

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana M. Kostić-Vuković

**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

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jovana M. Kostić-Vuković

**ASSESSMENT OF SURFACE WATER
QUALITY BASED ON MICROBIOLOGICAL
PARAMETERS AND
ECOGENOTOXICOLOGICAL AND
HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF
COMMON BREAM *Abramis brama* (L.,
1758), WHITE BREAM *Blicca bjoerkna* (L.,
1758) AND WHITE-EYE BREAM *Ballerus
sapa* (P., 1814) TISSUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

Dr Branka Vuković-Gačić, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Mirjana Lenhardt, naučni savetnik,

Univerzitet u Beogradu - Institut za multidisciplinarna istraživanja

Komisija:

Dr Stoimir Kolarević, naučni saradnik,

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Zoran Gačić, naučni savetnik,

Univerzitet u Beogradu - Institut za multidisciplinarna istraživanja

Dr Božidar Rašković, docent,

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju i Centra za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, laboratoriji Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu i laboratoriji Katedre za opšte stočarstvo i oplemenjivanje domaćih i gajenih životinja, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su u okviru nacionalnog projekta OI 173045 "Ribe kao bioindikator stanja kvaliteta otvorenih voda Srbije", finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i u okviru međunarodnog projekta „Establishing the basic microbial faecal pollution pattern along a large river: testing the longitudinal continuum vs. lateral discontinuum hypothesis at the River Danube“, Austrijskog fonda za nauku (Austrian Science Fund (FWF)).

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Branki Vuković-Gačić na ukazanom poverenju, podršci od samog početka istraživanja, prilici da započnem naučnu karijeru i budem tu gde sam danas. Hvala na stručnom vođenju, savetima, idejama i vremenu koje ste uložili da bi se ova disertacija osmislila i realizovala.

Duboku zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Mirjani Lenhardt na velikoj podršci, razumevanju, stručnom vođenju, idejama i savetima tokom rada na terenu, istraživanja i izrade ove disertacije.

Neizmerno sam zahvalna što poznajem i blisko saradujem sa dr Stoimirom Kolarevićem. Stoimire hvala ti pre svega što i posle pet godina saradnje i dalje mislim da si jedna od najkvalitetnijih osoba i istraživača koje sam imala prilike da upoznam. Hvala na pruženom znanju, iskustvu, savetima, pomoći i stručnom vođenju u istraživanjima i radu na terenu. Hvala na razumevanju, prijateljskoj atmosferi i svim odgovorenim pitanjima.

Veliku zahvalnost dugujem dr Zoranu Gačiću na stručnim savetima, pomoći i znanju iz oblasti statistike. Hvala na uloženom trudu, vremenu i sugestijama koji su značajno doprineli realizaciji ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Božidaru Raškoviću što je nesebično podelio svoje znanje iz oblasti histopatologije i za pomoć oko analiziranja histoloških preparata. Hvala na vremenu i sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu ove disertacije.

Veliko hvala dr Željki Višnjić-Jeftić na nesebičnoj i stručnoj pomoći oko analize akumulacije metala i metaloida. Hvala na znanju i uloženom vremenu za analiziranje i obradu mojih uzoraka, na prijatnoj i prijateljskoj atmosferi tokom rada.

Hvala mojoj dragoj kolegini Margareti Kračun-Kolarević na svojoj pomoći prilikom terenskog rada, uzorkovanja i rada u laboratoriji. Neizmerno sam zahvalna što saradujem sa tako divnom osobom i sjajnim istraživačem.

Veliko hvala mojoj dragoj kolegini Karolini Sunjog na pomoći u laboratoriji, savetima oko izrade doktorske disertacije, podršci i prijateljskom odnosu.

Veliko hvala profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević, prof. dr Slaviši Stankoviću, prof. dr Biljani Nikolić, prof. dr Tanji Berić i dr Dragani Mitić-Ćulafić na pruženom znanju iz oblasti mikrobiologije, profesionalnoj i prijateljskoj podršci tokom rada u laboratoriji.

Posebno hvala mojim "mikrosima", mladim istraživačima Katedre za mikrobiologiju, Bojani Vasiljević, Ivanu Nikoliću, Ivici Dimkiću, Olji Stanojević, Tamari Janakiev, Stefani Cvetković, Marini Rajić-Jovanović, Jovani Jovanović na kolegijalnosti, prijateljskoj atmosferi, saradnji u laboratoriji i druženju nakon posla.

Veliko hvala svim članovima Odseka za prirodne resurse i životnu sredinu, Grupe za ihtiologiju i akvakulturu Instituta za multidisciplinarna istraživanja za pomoć prilikom terenskog rada i istraživanja, kao i na prijatnoj i kolegijalnoj atmosferi.

Posebnu zahvalnost dugujem Zorici Radović na vremenu koje je uložila za pripremu histoloških preprata, na strpljenju da odgovori na sva moja pitanja i pozitivnoj atmosferi tokom rada.

Zahvaljujem se svim ribolovcima koji su pomogli prikupljanje uzoraka na terenu. Hvala Agenciji za zaštitu životne sredine Republike Srbije i Republičkom hidrometeorološkom zavodu na ustupljenim podacima.

Hvala svim mojim prijateljima na ljubavi, podršci i razumevanju.

Hvala mojim Smiljanićima, Pavkovićima, Rovčanima i Stanišićima za bezgraničnu ljubav koju mi pružaju. Hvala mojim Vukovićima na svojoj ljubavi, toplini i podršci.

Hvala mom Branislavu na безусловnoj ljubavi, podršci i strpljenju koje su mi veliki oslonac u životu i što me voli onako kako mi je potrebno.

Hvala mojoj mami i sestri, ljubav koju osećam prema vama moj je najveći pokretač.

Ovaj rad posvećujem mom ocu Milomiru.

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)

Sažetak

Biomonitoring predstavlja neophodnu komponentu tradicionalnih tehnika monitoringa, sa ciljem da se uspostavi veza između spoljašnjih koncentracija zagađivača, koncentracija zagađivača u tkivima bioindikatora i ranih štetnih efekata po ispitivane organizme. Ribe su korisni bioindikatori i često se primenjuju u ekogenotoksikološkim ispitivanjima. U ovoj studiji, procena stanja kvaliteta površinske vode vršena je na reci Savi na lokalitetu Duboko i na reci Dunav na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine, kako bi se procenio uticaj različitih sezona na variranje parametara kvaliteta i odgovor biomarkera deverike, krupatice i crnooke deverike. Procena kvaliteta vode vršena je merenjem fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara fekalnog i organskog zagađenja. Procena genotoksičnog potencijala vršena je primenom alkalnog komet testa za kvantifikaciju DNK oštećenja u ćelijama krvi, jetre i škrge riba, kao biomarkera izlaganja. Histopatološke promene u jetri i škragama praćene su kao biomarker efekta. Paralelno, praćene su koncentracije metala i metaloida u jetri, škrgrama, gonadama i mišiću, primenom metode ICP-OES. Na lokalitetu Višnjica zabeležen je viši nivo fekalnog i organskog zagađenja. Na lokalitetu Duboko zabeležene su više koncentracije ispitivanih elemenata u sva četiri tkiva, u poređenju sa lokalitetom Višnjica. Na oba lokaliteta škrge su akumulirale najviše koncentracije metala i metaloida, a mišić najniže. Na oba lokaliteta, krv je bila tkivo sa najvišim nivoom DNK oštećenja, dok je jetra tokom većine meseci imala najniže DNK oštećenje. Na lokalitetu Višnjica zabeležene su više vrednosti DNK oštećenja krvi, na lokalitetu Duboko više vrednosti DNK oštećenja škrge, dok je nivo DNK oštećenja u ćelijama jetre na oba lokaliteta bio približno jednak. Na lokalitetu Duboko pri najvećim vrednostima histopatološkog indeksa škrge zabeleženo je blago do umereno oštećenje, a na lokalitetu Višnjica umereno do teško oštećenje škrge. Na oba lokaliteta, jetra je bila organ sa većim obimom histopatoloških promena u odnosu na škrge. Sveukupno, škrge kao prvi organ u direktnom kontaktu sa zagađivačima iz vode pokazale su veću akumulaciju ispitivanih

elemenata i viši nivo DNK oštećenja, dok je jetra kao glavni organ za procesuiranje zagađivača iz vode i hrane pokazala viši nivo histopatoloških promena. Odabrane vrste pokazale su se kao pogodni bioindikator za *in situ* ispitivanja efekata zagađenja.

Ključne reči: površinske vode, mikrobiološko zagađenje, *Abramis brama*, *Blicca bjoerkna*, *Ballerus sapa*, biomarkeri, ekogenotoksikologija, DNK oštećenje, histopatologija, metali i metaloidi.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija, Genotoksikologija, Ekotoksikologija, Histopatologija

UDK broj: [574.64+597.551.2+579.68]:556.53(043.3)

Assessment of surface water quality based on microbiological parameters and ecogenotoxicological and histopathological analysis of common bream *Abramis brama* (L., 1758), white bream *Blicca bjoerkna* (L., 1758) and white-eye bream *Ballerus sapa* (P., 1814) tissues

Abstract

Biomonitoring represents an essential part of traditional monitoring techniques with the aim to establish relationship between external concentrations of pollutants, concentrations of pollutants in the tissues of bioindicators and early adverse effects in examined organisms. Fish are useful bioindicators often used in ecogenotoxicological studies. In this study, assessment of the surface water quality was performed on the Sava River locality Duboko and on the Danube River locality Višnjica during 2014 in order to examine the impact of different seasons on the variation of the quality parameters and biomarker response in common bream, white bream and white-eye bream. Assessment of the water quality was performed based on the physico-chemical parameters and microbiological parameters of fecal and organic pollution. Genotoxic potential was assessed by using the alkaline comet assay in order to quantify DNA damage level, in blood, liver and gill cells, as a biomarker of exposure. Histopathological analyses of liver and gill tissue were monitored as a biomarker of effect. Additionally, concentrations of metals and metalloids in liver, gills, gonads and muscle were performed by the ICP-OES method. The higher level of fecal and organic pollution was present on the locality Višnjica. The higher concentrations of examined elements in all four tissues were present in fish from the locality Duboko, in comparison to the locality Višnjica. At both sites gills accumulated the highest concentrations of metals and metalloids, while muscle accumulated the lowest concentrations. Blood was the tissue with the highest level of DNA damage, while liver had the lowest level of DNA damage during most of the months at both sites. Higher DNA damage level in blood cells was observed at the locality Višnjica, in gill cells at the locality Duboko, while the level of DNA damage in liver was approximately the same at both localities. Based on the highest level of histopathological index of gills at the locality Duboko gills were slightly to moderately damaged, while at the locality Višnjica gills were

moderately to heavily damaged. At both localities liver had higher level of histopathological alterations in comparison to gills. Overall, gills as the first organ in direct contact with contaminants from water showed higher level of examined elements and DNA damage, while the liver as the main organ for processing contaminants from water and food showed higher level of histopathological alterations. Examined fish species proved to be useful bioindicators for *in situ* assessment of the pollution effects.

Key words: surface water, microbiological pollution, *Abramis brama*, *Blicca bjoerkna*, *Ballerus sapa*, biomarkers, ecogenotoxicology, DNA damage, histopathology, metals and metalloids.

Research field: Biology

Specific research field: Microbiology, Genotoxicology, Ecotoxicology, Histopathology

UDC No.: [574.64+597.551.2+579.68]:556.53(043.3)

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

AO – Akridin oranž

CFU – eng. *Colony Forming Unit* – broj jedinica koje formiraju kolonije

CP – Cirkulatorne promene

DMSO – Dimetil sulfoksid

DSM – eng. *Special Microplate Diluent*

DTA – Dekstrozni teluritni agar

Dw – Suva masa

EB – Etidijum bromid

EDTA – Etilendiamintetrasirćetna kiselina

EMB – Eozin metilensko plavo

EU – Evropska Unija

FC – fekalni koliformi

FE – fekalne enterokoke

FL– Učestalost histopatološke lezije

GI– Histopatološki indeks škrva

HBSS – eng. *Hanks Balanced Saline Solution*

HE – Hematoksilin–eozin

HI – Ukupni histopatološki indeks

I GC – Cirkulatorne promene u škrvama

I GP – Progresivne promene u škrigama

I GR – Regresivne promene u škrigama

I LC – Cirkulatorne promene u jetri

I LI – Inflamatorne promene u jetri

I LP – Progresivne promene u jetri

I LR – Regresivne promene u jetri

ICP–OES – Induktivno spregnuta plazma–optičko emisiona spektroskopija

IFA – Indeks fosfatazne aktivnosti

IP – Inflamatorne promene

LA – Luria agar

LI – Histopatološki indeks jetre

LMP – eng. *Low Melting Point*

MDK – Maksimalno dozvoljena koncentracija

MPI – Indeks zagađenja metalima

MPN – eng. *The Most Probable Number*

MUD – 4–Metilumbeliferil– β –D–glukozid

MUG – Metilumbeliferil– β –D–glukuronid

NMP – eng. *Normal Melting Point*

ONPG – Orto–nitrofenil– β –D–galaktopiranozid

OTM – eng. *Olive tail moment*

PAHs – Policiklični aromatični ugljovodonici

PBS – eng. *Phosphate buffered saline solution*

PCBs – Polihlorovani bifenili

p-NP – Para-nitrofenol

p-NPP – Para-nitrofenil-fosfat

PP – Progresivne promene

RHMZ – Republički hidrometeorološki zavod

rkm – Rečni kilometar

RP – Regresivne promene

rpm – eng. *Revolutions per minute* – broj obrtaja u minuti

RS – Republika Srbija

SCGE – eng. *Single Cell Gel Electrophoresis* – gel elektroforeza pojedinačnih ćelija

SD – Standardna devijacija

SE – Standardna greška

SL – Standardna dužina ribe

TC – ukupni koliformi

TI % – eng. *Tail intensity* – itenzitet repa komete

TL – Ukupna dužina ribe

TL pix – eng. *Tail lenght* – dužina repa komete

TSC – Triptoza sulfid cikloserin

TTA – Tris+Tes+Sirćetna kiselina (pufer)

W – Masa ribe

WHO – eng. *World Health Organisation*

Ww – Vlažna masa

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Površinske vode i izvori zagađenja	1
1.1.1 Hemijsko zagađenje površinske vode.....	1
1.1.2 Mikrobiološko zagađenje površinske vode	2
1.1.2.1 Fekalno zagađenje površinske vode	3
1.1.2.2 Organsko zagađenje površinske vode	5
1.2 Biomonitoring	6
1.2.1 <i>In situ</i> biomonitoring	7
1.3 Bioindikatori	8
1.3.1 Ribe kao bioindikatorski organizmi	9
1.3.1.1 Deverika (<i>Abramis brama</i>), krupatica (<i>Blicca bjoerkna</i>) i crnooka deverika (<i>Ballerus sapa</i>).....	10
1.4 Biomarkeri	12
1.4.1 Analiza koncentracija metala i metaloida u tkivima riba	14
1.4.1.1 Esencijalni elementi	16
1.4.1.1.1 Hrom (Cr).....	16
1.4.1.1.2 Bakar (Cu)	17
1.4.1.1.3 Gvožđe (Fe).....	17
1.4.1.1.4 Mangan (Mn).....	18
1.4.1.1.5 Molibden (Mo)	18
1.4.1.1.6 Cink (Zn)	19
1.4.1.1.7 Kobalt (Co).....	19
1.4.1.2 Neesencijalni elementi	20

1.4.1.2.1	Aluminijum (Al).....	20
1.4.1.2.2	Arsen (As)	20
1.4.1.2.3	Barijum (Ba).....	21
1.4.1.2.4	Olovo (Pb).....	21
1.4.1.2.5	Stroncijum (Sr).....	22
1.4.1.3	Detekcija metala i metaloida metodom ICP-OES.....	22
1.4.2	Oštećenje DNK molekula kao biomarker.....	24
1.4.2.1	Detekcija DNK oštećenja- komet test	25
1.4.3	Histopatologija tkiva kao biomarker	28
1.5	Područje istraživanja.....	32
1.5.1	Reka Sava	32
1.5.2	Reka Dunav	33
1.6	Ispitivanje kvaliteta Save i Dunava primenom mikrobioloških parametara i ekogenotoksikoloških analiza tkiva deverike, krupatice i crnooke deverike.....	34
2	CILJEVI RADA	36
3	MATERIJAL I METODE	38
3.1	Materijal.....	38
3.2	Metode	46
3.2.1	Opis ispitivanih lokaliteta.....	46
3.2.1.1	Lokalitet Duboko.....	46
3.2.1.2	Lokalitet Višnjica	47
3.2.2	Uzorkovanje vode i tkiva ribe na odabranim lokalitetima	48
3.2.3	Analize fizičko-hemijskih parametara vode	50
3.2.4	Analize mikrobioloških parametara u vodi	50

3.2.4.1	Ispitivanje sanitarnog aspekta - metoda membranske filtracije	51
3.2.4.2	Ispitivanje sanitarnog aspekta - metoda enzimskog razlaganja supstrata	53
3.2.4.3	Ispitivanje ekološkog aspekta.....	56
3.2.4.3.1	Heterotrofne i oligotrofne bakterije.....	56
3.2.4.3.2	Određivanje fosfatazne aktivnosti vode	57
3.3	Određivanje koncentracija metala i metaloida u tkivima ribe	59
3.3.1	Indeks zagađenja metalima (MPI- <i>Metal pollution index</i>)	63
3.4	Komet test- elektroforeza pojedinačnih ćelija	64
3.4.1	Uzorkovanje tkiva i pripremanje suspenzije ćelija.....	64
3.4.2	Određivanje vijabilnosti ćelija diferencijalnim AO/EB bojenjem	64
3.4.3	Alkalni komet test.....	65
3.5	Histopatološke analize jetre i škruga	68
3.5.1	Uzorkovanje tkiva i pripremanje histoloških preparata.....	68
3.5.2	Semikvantitativna analiza histopatoloških promena	70
3.6	Statističke analize.....	73
4	REZULTATI	74
4.1	Reka Sava - lokalitet Duboko	74
4.1.1	Analize fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na lokalitetu Duboko	74
4.1.2	Analize mikrobioloških indikatora na lokalitetu Duboko	77
4.1.2.1	Ispitivanje sanitarnog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Duboko	77
4.1.2.2	Ispitivanje ekološkog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Duboko	80
4.1.3	Uzorkovanje jedinki deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko	82
4.1.4	Koncentracije metala i metaloida u jetri, škrigama, gonadama i mišiću deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko.....	83

4.1.5	Detekcija oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi, jetre i škruga deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko	89
4.1.5.1	Određivanje vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škruga	89
4.1.5.2	DNK oštećenje u ćelijama krvi, jetre i škruga	90
4.1.6	Histopatološke promene na jetri i škrugama deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko	97
4.1.6.1	Kategorizacija histopatoloških promena u škrugama i jetri na lokalitetu Duboko	102
4.2	Reka Dunav - lokalitet Višnjica.....	104
4.2.1	Analize fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na lokalitetu Višnjica....	104
4.2.2	Analize mikrobioloških indikatora na lokalitetu Višnjica.....	108
4.2.2.1	Ispitivanje sanitarnog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Višnjica.....	108
4.2.2.2	Ispitivanje ekološkog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Višnjica.....	111
4.2.3	Uzorkovanje jedinki deverike na lokalitetu Višnjica	113
4.2.4	Koncentracije metala i metaloida u jetri, škrugama, gonadama i mišiću deverike na lokalitetu Višnjica.....	114
4.2.5	Detekcija oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi, jetre i škruga deverike na lokalitetu Višnjica	120
4.2.5.1	Određivanje vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škruga	120
4.2.5.2	DNK oštećenje u ćelijama krvi, jetre i škruga	120
4.2.6	Histopatološke promene na jetri i škrugama deverike na lokalitetu Višnjica	127
4.2.6.1	Kategorizacija histopatoloških promena u škrugama i jetri na lokalitetu Višnjica	130
4.3	Korelacije među praćenim biomarkerima na lokalitetima Duboko i Višnjica	133
5	DISKUSIJA	135
5.1	Analiza kvaliteta vode reka Save i Dunava	136

5.1.1	Procena fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na lokalitetima Duboko i Višnjica	136
5.1.2	Procena mikrobioloških indikatora fekalnog i organskog zagađenja na lokalitetima Duboko i Višnjica	139
5.2	Analiza koncentracija metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću riba na lokalitetima Duboko i Višnjica	141
5.3	Analiza oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi, jetre i škrge.....	145
5.4	Histopatološke analize škrge i jetre riba na lokalitetima Duboko i Višnjica.....	149
5.4.1	Histopatološke analize škrge	149
5.4.2	Histopatološke analize jetre.....	155
5.5	Korelacije među praćenim biomarkerima na lokalitetima Duboko i Višnjica	159
6	ZAKLJUČCI	161
7	LITERATURA	165
8	PRILOG	207

1 | UVOD

1. UVOD

1.1 Površinske vode i izvori zagađenja

Mnogi od glavnih izazova sa kojima se čovečanstvo suočava u XXI veku u vezi su sa kvantitetom/kvalitetom vode. Potreba za naglašavanjem važnosti vode kao resursa i sastavnog dela svih ekosistema nikada nije bila veća (Ormerod et al., 2010). Velike reke se decenijama koriste za transport, rekreaciju, ribolov, za potrebe industrije i poljoprivrede, a što je najvažnije, kao izvor vode za piće. Rast ljudske populacije i promena načina života doveli su do porasta proizvodnje, konzumacije i odlaganja zagađivača antropogenog porekla, a ovi antropološki pritisci ugrožavaju ekološki integritet velikih reka u svim zemljama sveta. Pored toga, vrši se modifikacija reka kako bi se omogućilo navodnjavanje i proizvodnja električne energije, što vodi nastanku brojnih tačkastih i difuznih izvora zagađenja (Doledec & Statzner, 2008).

Izvori zagađenja koji su lokalizovani, direktno se izlivaju u površinske vode i nisu pod uticajem meteoroloških fenomena (ispusti industrijskih i komunalnih otpadnih voda), spadaju u tačkaste izvore zagađenja. Za razliku od njih, difuzni izvori obuhvataju zagađenje koje povremeno dospeva u površinske vode i najviše je pod uticajem meteoroloških fenomena (de Wit et al., 2000) i uključuju: poljoprivredne aktivnosti, spiranje zemljišta, nepropisno izgrađene i održavane septičke jame, deponije opasnog otpada, rudarstvo, seču šuma, atmosferski unos zagađujućih materija i hidrološke modifikacije (izgradnja brana, preusmeravanje vodotokova, kopanje kanala, prekomerno ispušavanje podzemnih voda) (Duda, 1993). Dok se uticaj tačkastih izvora zagađenja na akvatične ekosisteme može relativno jednostavno proceniti primenom standardnih analitičkih i ekotoksikoloških metoda, efekte difuznih izvora zagađenja mnogo je teže proceniti i kvantifikovati usled združenog efekta više zagađivača (Adams & Greeley, 2000).

1.1.1 Hemijsko zagađenje površinske vode

Jedan od ključnih ekoloških problema predstavlja povećano zagađenje slatkovodnih ekosistema hemijskim jedinjenjima koja se svesno ispuštaju u životnu sredinu.

Više od jedne trećine dostupne obnovljive slatke vode na Zemlji koristi se u poljoprivredi, industriji i domaćinstvima, a većina ovih aktivnosti vodi zagađenju vode velikom količinom sintetisanih jedinjenja (Loos et al., 2009). Hemijsko zagađenje prirodnih voda predstavlja veliki problem u gotovo svim delovima sveta, jer može izazvati uglavnom nedovoljno poznate dugoročne efekte na akvatične organizme i ljudsko zdravlje.

Novosintetisani zagađivači (eng. *emerging pollutants*) obuhvataju širok spektar antropogenih hemikalija (pesticidi, proizvodi za ličnu higijenu, kućne hemikalije, farmaceutska jedinjenja i dr.) koje se koriste širom sveta i neophodne su za funkcionisanje savremenog društva. Proizvodnja hemikalija različitih namena povećala se između 1930. i 2000. godine sa 1 miliona na 400 miliona tona godišnje. Preko 50 % ukupno proizvedenih hemikalija između 2002. i 2011. godine predstavljaju supstance štetne za životnu sredinu (Gavrilescu et al., 2015). Istraživanja su pokazala da mnoga novosintetisana, do skoro nepoznata jedinjenja, dospevaju u životnu sredinu, prenose se i opstaju u većoj meri nego što se prvobitno mislilo. Ove hemikalije su visoko prisutne u akvatičnim ekosistemima, ne samo u industrijskim zonama, već i u udaljenijim sredinama. Neke od ovih hemikalija se nikada ne mogu uništiti (metali i metaloidi) ili se razlažu jako sporo (perzistentni organski zagađivači i neki lekovi). Čak i manje perzistentne hemikalije, mogu predstavljati problem ukoliko se konstantno ispuštaju u životnu sredinu (farmaceutski proizvodi i proizvodi za ličnu higijenu). Iako je većina ovih supstanci prisutna u niskim koncentracijama, mnoge od njih poseduju visok toksikološki i ekotoksikološki potencijal, posebno kada se nalaze u kompleksnim smešama (Loos et al., 2009). Okvirna Direktiva o vodama EU (EU Water Framework Directive 2000/60/EC) (European Commission, 2000) je objavila listu 33 prioritetne supstance ili grupa supstanci koje uključuju metale, pesticide, ftalate, policiklične aromatične ugljovodonike (PAHs), polihlorovane bifenile (PCBs), endokrine disruptore i dr. (Deblonde et al., 2011).

1.1.2 Mikrobiološko zagađenje površinske vode

Intenzivan rast ljudske populacije i aktivnosti doveo je do zagađenja vodnih resursa biološkim zagađivačima kao što su virusi i bakterije. Mikrobiološko zagađenje može biti poreklom iz tačkastih i/ili difuznih izvora zagađenja. Tačkasti izvori uključuju ispuštanje

tretiranih i netretiranih komunalnih otpadnih voda i postrojenja za uzgoj stoke, a difuzni izvori zagađenja nastaju usled spiranja urbanih i poljoprivrednih površina i izlivanja septičkih jama (Kirschner et al., 2009). Mikrobiološko zagađenje je važan problem koji utiče na kvalitet površinske vode, a procena sanitarnog i ekološkog aspekta kvaliteta neophodna je radi preduzimanja mera za efikasnije upravljanje prirodnim resursima i implementaciju sistema za preradu otpadnih voda.

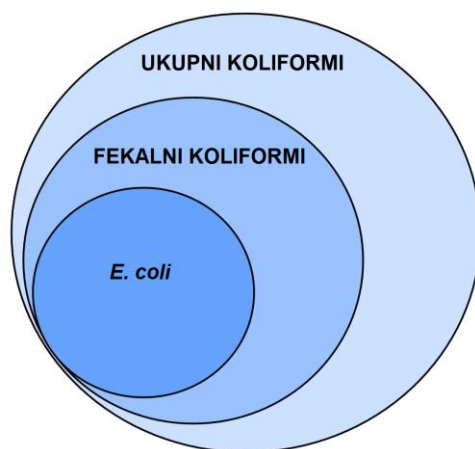
1.1.2.1 Fekalno zagađenje površinske vode

Zagađenje vode fekalnim materijalom, u kome mogu biti prisutni i brojni patogeni, predstavlja značajan rizik po zdravlje ljudi i životinja (Reischer et al., 2008). Fekalno zagađenje antropogenog porekla predstavlja važan problem za sve vidove upotrebe vode. Kako prisustvo netretiranog fekalnog otpada može dovesti do pojave i širenja raznih oboljenja kod ljudi izloženih zagađenoj vodi (Sinton et al., 1993), neophodan je monitoring sanitarnog kvaliteta površinske vode (Budnick et al., 1996). U poređenju sa patogenim mikroorganizmima poreklom iz fecesa ili otpadnih voda, bakterije normalne crevne flore nalaze se u većim koncentracijama, pa ih je lakše detektovati. Ukoliko one nisu prisutne u vodi, može se zaključiti da se u vodi ne nalaze ni patogeni mikroorganizmi (WHO, 1958).

Indikatorske bakterije koje se najčešće koriste u proceni sanitarnog kvaliteta vode pripadaju grupi koliforma. Koliformne bakterije, pre svega *Escherichia coli*, i enterokoke smatraju se osnovom monitoringa fekalnog zagađenja. *Clostridium perfringens*, fekalna bakterija koja formira endospore, pokazala se kao značajan organizam za detekciju geografski udaljenog, postojanog fekalnog zagađenja ili zagađenja nastalog u prošlosti. Dobijanje kvantitativnih podataka o fekalnom zagađenju predstavlja osnovu mikrobiološkog monitoringa kvaliteta vode (Byamukama et al., 2005; Kirschner et al., 2014).

Koliformne bakterije su prisutne u spoljašnjoj sredini i u fecesu toplokrvnih životinja i ljudi. Iako termin "koliformi" nema taksonomski značaj, koristi se kako bi se opisali različiti rodovi familije Enterobacteriaceae koji fermentišu laktozu. Koliformi uglavnom ne izazivaju oboljenja, ali njihovo prisustvo u vodi ukazuje na potencijalno prisustvo patogena.

U okviru grupe koliforma postoji podela na tri grupe indikatorskih mikroorganizama: ukupni koliformi, fekalni (termotolerantni) koliformi i *E. coli*. Prisustvo svake grupe ukazuje na različit nivo rizika (Slika 1.1). Ukoliko su u vodi prisutni ukupni koliformi, uzorak se ispituje na prisustvo fekalnih koliforma i *E. coli*.



Slika 1.1. Podela na tri grupe indikatorskih mikroorganizama u okviru koliforma (modifikovano sa maine.gov)

Grupa ukupnih koliforma uključuje aerobne i fakultativno anaerobne, gram negativne štapičaste bakterije koje ne formiraju endospore, a fermentišu laktozu uz produkciju gasa i kiseline tokom 48 h na 35 ± 2 °C uz pomoć enzima β -galaktozidaze (Bitton, 2005). Fekalni (termotolerantni) koliformi čine podgrupu ukupnih koliforma koja je direktno povezana sa fekalnim zagađenjem poreklom od homeoterma (Geldreich, 1968). Ove bakterije poseduju sve karakteristike ukupnih koliforma pri čemu one rastu i fermentišu laktozu uz produkciju gasa i kiseline na 44,5 °C u toku 48 h inkubacije. Kod termotolerantnih koliforma fiziološka osnova mogućnosti rasta na povišenim temperaturama tumači se kao adaptacija proteina da održe stabilnost na temperaturama koje vladaju u crevnom traktu životinja (Figueras et al., 2000). Jedina vrsta iz familije Enterobacteriaceae, *E. coli*, gotovo je uvek fekalnog porekla i smatra se najpreciznijim indikatorom fekalnog zagađenja i potencijalnog prisustva patogena (Bonde, 1977). Pored toga, najzastupljenija je od svih koliforma u crevnoj flori toplokrvnih životinja (Rompré et al., 2002).

Enterokoke, u prvom redu *Enterococcus faecalis*, normalno su prisutne u ljudskom i animalnom fecesu, pa se takođe koriste kao indikatori prisustva fekalnog zagađenja. Pripadaju rodu *Enterococcus* koji obuhvata oko 30 vrsta gram pozitivnih koka, koje ne stvaraju endospore. Čelije su pojedinačne, u parovima ili formiraju kratke lance. Optimalna temperatura za rast većine vrsta je 35-37 °C. Visoko su tolerantne na različite uslove životne sredine. Preferiraju anaerobne uslove, a svrstavaju se u fakultativne anaerobe. Kod ljudi dominira *E. faecalis*, međutim ponekad može prevladati *E. faecium*. Površinske vode nisu prirodno stanište enterokoka i njihovo prisustvo u ovom “miljeu” smatra se posledicom fekalnog zagađenja (Cabral, 2010).

C. perfringens je anaerobna, gram pozitivna, sulfid-redukujuća štapičasta bakterija koja formira endospore. Nalazi se u debelom crevu i predstavlja oko 0,5 % fekalne mikroflore. Strikatan je anaerob, ali može preživeti kratko izlaganje kiseoniku (Cabral, 2010). Produkuje endospore koje su prilično otporne na stres iz okruženja i dezinfekciju. Kako pripada grupi sulfid-redukujućih klostridija detektuje se na podlozi koja sadrži sulfite. Zbog prisustva otpornih endospora, predloženo je da se koristi kao indikator zagađenja nastalog u prošlosti i za praćenje sudbine patogena nakon što dospeju u akvatičnu sredinu (Bitton, 2005).

1.1.2.2 Organsko zagađenje površinske vode

U prirodi, posebno u vodenim sredinama, najčešće se sreću bakterije koje kao glavni izvor energije za rast i razmnožavanje koriste organsku materiju. To je velika grupa heterotrofnih bakterija, hemoorganotrofa, odnosno organotrofa (Petrović et al., 1998). Organotrofi čine jednu od najvećih grupa mikroorganizama koji učestvuju u procesima kruženja materije i proticanja energije u vodenim ekosistemima. Smatraju se autohtonim članovima vodenih ekosistema i uglavnom se koriste u proceni opterećenja vode organskom materijom (Kolarević et al., 2012). Oligotrofne bakterije naseljavaju sredine sa niskim koncentracijama organskih materija, ali kao fakultativni organizmi mogu se nalaziti u sredinama sa višim koncentracijama tih materija. Ovo je grupa heterotrofnih bakterija čiji su zahtevi u pogledu hranljivih materija znatno skromniji (grč. *oligos-* mali, *trophein-*

hraniti se). Visoka zastupljenost fakultativnih oligotrofa ukazuje na vodu manje opterećenu materijama organske prirode (Petrović et al., 1998).

Savremene biohemijske metode, od kojih je jedna merenje fosfatazne aktivnosti vode, omogućavaju detekciju nivoa razlaganja zagađujućih materija prisutnih u ispitivanom uzorku od strane organotrofne komponente akvatičnog ekosistema. Sposobnost mikroorganizama da koriste fosfor iz rastvorenih organskih fosfornih jedinjenja zavisi od aktivnosti enzima fosfataza koje katalizuju hidrolizu fosfatnih monoestara, pri čemu se oslobađa neorganski fosfat i organska materija (Labry et al., 2005). Povećana koncentracija kompleksnih organskih zagađivača indukuje produkciju i povećan nivo aktivnosti ovih enzima. Step en aktivnosti fosfataza u vodi odražava nivo heterotrofne aktivnosti prisutnih mikroorganizama, a posredno ukazuje na koncentraciju organofosfatnih polutanata. Nivo fosfatazne aktivnosti vode oslikava stanje ukupnog organskog opterećenja vodenih ekosistema (Petrović et al., 1998).

1.2 Biomonitoring

Merenja fizičkih, hemijskih i mikrobioloških parametara smatraju se osnovom monitoringa jer pokrivaju čitav spektar informacija za odgovarajuće upravljanje vodom. Ipak, akvatični ekosistemi često primaju povećane količine različitih zagađivača, od kojih većina može ispoljiti štetne efekte na različitim nivoima biološke organizacije (Kostić et al., 2017). Uprkos stalnom poboljšanju metodologija koje se koriste za određivanje koncentracija i sudbine zagađivača u različitim životnim sredinama, mnoge štetne supstance nalaze se u životnoj sredini u koncentracijama koje su ispod nivoa detekcije. Čak i ako bi se ovi zagađivači mogli detektovati, bilo u životnoj sredini ili biološkim uzorcima, sama detekcija zagađivača u abiotičkoj i biotičkoj komponenti nije dovoljna bez procene njihovih bioloških i ekoloških efekata (Dizer et al., 2002). Dodatno, zagađivači se u životnoj sredini pojavljuju u složenim smešama, pa je često nemoguće predvideti stvaran rizik po životnu sredinu samo na osnovu detekcije ograničenog broja zagađivača. Kako su biološki sistemi meta delovanja toksičnih agenasa, oni obezbeđuju važnu informaciju koja

se ne može dobiti hemijskim analizama prirodnih uzoraka i stoga se mogu koristiti u dijagnostici za integrisano upravljanje životnom sredinom (Jha, 2008). Biomonitoring se definiše kao sistemska upotreba živih organizama ili njihovih odgovora u proceni stanja i promena životne sredine i smatra se neophodnom komponentom koja dopunjuje tradicionalne tehnike monitoringa (Li et al., 2010).

Biomonitoring se zasniva na činjenici da hemikalije koje dospevaju u organizam ostavljaju trag (marker) koji ukazuje na izlaganje. Markeri mogu biti same hemikalije, njihovi metaboliti ili biološka promena (biomarker) u organizmu, nastala kao rezultat dejstva neke hemikalije. Rezultati ovakvih merenja daju informaciju o količini prirodnih i antropogenih hemikalija koje su dospele i ostale u organizmima, ali i o odgovarajućem indukovanom efektu. Ispitivanje uticaja različitih zagađivača primenom biomonitoringa može se vršiti korišćenjem *ex situ* i *in situ* pristupa. U *ex situ* pristupu, dejstvo određenih zagađivača na organizme ispituje se u laboratorijskim uslovima. Laboratorijska ispitivanja obično uključuju kratkotrajna izlaganja test organizama jednom ili nekolicini zagađivača. Stoga, uslovi ispitivanja u laboratorijskim studijama retko oslikavaju sredinu u kojoj se nalaze prirodne populacije i nedostaje im ekološki realizam (Adams & Greeley, 2000). U *in situ* pristupu procena se vrši na organizmima na samom lokalitetu koji je pod uticajem zagađenja.

1.2.1 *In situ* biomonitoring

U prirodnim uslovima svi organizmi su izloženi istovremenom dejstvu više faktora. Indukovani toksični efekat često je rezultat sinergističkih i antagonističkih interakcija različitih hemikalija u kompleksnim smešama i njihovih interakcija sa fizičkim i biološkim faktorima. Takav interaktivan i dinamičan „milje“ koji je prisutan u prirodi gotovo je nemoguće reprodukovati u laboratoriji (Sandhu & Lower, 1989). *In situ* istraživanja su od velikog značaja jer omogućavaju razumevanje i predviđanje efekata zagađenja na prirodne populacije i zajednice organizama u realnim uslovima. Ipak, usled nepoznate i kompleksne prirode otpadnih voda koje dospevaju u akvatične ekosisteme gotovo je nemoguće napraviti jasnu vezu između uočenih efekata u organizmima i specifičnog zagađivača ili grupe zagađivača (Wepener et al., 2005). Pri *in situ* biomonitoringu neophodno je pratiti i fizičko-

hemijske i fiziološke parametre kvaliteta vode, jer oni značajno mogu uticati na fiziološki status životinja i biodostupnost zagađivača. Neophodno je poznavati biologiju, fiziologiju i ekologiju korišćenih organizama kako bi se pravilno interpretirali rezultati. Preporuka je i da se *in situ* istraživanja vrše tokom različitih sezona, usled prirodnih sezonskih promena stanja lokaliteta, izloženosti zagađenju, ali i razlika u fiziološkom statusu test organizama (Liber et al., 2007). *In situ* istraživanja se mogu vršiti primenom aktivnog i pasivnog biomonitoringa. Aktivni biomonitoring podrazumeva gajenje indikatorskih organizama u laboratoriji i njihovo naknadno izlaganje na lokalitet od interesa, na određeno vreme. Takođe, u aktivnom biomonitoringu se može vršiti translokacija organizama sa nezagađenog na zagađen lokalitet. Na kraju perioda izlaganja analiziraju se nastale reakcije organizama ili zagađivači usvojeni od strane organizama. U slučaju pasivnog biomonitoringa koriste se organizmi koji su već prirodno prisutni na zagađenim lokalitetima i ispituju se njihovi odgovori (Markert, 2007). Jedan od problema koji se često javlja u *in situ* pristupu jeste pronalaženje odgovarajućeg kontrolnog lokaliteta, koji bi se u istom vodnom telu okarakterisao kao čist, a upotreba laboratorijskih ili istorijskih kontrola smatra se neadekvatnim (Sandhu & Lower, 1989). Za analizu biomarkera korišćenje negativne kontrole je važno, ali je moguće i samo pratiti vremensko variranje odgovora biomarkera na jednom lokalitetu (Dalzochio et al., 2016).

1.3 Bioindikatori

Prilikom procene rizika u životnoj sredini u biomonitoringu, obično se koriste indikatorski organizmi, bioindikatori (Friberg et al., 2011). Bioindikator se može definisati kao organizam koji daje informaciju o ekološkim uslovima na staništu (Van der Oost et al., 2003), a primena odgovarajućih bioindikatora značajno doprinosi kvalitetu biomonitoringa. Savršen bioindikator za procenu stanja akvatičnih ekosistema, trebalo bi da poseduje sledeće karakteristike (Zhou et al., 2008):

- 1) može da preživi akumulaciju visokih koncentracija zagađivača;
- 2) poseduje sesilan način života, pa reflektuje zagađenje na datom lokalitetu;

- 3) visoko je zastupljen i rasprostranjen; time omogućava ponavljanje i poređenje analiza;
- 4) ima dug životni vek, što omogućava poređenje među različitim uzrasnim kategorijama;
- 5) može da obezbedi odgovarajuće ciljno tkivo ili ćelije pogodne za ispitivanje odgovora na nižim nivoima biološke organizacije;
- 6) lako se uzorkuje i uzgaja u laboratoriji;
- 7) živi u vodenom staništu;
- 8) zauzima važno mesto u lancu ishrane;
- 9) u organizmu se može posmatrati dobar odnos doze i efekta.

Kako je gotovo nemoguće pronaći bioindikatorski organizam sa svim navedenim karakteristikama, u praksi se primenjuju bioindikator koji poseduju nekoliko navedenih karakteristika zavisno od specifičnog zadatka biomonitoringa (Zhou et al., 2008).

Upotreba bioindikatora zasniva se na analizi specifičnih odgovora ovih organizama na postojeće stanje ekosistema (Birk et al., 2012). Vođeni zahtevima međunarodnih propisa, kao što je Okvirna Direktiva o vodama EU, različite taksonomske grupe (alge, makrofite, makro-invertebrati i ribe) koriste se u proceni ekološkog statusa vodnih tela širom država članica EU (Colin et al., 2016). Biomonitoring daje informacije o promenama koje mogu predstavljati značajan rizik za pojedinačne vrste, uključujući i ljude, populacije, zajednice i ekosisteme. Stoga, izuzetno je važno korišćenje bioindikatora čiji se odgovori mogu ekstrapolirati u proceni rizika za stanje ekosistema, ali i zdravlje ljudi (Burger, 2006).

1.3.1 Ribe kao bioindikatorski organizmi

Kao veoma prisutna i važna komponenta slatkovodnih ekosistema ribe se primenjuju u monitoringu stanja rečnih ekosistema već dugi niz godina i jedna su od najčešće korišćenih grupa bioindikatora u ekotoksikološkim *in situ* ispitivanjima (Li et al., 2010). Ribe se koriste kao test organizmi zbog njihove pozicije u trofičkom lancu u akvatičnim ekosistemima i uloge u ishrani ljudi. Kako ribe zauzimaju najviši nivo u lancu ishrane u akvatičnim ekosistemima, mogu se smatrati amplifikatorima toksičnih i genotoksičnih supstanci prisutnih u organizmima na nižim nivoima lanca ishrane (Boettcher et al., 2010). Bioindikator, posebno sa dugim životnim vekom kao što su ribe,

osetljivi su na dejstvo kompleksnih smeša hemikalija koje dospevaju u akvatični ekosistem (Zhou et al., 2008).

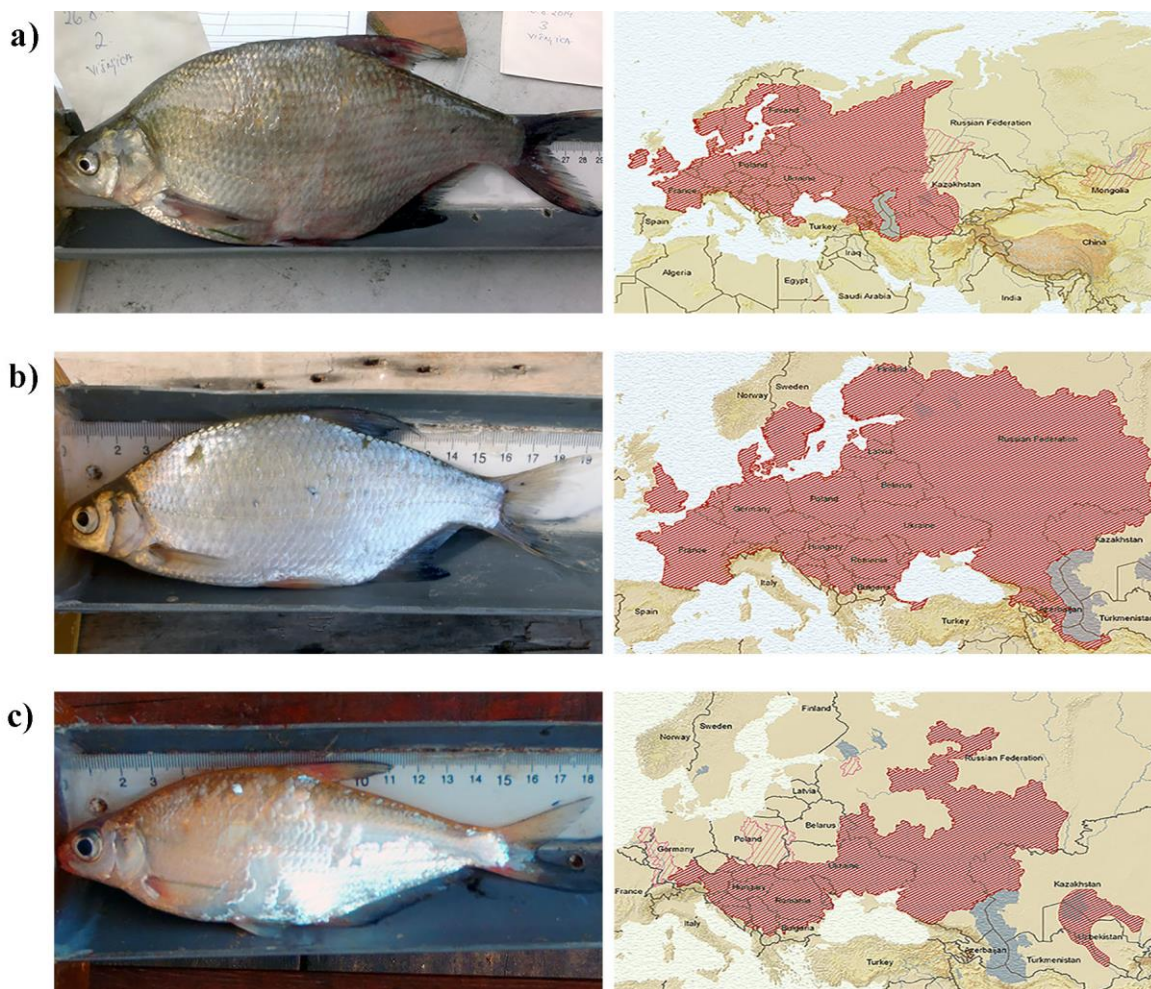
Koncentracija zagađivača u tkivima ribe smatra se odličnim indikatorom opterećenja životne sredine određenim zagađivačima, ali obično ne pokazuje direktne fiziološke i ekološke posledice takvog izlaganja. Zagađivači u akvatičnom ekosistemu obično izazivaju širok spektar efekata i odgovora koji variraju od promena na molekularnom nivou, preko promena u morfologiji i fiziologiji organizma, do promena u ponašanju, rastu i reprodukciji riba (Weis et al., 2001; Arukwe, 2001). Tokom kratkotrajnog izlaganja niskim koncentracijama zagađivača, u ribama se može uočiti odgovor na subćelijskom nivou, a obično je organizam u stanju da se izbori sa ovakvim stresom tako da ne dođe do ozbiljnih efekata po zdravlje. Ipak, dugotrajno i obimno izlaganje može indukovati niz funkcionalnih i strukturnih promena koje će ugroziti vitalne funkcije organizma (Van der Oost et al., 2003). U ribama su važna dva različita načina unosa zagađivača: direktno iz vode preko škrga i oralnim putem asimilacijom zagađene hrane. Ribe se smatraju odličnim bioindikatorima štetnih efekata zagađenja između ostalog i zbog činjenice da se biotransformacija zagađivača kod ovih organizama vrši uključivanjem mnogih sličnih reakcija kao i kod sisara (Kleinow et al., 1987).

1.3.1.1 Deverika (*Abramis brama*), krupatica (*Blicca bjoerkna*) i crnooka deverika (*Ballerus sapa*)

Deverika *Abramis brama*, krupatica *Blicca bjoerkna* i crnooka deverika *Ballerus sapa* su genetički, ekološki i biološki slične vrste. Prema istraživanju Van Dyk et al. (2009) očekivano je da će stanje blisko srodnih vrsta riba izloženih istim uslovima životne sredine biti ugroženo na sličan način. Sve tri vrste pripadaju porodici Cyprinidae, podporodici Leuciscinae, visoko su srodne i široko rasprostranjene u Evropi i Aziji (Perea et al., 2010; Molnár et al., 2011; fishbase.org) (Slika 1.2). Do skoro su krupatica i crnooka deverika pripadale rodu *Abramis*, a od nedavno su odvojene u zasebne rodove (Mendel et al., 2012). Ove tri vrste uglavnom naseljavaju sporotekuće nizijske reke i stajaće vode, blizu peskovitog i muljevitog dna, a hrane se crvima, mekušcima i larvama insekata (Simonović, 2001; Florea & Gheorghe, 2008). Hraneći se organizmima dna, bentivorne ribe izdižu

sediment i unose čestice sedimenta, što vodi njegovoj resuspenziji i oslobađanju supstanci u vodeni stub (Breukelaar et al., 1994). Usled toga, ove ribe su izložene zagađenju poreklom iz vode, hrane i sedimenta. One su odabrane kao bioindikator jer se love tokom čitave godine, autohtone su i visoko rasprostranjene u Savi i Dunavu (Jovičić et al., 2014). Takođe, ocenjene su kao slabo mobilne vrste (Bartel et al., 2007). Deverika, krupatica i crnooka deverika se koriste u ljudskoj ishrani, ali predstavljaju ekonomski manje cenjene vrste riba ("bela riba"), pri čemu krupniji primerci deverike mogu dostići i veću vrednost.

Deverika se smatra pogodnim indikatorskim organizmom u proceni stresa u životnoj sredini u programima monitoringa evropskih reka (Krüger et al., 1996; Dus et al., 2005). Pokazala se kao koristan i osetljiv bioindikator u ispitivanjima akumulacije metala i metaloida, kao i histopatoloških promena u različitim tkivima (Salanki et al., 1982; Krüger et al., 1996; Farkas et al., 2000, 2003; Giari et al., 2012). Krupatica je korišćena u studijama analize metala i metaloida (Lenhardt et al., 2012; Szkoda et al., 2014), dok za crnooku deveriku nisu nađene studije u kojima je korišćena kao bioindikator. Koliko znamo, ovo je prva studija u kojoj se kao osetljiv indikator genotoksičnosti prati oštećenje DNK molekula komet testom u navedenim vrstama.



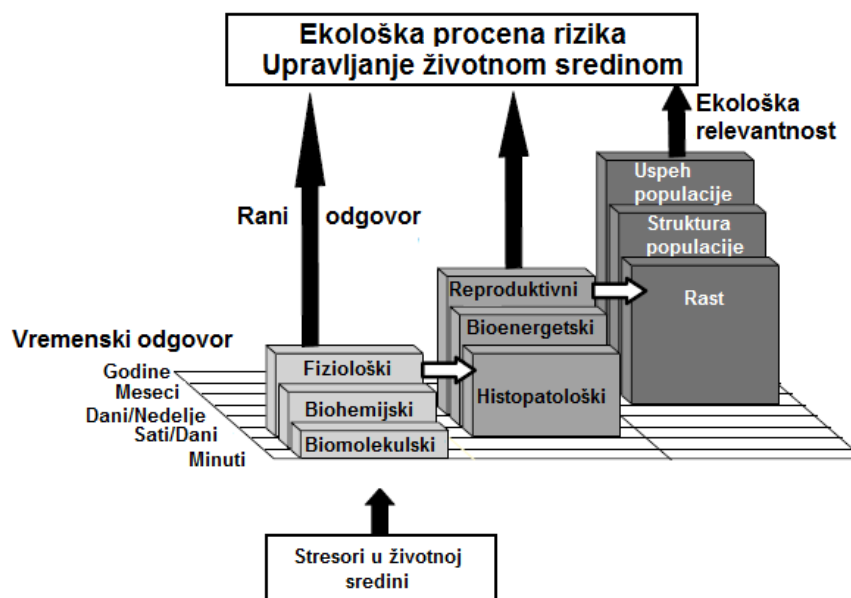
Slika 1.2. Vrste riba korišćenih u studiji sa arealima rasprostiranja; **(a)** deverika *Abramis brama*, **(b)** krupatica *Blicca bjoerkna*, **(c)** crnooka deverika *Ballerus sapo* (izvor slika mapa: itti fauna.org)

1.4 Biomarkeri

Jedan od ciljeva biomonitoringa jeste uspostavljanje veze između spoljašnjih koncentracija zagađivača, koncentracija zagađivača u tkivima bioindikatora i ranih štetnih efekata po ispitivane organizme (da Silva Montes et al., 2011). Odgovor biomarkera definiše se kao biohemijska ili biološka promena koja nastaje usled dejstva nekog agensa (Van der Oost et al., 2003). Biomarkeri pružaju informaciju o stvarnom odgovoru živih organizama izloženih egzogenim i endogenim stresorima. Najvažniji razlog za korišćenje

biomarkera je taj što oni daju informacije o biološkim efektima zagađenja, a ne samo podatak o prisustvu i nivou zagađenja u životnoj sredini.

Stresori u životnoj sredini prvo izazivaju promene na molekularnom nivou i gradivnim jedinicama organizma kao što su ćelije i tkiva, a ukoliko je dejstvo stresora dovoljnog trajanja i jačine, efekti na nižim nivoima vremenom će se manifestovati na višim nivoima biološke organizacije (Slika 1.3). Ovakav pristup nam može omogućiti da povežemo stresore u životnoj sredini sa posmatranim biološkim efektom (Adams & Greeley, 2000; Jha, 2008).



Slika 1.3. Hijerarhijski odgovor organizama na stres iz životne sredine. Pokazani su više osetljivi biomarkeri ranog odgovora- promene na nižim nivoima biološke organizacije i biomarkeri sprijeg odgovora, ali većeg ekološkog značaja - promene na višim nivoima biološke organizacije (modifikovano iz Adams & Greleey, 2000)

Biomarkeri na nižim nivoima biološke organizacije relativno brzo odgovaraju na stres i imaju visoku toksikološku relevantnost, dok oni na višim nivoima imaju relativno

spor odgovor i nižu toksikološku relevantnost, ali se karakterišu visokom ekološkom relevantnošću (Adams et al., 1989; Teh et al., 1997).

