216,667 ± 28,153	246,667 ± 34,945
Elektroprovo- djivost	μS/cm ³	398,182 ± 59,457	295,333 ± 68,869	404,100 ± 48,679	428,750 ± 71,918	607,917 ± 186,406	378,167 ± 95,232	406,750 ± 102,607	332,750 ± 72,545	360,583 ± 46,245	412,083 ± 60,662
Gvožđe (Fe)	μg/l	306,73 ± 351,64	355,93 ± 277,49	1157,57 ± 1474,17	1243,30 ± 1014,23	2621,49 ± 1666,89	2029,70 ± 1906,78	2640,05 ± 4145,59	877,20 ± 1111,98	837,47 ± 893,87	857,15 ± 1293,15

n.d.-nije detektovano; n.m.-nije mereno.

Tabela 2. Prikaz prosečnih vrednosti hemijskih parametara koji su detektovani na minimum jednom lokalitetu u slivu Velike Morave (podaci iz 2015. godine, preuzeti od SEPA) na osnovu kojih su dobijene SumTU vrednosti za ispitivane lokalitete; PNEC vrednosti su preuzete iz baze podataka NORMAN udruženja i agencije ECHA; crevenom su označene prosečne koncentracije koje su više u odnosu na PNEC vrednosti.

Hemijski parametri ($\mu\text{g/l}$)	PNEC ($\mu\text{g/l}$)	VM1	VM2	ZM1	ZM2	ZM3	JM1	JM2	JM3
Benzo(b)fluo-ranten	0,017	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0003 \pm 0,0001	n.d.
Benzo(k)fluo-ranten	0,017	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0003 \pm 0,0001	n.d.
Fluoranten	0,0063	0,0003 \pm 0,001	0,001 \pm 0	0,0003 \pm 0	0,0001 \pm 0	n.d.	0,0004 \pm 0,0001	0,001 \pm 0,001	0,0003 \pm 0
4-n-nonilfenol	0,27	0,000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001 \pm 0,002	n.d.	n.d.
para-terc-oktilfenol	0,1	n.d.	0,001 \pm 0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0003 \pm 0
Atrazin	0,6	n.d.	0,006 \pm 0,006	0,001 \pm 0,002	0,003 \pm 0,003	n.d.	n.d.	0,003 \pm 0,003	0,001 \pm 0,002
Simazin	1	n.d.	0,001 \pm 0	0,001 \pm 0,003	0,004 \pm 0,003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Terbutrin	0,065	0,001 \pm 0,002	0,001 \pm 0,002	n.d.	0,003 \pm 0,003	n.d.	0,001 \pm 0,003	n.d.	n.d.
Desetilatrazin	8,29	n.d.	n.d.	n.d.	0,0002 \pm 0,00001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Desetilterbuti-lazin	0,25	0,002 \pm 0,002	0,004 \pm 0,005	0,001 \pm 0,001	0,003 \pm 0,002	n.d.	0,001 \pm 0,001	0,001 \pm 0,001	0,001 \pm 0,002
Terbutilazin	0,06	0,005 \pm 0,002	0,018 \pm 0,04	0,002 \pm 0,002	0,008 \pm 0,012	n.d.	0,002 \pm 0,003	0,004 \pm 0,006	0,004 \pm 0,007
Acetohlor	11,8	0,001 \pm 0,002	0,015 \pm 0,037	0,000	0,005 \pm 0,014	0,000	0,001 \pm 0,005	0,009 \pm 0,013	0,028 \pm 0,066
Metolahlor	0,2	0,001 \pm	n.d.	n.d.	0,0023 \pm	n.d.	0,002 \pm	0,005 \pm 0,005	0,004 \pm

		0,002			0,003		0,002		0,005
Izoproturon	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,002	n.d.	0,002 ± 0,004
Diuron	0,2	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0	0,01	n.d.	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0	n.d.
Živa (Hg)- rastvorena	0,057	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,017 ± 0,058	n.d.	n.d.
Gvožđe (Fe)- rastvoreno	1000	118,067 ± 195,192	47,936 ± 73,556	84,092 ± 148,68	92 ± 154,116	61,15 ± 115,542	127,75 ± 205,82	155,189 ± 75,756	157 ± 261,113
Mangan (Mn)- rastvoreni	34	10,417 ± 12,737	9,745 ± 18,849	9,142 ± 10,332	2,99 ± 0	6,333 ± 25,72	38,242 ± 65,551	14,556 ± 20,887	52,4 ± 118,631
Cink (Zn)-rastvoreni	17	5,92 ± 8,955	11 ± 8,139	6,25 ± 0	3,775 ± 4,876	10,6 ± 7,388	18,627 ± 12,388	6,478 ± 9,67	23,386 ± 28,053
Bakar (Cu)-rastvoreni	11	0,883 ± 0,731	2,356 ± 3,217	3,336 ± 3,516	2,66 ± 3,057	0,45 ± 1,102	0,7 ± 1,067	0,767 ± 0,758	2,73 ± 4,485
Hrom (Cr)-rastvoreni	3,4	1,05 ± 1,104	1,627 ± 1,755	0,875 ± 1,288	0,855 ± 0,735	2,133 ± 2,589	0,808 ± 1,908	0,278 ± 0,376	1,1 ± 2,178
Olovo (Pb)-rastvoreno	2,4	0,233 ± 0,572	0,464 ± 0,727	n.d.	0,245 ± 0,618	0,3 ± 0,735	1,142 ± 1,641	0,133 ± 0,4	2,24 ± 4,716
Kadmijum (Cd)- rastvoreni	0,19	0,012 ± 0,027	0,073 ± 0,056	0,011 ± 0	0,02 ± 0,02	0,057 ± 0,029	0,064 ± 0,049	0,042 ± 0,03	0,036 ± 0,028
Nikl (Ni)-rastvoreni	6	1,1 ± 1,027	3,827 ± 1,967	1,217 ± 1,402	3 ± 2,47	4 ± 1,637	1,575 ± 1,064	0,478 ± 0,476	1,28 ± 1,346
Aluminijum (Al)- rastvoreni	550	14,233 ± 13,560	10,625 ± 18,490	20,588 ± 17,825	3,014 ± 0	6,22 ± 9,291	12,5 ± 19,421	3,9 ± 8,721	9,267 ± 10,681
Kobalt (Co)- rastvoreni	0,62	n.d.	0,15 ± 0,278	n.d.	0,1 ± 0	0,24 ± 0,336	0,213 ± 0,403	n.d.	0,3 ± 0,335
Antimon (Sb)- rastvoreni	1770	n.d.	n.d.	0,867 ± 0,619	0,45 ± 0	n.d.	1,667 ± 1,422	0,3 ± 0,671	0,3 ± 0,671

									<i>Prilozi</i>
Arsen (As)-rastvoreni	5,6	1,075 ± 1,242	3,25 ± 2,581	0,39 ± 0,468	0,956 ± 0,98	3,933 ± 3,763	3,53 ± 3,288	0,967 ± 1,471	1,875 ± 1,746
Sum TU		3,25	5,16	3,10	3,20	4,72	5,18	3,17	6,91

*n.d.-nije detektovano; n.m.-nije mereno.

Tabela 3. Prikaz ukupne dužine, težine i kondicionog indeksa uzorkovanih jedinki uklija (sr. vrednost \pm SE); različita slova označavaju statistički značajnu razliku (korišćeni testovi: one-way ANOVA sa Tukey's post-hoc; $p < 0,05$).