Prema opštoj, generalno prihvaćenoj klasifikaciji, biomarkeri su svrstani u tri glavne kategorije (Manno et al., 2010):

- 1) **biomarker izlaganja** je hemikalija, ili njen metabolit, ili proizvod interakcije hemikalija i ciljnih biomolekula, koji se može izmeriti u nekom delu ili tečnosti organizma;
- 2) **biomarker efekta** je merljiva biohemijska, strukturna, funkcionalna promena ili promena u ponašanju organizma, koja se zavisno od svog obima može dovesti u vezu sa postojećim ili potencijalnim stanjem organizma;
- 3) **biomarker osetljivosti** se može definisati kao indikator nasledene ili stečene sposobnosti organizma da odgovori na izazov izlaganja štetnim agensima.

Kako se efekti zagađivača na organizam mogu manifestovati na jednom ili više različitih nivoa biološke organizacije, procena odgovora na jednom nivou biološke organizacije nije dovoljna za kompletnu procenu i interpretaciju efekata zagađivača na stanje riba. Relevantan pristup u proceni efekta zagađenja na organizam bio bi praćenje nekoliko biomarkera istovremeno u organizmu, koji su idealno na različitim nivoima biološke organizacije (Wepener et al., 2005; Triebkorn et al., 2008; Lenhardt et al., 2015).

1.4.1 Analiza koncentracija metala i metaloida u tkivima riba

Koncentracija specifičnih zagađivača u organima i tkivima bioindikatora može se smatrati biomarkerom izlaganja (Forbes et al., 2006), jer se pri ovakvoj proceni dobija informacija o prisustvu specifičnih zagađivača u životnoj sredini. Sa druge strane, Van der Oost et al. (2003) su istakli da se opterećenje organizma određenim agensima ne može smatrati biomarkerom u pravom smislu te reči, jer se ne dobija informacija o indukovanim poremećajima u organizmu. Prema njima, nivo zagađivača u tkivima bioindikatora može se okarakterisati kao marker bioakumulacije.

Globalno zagađenje akvatičnih ekosistema metalima i metaloidima privlači sve više pažnje. Neki od ovih elemenata mogu ući u sastav stabilnih jedinjenja visoke toksičnosti, koja se mogu akumulirati u organizmima, povećavati svoje koncentracije kroz lanac ishrane i ugroziti zdravlje ljudi (Duruibe et al., 2007). Ovi elementi u akvatičnim ekosistemima

mogu biti prirodnog porekla, dospevaju iz zemljišta i stena, obično u niskim koncentracijama i ne izazivaju štetne efekte na date organizme (Sunjog et al., 2016).

Zagađenje metalima se povećalo sa tehnološkim napretkom ljudske populacije. Industrija, rudarstvo, unapređenje poljoprivrede, netretirane otpadne vode domaćinstava i motorni saobraćaj smatraju se glavnim izvorima zagađenja metalima (Sevcikova et al., 2011). Hemijske analize vode i sedimenta predstavljaju direktan pristup u otkrivanju zagađenja životne sredine metalima i metaloidima, ali ne mogu da pruže dokaz o sveopštem uticaju i mogućoj toksičnosti na organizme i ekosistem (Zhou et al., 2008). Usled stabilnosti i tendencije da se akumuliraju u vodi i sedimentu, ukoliko se nađu u većim koncentracijama, metali i metaloidi su visoko toksični za sve žive organizme (Fernandes et al., 2008).

Pokazano je da je koncentracija metala u vodi pozitivno korelisana sa njihovom koncentracijom u tkivima riba (Bervoets & Blust, 2003). Ribe su glavna komponenta ljudske ishrane, a one sa zagađenih staništa predstavljaju potencijalan rizik po zdravlje ljudi. Ribe usvajaju metale iz vode, hrane i sedimenta preko škrge, digestivnog trakta i površine kože (Dallinger et al., 1987). Nivo akumulacije metala i metaloida u tkivima pod uticajem je abiotičkih i biotičkih faktora, kao što su stanište ribe, hemijski oblik metala, temperatura i pH vode, koncentracija Ca^{2+} i rastvorenog kiseonika u vodi, providnost vode, kao i uzrast, pol, masa tela i fiziološko stanje riba (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008). Koncentracije metala u mišiću riba nisu najpouzdaniji indikator zagađenja čitavog organizma. Stoga, kako bi mogli pravilno da procenimo zagađenje riba određenim elementima, preporučuje se analiza i drugih tkiva (Has-Schön et al., 2006). Najčešći organi koji se koriste kao ciljni organi za praćenje akumulacije metala i metaloida su škrge i jetra. Škrge predstavljaju važan organ u monitoringu zagađenja kako su u direktnom kontaktu sa vodom, dok se jetra koristi zbog visokog potencijala akumulacije (Lenhardt et al., 2015). Nivo metala u mišićima se ispituje kako bi se odredio potencijalan rizik konzumacije za ljudsko zdravlje (Farkas et. al, 2003), dok se koncentracija metala u gonadama procenjuje radi eventualnog uticaja ovih elemenata na reproduktivne aktivnosti riba (Kime et al., 1996).

Zavisno od biološke uloge, elementi se mogu podeliti na esencijalne sa poznatom biološkom ulogom, neesencijalne bez poznate biološke uloge i toksične elemente. Kao i esencijalni elementi, neesencijalni i toksični elementi se takođe usvajaju od strane riba i akumuliraju u tkivima. Prisustvo ovih elemenata u tkivima riba ukazuje na egzogene faktore koji mogu biti u vezi sa zagađenjem (Carvalho et al., 2005; Tuzen & Soylak, 2007). Nedostatak esencijalnih elemenata kao i njihove visoke koncentracije mogu dovesti do različitih negativnih efekata po zdravlje riba, ekvivalentnih ili gorih od uticaja neesencijalnih metala (Sfakianakis et al., 2015). U daljem tekstu opisane su karakteristike esencijalnih i neesencijalnih elemenata procenjenih u tkivima riba u ovoj studiji.

1.4.1.1 Esencijalni elementi

1.4.1.1.1 Hrom (Cr)

Uloga hroma u prirodi veoma je kontradiktorna. To je esencijalan element uključen u metabolizam glukoze i lipida. Sa druge strane unos visokih koncentracija Cr (VI) može indukovati mutagene i kancerogene efekte i patološke promene u mnogim organima. Iako postoje različita oksidaciona stanja ovog metala, Cr (III) i Cr (VI) su dominantni u životnoj sredini. Cr (III) se nalazi prirodno u životnoj sredini i ima nisku toksičnost jer slabo prolazi kroz biološke membrane. Cr (VI) u većim količinama dospeva u životnu sredinu putem otpadnih voda poreklom iz domaćinstava i industrije, lako prolazi kroz membrane i visoko je toksičan jer se smatra jakim oksidantom. Unutar ćelija Cr (VI) se redukuje preko reaktivnih intermedijera, kao što su Cr (V) i Cr (IV), u stabilniji oblik Cr (III) (Chorvatovičová et al., 1993). Tokom ovog procesa stvaraju se slobodni radikali koji mogu reagovati sa ćelijskim makromolekulima, uključujući i DNK, pri čemu mogu nastati adukti Cr-DNK, jednolančani prekidi i DNK-protein unakrsne veze (Manning et al., 1994). Nekoliko studija potvrdilo je citotoksične, imunološke, hematološke, histopatološke i genotoksične efekte hroma na ribe (Alazemi, 1996; Velma & Tchounwou, 2010), kao i efekte na metabolizam, fiziološke aktivnosti, rast i ponašanje riba (Mishra & Mohanty, 2008, 2009).

1.4.1.1.2 Bakar (Cu)

Bakar (Cu) je esencijalan element za život svih organizama uključujući i ribe. Prirodno je prisutan u zemljištu i vodi, ima esencijalnu ulogu u nizu metaboličkih procesa i sastavni je deo brojnih enzima i strukturnih proteina (Sevcikova et al., 2011). Neophodan je za iskorišćavanje gvožđa i kao kofaktor je uključen u metabolizam glukoze i sintezu hemoglobina, vezivnog tkiva i fosfolipida (Celik & Oehlenschläger, 2004). Sposobnost Cu da prelazi iz oksidovanog Cu (II) u redukovano stanje Cu (I), koriste kuproenzimi uključeni u redoks reakcije. Ova osobina ga upravo čini potencijalno toksičnim jer se prilikom prelaska iz jednog u drugo stanje mogu formirati superoksid i hidroksi radikali. Rudarstvo, otpadne vode industrije i pesticidi koji sadrže Cu osnovni su izvori zagađenja akvatičnih ekosistema (WHO, 1998). Toksičnost bakra za ribe i njegova biodostupnost pod uticajem su fizičko-hemijskih osobina vode tj. pH, rastvorenih materija, sadržaja organskih materija i tvrdoće (Erickson et al., 2008). U zagađenim sredinama ribe mogu usvajati Cu i preko škrge i preko crevnog sistema (Dallinger et al., 1987). Uloga jetre u metabolizmu Cu kod riba je u njegovoj akumulaciji kada su ribe izložene visokim koncentracijama i raspodeli u organizmu kada su nedovoljne količine prisutne u hrani i vodi (Kamunde et al., 2002).

1.4.1.1.3 Gvožđe (Fe)

Gvožđe (Fe) je jedan od najrasprostranjenijih metala na Zemlji (Bury & Grosell, 2003). Esencijalan je element neophodan za mnoge fiziološke funkcije i njegova homeostaza u organizmu strogo je regulisana različitim mehanizmima. U biološkim sistemima prisutan je u tri oksidativna stanja (II, III i IV). Veliki deo Fe u organizmu je vezan za hemoglobin, transferin, feritin i enzime koji sadrže gvožđe. Prekomerni unos Fe ili poremećaji u njegovoj regulaciji mogu biti toksični što je povezano sa njegovom sposobnošću da katalizuje formiranje slobodnih radikala preko Fenton reakcije. Štetni efekti Fe uključuju oštećenje DNK, lipidnu peroksidaciju i oksidaciju proteina (Sevcikova et al., 2011). Fero gvožđe (Fe^{2+}), koje je potentnije od feri gvožđa (Fe^{3+}), katalizuje formiranje vodonik peroksida i stvaranje slobodnih radikala u prisustvu nezasićenih masnih kiselina i kiseonika (Watanabe et al., 1997). Iako škržni epitel apsorbuje Fe u određenoj

meri, crevna mukoza se smatra glavnim mestom ulaska u organizam riba (Bury et al., 2003).

1.4.1.1.4 Mangan (Mn)

Mangan (Mn) je jedan od najrasprostranjenijih metala u prirodi. Obično se nalazi u stenama, zemljištu i vodi, a Zemljina kora sadrži oko 0,1 % Mn. U akvatičnim sredinama prisutan je kao Mn^{2+} i Mn^{4+} . Prelazak iz jedne forme u drugu dešava se putem abiotičke ili biotičke oksidacije i redukcije. Jedinjenja Mn^{2+} su rastvorljiva, dok se Mn^{4+} najčešće nalazi u vidu nerastvorljivih oksida. Iako je Mn sveprisutan i široko rasprostranjen u prirodi, organizmima je potreban u malim količinama za normalan razvoj i funkcionisanje. Sastavni je deo metaloenzima i aktivator enzima kao što su hidrolaze, kinaze, dekarboksilaze, DNK i RNK polimeraze i transferaze (Culotta et al., 2005). Glavni antropogeni izvori Mn uključuju ispuste komunalnih otpadnih voda, deponije, rudarstvo, proizvodnju čelika i sagorevanje fosilnih goriva. Izlaganje visokim koncentracijama Mn može biti toksično i uticati negativno na kondiciju organizma (Roth, 2006; Pinsino et al., 2012). Unos Mn od strane akvatičnih beskičmenjaka i riba značajno se povećava sa povećanjem temperature i snižavanjem pH vode (Howe et al., 2004). Oslobođanje Mn u akvatične ekosisteme može ugroziti reproduktivni potencijal riba (Srivastava & Agrawal, 1983).

1.4.1.1.5 Molibden (Mo)

Molibden (Mo) je zastupljen u Zemljinoj kori sa oko 0,0015 % i javlja se najčešće u tri oblika, kao molibdenit (MoS_2), povelit ($CaMoO_4$) i vulfenit ili olovo molibdat ($PbMoO_4$). Molibdenit je dominantno prisutan i osnovni je izvor Mo. Mo je prisutan u tkivima svih biljaka, životinja i ljudi i smatra se esencijalnim elementom za sve oblike života. Koncentracije Mo u prirodnim populacijama životinja, ribama i beskičmenjacima su niske u poređenju sa koncentracijama u kopnenim biljkama (Eisler, 1989). Ulazi u sastav metaloenzima ksantin oksidaze i kofaktor je nekoliko enzima. Sagorevanje uglja predstavlja najveći izvor Mo u atmosferi (61 % ukupnog atmosferskog Mo iz antropogenih izvora). Mo je i sastavni deo čelika i drugih legura koje se koriste u proizvodnji cevi za dobijanje X-zraka, ekrana, radio mreža i svećica. Jedinjenja Mo su prisutna u lubrikantima,

farbama, gumama i đubrivu (Reid, 2002). Postoji relativno malo informacija o fiziološkom uticaju povećanih koncentracija Mo na ribe.

1.4.1.1.6 Cink (Zn)

Cink (Zn) je 23. element po rasprostranjenosti u Zemljinoj kori i uglavnom je prisutan kao cink sulfid (ZnS). Esencijalan je element za ćelije svih poznatih organizama i drugi je po rasprostranjenosti, odmah posle Fe, kod većine kičmenjaka. Neophodan je za mnoge osnovne biološke procese, uključujući metabolizam proteina, ugljenih hidrata i lipida, ima važnu ulogu u imunskom sistemu, neurotransmisiji i ćelijskoj signalizaciji. Pošto ulazi u sastav mnogih enzima, odgovoran je za različite biološke funkcije, za koje su neophodni relativno visoki nivoi Zn da bi se održale (Yılmaz et al., 2010). U većini prirodnih voda Zn je dominantno prisutan kao slobodan jon Zn^{2+} . Akumulacija Zn u škrgama riba i toksičnost u slatkoj vodi zavisiće od hemije vode, količine rastvorenih organskih materija, koncentracije Ca^{2+} i pH vode (Playle, 1998). Oko 75 % proizvedenog Zn koristi se za galvanizaciju čelika, u livnicama i proizvodnji legura, a preostalih 25 % u proizvodnji gume, hemikalija, boja i poljoprivrednih proizvoda. Kako se Zn u organizmima nalazi u visokoj koncentraciji, izlaganje riba ovom elementu uglavnom ne dovodi do povećane koncentracije u tkivima, dok dokazi za biomagnifikaciju putem lanca ishrane ne postoje (Goodyear & McNeill, 1999).

1.4.1.1.7 Kobalt (Co)

Kobalt (Co) je metal koji se nalazi u malim koncentracijama u Zemljinoj kori, a u prirodi se javlja u okviru različitih minerala. Esencijalan je element za ribe i druge organizme jer ulazi u sastav cijanokobalamina tj. vitamina B12 (Blust, 2011). Najranija upotreba Co vezuje se za proizvodnju plavog stakla i određenih boja. Co se koristi u proizvodnji legura gde poboljšava njihovu snagu, otpornost na visoke temperature i sprečava koroziju, u proizvodnji magneta, galvanizaciji i kao katalizator za prečišćavanje nafte. Posebno se ističe njegova upotreba za proizvodnju punjivih baterija hibridnih električnih vozila (Wang, 2006). Koncentracije Co u prirodi prilično su niske, ali se mogu povećati pod uticajem navedenih antropogenih aktivnosti. Co pripada grupi metala koji

mogu blokirati Ca^{2+} kanale i poremetiti njegovu regulaciju u akvatičnim organizmima. Co se ne akumulira intenzivno kod većine vrsta riba, kao što je slučaj sa drugim metalima i nije utvrđena biomagnifikacija kroz lanac ishrane (Gál et al., 2008). Co^{2+} može blokirati mehanosenzorne ćelije bočne linije riba i tako izazvati poremećaje u orijentaciji, ponašanju i detekciji plena (Butler, 2016).

1.4.1.2 Neesencijalni elementi

1.4.1.2.1 Aluminijum (Al)

Aluminijum (Al) je široko rasprostranjen element u vazduhu, vodi i zemljištu sa udelom od 8 % u Zemljinoj kori, odmah posle kiseonika (47 %) i silicijuma (28 %) (Kumar & Gill, 2009). Njegove količine u životnoj sredini su se povećale usled antropogenih aktivnosti, kao što su proizvodnja kućnih aparata, konzervi, hrane, kozmetike, lekova i herbicida (Verstraeten et al., 2008; Pereira et al., 2013). Smatra se neesencijalnim elementom, a njegova povećana biološka dostupnost dovodi se u vezu sa akutnim i hroničnim oboljenjima ljudi. Akumulacija Al u tkivima i organima uzrokuje njihovu disfunkciju, a efekti su često u saglasnosti sa koncentracijama ovog metala u tim organima (Becaria et al., 2002). Aluminijum se može vezati za jedinjenja koja sadrže kiseonik i azot, a posebno za neorganske i organske fosfate. Preko ovih interakcija, vezuje se za brojne biološke makromolekule (Exley, 2004). Povećane koncentracije Al u vodi predstavljaju jedan od velikih problema u životnoj sredini jer je Al pod određenim uslovima toksičan za ribe (Exley et al., 1991).

1.4.1.2.2 Arsen (As)

Metaloid arsen (As), okarakterisan kao prioritarna hazardna supstanca, jedna je od najštetnijih supstanci koja dospeva u akvatične ekosisteme kao rezultat geogenih procesa i antropogenih aktivnosti (ATSDR, 2002). Prirodno se nalazi u tragovima u akvatičnim ekosistemima, ali se njegova koncentracija povećala usled industrijskih, poljoprivrednih i rudarskih aktivnosti (Olmedo et al., 2013). Jedinjenja arsena obimno se koriste kao herbicidi, fungicidi, u konzervaciji drveta, u stipsama (desikantima), kao insekticidi za

tretiranje životinja, u bojama i farbama. Obimno se koristi u poljoprivredi, proizvodnji stakla, keramike, metalnih legura, poluprovodnika i električnih uređaja (Martin & Griswold, 2009). Nema poznate uloge u biološkim sistemima, a čak i niske koncentracije mogu ugroziti zdravlje akvatičnih i kopnenih organizama, uključujući i čoveka (Ng et al., 2003). U prirodi se može naći u neorganskom i organskom obliku, a smatra se da se neorganski oblik bolje akumulira, te da je toksičniji za izložene organizme (Oremland & Stolz, 2003). Arsen može indukovati genotoksičnost putem stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i smanjenja antioksidativne zaštite organizma (Lynn et al., 1997; Shi et al., 2004).

1.4.1.2.3 Barijum (Ba)

Barijum (Ba) je mikroelement prisutan u magmatskim i sedimentnim stenama. Iako se u prirodi ne nalazi u slobodnom stanju, prisutan je u brojnim jedinjenjima kao dvovalentni katjon, a najčešće kao barit (BaSO_4) ili viterit (BaCO_3). Osim što se normalno nalazi u Zemljinoj kori, a samim tim i u većini površinskih voda, Ba takođe dospeva u životnu sredinu putem industrijskih aktivnosti. Njegova jedinjenja se koriste u proizvodnji plastike, gume, elektronskih uređaja, tekstila, keramike, posuđa, cigala, stakla, papira, lekova i kozmetike. Dospeva u atmosferu tokom procesa sagorevanja uglja, fosilnih goriva i otpada, a takođe se nalazi u metalurškim i industrijskim otpadnim vodama. Taloženje u zemljištu može biti rezultat antropogenih aktivnosti kao što su odlaganje pepela i deponije. Generalno postoji malo informacija o potencijalnim štetnim efektima Ba po ribe. Kod ljudi, unos visokog nivoa rastvorljivih jedinjenja Ba može izazvati gastrointestinalne probleme, hipertenziju, aritmije i paralizu skeletnih mišića (WHO, 2003).

1.4.1.2.4 Olovo (Pb)

Među neesencijalnim metalima, malo njih se može porediti sa važnošću olova (Pb) za ljudsku istoriju u pogledu primene, ali je ovaj element takođe veoma toksičan. Pb je perzistentan metal koji je okarakterisan kao prioritetna hazardna supstanca. Nema poznate biološke funkcije, a toksičan je čak i u malim dozama (Flora et al., 2012). Nalazi se u niskim koncentracijama u Zemljinoj kori, uglavnom u obliku olovo sulfida (PbS). Iako se

javlja u prirodi, njegove koncentracije u životnoj sredini su se značajno povećale usled antropogenih aktivnosti kao što su metalurgija, proizvodnja boja i benzina koji sadrže olovo. U vodu može dospeti putem otpadnih voda industrije i topionica, starih olovnih cevi vodovoda, pesticida, padavina, spiranja ulica i otpadnih voda domaćinstava. Ribe lako apsorbiraju Pb^{2+} iz vode i smatra se da je direktan unos preko škrga primaran način unosa u slatkim vodama, putem jonske mimikrije. Kako se slabo akumulira u mišiću riba, zagađenje riba olovom generalno ne predstavlja značajan rizik po zdravlje ljudi. Olovo smanjuje antioksidativnu zaštitu i može izazvati značajno povećanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i oksidativni stres, što može voditi do različitih poremećaja u funkcionisanju lipida, proteina i DNK molekula (Authman et al., 2015).

1.4.1.2.5 Stroncijum (Sr)

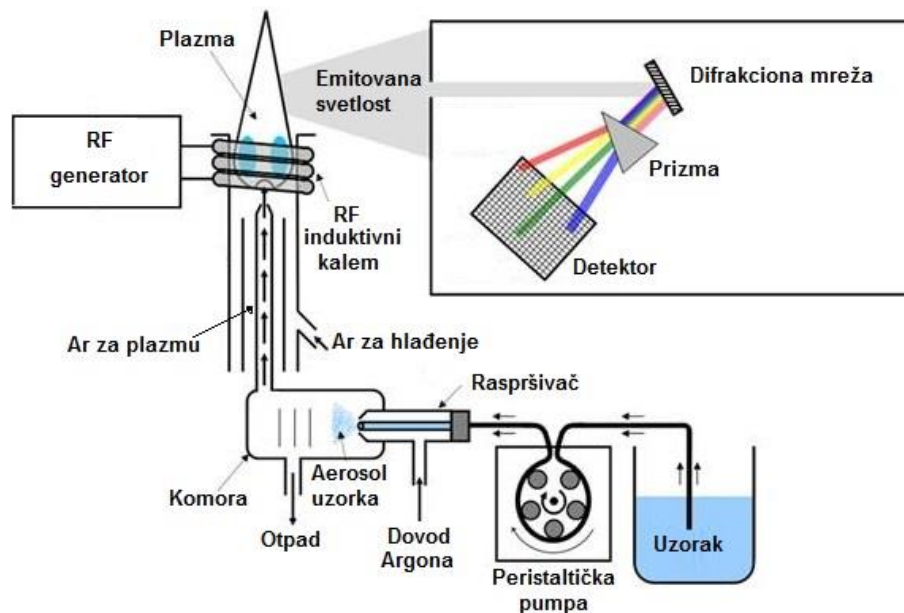
Stroncijum (Sr) je široko prisutan u prirodi kao celestit ($SrSO_4$) i stroncijanit ($SrCO_3$) i čini oko 0,037 % Zemljine kore. Prirodni Sr je mešavina četiri stabilna izotopa (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr i ^{88}Sr), pri čemu je ^{88}Sr najzastupljenija forma koja čini oko 83 % prirodnog Sr. Najvažniji antropogeni izvori su nuklearne aktivnosti, kao što su nuklearne termoelektrane, fabrike za preradu nuklearnog goriva, postrojenja za skladištenje nuklearnog otpada i proizvodnja nuklearnog oružja. Jedinjenja stroncijuma koriste se u industriji keramike i stakla, pirotehnike, pigmenata za boje, fluorescentnog svetla i lekova. Generalno, elementarni Sr se ne smatra toksičnim za organizme, ali postoji malo istraživanja na ovom polju na ribama i drugim akvatičnim organizmima (Chowdhury & Blust, 2012).

1.4.1.3 Detekcija metala i metaloida metodom ICP-OES

Metoda induktivno spregnute plazme optičko emisije spektroskopije (ICP-OES) jedna je od najpouzdanijih i najšire korišćenih analitičkih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata u tragovima u velikom broju različitih uzoraka (Hou et al., 2000). Princip se zasniva na sposobnosti atoma iz uzorka da prime energiju plazme i pređu u pobuđeno stanje. Pri povratku u osnovno stanje emituje se elektromagnetno zračenje talasne dužine karakteristične za određeni element. Detekcija zračenja određene

talasne dužine koristi se u kvalitativnoj analizi, dok se izmereni intenzitet koristi za kvantitativnu analizu uzorka. Argonska plazma je visoko jonizovan gas koji sadrži veliku količinu jona i elektrona argona. Argon je prirodan, plemenit, hemijski inertan gas pa ne može nagraditi stabilna jedinjenja sa elementima iz uzorka. Usled visoke energije jonizacije argon može da eksitira većinu elemenata iz periodnog sistema. Za analizu su potrebne male količine uzorka i moguća je detekcija veoma niskih koncentracija elemenata (Stalović & Đorđević, 2013; Velimirović, 2013).

Uzorak se pomoću peristaltičke pumpe unosi u raspršivač pod visokim pritiskom i pretvara u aerosol. Kada se atomi u uzorku pobude plazmom oni će prilikom povratka u osnovno stanje emitovati svetlost specifične talasne dužine. Zbog veoma visoke temperature plazme u ICP izvorima dobijaju se složeni spektri koji se dalje analiziraju pomoću spektroskopa. Funkcija spektroskopa je da razloži belu svetlost koja stiže od plazme na različite talasne dužine. Kada se dobiju različite talasne dužine, emitovane od različitih elemenata, njihovi intenziteti se mogu izmeriti detektorom (Slika 1.4).



Slika 1.4. Princip rada aparata ICP-OES (modifikovano sa [sites.google.com](https://www.google.com))

1.4.2 Oštećenje DNK molekula kao biomarker

Molekul DNK se nalazi u ćelijama svih živih organizama i nosilac je genetičke informacije. Svaka neprogramirana promena u strukturi DNK može dovesti do ozbiljnih bioloških posledica. Neki od hemijskih i fizičkih agenasa u životnoj sredini klasifikovani su kao genotoksični, što znači da poseduju potencijal da interaguju sa DNK molekulom i oštete njegovu strukturu (Shugart, 2000).

Genotoksikologija je polje nauke koje proučava interakcije agenasa koji oštećuju DNK tj. genetički materijal ćelije i efekte tih interakcija na zdravlje ljudi. Ekogenotoksikologija je pristup koji primenjuje principe i tehnike genotoksikologije u proceni efekta zagađenja životne sredine genotoksičnim agensima na stanje ekosistema. Za razliku od toksikoloških ispitivanja kojima je u fokusu stanje jedinke, ekogenotoksikologija procenjuje posledice genotoksičnih agenasa na kvalitativne i kvantitativne osobine populacija (Akpoilih, 2012).

Uticaj genotoksičnih agenasa na integritet ćelijske DNK jedan je od prvih događaja u organizmima izloženim zagađenju. Oštećenje molekula DNK može se koristiti kao biomarker izlaganja, ali i kao biomarker efekta. Detekcija prekida DNK lanaca može se koristiti kao opšti biološki odgovor i biomarker izlaganja genotoksičnim agensima, kako se ova promena može popraviti u procesu reparacije. Ukoliko se prekidi ne isprave ili se isprave na pogrešan način, može doći do nastanka mutacija i/ili hromozomskih aberacija. Kako su ove promene trajne njihovo prisustvo se koristi kao biomarker efekta (Shugart, 2000). Ukoliko mutacija nastane u somatskim ćelijama ona može indukovati kancerogenezu, a ukoliko nastane u germinativnim ćelijama vodiće do nastanka nasledne promene (Wurgler & Kramers, 1992). Hromozomske aberacije mogu dovesti do ćelijske smrti, što će uzrokovati niz patofizioloških stanja.

Neke strukturne promene mogu direktno ukazati na genotoksični agens pod čijim dejstvom su nastale. Na primer, UV zračenje od 290-320 nm dovodi do pojave dimera pirimidinskih baza u DNK molekulu, a policiklični aromatični ugljovodonici se kovalentno vezuju za DNK i formiraju adukte. Sa druge strane, postoje strukturne promene koje, iako nespecifične, ukazuju na izlaganje genotoksičnim agensima. Jedna od takvih promena jeste prekid DNK lanca (Shugart, 2000). Jonizujuće zračenje, kao i slobodni radikali mogu

izazvati prekide lanaca direktno, dok drugi fizički agensi, kao što je UV zračenje i određeni hemijski agensi koji su genotoksični, izazivaju oštećenja na DNK molekulu (fotoprodukti, adukti, izmenjene baze i dr.), čijom obradom tokom procesa reparacije mogu nastati prekidi na DNK lancima.

Interpretacija dobijenih podataka o količini prekida na DNK molekulu nekog organizma nije jednostavna. Pored toga što izloženost organizma genotoksičnim agensima može izazvati prekide na DNK molekulu, oni se dešavaju svakodnevno i prilikom nepatoloških stanja. Stoga, javlja se problem razlikovanja DNK prekida koji su nastali u normalnim uslovima od DNK prekida indukovanih genotoksičnim agensima u životnoj sredini. Ovo razlikovanje se često može olakšati odabirom odgovarajućih kontrolnih ili referentnih populacija koje nisu pod dejstvom genotoksičnog stresa, ali ova populacija bi trebalo da se nalazi u istim uslovima kao i populacija koja se ispituje (Shugart, 2000).

1.4.2.1 Detekcija DNK oštećenja- komet test

Analiza promena na DNK molekulu akvatičnih organizama pokazala se kao izuzetno pogodna metoda za procenu genotoksičnog zagađenja u životnoj sredini. Procena DNK oštećenja komet testom smatra se biomarkerom izlaganja jer ovo oštećenje nije trajno i može se ispraviti. Komet test je razvijen iz metode Rydberg & Johanson (1978) koji su prvi put kvantifikovali DNK oštećenje u pojedinačnim ćelijama. Nakon toga, Ostling & Johanson (1984) su poboljšali ovaj test uvođenjem elektroforeze na mikrogelu u neutralnim uslovima. Kako liza i elektroforeza u neutralnim uslovima omogućavaju detekciju samo dvolančanih prekida DNK, Singh et al. (1988) koristili su alkalnu verziju testa, tako da su mogli da detektuju i jednolančane prekide DNK i alkalno labilna mesta.

Gel elektroforeza pojedinačnih ćelija (eng. *Single Cell Gell Electrophoresis* (SCGE)) ili komet test je prvi put primenjen u ekogenotoksikologiji pre više od 20 godina i od tada je postao jedan od najpoznatijih testova za detekciju prekida DNK lanaca u akvatičnim organizmima pri *in vitro*, *in vivo* i *in situ* izlaganjima (Ohe et al., 2004).

Prednosti korišćenja komet testa uključuju:

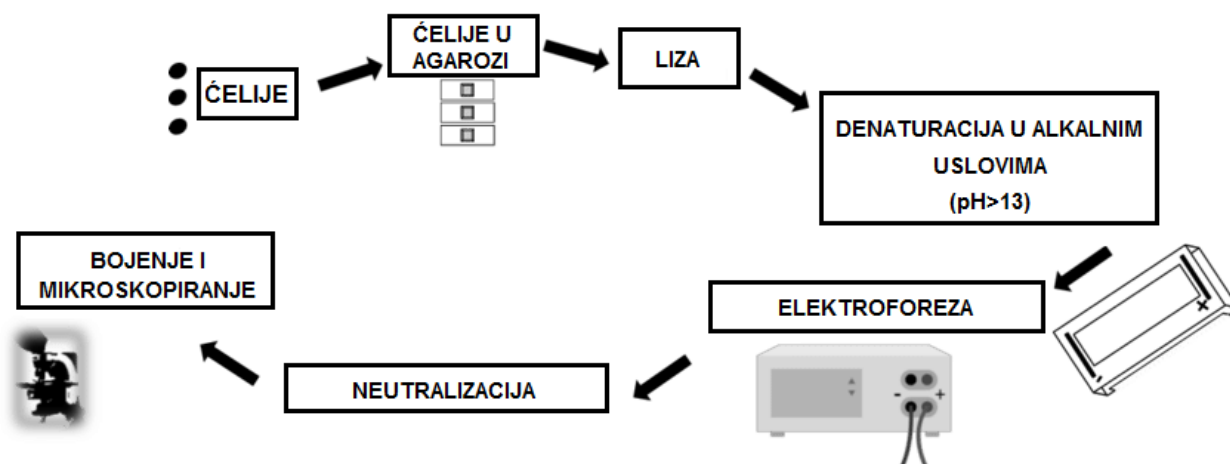
- (a) genotoksični efekat se detektuje na nivou pojedinačne ćelije;
- (b) većina eukariotskih ćelija je pogodna za testiranje;

- (c) potreban je relativno mali broj ćelija;
- (d) predstavlja generalno bržu i osjetljiviju metodu od drugih dostupnih metoda za procenu promena na DNK molekulu;
- (e) DNK prekidi nastaju relativno brzo po izlaganju genotoksičnim agensima, što omogućava procenu ranog odgovora organizma.

Dobro je poznata činjenica da genotoksični potencijal hemijskih agenasa zavisi od tipa ćelija i tkiva, kao i da se zagađujuće materije različito akumuliraju u organizmu. Različiti tipovi ćelija su različito osjetljivi zavisno od prirode supstance kojoj su izloženi, stope metabolizma i stope obnavljanja ćelija. U najčešće korišćene ćelije u komet testu spadaju cirkulatorne ćelije (hemocite mekušaca ili eritrociti riba). Ovo je najverovatnije iz praktičnih razloga jer se za analizu koristi tkivo koje već sadrži pojedinačne ćelije. Čvrsta tkiva kao što su škrge ili jetra zahtevaju disocijaciju ćelija pre početka komet testa, što potencijalno može dovesti do dodatnog oštećenja pod dejstvom mehaničkih i enzimskih procedura koje se koriste. Međutim, škrge su u direktnom kontaktu sa potencijalnim stresom iz okruženja i predstavljaju važno tkivo za usvajanje zagađivača, dok hepatociti jetre bioakumuliraju i biotransformišu zagađivače (Frenzilli et al., 2009).

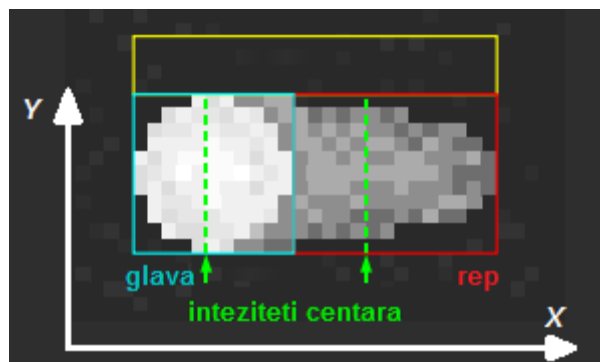
Osnovni princip komet testa zasniva se na činjenici da će negativno naelektrisani fragmenti DNK migrirati kroz agarozni gel ka pozitivnoj elektrodi tokom elektroforeze (Slika 1.5). Pod mikroskopom će se uočiti strukture koje podsećaju na komete, sa glavom u regionu nukleusa koja sadrži neoštećenu DNK i repom koji sadrži DNK fragmente koji su migrirali ka anodi. Daljina migracije i/ili količina DNK direktno ukazuju na količinu prekida tj. nivo oštećenja DNK molekula. Među različitim verzijama komet testa, alkalna verzija omogućava detekciju širokog spektra DNK oštećenja. U alkalnoj verziji komet testa mogu se detektovati dvolančani i jednolančani prekidi DNK, alkalno labilna mesta koja se u alkalnim uslovima prevode u jednolančane prekide i jednolančani prekidi nastali kao rezultat nedovršene ekscizije reparacije. U određenim uslovima test može detektovati DNK-DNK i DNK-protein unakrsne veze koje se, u odsustvu drugih vrsta oštećenja na DNK, iskazuju kao relativno smanjenje migracije DNK u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (Hartmann, 2003). Za vizuelizaciju kometa koriste se različite fluorescentne

DNK-interkalirajuće boje, kao što su etidijum bromid i akridin oranž, a pločice se posmatraju pod fluorescentnim mikroskopom.



Slika 1.5. Procedura komet testa (modifikovano iz Polat et al., 2016)

Za kvantifikaciju DNK oštećenja danas su u širokoj upotrebi kompjuterski softveri koji nude nekoliko parametara za prikazivanje oštećenja. Najčešće korišćeni parametri su: TI- intenzitet repa komete (eng. *tail intensity*), OTM- momenat repa komete (eng. *Olive tail moment*) i TL- dužina repa komete (eng. *tail length*). Parametar TI (%) meri intenzitet fluorescencije, koja direktno zavisi od količine DNK u repu komete. Parametar TI(pix) meri dužinu repa komete, ali se smatra nezadovoljavajućim jer dužina repa može biti ista za različite intenzitete repa komete, odnosno količine oštećenja DNK. OTM je izveden parametar i nastaje kao proizvod dva faktora: procenta DNK u repu komete (TI %) i razdaljine između centara intenziteta glave i repa komete duž x-ose (Slika 1.6). Razdaljina između centara intenziteta glave i repa u mnogome će zavisiti od algoritama koje softverski paketi koriste da bi definisali centar gravitacije DNK distribucije. Usled ovoga i potrebe za geometrijskim kalibrisanjem sistema za analizu slika, poređenje rezultata različitih laboratorija korišćenjem OTM parametra je otežano.



Slika 1.6. Određivanje intenziteta centara glave i repa komete duž x-ose - OTM parametar (modifikovano sa botanika.biologija.org)

Smatra se da će dalji razvoj komet testa u smislu prihvatljivosti kao regulatorne metode, u mnogome zavisiti upravo od parametra TI (%) koji bi omogućio harmonizaciju laboratorijskih protokola i interlaboratorijsko poređenje rezultata (Kumaravel et al., 2009; Sunjog et al., 2013).

1.4.3 Histopatologija tkiva kao biomarker

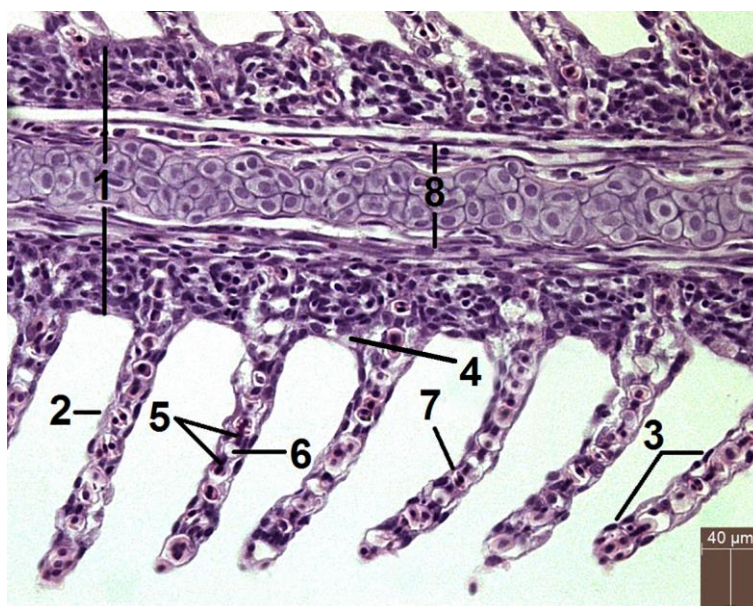
Histopatološko oštećenje tkiva rezultat je niza biohemijskih i fizioloških interakcija u ćeliji koje nastaju pod dejstvom različitih zagađivača. Teški metali mogu dovesti do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) koje oštećuju proteine, lipide i DNK izloženih organizama što se na nivou tkiva može videti kao histopatološka promena. Histopatološka analiza omogućava detekciju izlaganja nizu antropogenih zagađivača (Fatima et al., 2014). Prednost korišćenja histopatoloških promena kao biomarkera leži u činjenici da se procena vrši na središnjem nivou biološke organizacije (Bernet et al., 1999). Histopatološke promene specifičnih organa predstavljaju vremenski integrisane endogene i egzogene uticaje na organizam, proizašle iz promena na nižim nivoima biološke organizacije. Histopatološke promene su osetljive i dešavaju se pre promena u rastu i reprodukciji, a daju bolju procenu o stanju organizma u poređenju sa biohemijskim parametrima (Teh et al., 1997). Detekcija ovih promena može se smatrati biomarkerom izlaganja, ukoliko se detektuju blage i lako reverzibilne promene, ali i biomarkerom efekta, ako su detektovane

promene na tkivima ireverzibilne. Najčešće korišćeni organi riba za histopatološke analize u biomonitoringu su škrge i jetra.

Škrge riba predstavljaju multifunkcionalan organ zadužen za respiraciju, jonsku regulaciju, kiselinsko-baznu ravnotežu, ekskreciju azotnih jedinjenja (u prvom redu amonijaka) i predstavljaju 50 % ukupne površine tela (Wood, 2001). One su u konstantnom i direktnom kontaktu sa vodenom sredinom. Difuziona distanca između vode i krvi je veoma tanka i predstavlja debljinu ćelije skvamoznog epitela (0,5–10 μm), dok je efikasnost difuzione razmene pojačana suprotnim tokom krvi i vode na mestima razmene. Uzimajući u obzir ove činjenice, kao i podatak da slatkovodne vrste riba ne „piju“ vodu kao morske vrste, nije iznenađujuće što škrge ne samo da su glavno mesto ulaska mnogih zagađivača iz vode, već su i mesto dejstva većine zagađivača (Schlenk & Benson, 2003). Usled njihove specifične strukture, direktnog kontakta sa vodom i niza važnih funkcija, škrge se često analiziraju u proceni zagađenja akvatičnih ekosistema. Histopatološke analize ukazuju da ovaj organ deluje nespecifično i da različiti zagađivači mogu indukovati slične reakcije i promene na škragama (Lujčić et al., 2015). Jedna od prednosti korišćenja histopatoloških analiza je činjenica da su morfološke promene na škragama uočljive mnogo pre nego što dođe do promena u njihovoj funkciji ili ponašanju riba i znatno ih je lakše detektovati (Fanta et al., 2003; Yildirim et al., 2006).

Škrge košljoriba u koje spadaju deverika, krupatica i crnooka deverika, pokrivene su i zaštićene operkulumom. Većina košljoriba poseduje četiri para škržnih lukova koji se pružaju od osnove do vrha bukalne šupljine. Svaki škržni luk nosi nizove škržnih filamenata ili holobranhija, a svaka holobranhija izgrađena je od dve hemibranhije (Genten et al., 2009), dok jedan škržni luk nosi samo jedan red filamenata (hemibranhiju) i naziva se pseudobranhija, sa još uvek nejasnom funkcijom (Laurent & Dunel-Erb, 1984). Škržni filament ili primarne lamele su dugi prstoliki izraštaji vidljivi golim okom (5-15 mm) pokriveni višeslojnim epitelom, koji se često naziva i primarni epitel. U primarnom epitelu, nalaze se i hloridne i mukozne ćelije. Hloridne ćelije imaju ulogu u transportu jona. Svaka od ovih primarnih lamela poseduje veliki broj manjih sekundarnih lamela, koje su postavljene normalno u odonosu na primarne lamele. Epitel koji pokriva sekundarne lamele naziva se sekundarni ili respiratorni epitel i sastoji se od skvamoznih epitelnih ćelija,

obično postavljenih u jednom sloju. Mukozne ćelije su neravnomerno raspoređene među skvamoznim epitelnim ćelijama i nalaze se u bazalnom delu sekundarnih lamela. Prisustvo mukoznih ćelija je značajna karakteristika škržnog epitela. Biološki značaj bogatog sloja sluzi između riba i akvatične sredine obuhvata karakteristike kao što su jonska regulacija, mehanička i imunološka zaštita (Genten et al., 2009). Sekundarne lamele su upravo mesto gde se odvija razmena gasova i analogne su alveolama pluća. Prostori između sekundarnih lamela formiraju kanale kroz koje se dešava protok vode. Unutrašnjost sekundarnih lamela sastoji se od mreže spojenih krvnih kanala formiranih i odvojenih pojedinačnim pilarnim ćelijama sa kontraktilnom i potpornom funkcijom (Mallatt, 1985; Schlenk & Benson, 2003; Mumford et al., 2007). Na slici 1.7 pokazana je normalna morfologija škržnog filamena deverike sa sekundarnim lamelama i različitim tipovima ćelija prisutnim u škragama.

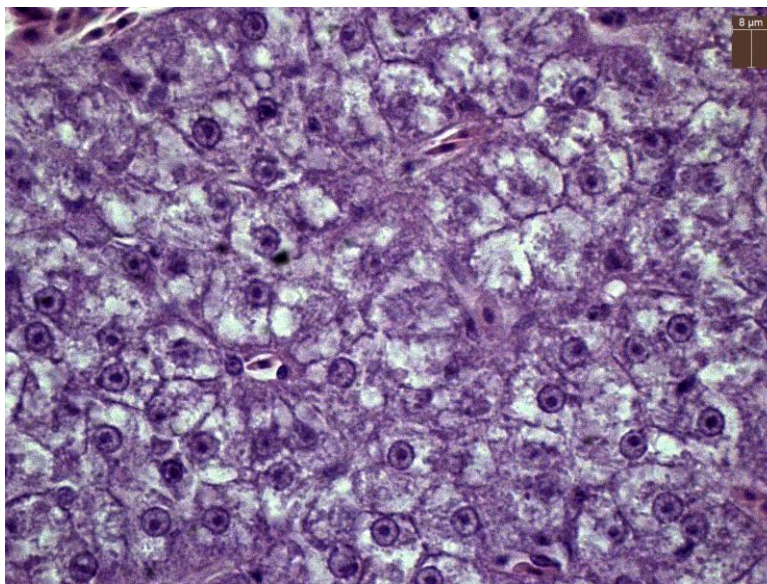


Slika 1.7. Longitudinalni presek škržnih filamena deverike: 1. Primarna lamela, 2. sekundarna lamela, 3. epitelna ćelija, 4. mukozna ćelija, 5. pilarne ćelije, 6. lumen kapilara, 7. eritocit u lumenu kapilara, 8. hrskavica, ispod koje se nalazi centralni venski sinus

Jetra je najveća mešovita žlezda, koja je deo digestivnog trakta, i po zapremini jedan od najvećih organa u organizmu ribe. Kod prirodnih populacija je obično crvenkasto-braon boje kod karnivora i svetlo braon kod herbivora, ali u određenim periodima godine

može biti žućkasta ili čak bela. Jetra je centralni organ u metabolizmu ugljenih hidrata i masti, a njene funkcije su, između ostalog: usvajanje, metabolizam, skladištenje i redistribucija nutrijenata i drugih endogenih molekula, pa je jedna od glavnih meta toksičnih hemikalija. Metabolizam zagađivača tj. biotransformacija koja se dešava u jetri je proces detoksifikacije koji povećava ekskreciju toksičnih supstanci i stoga smanjuje njihovu akumulaciju u organizmu. Ipak, tokom biotransformacije stvaraju se brojne elektrofilne reaktivne vrste koje lako interaguju sa važnim ćelijskim biomolekulima kao što su DNK i proteini. Ovo može narušiti normalne ćelijske funkcije i rezultirati u oštećenju ćelija ili kancerogenezi. Sve funkcije jetre, sinteza i redistribucija nutrijenata i prelaznih metabolita, biotransformacija i formiranje žuči, mogu biti uključeni u nastanak lezija u jetri. Usled brojnih fizioloških funkcija jetre i značajne plastičnosti, ona odgovara na dejstvo različitih zagađivača na različite načine (Schlenk & Benson, 2003).

Histologija jetre varira među vrstama, ali postoje neke opšte osobine koje su prisutne kod većine vrsta riba. Parenhim organa je smešten u okviru tanke kapsule vezivnog tkiva. Sam parenhim se sastoji od poligonalnih hepatocita sa centralno postavljenim jedrom i krupnim jedarcetom (Slika 1.8). U hepatocitima se skladišti glikogen i lipidi u manjoj meri. Osnovni faktori koji utiču na tip i količinu rezervnih materija su kvalitet hrane i aktivnost, što je najviše pod sezonskim uticajem. Sinusoidni kapilari su uokvireni endotelnim ćelijama i neravnomerno raspoređeni između hepatocita. Endotel kapilara je fenestriran malim porama. Žučni kanali se takođe nalaze u parenhimu jetre. Smešteni između hepatocita, žučni kanalići se spajaju i formiraju žučne kanale sve većeg dijametra i gotovo uvek završavaju u žučnoj kesi, oivičenoj pseudostratifikovanim epitelom (Mumford et al., 2007; Genten et al., 2009). Funkcionalna organizacija jetre riba ne odgovara onoj kod sisara i ne postoje lobulusi i portalne trijade u jetri (Rocha et al., 1995, 1997).



Slika 1.8. Hepatociti deverike sa krupnim jedrom i vidljivim jedarcetom

1.5 Područje istraživanja

1.5.1 Reka Sava

Reka Sava (945 km) predstavlja važan evropski vodotok i najveću pritoku reke Dunav. Protiče kroz Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu i Srbiju, i tri glavna grada (Ljubljana, Zagreb i Beograd), pokrivajući ukupnu površinu sliva od oko 97 713 km². Pripada Crnomorskom slivu, izvire u alpskom regionu u Sloveniji, a uliva se u Dunav, u Srbiji. U Sloveniji reka Sava ima odlike planinske reke, dok se od granice Slovenije i Hrvatske karakteriše kao ravničarska reka. Reka Sava predstavlja tipičan primer ekosistema pod velikim antropogenim pritiskom. U gornjem toku reke izgrađene su brojne veštačke brane hidroelektrana, što je značajno uticalo na tok reke. U srednjem i donjem toku reka Sava protiče kroz predele sa izraženom poljoprivrednom aktivnošću: Slavonija u Hrvatskoj, Bosanska Posavina i Semberija u Bosni i Hercegovini i Srem u Srbiji, koje zauzimaju ukupnu teritoriju od oko 100 000 km². Uticaj spiranja poljoprivrednih površina odrazio se u velikom narušavanju kvaliteta vode reke Save. Pored toga, čitavim tokom, reka je izložena brojnim tačkastim izvorima zagađenja, kao što su otpadne vode gradskih i industrijskih

zona u Sloveniji i Hrvatskoj, dok je donji tok pod velikim pritiskom otpadnih voda Beograda (oko 2 miliona stanovnika) (Vrzel et al., 2016; Kolarević et al., 2016 a). U pogledu vodosnabdevanja i veliki gradovi i manja naselja u slivu reke Save oslanjaju se na podzemne vode, dok Beograd koristi i podzemne vode (oko 70 %) i vodu reke Save. Ukupna dužina toka kroz područje Beograda je 62 km i reka Sava je glavni izvor vodosnabdevanja za Beograd, ali i glavni recipijent otpadnih voda (Popović et al., 2016).

Na reci Savi istraživanje je vršeno na lokalitetu Duboko, 24 km od centra Beograda i ušća sa rekom Dunav, koji je izložen brojnim tačkastim i difuznim izvorima zagađenja. Lokalitet je izložen netretiranoj otpadnoj vodi Obrenovca (oko 70 000 stanovnika), intenzivnoj poljoprivrednoj aktivnosti, ali i različitom kumulativnom zagađenju sa uzvodnih delova toka. Najveća termoelektrana u Srbiji, TE "Nikola Tesla A" Obrenovac-TENT A sa pripadajućim pepelištem smeštena je 15 km uzvodno od lokaliteta, što predstavlja dodatni problem za akvatični ekosistem na ispitivanom delu reke Save (Kostić et al., 2017).

1.5.2 Reka Dunav

Dunav je druga reka po dužini u Evropi (2 780 km), sa ukupnom površinom slivnog područja od oko 801 500 km². Dunavskom slivu pripada ukupno 19 zemalja (oko 81 milion stanovnika) što čini Dunav najznačajnijom međunarodnom rekom na svetu. Sama reka protiče kroz deset zemalja (Nemačka, Austrija, Slovačka, Mađarska, Hrvatska, Srbija, Rumunija, Bugarska, Moldavija i Ukrajina) i četiri glavna grada (Beč, Bratislava, Budimpešta, Beograd). Proizvodnja vode za piće i vodosnabdevanje za potrebe domaćinstava, poljoprivrede i industrije, od velike su važnosti za navedene države. Pored toga, Dunav je važan međunarodni plovni put i područje za rekreaciju. Duž toka, u mnogim sektorima, reka i njene brojne pritoke primaju nepotpuno tretirane i netretirane otpadne vode, što značajno doprinosi narušavanju kvaliteta ove važne međunarodne reke. Takođe, mnoge države su izgradile brane na Dunavu, za potrebe hidroelektrana, vodosnabdevanja i kontrole poplava. Izgradnja brana može uticati na usporavanje toka reke, povećanje temperature vode, smanjenje zamućenosti i povećanje *in situ* primarne produkcije. Kroz

Srbiju protiče srednji tok i deo donjeg toka Dunava ukupne dužine 588 km (oko 20 % ukupne dužine Dunava), a najveće pritoke su Tisa, Sava i Velika Morava. U Srbiji se voda Dunava koristi za vodosnadbavanje domaćinstava i industrije, za navodnjavanje i rad termoelektrana, ali i kao recipijent otpadnih voda. Među brojnim branama na Dunavu i njegovim pritokama, brane na Đerdapu I i II najveće su po zapremini, površini i hidroenergetskom potencijalu i nalaze se na granici Srbije i Rumunije. Rezultati ekspedicije koja je obuhvatila ispitivanje čitavog Dunava tokom 2013. godine (eng. *Joint Danube Survey - JDS*) od strane Internacionalne komisije za zaštitu Dunava (eng. *International Commission for the Danube River protection - ICPDR*) skrenuli su posebnu pažnju na sektor VI (1497–1075 rkm) koji je pod pritiskom velike količine netretiranih otpadnih voda, jer manje od 20 % otpadnih voda prolazi kroz sekundarni/tercijarni tretman, pre ispuštanja u površinske vode (Liška et al., 2015). U ovom sektoru, reka je pod uticajem velikih gradskih centara (Novi Sad i Beograd), kao i industrijskih postrojenja (Železara Smederevo i termoelektrana i kopovi Kostolac). Kolarević et al. (2016 b) potvrdili su visok genotoksični potencijal Dunava u sektoru VI.

Na reci Dunav istraživanje je vršeno na lokalitetu Višnjica koji se nalazi na desnoj obali Dunava (1162 rkm), na oko 8 km nizvodno od ušća sa Savom i centra Beograda. Ispust najvećeg kolektora otpadnih voda Beograda koje čine mešavinu komunalnih i industrijskih otpadnih voda nalazi se svega nekoliko kilometara uzvodno od mesta uzorkovanja (Kostić et al., 2016).

1.6 Ispitivanje kvaliteta Save i Dunava primenom mikrobioloških parametara i ekogenotoksikoloških analiza tkiva deverike, krupatice i crnooke deverike

Procena stanja kvaliteta površinske vode vršena je na reci Savi na lokalitetu Duboko i na reci Dunav na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine, kako bi se procenio uticaj različitih sezona na variranje parametara kvaliteta vode i odgovora biomarkera korišćenih vrsta riba.

Procena kvaliteta vode vršena je merenjem fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara fekalnog i organskog zagađenja. U proceni fekalnog zagađenja vršena je detekcija i kvantifikacija ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, *E. coli*, enterokoka i *C. perfringens*. U proceni organskog opterećenja vršena je detekcija i kvantifikacija heterotrofnih i oligotrofnih bakterija i određena je fosfatazna aktivnost vode.

Procena genotoksičnog potencijala Save i Dunava na odabranim lokalitetima vršena je primenom komet testa za kvantifikaciju DNK oštećenja u ćelijama krvi, jetre i škrge riba, kao biomarkera izlaganja genotoksičnim agensima. DNK oštećenje prikazano je upotrebom tri parametra: TI (%), OTM i TL (pix).

Kao biomarker efekta korišćene su histopatološke promene u jetri i škragama odabranih vrsta riba. Histopatološki preseći jetre i škrge ocenjivani su deskriptivno i semikvantitativnom metodom opisanom od strane Bernet et al. (1999). Prema ovoj metodi svaka promena ocenjuje se na osnovu faktora značajnosti i intenziteta. Množenjem ove dve vrednosti dobija se histopatološki skor za svaku kategoriju promena. Sabiranjem skorova svih promena u jednom tkivu dobija se histopatološki indeks organa, a sabiranjem histopatoloških indeksa organa dobija se ukupni histopatološki indeks za svaku jedinku.

Paralelno sa procenom DNK oštećenja i histopatoloških promena u jetri i škragama procenjeno je opterećenje ovih organa metalima i metaloidima. Koncentracije elemenata su određene metodom induktivno spregnute plazme-optičko emisijne spektroskopije (ICP-OES). Pored jetre i škrge, procena koncentracija metala i metaloida vršena je u mišiću i gonadama.

2 | CILJEVI

2 CILJEVI RADA

Zagađujuće supstance prisutne u otpadnim vodama pored toksičnih, mogu ispoljiti i genotoksične efekte i indukovati promene na svim nivoima biološke organizacije. Sezonske promene mogu imati značajan uticaj na variranje zagađenja u rekama i odgovor organizama i moraju se uzeti u obzir prilikom procene stanja kvaliteta površinske vode. Ribe se često koriste kao bioindikator stanja akvatičnih ekosistema jer imaju važno mesto u lancu ishrane, daju odgovor na niske koncentracije zagađivača i akumuliraju ih u svojim tkivima. Deverika, krupatica i crnooka deverika nisu ranije korišćene kao bioindikator za detekciju DNK oštećenja komet testom. U skladu sa svim gore navedenim postavljeni su sledeći ciljevi:

- Da se izvrši procena zagađenja reka Save i Dunava na odabranim lokalitetima praćenjem fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara fekalnog i organskog zagađenja.
- Da se kao biomarker akumulacije odrede koncentracije metala i metaloida tokom različitih sezona u jetri, škragama, gonadama i mišiću deverike, krupatice i crnooke deverike na odabranim lokalitetima.
- Da se kao biomarker izlaganja prati oštećenje DNK molekula alkalnim komet testom tokom različitih sezona, u krvi, jetri i škragama deverike, krupatice i crnooke deverike na odabranim lokalitetima.
- Da se kao biomarker efekta prate histopatološke promene tokom različitih sezona, u jetri i škragama deverike, krupatice i crnooke deverike na odabranim lokalitetima.
- Da se utvrde korelacije između praćenih biomarkera- koncentracije metala i metaloida, DNK oštećenja i histopatoloških promena u jetri i škragama analiziranih vrsta.

- Da se odredi uticaj sezone uzorkovanja na variranje fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara, koncentraciju metala i metaloida u tkivima riba, nivo DNK oštećenja i histopatoloških promena.
- Da se izvrši procena primenljivosti i osetljivosti ispitivanih vrsta kao bioindikatora stanja kvaliteta površinske vode primenom alkalnog komet testa.

3 | MATERIJAL I

METODE

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

Rastvori

Rastvor za lizu (pH 10)

Za 1 L rastvora potrebno je:

NaCl „Himedia“ (Indija)	146,6 g
EDTA „Sigma“ (SAD)	37,2 g
Tris „Sigma“ (SAD)	1,21 g
dH ₂ O.....	1000 mL

Triton X-100 „Sigma“ (SAD)

Dimetil sulfoksid (DMSO) “Sigma” (SAD)

Nakon podešavanja rastvora na pH 10, doda se 1 % Triton X-100 i snažno promućka. Za ćelije krvi, nakon dodavanja Triton X-100 dodaje se i 10 % DMSO.

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)

Za 1 L rastvora potrebno je:

10 M NaOH	30 mL
0,2 M EDTA	5 mL
dH ₂ O	965 mL

Nije potrebno podešavati pH.

10 M NaOH

Za 500 mL rastvora potrebno je:

NaOH „Sigma“ (SAD) 200 g

dH₂O do 500 mL

0,2 M EDTA

Za 500 mL rastvora potrebno je:

EDTA „Sigma“ (SAD) 37,2 g

dH₂O do 500 mL

Rastvor za neutralizaciju (pH 7,5)

Za 1 L rastvora potrebno je:

Tris „Sigma“ (SAD) 48,44 g

dH₂O 1000 mL

Podesiti na pH 7,5.

Nakon podešavanja pH sve rastvore čuvati u frižideru.

1 % NMP prvi sloj agaroze - presvlačenje predmetnih stakala (pločica)

Za 100 mL rastvora potrebno je:

NMP „Eurobio“ (Francuska)..... 1 g

dH₂O 99 mL

1 % NMP za drugi sloj agaroze

Za 100 mL rastvora potrebno je:

NMP „Eurobio“ (Francuska) 1 g

1xPBS „PAA The Cell Culture Company“ (Austrija)..... 99 mL

1 % LMP za treći sloj agaroze

Za 100 mL rastvora potrebno je:

LMP „Bio-Rad Laboratories“ (SAD) 1 g

1xPBS „PAA The Cell Culture Company“ (Austrija) 99 mL

1xPBS

Za 1 L rastvora potrebno je:

10xPBS „PAA The Cell Culture Company“ (Austrija) 100 mL

Sterilna dH₂O 900 mL

Tripsin 0,05 % „PAA The Cell Culture Company“ (Austrija)

Hank's Balanced Saline Solution (HBSS) „PAA The Cell Culture Company“ (Austrija)

Akridin oranž - primarni stok

10 mg/mL „Sigma“ (SAD)

Etidijum bromid - primarni stok

10 mg/mL „Sigma“ (SAD)

Akridin oranž/etidijum bromid

Za 1 mL rastvora potrebno je:

Akridin oranž - primarni stok 10 µL

Etidijum bromid - primarni stok..... 10 µL

dH₂O 980 µL

Akridin oranž za vizuelizaciju kometa

2 µg/mL „Sigma“ (SAD)

Heparin 5 000 i.j./1 mL rastvor za injekciju “Galenika” (Srbija)

Ulje karanfilića “Probotanic” (Srbija)

37 % Formaldehid “Zorka Pharma” (Srbija)

Za fiksiranje tkiva pripremljen je 4 % rastvor formaldehida u dH₂O.

Ze dehidraciju tkiva

Etanol “Zorka Pharma” (Srbija)70 %, 85 %, 95 %, 100 %

Ksilol “Zorka Pharma” (Srbija)

Za kalupljenje tkiva

Parafin Histowax- “Histolab” (Švedska) otopljen na 60 °C

Za histološko bojenje preseka:

Hematoksilin (Mayer-ov hematoksilin)

Za 1 L rastvora potrebno je:

Hematoksilin “Fisher Scientific” (SAD) 1 g

dH ₂ O	1 L
Na (K)-JO ₃	0,2 g
K (NH ₄) -Al(SO ₄) ₂	50 g
Limunska kiselina (C ₆ H ₈ O ₇)	1 g
Hloral hidrat (C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂)	50 g

Eozin- vodeni rastvor

Za 1 L rastvora potrebno je:

Eozin Y “Acros Organics” (Belgija)	2,85 g
dH ₂ O	1000 mL
Kanada balsam “Carl Roth” (Nemačka)	

Za digestiju tkiva:

65 % HNO ₃ Suprapur® „Merck“ (Nemačka)	6 mL
30 % H ₂ O ₂ Suprapur® „Merck“ (Nemačka)	4 mL

Mikrobiološke podloge:

Eosin Methylene Blue (EMB) podloga „Himedia“ (Indija)

Za 1 L podloge potrebno je:

Pepton	10 g
Dikalijum fosfat (K ₂ HPO ₄)	2 g

Laktoza	5 g
Saharoza	5 g
Eozin-Y	0,4 g
Metilensko plavo	0,065 g
Agar	13,5 g
dH ₂ O	1000 mL

Autoklavirati (20 min., 121 °C, 1 bar) i sterilno razliti u petri šolje.

Dekstrozni teluritni agar (DTA) „Torlak“ (Srbija)

Za 1 L podloge potrebno je:

Pepton-1	10 g
Mesni ekstrakt	10 g
Ekstrakt kvasca	3 g
Dekstroza	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
dH ₂ O	1000 mL

Nakon autoklaviranja (20 min, 121 °C, 1 bar) ostaviti podlogu da se ohladi do 60 °C i dodati 5 mL kalijum telurita (8 mg/mL). Dobro promućkati podlogu i sterilno razliti u petri šolje.

Triptoza Sulfit Cikloserin (TSC) podloga „Scharlab“ (Španija)

Za 1 L podloge potrebno je:

Triptaza	15 g
Sojin pepton	5 g
Ekstrakt kvasca	5 g
Natrijum metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1 g
Gvožđe amonijum citrat ($\text{C}_6\text{H}_9\text{FeNO}_7$)	1 g
Agar	18 g
dH ₂ O	1000 mL

Nakon autoklaviranja (20 min, 121 °C, 1 bar) ostaviti podlogu da se ohladi do 60 °C i dodati jednu bočicu D-cikloserin selektivnog suplementa na 250 mL medijuma. Dobro promešati i sterilno razliti u petri šolje.

Hranljivi medijum LA (Luria agar)

Za 1 L podloge potrebno je:

Goveđi ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 mL

Autoklavirati (20 min., 121 °C, 1 bar) i sterilno razliti u petri šolje.

Hranljivi medijum 1/10 LA

Za 1 L podloge potrebno je:

Goveđi ekstrakt	0,3 g
Pepton	0,5 g

Agar 15 g

dH₂O 1000 mL

Autoklavirati (20 min., 121 °C, 1 bar) i sterilno razliti u petri šolje.

Merenje fosfatazne aktivnosti vode:

Za 1L TTA pufera:

Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) 0,33 mol/dm³

TES (N-tris-Hydroxymethyl-methyl-2-aminoethanesulfonic acid) 0,33 mol/dm³

Glacijalna sirćetna kiselina 0,33 mol/dm³

Pomešati sastojke u odnosu 1:1:1 i podesiti pufere na pH 5, pH 7 i pH 9.

Za 1L 10N NaOH:

NaOH „Centrohem“ (Srbija) 400 g

dH₂O do 1 L

Za 10 mL rastvora para-nitrofenilfosfata (pNPP):

Bis(p-nitrophenyl) phosphate sodium salt „Sigma“ (SAD) 0,5 g

3.2 Metode

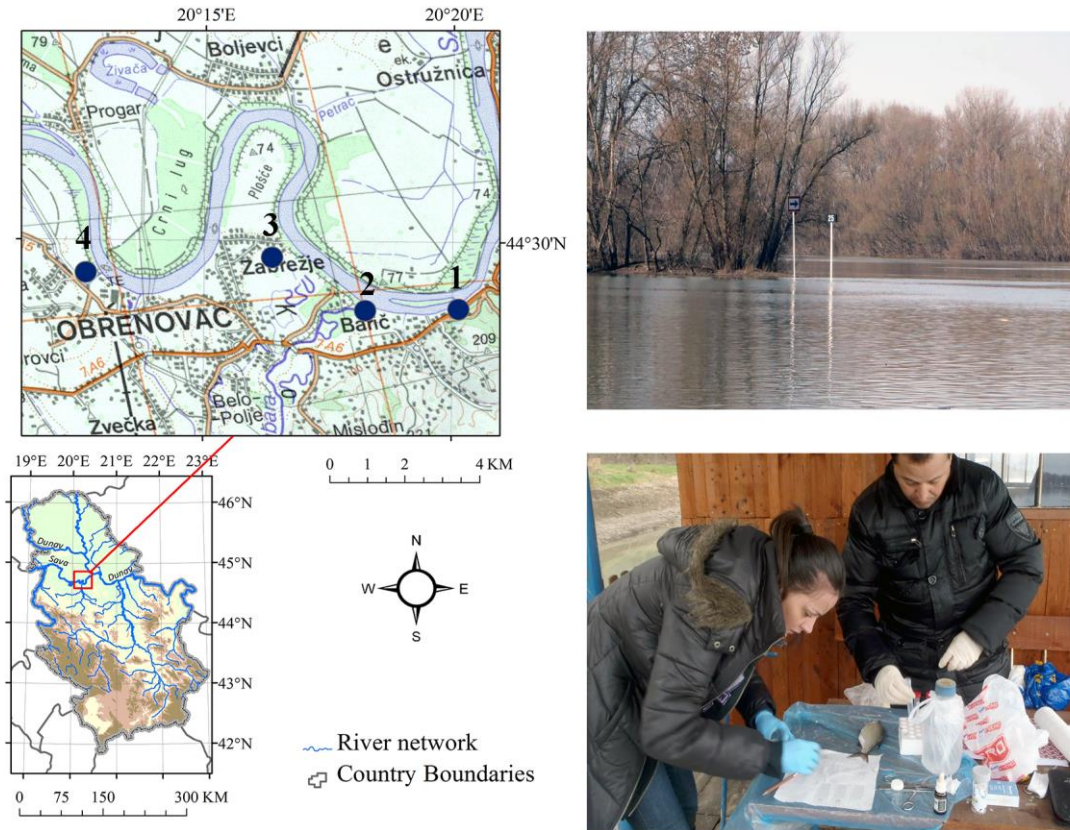
3.2.1 Opis ispitivanih lokaliteta

Ova disertacija obuhvata istraživanja koja su vršena tokom 2014. godine, na rekama Sava i Dunav. Prema Nacionalnoj regulativi obe reke pripadaju vodnim telima tipa I: velike nizijske reke, dominacija finog nanosa („Sl. glasnik RS", br. 74/2011).

3.2.1.1 Lokalitet Duboko

Na reci Savi istraživanje je vršeno na lokalitetu Duboko (44°39'39.77" N 20°16'52.57" E) koji se nalazi na desnoj obali, 24 km uzvodno od centra Beograda i ušća sa Dunavom (Slika 3.1). Lokalitet je odabran za ispitivanje usled izloženosti brojnim difuznim i tačkastim izvorima zagađenja. Na 28 km uzvodno od ušća Save i Dunava, tj. na oko 4 km uzvodno od lokaliteta Duboko, uliva se Kolubara, koja predstavlja poslednju veću, desnu pritoku Save. Kolubara prima netretirane komunalne vode Obrenovca (oko 70 000 stanovnika). Najveća termoelektrana u Srbiji TE „Nikola Tesla A“ Obrenovac- TENT A (6 blokova ukupne snage 1.650 megavata) sa pripadajućim pepelištem, nalazi se na oko 15 km uzvodno od mesta uzorkovanja. Ispust TE „Nikola Tesla B“ Obrenovac- TENT B nalazi se na oko 40 km uzvodno od lokaliteta. Termoelektrane "Nikola Tesla A" i "Nikola Tesla B" su poznati emiteri sumpor dioksida, azot oksida i suspendovanih čestica. Ove termoelektrane godišnje sagore oko 23 miliona tona uglja što ih čini jednim od najvećih globalnih zagađivača. Pepeo nastao sagorevanjem uglja odlaze se na dve deponije površina 600 ha i 400 ha. Jaki vetrovi koji karakterišu ovo područje (prosečno 124 dana godišnje) svojim dejstvom na pepelište direktno ugrožavaju veliki deo teritorije Obrenovca. Pored toga, ovo je područje intenzivne poljoprivredne aktivnosti. Od ukupno 31 826 ha upotrebnog poljoprivrednog zemljišta na teritoriji Obrenovca, 88 % predstavlja obradive površine, a ostatak je pod voćnjacima, vinogradima, livadama i pašnjacima. Emisija zagađujućih materija poreklom od termoelektrana, upotreba vode lošeg kvaliteta za navodnjavanje i prekomerna upotreba đubriva i pesticida predstavljaju potencijalne izvore zagađenja poljoprivrednog zemljišta i vode teškim metalima, ostacima pesticida, nitratima i fosforom (Popović et al., 2012). U maju 2014. godine usled nepovoljnih hidroloških uslova

došlo je do obimnih poplava u slivu reke Save, kada su upravo ovo područje i grad Obrenovac bili najviše pogođeni (Petrović et al., 2015).

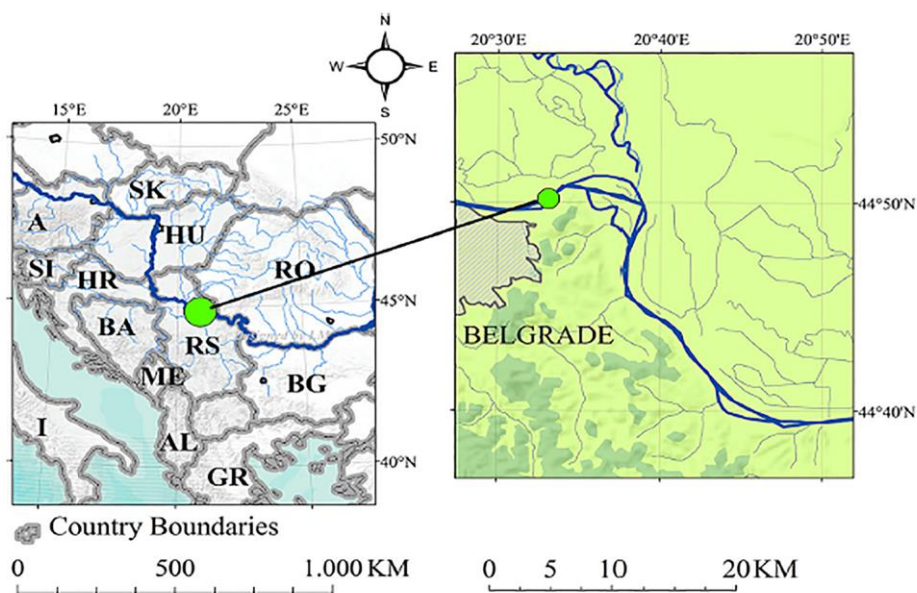


Slika 3.1. Lokalitet Duboko: 1. Mesto uzorkovanja, 2. Ušće Kolubare u Savu, 3. Obrenovac, 4. TENT A sa pripadajućim pepelištem

3.2.1.2 Lokalitet Višnjica

Na reci Dunav istraživanje je vršeno na lokalitetu Višnjica ($44^{\circ}49'55.20''$ N $20^{\circ}32'50.30''$ E) koji se nalazi na desnoj obali Dunava (1162 rkm), na oko 8 km nizvodno od ušća sa Savom i centra Beograda (Slika 3.2). Lokalitet Višnjica okarakterisan je kao jedno od glavnih žarišta fekalnog zagađenja na Dunavu (Kirschner et al., 2014). Ispust najvećeg kolektora otpadnih voda Beograda koje čine mešavinu komunalnih i industrijskih

otpadnih voda (Terzić et al., 2008) nalazi se u rukavcu na Adi Huji, svega nekoliko kilometara uzvodno od mesta uzorkovanja. Na ovom lokalitetu nalazi se i marina sa brodovima za rekreaciju koja je često izložena slučajnom curenju goriva/nafte u okolnu vodu (Vranković, 2015).



Slika 3.2. Lokalitet Višnjica

3.2.2 Uzorkovanje vode i tkiva ribe na odabranim lokalitetima

Na lokalitetu Duboko, uzorkovanje vode za procenu fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara, kao i tkiva deverike, krupatice i crnooke deverike vršeno je u

januaru (21.01.), februaru (19.02.), martu (20.03.), početkom juna (09.06.), krajem juna (27.06.), u julu (14.07.), avgustu (20.08.) i oktobru (10.10.) 2014. godine. Voda je uzorkovana sa drvene platforme, a riba je uhvaćena pecanjem od strane lokalnih ribara.

Na lokalitetu Višnjica, uzorkovanje vode za procenu fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara, vršeno je u januaru (23.01.), februaru (25.02.), martu (31.03.), aprilu (29.04.), maju (30.05.), junu (20.06.), julu (15.07.), avgustu (20.08.), septembru (24.09.), oktobru (29.10.), novembru (26.11.) i decembru (17.12.) 2014. godine. Uzorkovanje tkiva deverike vršeno je u februaru (25.02.), aprilu (29.04.), avgustu (26.08.) i novembru (26.11.) 2014. godine. Voda je uzorkovana sa motornog čamca na levoj obali, sredini i desnoj obali Dunava, a jedinke deverike izlovljene su mrežama stajaćicama i povlačnim mrežama. Kako je voda na lokalitetu Višnjica uzorkovana na levoj obali, sredini i desnoj obali, podaci o fizičko-hemijskim parametrima i mikrobiološkim indikatorima fekalnog i organskog zagađenja predstavljeni su kao prosečna vrednost tri dobijene vrednosti.

Pre disekcije, jedinke ribe anestetizirane su uljem karanfilića (50 μ L/L) i izmerene su im standardna dužina (SL [cm]), ukupna dužina (TL [cm]) i masa (W [g]).

Radi određivanja starosti jedinki uzorkovana je i krljušt iznad bočne linije, ispod dorzalnog peraja. Nakon što se očiste u destilovanoj vodi i osuše, po tri uzorka krljušti za svaku jedinku smeštana su na mikroskopsku pločicu i pokrivena pokrovnim staklom koje je pričvršćeno uz pomoć samolepljive trake.

Faktor kondicije, koji se često koristi da se pokaže opšte stanje riba, izračunat je na osnovu dužinsko-težinskog odnosa. Što je riba teža pri određenoj dužini tela, faktor će biti viši i smatra se da je riba u boljem stanju. Faktor kondicije se tradicionalno procenjuje prema jednačini predloženoj od strane Fulton (1911):

$$K = 100 * W / L^3$$

3.2.3 Analize fizičko-hemijskih parametara vode

Fizičko-hemijski parametri (pH, temperatura vode, koncentracija kiseonika, elektroprovodljivost, NO_2 , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) mereni su na samim lokalitetima, upotrebom odgovarajućih sonda i mobilne laboratorije (Hanna Instruments, WTW-Photolab spectrophotometer). Klase kvaliteta vode na osnovu fizičko-hemijskih parametara određene su prema Pravilniku o parametrima ekološkog i hemijskog statusa za površinske vode Republike Srbije („Službeni glasnik RS” br. 74/2011) za reke Tip I.

Podaci o specifičnim zagađujućim supstancama za odgovarajući mesec tokom 2014. godine, preuzeti su od Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije, koja vrši mesečni monitoring statusa površinske vode. Za reku Savu stanica najbliža lokalitetu Duboko je Ostružnica i nalazi se na oko 10 km nizvodno od lokaliteta. Od Agencije su preuzeti podaci za januar (30.01.), februar (19.02.), mart (19.03.), srednja vrednost za maj i jun (14.05./25.06.), jul (16.07.), avgust (20.08.) i oktobar (15.10.) 2014. godine. Za Dunav, stanica najbliža lokalitetu Višnjica je Vinča, i nalazi se na oko 26 km nizvodno. Od Agencije su preuzeti podaci za januar (30.01.), februar (19.02.), mart (19.03.), april (16.04.), maj (14.05.), jun (25.06.), jul (16.07.), avgust (20.08.), septembar (17.09.), oktobar (15.10.), novembar (19.11.) i decembar (24.12.) 2014. godine.

Hidrološki podaci o variranju vodostaja tokom 2014. godine na Savi i Dunavu preuzeti su od Republičkog hidrometeorološkog zavoda (RHMZ), sa mernih stanica najbližih lokalitetima Duboko i Višnjica. Merna stanica na Savi, najbliža ispitivanom lokalitetu je Beograd, koja se nalazi na oko 22 km nizvodno od Dubokog, tj. na manje od 1 km od ušća. Merna stanica na Dunavu, najbliža ispitivanom lokalitetu je Pančevo, koja se nalazi na oko 8 km nizvodno od Višnjice.

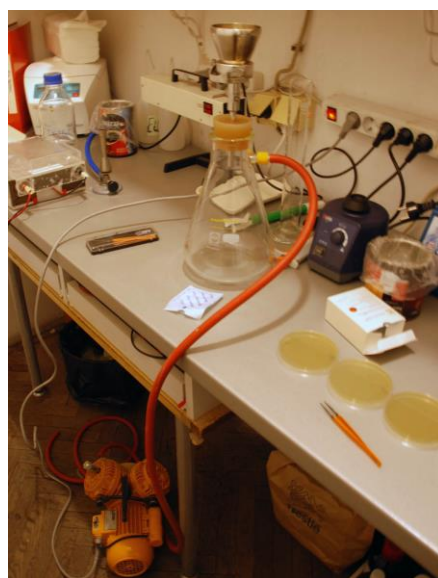
3.2.4 Analize mikrobioloških parametara u vodi

Prilikom uzorkovanja vode za mikrobiološke analize ispoštovana su pravila sterilnog rada i uzorci su transportovani na odgovarajući način do laboratorije, kako bi dobijeni podaci odgovarali stvarnom kvalitetu vode. Voda je uzorkovana u sterilne staklene flaše zapremine 1L, tako što se flaša odšrafi i otvor se postavi upravno na površinu vode. U

tom položaju flaša se potapa u vodu, do 30 cm dubine, a potom se pod vodom otvor flaše postavlja prema toku vode, da se flaša napuni. Odmah po uzimanju uzorka, boce se brzo zatvaraju i smeštaju u hladnu i mračnu torbu, kako bi se sprečila dalja deoba bakterija u uzorku. U ovoj torbi uzorci su transportovani do laboratorije i procesuirani u najkraćem mogućem roku. U okviru mikrobioloških analiza praćeni su indikatori fekalnog i organskog zagađenja.

3.2.4.1 Ispitivanje sanitarnog aspekta - metoda membranske filtracije

Ispitivanje sanitarnog aspekta na reci Savi obuhvatilo je izolaciju i kvantifikaciju ukupnih koliforma, fekalnih (termotolerantnih) koliforma, enterokoka i *C. perfringens*, metodom membranske filtracije i inkubacije na odgovarajućim selektivnim/diferencijalnim podlogama. Metoda membranske filtracije zasniva se na filtriranju određenih zapremina uzorka, odnosno razblaženja uzorka, kroz celulozno-nitratni membranski filter, sa porama prečnika 0,45 μm . Filtriranje se vrši upotrebom sterilne jedinice za filtriranje priključene na vakuum pumpu (Slika 3.3). Broj bakterija u ovoj metodi određuje se indirektno na osnovu prebrojavanja kolonija izraslih na površini hranljivog medijuma nakon inkubacije i izražava se kao broj jedinica koje formiraju kolonije u 100 mL uzorka (engl. “*colony forming units*” CFU/100 mL).

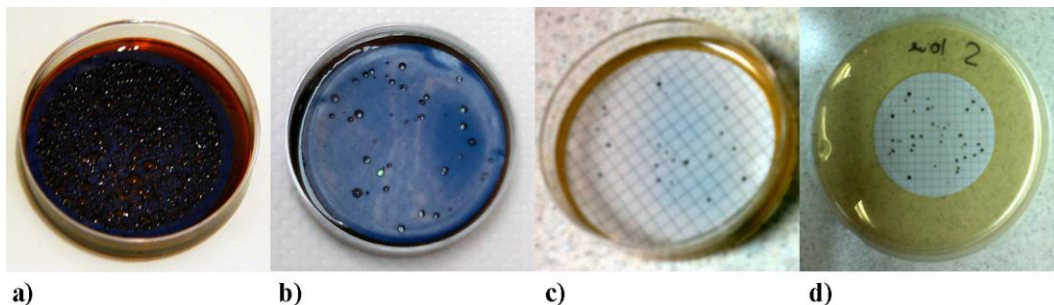


Slika 3.3. Jedinica za filtriranje uzoraka vode

Za izolaciju ukupnih i fekalnih koliforma koristi se Eosin methylene blue (EMB) agar koji je istovremeno selektivna i diferencijalna podloga. Kada se uzorci profiltriraju, sterilnom pincetom se filter pažljivo postavlja na površinu EMB podloge, a potom sledi inkubacija u toku 24 h, na 37 °C za izolaciju ukupnih koliforma i na 44,5 °C za izolaciju fekalnih (termotolerantnih) koliforma. Nakon inkubacije broje se tamno roze, crvenkaste i braon kolonije i preračunava se broj bakterija koji se izražava kao CFU/100 mL uzorka (Slika 3.4 a i 3.4 b).

Za izolaciju enterokoka nakon filtriranja određenih zapremina uzorka, filteri se postavljaju na površinu dekstroznog teluritnog agra (DTA), a potom inkubiraju na 37 °C, 24 h. Nakon inkubacije broje se karakteristične, crne kolonije i preračunava se CFU/100 mL uzorka (Slika 3.4 c).

Za izolaciju *C. perfringens* prvo smo pasterizovali 12 mL uzorka vode u dve sterilne epruvete (2x6 mL) u vodenom kupatilu (60±2 °C, 15±1 min.). Temperatura je merena u referentnoj epruveti ispunjenoj istom zapreminom dH₂O, kako bi 15 min. inkubacije počeli da merimo kada uzorak dostigne temperaturu od 60 °C. Kada se uzorak ohladio, profiltrirali smo 0,1 mL, 1 mL i 10 mL. Nakon filtriranja, filteri se postavljaju na površinu selektivne i diferencijalne triptoza sulfita cikloserin (TSC) čvrste podloge. Podloge se potom smeštaju u kese sa medijumom za vezivanje kiseonika i indikatorom prisustva kiseonika i kese se odmah zatvaraju. Nakon inkubacije u anaerobnim uslovima, na 44,5 °C, 24 h, broje se karakteristične, crne kolonije i preračunava se CFU/100 mL uzorka (Slika 3.4 d).



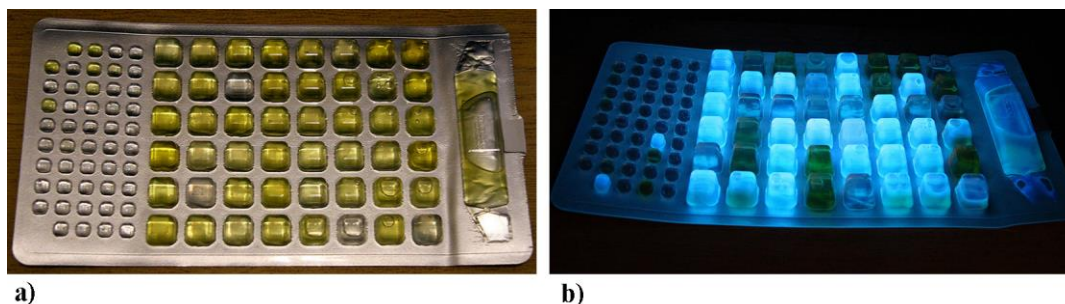
Slika 3.4. Kolonije (a) ukupnih koliforma, (b) fekalnih koliforma, (c) enterokoka i (d) *C. perfringens* na odgovarajućim podlogama

3.2.4.2 Ispitivanje sanitarnog aspekta - metoda enzimskog razlaganja supstrata

Ispitivanje sanitarnog aspekta na reci Dunav obuhvatilo je detekciju i kvantifikaciju ukupnih koliforma, *E. coli* i enterokoka metodom enzimskog razlaganja definisanog supstrata. Broj bakterija u ovoj metodi dobija se na osnovu broja pozitivnih enzimskih reakcija i očitava se iz tabela konstruisanih od strane proizvođača pri čemu se dobija najverovatniji broj bakterija u 100 mL uzorka, na osnovu statističke analize poznate kao “*Most Probable Number*” (MPN/100 mL).

Za detekciju ukupnih koliforma i *E. coli* primenjen je Colilert 18 sistem (ISO 9308-2:2012) koji omogućava istovremenu detekciju obe grupe indikatorskih mikroorganizama. U Colilert metodi koristi se definisani supstrat koji predstavlja mešavinu hromogenog supstrata orto-nitro-fenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) i fluorogenog 4-metilumbeliferil- β -D-glukuronid (MUG) supstrata. Ukupni koliformi poseduju enzim β -D-galaktozidazu koja im omogućava razlaganje hromogenog ONPG supstrata, pri čemu nastaje žuto obojeno jedinjenje o-nitrofenol, dok *E. coli* poseduje enzim β -D-glukuronidazu, ima sposobnost razgradnje fluorogenog MUG supstrata, pri čemu nastaje fluorescentni proizvod 4-metilumbeliferon.

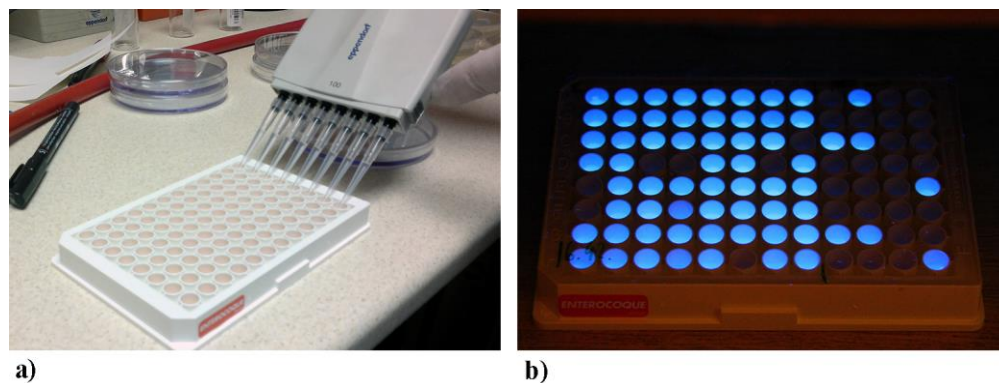
U sterilne, staklene flašice sipa se 100 mL uzorka koji se testira ili razblaženog uzorka u sterilnoj dH₂O, doda se Colilert praškasti supstrat i promućka. Nakon potpunog rastvaranja supstrata sadržaj iz flašica sipa se u Quanti-Tray/2000 ploče koje poseduju 97 komora (49 velikih i 48 malih). Ploče se zatvaraju provlačenjem kroz Quanti-Tray zavarivač (eng. *sealer*) i inkubiraju na 37 °C, 18 ± 6 h. Nakon inkubacije, za određivanje najverovatnijeg broja ukupnih koliforma broje se odeljci u kojima je došlo do promene boje medijuma iz bezbojne u žutu (Slika 3.5 a). Najverovatniji broj *E. coli* u uzorku dobija se kada se iste ploče izlože izvoru UV svetlosti (365 nm) i prebroji se broj odeljaka u kojima je došlo do pojave fluorescencije (Slika 3.5 b). Na osnovu broja velikih i malih odeljaka u kojima je došlo do pozitivne reakcije (žuta boja/fluorescencija) iz tabela dobijenih od proizvođača određuje se najverovatniji broj bakterija u 100 mL uzorka.



Slika 3.5. Enzimski metoda: (a) detekcija ukupnih koliforma i (b) *E. coli*

Za izolaciju enterokoka takođe su razvijene enzimski metode, koje primenjuju tehniku inkorporacije 4-metilumbeliferil- β -D-glukozid (MUD) fluorogenog supstrata u selektivnu podlogu, kako bi se detektovao enzim karakterističan za enterokoke, β -glukozidaza. Za detekciju i kvantifikaciju enterokoka razvijeni su i minijaturizovani MPN testovi. Metoda se zasniva na detekciji β -glukozidaze, čiji je supstrat MUD prisutan u dehidratisanom stanju na dnu bunarića mikroploče. U ovim testovima koriste se i specijalizovani tečni diluenti za pravljenje razblaženja uzorka. Jedan od takvih diluenata je DSM (eng. *Special Microplate Diluent*) koji sadrži veštačku morsku so, destilovanu vodu i indikator brom-fenol plavo. Korišćenjem DSM-a omogućava se razlikovanje razblaženja po obojenosti i olakšava njihova distribucija u bunariće. Supstrat se rehidratise nakon dodavanja uzorka u bunariće. Enzimskim razlaganjem supstrata oslobađa se fluorescentno jedinjenje 4-metilumbeliferon, koje se detektuje pod UV svetlošću (365 nm). Pri analizi, koristili smo dva razblaženja 1/2 i 1/20. Za pravljenje razblaženja 1/2 u 18 mL DSM dodali smo 18 mL uzorka vode. Za pravljenje razblaženja 1/20 u 18 mL DSM dodali smo 2 mL prethodnog (1/2) razblaženja. Mikrotitarska ploča puni se uz pomoć multikanalne pipete tako što se u 8 uzastopnih redova dodaje po 200 μ L razblaženja 1/2 (ukupno 64 bunara), a potom u preostala 4 reda po 200 μ L razblaženja 1/20 (ukupno 32 bunara) (Slika 3.6 a). Mikrotitarska ploča zatvara se lepljivom, providnom folijom i stavlja na inkubaciju 48 h, na 44 °C. Nakon inkubacije ploče se stavljaju pod izvor UV svetlosti (365 nm) i broje se bunarići u svakom od razblaženja u kojima je došlo do pojave fluorescencije (Slika 3.6 b). Na osnovu broja bunarića u kojima je došlo do pozitivne reakcije (fluorescencije) u oba

razblaženja, iz tabela dobijenih od proizvođača određuje se najverovatniji broj enterokoka u 100 mL uzorka.



Slika 3.6. Minijaturizovana enzimaska metoda: (a) punjenje mikrotitarskih ploča, (b) očitavanje rezultata nakon inkubacije

Na osnovu broja ukupnih koliforma, fekalnih koliforma/*E. coli* i enterokoka izvršena je klasifikacija kvaliteta vode prema okvirnoj direktivi Evropske unije (EU) sa integrisanim smernicama za kvalitet vode za kupanje (European Parliament & Council, 2006) na osnovu rada Kavka et al. (2006) (Tabela 3.1). Ova klasifikacija je u skladu i sa Pravilnikom o parametrima hemijskog i ekološkog statusa Republike Srbije („Službeni glasnik RS” br. 74/2011).

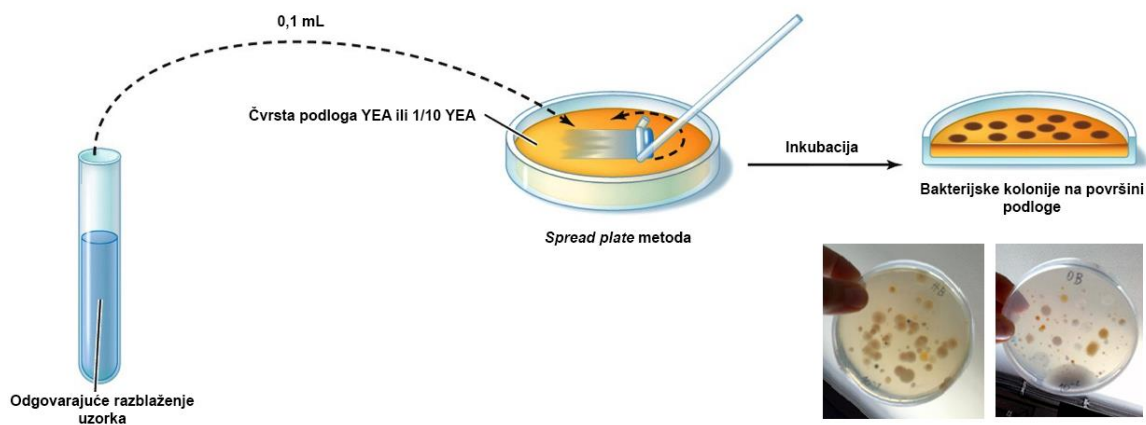
Tabela 3.1. Klasifikacija kvaliteta vode na osnovu broja fekalnih indikatora (Kavka et al., 2006)

	Klasa	I	II	III	IV	V
	Zagađenje	Nisko	Umereno	Kritično	Jako	Prekomerno
Ukupni koliformi	100 mL	≤500	≤10 000	≤100 000	≤1 000 000	>1 000 000
Fekalni koliformi/ <i>E. coli</i>	100 mL	≤100	≤1 000	≤10 000	≤100 000	>100 000
Fekalne enterokoke	100 mL	≤40	≤400	≤4 000	≤40 000	>40 000

3.2.4.3 Ispitivanje ekološkog aspekta

3.2.4.3.1 Heterotrofne i oligotrofne bakterije

Određivanje ukupnog broja aerobnih heterotrofa i fakultativnih oligotrofa vrši se u cilju provere kvaliteta vode sa aspekta njenog organskog zagađenja tj. opterećenosti. Aerobni heterotrofi određuju se na bogatoj hranljivoj podlozi LA. Oligotrofi se određuju na 10 puta razblaženoj LA podlozi (1/10 LA). Podloga se razblažuje kako bi se obezbedila niska koncentracija nutrijenata neophodna za izolaciju oligotrofa. Po 0,1 mL odgovarajućih razblaženja uzorka vode nanosi se na podloge LA i 1/10 LA. Sterilisan stakleni štapić koristi se za utrljavanje uzorka “*spread-plate*” metodom na površinu podloge (Slika 3.7). Inkubacija traje 3-5 dana, na 22-26 °C. Nakon inkubacije broje se sve kolonije i izračunava se ukupan broj heterotrofa/oligotrofa u 1 mL uzorka.



Slika 3.7. *Spread plate* metoda za izolaciju heterotrofnih i oligotrofnih bakterija

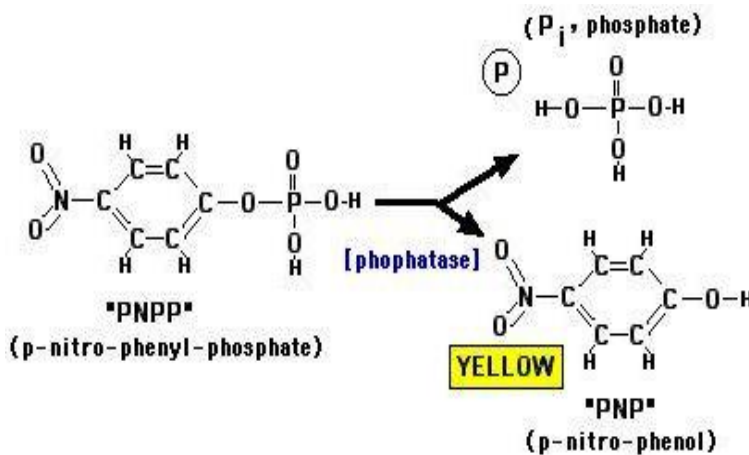
Ocena ekološkog statusa reka na osnovu broja aerobnih heterotrofa izvršena je prema Kohl (1975) i propisana Pravilnikom o parametrima hemijskog i ekološkog statusa Republike Srbije („Službeni glasnik RS” br. 74/2011) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Granice klasa ekološkog statusa reka na osnovu broja aerobnih heterotrofa (Kohl, 1975)

	Klasa	I-II	II-III	III-IV	IV-V
Broj aerobnih heterotrofa (metoda Kohl)	1 mL	500	10000	100000	750000

3.2.4.3.2 Određivanje fosfatzne aktivnosti vode

Za procenu organskog opterećenja vode meri se indeks fosfatzne aktivnosti koji predstavlja srednju vrednost aktivnosti kiselih, neutralnih i alkalnih hidrolaza fosfomonoestara i to njihove potencijalne aktivnosti (na određenoj pH i temperaturi od 30 °C). Test se zasniva na hidrolitičkom cepanju fosforne grupe jedinjenja para-nitrofenilfosfat (p-NPP) pod dejstvom enzima fosfataza. Kao rezultat ovog cepanja nastaju ortofosfat (P) i para-nitrofenol (p-NP), obojeno jedinjenje koje se može spektrofotometrijski kvantifikovati (Slika 3.8).



Slika 3.8. Cepanje molekula para-nitrofenilfosfata (p-NPP) na ortofosfat (P) i paranitrofenol (p-NP) pod dejstvom fosfataza

U tri epruvete dodaje se po 2,4 mL uzorka vode, po 0,3 mL sterilnog rastvora TTA pufera odgovarajućeg pH (redom pH 5, 7 i 9) i po 0,3 mL 5 % rastvora pNPP. Za svaki uzorak rade se tri ponavljanja (po tri puta za svaki pH), a kao negativna kontrola koristi se

sterilna dH₂O. Mešavina se promućka i inkubira 1 h, na 30 °C. Nakon toga, reakcija se prekida dodavanjem 0,1 mL 10N NaOH i smeša se centrifugira 10 min., 3000 rpm.

Kao posledica reakcije smeša se boji žuto usled nastanka para-nitrofenola (pNP), a intenzitet boje srazmeran je nivou aktivnosti fosfatata u uzorku. Ekstinkcija se očitava na 420 nm za kontrolu i uzorke, a kao slepa proba koristi se destilovana voda. Indeks fosfatne aktivnosti- IFA, izračunava se prema formuli:

$$\text{IFA } (\mu\text{molpNP/s/dm}^3) = D \cdot V \cdot C \cdot 1000 / v \cdot t \cdot d$$

gde su:

D- razlika u ekstinkciji na 420 nm između probe i kontrole

V- ukupna zapremina reakcione smeše (mL)

C- koeficijent molarne ekstinkcije (za pH iznad 8,5 on iznosi 90,9)

v- zapremina uzorka (mL)

t- vreme trajanja reakcije u sekundama

d- dužina puta svetlosti kroz kivetu

Skraćeni oblik formule je: $\text{IFA } (\mu\text{mol/s/dm}^3) = 33,667 \cdot D$

Na osnovu indeksa fosfatne aktivnosti takođe se može vršiti kategorizacija i određivanje kvaliteta vode prema klasifikaciji predloženoj od strane Matavulj et al. (1989) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Klasifikacija vode prema vrednostima indeksa fosfatne aktivnosti (Matavulj et al., 1989)

Indeks fosfatne aktivnosti ($\mu\text{m/s/dm}^3$ pNP) 30 °C	Kategorija		Karakteristike vode
<0,01	I	A	Maksimalno čista
0,01-0,1		B	Veoma čista
0,1-0,25	I-II		Čista
0,25-0,50	II	A	Zadovoljavajuće čista
0,50-1,0		B	Malo zagađena
1,0-2,5	II-III		Umereno zagađena
2,5-5,0	III	A	Zagađena
5,0-7,5		B	Veoma zagađena
7,5-10,0	III-IV		Prljava
10,0-15,0	IV	A	Veoma prljava
>15,0		B	Maksimalno prljava

3.3 Određivanje koncentracija metala i metaloida u tkivima ribe

Na lokalitetu Duboko analize metala i metaloida u tkivima deverike, krupatice i crnooke deverike rađene su na jedinkama uzorkovanim u februaru (5 jedinki), početkom juna (5 jedinki), julu (3 jedinke), avgustu (3 jedinke) i oktobru (2 jedinke), ukupno 18 jedinki. Na lokalitetu Višnjica analize metala i metaloida u tkivima deverike rađene su na jedinkama uzorkovanim u februaru, aprilu, avgustu i novembru, po 5 jedinki tokom svakog meseca, ukupno 25 jedinki. Nakon disekcije uzimani su uzorci škrge, jetre, mišića i gonada. Uzorci su odmah isprani destilovanom vodom, smešteni u plastične kesice i na ledu transportovani do laboratorije. Uzorci tkiva čuvani su na -20 °C do analize. Pre početka analize, uzorci tkiva su odleđeni na sobnoj temperaturi i izmerena im je ukupna masa (vlažna masa, eng. *wet weight*- ww) (Slika 3.9).



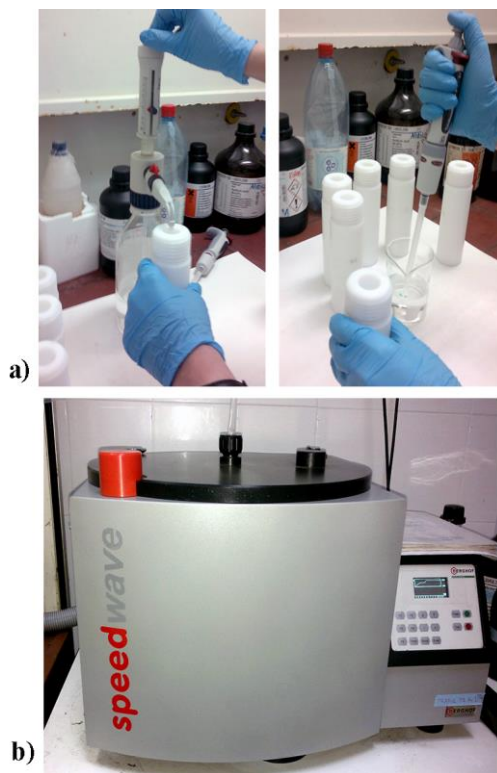
Slika 3.9. Merenje vlažne mase uzoraka pre liofilizacije

Nakon toga sledi liofilizacija (Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrator, GAMMA 1-16 LSC, Nemačka) koja podrazumeva sušenje tkiva na niskim temperaturama (Slika 3.10).



Slika 3.10. Liofilizator (Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrator, GAMMA 1-16 LSC, Nemačka)

Nakon liofilizacije težina uzoraka tkiva varirala je od 0,1-0,7 g suve mase. Ovako osušeni uzorci mase do 0,3 g izloženi su smeši od 6 mL 65 % HNO_3 i 4 mL 30 % H_2O_2 i smešteni u mikrotalasnu peć u kojoj se vrši digestija uzoraka (speedwaveTM MWS-3+, Berghof Products + Instruments GmbH, Nemačka) (Slika 3.11 a i b). Proces digestije izveden je sa temperaturnim programom za razlaganje uzoraka hrane, sa opsegom od 100 do 170 °C.



Slika 3.11. Proces digestije: **(a)** dodavanje 65 % HNO₃ i 30 % H₂O₂; **(b)** mikrotalasna peć (speedwave™ MWS-3+, Berghof Products + Instruments GmbH, Nemačka)

Po završetku digestije uzorci se hlade do sobne temperature i razblažuju destilovanom vodom do finalne zapremine od 25 mL. Detekcija metala i metaloida vršena je uz pomoć induktivno spregnute plazme-optičko emisijne spektroskopije (ICP-OES, Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments GmbH, Nemačka) (Slika 3.12).



Slika 3.12. Instrument sa induktivno spregnutom plazmom - optičko emisionom spektroskopijom (ICP-OES, Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments GmbH, Nemačka)

Ispitano je ukupno 16 elemenata koji su detektovani na sledećim talasnim dužinama:

Al 396,152 nm	Fe 259,941 nm	Cr 267,716 nm
As 234,948 nm	Sr 460,733 nm	Mn 257,611 nm
Cd 226,502 nm	Zn 213,856 nm	Mo 202,095 nm
Cu 324,754 nm	Li 460,289 nm	Ni 231,604 nm
B 249,773 nm	Co 228,616 nm	Pb 220,353 nm
Ba 230,424 nm		

Kvalitet analitičkog procesa kontrolisan je analizom referentnog materijala goveđe jetre (BCR-185R) i tkiva lišaja (IAEA-336 Lichen). Sve vrednosti izražene su u $\mu\text{g/g}$ suve mase tkiva (dw).

Na osnovu dobijenih podataka moguće je izračunati koncentracije elemenata u mišiću koje se izražavaju u $\mu\text{g/g}$ vlažne mase tkiva (ww), za koje su propisane maksimalne dozvoljene koncentracije (MDK) u ribljem mesu prema Nacionalnoj regulativi (Službeni glasnik, 29/2014) i prema regulativi Evropske komisije (1881/2006/EC). Regulativa Republike Srbije propisuje MDK vrednosti za As ($2 \mu\text{g/g ww}$), Pb ($0,3 \mu\text{g/g ww}$), Cd ($0,05 \mu\text{g/g ww}$) i Hg ($0,5-1 \mu\text{g/g ww}$). Regulativa Evropske komisije propisuje vrednosti za Pb, Cd i Hg koje se poklapaju sa vrednostima propisanim nacionalnom regulativom. Dodatno, Nacionalna regulativa propisuje MDK vrednosti za Zn, Fe i Cu u ribljim proizvodima u limenoj ambalaži, i one iznose 100, 30 i $30 \mu\text{g/g ww}$, respektivno.

3.3.1 Indeks zagađenja metalima (MPI- *Metal pollution index*)

Indeks zagađenja metalima (MPI) predstavlja matematički model koji omogućava da se svi podaci o koncentracijama praćenih elemenata u nekom tkivu predstave kao jedna vrednost. Na ovaj način moguće je međusobno porediti analizirana tkiva i odrediti opterećenost tkiva u smislu zagađenja metalima i metaloidima. Da bi se ovo postiglo mora se izvesti normalizacija svih dobijenih vrednosti za praćene elemente, kako bi se omogućilo sumiranje i svođenje koncentracija različitih elemenata u jednu vrednost.

Indeks zagađenja metalima (MPI) izračunat je na osnovu formule (Usero et al., 1997):

$$\text{MPI} = (C_1 \times C_2 \times \dots \times C_n)^{1/n}$$

Gde je C_n koncentracija elemenata u određenom tkivu, a n je ukupan broj elemenata koji se koriste prilikom računanja MPI.

3.4 Komet test- elektroforeza pojedinačnih ćelija

3.4.1 Uzorkovanje tkiva i pripremanje suspenzije ćelija

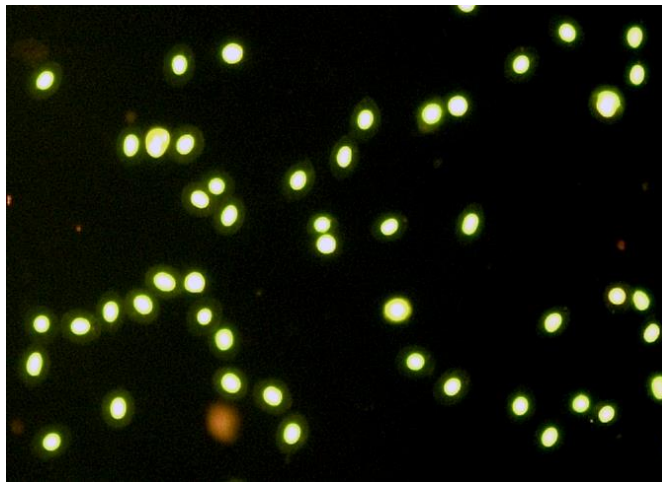
Nakon disekcije, uzorci jetre i škrge odmah se smestaju u epruvete sa hladnim 1xPBS. Krv se uzima direktno iz srca heparinizovanim iglama i špricovima, i oko 50 μ L krvi smešta se u ependorfice sa hladnim 1xPBS. Uzorci se transportuju do laboratorije, u tamnoj i hladnoj kutiji i procesuiraju u roku od 1 h.