Lokaliteti	Br. jedinki	Ukupna dužina (cm)	Masa (g)	Kondicioni indeks
RS	5	11,0 \pm 1,6	11,4 \pm 0,5	0,89 \pm 0,09
VM1	6	13,7 \pm 2,4	12,4 \pm 1,0	0,56 \pm 0,05 ^a
VM2	6	11,8 \pm 2,1	12,9 \pm 0,5	0,55 \pm 0,07 ^a
ZM1	5	10,3 \pm 2,5	10,9 \pm 1,0	0,80 \pm 0,09 ^{bc}
ZM2	6	11,1 \pm 1,1	10,7 \pm 0,8	0,70 \pm 0,07 ^{ac}
ZM3	6	9,8 \pm 2,6	11,1 \pm 1,1	0,71 \pm 0,09 ^{ac}
JM1	6	13,3 \pm 3,6	12,3 \pm 1,1	0,70 \pm 0,07 ^{ac}
JM2	6	9,5 \pm 2,3	10,8 \pm 0,7	0,75 \pm 0,10 ^{bc}
JM3	6	11,2 \pm 1,6	12,6 \pm 1,1	0,57 \pm 0,14 ^a

Tabela 4. Koncentracije metala i metaloida u jedinkama uklija sa lokaliteta sliva Velike Morave izraženih u mg/kg wbc (srednja vrednost \pm SE); n.d. – nije detektovano u uzorku; različita slova označavaju statistički značajnu razliku između lokaliteta (korišćeni testovi: Kruskal Wallis i Mann Whitney U sa Dunn-Boniferroni korekcijom, $p < 0,001$).

	RS	VM1	VM2	ZM1	ZM2	ZM3	JM1	JM2	JM3
Al	5,83 \pm 3,76 ^a	72,89 \pm 160,69 ^a	7,12 \pm 11,39 ^a	23,81 \pm 22,94 ^a	3,01 \pm 3,01 ^a	11,84 \pm 25,76 ^a	13,8 \pm 8,49 ^a	29,53 \pm 31,73 ^a	11,96 \pm 7,01 ^a
As	0,066 \pm 0,069	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cd	0,001 \pm 0,001 ^a	0,006 \pm 0,008 ^{ab}	0,001 \pm 0,002 ^a	0,009 \pm 0,009 ^b	0,010 \pm 0,010 ^b	0,004 \pm 0,004 ^{ab}	0,011 \pm 0,014 ^b	0,010 \pm 0,004 ^b	0,005 \pm 0,005 ^{ab}
Co	0,0020 \pm 0,004 ^a	0,0005 \pm 0,001 ^a	0,0010 \pm 0,001 ^a	0,1200 \pm 0,019 ^a	nd	0,0065 \pm 0,016 ^a	nd	0,0110 \pm 0,015 ^a	nd
Cr	0,17 \pm 0,02 ^a	0,51 \pm 0,60 ^{ac}	0,23 \pm 0,07 ^{ab}	0,48 \pm 0,16 ^c	0,25 \pm 0,08 ^{ab}	0,46 \pm 0,40 ^{bc}	0,27 \pm 0,04 ^{bc}	0,29 \pm 0,20 ^{ab}	0,31 \pm 0,05 ^b
Cu	0,49 \pm 0,07 ^{ab}	1,13 \pm 0,38 ^c	1,07 \pm 0,33 ^c	1,35 \pm 0,84 ^c	0,76 \pm 0,28	0,47 \pm 0,13 ^{abc}	0,26 \pm 0,09 ^{ab}	0,51 \pm 0,13 ^{ab}	0,65 \pm 0,13 ^{abc}
Fe	11,01 \pm 3,43 ^{ab}	70,41 \pm 139,06 ^c	11,78 \pm 13,37 ^c	33,74 \pm 21,43 ^c	12,04 \pm 4,79 ^a	18,55 \pm 28,51 ^{bc}	29,86 \pm 15,92 ^{ab}	46,42 \pm 44,56 ^{ab}	21,21 \pm 8,23 ^{abc}
Hg	0,04 \pm 0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mn	3,37 \pm 1,20 ^a	6,79 \pm 5,52 ^a	4,28 \pm 3,07 ^a	8,09 \pm 3,39 ^a	5,22 \pm 2,08 ^a	5,16 \pm 2,97 ^a	5,89 \pm 3,44 ^a	7,08 \pm 4,26 ^a	5,73 \pm 2,76 ^a
Ni	0,047 \pm 0,033 ^a	0,350 \pm 0,800 ^{abc}	0,027 \pm 0,066 ^{ac}	0,150 \pm 0,150 ^a	0,012 \pm 0,016 ^{abc}	0,103 \pm 0,24 ^b	0,004 \pm 0,009 ^{bc}	0,036 \pm 0,060 ^{ab}	nd
Pb	0,014 \pm 0,014 ^a	0,100 \pm 0,210	0,020 \pm 0,040	0,120 \pm 0,160 ^{ab}	0,245 \pm 0,232 ^b	0,145 \pm 0,100 ^b	0,077 \pm 0,059 ^{ab}	0,070 \pm 0,070 ^{ab}	0,018 \pm 0,021 ^a
Se	0,28 \pm 0,02 ^a	0,44 \pm 0,09 ^{ab}	0,40 \pm 0,05 ^b	0,69 \pm 0,05 ^c	0,56 \pm 0,08 ^{abcd}	0,43 \pm 0,09 ^{ab}	0,54 \pm 0,12 ^{abcdef}	0,46 \pm 0,06 ^{abcde}	0,55 \pm 0,08 ^{abc}
Sn	0,009 \pm 0,003 ^a	0,410 \pm 0,190 ^b	0,310 \pm 0,250	0,137 \pm 0,110 ^{bc}	0,160 \pm 0,140 ^{bc}	0,046 \pm 0,049 ^{abcd}	0,110 \pm 0,072 ^{bc}	0,080 \pm 0, 100 ^{abcde}	0,073 \pm 0,110 ^{abcd}
Zn	35,42 \pm 13,87 ^a	39,60 \pm 7,46 ^a	46,53 \pm 10,03 ^a	52,40 \pm 8,61 ^a	46,41 \pm 7,90 ^a	44,63 \pm 8,38 ^a	58,37 \pm 15,12 ^a	44,14 \pm 18,28 ^a	23,24 \pm 12,63 ^a
MPI	0,16	0,99	0,27	0,77	0,61	0,46	0,60	0,54	0,73

PRILOG 2

Tabela 1. Vrednosti hemijskih parametara koji su detektovani tokom aprila/maja 2019. godine (podaci preuzeti iz baze GZZJZ, Beograd).

Parametri	Jedinica	Lokaliteti		
		SZ	UK	UB
BPK ₅	mg/l	1,6	2,8	6,1
HPK (KMnO ₄)	mg/l	1,7	3,0	40
Amonijačni azot (NH ₄ -N)	mg/l	0,06	0,23	5,88
Nitrati (NO ₃ ⁻ /N)	mg/l	0,9	1,2	1,6
Nitriti (NO ₂ ⁻ /N)	mg/l	0,022	0,036	0,201
Hloridi (Cl ⁻)	mg/l	21,1	10,5	27,5
Ortofosfati	mg/l	n.d.	n.d.	n.m.
Sulfati (SO ₄ ²⁻)	mg/l	22,3	28,9	72,5
Ukupni azot (N)	mg/l	1	1,5	23,4
Ukupni fosfati (P)	mg/l	0,044	0,036	1,99
As	µg/l	n.m.	3	4
Cu	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.
Zn	µg/l	2	5	5
Cr	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.
Fe	µg/l	n.m.	n.m.	n.m.
Ni	µg/l	2	n.m.	5

*n.m. – nije mereno, n.d. – nije detektovano

Tabela 2. Prosečne vrednosti (sr. vrednost \pm SE) hemijskih parametara za period 2017 – 2019 godina (preuzeto od GZZJZ Beograd); crvene vrednosti označavaju IV ili V klasu kvaliteta vode (Službeni glasnik RS“, broj 74/2011).