Uzorci jetre i škrge prolaze mehaničku i enzimsku obradu kako bi se dobila suspenzija ćelija (pojedinačne ćelije). Tkiva se smestaju u 0,2 mL Hank's Balanced Saline Solution (HBSS) i uz pomoć dva skalpela seckaju do homogenizacije. Ovako pripremljena suspenzija ćelija prebacuje se u epruvete sa 2,8 mL hladnog HBSS. U cilju enzimske obrade suspenziji se dodaje 30 μ L tripsina (finalna koncentracija 0,05 %) i vrši se inkubacija na sobnoj temperaturi, 10 min. uz konstantno mućkanje u šejkeru. Da bi se zaustavilo dalje dejstvo tripsina, nakon inkubacije, epruvete se dopune do 10 mL hladnim HBSS. Supernatant u kome su ćelije pažljivo se prebacuje u nove epruvete (oko 9 mL) koje se stavljaju na centrifugiranje 10 min., 4 °C, 2000 rpm. Nakon centrifugiranja ostavlja se oko 1 mL supernatanta za resuspendovanje taloga u kome se nalaze ćelije. Ukoliko je potrebno, suspenzija ćelija može se dodatno razblažiti u HBSS, kako bi se dobilo približno 50 000 ćelija/mL.

3.4.2 Određivanje vijabilnosti ćelija diferencijalnim AO/EB bojenjem

Pre početka komet testa vrši se provera vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škrge, diferencijalnim bojenjem akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB). Vijabilnost ćelija proverava se kako bi se isključila mogućnost da je povećano prisustvo DNK prekida rezultat citotoksičnosti (Lee & Steinert, 2003). Na mikroskopsku pločicu nanosi se 20 μ L suspenzije ćelija i 2 μ L AO/EB boje i pokriva se pokrovnim staklom. Ćelije se posmatraju na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Nemačka) sa ekscitacionim filterom od 510 - 560 nm i emisionim filterom od 590 nm, pod 400 \times uveličanjem. Pri ovoj proceduri proverava se integritet ćelijske membrane. Ukoliko je membrana ćelije neoštećena u ćeliju

će moći da difunduje samo boja AO, za koju je membrana propustljiva i koja će bojiti jedro zelenom fluorescencijom. Ukoliko je ćelijska membrana oštećena, u ćeliju će ući i EB, koji dolazi do jedra i prekriva signal AO, usled čega jedra emituju narandžasto-crvenu fluorescenciju (Squier & Cohen, 2001). Ćelije sa zelenim jedrima smatraju se živim, dok se ćelije čija su jedra narandžasta i crvena smatraju mrtvim (Slika 3.13). Broji se 100 nasumično odabranih ćelija i izračunava se procenat vijabilnih ćelija. Da bi rezultati komet testa bili validni vijabilnost treba da je iznad 70 %.



Slika 3.13. Određivanje vijabilnosti ćelija diferencijalnim AO/EB bojenjem

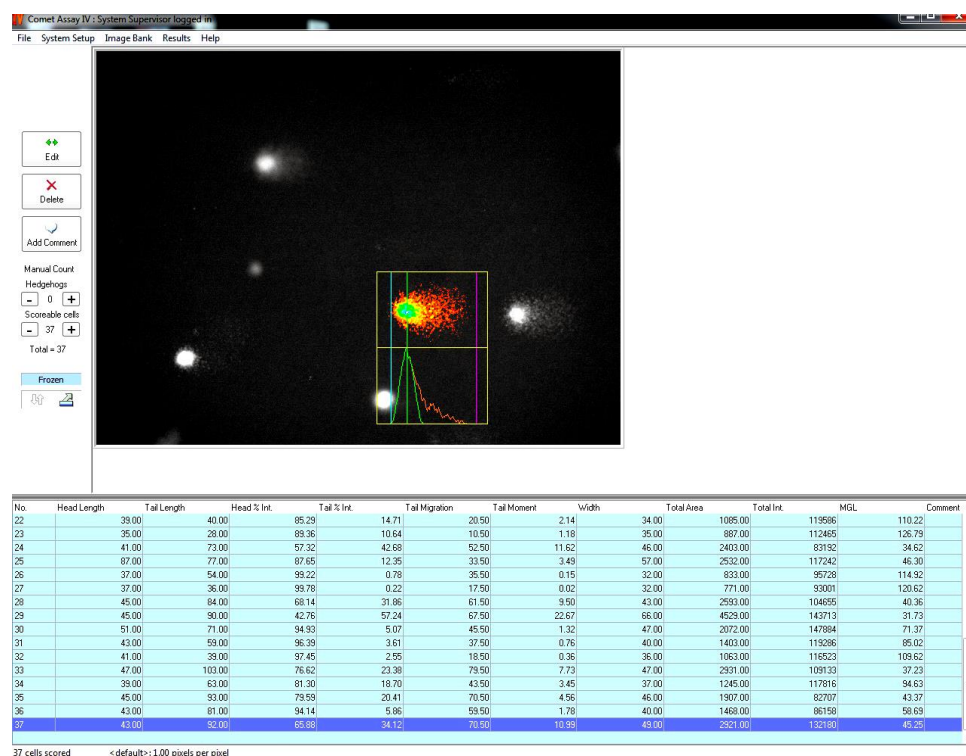
3.4.3 Alkalni komet test

Kako bi pored dvolančanih prekida, detektovali i jednolančane prekide i alkalno-labilna mesta na DNK molekulu, komet test je rađen u alkalnim uslovima. S obzirom da prirodna svetlost može dodatno da ošteti DNK molekul, čitava procedura komet testa izvodi se u mraku ili pod žutim svetlom (Singh et al., 1988). U prvom koraku, mikroskopske pločice temeljno se operu i osuše na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Sledećeg dana vrši se oblaganje pločica slojem 1 % agaroze normalne tačke topljenja (1 % NMP, eng. *Normal Melting Point*) tako što se čitave pločice potapaju u agarozu i ostavljaju da se suše naredna 24 h. Na dan eksperimenta, na levu i desnu stranu pločica nanosi se po 80 µL 1 % NMP agaroze i stavlja se pokrovna stakla kako bi se agarozu ravnomerno

rasporedila. Pločice se smeštaju na 4 °C, 5-10 min., da bi gel očvrstnuo. Nakon toga pokrovna stakla se pažljivo uklanjaju, a na gelove sa leve i desne strane, nanosi se po 70 µL ćelija prethodno pomešanih sa agarozom niske tačke topljenja (1 % LMP, eng. *Low Melting Point*) u odnosu 30 µL ćelija i 70 µL 1 % LMP i ponovo se stavljaju pokrovna stakla. Pločice se još jednom smeštaju na 4 °C, 5-10 min. Nakon uklanjanja pokrovnih stakala, pločice na kojima se sada nalaze ćelije „zarobljene“ u agarozu smeštaju se u kadice i prelivaju sveže napravljenim i dobro ohlađenim rastvorom za lizu koji omogućava uklanjanje svih ćelijskih membrana (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, pH = 10). Pločice na kojima se nalaze ćelije krvi prekrivaju se rastvorom za lizu sa dodatkom 10 % dimetil-sulfoksida (DMSO). Kako DMSO ima sposobnost vezivanja gvožđa, na ovaj način sprečava se dodatni nastanak DNK oštećenja od strane radikala formiranih pod dejstvom gvožđa oslobođenog iz eritrocita tokom lize (Tice et al., 1991). Pločice u rastvoru za lizu ostaju preko noći (16-18 h). Narednog dana, pločice se vade iz rastvora za lizu, smeštaju na papirne ubruse, prebacuju u kadicu za elektroforezu i prekrivaju sveže pripremljenim, hladnim rastvorom visokog pH, u kome će se vršiti denaturacija i elektroforeza (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Kadica se zatvara poklopcem i povezuje sa uređajem za snabdevanje električnom energijom (eng. *power supplier*). U ovom rastvoru pločice stoje 20 min., kako bi se izvršila denaturacija DNK, a potom se u isti rastvor preko uređaja za napajanje uvodi struja i sledi elektroforeza 20 min. (0,75 V/cm, 300 mA). Nakon denaturacije i elektroforeze pločice se premeštaju na papirne ubruse, a potom u čiste kadice i prelivaju ohlađenim rastvorom za neutralizaciju, 15 min. (0,4 M Tris, pH 7,5). Nakon neutralizacije sledi fiksiranje u ledeno hladnom metanolu 15 min., a potom sušenje na 4 °C, 24 h, u mraku. Fiksirane pločice se do analize čuvaju u klasteru, a neposredno pred analizu može se vršiti rehidratacija u hladnoj dH₂O, 15 min.

Za vizuelizaciju kometa, gelovi se pokrivaju sa 20 µL boje AO (2 µg/mL) i pokrovnim staklom. Pločice se posmatraju pod fluorescentnim mikroskopom na uvećanju 400× (Leica, DMLS, Nemačka; ekscitacioni filter 510 – 560 nm, emisioni filter 590 nm). Za kvantifikaciju DNK oštećenja korišćen je kompjuterski softver Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK) (Slika 3.14). Za svaku jedinku pripremljena je jedna pločica, sa dve replike gela (na levoj i desnoj strani). Na svakom gelu analizirano je po 25

kometa, tj. 50 kometa po pločici/jedinki, odnosno 250 kometa za svako tkivo u okviru jednog meseca uzorkovanja. Kada je broj jedinki u toku meseca bio manji od 5, analizirane su dodatne komete, kako bi se dobilo 250 kometa po tkivu. Prema našem saznanju, ovo je prvi put da je komet test primenjen za detekciju DNK oštećenja kod navedenih vrsta riba, pa je nivo DNK oštećenja izražen preko tri najčešće korišćena parametra u komet testu: intenzitet repa komete- eng. *Tail intensity* (TI %), momenat repa komete- Olive tail moment (OTM) i dužina repa komete- eng. *Tail lenght* (TLpix) kako bi ispitali primenljivost svakog od parametara za predstavljanje DNK oštećenja.



Slika 3.14. Kvantifikacija DNK oštećenja u kompjuterskom programu Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK)

3.5 Histopatološke analize jetre i škrge

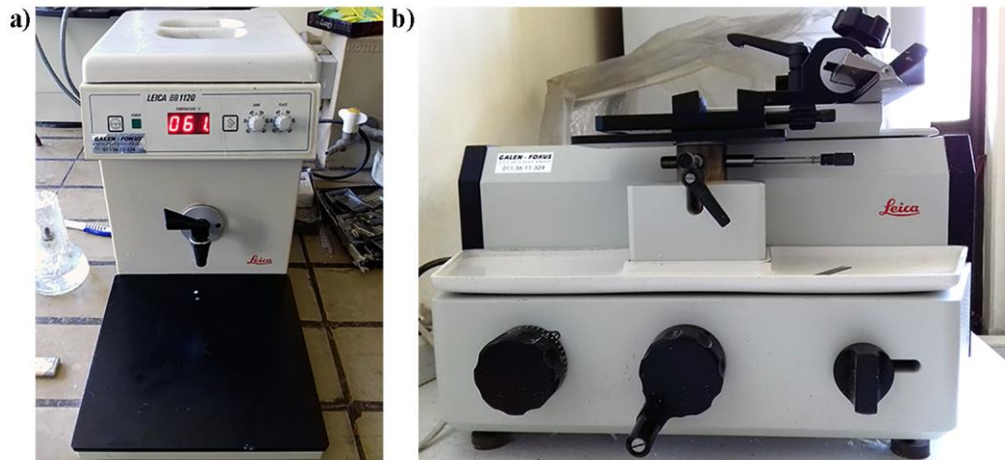
3.5.1 Uzorkovanje tkiva i pripremanje histoloških preparata

Na lokalitetu Duboko za histopatološke analize uzorkovane su jetra i škrge deverike, krupatice i crnooke deverike izlovljenih u februaru, martu, junu, julu, avgustu i oktobru (ukupno 26 jedinki). Na lokalitetu Višnjica za histopatološke analize uzorkovane su jetra i škrge deverika izlovljenih u februaru, aprilu, avgustu i novembru (ukupno 20 jedinki). Nakon disekcije uzorci jetre i škrge smešteni su u 4 % formalin radi fiksiranja tkiva. Fiksiranje ima za cilj da očuva strukturu tkiva i spreči denaturaciju proteina, kao i autolizu ćelija pod dejstvom enzima. Nakon fiksiranja uzorci su smešteni u automatski procesor (Leica TP 1020, Leica, Nemačka) (Slika 3.15), u kome se vrši dehidracija tkiva sprovođenjem kroz seriju rastućih koncentracija etanola (70 % - 2 x 30 minuta, 85 % - 30 minuta, 95 % - 30 minuta, 100 % - 2 x 30 minuta). Nakon dehidracije automatski procesor smešta tkiva u ksilol (2 x 30 minuta). Na ovaj način vrši se zamena etanola u tkivu ksilolom radi kalupljenja tkiva u parafinu, jer se ksilol jednako lako meša i sa apsolutnim etanolom i sa parafinom.



Slika 3.15. Automatski procesor tkiva (Leica TP 1020, Nemačka)

Ovako pripremljena tkiva kalupe se u parafinu prethodno otopljenom na 60 °C (Slika 3.16 a). Kalupi se montiraju na plastične držače i prave se preseći tkiva na mikrotomu SM 2000R (Leica, Nemačka) (Slika 3.16 b). Preseći debljine 5 µm pažljivo se prebacuju u vodeno kupatilo (voda zagrejana na 40 °C), radi ispravljanja (opuštanja) i nakon kraćeg vremena smeštaju se na mikroskopske pločice. Pre bojenja, preparati stoje u termostatu kako bi se izvršila deparafinizacija i kako bi na mikroskopskoj pločici ostao samo presek tkiva.



Slika 3.16. (a) Aparat za kalupljenje tkiva u parafinu; (b) mikrotom

U automatizovanom centru za bojenje preparata ST 4040 (Leica, Nemačka) (Slika 3.17) prvo se vrši rehidracija tkiva koja podrazumeva sve korake dehidracije samo obrnutim redosledom (ksilol, opadajući gradijent koncentracija etanola, dH₂O). Ovako spremni preparati boje se hematoksilin eozin (HE) bojenjem, po metodi Stevens & Wilson (1996).



Slika 3.17. Automatizovani centar za bojenje preparata ST 4040 (Leica, Nemačka)

Mikrografije uzoraka pravljeni su pomoću Leica DMLS mikroskopa sa Leica DFC 310 FX kamerom (Leica, Nemačka). Celokupno procesuiranje tkiva i obrada histoloških uzoraka urađena je u Laboratoriji za histologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.5.2 Semikvantitativna analiza histopatoloških promena

Tip i obim histopatoloških promena uočenih na presecima jetre i škrge ocenjeni su semikvantitativnom analizom opisanom od strane Bernet et al. (1999). Značajnost svake lezije zavisi od njene histološke važnosti tj. kako utiče na funkciju organa i sposobnost ribe da preživi. Svaka lezija se ocenjuje *faktorom značajnosti* (*w*) (eng. *importance factor*) čija vrednost može biti:

- 1** - minimalna patološka značajnost, lezija je lako reverzibilna čim se izlaganje štetnom agensu prekine;
- 2** - umerena patološka značajnost, lezija je reverzibilna u većini slučajeva kada se štetni agens neutrališe;
- 3** - velika patološka značajnost, lezija je ireverzibilna i vodi do delimičnog ili potpunog gubitka funkcije organa.

Za svaki ispitani organ određene patološke promene mogu se klasifikovati u pet različitih kategorija (eng. *reaction pattern*): cirkulatorne promene, regresivne promene,

progresivne promene, inflamatorne promene i neoplazije (u zagradi su prikazani faktori značajnosti svake promene).

Cirkulatorne promene nastaju usled patoloških stanja toka krvi i protoka tkivnih tečnosti. Cirkulatorne promene su:

Hemoragije - isticanje krvi iz krvnih sudova (1);

Hiperemija - zaustavljanje krvi u organu izazvano promenama u venskom i/ili arterijskom sistemu (1);

Aneurizma - proširenje arterijskih krvnih sudova (1);

InterCelularni edem - pojava tkivne tečnosti koja je filtracijom preko kapilara došla u tkivo (1).

Regresivne promene obuhvataju procese čiji krajnji ishod može biti redukcija funkcije ili prestanak rada organa. Regresivne promene su:

Strukturne promene - promene strukture tkiva, oblika i rasporeda ćelija (1);

Promene u citoplazmi - hijalinske kapljice (granularne promene), koloidne kapljice (koloidne promene), degenerativna masna vakuolizacija ili hidropske glikogenske kapljice, krečnjačke promene, zadebljanje finih vlakana vezivnog tkiva (hijalinske promene) (1);

Depoziti - međućelijske akumulacije supstanci primarno izazvane degenerativnim procesima (1);

Jedarne promene - promene oblika jedra i strukture hromatina (2);

Atrofija ćelija - redukcija broja i zapremine ćelija i/ili smanjenje količine međućelijskih supstanci (2);

Nekroza - morfološko stanje ćelija ili tkiva koje nastaje usled nepovratnog gubitka funkcije ćelije (3).

Progresivne promene obuhvataju procese koji vode ka povećanoj aktivnosti ćelija ili tkiva. Progresivne promene su:

Hipertrofija - povećanje volumena ćelija ili tkiva bez povećanja broja ćelija (1);

Hiperplazija - uvećanje tkiva ili organa usled povećanog broja ćelija bez promena volumena ćelija (2).

Inflamatorne promene su:

Pojava eksudata - tečnosti koja sadrži visoku koncentraciju proteina i veliku količinu ćelijskih ostataka izlučenih iz krvnih i limfnih sudova (1);

Aktivacija retikuloendotelnog sistema (RES) - hipertrofija RES koji se sastoji od endotelnih ćelija i makrofaga koje okružuju male krvne sudove (1);

Infiltracija - prodor i ulazak leukocita iz krvnih sudova u okolno tkivo (2).

Neoplazije obuhvataju nekontrolisanu proliferaciju ćelija i tkiva. Tumori se mogu podeliti u dve klase:

Benigni tumori - diferencirane ćelije koje zamenjuju originalno tkivo (tumorske ćelije liče na ćelije originalnog tkiva) (2);

Maligni tumori - slabo definisane ćelije koje se brzo dele, napadaju i uništavaju normalno tkivo, gde se nekada mogu uočiti i metastaze (3).

Pored faktora značajnosti, zavisno od stepena i obima promene za svaku alteraciju određuje se i *intenzitet lezije (a)* (eng. *score value*) koji se kreće od **0** (neizmenjena morfologija), preko **2** (blago prisutna promena) i **4** (umereno prisutna promena) do **6** (ozbiljno prisutna promena- difuzne lezije).

Množenjem faktora značajnosti (*w*) i intenziteta lezije (*a*) dobija se histopatološki skor za svaku kategoriju promena:

$$I_{org\ rp} = \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

za histopatološki indeks organa:

$$I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

za ukupan histopatološki indeks oba ispitivana organa (škrge, jetra):

$$I_T = \sum_{org} \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times w_{org\ rp\ alt})$$

Frekvencija (učestalost) lezija (FL) računa se tako što se broj riba u kojima je detektovana određena lezija deli sa ukupnim brojem analiziranih riba prema formuli:

$$FL (\%) = N_{lezija} \times N_{ukupno}^{-1} \times 100$$

3.6 Statističke analize

Statističke analize urađene su u programima Statistica 7.0. (StatSoft, Inc., 2001) i SPSS 21.0 (SAD). Normalnost podataka za komet test ispitana je Kolmogorov-Smirnov testom, dok je normalnost distribucije podataka za histopatološke analize i metale ispitana Shapiro-Wilk testom. Podaci za komet test nisu pokazali normalnu raspodelu, pa je za testiranje značajnih razlika odabran neparametrijski Kruskal-Wallis H test, a parovi grupa poređeni su Mann-Whitney U testom, pri čemu je vrednost p korigovana u odnosu na ukupan broj poređenja ($p = 0,05/\text{ukupan br. poređenja}$).

Kako su neki podaci dobijeni iz histopatoloških analiza tkiva i podaci o koncentracijama elemenata u tkivima odstupali od normalne raspodele, za testiranje značajnih razlika odabran je neparametrijski test Kruskal-Wallis sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom koja daje korigovanu vrednost p.

Korelacione analize vršene su u zavisnosti od distribucije podataka Pearson ili Spearman testom. Za sve testove nivo značajnosti iznosio je $p < 0,05$. Pearson korelacija je primenjena pri analizi korelacija među parametrima komet testa, kao i između nivoa DNK oštećenja u krvi, jetri i škragama. Spearman korelacija je primenjena za utvrđivanje korelacija između praćenih biomarkera: koncentracija metala i metaloida, nivoa DNK oštećenja i histopatoloških promena u okviru škruga i jetre.

Koncentracije metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću predstavljene su kao srednja vrednost \pm SD; vijabilnost ćelija krvi, jetre i škruga predstavljena je kao srednja vrednost \pm SD; DNK oštećenje u ćelijama krvi, škruga i jetre predstavljeno je kao srednja vrednost \pm SE; pojedinačne histopatološke promene u jetri i škragama predstavljene su kao srednja vrednost \pm SD; grupe histopatoloških promena škruga i jetre, histopatološki indeks škruga i jetre i ukupni histopatološki indeks prikazani su kao srednja vrednost \pm SE.

4 | REZULTATI

4 REZULTATI

4.1 Reka Sava - lokalitet Duboko

4.1.1 Analize fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na lokalitetu

Duboko

Rezultati merenja fizičko-hemijskih parametara kvaliteta vode (pH, temperatura, koncentracija kiseonika, saturacija kiseonikom, elektroprovodljivost, NO_2 , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) na lokalitetu Duboko tokom januara, februara, marta, početka juna, kraja juna, jula, avgusta i oktobra 2014. godine, preuzeti su iz doktorske disertacije Kračun-Kolarević (2017) i dati u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara izmerene na lokalitetu Duboko

	pH	T °C	Elektroprovodljivost μS/cm	O ₂		NO ₂	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻
				mg/L	%				
Januar	8,5	8,9	373	11,2	/	0,074	5,86	1,743	0,37
Februar	8,5	8,7	338	11,5	99,0	0,051	5,05	1,322	0,27
Mart	8,8	11,8	376	12,0	120,0	0,059	1,59	1,877	0,24
Početak juna	7,8	19,7	365	8,5	90,3	0,080	1,10	1,245	0,20
Kraj juna	8,6	21,6	/	9,6	108,6	0,060	1,46	0,534	0,22
Jul	8,7	22,0	372	/	/	0,047	1,26	0,598	0,19
Avgust	8,3	23,2	439	5,8	67,7	0,050	0,60	0,570	14,70
Oktobar	7,7	16,9	405	7,1	73,0	0,040	2,60	0,110	1,20

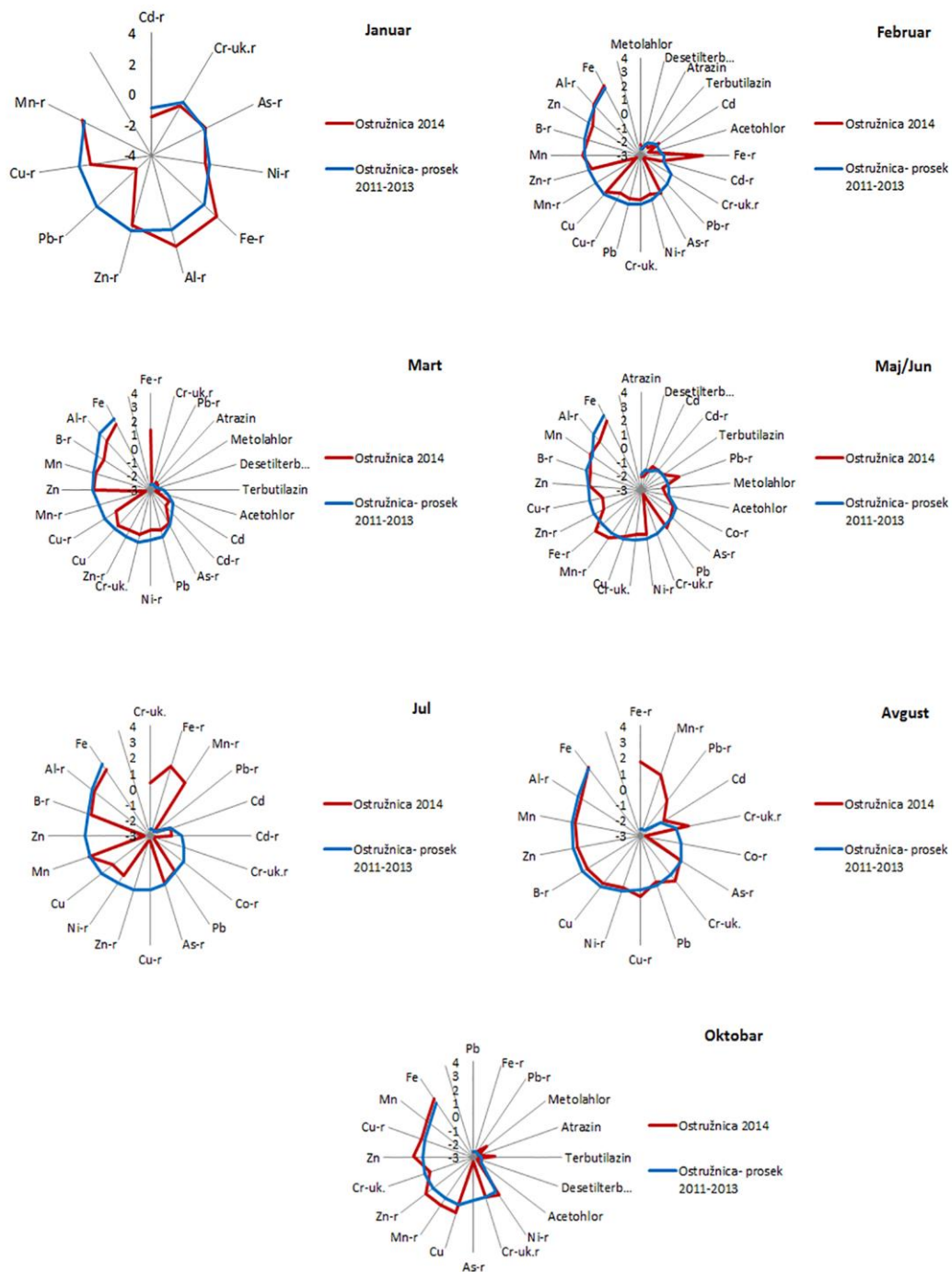
* /- nije izmereno

Tokom čitavog perioda uzorkovanja pH je bila blago alkalna sa vrednostima višim od 8,5 tokom marta, krajem juna i jula što je ukazivalo na IV-V klasu kvaliteta. Koncentracija rastvorenog kiseonika bila je najniža u avgustu, kada je zabeležena i najviša temperatura vode, a tada je voda pripadala III kategoriji. U oktobru je voda prema koncentraciji rastvorenog kiseonika pripadala II kategoriji. Tokom ostalih meseci koncentracija kiseonika u vodi bila je iznad 8,5 mg/L što je upućivalo na I klasu kvaliteta vode. Najviša koncentracija NO_2 zabeležena je početkom juna, a najniža u oktobru. Najviše

koncentracije NO_3^- zabeležene su tokom januara i februara kada se voda mogla svrstati u III klasu kvaliteta. Najniža koncentracija NO_3^- zabeležena je u avgustu i voda je tada pripadala I klasi, a tokom svih ostalih meseci II klasi kvaliteta. Prema koncentracijama NH_4^+ voda je tokom januara, februara, marta i početka juna pripadala V klasi, a krajem juna, u julu i avgustu III klasi. U oktobru je zabeležena najniža koncentracija NH_4^+ i tada je voda mogla da se svrsta u II klasu kvaliteta. Najviša koncentracija PO_4^{3-} zabeležena je u avgustu i oktobru kada je voda pripadala V klasi, a tokom ostalih meseci voda se mogla svrstati u IV klasu kvaliteta.

Podaci o specifičnim zagađujućim supstancama za odgovarajući mesec, čije su koncentracije varirale tokom različitih meseci, dobijeni su od Agencije za zaštitu životne sredine RS, sa merne stanice Ostružnica (10 km nizvodno od lokaliteta) i prikazani su u tabeli 8.1 (Prilog).

Kako je 2014. godina bila specifična po meteorološkim i hidrološkim parametrima, usled čega su nastupile poplave tokom maja, koncentracije specifičnih zagađujućih materija u vodi tokom 2014. godine poređene su sa prosečnim koncentracijama ovih materija za poslednje tri godine na mernoj stanici Ostružnica. Na ovaj način mogli bi da sagledamo uticaj poplava na koncentracije zagađujućih materija u vodi u poređenju sa prosečnim vrednostima, jer se pritisci na lokalitetu nisu značajno menjali od 2011. do 2014. godine. Podaci su transformisani logaritmovanjem i predstavljeni preko radarskih grafikona (Slika 4.1), primenjenih u studiji Jovanović et al. (2017). Tokom januara su primećene povećane vrednosti rastvorenog Fe i Al. Tokom februara i marta je primećen skok rastvorenog Fe. Za maj i jun je izračunata srednja vrednost, kako je uzorkovanje vode i tkiva ribe u našoj studiji izostalo tokom maja, a vršeno je početkom i krajem juna. U tom periodu primećen je skok rastvorenog Pb i Fe u vodi. U julu je primećen skok ukupnog Cr, rastvorenog Fe i Mn. U avgustu je primećen skok ukupnog i rastvorenog Cr i rastvorenog Fe, Mn i Pb. U oktobru su primećene povećane koncentracije metolahlora i terbutilazina, Cu, rastvorenog Mn, i ukupnog i rastvorenog Zn.



Slika 4.1. Poređenje koncentracija metala, metaloida i specifičnih zagađujućih materija na mernoj stanici Ostružnica tokom 2014. godine sa trogodišnjim prosekom (2011-2013)

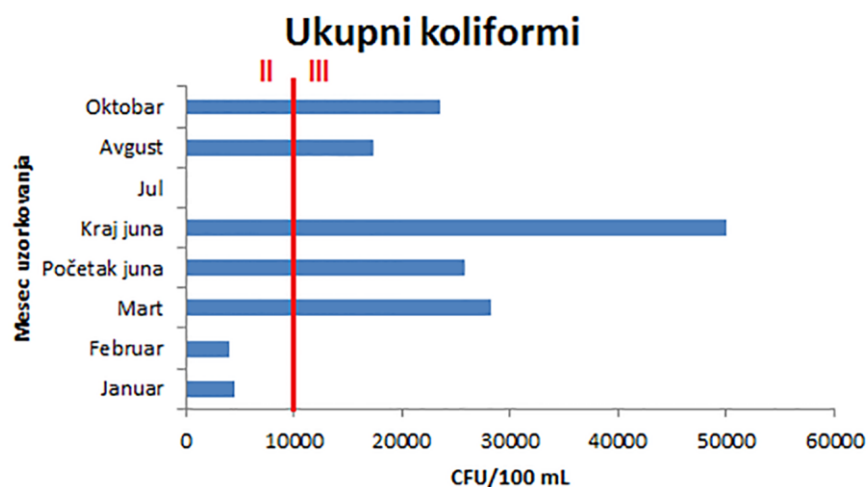
Podaci o dnevnom variranju vodostaja tokom 2014. godine na reci Savi dobijeni su od Republičkog hidrometeorološkog zavoda (RHMZ) sa merne stanice Beograd, koja se nalazi na oko 22 km nizvodno od lokaliteta Duboko, tj. na manje od 1 km od ušća sa Dunavom i prikazani su na slici 8.1 (Prilog).

4.1.2 Analize mikrobioloških indikatora na lokalitetu Duboko

4.1.2.1 Ispitivanje sanitarnog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Duboko

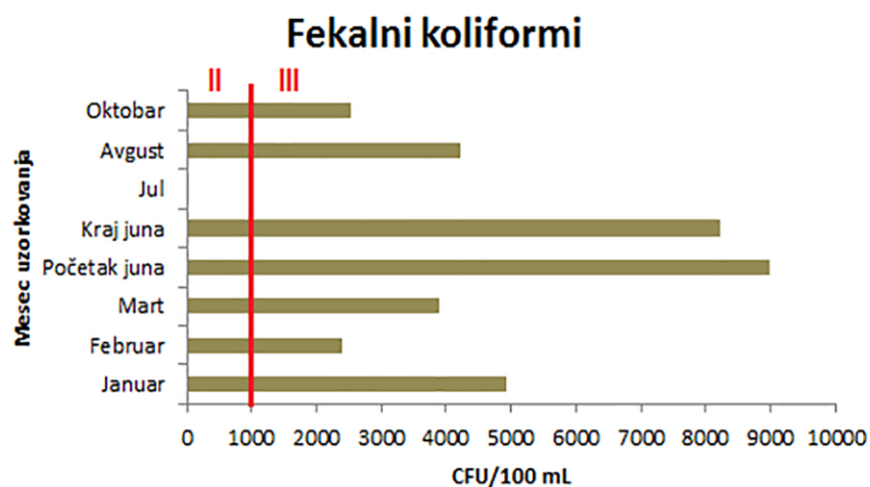
Koncentracije mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja na lokalitetu Duboko praćene su tokom januara, februara, marta, početka juna, kraja juna, jula, avgusta i oktobra 2014. godine i dobijene su primenom metode membranske filtracije i inkubacije na odgovarajućim podlogama.

Najviša koncentracija ukupnih koliforma zabeležena je krajem juna, a najniža u februaru. Prema koncentraciji ukupnih koliforma voda je tokom svih meseci, izuzev januara i februara, pripadala III klasi kvaliteta (kritično fekalno zagađenje) (Slika 4.2).



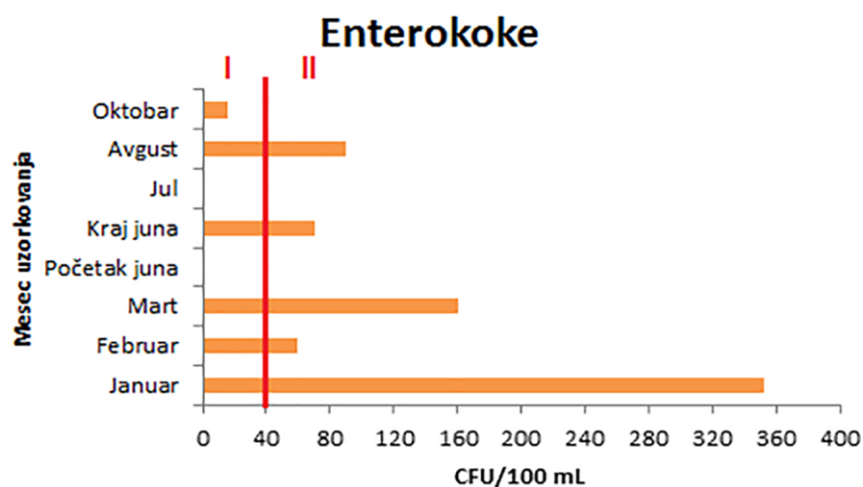
Slika 4.2. Koncentracije ukupnih koliforma na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine izražene kao CFU/100 mL sa naznačenom granicom između II i III klase

Najviša koncentracija fekalnih koliforma zabeležena je početkom juna, a najniža u februaru. Koncentracije fekalnih koliforma, koji se smatraju preciznijim indikatorima fekalnog zagađenja, tokom svih meseci uzorkovanja ukazivale su na III klasu kvaliteta (kritično fekalno zagađenje) (Slika 4.3).



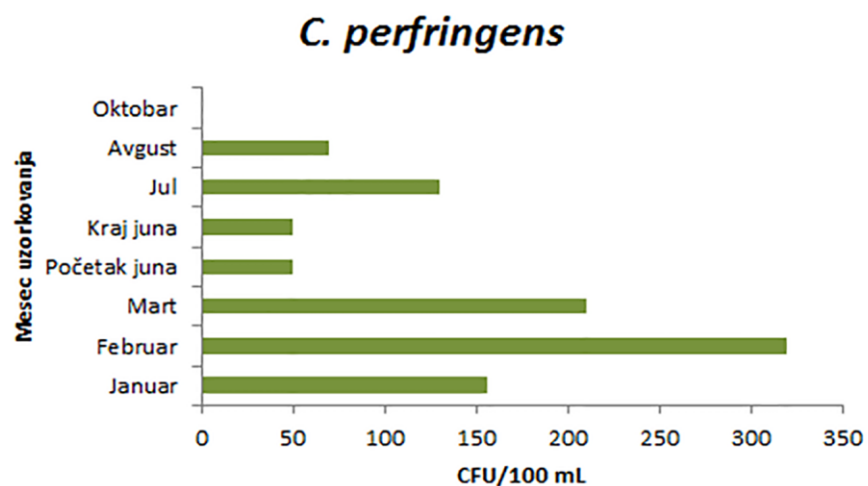
Slika 4.3. Koncentracije fekalnih koliforma na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine izražene kao CFU/100 mL sa naznačenom granicom između II i III klase

Najviša koncentracija enterokoka zabeležena je tokom januara, a najniža u oktobru. Na osnovu koncentracija enterokoka voda je tokom svih meseci pripadala II klasi kvaliteta (umereno fekalno zagađenje), izuzev oktobra kada je pripadala I klasi (nisko fekalno zagađenje) (Slika 4.4).



Slika 4.4. Koncentracije enterokoka na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine izražene kao CFU/100 mL sa naznačenom granicom između I i II klase

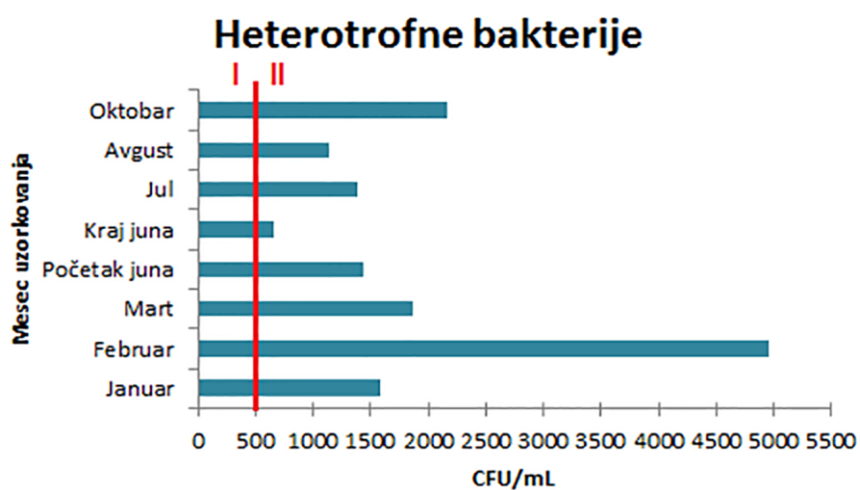
Praćenje koncentracija spora *C. perfringens* u vodi koristi se kao dopunski podatak u praćenju prisustva fekalnog zagađenja. Prisustvo ove bakterije ukazuje na postojano fekalno zagađenje u vodenim ekosistemima. Najviše koncentracije zabeležene su tokom februara, a najniže početkom juna (Slika 4.5).



Slika 4.5. Koncentracije *C. perfringens* na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine izražene kao CFU/100 mL

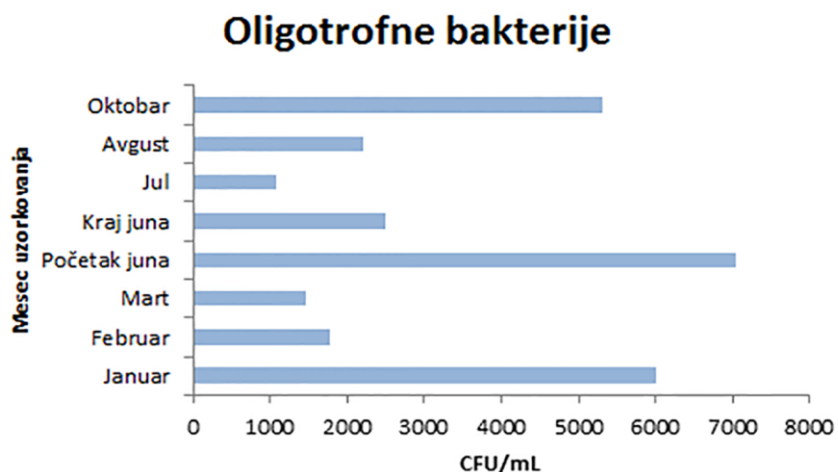
4.1.2.2 Ispitivanje ekološkog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Duboko

U cilju ispitivanja organskog opterećenja vode praćene su koncentracije heterotrofnih i oligotrofnih bakterija, kao i indeks fosfatizne aktivnosti. Najviše koncentracije heterotrofnih bakterija zabeležene su tokom februara, a najniže krajem juna. Prema koncentracijama heterotrofnih bakterija voda je tokom svih meseci bila u II klasi kvaliteta (Slika 4.6).



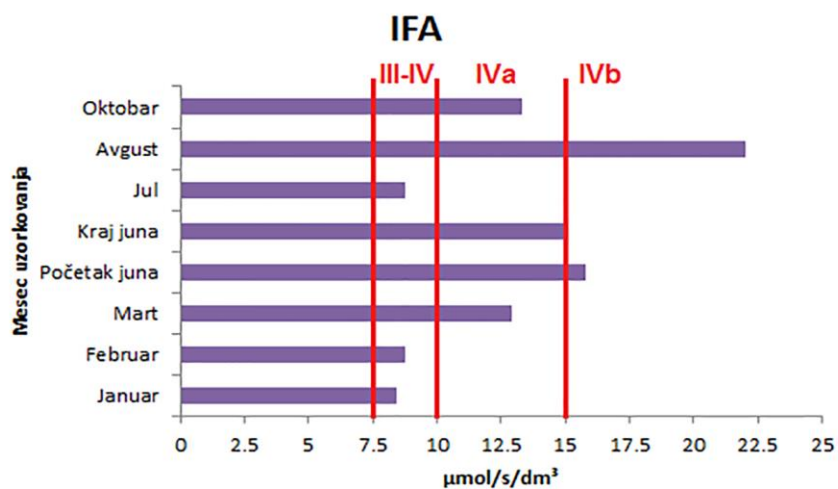
Slika 4.6. Koncentracije heterotrofnih bakterija na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine izražene kao CFU/mL sa naznačenom granicom između I i II klase

Variranje koncentracija oligotrofnih bakterija tokom 2014. godine, prikazano je na slici 4.7. Najviše koncentracije oligotrofnih bakterija zabeležene su početkom juna, a najniže u julu.



Slika 4.7. Koncentracije oligotrofnih bakterija na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine izražene kao CFU/mL

Prema indeksu fosfatazne aktivnosti najviše organsko opterećenje vode zabeleženo je u avgustu, a najniže u januaru. Tokom januara, februara i jula vrednosti IFA bile su preko 7,5 što ukazuje na klasu kvaliteta između III i IV klase (prljava voda), tokom marta i oktobra IFA je bio viši od 10 i voda je tada pripadala IVa klasi (veoma prljava voda), a početkom juna, krajem juna i u avgustu IFA je imao vrednosti veće od 15 pa je voda pripadala klasi IVb (maksimalno prljava) (Slika 4.8).



Slika 4.8. Vrednosti indeksa fosfatazne aktivnosti na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine sa granicama između III-IV, IVa i IVb klase

4.1.3 Uzorkovanje jedinki deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko

Na lokalitetu Duboko na Savi istraživanje je vršeno na deverici, krupatici i crnookojoj deverici tokom januara, februara, marta, početkom juna, krajem juna, jula, avgusta i oktobra 2014. godine. Starost uzorkovanih jedinki kretala se od 2+ do 4+. Detaljan pregled podataka o dužini, težini i faktoru kondicije (KF) jedinki dat je u tabeli 4.2. Najviše vrednosti faktora kondicije zabeležene su krajem juna i u februaru, a najniže u martu i julu.

Tabela 4.2. Pregled uzorkovanih jedinki deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko sa vrednostima faktora kondicije - KF izraženim kao sr. vrednost \pm SD

Mesec uzorkovanja			1	2	3	4	5	KF
Januar	SL	cm	17	17,2	16,5	17,5	17	<i>1,00\pm0,21</i>
	TL		21,5	21,5	21	20,5	21	
	W	g	133	83	98	83	76	
Februar	SL	cm	17,5	17,3	17	15,5	16	<i>1,21\pm0,07</i>
	TL		22	21,5	21	19,9	19,5	
	W	g	139	124	107	89	91	
Mart	SL	cm	16,5	15	15	16	15,5	<i>0,94\pm0,18</i>
	TL		20,5	18	18,5	20	19	
	W	g	69	72	63	65	60	
Početak juna	SL	cm	17	20	15,8	15	15	<i>1,00\pm0,22</i>
	TL		21	24	20	18	18	
	W	g	90	97	76	63	76	
Kraj juna	SL	cm	13	15	12			<i>1,22\pm0,17</i>
	TL		16	18	15			
	W	g	57	61	41			
Jul	SL	cm	17,5	12,5	15,5	14,5		<i>0,94\pm0,07</i>
	TL		22,5	16	19,5	18,5		
	W	g	97	41	73	58		
Avgust	SL	cm	18	17,5	14,5	11,5	12,3	<i>1,00\pm0,10</i>
	TL		22,5	22,2	18	14,5	15	
	W	g	103	98	61	31	38	

	SL	cm	10	15,5	18	
Oktobar	TL	cm	13	19	23	1,07±0,06
	W	g	22	76	133	

* SL-standardna dužina ribe, TL-ukupna dužina ribe, W-težina ribe

4.1.4 Koncentracije metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko

Koncentracije metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko ispitane su tokom februara, početka juna, jula, avgusta i oktobra i prikazane u tabeli 4.3 kao srednja vrednost \pm SD. Tokom februara i početkom juna analizirano je po 5 jedinki, a tokom jula i avgusta po 3 jedinke. U tabeli 4.3 date su i značajne razlike među koncentracijama u određenom tkivu tokom različitih meseci (mala slova) i značajne razlike među koncentracijama u različitim tkivima u okviru istog meseca (velika slova), pri čemu različita slova označavaju statistički značajne razlike. Podaci dobijeni u oktobru nisu statistički testirani jer su dobijeni analizom tkiva u samo dve jedinke. Koncentracije elemenata u tkivima ribe izražene su u $\mu\text{g/g}$ suve težine.

Tokom čitavog perioda uzorkovanja bor (B) je detektovan samo u gonadama jedne jedinke početkom juna. Kadmijum (Cd) je detektovan samo u jetri i to u jednoj jedinki tokom februara, u dve jedinke početkom juna i u svim jedinkama tokom avgusta (0,17±0,17). Kobalt (Co) je detektovan u jetri u jednoj jedinki u februaru i jednoj jedinki početkom juna i gonadama u dve jedinke u februaru i u svim jedinkama početkom juna (0,20±0,23), u julu (0,29±0,21) i avgustu (0,22±0,15) i u jednoj jedinki tokom oktobra. Litijum (Li) je detektovan samo u jetri u jednoj jedinki početkom juna. Nikl (Ni) je detektovan u jetri u jednoj jedinki početkom juna i jednoj jedinki u avgustu. U škragama, Ni je detektovan u jednoj jedinki početkom juna i u svim jedinkama u avgustu (6,40±5,97). U gonadama, Ni je detektovan u jednoj jedinki u avgustu, a u mišiću u po jednoj jedinki početkom juna, u julu i u avgustu. Ovi elementi nisu uzeti u obzir prilikom izvođenja statističkih analiza kako su se neredovno detektovali tokom uzorkovanja.

Tabela 4.3. Koncentracije metala i metaloida u jetri, škr gama, gonadama i mišiću deverike, krupatice i crnooke deverike tokom različitih meseci na lokalitetu Duboko

	Mesec uzorkovanja i br. jedinki	JETRA	ŠKRGE	GONADE	MIŠIĆ
Al	Februar 5	9,09±10,61 ^{a A}	11,52±7,06 ^{a A}	13,26±12,92 ^{a A}	14,26±14,94 ^{a A}
	Početak juna 5	42,32±77,31 ^{a A}	233,95±171,87 ^{b B}	20,47±8,86 ^{a AB}	19,62±18,88 ^{a AB}
	Jul 3	66,74±97,42 ^{a A}	81,07±83,07 ^{ab A}	9,06±0,38 ^{a A}	7,16±6,42 ^{a A}
	Avgust 3	6,84±6,12 ^{a A}	14,26±11,00 ^{ab A}	20,55±20,26 ^{a A}	7,24±2,07 ^{a A}
	Oktober 2	20,56±27,44	94,06±9,00	11,75*	0,42±0,50
As	Februar 5	2,32±2,43 ^{a A}	0,52*	0,66±0,54 ^{a A}	0,35±0,32 ^A
	Početak juna 5	1,21±1,73 ^{a A}	1,54*	1,48±1,09 ^{a A}	0,42*
	Jul 3	0,92±0,49 ^{a A}	ND	1,20±0,43 ^{a A}	0,04*
	Avgust 3	1,66*	0,03*	3,00±2,57 ^a	ND
	Oktober 2	2,26±2,92	0,27±0,23	2,62*	ND
Ba	Februar 5	0,28±0,22**	21,05±7,91 ^{a A}	0,09±0,08 ^{a B}	2,01±0,71 ^{a AB}
	Početak juna 5	2,56*	37,26±9,81 ^{a A}	0,30±0,08**	1,39±0,49 ^{a B}
	Jul 3	0,38±0,28 ^{AB}	38,85±2,20 ^{a A}	0,25±0,06 ^{a B}	1,41±0,15 ^{a AB}
	Avgust 3	0,19*	42,56±8,15 ^{a A}	1,52±2,29 ^{a A}	2,05±0,53 ^{a A}
	Oktober 2	ND	41,90±4,44	0,24*	1,69±0,57
Cr	Februar 5	0,22±0,11 ^{a AB}	0,64±0,24 ^{a A}	0,18±0,07 ^{a AB}	0,20±0,16 ^{a B}
	Početak juna 5	0,23±0,18 ^{a AB}	1,44±0,34 ^{b A}	0,10±0,09 ^{a B}	1,72±3,34 ^{a AB}
	Jul 3	0,17±0,03 ^{a AB}	1,02±0,23 ^{ab A}	0,12±0,02 ^{a B}	0,37±0,34 ^{a AB}
	Avgust 3	0,28±0,17 ^{a A}	0,91±0,01 ^{ab A}	0,23±0,18 ^{a A}	0,21±0,02 ^{a A}
	Oktober 2	0,33±0,05	1,59±0,32	ND	0,20±0,00
Cu	Februar 5	19,18±15,83 ^{a AC}	0,31±0,44 ^{a B}	11,87±7,60 ^{a C}	1,05±0,67 ^{a ABC}
	Početak juna 5	17,63±3,39 ^{a A}	15,12±32,78 ^{a AB}	0,29±0,24 ^{a B}	0,83±0,31 ^{a AB}
	Jul 3	19,59±4,29 ^{a A}	1,14±0,61 ^{a AB}	0,27±0,29 ^{a B}	0,67±0,24 ^{a AB}
	Avgust 3	19,17±3,74 ^{a A}	1,29±0,53 ^{a AB}	0,28±0,18 ^{a B}	0,42±0,18 ^{a AB}
	Oktober 2	22,09±10,00	3,79±5,12	0,74*	0,99±0,05
Fe	Februar 5	225,89±198,85 ^{a A}	148,42±54,63 ^{a A}	39,76±19,66 ^{a AB}	13,64±4,20 ^{a B}
	Početak juna 5	223,23±151,48 ^{a A}	331,41±215,19 ^{a A}	23,12±10,43 ^{a AB}	16,57±12,95 ^{a B}
	Jul 3	166,79±15,18 ^{a A}	261,55±258,28 ^{a A}	26,72±20,90 ^{a A}	14,71±11,10 ^{a A}
	Avgust 3	295,26±99,83 ^{a A}	147,45±21,28 ^{a AB}	44,98±40,87 ^{a AB}	14,77±11,55 ^{a B}
	Oktober 2	153,63±5,43	613,66±167,78	38,51*	11,26±0,30

Mn	Februar	5	4,90±1,11 ^{a AB}	13,63±6,30 ^{a A}	12,03±6,91 ^{a AB}	0,80±0,21 ^{a B}
	Početak juna	5	6,34±2,04 ^{a AB}	81,22±35,18 ^{a A}	0,59±0,39 ^{a B}	2,70±1,15 ^{ab B}
	Jul	3	6,15±1,24 ^{a AB}	90,34±15,86 ^{a A}	1,12±1,00 ^{a B}	3,70±0,50 ^{ab AB}
	Avgust	3	7,13±1,41 ^{a AB}	94,19±14,31 ^{a A}	1,09±0,95 ^{a B}	4,89±0,53 ^{b AB}
	Oktoabar	2	8,28±0,34	99,92±5,64	0,50*	3,10±0,42
Mo	Februar	5	0,28±0,15 ^A	1,65±1,49 ^{a A}	0,25±0,24 ^{a A}	0,21±0,19 ^{a A}
	Početak juna	5	0,56±0,57**	2,91±0,80 ^{a A}	0,11±0,08 ^{a B}	0,33±0,13 ^{a AB}
	Jul	3	0,003*	2,67±0,55 ^{a A}	0,26*	0,33±0,19 ^{a B}
	Avgust	3	0,60*	2,47±0,35 ^{a A}	0,45±0,36 ^{a A}	0,47±0,17 ^{a A}
	Oktoabar	2	0,27±0,11	3,25±0,17	0,24*	0,40±0,04
Pb	Februar	5	0,53±0,25 ^{a A}	ND	0,12±0,13 ^{a B}	0,11*
	Početak juna	5	0,30±0,21 ^{a A}	1,07*	0,13±0,07 ^{a A}	0,06±0,05 ^{a A}
	Jul	3	0,11*	ND	0,12±0,06 ^{a A}	0,09±0,02 ^{a A}
	Avgust	3	0,45±0,25 ^{a A}	0,28*	0,10±0,09 ^{a B}	0,01*
	Oktoabar	2	0,24±0,01	0,45±0,32	0,28*	0,09±0,04
Sr	Februar	5	0,38±0,14 ^{a A}	63,17±31,57 ^{a B}	1,07±1,47 ^{a A}	1,52±0,50 ^{a AB}
	Početak juna	5	0,30±0,11 ^{a A}	86,05±38,57 ^{a B}	0,15±0,05 ^{b A}	2,19±1,06 ^{ab AB}
	Jul	3	0,54±0,24 ^{a AB}	73,35±7,13 ^{a A}	0,11±0,10 ^{b B}	2,25±0,17 ^{ab AB}
	Avgust	3	0,43±0,11 ^{a AB}	77,47±3,57 ^{a A}	0,26±0,10 ^{ab B}	3,83±0,85 ^{b AB}
	Oktoabar	2	0,30±0,04	74,33±2,38	0,18*	2,31±0,71
Zn	Februar	5	55,20±24,52 ^{a A}	48,12±21,33 ^{a A}	160,60±85,33 ^{a A}	31,09±6,92 ^{a A}
	Početak juna	5	42,83±8,50 ^{a AB}	59,38±7,98 ^{a A}	32,17±31,10 ^{a AB}	20,20±4,91 ^{a B}
	Jul	3	56,40±19,23 ^{a A}	66,09±3,01 ^{a A}	15,20±11,82 ^{a A}	22,55±8,50 ^{a A}
	Avgust	3	59,75±12,20 ^{a A}	71,99±5,43 ^{a A}	67,66±23,51 ^{a A}	21,78±4,88 ^{a A}
	Oktoabar	2	76,73±4,58	57,26±3,01	7,95*	21,36±0,84

* Podaci su predstavljeni kao sr. vrednost±SD i izraženi u µg/g suve težine. ^{a,b} Vrednosti označene različitim slovom su značajno različite tokom različitih meseci u jednom tkivu. ^{A,B,C} Vrednosti označene različitim slovom su značajno različite između različitih tkiva u okviru istog meseca (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, $p < 0,05$); ND- vrednosti ispod granice detekcije; * vrednost izmerena u jednoj jedinki; ** vrednost izmerena u dve jedinice (sr. vrednost±SD).