Paramteri	Jedinica	Lokaliteti		
		SZ	UK	UB
BPK ₅	mg/l	1,21 \pm 0,11	2,35 \pm 0,23	12,63\pm6,77
HPK (KMnO ₄)	mg/l	2,41 \pm 0,16	4,27 \pm 0,33	15,91 \pm 2,98
Amonijačni azot (NH ₄ -N)	mg/l	0,09 \pm 0,05	0,26 \pm 0,04	14,70\pm3,57
Nitrati (NO ₃ ⁻ /N)	mg/l	0,93 \pm 0,05	1,42 \pm 0,07	0,76 \pm 0,25
Nitriti (NO ₂ ⁻ /N)	mg/l	0,016 \pm 0,002	0,076 \pm 0,008	0,093 \pm 0,026
Hloridi (Cl ⁻)	mg/l	21,17 \pm 1,49	15,91 \pm 0,72	57,84 \pm 4,44
Ortofosfati	mg/l	0,001 \pm 0,002	0,024 \pm 0,003	0,511\pm0,118
Sulfati (SO ₄ ²⁻)	mg/l	19,12 \pm 0,79	36,22 \pm 2,04	69,41 \pm 3,86
Ukupni azot (N)	mg/l	1,04 \pm 0,07	1,99 \pm 0,17	19,83 \pm 2,72
Ukupni fosfati (P)	mg/l	0,049 \pm 0,004	0,070 \pm 0,006	1,386\pm0,243
As	μg/l	n.d.	5,5 \pm 0,7	3,7 \pm 0,1
Cu	μg/l	n.d.	16,4 \pm 3,4	n.d.
Zn	μg/l	9,5 \pm 5,3	19,8 \pm 5,4	40,1 \pm 18,0
Cr	μg/l	n.d.	23,9 \pm 9,4	n.d.
Fe	mg/l	n.d.	6,6 \pm 8,4	n.d.
Ni	μg/l	5,7 \pm 3,2	6,9 \pm 1,3	n.d.

*n.d. – nije detektovano

Tabela 3. Prikaz koncentracija organskih zagađujućih supstanci za period 2017-2019 na lokalitetima SZ, UK, UB (podaci preuzeti od GZZJZ, Beograd); n.d.- nije detektovano, n.m.-nije mereno.

Lokalitet	Tip jedinjenja	Jedinjenje (µg/l)	maj 2017	sep.2 017	maj.2 018	sep.2 018	maj.2 019	sep.2 019
SZ	Pesticidi, GC/MSD	Acetohlor	n.d.	n.d.	n.m.	n.d.	n.d.	n.d.
		Desetilterbutilazin	n.d.	n.m.	0,015	n.m.	0,009	n.m.
		DEET (N,N-dietil-m-toluamid)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Metolahlor	n.d.	n.d.	0,123	n.d.	0,193	n.m.
		Metalaksil	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Piperonil butoksid	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Terbutilazin	n.d.	n.d.	0,122	n.d.	n.d.	n.m.
		Terbutilazin-desetil	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Tiametoksan	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Imidakloprid	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	
	Polihlorovani bifenili PCB GC/MSD	Ukupni polihlorovani bifenili	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.m.
	Policiklični aromatični ugljovodonici GC/MSD	Fenantren	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Fluoranten	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Naftalen	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Piren	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Ukupni policiklični aromatični ugljovodonici	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Lakoisparljiva organska jedinjenja GC/MSD/PT	Hloroform	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Toluol		n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	
UK	Pesticidi, GC/MSD	Acetohlor	n.d.	n.m.	0,016	n.d.	n.m.	n.d.
		Desetil terbutilazin	0,019	n.m.	0,251	n.m.	n.m.	n.m.
		DEET (N,N-dietil-m-toluamid)	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Metolahlor	0,186	n.d.	5,62	n.d.	n.m.	n.m.
		Metalaksil	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Piperonil butoksid	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.

	Terbutilazin	0,164	n.d.	3,257	n.d.	n.m.	n.m.
	Terbutilazin-desetil	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Tiametoksan	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Imidakloprid	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Polihlorovani bifenili PCB GC/MSD	Ukupni polihlorovani bifenili	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Fenantren	n.m.	0,02	n.m.	n.m.	n.m.
		Fluoranten	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Naftalen	n.d.	n.m.	n.d.	n.d.	n.m.
	Policiklični aromatični ugljovodonici GC/MSD	Piren	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Ukupni policiklični aromatični ugljovodonici	n.d.	0,02	n.d.	n.d.	n.m.
	Lakoisparljiva organska jedinjenja GC/MSD/PT	Hloroform	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.m.
		Toluol	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		Acetohlor	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Des etil terbutilazin	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
		DEET (N,N-dietil-m-toluamid)	n.m.	n.m.	0,322	n.m.	n.m.
		Metolahlor	0,021	n.d.	0,083	n.d.	0,245
		Metalaksil	0,065	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	Pesticidi, GC/MSD	Piperonil butoksid	n.m.	n.m.	n.m.	0,05	n.m.
		Terbutilazin	0,029	n.d.	0,297	n.d.	0,123
		Terbutilazin-desetil	n.m.	n.m.	0,022	n.m.	n.m.
		Tiametoksan	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0,014
		Imidakloprid	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0,016
	Polihlorovani bifenili PCB GC/MSD	Ukupni polihlorovani bifenili	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Fenantren	n.m.	0,03	n.m.	0,091	0,042
		Fluoranten	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0,037
	Policiklični aromatični ugljovodonici GC/MSD	Naftalen	n.d.	n.m.	n.d.	0,248	n.d.
		Piren	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0,063
		Ukupni	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	n.d.

	policiklični aromatični ugljovodonici							
Lakoisparljiva organska jedinjenja GC/MSD/PT	Hloroform	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,32	
	Toluol	2,2	n.d.	n.d.	16,72	n.d.	n.d.	

Tabela 4. Prikaz prosečnih vrednosti (srednja vrednost \pm SE) koncentracija supstanci na lokalitetima za period 2017 – 2019 godine (preuzeto od GZZJZ Beograd) i SumTU vrednosti dobijene na osnovu prosečnih detektovanih koncentracija jedinjenja i PNEC vrednosti (preuzeto iz baze podataka NORMAN udruženja i agencije ECHA); crveno označene vrednosti - prosečne koncentracije koje su više u odnosu na PNEC vrednosti.

Hemijski parametri ($\mu\text{g/l}$)	PNEC ($\mu\text{g/l}$)	Lokaliteti		
		SZ	UK	UB
As	5,6	n.d.	$5,5 \pm 0,7$	$3,7 \pm 0,1$
Cu	11	n.d.	$16,4 \pm 3,4$	n.d.
Zn	17	$9,5 \pm 5,3$	$19,8 \pm 5,4$	$40,1 \pm 18,0$
Fe	1000	n.d.	660 ± 84	n.d.
Ni	6	$5,7 \pm 3,2$	$6,9 \pm 1,3$	n.d.
Acetohlor	0,013	n.d.	$0,023 \pm 0,002$	n.d.
Metolahlor	0,2	$0,078 \pm 0,034$	$1,464 \pm 1,386$	$0,080 \pm 0,043$
Terbutilazin	0,06	$0,044 \pm 0,019$	$0,868 \pm 0,797$	$0,100 \pm 0,053$
SumTU		3,22	28,98	5,99

Tabela 5. Prikaz ukupne dužine, težine i kondicionog indeksa jedinki uklija uzorkovanih u slivu Save (sr. vrednost \pm SE); korišćeni test: one-way ANOVA, $p < 0,05$.

Lokaliteti	Ukupna dužina (cm)	Masa (g)	Kondicioni indeks
Zabran	$12,69 \pm 0,51$	$8,66 \pm 0,13$	$0,43 \pm 0,03$
Ušće Kolubare	$11,95 \pm 0,15$	$8,18 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,20$
Ušće Baričke	$12,75 \pm 0,65$	$9,94 \pm 0,18$	$0,48 \pm 0,13$

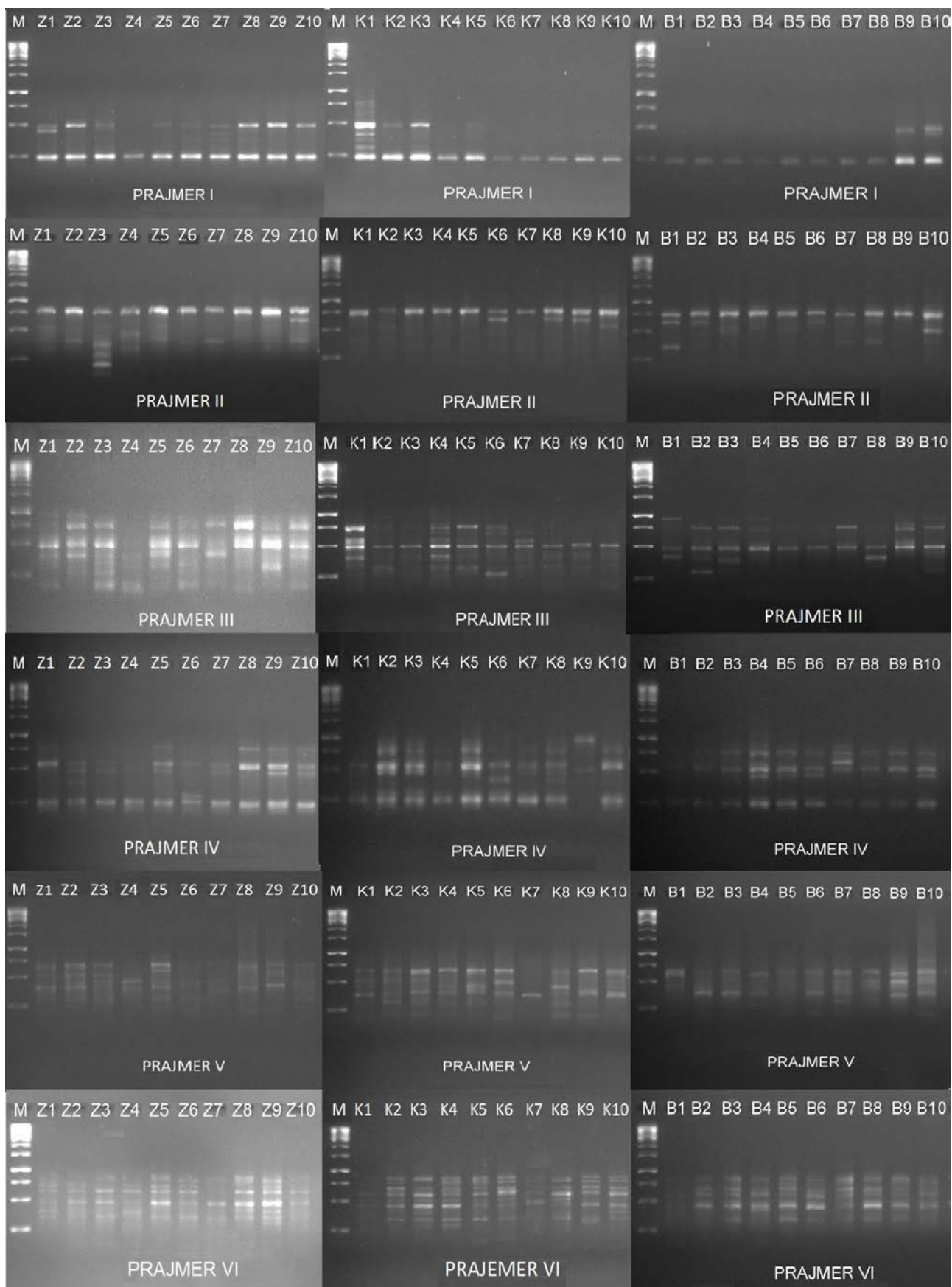
Tabela 6. Koncentracije metala i metaloida u mišiću jedinki uklija uzorkovanih u slivu Save izraženih u mg/kg wbc (srednja vrednost \pm SE) i MPI vredosti.

Koncentracija (mg/kg wbc)	SZ	UK	UB
Al	n.d.	n.d.	n.d.
As	n.d.	n.d.	n.d.
Cd	0,014 \pm 0,004	0,004 \pm 0,001	0,003 \pm 0,000
Co	n.d.	n.d.	n.d.
Cr	0,070 \pm 0,001	0,071 \pm 0,005	0,084 \pm 0,009
Cu	0,342 \pm 0,039	0,360 \pm 0,025	0,453 \pm 0,003
Fe	3,130 \pm 0,029	3,192 \pm 0,080	3,574 \pm 0,079
Hg	0,009 \pm 0,009	0,039 \pm 0,019	0,050 \pm 0,008
Mn	0,340 \pm 0,057	0,369 \pm 0,036	0,413 \pm 0,089
Ni	0,002 \pm 0,002	n.d.	0,046 \pm 0,046
Pb	0,032 \pm 0,011	0,038 \pm 0,022	0,025 \pm 0,005
Se	0,207 \pm 0,019	0,201 \pm 0,008	0,224 \pm 0,015
Sr	0,436 \pm 0,015	0,606 \pm 0,111	0,634 \pm 0,186
Zn	12,908 \pm 0,879	14,078 \pm 0,819	14,740 \pm 0,312
MPI	0,028	0,025	0,044

*n.d. – nije detektovano

Tabela 7. Prikaz koncentracije DNK jedinki uklija uzorkovanih na lokalitetima sliva Save i vrednosti odnosa absorbanca talasnih dužina 260 nm i 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$).

Lokalitet	Šifra jedinke	Koncentracija DNK (ng/ul)	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$
SZ	Z1	410,35	1,89
	Z2	329,95	1,91
	Z3	257,15	1,89
	Z4	580,40	1,96
	Z5	545,45	1,95
	Z6	125,15	1,84
	Z7	204,15	1,87
	Z8	351,8	1,88
	Z9	412,50	1,87
	Z10	1149,7	1,96
UK	K1	1158,0	1,90
	K2	1294,8	1,90
	K3	1214,2	1,93
	K4	527,65	1,75
	K5	204,4	1,82
	K6	327,3	1,85
	K7	280,9	1,84
	K8	273,85	1,85
	K9	645,35	1,89
	K10	368,9	1,86
UB	B1	720,15	1,89
	B2	177,35	1,81
	B3	364,35	1,87
	B4	408,15	1,85
	B5	275,2	1,85
	B6	348,35	1,86
	B7	374,90	1,85
	B8	679,35	1,90
	B9	480,8	1,87
	B10	400,00	1,92



Slika 1. Prikaz umnoženih DNK fragmenata korišćenjem šest prajmera (I-VI); Z1-Z10 jedinke sa lokaliteta SZ, K1-K10 jedinke sa lokaliteta UK, B1-B10 jedinke sa lokaliteta UB.