U škragama je primećena najviša koncentracija Al početkom juna i u julu, a najniža u februaru. Koncentracija Al u škragama početkom juna bila je značajno viša u odnosu na

koncentraciju detektovanu u februaru. Početkom juna je primećena značajno viša koncentracija Al u škragama u odnosu na jetru.

As je bio dominantan u jetri i gonadama, a najmanje prisutan u mišiću. Značajne razlike u koncentracijama tokom različitih meseci, kao i između različitih tkiva nisu uočene.

U škragama su primećene najviše koncentracije Ba tokom svih meseci uzorkovanja, dok je u jetri bio najmanje zastupljen. Koncentracija Ba u škragama bila je značajno viša u odnosu na gonade tokom februara i jula, a u odnosu na mišić početkom juna. U škragama je primećeno postepeno povećanje koncentracija Ba od februara ka avgustu, ipak u okviru pojedinačnih tkiva nisu primećene značajne razlike u koncentracijama između različitih meseci.

Cr je bio dominantno prisutan u škragama, a najmanje u gonadama. Koncentracija Cr je bila značajno viša u škragama u odnosu na mišić tokom februara i u odnosu na gonade početkom juna i u julu. U škragama je primećena značajno viša koncentracija Cr početkom juna u odnosu na februar kada su zabeležene najniže koncentracije. U ostalim tkivima nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Cr tokom različitih meseci.

Koncentracija Cu bila je značajno viša u jetri u odnosu na škrge tokom februara i u odnosu na gonade početkom juna, u julu i avgustu. Cu je bio najmanje prisutan u gonadama. Značajne razlike u koncentracijama Cu tokom različitih meseci nisu primećene ni za jedno tkivo.

Najviše koncentracije Fe primećene su u jetri i škragama. Koncentracije Fe u škragama i jetri bile su značajno više u odnosu na mišić tokom februara i početkom juna, dok je koncentracija Fe u jetri bila značajno viša u odnosu na mišić tokom avgusta. U okviru pojedinačnih tkiva nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Fe tokom različitih meseci.

Najviše koncentracije Mn zabeležene su u škragama i bile su značajno više u odnosu na mišić tokom februara, u odnosu na gonade i mišić početkom juna, i u odnosu na gonade tokom jula i avgusta. U mišiću je koncentracija Mn tokom avgusta bila značajno viša u odnosu na februar, dok u ostalim tkivima nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Mn između različitih meseci.

Najviše koncentracije Mo zabeležene su u škragama i bile su značajno više u odnosu na gonade početkom juna i u odnosu na mišić tokom jula. Generalno, u jetri su zabeležene najniže koncentracije Mo. U okviru pojedinačnih tkiva nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Mo tokom različitih meseci.

Koncentracije Pb u jetri bile su značajno više u odnosu na koncentracije u gonadama tokom februara i avgusta. U škragama su zabeležene najniže koncentracije Pb. U okviru pojedinačnih tkiva nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Pb tokom različitih meseci.

Najviše koncentracije Sr zabeležene su u škragama, a najniže u gonadama. Koncentracije Sr u škragama bile su značajno više u odnosu na koncentracije u jetri tokom februara i početkom juna, a tokom svih meseci u odnosu na koncentracije u gonadama. U gonadama je koncentracija Sr u februaru bila značajno viša u odnosu na koncentracije detektovane početkom juna i u julu. U mišiću je koncentracija Sr tokom avgusta bila značajno viša u odnosu na koncentraciju detektovanu u februaru. U jetri i škragama nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Sr tokom različitih meseci.

Koncentracija Zn u škragama tokom februara bila je značajno viša od koncentracija detektovanih u mišiću. U okviru pojedinačnih tkiva nisu detektovane značajne razlike u koncentracijama Zn tokom različitih meseci.

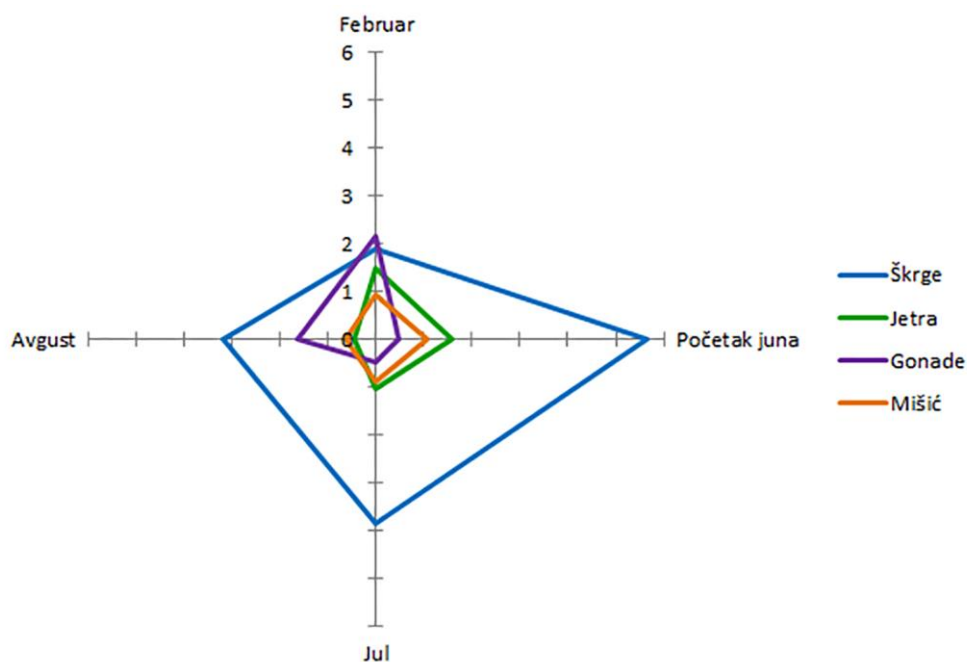
Kako su vrednosti MDK za As, Pb, Cd, Cu, Fe i Zn prema Nacionalnoj regulativi i regulativi EU izražene u $\mu\text{g/g}$ vlažne mase tkiva (ww), za ove elemente, izuzev Cd koji nije bio detektovan, preračunate su koncentracije po jedinici vlažne mase za mišić. U tabeli 4.4 date su koncentracije navedenih elemenata u $\mu\text{g/g}$ ww i propisane MDK vrednosti radi lakšeg poređenja. Tokom čitavog perioda uzorkovanja nijedan od elemenata nije bio prisutan u koncentracijama višim od MDK.

Tabela 4.4. Koncentracije Pb, As, Cu, Fe i Zn u mišiću riba na lokalitetu Duboko i propisane MDK vrednosti

Mesec uzorkovanja	Pb	As	Cu	Fe	Zn
Februar	ND	ND	0,28±0,18	3,51±0,98	8,08±1,93
Početak juna	0,01±0,01	ND	0,21±0,08	4,06±3,06	5,05±1,52
Jul	0,02±0,01	ND	0,14±0,05	2,98±2,12	4,62±1,54
Avgust	ND	ND	0,09±0,04	3,35±2,68	4,89±0,93
Oktobar	0,02±0,01	0,09±0,09	0,20±0,02	2,33±0,02	4,41±0,01
MDK	0,3	2	30	30	100

* ND- ispod praga detekcije. Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost±SD i izražene u µg/g vlažne mase

Indeks zagađenja metalima (*Metal pollution index- MPI*) je izračunat u cilju normalizacije podataka i poređenja ukupnog sadržaja metala u različitim tkivima tokom različitih meseci na lokalitetu Duboko. Podaci iz oktobra nisu uzeti u obzir, kako su dobijeni analizom samo dve jedinke. Škrge su imale najviše vrednosti MPI tokom svih meseci (početak juna, jul i avgust), izuzev februara kada su gonade imale najviši MPI (2,1). Gonade su imale najniži MPI početkom juna i u julu (0,5). Jetra i mišić su imali najviši MPI početkom juna, a najniži u avgustu. Generalno, u škragama su zabeležene najviše koncentracije elemenata tokom svih meseci, a u mišiću najniže (Slika 4.9).



Slika 4.9. Indeks zagađenja metalima (*Metal pollution index- MPI*) škrge, jetre, gonada i mišića deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko tokom četiri meseca (februar i početak juna- analizirano po 5 jedinki, jul i avgust- analizirano po 3 jedinke)

4.1.5 Detekcija oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi, jetre i škrge deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko

4.1.5.1 Određivanje vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škrge

Pre izvođenja komet testa neophodno je utvrditi procenat vijabilnih ćelija u uzorku tkiva, kako bi se isključio eventualni doprinos apoptoze/nekroze ćelija ukupnom DNK oštećenju. Kako tkiva jetre i škrge podležu mehaničkoj i enzimskoj obradi u cilju dobijanja suspenzije pojedinačnih ćelija, ova procedura bi potencijalno mogla da dovede do pada vijabilnosti ćelija. Preživljavanje ćelija određeno je diferencijalnim akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB) bojenjem. Pregled vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škrge deverike, krupatice i crnooke deverike tokom različitih meseci 2014. godine na lokalitetu Duboko dat je u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Vijabilnost ćelija krvi, jetre i škrge deverike, krupatice i crnooke deverike uzorkovanih na lokalitetu Duboko

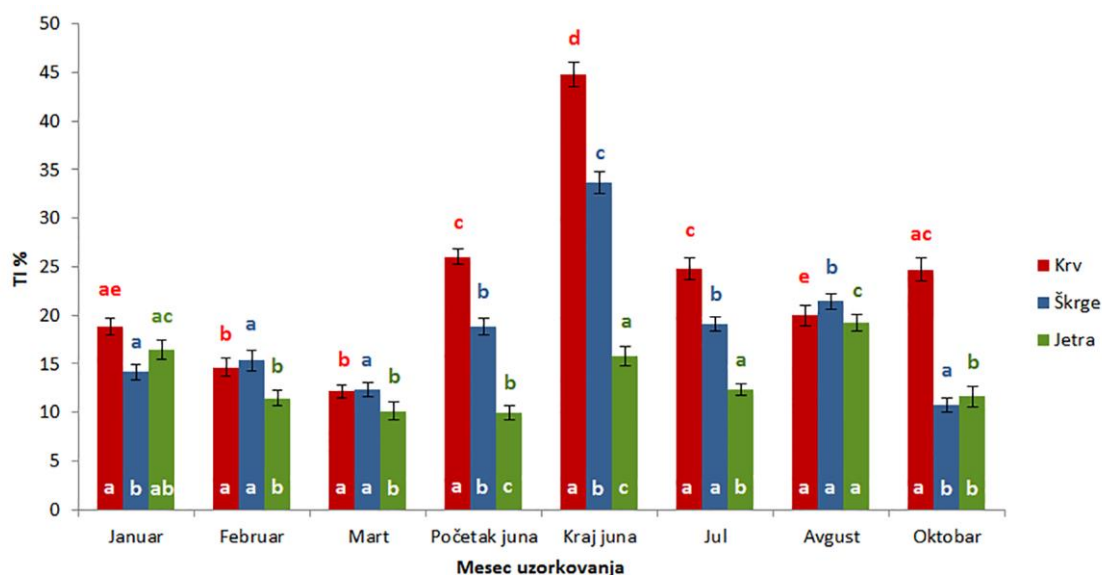
Mesec uzorkovanja	Krv	Jetra	Škrge
Januar	99,4±0,9	78,8±21,5	98,8±1,3
Februar	87,0±9,3	75,2±5,1	81,0±7,7
Mart	100,0±0,0	97,4±2,6	95,0±4,5
Početak juna	>70	>70	>70
Kraj juna	94,3±9,8	87,7±10,5	78,7±2,5
Jul	97,2±3,1	77,0±2,2	82,0±2,9
Avgust	96,8±3,3	86,4±3,0	85,8±3,1
Oktoibar	88,7±2,1	78,0±2,0	80,0±7,2

* vrednosti su prikazane kao sr. vrednost±SD i izražene u %

Tokom svih sezona ćelije krvi pokazale su višu vijabilnost u odnosu na ćelije jetre i škrge. Ćelije škrge pokazale su viši stepen vijabilnosti u odnosu na ćelije jetre, izuzev u martu, krajem juna i u avgustu.

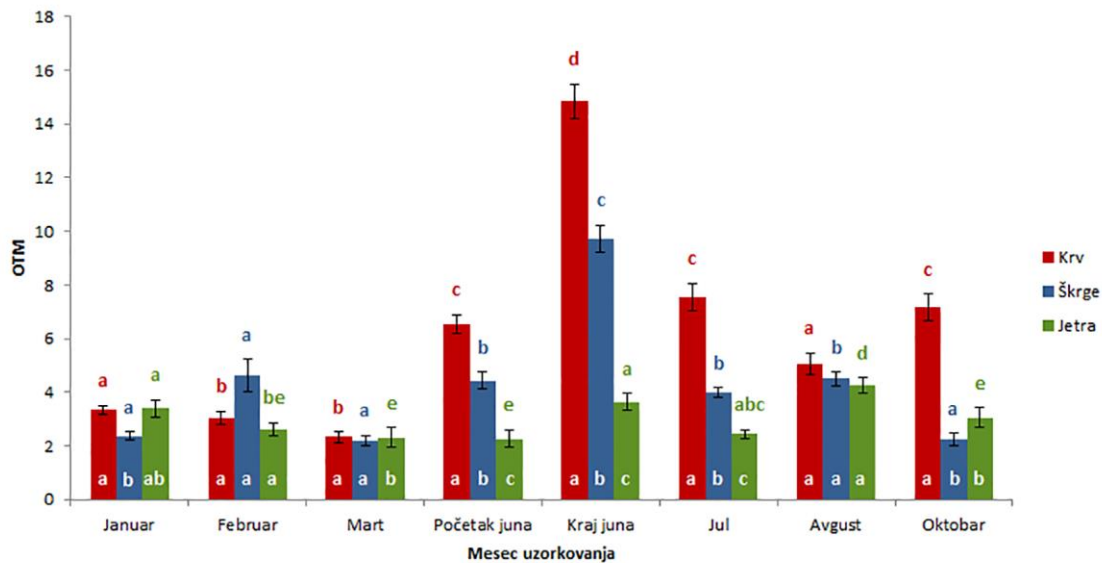
4.1.5.2 DNK oštećenje u ćelijama krvi, jetre i škrge

Prema TI (%) parametru, krv i škrge su imale najviše oštećenje DNK krajem juna, a jetra u avgustu. Krv je imala najniže oštećenje u martu, škrge u oktobru, a jetra početkom juna (slova u boji za svako tkivo; različita slova označavaju statistički značajne razlike) (Slika 4.10). U januaru krv je imala značajno viši nivo DNK oštećenja u odnosu na škrge, koje su bile najmanje oštećeno tkivo. U februaru i martu jetra je imala značajno niže DNK oštećenje u odnosu na škrge i krv. Početkom i krajem juna primećene su značajne razlike u DNK oštećenju tri tkiva, pri čemu je krv imala najviše oštećenje, a jetra najniže. U julu se ovaj trend nastavlja pri čemu se nivo DNK oštećenja u škrgrama nije značajno razlikovao u odnosu na krv. U avgustu nije primećena značajna razlika u DNK oštećenju tri tkiva. U oktobru krv je imala značajno viši nivo DNK oštećenja u odnosu na škrge i jetru (bela slova na dnu stubića; različita slova označavaju statistički značajne razlike) (Slika 4.10).



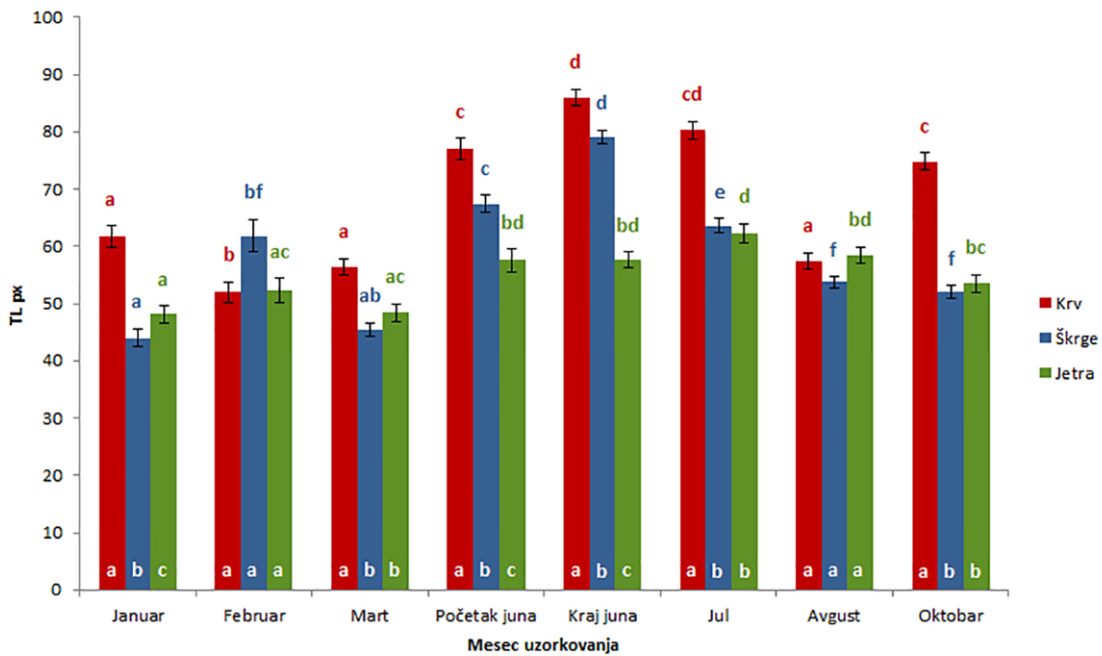
Slika 4.10. Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi, škrge i jetre izražen preko TI (%) parametra sa statistički značajnim razlikama u DNK oštećenju tri tkiva u okviru svakog meseca (bela slova na dnu stubića) kao i mesečnim razlikama u okviru svakog tkiva (iznad stubića slova u boji za svako tkivo). a, b, c, d, e - različita slova označavaju statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost \pm SE

Prema OTM parametru, takođe su krv i škrge imale najviši nivo DNK oštećenja krajem juna, a jetra u avgustu. Najniže vrednosti OTM takođe su primećene u martu za krv i početkom juna za jetru, dok je kod škrge prema OTM parametru najniže DNK oštećenje zabeleženo u martu (slova u boji za svako tkivo; različita slova označavaju statistički značajne razlike) (Slika 4.11). U okviru pojedinačnih meseci parametri TI (%) i OTM su pokazali iste rezultate, sa izuzetkom februara i jula. Prema OTM parametru u februaru nije primećena značajna razlika u DNK oštećenju tri tkiva, dok se u julu DNK oštećenje tri tkiva značajno razlikovalo, pri čemu je krv imala najviši, a jetra najniži nivo DNK oštećenja (bela slova na dnu stubića; različita slova označavaju statistički značajne razlike) (Slika 4.11).



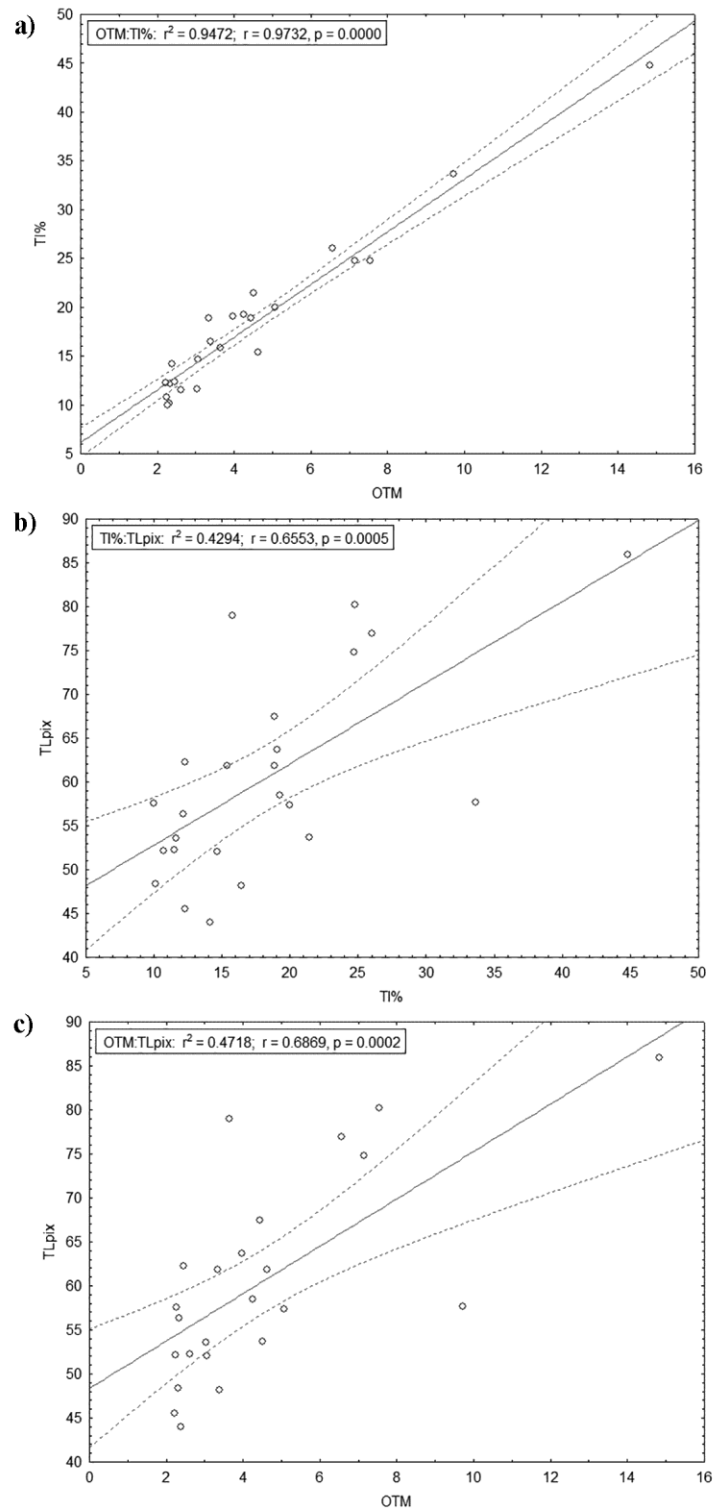
Slika 4.11. Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi, škrge i jetre izražen preko OTM parametra sa statistički značajnim razlikama u DNK oštećenju tri tkiva u okviru svakog meseca (bela slova na dnu stubića) kao i mesečnim razlikama u okviru svakog tkiva (iznad stubića slova u boji za svako tkivo). a, b, c, d, e - različita slova označavaju statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost \pm SE

Prema TL (pix) parametru takođe su krv i škrge imale najviši nivo DNK oštećenja krajem juna, dok je jetra imala najviši nivo DNK oštećenja u julu, ali ne značajno viši u odnosu na avgust. U pogledu najnižeg DNK oštećenja, parametar TL (pix) odstupa od parametara TI (%) i OTM, pa je tako najniže DNK oštećenje za krv zabeleženo u februaru, za škrge u januaru, a za jetru u martu (slova u boji za svako tkivo; različita slova označavaju statistički značajne razlike) (Slika 4.12). U pogledu DNK oštećenja tri tkiva u okviru pojedinačnih meseci TL (pix) parametar je dao iste rezultate kao i druga dva parametra za februar, početak juna, kraj juna, avgust i oktobar, dok se za januar, mart i jul značajnosti iskazane preko TL (pix) razlikuju u odnosu na parametre TI (%) i OTM. U januaru je prema TL (pix) parametru primećena značajna razlika u DNK oštećenju tri tkiva, pri čemu je krv imala najviše oštećenje, a škrge najniže. U martu i julu DNK oštećenje u krvi je bilo značajno više u odnosu na škrge i jetru (bela slova na dnu stubića; različita slova označavaju statistički značajne razlike) (Slika 4.12).



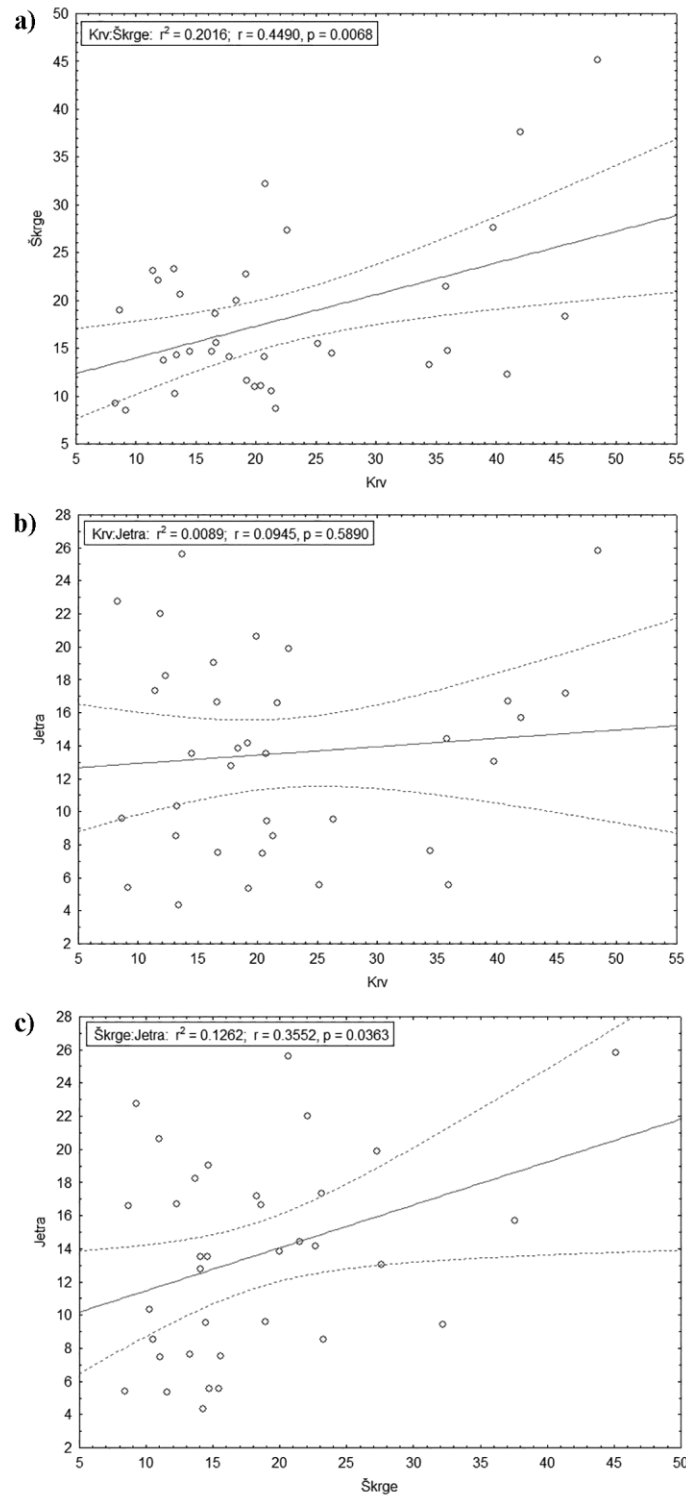
Slika 4.12. Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi, škrge i jetre izražen preko TL (pix) parametra sa statistički značajnim razlikama u DNK oštećenju tri tkiva u okviru svakog meseca (bela slova na dnu stubića) kao i mesečnim razlikama u okviru svakog tkiva (iznad stubića slova u boji za svako tkivo). a, b, c, d, e, f - različita slova označavaju statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost \pm SE

Korelacione analize (Pearson korelacija, $p < 0,05$) pokazale su visoku i statistički značajnu pozitivnu korelaciju između parametara TI (%) i OTM ($r = 0,97$, $p = 0,0000$) (Slika 4.13 a), između parametara TI (%) i TL (pix) ($r = 0,83$, $p = 0,0000005$) (Slika 4.13 b), kao i između parametara OTM i TL (pix) ($r = 0,85$, $p = 0,0000001$) (Slika 4.13 c) u prikazivanju nivoa DNK oštećenja.



Slika 4.13. Korelacija između parametara TI (%), OTM i TL (pix) pri prikazivanju DNK oštećenja; **(a)** korelacija između parametara TI (%) i OTM; **(b)** korelacija između parametara TL (pix) i TI (%); **(c)** korelacija između parametara TL (pix) i OTM (Pearson korelacija, $p < 0,05$)

Kako bi proverili podudarnost u odgovoru tri tkiva, urađene su korelacione analize (Pearson korelacija, $p < 0,05$) između DNK oštećenja krvi, jetre i škrge izraženog preko parametra TI (%) (Slika 4.14). Kako je pokazana visoka pozitivna i statistički značajna korelacija između tri dostupna parametra u komet testu, odabrali smo da korelacije među tkivima predstavimo korišćenjem samo parametra TI (%). Primećena je značajna pozitivna korelacija u nivou DNK oštećenja između krvi i škrge ($r = 0,45$, $p = 0,0068$) (Slika 4.14 a). Između DNK oštećenja krvi i jetre ($r = 0,09$, $p = 0,5900$) nije primećena korelacija (Slika 4.14 b), dok je između škrge i jetre primećena značajna pozitivna korelacija ($r = 0,35$, $p = 0,0400$) (4.14 c).



Slika 4.14. Korelacija između tkiva u nivou DNK oštećenja izraženog preko parametra TI (%); **(a)** korelacija između krvi i škrge; **(b)** korelacija između krvi i jetre; **(c)** korelacija između jetre i škrge (Pearson korelacija, $p < 0,05$)

4.1.6 Histopatološke promene na jetri i škragama deverike, krupatice i crnooke deverike na lokalitetu Duboko

Pojedinačne histopatološke promene uočene u jetri i škragama tokom uzorkovanja prikazane su u tabeli 4.6, sa naznačenim značajnim razlikama između različitih meseci. U tabeli 4.7 date su učestalosti javljanja promena u škragama i jetri tokom različitih meseci.

Kod riba na lokalitetu Duboko, škržni aparat nije bio intenzivno oštećen. Promena najvećeg intenziteta u škragama bila je hiperemija koja pripada grupi cirkulatornih, lako reverzibilnih promena, sa srednjim vrednostima višim od 2 (od maksimalnih 6). Procenat pojavljivanja hiperemije iznosio je 80 % tokom januara i februara i 100 % tokom ostalih meseci. Od regresivnih promena najvećeg intenziteta bili su izdizanje respiratornog epitela sa najvišom srednjom vrednošću 4 tokom avgusta, poremećena arhitektura sa najvišom srednjom vrednošću od 2,8 tokom marta i mukozne ćelije u sekundarnim lamelama koje su tokom avgusta dostigle vrednost od 2,5. Učestalost izdizanja respiratornog epitela bila je najviša tokom januara i avgusta (100 %), a najniža u julu (33,3 %). Poremećena arhitektura bila je najzastupljenija u februaru i martu (80 %), a najmanje zastupljena u januaru (40 %). Mukozne ćelije u sekundarnim lamelama imale su najvišu zastupljenost početkom juna (60 %), a najnižu krajem juna i u julu (33,3 %). Nekroza, koja se smatra regresivnom promenom najveće histopatološke važnosti, nije imala vrednosti veće od 1, a najviša frekvencija nekroze zabeležena je u julu (100 %). Od progresivnih promena, proliferacija mukoznih ćelija imala je srednju vrednost 2,4 u januaru i vrednosti ispod 2 tokom ostalih meseci. Proliferacija mukoznih ćelija je u januaru bila prisutna kod svih uzorkovanih jedinki, dok je tokom jula potpuno izostala.

Iako se ove promene smatraju blagim one mogu prouzrokovati smetnje u funkciji škrga. Značajne razlike tokom različitih meseci nisu uočene ni za jednu od promena u škržnom aparatu.

Tabela 4.6. Pojedinačne histopatološke promene (HP) u jetri i škragama riba sa lokaliteta Duboko tokom različitih meseci sa brojem analiziranih jedinki

	HP	(w)	MESEC UZORKOVANJA							
			Januar 5	Februar 5	Mart 5	Početak juna 5	Kraj juna 3	Jul 4	Avgust 5	Oktobar 2
	JETRA BROJ JEDINKI									
IP	Infiltracija leukocita	2	0,8 ± 1,1 ^a	2,8 ± 1,1 ^{ab}	1,2 ± 1,8 ^a	1,6 ± 0,9 ^{ab}	1,3 ± 1,2 ^{ab}	6,0 ± 0,0 ^b	4,4 ± 1,7 ^{ab}	4,0 ± 0,0 ^{nt}
CP	Staze u krvnim sudovima	1	0,8 ± 1,1 ^a	3,6 ± 0,9 ^{ab}	2,4 ± 1,7 ^{ab}	1,6 ± 2,6 ^{ab}	6,0 ± 0,0 ^b	4,0 ± 1,6 ^{ab}	4,4 ± 1,7 ^{ab}	1,0 ± 1,4 ^{nt}
	Kongestija sinusoida	1	2,0 ± 1,4 ^a	2,4 ± 2,6 ^a	3,2 ± 2,3 ^a	2,4 ± 2,6 ^a	5,3 ± 1,2 ^a	5,0 ± 2,0 ^a	4,8 ± 1,8 ^a	2,0 ± 2,8 ^{nt}
PP	Fibroza krvnih sudova	2	0,4 ± 0,9 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	1,2 ± 1,1 ^a	0,7 ± 1,2 ^a	2,0 ± 2,8 ^a	0,8 ± 1,1 ^a	3,0 ± 1,4 ^{nt}
RP	Fokalne promene hepatocita	2	1,2 ± 1,1 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	0,7 ± 1,2 ^a	1,0 ± 1,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 1,4 ^{nt}
	Vakuolizacija hepatocita	2	3,6 ± 2,6 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	2,0 ± 2,8 ^a	0,8 ± 1,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,5 ± 1,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 1,4 ^{nt}
	Nekroza	3	2,0 ± 1,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	0,8 ± 1,8 ^a	1,3 ± 1,2 ^a	1,5 ± 1,0 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	1,0 ± 1,4 ^{nt}
	ŠKRGE BROJ JEDINKI									
CP	Hiperemija	1	2,4 ± 1,7 ^a	3,2 ± 2,3 ^a	4,0 ± 2,0 ^a	3,2 ± 1,8 ^a	2,7 ± 1,2 ^a	5,3 ± 1,2 ^a	5,0 ± 2,0 ^a	/
	Edem primarnog epitela	1	0,4 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,2 ± 1,8 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	0,7 ± 1,2 ^a	0,7 ± 1,2 ^a	2,0 ± 1,6 ^a	/
PP	Hipertrofija epitelnih ćelija	1	0,4 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	1,2 ± 1,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,7 ± 1,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	/
	Hiperplazija epitelnih ćelija	2	0,7 ± 0,7 ^a	0,3 ± 0,5 ^a	0,7 ± 0,8 ^a	1,2 ± 1,0 ^a	0,5 ± 0,6 ^a	0,9 ± 0,6 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	/
	Proliferacija mukoznih ćelija	1	2,4 ± 0,9 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	1,2 ± 1,8 ^a	0,4 ± 0,9 ^a	1,3 ± 2,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,5 ± 1,0 ^a	/
RP	Nekroza	3	0,6 ± 1,2 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	1,0 ± 1,7 ^a	0,1 ± 0,3 ^a	0,4 ± 0,4 ^a	0,8 ± 0,5 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	/
	Izdizanje respiratornog epitela	1	2,4 ± 0,9 ^a	1,2 ± 1,1 ^a	2,0 ± 2,0 ^a	2,0 ± 1,4 ^a	1,3 ± 1,2 ^a	1,3 ± 2,3 ^a	4,0 ± 2,3 ^a	/
	Poremećena arhitektura	1	0,8 ± 1,1 ^a	1,6 ± 0,9 ^a	2,8 ± 1,8 ^a	2,0 ± 2,4 ^a	2,0 ± 2,0 ^a	1,3 ± 1,2 ^a	2,0 ± 1,6 ^a	/
	Mukozne ćelije u sekundarnim lamelama	1	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	1,2 ± 1,1 ^a	1,3 ± 2,3 ^a	2,0 ± 3,5 ^a	2,5 ± 3,0 ^a	/

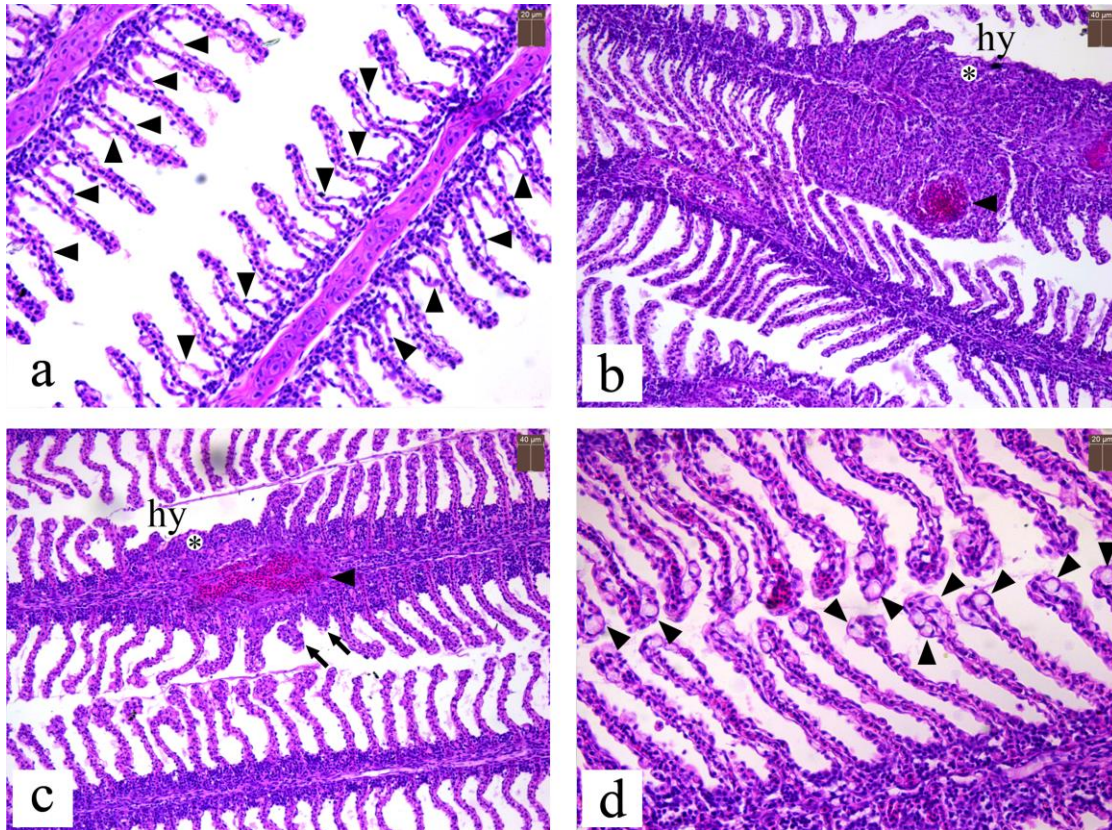
* IP- inflamatorne promene, CP- cirkulatorne promene, PP- progresivne promene, RP- regresivne promene; w- faktor značajnosti; vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost±SD. ^{a,b} - Vrednosti označene različitim slovima su značajno različite tokom različitih meseci (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, p < 0,05). nt- nije testirano, /- nema podataka

Tabela 4.7. Učestalost javljanja histopatoloških promena (HP) u jetri i škragama tokom različitih meseci (%)
na lokalitetu Duboko sa brojem analiziranih jedinki

	HP	(w)	MESEC UZORKOVANJA						
			JETRA BROJ JEDINKI	Januar 5	Februar 5	Mart 5	Početak juna 5	Kraj juna 3	Jul 4
IP	Infiltracija leukocita	2	40 %	100 %	40 %	80 %	66,7 %	100 %	100 %
CP	Staze u krvnim sudovima	1	40 %	100 %	80 %	40 %	100 %	100 %	100 %
	Kongestija sinusoida	1	80 %	60 %	80 %	60 %	100 %	100 %	100 %
PP	Fibroza krvnih sudova	2	20 %	20 %	20 %	60 %	33,3 %	50 %	40 %
RP	Fokalne promene hepatocita	2	60 %	20 %	20 %	20 %	33,3 %	50 %	NN
	Vakuolizacija hepatocita	2	80 %	NN	40 %	40 %	NN	25 %	NN
	Nekroza	3	80 %	NN	20 %	20 %	66,7 %	75 %	20 %
	ŠKRGE BROJ JEDINKI		Januar 5	Februar 5	Mart 5	Početak juna 5	Kraj juna 3	Jul 3	Avgust 4
CP	Hiperemija	1	80 %	80 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	Edem primarnog epitela	1	20 %	NN	40 %	20 %	33,3 %	33,3 %	75 %
PP	Hipertrofija epitelnih ćelija	1	20 %	NN	20 %	60 %	NN	33,3 %	NN
	Hiperplazija epitelnih ćelija	2	80 %	40 %	60 %	80 %	66,7 %	100 %	NN
	Proliferacija mukoznih ćelija	1	100 %	20 %	40 %	20 %	33,3 %	NN	25 %
RP	Nekroza	3	40 %	20 %	40 %	20 %	66,7 %	100 %	25 %
	Izdizanje respiratornog epitela	1	100 %	60 %	60 %	80 %	66,7 %	33,3 %	100 %
	Poremećena arhitektura	1	40 %	80 %	80 %	60 %	66,7 %	66,7 %	75 %
	Mukozne ćelije u sekundarnim lamelama	1	NN	NN	NN	60 %	33,3 %	33,3 %	50 %

* w- faktor značajnosti; NN- nije nađeno

Neke od histopatoloških promena uočeni u škragama tokom ispitivanja, prikazane su na slici 4.15.

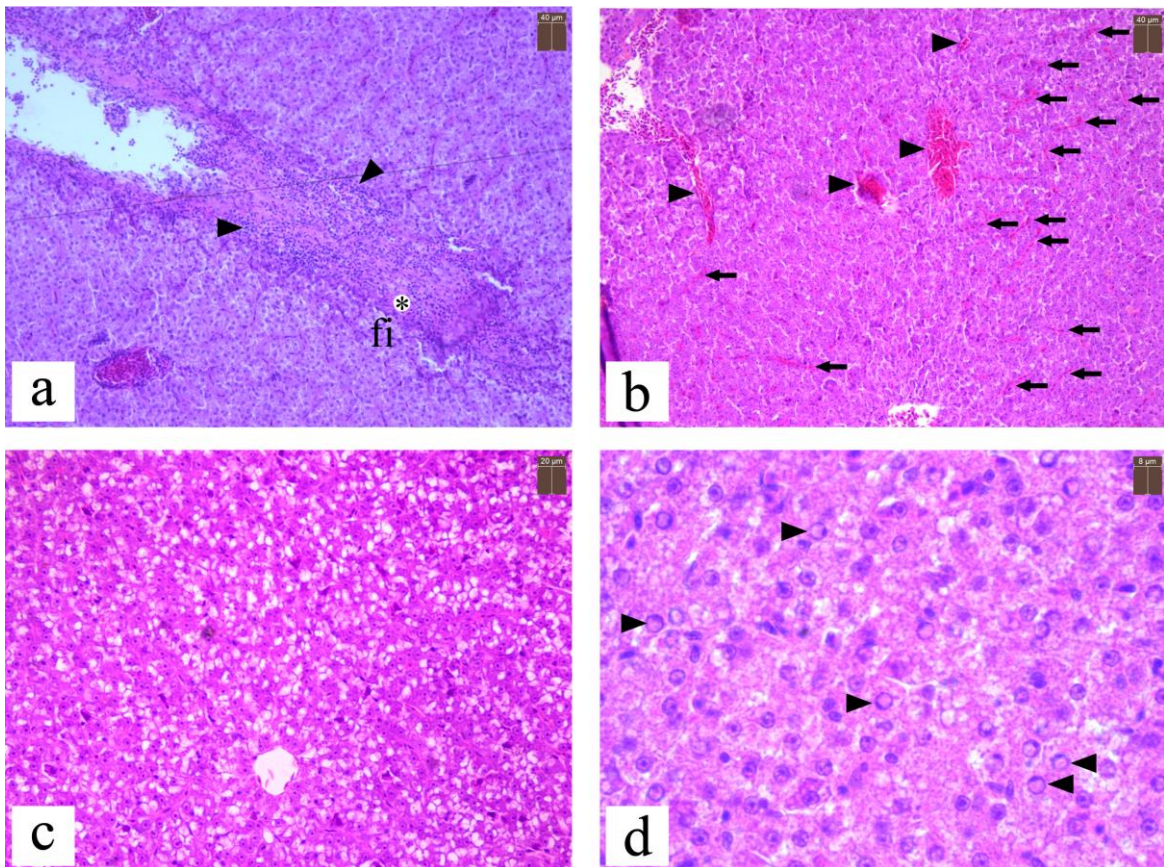


Slika 4.15. Histopatološke promene u škragama: **a.** izdizanje respiratornog epitela (vrh strelice) (HE $\times 200$); **b.** hiperplazija (hy) epitelnih ćelija koja vodi kompletnej fuziji sekundarnih lamela, sa rupturom krvnog suda i hematmom (vrh strelice) (HE $\times 200$); **c.** hiperplazija epitelnih ćelija (hy), skraćivanje sekundarnih lamela (strelice), staza u centralnom venskom sinusu (vrh strelice) (HE $\times 200$); **d.** prisustvo mukoznih ćelija u sekundarnim lamelama (vrh strelice) (HE $\times 400$)

U jetri, promene najvećeg intenziteta bile su kongestija sinusoida i staza u krvnim sudovima, koje pripadaju grupi cirkulatornih promena. Obe promene su imale najviše srednje vrednosti krajem juna (kongestija sinusoida 5,3 i staza 6). Kongestija sinusoida se pojavljivala sa učestalošću od 60 % u februaru i početkom juna, do 100 % krajem juna, u julu i avgustu. Staza je imala učestalost od 40 % u januaru i početkom juna, dok je učestalost od 100 % zabeležena takođe krajem juna, u julu i avgustu. Za stazu je primećena značajna razlika među vrednostima zabeleženim u januaru i krajem juna.

Treća promena po intenzitetu bila je infiltracija leukocita, koja pripada grupi inflamatornih promena, sa histopatološkim skorom 6 u julu i značajnom razlikom u vrednostima između januara i jula. Najniža učestalost infiltracije zabeležena je u januaru i martu (40 %), a najviša u februaru, julu i avgustu (100 %). Fokalne promene hepatocita, vakuolizacija i nekroza koje pripadaju regresivnim promenama imale su najviše vrednosti i učestalost tokom januara, ali značajne razlike među vrednostima tokom različitih meseci nisu zabeležene. Od progresivnih promena, detektovana je samo fibroza krvnih sudova sa najvišom vrednošću 2, tokom jula, bez značajnih razlika između različitih meseci.

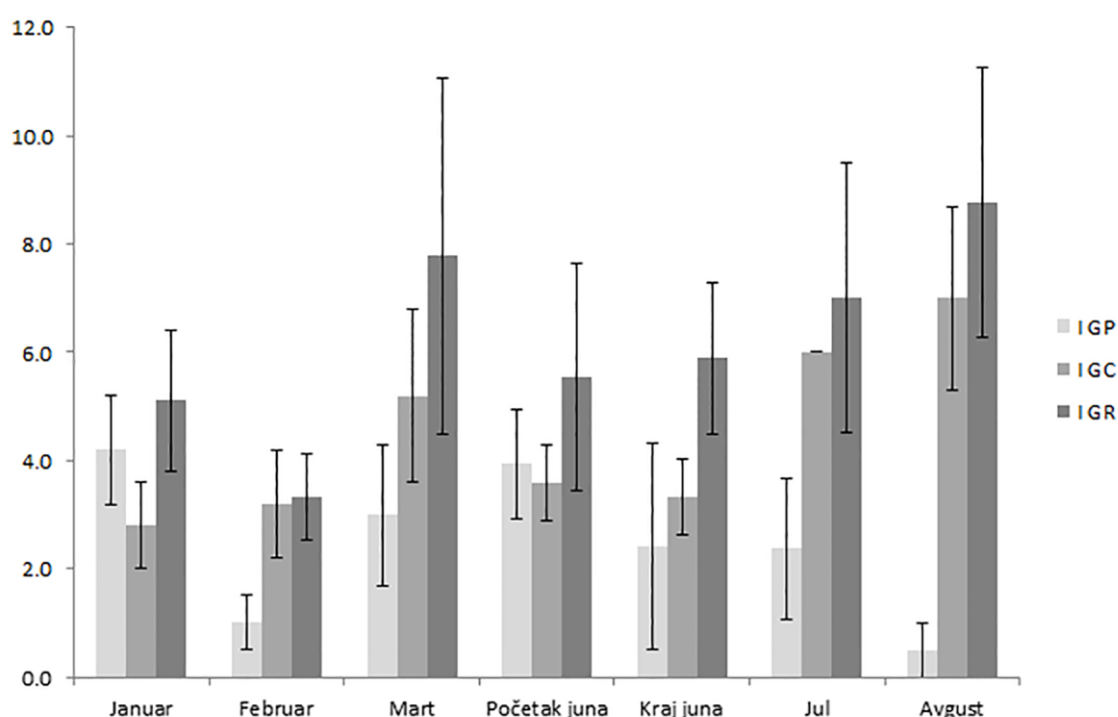
Neke od histopatoloških promena uočeni u jetri, prikazane su na slici 4.16.



Slika 4.16. Histopatološke promene u jetri: **a.** infiltracija leukocita u parenhim jetre, pogotovo oko krvnih sudova (vrh strelice); posebno je primetna intenzivna fibroza (fi) krvnih sudova (HE $\times 200$); **b.** kongestija sinusoida (strelice) i prisustvo staze unutar krvnih sudova (vrh strelice) (HE $\times 200$); **c.** vakuolizacija hepatocita (HE $\times 400$); **d.** patološke promene na nukleolusu (vrh strelice) (HE $\times 1000$)

4.1.6.1 Kategorizacija histopatoloških promena u škragama i jetri na lokalitetu Duboko

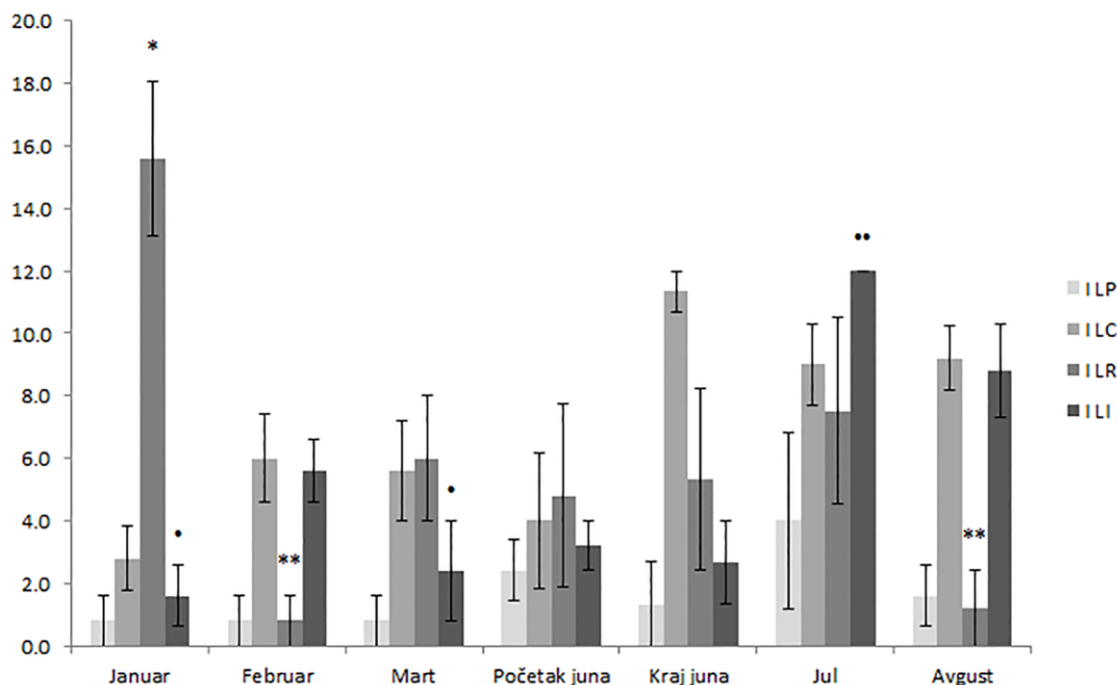
Zabeležene promene u škragama mogle su se kategorisati u tri grupe promena-progresivne (I GP), cirkulatorne (I GC) i regresivne (I GR). Tokom čitavog perioda uzorkovanja u škragama je primećena dominacija regresivnih promena, dok su progresivne promene bile najnižeg intenziteta. Progresivne promene bile su većeg intenziteta u odnosu na cirkulatorne jedino tokom januara i početkom juna. Ipak, nisu primećene značajne razlike u intenzitetu promena tokom različitih meseci (Slika 4.17).