PRILOG 3

Tabela 1. Prosečne vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara merenih na lokalitetima u slivu Dunava u okviru nadzornog monitoringa 2018. godine i na lokalitetu na Savi (RS) koje su izmerene u toku 2015. godine (sr. vrednost \pm SE); podaci su preuzeti iz baze SEPA.

Parametri	Jedini- nica	RS	JDS33	JDS35	JDS36	JDS37	JDS40	JDS41
Antimon (Sb)	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,3 \pm 0,05$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Olovo (Pb)-rastvoreno	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,2 \pm 0,076$	$0,27 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,55$	$1,28 \pm 0,62$	$0,36 \pm 0,06$	n.d.
Živa (Hg)-rastvorena	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,04 \pm 0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Antimon (Sb)-rastvoreni	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,025 \pm 0$	$0,3 \pm 0,05$	n.d.	$0,25 \pm 0$	n.d.	n.d.
Benzo(a)piren	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,001 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0,000$	n.d.
para-terc-oktilfenol	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,0006 \pm 0,0001$	n.d.	n.d.	$0,0014 \pm 0,0008$	$0,002 \pm 0,0006$	$0,001 \pm 0,0002$
4-n-nonilfenol	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Atrazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,0045 \pm 0,0025$	$0,0011 \pm 0,0003$	$0,0013 \pm 0,0004$	$0,0031 \pm 0,0012$	$0,0032 \pm 0,0007$	$0,0041 \pm 0,0013$
Simazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,0008 \pm 0,0003$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Terbutrin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	$0,0008 \pm 0,0003$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,0007 \pm 0,0002$
Desetiltrazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0,0013 \pm 0,0006$	$0,0007 \pm 0,0002$
Desetilterbutilazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,004 \pm 0,002$	$0,003 \pm 0,0008$	$0,0036 \pm 0,0008$	$0,0057 \pm 0,0017$	$0,0067 \pm 0,0039$	$0,0093 \pm 0,0058$
Terbutilazin	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,01 \pm 0,005$	$0,0058 \pm 0,0028$	$0,0139 \pm 0,0066$	$0,01571 \pm 0,00729$	$0,0287 \pm 0,0254$	$0,0607 \pm 0,0473$
Acetohlor	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,0016 \pm 0,001$	n.d.	$0,0012 \pm 0,0005$	n.d.	n.d.	n.d.
Metolahlor	$\mu\text{g/l}$	n.d.	$0,019 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$	$0,027 \pm$	$0,028 \pm 0,0117$	$0,0736 \pm$	$0,086 \pm$

					0,0089		0,0637	0,077
Diuron	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Izoproturon	µg/l	n.d.	0,0008 ± 0,0002	0,001 ± 0,0002	0,0009 ± 0,0002	0,0017 ± 0,0004	0,0011 ± 0,0002	0,0015 ± 0,0015
Indeno(1,2,3-c,d)piren	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	0,0016 ± 0,0009	0,0007 ± 0,0005	0,0007 ± 0,0004	0,0007 ± 0,0005
Benzo(b)fluoranten	µg/l	n.d.	n.d.	0,0006 ± 0,0004	0,0009 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0012	0,0006 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0006
Benzo(k)fluoranten	µg/l	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,0006	0,0008 ± 0,0004	0,0010 ± 0,0007	0,0006 ± 0,0003	0,0007 ± 0,0005
Fluoranten	µg/l	n.d.	0,0003 ± 0	0,0008 ± 0,0003	0,0031 ± 0,001	0,0014 ± 0,0005	0,0005 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0001
Živa (Hg)	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,02	n.d.
Bisfenol A	µg/l	n.d.	0,0028 ± 0,002	n.d.	0,0671 ± 0,0209	0,0194 ± 0,0075	0,002 ± 0,0006	0,0088 ± 0,0029
Linuron	µg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metoksihlor	µg/l	n.d.	n.d.	0,0012 ± 0,0007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kobalt (Co)-rastvoreni	µg/l	n.d.	0,03 ± 0	0,31 ± 0,04	0,38 ± 0,09	0,31 ± 0,06	0,33 ± 0,05	0,29 ± 0,04
Kobalt (Co)	µg/l	n.d.	0,48 ± 0,195	17,63 ± 11,24	0,46 ± 0,09	0,72 ± 0,20	0,66 ± 0,31	0,56 ± 0,193
Nitriti (NO ₂ -N)	mg/l	0,015 ± 0,007	0,015 ± 0,002	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,01 ± 0	0,02 ± 0
Propazin	µg/l	n.d.	n.d.	0,001 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kadmijum (Cd)-rastvoreni	µg/l	0,034 ± 0,029	0,038 ± 0,008	0,024 ± 0,005	0,03 ± 0,005	0,08 ± 0,017	0,037 ± 0,005	0,06 ± 0,011
Ortofosfati (PO ₄ -P)	mg/l	0,060 ± 0,031	0,05 ± 0,005	0,044 ± 0,005	0,049 ± 0,006	0,051 ± 0,005	0,03 ± 0	0,07 ± 0
Kadmijum (Cd)	µg/l	0,08 ± 0,10	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,06
Amonijum (NH ₄ -N)	mg/l	0,084 ± 0,036	0,09 ± 0,014	0,1 ± 0,011	0,141 ± 0,020	0,212 ± 0,0210	0,121 ± 0,011	0,113 ± 0,022

Ukupni fosfor (P)	mg/l	0,16 ± 0,11	0,11 ± 0,009	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,18 ± 0,03
Hrom (Cr)-rastvoreni	µg/l	0,325 ± 0,650	1,78 ± 0,179	1,31 ± 0,15	0,92 ± 0,26	0,87 ± 0,30	9,1 ± 8,36	0,93 ± 0,228
Arsen (As)-rastvoreni	µg/l	0,433 ± 0,404	2,242 ± 0,25	1,33 ± 0,2	1,4 ± 0,12	1,43 ± 0,14	1,78 ± 0,27	1,818 ± 0,22
Bakar (Cu)-rastvoreni	µg/l	0,483 ± 0,755	20,217 ± 5,804	2,87 ± 0,24	3,25 ± 0,69	3,64 ± 0,90	8,96 ± 1,54	3,76 ± 0,675
Organski azot (N)	mg/l	0,727 ± 0,672	0,572 ± 0,095	0,95 ± 0,25	0,38 ± 0,08	0,71 ± 0,11	0,3 ± 0,05	0,89 ± 0,11
Nitrati (NO ₃ -N)	mg/l	0,79 ± 0,21	0,8 ± 0,131	0,69 ± 0,06	0,64 ± 0,05	0,88 ± 0,09	1,16 ± 0,13	0,88 ± 0,09
Arsen (As)	µg/l	1,150 ± 0,164	2,57 ± 0,259	1,43 ± 0,19	2,93 ± 1,13	2,57 ± 0,60	2,48 ± 0,37	2,25 ± 0,22
Olovo (Pb)	µg/l	1,367 ± 2,052	1,575 ± 0,483	1,12 ± 0,28	3,18 ± 1,74	4,49 ± 2,60	2,11 ± 0,67	1,69 ± 0,66
Ukupni azot (N)	mg/l	1,627 ± 0,709	1,48 ± 0,14	1,69 ± 0,26	1,17 ± 0,09	1,83 ± 0,20	1,6 ± 0,16	1,86 ± 0,15
Hrom (Cr)-ukupni	µg/l	1,867 ± 3,071	3,83 ± 0,934	4,66 ± 0,99	2,66 ± 0,89	9,01 ± 5,74	3,94 ± 1,48	2,83 ± 1,1
Cink (Zn) rastvoreni	µg/l	1,950 ± 2,758	167,5 ± 31,476	8,99 ± 0,94	7,15 ± 0,95	6,43 ± 1,12	42,87 ± 10,33	9,9 ± 1,37
Kalijum (K ⁺)	µg/l	2,056 ± 1,165	3,65 ± 0,175	2,22 ± 0,45	1,76 ± 0,18	2,92 ± 0,27	2,2 ± 0,18	2,68 ± 0,2
Biološka potrošnja kiseonika (BPK-5)	mg/l	2,127 ± 0,759	1,617 ± 0,182	2,22 ± 0,45	1,78 ± 0,21	2,42 ± 0,31	1,78 ± 0,23	2 ± 0,1
Aluminijum (Al)-rastvoreni	µg/l	2,340 ± 5,232	121,782 ± 45,32	11,97 ± 3,6	33,65 ± 23,26	26,45 ± 18,92	88,76 ± 34,37	19,956 ± 4,85
Bakar (Cu)	µg/l	3,150 ± 1,420	27,383 ± 6,248	6,48 ± 1,3	5,85 ± 0,68	6,94 ± 0,89	17,34 ± 3,04	6,31 ± 1,01
Nikl (Ni)	µg/l	3,283 ± 2,897	15,48 ± 3,064	8,78 ± 1,86	4,52 ± 1,87	2,45 ± 0,45	7,78 ± 1,48	3,1 ± 157,57
Hemijska potrošnja kiseonika (KMnO ₄)	mg/l	3,527 ± 1,186	5,36 ± 0,426	4,02 ± 0,32	3,06 ± 0,39	4,47 ± 0,77	4,26 ± 0,32	3,36 ± 0,24
Ukupni organski ugljenik (TOC)	mg/l	5,073 ± 2,295	4,43 ± 0,278	3,35 ± 0,24	3,67 ± 0,35	4,06 ± 0,40	3,83 ± 0,26	3,52 ± 0,33
Rastvoreni silikati (SiO ₂)	mg/l	6,633 ± 1,240	7,292 ± 0,881	5,9 ± 0,92	5,18 ± 0,4	4,37 ± 0,61	5,13 ± 0,58	5,95 ± 0,58
Mangan (Mn)-rastvoreni	µg/l	8,569 ± 13,435	35,745 ± 3,683	8,36 ± 1,56	8,9 ± 1,68	9,1 ± 3,3	10,1 ± 1,78	5,85 ± 0,85
Natrijum (Na ⁺)	mg/l	8,800 ± 3,086	33,43 ± 2,727	9,66 ± 1,27	9,08 ± 1,25	13,43 ± 0,888	16,21 ± 1,27	13,97 ± 0,9
Magnezijum (Mg ²⁺)	mg/l	13,091 ± 3,807	8,775 ± 0,563	16,03 ± 1,93	11,04 ± 0,9	13,27 ± 0,65	11,57 ± 0,48	13,14 ± 1,5

Hloridi (Cl ⁻)	mg/l	16,270 ± 7,799	42,48 ± 4,425	25,67 ± 3,08	21,58 ± 3,13	20,09 ± 1,02	24,46 ± 2,11	18,63 ± 0,84
Sulfati (SO ₄ ²⁻)	mg/l	18,364 ± 3,414	38,083 ± 2,832	20,42 ± 2,19	15,67 ± 0,85	26 ± 1,63	31,5 ± 1,71	28,25 ± 2,9
Nikl (Ni)-rastvoreni	µg/l	18,367	12,23 ± 2,897	2,49 ± 0,21	1,77 ± 0,21	1,21 ± 0,10	3,96 ± 0,83	1,97 ± 0,29
Gvožđe (Fe)-rastvoreno	µg/l	18,900 ± 27,293	140,73 ± 41,79	18,96 ± 5,3	37,29 ± 12,64	37,49 ± 13,73	110,67 ± 24,2	22,24 ± 8,52
Bor (B)	µg/l	25,460 ± 6,266	51,95 ± 4,644	11,22 ± 3,06	20,12 ± 2,12	23,43 ± 4,07	34,56 ± 4,23	26,06 ± 1,06
Cink (Zn)	µg/l	26,367 ± 35,029	229,38 ± 37,026	23,98 ± 4,34	16,02 ± 2,1	20,84 ± 4,18	74,37 ± 20,86	13,28 ± 1,87
Bor (B)-rastvoreni	µg/l	33,10	48,967 ± 4,121	10 ± 3,06	19,2 ± 2,2	18,94 ± 4,06	32,01 ± 3,64	23,97 ± 2,03
Mangan (Mn)	µg/l	47,283 ± 65,754	71,583 ± 13,672	69,28 ± 12,76	35,89 ± 9,71	40,14 ± 6,20	60,42 ± 12,36	29,42 ± 7,76
Kalcijum (Ca ²⁺)	mg/l	62,273 ± 12,330	48,6 ± 1,738	64,82 ± 2,27	64,98 ± 2,08	53,08 ± 2,04	54,16 ± 1,58	56,15 ± 1,49
Aluminijum (Al)	mg/l	102,720 ± 22,587	885,236 ± 357,936	658,33 ± 139,74	198,13 ± 42,3	439,17 ± 184,43	767,6 ± 408,52	388,66 ± 0,19
Ukupne rastvorene soli	mg/l	234,818 ± 32,363	273,58 ± 13,24	253,75 ± 11,94	238,25 ± 11,74	227 ± 8,94	250,5 ± 7,76	232,17 ± 6,06
Elektroprovodljivost	µS/cm ³	398,182 ± 59,457	459,75 ± 25,95	439,08 ± 20,93	419,08 ± 21,18	396,58 ± 15,45	416,5 ± 16,05	403,75 ± 11,41
Gvožđe (Fe)	µg/l	306,73 ± 351,64	1273,33 ± 481,682	1012,99 ± 214,08	377,24 ± 58,94	736,95 ± 185,83	1069,03 ± 357,43	656,05 ± 216,68

Tabela 2. Prikaz prosečnih koncentracija jedinjenja praćenih tokom 2018. u okviru SEPA nadzornog monitoringa lokaliteta u slivu Dunava i SumTU vrednosti dobijene na osnovu detektovanih koncentracija i PNEC vrednosti (preuzete iz baze podataka NORMAN udruženja i agencije ECHA); crveno označene vrednosti - koncentracije koje su više u odnosu na PNEC vrednosti.