Slika 4.17. Kategorizacija pojedinačnih promena u škragama: progresivne (I GP), cirkulatorne (I GC) i regresivne (I GR) promene. Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost \pm SE. Statistički značajne razlike između različitih meseci nisu primećene ni za jednu od kategorija histopatoloških promena u škragama (Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$)

Zabeležene promene u jetri mogle su se kategorisati u četiri grupe promena-progresivne (I LP), cirkulatorne (I LC), regresivne (I LR) i inflamatorne (I LI). Regresivne promene tokom januara bile su značajno višeg intenziteta u odnosu na februar i avgust.

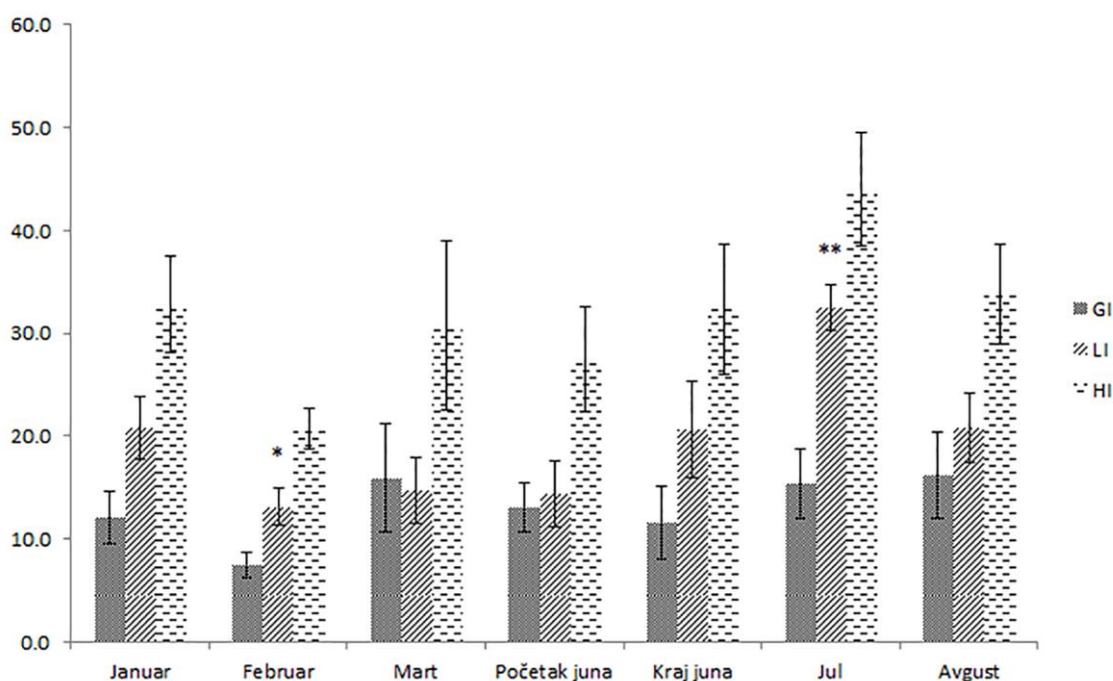
Inflamatorne promene su tokom jula imale značajno viši intenzitet u odnosu na januar i mart (Slika 4.18).



Slika 4.18. Kategorizacija pojedinačnih promena u jetri: progresivne (ILP), cirkulatorne (ILC), regresivne (ILR) i inflamatorne promene (ILI). Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost \pm SE; *** - statistički značajne razlike u okviru regresivnih promena tokom različitih meseci; •,•• - statistički značajne razlike u okviru inflamatornih promena tokom različitih meseci (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, $p < 0,05$)

Na osnovu dobijenih podataka izračunati su histopatološki indeks škrge (GI), histopatološki indeks jetre (LI), kao i ukupni histopatološki indeks (HI) koji predstavlja zbir promena na škragama i jetri u jednoj jedinki.

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE. Histopatološki indeks škrge nije pokazao značajne razlike tokom različitih meseci, dok je histopatološki indeks jetre pokazao značajno više vrednosti tokom jula u odnosu na februar. Ukupni histopatološki indeks nije pokazao značajna variranja vrednosti tokom različitih meseci (Slika 4.19).



Slika 4.19. Histopatološki indeks škrge (GI), jetre (LI) i ukupni histopatološki indeks (HI) predstavljeni kao sr. vrednost \pm SE tokom različitih meseci uzorkovanja. *** - statistički značajne razlike u okviru histopatološkog indeksa jetre tokom različitih meseci (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, $p < 0,05$)

4.2 Reka Dunav - lokalitet Višnjica

4.2.1 Analize fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na lokalitetu Višnjica

Rezultati merenja fizičko-hemijskih parametara kvaliteta vode (pH, temperatura, koncentracija kiseonika, saturacija kiseonikom, elektroprovodljivost, NO_2 , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) na lokalitetu Višnjica, tokom januara, februara, marta, aprila, maja, juna, jula, avgusta, septembra, oktobra, novembra i decembra 2014. godine, dati su u tabeli 4.8. Tokom čitavog perioda uzorkovanja pH vode je bila blago alkalna sa vrednostima ispod 8,5, izuzev u januaru, februaru i martu kada su zabeležene pH vrednosti iznad 9 što je ukazivalo na V klasu kvaliteta. Koncentracija rastvorenog kiseonika bila je najniža u

avgustu, a tada je voda pripadala IV klasi. Tokom juna, septembra i novembra prema koncentraciji rastvorenog kiseonika voda se mogla svrstati u III klasu kvaliteta, tokom maja, oktobra i decembra u II klasu, a u januaru, februaru, martu i aprilu voda je pripadala I klasi. Najviša koncentracija NO_2 zabeležena je u septembru. Najviša koncentracija NO_3^- zabeležena je tokom januara i februara kada se voda mogla svrstati u IV klasu, tokom marta, avgusta, oktobra i decembra voda je pripadala III klasi, a tokom aprila, maja, juna, jula, septembra i novembra II klasi. Najviša koncentracija NH_4^+ zabeležena je u februaru, a najniža u oktobru. Prema koncentracijama NH_4^+ voda je tokom januara, februara, marta, aprila, juna i jula pripadala V klasi, tokom maja i septembra III klasi, tokom avgusta i novembra II klasi, a tokom oktobra i decembra I klasi. Najviša koncentracija PO_4^{3-} zabeležena je u novembru, a voda je prema koncentracijama PO_4^{3-} od avgusta do decembra pripadala V klasi. Prema koncentraciji PO_4^{3-} , tokom januara, marta, aprila, juna i jula voda je pripadala IV klasi, u maju III klasi, dok je tokom februara koncentracija PO_4^{3-} bila ispod nivoa detekcije.

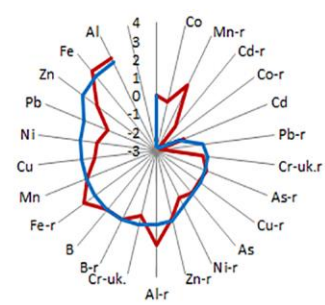
Tabela 4.8. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara izmerene na lokalitetu Višnjica

	pH	T °C	Elektroprovodljivost μS/cm	O ₂		NO ₂	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻
				mg/L	%				
Januar	9,10	7,10	425	10,46	85,53	0,05	8,38	1,48	0,24
Februar	9,07	8,47	356	9,37	77,53	0,06	7,74	2,33	< 0,20
Mart	9,43	14,43	416	11,53	110,83	0,05	5,16	1,83	0,24
April	8,23	16,50	354	13,27	/	0,06	1,05	2,16	0,20
Maj	8,47	19,03	355	7,52	81,80	0,08	1,28	0,67	0,19
Jun	7,83	21,43	345	5,74	65,40	0,08	1,17	1,24	0,27
Jul	8,17	23,60	353	/	/	0,07	1,36	1,23	0,26
Avgust	8,17	22,30	371	4,79	53,27	0,06	5,10	0,12	6,10
Septembar	7,76	15,03	420	5,46	54,67	0,13	2,50	0,50	3,40
Oktobar	8,07	12,53	435	7,04	73,17	0,07	3,50	0,05	5,50
Novembar	7,81	7,73	352	6,72	56,40	0,02	2,0	0,17	9,00
Decembar	7,93	7,50	452	7,65	66,07	0,04	3,6	0,08	1,30

* /- nije izmereno

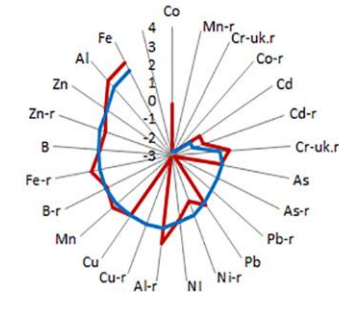
Podaci o specifičnim zagađujućim supstancama za odgovarajući mesec, čije su koncentracije varirale tokom različitih meseci, dobijeni su od Agencije za zaštitu životne sredine RS, sa merne stanice Vinča (22 km nizvodno od lokaliteta) i prikazani su u tabeli 8.2 (Prilog).

Vrednosti parametara izmerenih u vodi na mernoj stanici Vinča poređene su sa vrednostima izmerenim na mernoj stanici Bezdan, Agencije za zaštitu životne sredine, tokom 2014. godine. Za reku Dunav odabran je lokalitet Bezdan kao relativno nezagaden s obzirom da pripada Gornjem Podunavlju koje predstavlja Specijalni rezervat prirode. Podaci su transformisani logaritmovanjem i predstavljeni preko radarskih grafikona (Slika 4.20). Tokom januara su primećene povećane vrednosti rastvorenog Mn, Al i Fe, kao i ukupnog Fe i Co. Tokom februara su primećene povećane vrednosti rastvorenog Fe, Al i Cr, kao i ukupnog Fe, Al, Co i Cd. Tokom marta primećen je skok ukupnog i rastvorenog As, rastvorenog Cr i ukupnog Pb, Co, Ni, Zn, Al i Fe. Tokom aprila bile su prisutne povećane količine ukupnog i rastvorenog As, i rastvorenog Co. U maju su primećene povećane koncentracije rastvorenog Mn, Cr, Pb, Cd, Al i ukupnog Cr. U junu vrednosti izmerene na mernoj stanici Vinča nisu bile povećane u odnosu na vrednosti na mernoj stanici Bezdan. U julu je primećen skok ukupnog Cr i Co, kao i rastvorenog Fe, Mn, Al i B. U avgustu su primećene više koncentracije ukupnog i rastvorenog Cr, kao i rastvorenog Al, B i Cd. U septembru je primećena viša koncentracija Co i rastvorenog Al. U oktobru su bile prisutne više koncentracije ukupnog i rastvorenog Cr, kao i rastvorenog Mn i Cu. U novembru su bile prisutne više koncentracije rastvorenog Fe, Mn, Ni, Zn, ukupnog i rastvorenog Cu, kao i ukupnog Cr i Mn. U decembru su primećene više koncentracije ukupnog Co i Cr, kao i rastvorenog Pb i Cd.



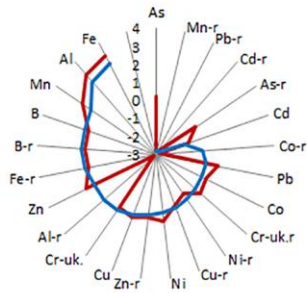
Januar

— Vinča
— Beždan



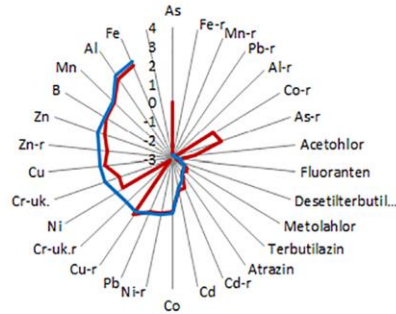
Februar

— Vinča
— Beždan



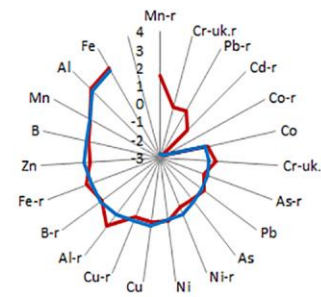
Mart

— Vinča
— Beždan



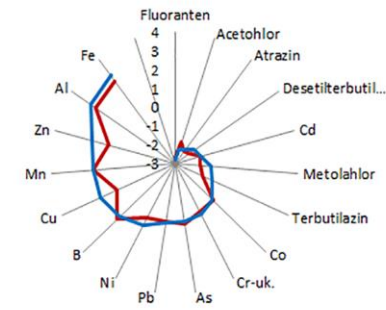
April

— Vinča
— Beždan



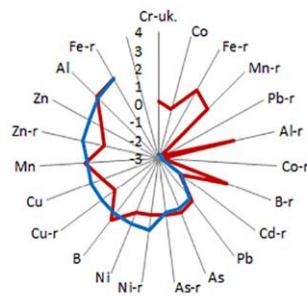
Maj

— Vinča
— Beždan



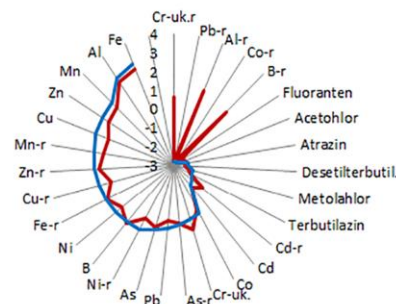
Jun

— Vinča
— Beždan



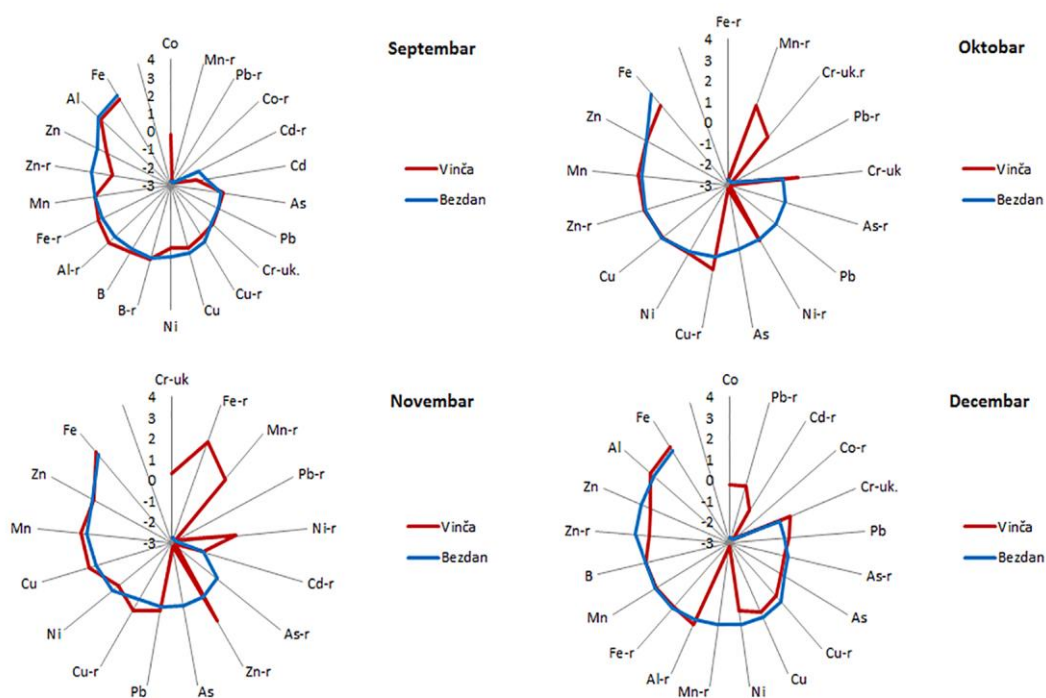
Jul

— Vinča
— Beždan



Avgust

— Vinča
— Beždan



Slika 4.20. Poređenje koncentracija metala, metaloida i specifičnih zagađujućih materija na mernoj stanici Vinča i mernoj stanici Bezdan tokom 2014. godine

Podaci o dnevnom variranju vodostaja tokom 2014. godine na reci Dunav, dobijeni su od Republičkog hidrometeorološkog zavoda (RHMZ), sa merne stanice Pančevo, koja se nalazi na oko 8 km nizvodno od lokaliteta Višnjica i prikazani su na slici 8.2 (Prilog).

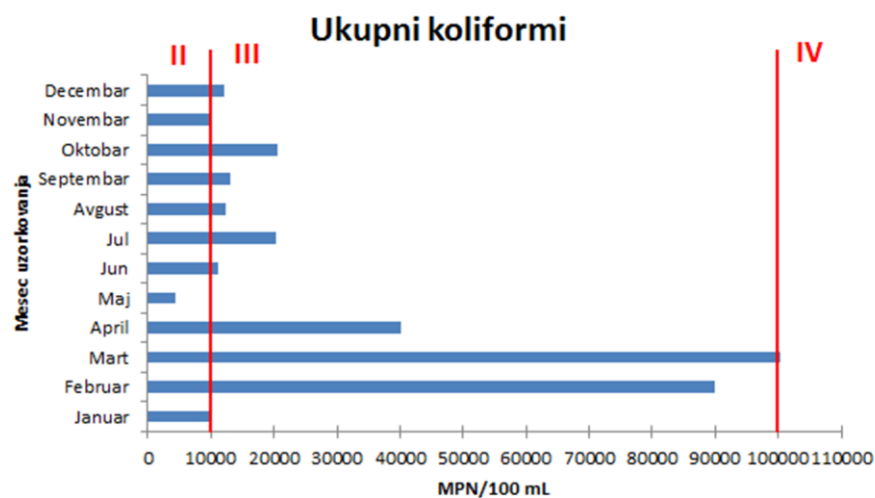
4.2.2 Analize mikrobioloških indikatora na lokalitetu Višnjica

4.2.2.1 Ispitivanje sanitarnog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Višnjica

Koncentracije ukupnih koliforma, *E. coli* i enterokoka na lokalitetu Višnjica, dobijene su primenom metode enzimskog razlaganja supstrata, dok je količina *C. perfringens* određena primenom metode membranske filtracije i inkubacije na TSC podlozi.

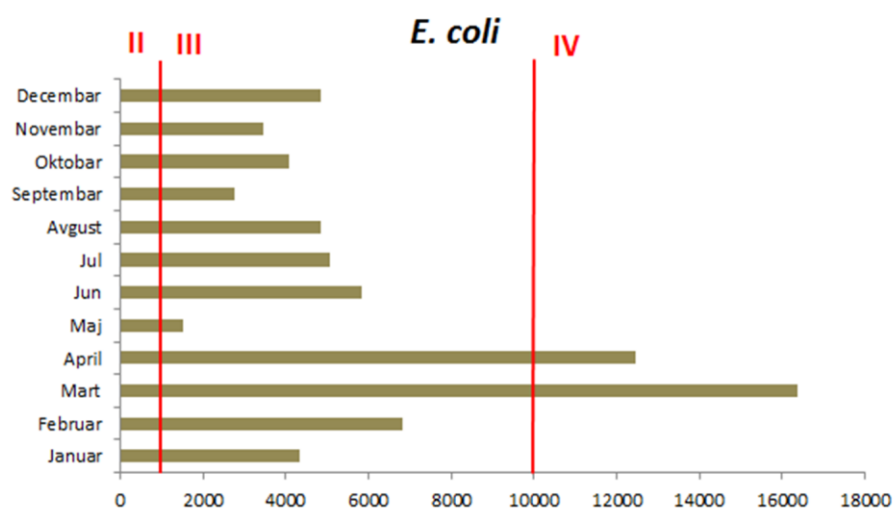
Najviša koncentracija ukupnih koliforma zabeležena je u martu kada je voda pripadala IV klasi kvaliteta (jako fekalno zagađenje). Najniža koncentracija ukupnih koliforma zabeležena je u maju, a voda je tokom maja, januara i novembra pripadala II

klasi (umereno fekalno zagađenje). Tokom ostalih meseci voda je pripadala III klasi kvaliteta (kritično fekalno zagađenje) (Slika 4.21).



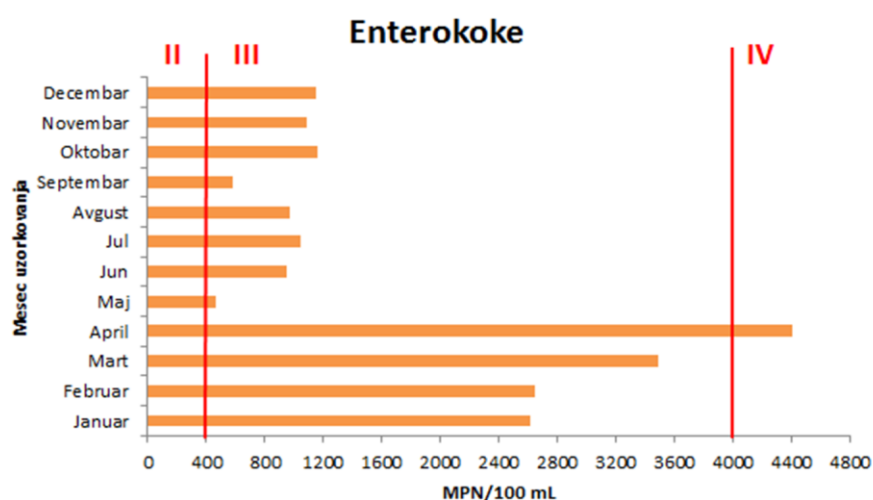
Slika 4.21. Koncentracije ukupnih koliforma na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine izražene kao MPN/100 mL sa naznačenom granicom između II, III i IV klase

Najviše koncentracije *E. coli* zabeležene su takođe u martu i aprilu, kada je voda pripadala IV klasi (jako fekalno zagađenje). Tokom ostalih meseci uzorkovanja voda je pripadala III klasi kvaliteta (kritično fekalno zagađenje), a najniža koncentracija *E. coli* zabeležena je u maju (Slika 4.22).



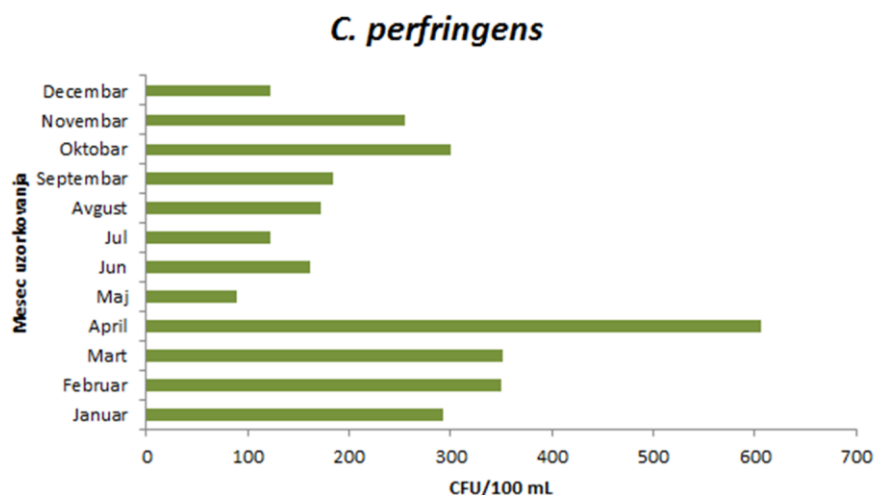
Slika 4.22. Koncentracije *E. coli* na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine izražene kao MPN/100 mL sa naznačenom granicom između II, III i IV klase

Najviša koncentracija enterokoka zabeležena je u aprilu, kada je voda pripadala IV klasi (jako fekalno zagađenje). Tokom ostalih meseci voda je pripadala III klasi kvaliteta (kritično fekalno zagađenje), a najniža koncentracija enterokoka zabeležena je u maju (Slika 4.23).



Slika 4.23. Koncentracije enterokoka na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine izražene kao MPN/100 mL sa naznačenom granicom između II, III i IV klase

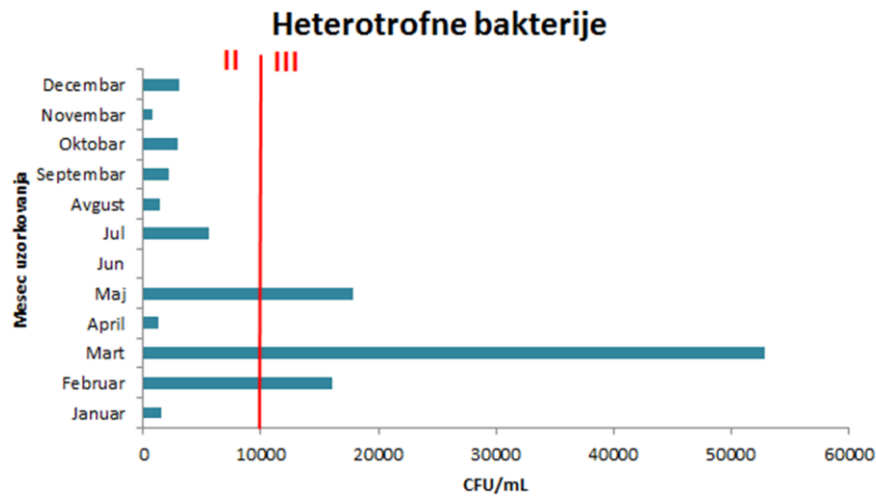
Najviše koncentracije *C. perfringens* zabeležene su tokom aprila, a najniže tokom maja (Slika 4.24).



Slika 4.24. Koncentracije *C. perfringens* na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine izražene kao CFU/100 mL

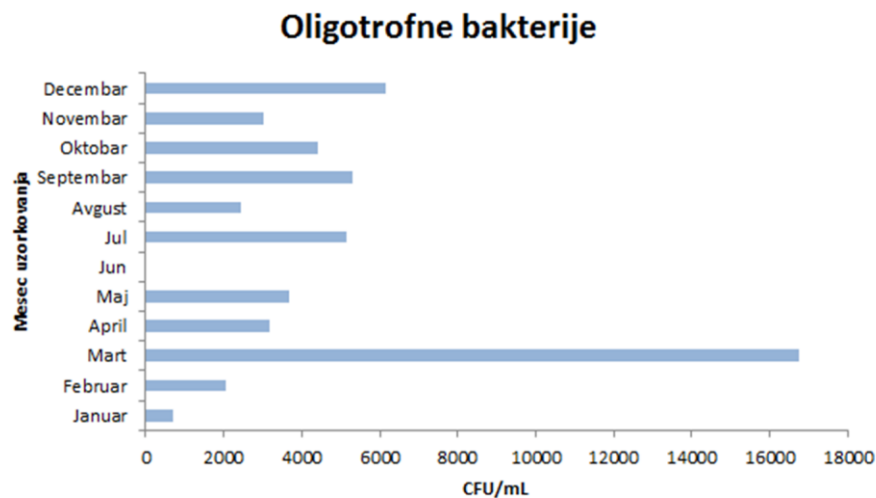
4.2.2.2 Ispitivanje ekološkog aspekta kvaliteta vode na lokalitetu Višnjica

U cilju ispitivanja organskog opterećenja vode praćene su koncentracije heterotrofnih i oligotrofnih bakterija, kao i indeks fosfatne aktivnosti. Prema koncentracijama heterotrofnih bakterija voda je tokom većine meseci bila u II klasi kvaliteta, dok je tokom februara, marta i maja pripadala III klasi (Slika 4.25). Najviše koncentracije zabeležene su tokom marta, a najniže u novembru.



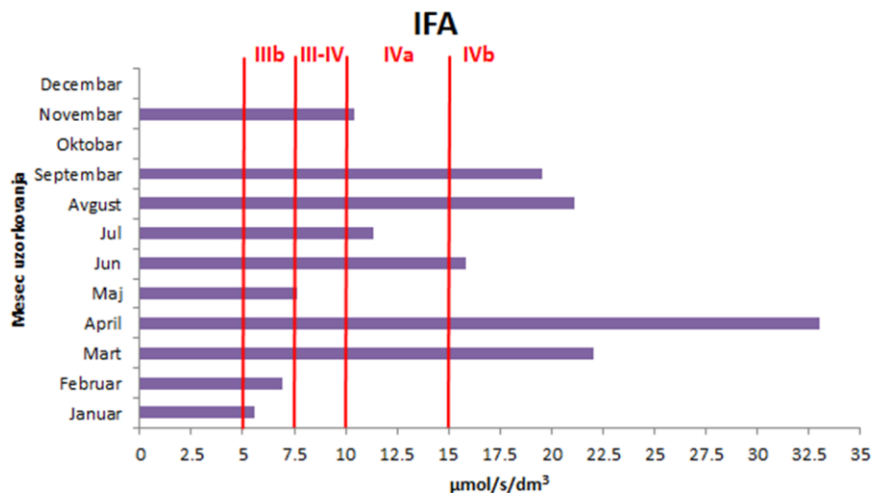
Slika 4.25. Koncentracije heterotrofnih bakterija na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine izražene kao CFU/mL sa naznačenom granicom između II i III klase

Variranje koncentracija oligotrofnih bakterija tokom 2014. godine, prikazano je na slici 4.26. Najviše koncentracije oligotrofnih bakterija zabeležene su u martu, a najniže u januaru.



Slika 4.26. Koncentracije oligotrofnih bakterija na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine izražene kao CFU/mL

Prema indeksu fosfatazne aktivnosti vode, najviše organsko opterećenje zabeleženo je u aprilu, a najniže u januaru, kao i na lokalitetu Duboko (Slika 4.27). Tokom januara i februara vrednosti IFA nisu bile veće od 7,5, pa se voda mogla svrstati u IIIb kategoriju (veoma zagađena), a u maju je bila između III i IV kategorije (prljava voda). U julu i novembru, voda je pripadala IVa kategoriji (veoma prljava), dok je tokom marta, aprila, juna, avgusta i septembra pripadala IVb kategoriji (maksimalno prljava).



Slika 4.27. Vrednosti indeksa fosfatazne aktivnosti na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine sa granicama između IIIb, III-IV, IVa i IVb klase

4.2.3 Uzorkovanje jedinki deverike na lokalitetu Višnjica

Uzorkovanje jedinki deverike na lokalitetu Višnjica na Dunavu vršeno je tokom februara, aprila, avgusta i novembra 2014. godine. Svakog meseca uzorkovano je po 5 jedinki. Starost jedinki deverike uzorkovanih na lokalitetu Višnjica kretala se od 2+ do 4+. Detaljan pregled podataka o dužini, težini i faktoru kondicije (KF) jedinki dat je u tabeli 4.9. Najviša vrednost faktora kondicije zabeležena je u aprilu, a najniža u novembru.

Tabela 4.9. Pregled uzorkovanih jedinki deverike na lokalitetu Višnjica sa vrednostima faktora kondicije - KF izraženim kao sr. vrednost \pm SD

Mesec uzorkovanja		1	2	3	4	5	KF
Februar	SL	25,5	29	31	26	27,5	<i>1,30\pm0,04</i>
	TL	31	34	37	31	33,5	
	W	395	502	687	379	482	
April	SL	27	29	27	27	28,5	<i>1,42\pm0,15</i>
	TL	32,5	35	31	33	34,5	
	W	491	568	491	509	517	
Avgust	SL	27	24	26,5	26,5	25,5	<i>1,29\pm0,09</i>
	TL	32,5	29,5	32,5	33	32	
	W	449	368	429	449	400	
Novembar	SL	27	28,5	27,5	26,5	25	<i>1,22\pm0,06</i>
	TL	32,5	34	34,5	31,5	31	
	W	440	500	478	365	359	

* SL-standardna dužina ribe, TL-ukupna dužina ribe, W-težina ribe

4.2.4 Koncentracije metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću deverike na lokalitetu Višnjica

Koncentracije metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću deverika na lokalitetu Višnjica ispitane su tokom februara, aprila, avgusta i novembra i prikazane u tabeli 4.10 kao srednja vrednost \pm SD. Tokom svakog meseca analizirana su tkiva po 5 jedinki. Ispitane su statistički značajne razlike među koncentracijama elemenata u svakom tkivu tokom različitih meseci (mala slova) kao i statistički značajne razlike među koncentracijama elemenata u različitim tkivima u okviru istog meseca (velika slova), pri čemu različita slova označavaju statistički značajne razlike.

Tokom čitavog perioda uzorkovanja bor (B) je detektovan u jetri u jednoj jedinki tokom februara i u škragama u jednoj jedinki tokom avgusta. Kadmijum (Cd) je detektovan samo u jetri i to u jednoj jedinki tokom februara i svim jedinkama tokom aprila ($0,06\pm 0,07$), avgusta ($0,05\pm 0,04$) i novembra ($0,17\pm 0,13$). Litijum (Li) je detektovan samo

u škragama, u po dve jedinke tokom februara i avgusta i svim jedinkama u novembru ($1,54 \pm 0,37$). Nikl (Ni) je detektovan u jetri u jednoj jedinki u februaru i jednoj u avgustu, u škragama u jednoj jedinki u februaru, jednoj u aprilu i dve jedinke u avgustu, u gonadama u jednoj jedinki u avgustu i u mišiću u dve jedinke u aprilu i jednoj u avgustu. Ovi elementi nisu uzeti u obzir prilikom izvođenja statističkih analiza s obzirom da su se neredovno detektovali tokom perioda uzorkovanja.

Tabela 4.10. Koncentracije metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću deverike tokom različitih meseci na lokalitetu Višnjica

	Mesec uzorkovanja	JETRA	ŠKRGE	GONADE	MIŠIĆ
Al	Februar	$6,95 \pm 10,50^{a AB}$	$61,19 \pm 26,04^{a A}$	$1,40 \pm 1,24^{a B}$	$5,99 \pm 10,48^{a AB}$
	April	$0,69 \pm 0,76^{a A}$	$64,68 \pm 57,59^{a B}$	$5,80 \pm 8,08^{a AB}$	$4,00 \pm 4,88^{a AB}$
	Avgust	$9,28 \pm 11,79^{a AB}$	$31,69 \pm 22,27^{ab A}$	$1,68 \pm 1,57^{a B}$	$15,85 \pm 23,86^{a AB}$
	Novembar	$5,29 \pm 3,88^{a A}$	$5,35 \pm 8,17^{b A}$	$10,47 \pm 6,20^{a A}$	$8,07 \pm 1,61^{a A}$
As	Februar	0,22*	ND	$1,75 \pm 0,75^{a A}$	$1,73 \pm 2,39^{a A}$
	April	$0,14 \pm 0,18^{**}$	3,20*	$1,21 \pm 0,89^{a A}$	$0,46 \pm 0,35^{a A}$
	Avgust	ND	ND	$1,61 \pm 1,37^a$	ND
	Novembar	ND	ND	1,04*	ND
Ba	Februar	0,10*	$28,47 \pm 4,21^{a A}$	0,23*	$1,15 \pm 0,43^{a B}$
	April	0,06*	$19,82 \pm 13,98^{a A}$	17,88*	$1,25 \pm 0,34^{a A}$
	Avgust	0,25*	$27,43 \pm 3,56^{a A}$	$0,05 \pm 0,01^{**}$	$1,30 \pm 0,63^{a B}$
	Novembar	ND	$22,78 \pm 4,10^{a A}$	$0,03 \pm 0,02^B$	$0,90 \pm 0,17^{a AB}$
Co	Februar	$0,08 \pm 0,07^{a A}$	$0,05 \pm 0,03^{a A}$	$0,18 \pm 0,27^{a A}$	ND
	April	$0,11 \pm 0,04^{a A}$	$0,18 \pm 0,13^{**}$	$0,11 \pm 0,17^{a A}$	ND
	Avgust	$0,12 \pm 0,10^{a A}$	$0,16 \pm 0,18^{a A}$	$0,19 \pm 0,13^{a A}$	ND
	Novembar	$0,07 \pm 0,03^{a A}$	$0,06 \pm 0,04^{a A}$	$0,13 \pm 0,10^{a A}$	ND
Cr	Februar	$0,25 \pm 0,07^{a AB}$	$1,32 \pm 0,25^{a A}$	$0,08 \pm 0,09^{a B}$	$0,26 \pm 0,08^{a AB}$
	April	$0,18 \pm 0,02^{a A}$	$0,91 \pm 0,64^{a A}$	$0,18 \pm 0,17^{a A}$	$0,30 \pm 0,21^{a A}$
	Avgust	$0,20 \pm 0,04^{a AB}$	$3,71 \pm 6,30^{a A}$	$0,10 \pm 0,07^{a B}$	$0,33 \pm 0,22^{a AB}$
	Novembar	$0,21 \pm 0,05^{a AB}$	$0,76 \pm 0,10^{a A}$	$0,21 \pm 0,10^{a AB}$	$0,19 \pm 0,05^{a B}$

Cu	Februar	44,25±58,29 ^{a A}	2,11±0,59 ^{a AB}	1,16±2,25 ^{a B}	1,13±1,24 ^{a B}
	April	22,07±19,29 ^{a A}	0,85±0,64 ^{ab AB}	1,54±2,49 ^{a B}	1,41±1,72 ^{a AB}
	Avgust	44,06±11,98 ^{a A}	1,76±0,69 ^{ab AB}	1,31±1,30 ^{a AB}	0,66±1,10 ^{a B}
	Novembar	64,66±22,25 ^{a A}	0,98±0,13 ^{b B}	0,81±0,41 ^{a B}	1,49±0,98 ^{a AB}
Fe	Februar	177,56±127,08 ^{a AB}	428,22±78,90 ^{a A}	20,67±15,73 ^{a B}	9,72±6,83 ^{a B}
	April	225,11±94,66 ^{a A}	158,45±115,79 ^{ab AB}	33,80±33,34 ^{a AB}	14,23±6,56 ^{a B}
	Avgust	190,35±62,97 ^{a A}	167,64±36,09 ^{ab A}	28,12±13,76 ^{a AB}	27,64±24,93 ^{a B}
	Novembar	177,74±78,89 ^{a A}	117,00±31,04 ^{b A}	29,26±9,40 ^{a AB}	15,40±5,07 ^{a B}
Mn	Februar	5,64±2,15 ^{a AB}	44,49±9,44 ^{a A}	2,93±6,19 ^{a B}	1,42±1,26 ^{a B}
	April	5,74±1,47 ^{a A}	26,77±18,05 ^{a A}	8,45±11,74 ^{a A}	1,67±0,97 ^{a A}
	Avgust	6,64±1,59 ^{a AB}	42,79±18,35 ^{a A}	4,83±8,27 ^{a B}	1,98±1,69 ^{a B}
	Novembar	4,45±0,61 ^{a AB}	33,38±9,85 ^{a A}	1,05±0,44 ^{a B}	1,42±0,29 ^{a B}
Mo	Februar	0,52±0,29 ^{a AB}	2,06±0,68 ^{a A}	0,22±0,17 ^{a B}	0,32±0,23 ^{a B}
	April	0,66±0,18 ^{a AB}	1,91±1,39 ^{a A}	0,42±0,31 ^{a B}	0,43±0,15 ^{a B}
	Avgust	0,73±0,24 ^{a AB}	1,54±0,16 ^{a A}	0,24±0,15 ^{a B}	0,36±0,25 ^{a B}
	Novembar	0,27±0,23 ^{a AB}	8,38±10,18 ^{a A}	0,09±0,08 ^{a B}	0,21±0,14 ^{a AB}
Pb	Februar	0,20±0,13 ^{**}	0,23 [*]	0,08±0,05 ^{a A}	0,08±0,04 ^A
	April	0,05±0,04 ^{a A}	0,12 [*]	0,08±0,03 ^{a A}	ND
	Avgust	0,47±0,84 ^{a A}	ND	0,09±0,05 ^{a A}	ND
	Novembar	0,11±0,07 ^a	ND	ND	ND
Sr	Februar	0,22±0,11 ^{a A}	159,04±18,93 ^{a B}	0,20±0,26 ^{a A}	3,20±3,52 ^{a AB}
	April	0,36±0,24 ^{a A}	105,78±79,01 ^{a B}	17,62±39,02 ^{a A}	3,72±2,09 ^{a AB}
	Avgust	0,21±0,05 ^{a A}	134,45±14,50 ^{a B}	0,12±0,08 ^{a A}	3,54±2,21 ^{a AB}
	Novembar	0,24±0,05 ^{a AC}	130,77±16,39 ^{a B}	0,14±0,04 ^{a A}	3,28±0,68 ^{a BC}
Zn	Februar	76,27±36,50 ^{a A}	67,48±7,61 ^{a A}	69,65±113,63 ^{a A}	26,49±7,63 ^{a A}
	April	49,40±13,14 ^{a A}	48,99±34,14 ^{a A}	53,68±64,74 ^{a A}	24,42±4,95 ^{a A}
	Avgust	76,74±12,09 ^{a A}	67,19±2,87 ^{a A}	80,32±73,29 ^{a A}	21,67±3,29 ^{a A}
	Novembar	91,93±15,26 ^{a A}	57,75±5,69 ^{a AB}	34,96±18,46 ^{a B}	20,58±2,55 ^{a B}

* Podaci su predstavljeni kao sr. vrednost±SD i izraženi u µg/g suve težine. ^{a,b} Vrednosti označene različitim slovom su značajno različite tokom različitih meseci u okviru jednog tkiva. ^{A,B,C} Vrednosti označene različitim slovom su značajno različite između različitih tkiva u okviru istog meseca (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, p < 0,05); ND- vrednosti ispod granice detekcije; * vrednost izmerena u jednoj jedinki; ** vrednost izmerena u dve jedinke (sr. vrednost±SD)

Značajne razlike u koncentracijama elemenata tokom različitih meseci uočene su samo u škragama za Al, Cu i Fe. Koncentracije Al u škragama bile su značajno više u februaru i aprilu u odnosu na novembar. Koncentracije Cu i Fe u škragama bile su značajno više u februaru u odnosu na novembar.

Al je bio najzastupljeniji u škragama. U toku februara i avgusta, škrge su imale značajno višu koncentraciju Al u odnosu na gonade, u toku aprila u odnosu na jetru, dok tokom novembra nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Al između četiri tkiva.

As je detektovan u gonadama svih ispitivanih jedinki tokom februara, aprila i avgusta, kao i u mišiću svih jedinki tokom februara i aprila, a najmanje je bio prisutan u škragama i jetri. Nisu primećene značajne razlike u koncentracijama As između gonada i mišića.

Tokom svih meseci Ba je bio prisutan kod svih jedinki u škragama i mišiću, a u gonadama je kod svih jedinki detektovan samo u novembru. U jetri su zabeležene najniže koncentracije Ba, on je detektovan u po jednoj jedinki u februaru, aprilu i avgustu, a u novembru nije detektovan. Koncentracije Ba u škragama bile su značajno više u odnosu na koncentracije u mišiću tokom februara i avgusta i u odnosu na koncentracije u gonadama tokom novembra.

Co je detektovan u jetri i gonadama svih jedinki tokom svih meseci, u škragama je detektovan u februaru, avgustu i novembru u svim jedinkama i u aprilu u dve jedinke, dok u mišiću nije detektovan. Nisu primećene značajne razlike u koncentracijama Co između različitih tkiva u okviru istog meseca.

U škragama je primećena značajno viša koncentracija Cr u odnosu na gonade tokom februara i avgusta, kao i u odnosu na mišić tokom novembra.

Najviše koncentracije Cu zabeležene su u jetri i bile su značajno više u odnosu na koncentracije u gonadama tokom februara, aprila i novembra, u odnosu na koncentracije u mišiću tokom februara i avgusta, a u odnosu na koncentracije u škragama tokom novembra.

Najviše koncentracije Fe primećene su u jetri i škragama. Tokom februara škrge su imale značajno više koncentracije Fe u odnosu na gonade i mišić. Tokom aprila jetra je imala značajno više koncentracije Fe u odnosu na mišić. Tokom avgusta i novembra jetra i škrge su imale značajno više koncentracije Fe u odnosu na mišić.

Najviše koncentracije Mn primećene su u škragama i bile su značajno više od koncentracija detektovanih u gonadama i mišiću tokom februara, avgusta i novembra.

Najviše koncentracije Mo primećene su u škragama i bile su značajno više u odnosu na koncentracije u gonadama tokom svih meseci i u odnosu na koncentracije u mišiću tokom svih meseci izuzev novembra.

Pb je detektovan u svim jedinkama u jetri tokom aprila, avgusta i novembra, u gonadama tokom februara, aprila i avgusta, kao i u mišiću tokom februara. Nisu primećene značajne razlike među različitim tkivima u okviru pojedinačnih meseci.

Sr je dominantno bio prisutan u škragama. Koncentracije Sr u škragama bile su značajno više u odnosu na koncentracije u jetri i gonadama tokom svih meseci. Koncentracije Sr u mišiću tokom novembra bile su značajno više u odnosu na koncentracije u gonadama.

Zn je bio obimno prisutan u jetri, škragama i gonadama. Koncentracije Zn u jetri bile su značajno više u odnosu na koncentracije u gonadama i mišiću tokom novembra.

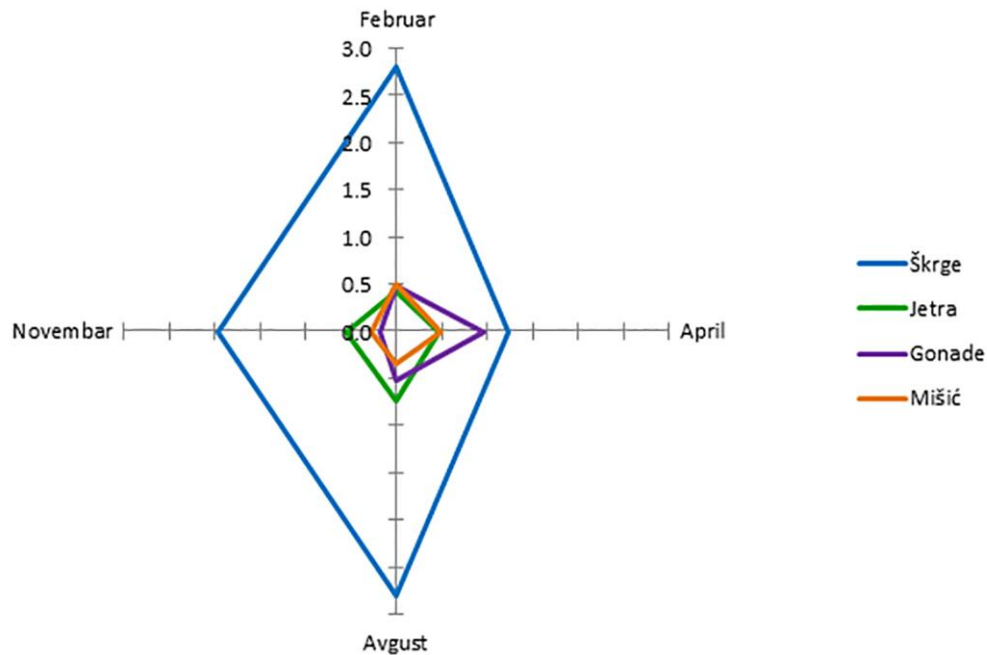
Za Pb, As, Cd, Cu, Fe i Zn propisane su vrednosti MDK po jedinici vlažne mase (ww) za mišić. Kako bi smo mogli da izvršimo poređenje dobijenih vrednosti sa propisanim MDK, za sve elemente izuzev Cd koji nije bio detektovan, preračunate su koncentracije po jedinici vlažne mase mišića. Rezultati su prikazani u tabeli 4.11 sa propisanim MDK vrednostima radi lakšeg poređenja. Koncentracije elemenata u mesu ribe (mišić), bile su ispod propisanih maksimalno dozvoljenih koncentracija.

Tabela 4.11. Koncentracije Pb, As, Cu, Fe, Zn u mišiću riba na lokalitetu Višnjica i propisane MDK vrednosti

	Pb	As	Cu	Fe	Zn
Februar	0,02±0,01	0,43±0,58	0,29±0,33	2,46±1,89	6,55±1,94
April	ND	0,11±0,08	0,32±0,36	3,35±1,50	5,75±1,37
Avgust	ND	ND	0,15±0,26	6,45±5,98	4,93±0,75
Novembar	ND	ND	0,35±0,23	3,57±1,25	4,75±0,77
MDK	0,3	2	30	30	100

* ND- ispod praga detekcije. Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost±SD i izražene u µg/g vlažne mase

Indeks zagađenja metalima (*Metal pollution index- MPI*) izračunat je u cilju normalizacije podataka i poređenja ukupnog sadržaja metala u različitim tkivima tokom različitih meseci na ispitanom lokalitetu. Prema MPI, u škragama su zabeležene najviše koncentracije elemenata tokom svih meseci. Najviše vrednosti MPI u škragama zabeležene su u februaru i avgustu (2,8), u jetri tokom avgusta (0,7), u gonadama u aprilu (1,0), a u mišiću tokom februara i aprila (0,5). U februaru jetra je imala najniži MPI (0,4), u aprilu jetra i mišić (0,5), u avgustu mišić (0,3), a u novembru gonade (0,2). Generalno, u mišiću su zabeležene niže koncentracije metala i metaloida tokom većine meseci (Slika 4.28).



Slika 4.28. Indeks zagađenja metalima (*Metal pollution index- MPI*) škrge, jetre, gonada i mišića deverike na lokalitetu Višnjica tokom četiri meseca (za svaki mesec analizirano je po 5 jedinki)

4.2.5 Detekcija oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi, jetre i škrge deverike na lokalitetu Višnjica

4.2.5.1 Određivanje vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škrge

Pregled vijabilnosti ćelija krvi, jetre i škrge deverike tokom različitih meseci 2014. godine na lokalitetu Višnjica dat je u tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Vijabilnost ćelija krvi, jetre i škrge deverike uzorkovane na lokalitetu Višnjica

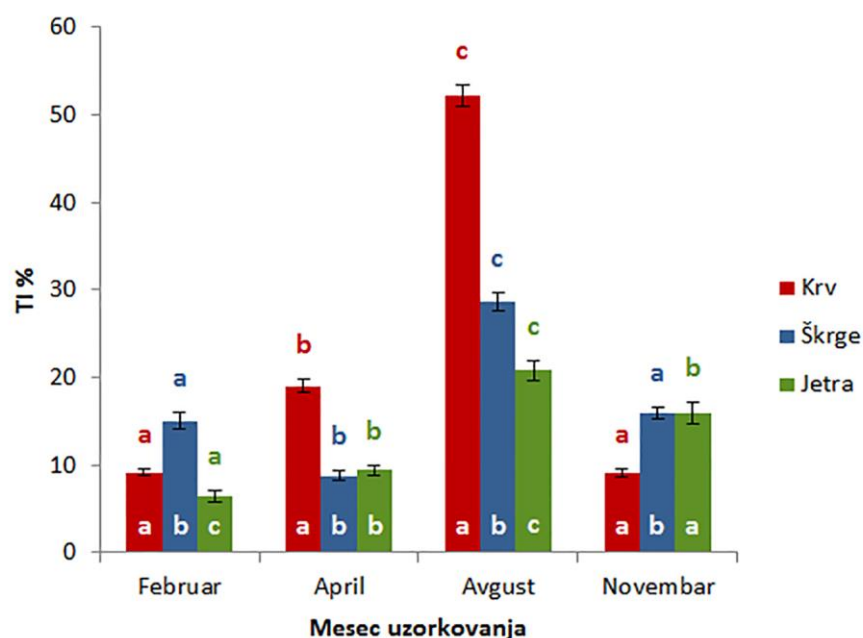
Mesec uzorkovanja	Krv	Jetra	Škrge
Februar	94,4±2,7	81,0±14,1	90,6±5,8
April	98,0±1,9	87,4±4,2	92,2±6,9
Avgust	95,6±4,3	88,6±5,9	81,8±6,3
Novembar	96,6±4,0	83,0±7,1	93,6±10,1

* Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost±SD i izražene u %

Tokom svih meseci ćelije krvi pokazale su višu vijabilnost u odnosu na ćelije jetre i škrge. Ćelije škrge pokazale su viši stepen vijabilnosti u odnosu na ćelije jetre, izuzev u avgustu.

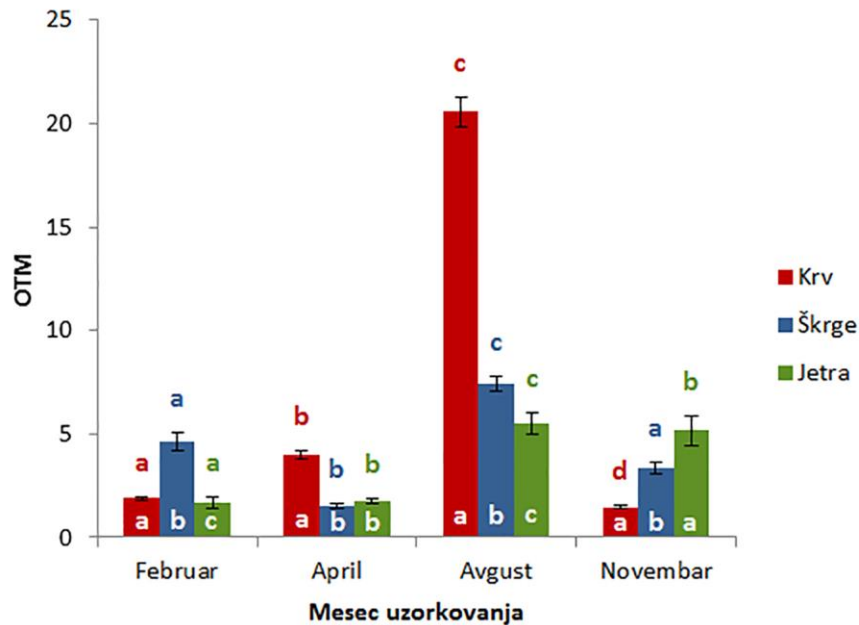
4.2.5.2 DNK oštećenje u ćelijama krvi, jetre i škrge

Prema TI (%) parametru, sva tri tkiva imala su najviše DNK oštećenje u avgustu. Ćelije krvi imale su najniže oštećenje u februaru i novembru, ćelije škrge u aprilu, a ćelije jetre u februaru (Slika 4.29) (slova u boji za svako tkivo; različita slova označavaju statistički značajne razlike). U februaru se DNK oštećenje tri tkiva značajno razlikovalo, pri čemu su škrge imale najviši nivo DNK oštećenja, a jetra najniži. U aprilu krv je imala značajno viši nivo DNK oštećenja u odnosu na škrge i jetru. U avgustu se DNK oštećenje tri tkiva značajno razlikovalo, pri čemu je krv imala najviši nivo DNK oštećenja, a jetra najniži. U novembru su škrge imale najviši nivo oštećenja, a krv najniži (Slika 4.29) (bela slova na dnu stubića; različita slova označavaju statistički značajne razlike).