Detektovane supstance (µg/l)	PNEC (µg/l)	Lokaliteti					
		JDS33	JDS35	JDS36	JDS37	JDS40	JDS41
Benzo(a)piren	0,27	n.d.	n.d.	0,0010 ± 0,0006	0,0012 ± 0,0010	0,0007 ± 0,0004	n.d.
Benzo(g,h,i)piren	0,0082	n.d.	0,0004 ± 0,0001	0,0014 ± 0,0008	0,0006 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0006 ± 0,0004
Benzo(b)fluoranten	0,017	n.d.	0,0006 ± 0,0004	0,0009 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0012	0,0006 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0006
Benzo(k)fluoranten	0,017	n.d.	0,0010 ± 0,0006	0,0008 ± 0,0004	0,0010 ± 0,0007	0,0006 ± 0,0003	0,0007 ± 0,0005
Fluoranten	0,0063	0,0003 ± 0,000	0,0008 ± 0,0003	0,0031 ± 0,001	0,0014 ± 0,0005	0,0005 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0001
Indeno(1.2.3-c,d)piren	0,27	n.d.	n.d.	0,0016 ± 0,0009	0,0007 ± 0,0005	0,0007 ± 0,0004	0,0007 ± 0,0005
Bisfenol A	0,24	0,0028 ± 0,002	n.d.	0,0671 ± 0,0209	0,0194 ± 0,0075	0,0054 ± 0,0031	0,0088 ± 0,0029
para-terc-oktilfenol	0,1	0,0006 ± 0,0001	n.d.	0,0005 ± 0	0,0013 ± 0,0008	0,002 ± 0,0006	0,001 ± 0,0002
Atrazin	0,6	0,0045 ± 0,0025	0,0011 ± 0,0003	0,0013 ± 0,0004	0,0031 ± 0,0012	0,0032 ± 0,0007	0,0041 ± 0,0013
Simazin	1	n.d.	0,0008 ± 0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Terbutrin	0,065	n.d.	0,0008 ± 0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	0,0007 ± 0,0002
Desetilatrazin	8,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0013 ± 0,0006	0,0007 ± 0,0002

Propazin	0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0005 ± 0,0002
Desetilterbutilazin	0,25	0,004 ± 0,002	0,003 ± 0,0008	0,0036 ± 0,0008	0,0057 ± 0,0017	0,0067 ± 0,0039	0,0093 ± 0,0058
Terbutilazin	0,06	0,01 ± 0,005	0,0058 ± 0,0028	0,0139 ± 0,0066	0,0157 ± 0,0072	0,0287 ± 0,0254	0,0607 ± 0,0473
Desizoprilatrazin	0,39	n.d.	n.d.	0,0019 ± 0,0014	n.d.	n.d.	n.d.
Acetohlor	11,8	0,0016 ± 0,001	n.d.	0,0012 ± 0,0005	n.d.	n.d.	n.d.
Metolahlor	0,2	0,019 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,027 ± 0,0089	0,028 ± 0,0118	0,074 ± 0,064	0,086 ± 0,077
Izoproturon	0,1	0,0008 ± 0,0002	0,001 ± 0,0002	0,0009 ± 0,0002	0,0017 ± 0,0004	n.d.	0,0015 ± 0,0015
Metoksihlor	0,3	n.d.	0,0012 ± 0,0007	n.d.	n.d.	0,0736 ± 0,0637	n.d.
Gama-HCH (Lindan)	0,02	n.d.	n.d.	0,0007 ± 0,0002	n.d.	n.d.	n.d.
Metolahlor	0,5	0,019 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,027 ± 0,0089	0,028 ± 0,0118	n.d.	0,086 ± 0,077
Gvožđe (Fe)-rastvoreno	1000	140,73 ± 41,79	18,96 ± 5,3	37,29 ± 12,64	37,49 ± 13,73	110,67 ± 24,2	22,24 ± 8,52
Mangan (Mn)-rastvoreni	34	35,74 ± 3,68	8,36 ± 1,56	8,90 ± 1,68	9,10 ± 3,30	10,10 ± 1,78	5,85 ± 0,85
Cink (Zn)-rastvoreni	17	167,5 ± 31,476	8,99 ± 0,94	7,15 ± 0,95	6,43 ± 1,12	42,87 ± 10,33	3,76 ± 0,675
Bakar (Cu)-rastvoreni	11	20,22 ± 5,80	2,87 ± 0,24	3,25 ± 0,69	3,64 ± 0,9	8,96 ± 1,54	3,76 ± 0,675
Hrom (Cr)-rastvoreni	3,4	1,78 ± 0,179	1,31 ± 0,15	0,92 ± 0,26	0,875 ± 0,305	9,1 ± 8,36	0,93 ± 0,228
Olovo (Pb)-rastvoreno	2,4	0,20 ±	0,27 ± 0,02	1,20 ± 0,55	1,28 ± 0,62	0,36 ± 0,06	n.d.

		0,08					
Kadmijum (Cd)-rastvoreni	0,19	0,038 ± 0,008	0,024 ± 0,005	0,03 ± 0,005	0,08 ± 0,017	0,037 ± 0,005	0,06 ± 0,011
Nikl (Ni)-rastvoreni	6	12,23 ± 2,897	2,49 ± 0,21	1,77 ± 0,21	1,21 ± 0,1	3,96 ± 0,83	1,973 ± 0,291
Aluminijum (Al)-rastvoreni	550	121,782 ± 45,32	11,97 ± 3,6	33,65 ± 23,26	26,45 ± 18,92	88,76 ± 34,37	19,956 ± 4,85
Kobalt (Co)-rastvoreni	0,62	0,03 ± 0	0,31 ± 0,04	0,38 ± 0,09	0,31 ± 0,06	0,33 ± 0,05	0,29 ± 0,04
Antimon (Sb)-rastvoreni	1770	n.d.	0,3 ± 0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Arsen (As)-rastvoreni	5,6	2,24 ± 0,25	1,33 ± 0,2	1,4 ± 0,12	1,43 ± 0,14	1,78 ± 0,27	1,82 ± 0,22
Bor (B)-rastvoreni	2900	48,967 ± 4,121	10 ± 3,06	19,2 ± 2,2	18,94 ± 4,06	32,01 ± 3,64	23,97 ± 2,03
Sum TU		17,49	5,06	5,22	4,84	9,99	5,20

* n.d. – nije detektovano

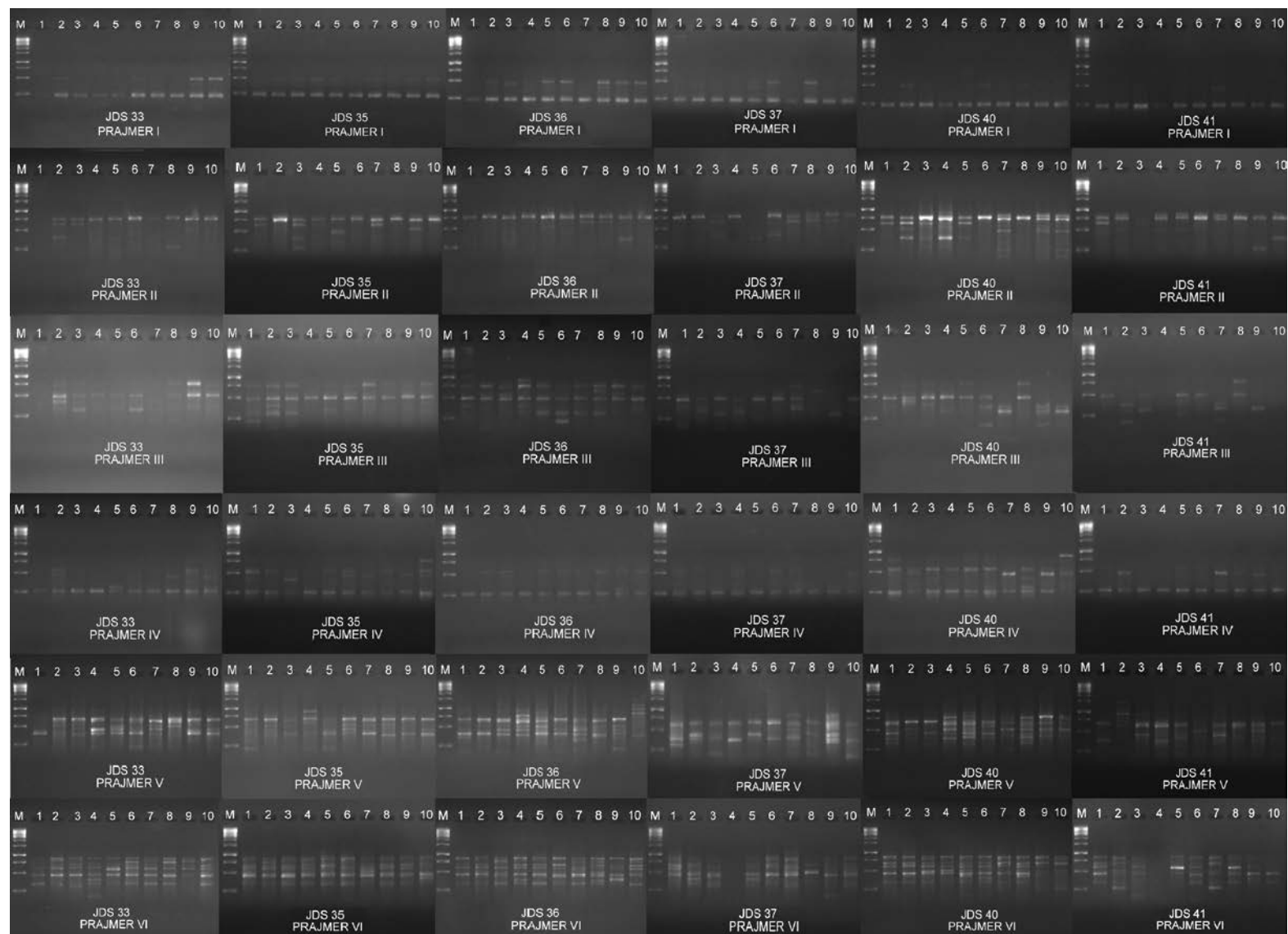
Tabela 3. Prikaz prosečne dužine, mase i kondicionog indeksa jedinki uklija uzorkovanih na lokalitetima u slivu Dunava (sr. vrednost \pm SE); korišćeni testovi: one-way ANOVA i Tukey's post-hoc, $p < 0,05$.