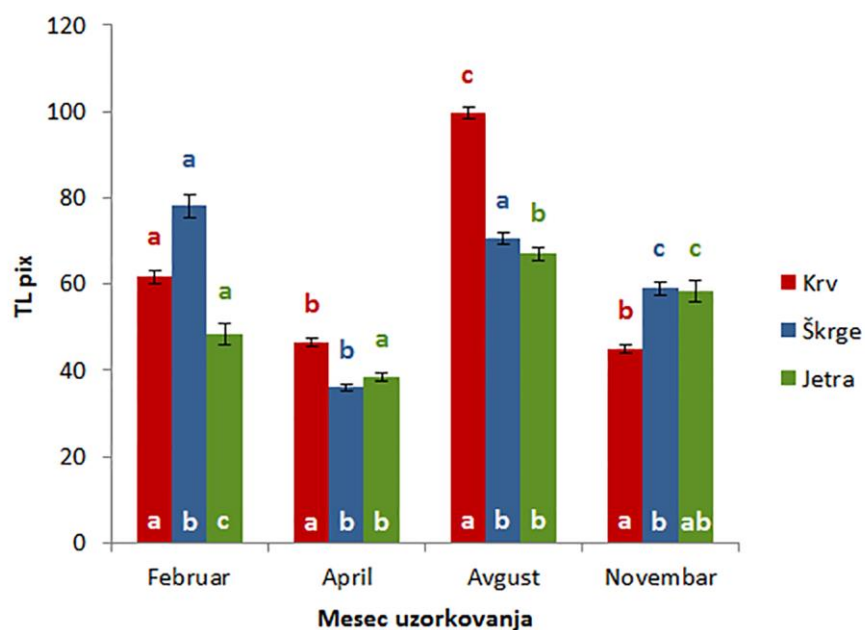
Slika 4.29. Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi, škrge i jetre izražen preko TI (%) parametra sa statistički značajnim razlikama u DNK oštećenju tri tkiva u okviru svakog meseca (bela slova na dnu stubića) kao i mesečnim razlikama u okviru svakog tkiva (iznad stubića slova u boji za svako tkivo). a, b, c- različita slova označavaju statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost \pm SE

U pogledu najvišeg i najnižeg nivoa DNK oštećenja u tri tkiva OTM parametar dao je iste rezultate kao i TI (%) parametar, izuzev u slučaju ćelija krvi, kako se prema OTM parametru nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi u februaru i novembru značajno razlikovao (Slika 4.30) (slova u boji za svako tkivo; različita slova označavaju statistički značajne razlike). Takođe, u okviru pojedinačnih meseci parametri TI (%) i OTM su pokazali iste rezultate značajnih razlika u DNK oštećenju tri tkiva (Slika 4.30) (bela slova na dnu stubića; različita slova označavaju statistički značajne razlike).



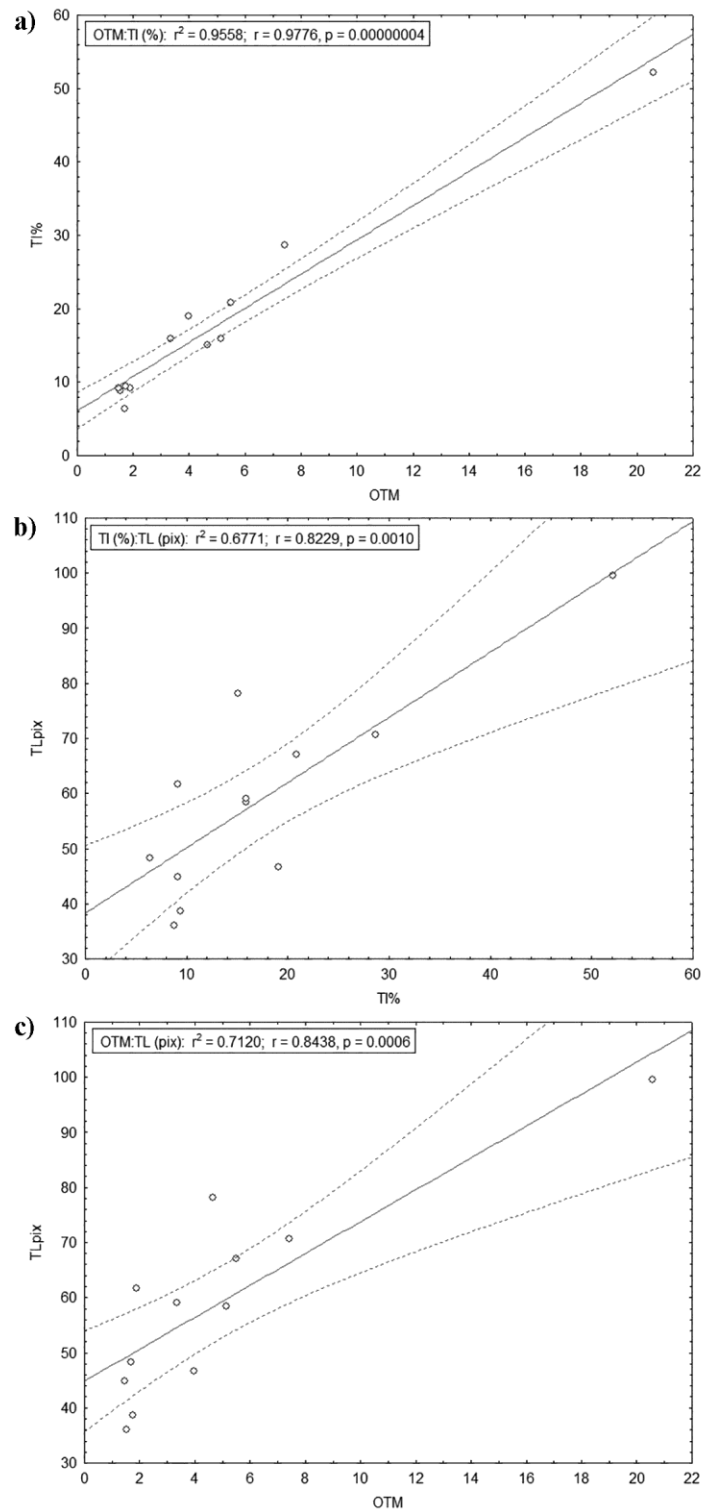
Slika 4.30. Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi, škrge i jetre izražen preko OTM parametra sa statistički značajnim razlikama u DNK oštećenju tri tkiva u okviru svakog meseca (bela slova na dnu stubića) kao i mesečnim razlikama u okviru svakog tkiva (iznad stubića slova u boji za svako tkivo). a, b, c, d- različita slova označavaju statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost \pm SE

Prema TL (pix) parametru takođe su krv i jetra imale najviši nivo DNK oštećenja u avgustu, dok su škrge imale najviši nivo DNK oštećenja u februaru, ali ne statistički značajno viši od DNK oštećenja tokom avgusta. Krv je imala najniže DNK oštećenje u novembru, ali ne značajno različito u odnosu na april, škrge su imale najniže DNK oštećenje u aprilu, a jetra u aprilu i februaru (Slika 4.31) (slova u boji za svako tkivo; različita slova označavaju statistički značajne razlike). U pogledu DNK oštećenja tri tkiva tokom pojedinačnih meseci, TL (pix) parametar je dao iste rezultate kao i druga dva parametra za februar i april, dok prema TL (pix) parametru u avgustu i novembru nije primećena značajna razlika u DNK oštećenju škrge i jetre (Slika 4.31) (bela slova na dnu stubića; različita slova označavaju statistički značajne razlike).



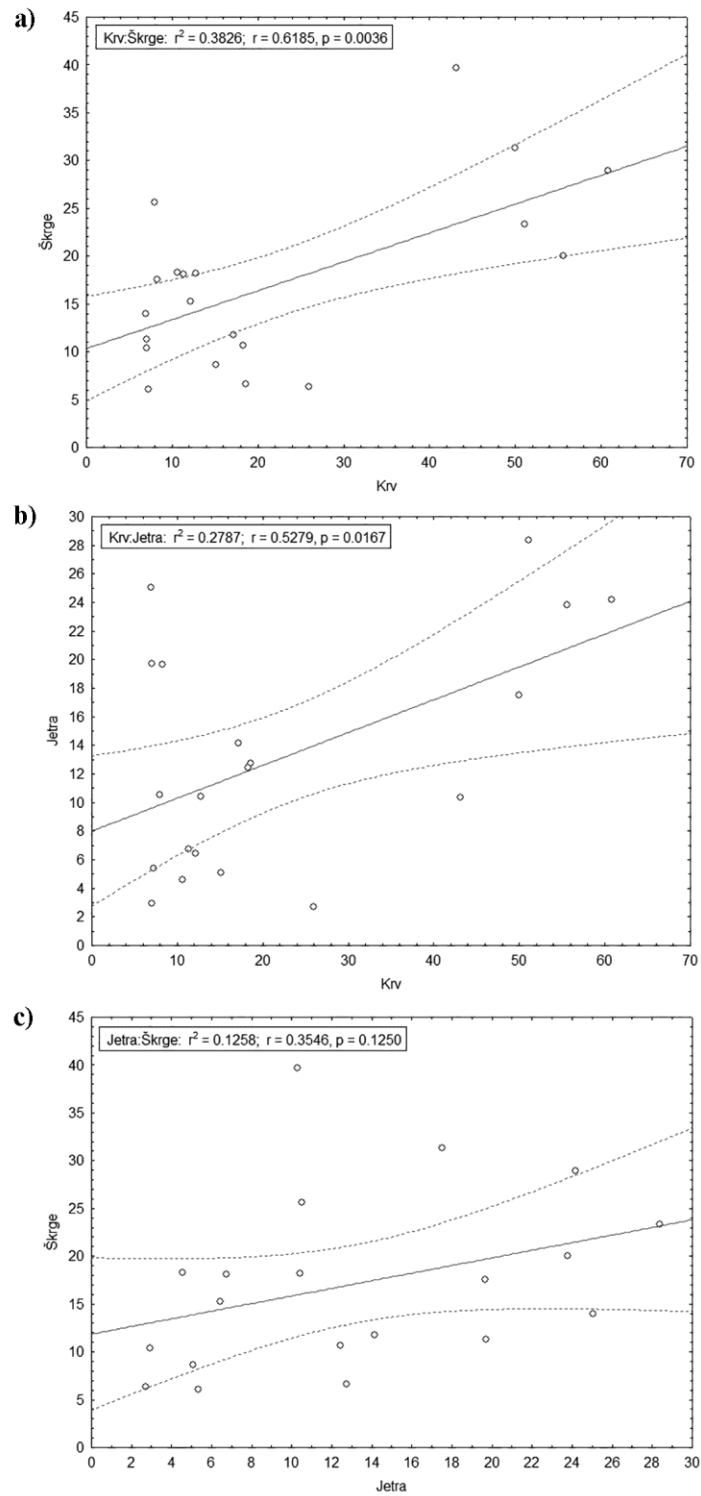
Slika 4.31. Nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi, škrge i jetre izražen preko TL parametra sa statistički značajnim razlikama u DNK oštećenju tri tkiva u okviru svakog meseca (bela slova na dnu stubića) kao i mesečnim razlikama u okviru svakog tkiva (iznad stubića slova u boji za svako tkivo). a, b, c- različita slova označavaju statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost \pm SE

Korelacione analize (Pearson korelacija, $p < 0,05$) pokazale su visoku i značajnu pozitivnu korelaciju između parametara TI (%) i OTM u prikazivanju DNK oštećenja ($r = 0,98$, $p = 0,00000004$) (Slika 4.32 a). Takođe, pokazana je visoka i značajna pozitivna korelacija između parametara TI (%) i TL (pix) ($r = 0,82$, $p = 0,001$) (Slika 4.32 b), kao i između parametara OTM i TL (pix) ($r = 0,84$, $p = 0,0006$) (Slika 4.32 c).



Slika 4.32. Korelacija između parametara TI (%), OTM i TL (pix) pri prikazivanju DNK oštećenja; **(a)** korelacija između parametara TI (%) i OTM; **(b)** korelacija između parametara TL (pix) i TI (%); **(c)** korelacija između parametara TL (pix) i OTM (Pearson korelacija, $p < 0,05$)

Kako bi proverili podudarnost u odgovoru tri tkiva, urađene su korelacione analize (Pearson korelacija, $p < 0,05$) između DNK oštećenja krvi, jetre i škrge izraženog preko parametra TI (%) (Slika 4.33). Primećena je pozitivna i statistički značajna korelacija u DNK oštećenju između krvi i škrge ($r = 0,62$, $p = 0,0036$) (4.33 a) i između krvi i jetre ($r = 0,53$, $p = 0,0167$) (4.33 b), dok između škrge i jetre nije primećena statistički značajna korelacija ($r = 0,35$, $p = 0,1250$) (4.33 c).



Slika 4.33. Korelacija između tkiva u nivou DNK oštećenja izraženog preko parametra TI (%); **(a)** korelacija između krvi i škrge; **(b)** korelacija između krvi i jetre; **(c)** korelacija između jetre i škrge (Pearson korelacija, $p < 0,05$)

4.2.6 Histopatološke promene na jetri i škragama deverike na lokalitetu

Višnjica

Pojedinačne histopatološke promene uočene u jetri i škragama deverika na lokalitetu Višnjica sa učestalošću pojavljivanja (FL %) prikazane su u tabeli 4.13, sa naznačenim značajnim razlikama između različitih meseci. Tokom svih meseci analiza je vršena na po 5 jedinki deverike.

Kod riba na lokalitetu Višnjica, škržni aparat nije bio intenzivno oštećen i većina detektovanih promena je pripadala grupi lako reverzibilnih promena (vrednost histopatološkog indeksa 1). Kao i kod riba na lokalitetu Duboko, promena najvećeg intenziteta u škragama bila je hiperemija koja pripada grupi cirkulatornih, lako reverzibilnih promena, sa srednjim vrednostima višim od 2 tokom aprila, avgusta i novembra, bez značajnih razlika tokom različitih meseci. U novembru je edem škrge imao vrednost od 5,6, značajno više u odnosu na februar.

Od progresivnih promena, proliferacija mukoznih ćelija je bila najvišeg intenziteta, sa vrednostima preko 4 tokom februara i novembra. Intenzitet proliferacije mukoznih ćelija je bio značajno viši tokom februara u odnosu na april i avgust.

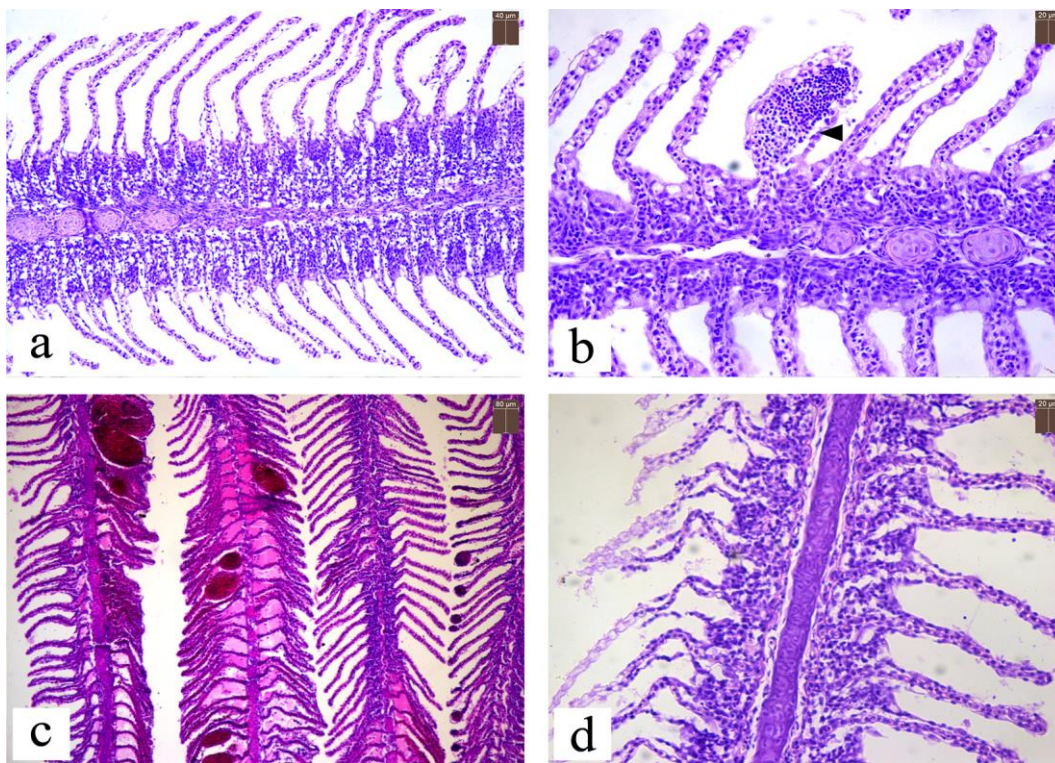
Od regresivnih promena najvišeg intenziteta bili su izdizanje respiratornog epitela sa najvećom srednjom vrednošću 4 tokom aprila, i poremećena arhitektura sa najvećom srednjom vrednošću od 2,4 tokom novembra. Iako se ove promene smatraju blagim one mogu prouzrokovati smetnje u funkciji škrge. Nekroza tkiva, koja predstavlja ireverzibilnu promenu detektovana je samo u jednoj jedinki tokom aprila i jednoj jedinki tokom avgusta.

Neke od histopatoloških promena uočenih u škragama tokom ispitivanja, prikazane su na slici 4.34.

Tabela 4.13. Pojedinačne histopatološke promene (HP) u jetri i škragama deverika sa lokaliteta Višnjica tokom različitih meseci i učestalošću pojavljivanja lezija (FL %)

HP										
	JETRA	(w)	Februar	FL%	April	FL%	Avgust	FL%	Novembar	FL%
IP	Infiltracija leukocita	2	0,8±1,1 ^{ab}	40 %	4,4±1,7 ^a	100 %	0,4±0,9 ^b	20 %	3,2±2,3 ^{ab}	80 %
CP	Staze u krvnim sudovima	1	1,6±0,9 ^a	80 %	3,2±1,1 ^a	100 %	4,0±1,4 ^a	100 %	3,2±1,8 ^a	100 %
	Kongestija sinusoida	1	2,0±1,4 ^a	80 %	3,2±2,3 ^a	80 %	3,2±3,0 ^a	60 %	3,2±2,7 ^a	80 %
PP	Fibroza krvnih sudova	2	0,4±0,9 ^a	20 %	2,4±0,9 ^a	100 %	0,4±0,9 ^a	20 %	2,0±1,4 ^a	80 %
RP	Fokalne promene hepatocita	2	0,4±0,9 ^a	20 %	1,2±2,7 ^a	20 %	0,0±0,0 ^{nt}	NN	2,0±1,4 ^a	80 %
	Vakuolizacija hepatocita	2	3,2±2,3 ^a	80 %	0,4±0,9 ^a	20 %	2,0±2,0 ^a	60 %	0,0±0,0 ^{nt}	NN
	Nekroza	3	0,0±0,0 ^{nt}	NN	1,2±1,1 ^a	60 %	0,0±0,0 ^{nt}	NN	0,8±1,8 ^a	20 %
	Jedra pomerena u stranu	2	1,2±1,1 ^a	60 %	0,0±0,0 ^{nt}	NN	1,2±1,8 ^a	40 %	0,0±0,0 ^{nt}	NN
ŠKRGE			Februar		April		Avgust		Novembar	
CP	Hiperemija	1	1,6±1,7 ^a	60 %	2,8±2,3 ^a	80 %	3,6±0,9 ^a	100 %	3,2±1,8 ^a	100 %
	Edem primarnog epitela	1	1,6±2,6 ^a	40 %	3,2±2,3 ^{ab}	80 %	0,0±0,0 ^{nt}	NN	5,6±0,9 ^b	100 %
PP	Hiperplazija epitelnih ćelija	2	0,3±0,3 ^a	60 %	2,4±1,8 ^a	100 %	1,1±1,0 ^a	60 %	2,0±1,4 ^a	80 %
	Proliferacija mukoznih ćelija	1	4,4±0,9 ^a	100 %	0,8±1,1 ^{bc}	40 %	0,4±0,9 ^c	20 %	4,2±1,8 ^{ab}	100 %
RP	Izdizanje respiratornog epitela	1	2,4±1,7 ^a	80 %	4,0±1,4 ^a	100 %	1,2±1,1 ^a	60 %	2,8±2,3 ^a	80 %
	Poremećena arhitektura	1	1,2±1,8 ^a	40 %	2,0±1,4 ^a	80 %	2,0±1,4 ^a	80 %	2,4±0,9 ^a	100 %
	Mukozne ćelije u sekundarnim lamelama	1	0,0±0,0 ^a	NN	0,0±0,0 ^a	NN	0,4±0,9 ^a	20 %	1,6±2,6 ^a	40 %

* IP- inflamatorne promene, CP- cirkulatorne promene, PP- progresivne promene, RP- regresivne promene; w- faktor značajnosti; FL- frekvencija lezija (%); NN- nije nađeno; vrednosti su predstavljene kao sr. vrednost±SD. ^{a,b,c}- Vrednosti označene drugačijim slovima su značajno različite tokom različitih meseci (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, p < 0,05). ^{nt}- nije testirano, /- nema podataka



Slika 4.34. Histopatološke promene u škrgama: **a.** edem primarnog epitela i proliferacija mukoznih ćelija (HE $\times 200$); **b.** infiltracija leukocita u sekundarnu lamelu (vrh strelice) (HE $\times 400$); **c.** hematomi i telangiektazije (HE $\times 100$); **d.** prisustvo nekroze na jednoj strani škrga (levo) (HE $\times 200$)

Kao i na lokalitetu Duboko, promene najvećeg intenziteta u jetri bile su kongestija sinusoida i staza, koje pripadaju grupi cirkulatornih promena. Obe promene su imale srednje vrednosti veće od 3 tokom aprila, avgusta i novembra, bez značajnih razlika u vrednostima tokom različitih meseci.

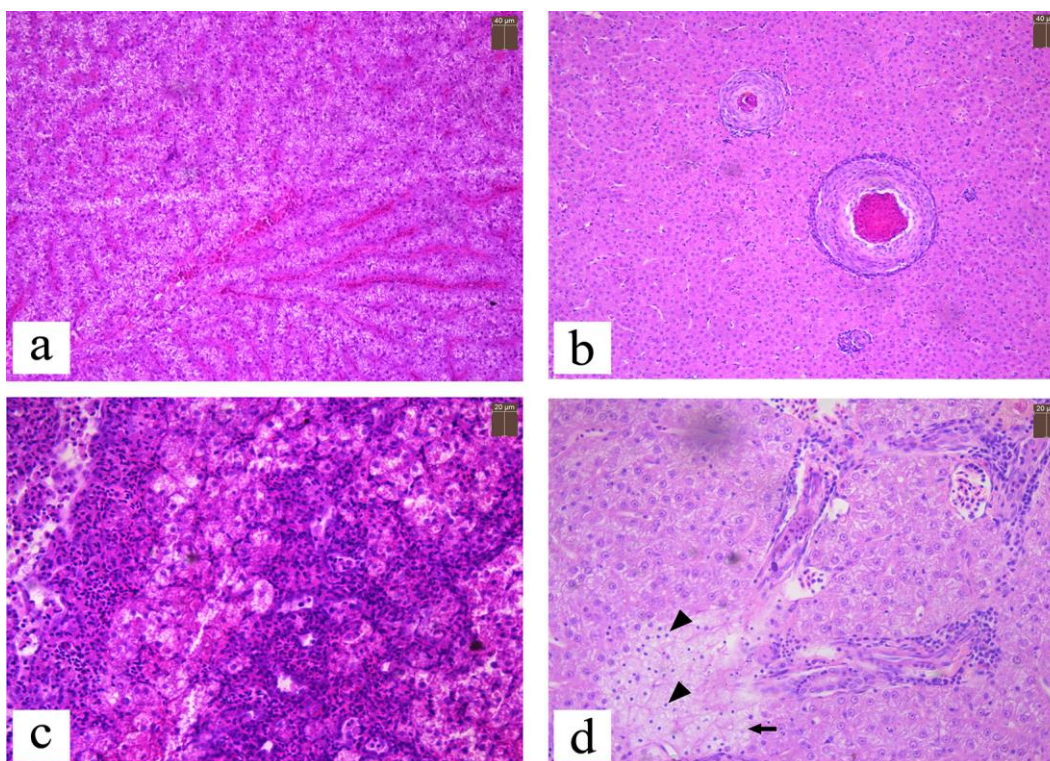
Treća promena po intenzitetu bila je infiltracija leukocita u parenhim jetre, koja pripada grupi inflamatornih promena, sa histopatološkim skorom 4,4 tokom aprila, značajno višim u odnosu na vrednosti detektovane u avgustu.

Od progresivnih promena, detektovana je samo fibroza sa srednjom vrednošću iznad 2 tokom aprila, bez značajnih razlika između različitih meseci.

U okviru regresivnih promena najvećeg intenziteta bila je vakuolizacija hepatocita sa najvišom vrednosti tokom februara, ali bez značajnih razlika između različitih meseci.

Fokalne promene hepatocita, ekscentrična jedra i nekroza imale su srednje vrednosti manje od 2, bez značajnih razlika u vrednostima tokom različitih meseci.

Neke od histopatoloških promena uočeni u jetri, prikazane su na slici 4.35.

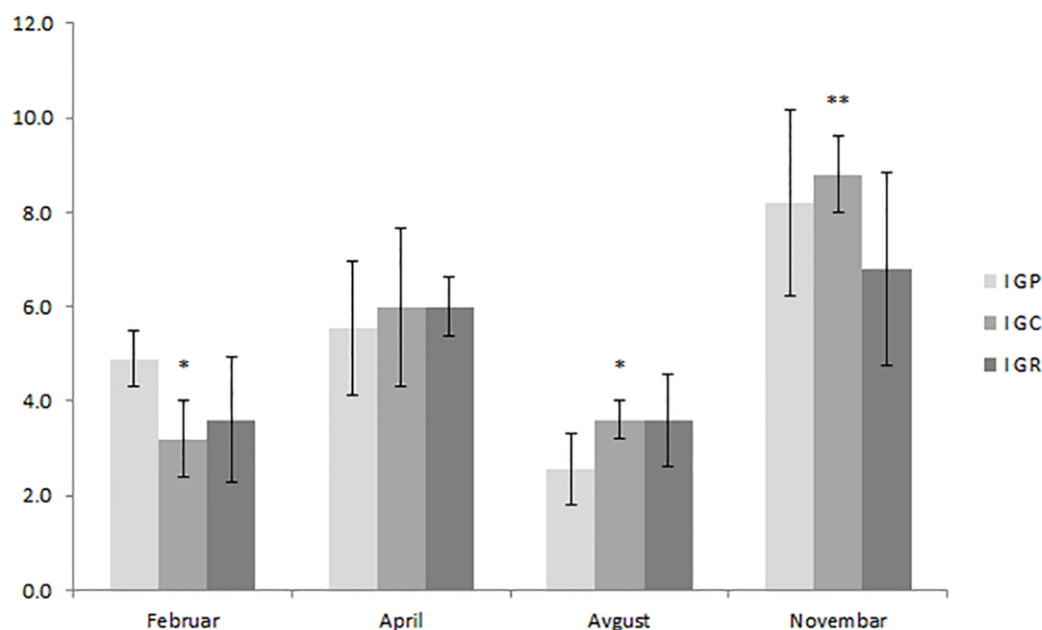


Slika 4.35. Histopatološke promene u jetri: **a.** kongestija sinusoida (HE $\times 200$); **b.** prisustvo granuloma u jetrinom parenhimu (HE $\times 400$); **c.** intenzivna infiltracija leukocita u parenhim jetre (HE $\times 400$); **d.** nekroza jetrinog parenhima (strelica), praćena pojavom piknotičkih jedara (vrh kraćih strelica) (HE $\times 400$)

4.2.6.1 Kategorizacija histopatoloških promena u škragama i jetri na lokalitetu

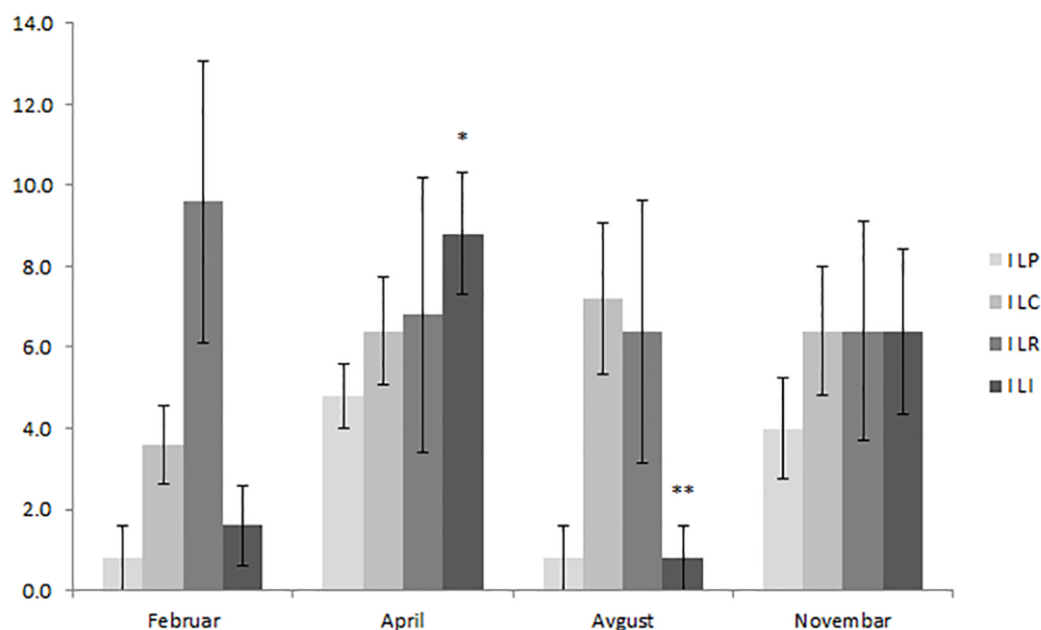
Višnjica

Zabeležene promene u škragama mogle su se kategorisati u tri grupe promena- cirkulatorne (I GC), regresivne (I GR) i progresivne (I GP). Tokom februara i novembra progresivne promene su imale najviše vrednosti, dok su tokom aprila i avgusta cirkulatorne promene imale najviše vrednosti, a progresivne najniže. U okviru cirkulatornih promena primećene su značajno više vrednosti u novembru u odnosu na februar i avgust (Slika 4.36).



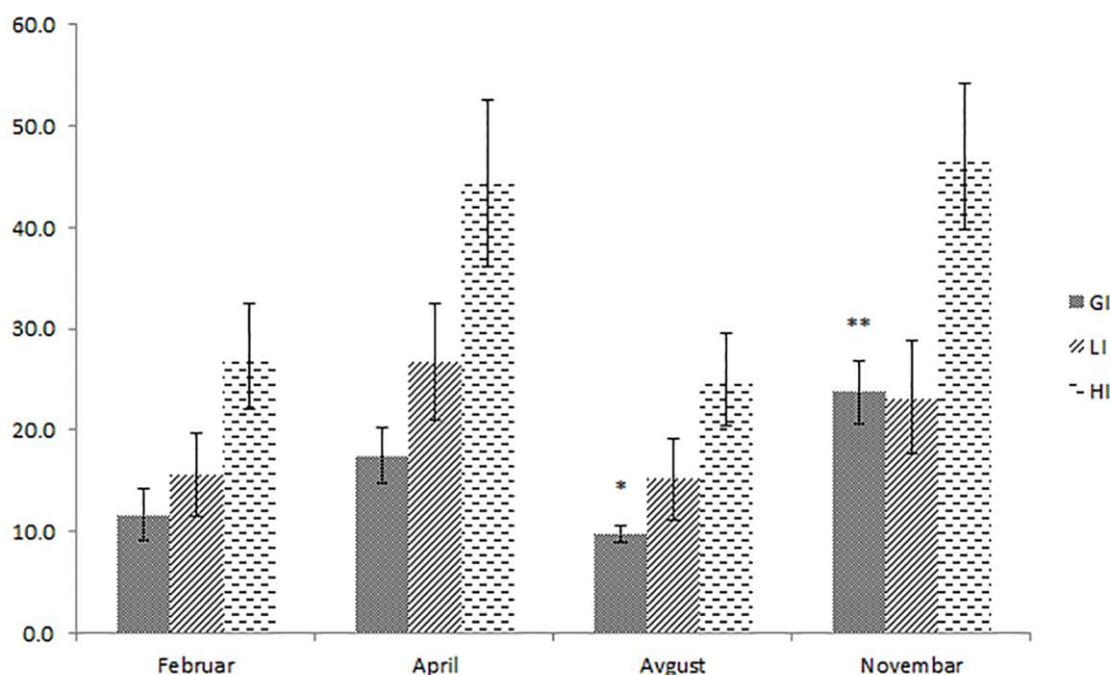
Slika 4.36. Kategorizacija pojedinačnih promena u škragama: progresivne (I GP), cirkulatorne (I GC) i regresivne (I GR) promene. Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost \pm SE. ** Statistički značajne razlike između različitih meseci u okviru cirkulatornih promena (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, $p < 0,05$)

Zabeležene promene u jetri mogle su se kategorisati u četiri grupe promena- cirkulatorne (I LC), regresivne (I LR), progresivne (I LP) i inflamatorne (I LI). U februaru su regresivne promene bile najvišeg intenziteta, u aprilu inflamatorne, u avgustu cirkulatorne, a u novembru su podjednako bile zastupljene cirkulatorne, regresivne i inflamatorne promene. U okviru inflamatornih promena primećene su značajno više vrednosti u aprilu u odnosu na avgust (Slika 4.37).



Slika 4.37. Kategorizacija pojedinačnih promena u jetri: progresivne (I LP), cirkulatorne (I LC), regresivne (I LR) i inflamatorne (I LI) promene. Vrednosti su prikazane kao sr. vrednost \pm SE. *** Statistički značajne razlike između različitih meseci u okviru inflamatornih promena (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, $p < 0,05$)

Na osnovu dobijenih podataka izračunati su histopatološki indeks škrge (GI), histopatološki indeks jetre (LI), kao i ukupni histopatološki indeks (HI). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm st.greška. Generalno, histopatološki indeks jetre pokazao je više vrednosti u odnosu na histopatološki indeks škrge tokom februara, aprila i avgusta. Histopatološki indeks škrge imao je značajno više vrednosti u novembru u odnosu na avgust. Histopatološki indeks jetre imao je najviše vrednosti u aprilu, a najniže u avgustu, bez statistički značajnih razlika u vrednostima tokom različitih meseci. Ukupan histopatološki indeks imao je najviše vrednosti u novembru, a najniže u avgustu, ali bez značajnih razlika među različitim mesecima (Slika 4.38).



Slika 4.38. Histopatološki indeks škrge (GI), jetre (LI) i ukupni histopatološki indeks (HI) predstavljeni kao sr. vrednost \pm SE tokom različitih meseci uzorkovanja. *,** - statistički značajne razlike u okviru histopatološkog indeksa škrge tokom različitih meseci (Kruskal-Wallis test sa Dunn-Bonferroni post hoc metodom, $p < 0,05$)

4.3 Korelacije među praćenim biomarkerima na lokalitetima Duboko i Višnjica

Na oba lokaliteta u okviru škrge uočene su značajne pozitivne korelacije između svih kategorija promena (I GP, I GC i I GR), histopatološkog indeksa škrge (GI) i ukupnog histopatološkog indeksa (HI). Pored toga, na oba lokaliteta uočena je značajna pozitivna korelacija između cirkulatornih (I GC) i regresivnih promena (I GR) u škragama (Tabele 8.3 i 8.5, Prilog).

Na lokalitetu Višnjica, primećena je značajna pozitivna korelacija između histopatološkog indeksa škrge (GI) i regresivnih promena u škragama (I GR) sa histopatološkim indeksom jetre (LI). Dodatno, primećena je značajna negativna korelacija progresivnih promena (I GP) i GI sa nivoom DNK oštećenja u škragama. Pokazana je značajna negativna korelacija između koncentracija Cu i Fe sa I GC, kao i pozitivna

značajna korelacija između koncentracije Sr i I GP. Primećen je veliki broj značajnih korelacija među metalima u škragama na lokalitetu Višnjica. Al je korelisao sa Cr, Cu, Fe, Mo, Sr i Zn. Ba je korelisao sa Cr, Cu, Fe, Mn, Sr i Zn. Cr je korelisao sa Cu, Fe, Mn, Mo, Sr i Zn. Cu je korelisao sa Fe, Mn i Zn, Fe je korelisao sa Mn, Mo, Sr i Zn, Sr je korelisao sa Mn, Mo i Zn, a Zn je korelisao sa Mn i Mo (Tabela 8.5, Prilog).

Na lokalitetu Duboko, primećena je značajna pozitivna korelacija koncentracija Al sa progresivnim promenama u škragama (I GP), kao i značajna pozitivna korelacija Zn sa nivoom DNK oštećenja u škragama. Pokazane su značajne pozitivne korelacije među koncentracijama ispitivanih elemenata u škragama. Al je korelisao sa Cr, Fe i Mo, Ba sa Cu i Mn, Cr sa Fe, Mo sa Cr, Fe, Mn i Zn, a Zn sa Sr i Mn (Tabela 8.3, Prilog).

U okviru jetre, na oba lokaliteta, uočene su značajne pozitivne korelacije između svih kategorija promena (I LP, I LC, I LR i I LI), histopatološkog indeksa jetre (LI) i ukupnog histopatološkog indeksa (HI). Dodatno, na oba lokaliteta pokazana je pozitivna značajna korelacija između inflamatornih (I LI) i progresivnih promena (I LP) u jetri (Tabele 8.4 i 8.6, Prilog).

Na lokalitetu Višnjica, pokazana je značajna pozitivna korelacija između cirkulatornih promena (I LC) i nivoa DNK oštećenja u jetri. Pokazana je značajna pozitivna korelacija između inflamatornih promena (I LI) i koncentracije Fe u jetri. Takođe, primećene su značajne pozitivne korelacije Mo sa Co, Fe i Mn, Zn sa Cr i Cu, Fe sa Co, i Cr sa Mn (Tabela 8.6, Prilog).

Na lokalitetu Duboko pokazana je značajna negativna korelacija između cirkulatornih i regresivnih promena u jetri. Takođe, pokazana je visoka značajna negativna korelacija između koncentracija Mo i histopatološkog indeksa jetre, regresivnih promena i nivoa DNK oštećenja u jetri. Dodatno, uočene su značajne pozitivne korelacije Al sa Cu, Cr sa Mn i Zn, kao i Sr sa Cu i Mn (Tabela 8.4, Prilog).

5 | DISKUSIJA

5 DISKUSIJA

U ovoj studiji, određivanje kvaliteta površinske vode vršeno je na Savi na lokalitetu Duboko i na Dunavu na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine, kako bi se procenilo variranje kvaliteta vode tokom različitih sezona. Kvalitet vode tokom različitih sezona procenjen je praćenjem fizičko-hemijskih, hemijskih, mikrobioloških parametara, analize metala i metaloida u tkivima riba i odgovora biomarkera riba - DNK oštećenje u ćelijama i histopatološke analize tkiva. Procena variranja nivoa zagađenja u rekama tokom različitih sezona daje realne informacije o ulasku prirodnih i antropogenih zagađivača iz tačkastih i difuznih izvora zagađenja (Ouyang et al., 2006). Usled velikog broja različitih zagađivača u slatkovodnim ekosistemima na izloženim organizmima mogu se uočiti različiti štetni efekti. Stoga, biomonitoring zahteva primenu više biomarkera kako bi se procenile promene na različitim nivoima biološke organizacije. Kada se ovi efekti ispituju *in situ*, dobija se informacija koja reflektuje združeni uticaj svih prisutnih zagađivača i prirodnih fenomena na akvatične ekosisteme (Azevedo et al., 2013).

Lokalitet Duboko je odabran usled izloženosti različitim i brojnim izvorima zagađenja kao što su intenzivna poljoprivredna aktivnost, najveće termoelektrane u Srbiji “Nikola Tesla” A i B sa pepelištima i ušće Kolubare koja je pored netretiranih otpadnih voda Obrenovca izložena i zagađenju poreklom od rudarskog basena “Kolubara”. Poljoprivredni, industrijski i urbani izvori zagađenja označeni su kao glavni izvori ulaska hemikalija i organskih materija u akvatične ekosisteme (Ouyang et al., 2006). Brojne agencije za zaštitu životne sredine označile su otpadne vode rudarstva i spiranje poljoprivrednih površina kao jedne od najvećih pretnji za slatkovodne ekosisteme. Otpadne vode rudarstva unose visoke koncentracije metala u vodu, dok su poljoprivredne aktivnosti izvor zagađenja metalima i različitim organskim zagađivačima (Barišić et al., 2015). Istraživanje na lokalitetu Duboko započeto je u januaru 2014. godine, sa ciljem praćenja sezonskog variranja kvaliteta vode. Sredinom maja 2014. godine usled nepovoljnih hidroloških uslova došlo je do obimnih poplava (stogodišnje poplave) na ispitivanom lokalitetu, kada je upravo teritorija Obrenovca bila najviše pogođena. Ovaj katastrofalni događaj, dao nam je priliku da pored sezonskog variranja, ispitamo i uticaj ovog važnog

prirodnog fenomena na stanje parametara u akvatičnim ekosistemima, koncentraciju metala i metaloida u tkivima riba i odgovor biomarkera riba. Stoga, na lokalitetu Duboko vršena je procena združenog uticaja više antropogenih izvora zagađenja tokom različitih sezona i poplava na praćene parametre i odgovor biomarkera u jedinkama visoko srodnih vrsta deverike, krupatice i crnooke deverike.

Lokalitet Višnjica na reci Dunav odabran je usled izloženosti ispustu najvećeg gradskog kolektora koji sakuplja otpadne vode sa čitave teritorije Beograda. Ovaj lokalitet je identifikovan kao jedno od žarišta fekalnog zagađenja u srpskom delu toka Dunava (Kirschner et al., 2014). Prema White & Rasmussen (1998) gradske otpadne vode predstavljaju složene smeše otpadnih voda domaćinstava i industrije sa visokim genotoksičnim potencijalom. Na lokalitetu Višnjica, vršena je procena uticaja netretiranih gradskih otpadnih voda na praćene parametre i odgovor biomarkera u jedinkama deverike tokom različitih sezona.

5.1 Analiza kvaliteta vode reka Save i Dunava

5.1.1 Procena fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na lokalitetima Duboko i Višnjica

Na lokalitetu Duboko tokom čitavog perioda uzorkovanja pH vrednost vode bila je blago alkalna, sa vrednostima iznad 8,5 tokom marta, krajem juna i u julu kada je voda pripadala IV-V kategoriji. Na lokalitetu Višnjica pH vrednost vode takođe je bila blago alkalna, sa vrednostima ispod 8,5 tokom većine meseci, izuzev u januaru, februaru i martu, kada su vrednosti iznad pH 9 ukazale na V klasu kvaliteta. Vrednosti iznad pH 8 mogu predstavljati stres za ribe jer pod određenim uslovima i u kombinaciji sa drugim stresorima, kao što je amonijak, mogu izazvati povećanje O₂ difuzione distance u škragama (Lease et al., 2003). Najviše temperature vode, kao i najniže koncentracije kiseonika na oba lokaliteta zabeležene su u avgustu. Prema koncentraciji O₂ u avgustu, na lokalitetu Duboko voda je pripadala III klasi, a na lokalitetu Višnjica IV klasi. Elektroprovodljivost je na lokalitetu

Duboko varirala od 338-439 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a na lokalitetu Višnjica od 345-452 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Prema studiji Camargo & Martinez (2007) elektroprovodljivost iznad 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ može biti znak narušenog kvaliteta vode. Tokom većeg broja meseci na lokalitetu Višnjica su uočene više koncentracije NO_2 , NO_3^- , NH_4^+ i PO_4^{3-} , u odnosu na lokalitet Duboko. Koncentracije NO_3^- su generalno najviše tokom kasne zime i proleća, smanjuju se tokom leta, a ponovo se povećavaju tokom jeseni i rane zime (Laznik et al., 1999), što je u skladu sa sezonskim promenama rasta biljaka. Kako je primena neorganskih đubriva (obično amonijum nitrata) veoma česta, prisustvo NO_3^- na lokalitetima može biti znak spiranja poljoprivrednih zemljišta. Poljoprivredne aktivnosti takođe mogu uticati na visoke nivoe NH_4^+ u vodi, ali ovaj zagađivač može nastati i kao proizvod razgradnje azotnih organskih jedinjenja kao što su proteini i urea, koji se obimno nalaze u gradskim otpadnim vodama (Vega et al., 1998). Na oba lokaliteta najviše koncentracije PO_4^{3-} uočene su tokom leta i jeseni. Visoke koncentracije PO_4^{3-} mogu biti poreklom od ispusta gradskih otpadnih voda jer su fosfati važna komponenta deterdženata (Vega et al., 1998). Carpenter et al. (1998) označili su poljoprivredne i urbane aktivnosti kao glavne izvore fosfora i azota u akvatičnim ekosistemima. Visoke koncentracije fosfata u vodi tokom jeseni mogu se pripisati poljoprivrednim aktivnostima i većoj količini padavina tokom ove sezone (Kolarević et al., 2012). Povišene koncentracije PO_4^{3-} tokom leta mogu biti uzrokovane sporijim tokom reke u ovoj sezoni (Laznik et al., 1999), ali i njegovim povećanim oslobađanjem iz sedimenta u uslovima hipoksije i anoksije (Paerl et al., 1998).

Variranje koncentracija rastvorenih metala i metaloida u vodi može biti rezultat nekoliko prirodnih i antropogenih faktora. Ispuštanje otpadnih voda i spiranje zemljišta mogu dovesti do povećanja koncentracija ukupnih metala u vodi, dok promene fizičko-hemijskih parametara deluju na stanje i redistribuciju metala u vodi (Dragun et al., 2009). Pri analizi podataka dobijenih od Agencije za zaštitu životne sredine na oba lokaliteta (Ostružnica na Savi i Vinča na Dunavu) tokom 2014. godine primećene su najviše koncentracije rastvorenog Fe i Al tokom januara, rastvorenog As u julu, ukupnog As i rastvorenog Cr u avgustu, kao i najviše koncentracije ukupnog Zn i rastvorenog Zn i Cu u oktobru. Povećane koncentracije Zn i Cu u vodi na reci Savi tokom jeseni uočene su i u studiji Vuković et al. (2011).

Na reci Savi, na mernoj stanici Ostružnica, najviše koncentracije većine elemenata zabeležene su u periodu maj/jun i tokom leta u avgustu. U maju/junu zabeležene su najviše koncentracije ukupnog Mn, Pb, Cd i Co, rastvorenog Pb, Cd i Co, kao i svih pesticida u vodi. Povećane koncentracije Pb, Cd i pesticida mogu biti prisutne u rekama nakon poplava (Albering et al., 1999). Pored toga, pri sagorevanju lignita u površinskom sloju pepelišta termoelektrana mogu se naći visoke koncentracije ovih elemenata (Baba, 2000; Pavlović et al., 2004; Sushil & Batra, 2006). Upravo, visoke koncentracije ovih elemenata uočene su u zemljištu u neposrednoj blizini pepelišta termoelektrana "Nikola Tesla" A i B (Ćujić et al., 2016). Moguće je da su povećane koncentracije ovih elemenata dospele u vodu tokom poplava, spiranjem okolnog zemljišta i pepelišta. Povišene koncentracije metala u vodi tokom leta mogu se pripisati većem uticaju otpadnih voda tokom sušnih sezona i povećanom zalivanju poljoprivrednih useva, što može uneti u vodu jedinjenja koja sadrže ove elemente (Tuna et al., 2007).

Generalno, na Dunavu, na mernoj stanici Vinča, zabeležene su više koncentracije većine elemenata u odnosu na Savu (Ostružnica) (Tabela 8.7, Prilog). Gradske otpadne vode su glavni izvor metala kao što su Cd, Cu, Cr, Mn, Ni, Zn i Pb, posebno u velikim gradovima gde intenzivne industrijske aktivnosti izostaju, kao što je slučaj sa Beogradom (Davis & Jacknow, 1975; Sörme & Lagerkvist, 2002; Tuna et al., 2007). Na Dunavu (Vinča) u martu su zabeležene najviše koncentracije većine elemenata- ukupnog Fe, Mn, Cr, Pb, Cd, Al i Co. U izveštajima Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije o havarijskom zagađenju nađen je podatak da se 29.01.2014. godine u Dunavu kod Vinče prevrnula barža natovarena piritom (Fe_2S). Analize sadržaja elemenata u prirodnom piritu često pokazuju da on sadrži značajne količine teških metala (Schoonen, 2004). Pored toga, pokazano je da sulfidni minerali i pirit mogu sadržati elemente kao što su Mn, Cr, Pb, Cd, Al i Co (Huerta-Diaz & Morse, 1990; Dorronsoro et al., 2002). U martu je zabeležena koncentracija Fe u vodi od 1797 mg/L po čemu se voda mogla svrstati u III-IV klasu zagađenja prema Uredbi o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje („Službeni glasnik RS” br. 50/12). U poređenju koncentracija ovih elemenata na drugim mernim stanicama Agencije na Dunavu tokom marta, kao što su Zemun i Smederevo, uočene su znatno niže

vrednosti. Stoga, može se zaključiti da povećane koncentracije ovih elemenata u Dunavu kod Vinče najverovatnije nisu uzrok prirodnih faktora već pomenute havarije.

Na oba lokaliteta uočene su najviše koncentracije pesticida terbutilazina, desetilterbutilazina i metolahlora tokom juna (Dunav), odnosno maja/juna (Sava). Jedan od najčešće korišćenih dvokomponentnih pesticida, Gardoprim plus gold 500 SC, predstavlja kombinaciju upravo metolahlora i terbutilazina (Iordache & Borza, 2011). Koncentracije ovih zagađivača bile su gotovo duplo veće na Savi, u poređenju sa Dunavom. Ovo se može objasniti većom blizinom poljoprivrednih površina i poplavama koje su se desile na ovom području, ali i većim kapacitetom reke Dunav u odnosu na Savu, usled čega dolazi do razblaženja (Loos et al., 2010). Pored toga, povećane koncentracije fluorantena, atrazina i acetohlorla zabeležene su na Dunavu u aprilu. Povećane koncentracije pesticida u vodi očekuju se u periodu njihove primene, tj. od aprila do jula (Vrana et al., 2015).

5.1.2 Procena mikrobioloških indikatora fekalnog i organskog zagađenja na lokalitetima Duboko i Višnjica

Mikrobiološke analize fekalnog zagađenja na lokalitetu Duboko obuhvatile su praćenje ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i enterokoka primenom metode membranske filtracije i inkubacije na selektivnim podlogama. Na lokalitetu Višnjica analiza fekalnog zagađenja obuhvatila je praćenje ukupnih koliforma, *E. coli* i enterokoka primenom enzimskih metoda. Enzimske metode smatraju se ekvivalentnim ili boljim od metode membranske filtracije u pogledu osetljivosti i specifičnosti (Eckner, 1998). Pored toga, na oba lokaliteta praćeno je prisustvo *C. perfringens* primenom metode membranske filtracije i inkubacije na TSC podlozi.

Generalno, više koncentracije svih indikatorskih mikroorganizama fekalnog zagađenja i lošiji kvalitet vode zabeleženi su na lokalitetu Višnjica što ukazuje da je on izložen većem pritisku netretiranih gradskih otpadnih voda. U našoj studiji (Kostić et al., 2016) na lokalitetu Višnjica koncentracije NO_2 , NO_3^- , NH_4^+ imale su sličan trend kao i indikatori fekalnog zagađenja, što je potvrdilo da je najveći pritisak zagađenja na ovom lokalitetu povezan sa prilivom netretiranih gradskih otpadnih voda.

Na lokalitetu Višnjica najniže koncentracije svih indikatorskih mikroorganizama fekalnog zagađenja zabeležene su u maju. Posebno je interesantno napomenuti da smo pri praćenju koncentracija *E. coli* na lokalitetu Duboko enzimskom metodom takođe uočili najmanje količine početkom juna (09.06.2014.) (uzorkovanje na Višnjici bilo je krajem maja 30.05.2014.) (Aborgiba et al., 2016). Najniže koncentracije *E. coli* na oba lokaliteta početkom juna/u maju mogu se objasniti evakuacijom stanovništva sa područja Obrenovca tokom poplava, kada je uticaj fekalnog zagađenja putem gradskih otpadnih voda bio gotovo potpuno isključen. Ovde je pokazana veća preciznost *E. coli* kao indikatora fekalnog zagađenja u odnosu na grupu fekalnih (termotolerantnih) koliforma kojoj pored *E. coli* pripadaju i vrste rodova *Klebsiella*, *Citrobacter* i *Enterobacter*, od kojih nisu sve fekalnog porekla. Zbog ovoga je čak predloženo da naziv fekalni koliformi nije odgovarajući, već da bi trebalo samo koristiti termin „termotolerantni“ koliformi (Alonso et al., 1999; Hachich et al., 2012).

Sezonsko variranje obima i tipa fekalnog zagađenja, ekološki uslovi koji utiču na preživljavanje fekalnih bakterija i hidrološki uslovi koji utiču na remobilizaciju ovih bakterija su faktori koji mogu doprineti variranju količine fekalnih indikatora i patogena tokom različitih sezona (Wilkes et al., 2009). Ukoliko se izuzme maj, kao mesec kada su se dogodile poplave, u našoj studiji zabeležene su niže koncentracije ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i *E. coli* tokom hladnijih meseci, što je uočeno u mnogim studijama (Canale et al., 1973; Barcina et al., 1986; Bagde & Rangari, 1999). Pored toga, velike količine padavina i ubrzan tok reke mogu uzrokovati pomeranje sedimenta i oslobađanje veće količine fekalnih bakterija u vodeni stub (Obiri-Danso & Jones, 1999), čime se mogu objasniti najviše koncentracije svih indikatorskih mikroorganizama fekalnog zagađenja na Višnjici tokom marta i aprila.

Procena organskog zagađenja na lokalitetima Duboko i Višnjica obuhvatila je praćenje koncentracija heterotrofa, oligotrofa i fosfatazne aktivnosti vode. Tokom većine meseci uočene su više koncentracije heterotrofnih i oligotrofnih bakterija na lokalitetu Višnjica, u odnosu na lokalitet Duboko. Na lokalitetu Duboko uočena je dominacija heterotrofa tokom februara, marta i jula, a oligotrofa tokom ostalih meseci. Na lokalitetu Višnjica uočen je sličan obrazac variranja između heterotrofa i oligotrofa, s tim što su od

januara do avgusta heterotrofi imali veću brojnost, a od avgusta do decembra oligotrofi.

Tokom većine meseci primećene su više vrednosti indeksa fosfatne aktivnosti (IFA) na lokalitetu Višnjica u odnosu na lokalitet Duboko. Najniže vrednosti IFA na lokalitetu Višnjica zabeležene su u januaru, a najviše u aprilu, kada su zabeležene i najviše koncentracije enterokoka i *C. perfringens*. Najniže vrednosti IFA na lokalitetu Duboko zabeležene su takođe u januaru, a najviše u avgustu. U avgustu su zabeležene najviše koncentracije fosfata u vodi i najniže koncentracije kiseonika, što može ukazati na proces razgradnje organske materije (Paerl et al., 1998).

Ovi rezultati pokazuju da je lokalitet Višnjica pod većim pritiskom organskog opterećenja u odnosu na lokalitet Duboko. Organsko zagađenje u rekama može biti poreklom od fekalnog otpada, razlaganja hranljivih materija, organskih đubriva koja se koriste u poljoprivredi, cvetanja algi i antropogenih aktivnosti (Kolarević et al., 2011).