	Lokaliteti	Ukupna dužina (cm)	Masa (g)	Kondicioni indeks
Tisa	JDS33	$10,24 \pm 0,22$	$7,30 \pm 0,45$	$0,67 \pm 0,01^{ab}$
Sava	JDS35	$11,13 \pm 0,54$	$10,20 \pm 1,77$	$0,67 \pm 0,02^{ab}$
	JDS36	$10,35 \pm 0,24$	$5,90 \pm 0,28$	$0,54 \pm 0,02^a$
Dunav	JDS37	$9,46 \pm 0,26$	$5,40 \pm 0,43$	$0,63 \pm 0,03^{ab}$
	JDS40	$8,78 \pm 0,14$	$4,80 \pm 0,42$	$0,71 \pm 0,06^b$
	JDS41	$8,84 \pm 0,33$	$4,70 \pm 0,33$	$0,69 \pm 0,04^{ab}$

Tabela 4. Prikaz koncentracije DNK jedinki uklija i vrednosti odnosa absorbanci talasnih dužina 260 nm i 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$).

Lokalitet	Šifra jedinke	Koncentracija DNK (ng/ μ l)	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$
JDS33	33 1	65,50	2,00
	33 2	157,60	2,01
	33 3	154,55	1,97
	33 4	73,10	2,01
	33 5	110,80	1,98
	33 6	124,25	1,99
	33 7	308,0	1,91
	33 8	122,30	1,95
	33 9	136,20	1,95
	33 10	155,0	1,96
JDS35	35 1	132,60	1,99
	35 2	142,4	1,99
	35 3	175,0	1,94
	35 4	123,60	1,98
	35 5	150,55	1,98
	35 6	185,10	1,96
	35 7	185,30	1,96
	35 8	220,50	1,94
	35 9	178,55	1,95
	35 10	194,40	1,95
JDS36	36 1	85,300	1,84
	36 2	149,30	1,90
	36 3	216,65	1,89
	36 4	103,15	1,91
	36 5	273,4	1,88
	36 6	175,9	1,90
	36 7	223,10	1,89
	36 8	215,00	1,87
	36 9	231,55	1,90
	36 10	214,90	1,91
JDS37	37 1	303,95	1,89
	37 2	146,95	1,84
	37 3	496,60	1,86
	37 4	184,45	1,84
	37 5	434,30	1,92
	37 6	320,95	1,92
	37 7	450,90	1,90
	37 8	563,85	1,89
	37 9	257,15	1,87
	37 10	188,20	1,86
JDS40	40 1	233,75	1,93
	40 2	263,6	1,90
	40 3	199,6	1,91
	40 4	267,15	1,91
	40 5	103,0	1,96
	40 6	270,20	1,89
	40 7	481,30	1,93
	40 8	248,30	1,90
	40 9	857,40	1,95

	40 10	542,10	1,95
	40 10	764,15	1,94
	41 1	112,15	1,78
	41 2	359,05	1,90
	41 3	208,40	1,83
	41 4	180,20	1,85
JDS41	41 5	272,0	1,85
	41 6	170,45	1,85
	41 7	355,05	1,91
	41 8	213,65	1,86
	41 9	265,5	1,87
	41 10	198,25	1,85



Slika 1. Prikaz umnoženih DNK fragmenata korišćenjem šest prajmera (I-VI).

BIOGRAFIJA

Jovana M. Jovanović Marić rođena je 18.08.1992. godine u Užicu. Osnovne akademske studije upisala je 2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, a 2015. godine upisala je master akademske studije, studijska grupa Biologija, modul Biologija mikroorganizama. Master rad pod nazivom „Procena genotoksičnog potencijala vode reke Adide (Italija) i njenog sliva prokariotskim i eukariotskim testovima” urađen je pod rukovodstvom prof. dr Branke Vukuović-Gaćić i dr Stoimira Kolarevića i 2016. godine je odbranjen ocenom 10.

Doktorske akademske studije upisala je 2016. godine, studijska grupa Biologija, modul Biologija mikroorganizama na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od maja 2018. do decembra 2020. godine Jovana Jovanović Marić je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja na projektu „Merenje i modeliranje fizičkih, hemijskih, bioloških i morfodinamičkih parametara reka i vodnih akumulacija“ (TR37009) na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda. Takođe, učestvovala je u realizaciji nekoliko nacionalnih i međunarodnih projekata.

Od 2018. godine član je Srpskog biološkog društva, od 2020. godine je član Srpskog društva za zaštitu voda, a od 2021. godine član Društva genetičara Srbije, European Environmental Mutagen Society (EEMS), EEMS International Comet Assay Working Group i EEMS New Investigators Group.

Do sada je objavila 9 radova u međunarodnim naučnim časopisima, 2 poglavlja u monografiji i imala 11 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јована Јвановић Марић

број индекса Б3010/2016

Изјављујем

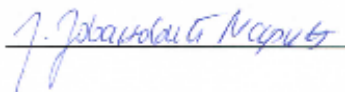
да је докторска дисертација под насловом

„Процена осетљивости *in vitro* и *in vivo* тестова у екогенотоксикологији и формулисање смерница за њихову примену у истраживањима на великим равничарским рекама“

- 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 докторанда

У Београду, _____



Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Јована Јовановић Марић

Број индекса Б3010/2016

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Процена осетљивости *in vitro* и *in vivo* тестова у екогенотоксикологији и формулисање смерница за њихову примену у истраживањима на великим равничарским рекама“

Ментор проф. др Бранка Вуковић-Гачић, др Маргарета Крачун-Коларевић

Потписани/а Јована Јовановић Марић

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 докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Процена осетљивости *in vitro* и *in vivo* тестова у екогенотоксикологији и формулисање смерница за њихову примену у истраживањима на великим равничарским рекама“

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 докторанда

У Београду, _____



1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.
-