5.2 Analiza koncentracija metala i metaloida u jetri, škragama, gonadama i mišiću riba na lokalitetima Duboko i Višnjica

Koncentracije metala i metaloida u tkivima riba mogu se posmatrati kao biomarker izlaganja datim elementima. U našoj studiji koncentracija metala i metaloida određena je u jetri, škragama, gonadama i mišiću odabranih vrsta, primenom metode induktivno spregnute plazme-optičko emisione spektroskopije (ICP-OES) i izražena je u $\mu\text{g/g}$ suve mase tkiva.

Prema indeksu zagađenja metalima (MPI) na oba lokaliteta pokazano je da su škrge organ koji je kvantitativno i kvalitativno pod najvećim pritiskom metala i metaloida iz životne sredine. Usled bentosnog načina života ribe koje se hrane na dnu konstantno pomeraju sediment koji često služi kao rezervoar mnogih toksičnih metala (Salem et al., 2014). Stoga, nije iznenađujuće što su u našoj studiji škrge bile tkivo sa najvišim koncentracijama većine analiziranih elemenata. Škrge su glavni organ za regulaciju jona. Brojni neesencijalni i toksični metali mogu putem “jonske mimikrije” i aktivnog transporta dospeti u organizam riba preko škrge (Wood, 2011). Pored toga, najviša koncentracija elemenata u škragama ukazuje da bi voda mogla biti glavni izvor zagađenja (Kraal et al., 1995).

Prema koncentracijama elemenata u četiri analizirana tkiva i vrednostima MPI može se zaključiti da su ribe na lokalitetu Duboko pod većim pritiskom zagađenja metalima i metaloidima. Ovo naizgled nije u saglasnosti sa prethodno pomenutim rezultatima da su na Dunavu, na mernoj stanici Vinča izmerene više koncentracije većine elemenata, u poređenju sa mernom stanicom Ostružnica na Savi. Ovakvi kontradiktorni rezultati ukazuju da na lokalitetu Duboko voda ipak nije bila glavni izvor unosa metala u organizam riba, već najverovatnije sediment (Jeziarska & Witeska, 2006). Najviše koncentracije analiziranih elemenata u škragama, jetri i mišiću zabeležene su upravo početkom juna, što se može pripisati uticaju poplava na pomeranje sedimenta i oslobađanje metala i drugih zagađivača.

Generalno, uočeno je više značajnih razlika među tkivima u akumulaciji određenih metala, nego razlika tokom različitih meseci u pojedinačnim tkivima. Na oba lokaliteta pokazana je specifičnost škrge u akumuliranju Al, Ba, Cr, Mn, Mo i Sr, kao i jetre u akumuliranju Cu, Pb i As koji je detektovan samo u jetri riba na lokalitetu Duboko. Jetra i škrge su akumulirale relativno visoke koncentracije Fe. Relativno visoke koncentracije Zn akumulirala su sva četiri tkiva, posebno jetra, škrge i gonade. Generalno, akumulacija esencijalnih metala kao što su Fe, Zn, Cu, Mn i Co je tkivno specifična. Tako će se Cu čak i pri niskim koncentracijama u životnoj sredini akumulirati u jetri, a Zn u gonadama, jer tu ispoljavaju svoje metaboličke funkcije. Kada postoji zagađenje metalima, oni će se akumulirati u ovim organima i potencijalno indukovati toksične efekte (Jeziarska & Witeska, 2006). Poklapanje u akumulaciji ovako velikog broja elemenata na dva lokaliteta ističe fiziološku i ekološku sličnost ispitivanih vrsta. Studija Lenhardt et al. (2012) takođe je pokazala visoku sličnost deverike i krupatice u pogledu akumulacije metala i metaloida. Mnoge studije su pokazale sličan afinitet škrge i jetre prema akumulaciji pomenutih elemenata (Višnjic-Jeftić et al., 2010; Lenhardt et al., 2012; Sunjog et al., 2012; Subotić et al., 2013). Interesantno je da je u ovim studijama, jetra označena kao glavni organ za akumulaciju Mo, dok su u našoj studiji najviše koncentracije Mo primećene u škragama. Nivo akumulacije Mo u škragama oslikava nivo koncentracije Mo u vodi, što je pokazano u škragama nekoliko vrsta riba u studiji Regoli et al. (2012). Važan antropogeni izvor Mo u akvatičnim ekosistemima može biti spiranje poljoprivrednih površina koje mogu sadržati visoke koncentracije đubriva na bazi molibdena (McNeely et al., 1979). U studiji Farkas et

al. (2000) u tri vrste riba Cu je imao najvišu stopu akumulacije u jetri, u poređenju sa škrigama i mišićem, bez značajnog sezonskog variranja, što je u skladu sa našim rezultatima. Visoki nivoi Cu i Zn u jetri mogu se objasniti njihovom povezanošću sa proteinima male molekulske mase (metalotioneini) koji se koncentrišu u jetri sa ulogom u održavanju balansa ovih esencijalnih metala (Hamilton & Mehrle, 1986). Pored uloge u regulaciji esencijalnih metala, metalotioneini učestvuju u detoksikaciji ovih i drugih neesencijalnih metala. Kako su metali poznati induceri oksidativnog stresa u akvatičnim organizmima, vezivanjem za metalotioneine sprečava se nastanak oksidativnog oštećenja od strane metala (Sevcikova et al., 2011). Takođe, proteini u jetri kao što su hemokuprein i hepatokuprein, kao i nekoliko oksidativnih enzima, zahtevaju Cu kao važnu komponentu za njihovo funkcionisanje (Avenant-Oldewage, 2000). Bogata snadbevenost jetre krvlju može biti uzrok viših koncentracija Fe u jetri (Omar et al., 2013). Mnoge studije su pokazale da je jetra glavno mesto akumulacije As (Sorensen et al., 1979; Farombi et al., 2007; Jarić et al., 2011). U našoj studiji As je detektovan samo u jetri riba na lokalitetu Duboko, dok je na Višnjici detektovan u jednoj jedinki u februaru i dve jedinke u aprilu. Prema Bhattacharya & Bhattacharya (2007) As ima potencijal da indukuje oksidativni stres u jetri riba i izmeni hematološke parametre. Sorensen et al. (1980) pokazali su pozitivnu korelaciju između nivoa akumuliranog As u jetri ribe sunčice (*Lepomis cyanellus*) i nivoa histopatološkog oštećenja u ovom tkivu. Olovo je označeno kao čest toksičan metal u životnoj sredini koji dospeva iz izvora kao što su gradske i industrijske otpadne vode i spiranje poljoprivrednih površina (Olojo et al, 2005). Takođe, studija Vinodhini & Narayanan (2008) pokazala je afinitet Pb u akumulaciji u jetri riba.

Gonade su pokazale afinitet prema akumuliranju As, Pb i Co koji je detektovan samo na Višnjici. Alhashemi et al. (2012) uočili su akumuliranje Pb i Co u gonadama dve vrste riba i istakli potencijal ovih elemenata da deluju na reproduktivni status riba, dok je studija Yamaguchi et al. (2007) pokazala potencijalni inhibitorni efekat As i Pb na spermatogenezu soma.

Generalno, u našoj studiji pokazana je relativno niža akumulacija elemenata u mišiću riba nego u drugim tkivima. To se može objasniti činjenicom da mišić nije u direktnom kontaktu sa metalima i metaloidima iz vode kako je zaštićen kožom koja je

keratinizovana i poseduje sloj sluzi, a nije ni aktivno mesto za detoksifikaciju, pa je transport metala iz drugih tkiva u mišić relativno slab (Alhashemi et al., 2012).

Na lokalitetu Duboko, u jetri riba nije uočeno značajno variranje koncentracija elemenata tokom različitih meseci. U škragama su Al i Cr imali značajno više koncentracije početkom juna u poređenju sa ostalim mesecima. Povećane koncentracije ovih toksičnih metala početkom juna mogu biti u vezi sa poplavama i unosom zagađivača sa okolnih površina i iz sedimenta (Kostić et al., 2017). U gonadama su uočene značajno više koncentracije Sr u februaru u odnosu na početak juna i jul. U mišiću su uočene značajno niže koncentracije Mn i Sr u februaru u odnosu na avgust. Prema Regoli et al. (1998) očekivano je da će koncentracija metala u tkivima varirati tokom različitih sezona, usled promena u ulasku zagađenja i metabolizmu organizama. Sa povećanjem temperature povećava se stopa metabolizma, ishrane i aktivnost riba što može rezultovati u povećanom unosu i akumulaciji metala (Salem et al., 2014).

Na lokalitetu Višnjica, značajne razlike u koncentracijama elemenata tokom različitih meseci uočene su samo u škragama, kao i na lokalitetu Duboko. U škragama su primećene značajno više koncentracije Al, Cu i Fe u februaru u odnosu na novembar. U februaru su primećene i povećane koncentracije ukupnog i rastvorenog Al i Fe u vodi na mernoj stanici Vinča, u odnosu na Bezdán. Ovo se može pripisati havariji koja se desila kod Vinče krajem januara 2014. godine, kada su velike količine pirita dospele u Dunav. Izlaganje visokim nivoima Fe može indukovati povećanu ekskreciju mukusa na škragama, koja će povećati difuzionu distancu i smanjiti sposobnost škrge da usvajaju O₂ i oslobađaju CO₂. Pokazano je da su škrge i mukus glavna mesta apsorpcije Al iz vode (Handy & Eddy, 1989). Takođe, iako je Cu esencijalan element, u prekomernim koncentracijama može indukovati strukturno oštećenje škrge, promene u fiziologiji, osmoregulaciji i respiraciji (Salem et al., 2014). Štaviše, u škragama su u februaru detektovane najviše vrednosti proliferacije mukoznih ćelija. Generalno, više koncentracije metala primećene su u proleće i leto, u odnosu na jesen i zimu. Povećanje nivoa metala tokom ovih sezona može se pripisati povećanoj fiziološkoj aktivnosti riba tokom ovih sezona, što je izazvano prvenstveno povećanjem temperature vode (Canpolat & Çalta, 2003).

U ekološkim ispitivanjima, akumulacija metala i metaloida u mišiću je od velikog interesa jer se on koristi u ishrani ljudi (Lenhardt et al., 2012; Salem et al., 2014). Kako bi poredili podatke dobijene u ovoj studiji sa propisanim MDK metala u mišiću, prema Nacionalnoj regulativi i regulativi EU, sve koncentracije metala za koje su propisane MDK (Pb, As, Cu, Fe i Zn) u mišiću transformisane su iz suve u vlažnu masu. U našoj studiji, nijedan od pomenutih metala nije prešao propisane MDK vrednosti, što ukazuje da su ispitivane vrste riba relativno bezbedne za ljudsku ishranu.

5.3 Analiza oštećenja DNK molekula u ćelijama krvi, jetre i škruga

Za procenu genotoksičnog potencijala Save i Dunava na odabranim lokalitetima i kao biomarker izlaganja praćeno je oštećenje DNK molekula u ćelijama krvi, škruga i jetre riba alkalnim komet testom. Pošto je pokazana visoka i značajna korelacija između tri korišćena parametra u komet testu i na Savi i na Dunavu, radi jednostavnosti, rezultati će biti diskutovani samo prema parametru TI (%). Brojne studije su preporučile upotrebu parametra TI (%) (Belpaeme et al., 1998; Akcha et al., 2003; Sunjog et al., 2013; Kostić et al., 2016). Kako je već napomenuto, TI (%) se pokazao kao najpouzdaniji parametar za prikazivanje nivoa DNK oštećenja i interlaboratorijska poređenja rezultata.

Pri primeni komet testa na ribama, jedno od najčešće korišćenih tkiva je krv, jer se lako uzorkuje i ne zahteva disocijaciju tkiva. Ipak, različita tkiva akumuliraju metale i druge zagađivače različitim stopom, zavisno od biohemijskih karakteristika zagađivača. Stoga, izbor tkiva u komet testu treba da se oslanja na sposobnost tkiva da usvaja i metaboliše zagađivače (Monteiro et al., 2011). U ovoj studiji, upotreba ćelija škruga i jetre, pored ćelija krvi, zasniva se na činjenici da su škrge prvi organ u direktnom kontaktu sa zagađivačima iz vode, dok je jetra odabrana usled uloge u metabolizmu, akumulaciji i detoksikaciji zagađivača.

U ovoj studiji, na lokalitetu Duboko, DNK oštećenje u ćelijama krvi i škruga bilo je najviše krajem juna, a u ćelijama jetre u avgustu. Dobro je poznato da stopa metabolizma i fiziologija svih ektotermnih organizama visoko zavisi od temperature u životnoj sredini

(Clarke & Johnston, 1999). Studija De Andrade et al. (2004 a) pokazala je da povećana temperatura utiče na povećanje nivoa DNK oštećenja u ćelijama krvi dve vrste riba, kako onih u kontroli, tako i onih tretiranih metil metansulfonatom (MMS) u *in vitro* uslovima. Ista grupa istraživača izvestila je o visokoj osetljivosti komet testa u *in situ* ispitivanjima i sezonskom variranju DNK oštećenja u ćelijama krvi, sa višim vrednostima tokom toplijih sezona (De Andrade et al., 2004 b). Kako je najviše DNK oštećenje u ćelijama krvi i škrge uočeno krajem juna, jedan mesec nakon poplava, moguće je da je ovaj događaj imao veliki uticaj na DNK oštećenje u ovim tkivima. Može se pretpostaviti da je voda koja se povlačila sa susednih poljoprivrednih površina i pepelišta termoelektrana unela visoke koncentracije genotoksičnih supstanci koje su ispoljile svoj efekat u direktnom kontaktu sa škragama. Prema Polard et al. (2011), najviše koncentracije pesticida u vodotokovima blizu poljoprivrednih površina primećene su tokom poplava, usled spiranja zemljišta. Pored toga, poplave imaju veliki uticaj na pomeranje sedimenta i resuspenziju adsorbovanih zagađivača (Hollert et al., 2000). Brinkmann et al. (2010) su pokazali da se genotoksični efekti ispoljavaju nakon relativno kratkog izlaganja resuspendovanom sedimentu u simuliranom događaju poplava. Pored toga, tokom ovog perioda uočene su najviše koncentracije Mn, Pb, Cd, Co, kao i svih pesticida u vodi, prema podacima Agencije za zaštitu životne sredine. Koncentracije terbutilazina su bile oko 20 puta veće, metolahlora oko 10 puta veće, a desetilterbutilazina oko 4 puta veće u odnosu na prethodne mesece. Kao što je već pomenuto, jedan od najčešće korišćenih pesticida, Gardoprim plus gold 500 SC, predstavlja mešavinu terbutilazina i metolahlora. Ovaj pesticid je okarakterisan kao veoma toksičan za akvatične organizme, a u studiji akutne toksičnosti na kišnim glistama pokazao se kao ekstremno toksičan (Iordache & Borza, 2011). U studiji Dobšiková et al. (2012) pokazane su promene hematoloških, biohemijskih parametara i patološke promene na škragama i jetri šarana izloženih ovom pesticidu. Sa druge strane, jetra je imala najviši nivo oštećenja tokom avgusta u odnosu na sve mesece. Ovo se može objasniti povećanom metaboličkom aktivnošću riba tokom leta, kada su temperature bile najviše. Takođe, moguće je da se DNK oštećenje u jetri povećalo tokom avgusta kao rezultat procesuiranja velike količine genotoksičnih supstanci, unetih u vodu, sediment i organizme tokom poplava (Pailler et al., 2009). Poznato je da su škrge glavno mesto ulaska metala u organizam riba i da preko njih

dospevaju direktno u krvotok, a putem krvi do ostalih organa u kojima se akumuliraju, ili do jetre gde se transformišu i akumuliraju (Nussey, 2000; Omar et al., 2013). Prema tome, očekivano je da će genotoksične supstance svoj efekat ispoljiti prvo na ćelijama škrge i krvi, a potom i jetre. Takođe, tokom avgusta je zabeležena najniža koncentracija O_2 u vodi, kao i najviša koncentracija PO_4^{3-} na lokalitetu Duboko. Najviši nivo fosfatazne aktivnosti u avgustu, ukazuje na prisustvo visokih koncentracija organskih zagađivača. Organski zagađivači mogu izazvati niz promena u jetri ciprinidnih riba, od biohemijskih do morfoloških (Gül et al., 2004).

Na lokalitetu Višnjica tokom februara su zabeležene značajne razlike u DNK oštećenju tri tkiva, pri čemu su škrge imale najviši nivo DNK oštećenja, a jetra najniži. U aprilu krv je imala značajno viši nivo DNK oštećenja u odnosu na škrge i jetru. U avgustu su opet zabeležene značajne razlike u DNK oštećenju tri tkiva, pri čemu je krv imala najviši nivo oštećenja, a jetra najniži. U novembru škrge su imale značajno viši nivo DNK oštećenja u odnosu na krv i jetru. Razlika u odgovoru tri tkiva nije iznenađujuća, znajući da razlike između ćelija u pogledu metaboličkog kapaciteta, kapaciteta za reparaciju DNK i antioksidativnog statusa mogu doprineti različitom odgovoru pod uticajem genotoksičnih agenasa (Mitchellmore & Chipman, 1998). Na osnovu nivoa DNK oštećenja u sva tri tkiva detektovan je snažan odgovor na prisustvo stresora u životnoj sredini, koji je značajno varirao tokom različitih sezona. U našoj studiji na lokalitetu Višnjica (Kostić et al., 2016) primetili smo značajan uticaj izbora tkiva i sezone uzrokovanja na variranje DNK oštećenja, prema sva tri parametra (TI %, OTM, TLpix). Krv je imala najniži nivo oštećenja u februaru i novembru, jetra u februaru, škrge u aprilu. Februar i novembar su bili meseci sa najnižim temperaturama, dok je april bio mesec u kom je zabeležena najviša koncentracija O_2 u vodi. U vodama visoko zasićenim kiseonikom može doći do redukcije funkcionalne površine škrge i izmenjenog difuzionog kapaciteta (Sollid & Nilsson, 2006). Ovo bi potencijalno moglo da uzrokuje smanjenu razmenu krvi i zagađivača iz vode, a samim tim i smanjeno DNK oštećenje u škragama tokom aprila. Takođe, u prolećnim mesecima su brzina toka i zapremina reka značajno povećani, što može doprineti velikom razblaženju zagađenja iz vode i umanjiti efekat zagađivača na škrge. Najviši nivo DNK oštećenja u sva tri tkiva zabeležen je u avgustu, kada je temperatura vode bila najviša, a

koncentracija kiseonika najniža. Çavaş & Ergene-Gözükara (2005) označili su temperaturu vode kao jedan od najznačajnijih faktora koji doprinosi sezonskom variranju učestalosti mikronukleusa u ribi *Mugil cephalus*. U nizu studija, pokazana je pozitivna korelacija između temperature vode i DNK oštećenja u školjkama (Buschini et al., 2003; Kolarević et al., 2013) i ribama (Buschini et al., 2004; Pereira et al., 2010; Osman et al., 2012). Pretpostavka je da se stopa metabolizma povećava sa temperaturom, kao i stopa reparacije DNK, što uzrokuje povećan nivo prekida DNK lanaca, kao intermedijera u reparaciji (Buschini et al., 2004). U avgustu su u odnosu na lokalitet Bezdan primećene povećane koncentracije ukupnog i rastvorenog Cr, kao i rastvorenog Al, B i Cd, što je moglo da doprinese povećanom nivou DNK oštećenja tokom ovog meseca. Brojne studije su izvestile o genotoksičnom potencijalu Cr, Al, i Cd (Pruski & Dixon, 2002; Zhu et al., 2004; Goodale et al., 2008; García-Medina et al., 2011), a ova tri elementa označena su kao prioritetne hazardne supstance. Oni se nalaze u površinskim vodama i sedimentu, a njihove povećane koncentracije ukazuju na prisustvo zagađenja poreklom od industrijskih i poljoprivrednih aktivnosti, jer ulaze u sastav brojnih pesticida i insekticida.

Na oba lokaliteta, tokom većine meseci krv je bila tkivo sa najvišim nivoom DNK oštećenja, potom slede škrge, dok je jetra tokom većine meseci imala najniže DNK oštećenje. Na lokalitetu Duboko, krv je bila tkivo sa najvećim brojem značajnih razlika između različitih meseci. Ovo potencijalno ukazuje na dovoljnu osetljivost ćelija krvi da diskriminišu različite uslove sredine tokom različitih meseci. Jetra je bila tkivo sa najmanjim brojem značajnih razlika tokom različitih meseci, što ukazuje na njen kapacitet da održi balans u različitim uslovima životne sredine. Na lokalitetu Višnjica, sva tri tkiva su pokazala isti broj značajnih razlika između različitih meseci.

Na lokalitetu Duboko pokazana je značajna pozitivna korelacija u odgovoru ćelija škrge sa ćelijama krvi i jetre, dok je na lokalitetu Višnjica pokazana značajna korelacija između ćelija krvi sa ćelijama škrge i jetre. Takođe, na oba lokaliteta su uočeni slični odgovori tkiva tokom meseci sa sličnom temperaturom, kao što su januar, februar, mart i oktobar na lokalitetu Duboko i februar i novembar na lokalitetu Višnjica. U studiji Sunjog et al. (2014) takođe je uočen sličan odgovor ćelija u pogledu DNK oštećenja tokom meseci sa sličnim temperaturama.

U škrigama riba sa oba lokaliteta pokazana je veća akumulacija metala i metaloida u odnosu na jetru. Metali u sprezi sa histopatološkim promenama u škrigama kao što su povećana produkcija mukusa, povećana difuziona distanca između krvi i vode i smanjena funkcionalna površina škriga mogu izazvati povećanje ventilacione frekvencije. Ovakav respiratorni stres može povećati nivo oksidativnog oštećenja i biti razlog višeg nivoa DNK oštećenja u škrigama u poređenju sa jetrom.

Generalno, uočene su više vrednosti DNK oštećenja u ćelijama krvi na lokalitetu Višnjica i više vrednosti DNK oštećenja u ćelijama škriga na lokalitetu Duboko, dok su maksimalne vrednosti DNK oštećenja u ćelijama jetre na oba lokaliteta bile približno jednake. Više vrednosti DNK oštećenja u škrigama na lokalitetu Duboko u saglasnosti su sa višim vrednostima MPI u škrigama riba na lokalitetu Duboko u poređenju sa ribama na lokalitetu Višnjica.

5.4 Histopatološke analize škriga i jetre riba na lokalitetima Duboko i Višnjica

Histopatološke analize različitih organa široko su korišćene i predložene kao korisni i osetljivi biomarkeri u monitoringu opšteg stanja riba i zagađenja površinske vode (Bernet et al., 1999). Među tkivima riba, jetra i škrge se najčešće koriste u proceni zagađenja akvatičnih ekosistema jer akumuliraju zagađivače različitim stopama (Vasanthi et al., 2013). Van Dyk et al. (2012) su istakli da se pri proceni histopatoloških promena u tkivima riba, pored praćenja nivoa zagađujućih materija, mora uzeti u obzir i uticaj sezonskog variranja.

5.4.1 Histopatološke analize škriga

Škržni filamenti i lamele predstavljaju veliku površinu u direktnom i stalnom kontaktu sa zagađivačima iz vode što škrge čini izuzetno osetljivim na hemikalije u vodi (Bernet et al., 1999; Au, 2004). Brojne lamele škriga pokrivene su multifunkcionalnim epitelom, a čine i do 90 % ukupne površine tela ribe (Wendelaar Bonga & Lock, 1991).

Ipak, odgovori škruga na zagađenje su nespecifični i različiti zagađivači mogu izazvati slične reakcije.

Na lokalitetu Duboko histopatološki indeks škruga (GI) je imao najniže vrednosti u februaru, a najviše u avgustu i martu, ali bez značajnih razlika između različitih meseci.

Tokom svih meseci na lokalitetu Duboko, regresivne promene su bile najvećeg intenziteta, sa najnižim vrednostima u februaru, a najvišim u avgustu. Izdizanje respiratornog epitela i mukozne ćelije u sekundarnim lamelama imale su najviše vrednosti u avgustu. U avgustu su takođe zabeležene najviše vrednosti cirkulatornih promena u škrugama. Prema Mallatt (1985), izdizanje respiratornog epitela je najčešća promena u histopatološkim ispitivanjima škruga. Ova reverzibilna promena nastaje relativno brzo kao odgovor na stresne uslove i prisustvo zagađenja, a rezultuje u povećanoj difuzionoj distanci između vode i krvi (Figueiredo-Fernandes et al., 2007). U novoformiranim uslovima redukovanih koncentracija kiseonika, dolazi do povećanja toka krvi što uzrokuje povećanje nivoa cirkulatornih promena (Kleinow et al., 2008; Rašković et al., 2013). U ovoj studiji, najzastupljenije cirkulatorne promene bile su edem i hiperemija, koja upravo predstavlja povećan dotok krvi usled poremećene razmene gasova (Rašković et al., 2010), a imala je najviše vrednosti u julu i avgustu. Značajna pozitivna korelacija između regresivnih i cirkulatornih promena na škrugama, uočena u ovoj studiji, potvrđuje povezanost ove dve grupe promena. U avgustu je zabeležena najviša temperatura i najniža koncentracija kiseonika u vodi, kao i najviše koncentracije PO_4^{3-} i IFA na lokalitetu Duboko. Prema Mallatt (1985) iako su neka istraživanja pokazala da sa porastom temperature vode neki zagađivači i pri niskim koncentracijama mogu postati toksični za ribe, generalno za promene na škrugama nije nađeno da zavise od temperature. Povećana koncentracija PO_4^{3-} i IFA na lokalitetu Duboko tokom avgusta, ukazuju na povećano prisustvo organske materije, što može biti rezultat ispuštanja otpadnih voda domaćinstava i poljoprivrede, ali i prirodnih faktora kao što su usporavanje toka reke i nizak vodostaj koji mogu uticati na povećanje koncentracije zagađivača u vodi. Martins Silva Santos et al. (2012) primetili su niz regresivnih, progresivnih i cirkulatornih promena na škrugama riba izloženih visokoj koncentraciji organskih čestica i fosfata. Na sve ovo, povećanje koncentracija organske materije može dovesti do niže koncentracije O_2 u vodi (Overstreet, 1988). Najčešće uočena

reakcija riba na niske koncentracije O_2 u vodi je da povećaju zapreminu vode koja prelazi preko škrge, povećanjem ventilacije, što može uzrokovati da povećane koncentracije zagađivača dolaze u kontakt sa epitelom škrge, koji je glavno mesto njihove apsorpcije (Lloyd, 1961). Takođe, tokom avgusta na mernoj stanici Ostružnica zabeležene su i povišene koncentracije ukupnog i rastvorenog Cr, kao i rastvorenog Fe, Mn, Pb i Cu u odnosu na trogodišnji prosek. Narušena osmotska i jonska funkcija škrge riba izloženih metalima kao što su Cr, Fe, Mn, Pb i Cu pokazana je u nekoliko studija (Cerqueira & Fernandes, 2002; Abdel-Moneim et al., 2012; Javed & Usmani, 2013). U škrnama riba izloženih Cr upravo su primećene promene kao što su izdizanje respiratornog epitela i povećana sekrecija mukusa (Mishra & Mohanty, 2008).

U martu su primećene najviše vrednosti regresivnih promena poremećene arhitekture i nekroze u škrnama. Tada je zabeležen najviši nivo pH vode (pH 8,8) i najviša koncentracija NH_4^+ . Pri visokim vrednostima pH vode ribe imaju problem sa ekskrecijom amonijaka, koja se odvija niz gradijent koncentracije, tj. pasivnom difuzijom. Kada je kiselinsko-bazna ravnoteža između vode i tkiva narušena, strana koja poseduje niži pH privlačiće dodatne molekule amonijaka (Svobodová et al., 1993). Usled ovoga, pri visokim vrednostima pH vode, čak i niske koncentracije nejonizovanog amonijaka (NH_3) u vodi mogu predstavljati stres za ribe, jer će dovesti do nakupljanja amonijaka u organizmu (Wang et al., 2003). Rašković et al. (2013) uočili su značajnu pozitivnu korelaciju između histopatološkog indeksa škrge i pH vode i istakli ključnu ulogu povišenog pH u nastanku lezija na škrnama. Pored toga, u studiji da Silva et al. (2013) uočeno je da se u alkalnoj sredini (pH 8,8) visoke, ali ne i štetne koncentracije NH_4^+ konvertuju u visoke toksične nivoe NH_3 , koji su značajno uticali na rast juvenilnih jedinki tilapije (*Oreochromis niloticus*). Chezhian et al. (2012) su uočili fuziju škržnih filamenata, izdizanje respiratornog epitela i nekrozu u škrnama riba izloženih visokim koncentracijama amonijaka pri visokom pH (pH 8). Takođe, u martu su zabeležene i visoke koncentracije rastvorenog Fe u vodi, u odnosu na trogodišnji prosek. Škrge su generalno okarakterisane kao glavno mesto toksičnosti Fe, a studija Dalzell & Macfarlane (1999) pokazala je izdizanje respiratornog epitela, hipertrofiju i nekrozu epitelnih ćelija, rupturu i fuziju lamela kod riba izloženih Fe.

Očigledno je da su upravo regresivne promene najviše doprinele vrednostima ukupnog histopatološkog indeksa škrگا, kako je on imao najviše vrednosti upravo u avgustu i martu.

Progresivne promene su bile najnižeg intenziteta u škrگama riba na lokalitetu Duboko, izuzev u januaru i početkom juna u odnosu na cirkulatorne promene. U okviru progresivnih promena, takođe nije uočeno značajno sezonsko variranje, a najzastupljenije bile su proliferacija mukoznih ćelija, hiperplazija i hipertrofija. Proliferacija mukoznih ćelija imala je najviše vrednosti u januaru. U januaru su zabeležene najviše vrednosti NO_3^- u vodi, rastvorenog Al i Fe u odnosu na trogodišnji prosek, kao i najviše koncentracije enterokoka u vodi. Povećane količine NO_3^- i enterokoka u vodi ukazuju na antropogeni uticaj i ispuštanje otpadnih voda domaćinstava ili spiranje poljoprivrednih površina (Dolomatov et al., 2011). Proliferacija mukoznih ćelija je nespecifičan odgovor škrگا na različite iritante u vodi (Kirk & Lewis, 1993). Hipertrofija i hiperplazija spadaju u jedne od najčešćih odgovora škrگا na dejstvo različitih tipova zagađivača (Mallatt, 1985), a imale su najviše vrednosti početkom juna. Početkom juna zabeležene su najviše koncentracije NO_2 u vodi i rastvorenog Pb, Mn i Fe u odnosu na trogodišnji prosek, kao i fekalnih koliforma, oligotrofnih bakterija i visok IFA vode. Hipertrofija i hiperplazija bile su jedne od najizraženijih promena u škrگama riba hronično izloženih NO_2 (Michael et al., 1987). Takođe, početkom juna zabeležene su značajno više koncentracije Al i Cr u škrگama ovih riba. Akumulacija hroma u škrگama povezuje se sa strukturnim oštećenjem epitela škrگا i poremećenim funkcijama respiracije i osmoregulacije (Temminck et al., 1983). U studiji Alazemi et al., (1996) uočena je pojava hipertrofije i hiperplazije u škrگama riba izloženih Cr, a ove promene okarakterisane su kao odbrambeni mehanizmi koji dovode do smanjenja respiratorne površine i povećanja difuzione distance između krvi i vode. U studiji Camargo & Martinez (2007) uočene su hiperplazija i hipertrofija u škrگama riba izloženih različitim difuznim i tačkastim izvorima zagađenja industrijskih, urbanih i poljoprivrednih aktivnosti. Takođe, ove promene su mogle nastati usled pomeranja sedimenta nakon poplava. Costa et al. (2009) uočili su hipertrofiju i hiperplaziju epitelnih ćelija u škrگama riba izloženih zagađenom sedimentu i istakli da laboratorijsko izlaganje prirodnom sedimentu može pojačati dostupnost zagađivača usled pomeranja sedimenta, te da oslikava stanje koje se dešava u rekama prilikom prirodnih nepogoda.

Na lokalitetu Višnjica, GI je imao značajno više vrednosti u novembru u poređenju sa avgustom . Sve tri kategorije promena u škrgama imale su najviše vrednosti u novembru, a u okviru cirkulatornih promena primećene su značajno više vrednosti u novembru u odnosu na februar i avgust. Generalno, kao i na lokalitetu Duboko, regresivne i cirkulatorne promene bile su većeg intenziteta u odnosu na progresivne promene, tokom svih meseci izuzev februara kada su progresivne promene imale najviše vrednosti.

Od regresivnih promena zabeležene su izdizanje respiratornog epitela, poremećena arhitektura i mukozne ćelije u sekundarnim lamelama. Izdizanje respiratornog epitela imalo je najviše vrednosti u aprilu, dok su poremećena arhitektura i mukozne ćelije u sekundarnim lamelama imale najviše vrednosti u novembru.

Od cirkulatornih promena primećene su hiperemija i edem. Hiperemija je imala najviše vrednosti u avgustu, dok je edem imao značajno više vrednosti u novembru u odnosu na februar. U avgustu je zabeležena najviša temperatura vode i najniža koncentracija O₂ u vodi, kao i rastvorenog Cr, Al, B, Cd i ukupnog Cr u odnosu na lokalitet Beždan. Takođe u avgustu je zabeležen najviši nivo DNK oštećenja i u škrgama i u krvi deverika na lokalitetu Višnjica. Ribe su kao poikilotermni organizmi izuzetno osetljive na sezonsko i dnevno variranje temperature, a u studiji Aboka et al. (2017) pokazano je da akutno izlaganje riba povišenim temperaturama uzrokuje niz histopatoloških promena u škrgama. U studiji Mustafa et al. (2011) primećeno je značajno više DNK oštećenje u ćelijama krvi i niz histopatoloških promena na škrgama šarana izloženih hipoksičnim uslovima. U studiji Authman et al. (2015) sumiran je uticaj Cr, Al i Cd na indukovanje strukturnih i funkcionalnih promena različitih organa riba, a studija Gül et al. (2013) pokazala je prisustvo hiperemije u škrgama riba izloženih povišenim koncentracijama bora (B).

Od progresivnih promena tokom čitavog perioda zabeležene su hiperplazija epitelnih ćelija i proliferacija mukoznih ćelija koje predstavljaju nespecifičan odgovor škrge izloženih iritantima i ove promene su primećene u škrgama riba izloženih ispustu otpadnih voda (Corbett et al., 2014). Hiperplazija epitelnih ćelija je imala najviše vrednosti u aprilu, kao i regresivna promena izdizanje respiratornog epitela. U studiji El-Aziz et al. (2011) takođe su uočene povećane vrednosti hiperplazije u prolećnoj sezoni, što je

pripisano povećanoj količini spiranja zemljišta nakon zimske sezone. U aprilu su zabeležene najviše koncentracije kiseonika u vodi, pa se ove promene mogu shvatiti kao adaptivne jer redukuju površinu sekundarnih lamela koja je u kontaktu sa vodom i povećavaju distancu između krvi i vode. Ovo bi potvrdilo ranije pomenutu mogućnost da su škrge tokom aprila imale najniže DNK oštećenje upravo zbog redukcije funkcionalne površine škrge i posledičnog smanjenog ulaska zagađivača iz vode. April je bio mesec kada su zabeležene povećane vrednosti ukupnog i rastvorenog As i rastvorenog Co u vodi, u odnosu na lokalitet Bezdan. Takođe zabeležene su i visoke koncentracije *E. coli*, enterokoka, *C. perfringens* i IFA. U škragama su u aprilu zabeležene značajno više koncentracije Al. U studiji Santos et al. (2014) hiperplazija je bila jedna od najzastupljenijih promena u škragama riba izloženih vodi zagađenoj visokim koncentracijama fekalnog, organskog otpada i aluminijuma. Proliferacija mukoznih ćelija imala je značajno više vrednosti u februaru i novembru, u odnosu na april i avgust. U škragama deverika uočene su značajno više koncentracije Al, Fe i Cu u februaru u odnosu na novembar. Kako je proliferacija mukoznih ćelija imala gotovo jednake vrednosti u februaru i novembru jasno je da pomenuti metali nisu imali uticaj na ovu promenu. U februaru su primećene najviše vrednosti NH_4^+ u vodi, visok pH vode, kao i povećane koncentracije ukupnog i rastvorenog Al, Fe, Cd, ukupnog Co i rastvorenog Cr u odnosu na Bezdan. U novembru su primećene najviše koncentracije PO_4^{3-} u vodi, kao i ukupnog i rastvorenog Mn i Cu, ukupnog Cr i rastvorenog Fe, Ni i Zn, u odnosu na Bezdan. Reke opterećene otpadnim kanalizacionim i industrijskim vodama često imaju alkalne vrednosti pH vode, visoke koncentracije amonijaka, fosfata i metala kao što su Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Ni i Pb (Venkateswarlu, 1986). Moguće je da su svi ovi uslovi doveli do povećane proliferacije mukoznih ćelija, koja ima ulogu u zaštiti škrge od dejstva iritanata, ali i drugih kategorija promena tokom novembra, kao što su poremećena arhitektura, mukozne ćelije u sekundarnim lamelama i edem.

Na lokalitetu Duboko histopatološki indeks škrge (GI) je varirao od 7,5 do 16,3, a na lokalitetu Višnjica od 9,8 do 23,8. Prema Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994) može se zaključiti da su škrge na lokalitetu Duboko pri najvišim vrednostima GI bile blago do umereno oštećene, a škrge na lokalitetu Višnjica umereno do teško oštećene.

5.4.2 Histopatološke analize jetre

Jetra je glavni organ odgovoran za detoksikaciju, transformaciju i skladištenje toksičnih metala i stoga je ciljno mesto za indukovanje patoloških efekata od strane zagađivača (Omar et al., 2013). Prema Marchand et al. (2009) u jetrama riba iz prirodnih populacija histopatološke promene mogu biti indukovane prisustvom velikog broja zagađivača. Pored toga, nedostatak kiseonika izazvan promenama na škragama može biti jedan od uzroka ćelijske degeneracije u jetri (Younis et al., 2013).

U ovoj studiji, na lokalitetu Duboko histopatološki indeks jetre (LI) riba je imao značajno viši nivo promena u julu u odnosu na februar. Moguće da je jetra bila pod velikim pritiskom obrade visokih koncentracija zagađivača unetih u reku povlačenjem vode i resuspenzijom sedimenta tokom poplava. Istraživanje od strane Einsporn et al. (2005) pokazalo je prisustvo histopatoloških promena u jetri iverka (*Platichthys flesus*) čak 5 meseci nakon poplava. Na lokalitetu Višnjica nisu uočene značajne razlike u histopatološkom indeksu jetre tokom različitih meseci, LI je bio najviši u aprilu, a najniži u avgustu i februaru.

Na lokalitetu Duboko, u okviru cirkulatornih promena uočene su staze i kongestija sinusoida. Obe promene su imale najniže vrednosti u januaru, a najviše krajem juna, a za staze su uočene i statistički značajne razlike između ova dva meseca. Krajem juna su uočene povišene koncentracije svih pesticida u vodi u odnosu na prethodne mesece. Iako nisu uočene povećane koncentracije ovih zagađivača u odnosu na trogodišnji prosek, može se zaključiti da se u ovom periodu godine usled primene pesticida, ali i povećanih padavina i spiranja zemljišta unose veće koncentracije ovih zagađivača u površinske vode u blizini poljoprivrednih aktivnosti (Antić et al., 2015). Vaskularne promene se često javljaju kod riba izloženih organskim zagađivačima (Schmidt et al., 1999). U našoj studiji, jetra je označena kao glavni organ za akumulaciju As, Cu, Fe i Pb. Studija Kaoud & El-Dahshan (2010) pripisala je histopatološke promene, kao što su cirkulatorni poremećaji, produženom izlaganju metalima kao što su Cu i Pb. Atamanalp et al. (2008) su našli da izlaganje kalifornijske pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) bakar-sulfatu (CuSO_4) indukuje, među drugim poremećajima, kongestiju krvnih sudova u jetri. Kongestija sinusoida zaustavlja krv

iz hepatične arterije i interbilijarne portalne vene, koja mora proći kroz sinusoide na svom putu do centralne vene. Ova nemogućnost krvi da stigne do centralne vene utiče da jetra pumpa krv jače i može izazvati poremećaje u jetri (Olojo et al, 2005). Takođe krajem juna su u našoj studiji primećene i najviše koncentracije ukupnih koliforma (TC). U studiji Mohamed (2009) primećene su kongestija sinusoida i druge cirkulatorne promene u jetri riba izloženih zagađenim drenažnim vodama naselja. Brown et al. (1973) pokazali su pozitivnu korelaciju između količine koliformnih bakterija u vodi i učestalosti tumora u jetri riba. Povećane koncentracije pesticida, pomenutih metala i totalnih koliforma u vodi krajem juna mogu biti rezultat poplava i povlačenja vode sa okolnih površina, kao što je već napomenuto.

Na lokalitetu Duboko, regresivne promene u jetri imale su najviše vrednosti u januaru i to značajno više u odnosu na februar i avgust. Regresivne promene u jetri riba sa lokaliteta Duboko obuhvatile su fokalne promene hepatocita, vakuolizaciju i nekrozu, a sve tri promene su imale najviše vrednosti u januaru. U januaru su u vodi na lokalitetu Duboko uočene najviše koncentracije NO_3^- , kao i povišene koncentracije rastvorenog Fe i Al u odnosu na trogodišnji prosek. Iqbal et al. (2005) uočili su degeneraciju hepatocita, nekrozu tkiva i vakuolizaciju u jetri riba izloženih subletalnim koncentracijama NO_3^- , a koje su bile dva puta veće od onih izmerenih u januaru na lokalitetu Duboko. U studiji Shahi et al. (2016) drenažne vode rudnika uglja bogate Al i Fe indukovale su DNK oštećenje u ćelijama jetre, kao i vakuolizaciju i nekrozu u jetrinom parenhimu. Nekroza ćelija jetre može nastati kao rezultat inhibicije sinteze DNK koja je neophodna za rast i razvoj jetre (Hadi et al., 2012). Štaviše, u januaru je zabeleženo i relativno visok nivo DNK oštećenja u ćelijama jetre.

Na lokalitetu Višnjica, najniže vrednosti cirkulatornih promena uočene su u februaru, a najviše u avgustu, bez značajnih razlika između meseci. Kao što je ranije pomenuto, u avgustu su zabeležene najviša temperatura vode, najniža koncentracija kiseonika i povećane koncentracije Cr, Al i B u vodi, u odnosu na lokalitet Beždan. Marchand et al. (2009) zabeležili su niz promena u jetri riba izloženih otpadnoj vodi postrojenja za preradu voda, industrije i naselja koja je sadržala visoke koncentracije Cr i Al. Hrom detektovan u jetri riba, zajedno sa drugim metalima i metaloidima, može izazvati

povećanu učestalost lezija (Paulino et al., 2014) i indukovati genetičke, fiziološke, biohemijske i morfološke promene (Velma et al., 2009). U avgustu je zabeležen i značajno viši nivo DNK oštećenja u jetri u odnosu na ostale mesece. Moguće da je jetra riba u avgustu usled povećane aktivnosti i stope ishrane riba metabolisala veliku količinu zagađivača, usled čega su nastali visoko reaktivni metaboliti koji su ispoljili svoj efekat na molekulskom, ali i histološkom nivou (Ameur et al., 2012).

Na lokalitetu Višnjica regresivne promene u jetri imale su najviše vrednosti u februaru, a obuhvatale su fokalne promene hepatocita, vakuolizaciju, nekrozu i ekscentrična jedra. U februaru je na lokalitetu Višnjica zabeležena najviša koncentracija NH_4^+ u vodi, a pH vode bila je iznad pH 9. Amonijum jon može dospeti u vodu putem otpadnih gradskih i industrijskih voda, kao i poljoprivrednim aktivnostima i razlaganjem biološkog otpada. U februaru su zabeležene povišene koncentracije Co, rastvorenog Cr i ukupnog i rastvorenog Cd, Al, Fe u odnosu na lokalitet Bezdan. U jetri riba izloženih povećanim koncentracijama Cd i Co u vodi uočena su oštećenja hepatocita, vakuolizacija, fokalna nekroza i druge promene (Koca et al., 2008).

Više vrednosti regresivnih promena u jetri riba na oba lokaliteta tokom hladnijih meseci mogu biti u vezi sa promenama temperature vode, metaboličkih, endokrinih aktivnosti i ishrane riba, ali i uticaja sezone na distribuciju zagađivača (Dawson & Grimm, 1980; Koivusaari et al., 1981; Slooff et al., 1983).

Jedina inflamatorna promena uočena u ovoj studiji na oba lokaliteta bila je infiltracija leukocita u jetrin parenhim. Pored toga, na oba lokaliteta, progresivne promene u jetri bile su najnižeg intenziteta, a jedina uočena progresivna promena bila je pojava fibroze. Na lokalitetu Duboko, najviše vrednosti infiltracije leukocita i fibroze zabeležene su u julu, dok su na lokalitetu Višnjica obe promene imale najviše vrednosti u aprilu. Prema Bernet et al. (1999), infiltracija leukocita često nastaje u sprezi sa drugim promenama, a prisustvo leukocita omogućava neutralizaciju i uništavanje stresora, čišćenje tkiva, uklanjanje mrtvih ćelija i indukciju regeneracije oštećenog tkiva. Štaviše, u našoj studiji na oba lokaliteta je pokazana značajna pozitivna korelacija između fibroze i infiltracije leukocita. Inflamacija je tipično prisutna u svim stadijumima oštećenja jetre i povezana je sa razvijanjem fibroze, ciroze i hepatocelularnih karcinoma. Ćelijska smrt i inflamacija čine

dva karakteristična i povezana događaja hroničnog oboljenja jetre koji promovišu nastanak fibroze (Seki & Schwabe, 2015). U studiji Koponen et al. (2001) primećeno je istovremeno prisustvo fibroze i inflamatornih ćelija oko krvnih sudova i žučnih kanalića u jetri deverike. U julu su na lokalitetu Duboko primećene više koncentracije ukupnog Cr i rastvorenog Fe i Mn, u odnosu na trogodišnji proseka, kao i povišene koncentracije Al u jetri riba. Rašković et al. (2015) pokazali su prisustvo infiltracije leukocita i fibrozu u jetri bentofagnih riba izloženih metalima u Dunavu. U aprilu su na lokalitetu Višnjica, tj. na mernoj stanici Vinča, uočene povećane koncentracije ukupnog i rastvorenog As i rastvorenog Co u odnosu na Bezdán. Takođe, primećene su i visoke koncentracije *E. coli*, enterokoka (IV klasa vode), *C. perfringens* i IFA što ukazuje na visoke koncentracije fekalnog i organskog otpada. U studiji Mohamed (2009) uočene su inflamatorne ćelije između hepatocita i fibroza u jetri riba izloženih visokim koncentracijama fekalnih bakterija i organskog zagađenja u jezeru. U studiji Paolini et al. (2005) primećena je infiltracija leukocita u jetri klena (*Leuciscus cephalus*) iz dve reke u Italiji, koje primaju komunalne otpadne vode. Takođe, u studiji Cazenave et al. (2014) primećena je povećana učestalost leukocita u krvi riba izloženih netretiranoj kanalizacionoj otpadnoj vodi i istaknut je infektivni potencijal ove vode.

Generalno, jetra je bila organ sa većim obimom histopatoloških promena i višim ukupnim histopatološkim indeksom u odnosu na škrge, na oba lokaliteta. Kako je jetra glavni organ za obradu i akumulaciju nutrijenata, sintezu enzima i metabolizam zagađivača, očekivano je da će biti jedan od najviše oštećenih organa (Wolf & Wolfe, 2005), pogotovo kod populacija koje su konstantno izložene mnogobrojnim izvorima zagađenja (Marchand et al., 2012). Takođe, brojne studije su pokazale veći broj i obim histopatoloških promena u jetri, u odnosu na sve ostale organe, što ističe njenu ulogu kao ciljnog organa u ispitivanju stanja životne sredine (Escher et al., 1999; Cazenave et al., 2014; Paulino et al., 2014).

Pored toga, neke od najčešće uočenih promena u škragama: sve uočene cirkulatorne promene, hipertrofija, izdizanje respiratornog epitela, proliferacija mukoznih ćelija i mukozne ćelije u sekundarnim lamelama, su promene koje nastaju brzo po izlaganju zagađivačima i lako su reverzibilne. Škrge su podložnije trenutnim reakcijama (akutnim efektima) na izlaganje zagađivačima u vodi, dok promene u jetri pokazuju efekte

dugotrajnog izlaganja (hronični efekti) zagađivačima i njihovim, često toksičnim metabolitima (Costa et al., 2009). Štaviše, u studiji Giari et al. (2012) potvrđeno je da škrge odgovaraju brže od jetre na prisustvo akutnog zagađenja toksičnim agensima, a da efekti u jetri odražavaju prisustvo hroničnog izlaganja zagađenju.

5.5 Korelacije među praćenim biomarkerima na lokalitetima Duboko i Višnjica

U okviru škrge, na oba lokaliteta uočene su statistički značajne pozitivne korelacije između svih kategorija promena u škragama i histopatološkog indeksa škrge sa ukupnim histopatološkim indeksom, kao i između cirkulatornih i regresivnih promena, što je ranije pomenuto. Na lokalitetu Višnjica, pokazana je značajna pozitivna korelacija između histopatološkog indeksa škrge i histopatološkog indeksa jetre, što ukazuje da su škrge bile glavno mesto ulaska zagađivača iz vode i sedimenta (Costa et al., 2009). Na lokalitetu Duboko primećena je značajna pozitivna korelacija između koncentracija Al i progresivnih promena u škragama. Škrge su ciljni organ na kome Al ispoljava svoju akutnu toksičnost (Exley et al., 1991), a takođe, pokazano je da škrge imaju sposobnost adaptacije prilikom hroničnog izlaganja niskim koncentracijama Al (Mueller et al., 1991), pa je moguće da su ove progresivne promene adaptivne. Na lokalitetu Višnjica primećena je značajna negativna korelacija progresivnih promena i histopatološkog indeksa škrge sa nivoom DNK oštećenja u škragama. Histopatološke promene na škragama, posebno progresivne promene, dovode do povećanja difuzione distance između krvi i zagađivača iz vode, što može uzrokovati smanjen ulazak zagađivača, a samim tim i niži nivo DNK oštećenja (Banerjee, 2007). Na lokalitetu Višnjica primećena je pozitivna korelacija između Sr i progresivnih promena, kao i značajna negativna korelacija između koncentracija Fe i Cu sa cirkulatornim promenama. Esencijalni metali kao što su Fe i Cu imaju regulatorne fiziološke funkcije u organizmu (Mohamed, 2008), a pokazano je da Cu ima zaštitnu ulogu protiv oksidativnog oštećenja (Sevcikova et al., 2011). Na lokalitetu Duboko je pokazana značajna pozitivna korelacija između koncentracije Zn i nivoa DNK oštećenja u škragama. U studiji Atif et al. (2008) pokazano je da Zn ima sposobnost da indukuje produkciju

metalotioneina u škragama, a predloženo je da se u uslovima oksidativnog stresa oslobađa iz metalotioneina i ima ulogu sakupljača slobodnih radikala. Veliki broj korelacija među metalima u škragama na oba lokaliteta, ukazuju na njihovo slično antropogeno poreklo i ističe združeno dejstvo ovih zagađivača (Demirak et al., 2006).

U jetri su na oba lokaliteta pokazane značajne pozitivne korelacije između svih kategorija promena i histopatološkog indeksa jetre sa ukupnim histopatološkim indeksom. Takođe, na oba lokaliteta su uočene značajne pozitivne korelacije između inflamatornih i progresivnih promena u jetri, dok je na lokalitetu Duboko primećena značajna negativna korelacija između cirkulatornih i regresivnih promena. Na lokalitetu Duboko uočena je visoka značajna negativna korelacija između koncentracije Mo sa regresivnim promenama, ukupnim histopatološkim indeksom i nivoom DNK oštećenja u jetri. Molibden se smatra relativno netoksičnim za ribe, esencijalan je element koji ulazi u sastav nekoliko enzima koji imaju važnu ulogu u detoksifikaciji zagađivača (Reid, 2011). Na lokalitetu Višnjica pokazana je značajna pozitivna korelacija cirkulatornih promena sa nivoom DNK oštećenja u jetri. Kao što je već pomenuto, cirkulatorne promene kao što su prisustvo staza i kongestija sinusoida uzrokuju jači protok krvi i opterećenost jetre (Olojo et al., 2005). U studiji Ameer et al. (2012) pokazana je korelacija između DNK oštećenja i histopatoloških lezija u jetri dve vrste riba izloženih antropogenom zagađenju. Studija Hermenean et al. (2015) istakla je da zagađenje reka metalima može indukovati oksidativni stres u jetri riba i niz histopatoloških promena među kojima i kongestiju sinusoida. Zanimljivo je da je na oba lokaliteta uočena značajna pozitivna korelacija Cr sa Mn i Zn, što ukazuje ili na slično ponašanje ili na slične izvore ovih elemenata (Agah et al., 2009). Visoka značajna pozitivna korelacija pokazana je između Cu i Zn u jetri riba na lokalitetu Višnjica, što ukazuje na moguće deponovanje ovih metala u jetri. Na lokalitetu Duboko primećena je značajna pozitivna korelacija Cu sa Al i Sr, kao i Sr sa Mn. Na lokalitetu Višnjica, Mo je korelisao sa Co, Fe i Mn, a primećene su još značajne pozitivne korelacije između Co i Fe. Ove korelacije mogu biti znak zajedničkog izvora zagađenja u ekosistemu (Vicente-Martorell et al., 2008).

6 | ZAKLJUČCI

6 ZAKLJUČCI

- Na lokalitetu Višnjica, tokom većeg broja meseci, uočene su više vrednosti pH, elektroprovodljivosti, NO_2 , NO_3^- , NH_4^+ i PO_4^{3-} u vodi, u odnosu na lokalitet Duboko.
- Na Dunavu, na mernoj stanici Vinča, zabeležene su više koncentracije većine metala i metaloida u odnosu na Savu, merna stanica Ostružnica.
- Na oba lokaliteta uočene su najviše koncentracije pesticida terbutilazina, desetilterbutilazina i metolahlora tokom juna na Dunavu, odnosno maja/juna na Savi, pri čemu su koncentracije ovih zagađivača bile gotovo duplo veće na Savi.
- Prema količini ukupnih koliforma tokom većine meseci voda reka Save i Dunava na odabranim lokalitetima mogla se svrstati u III klasu, dok je na lokalitetu Višnjica u martu pripadala IV klasi.
- Prema količini fekalnih koliforma na lokalitetu Duboko i *E. coli* na lokalitetu Višnjica voda se tokom većine meseci mogla svrstati u III klasu, dok je na lokalitetu Višnjica u martu i aprilu pripadala IV klasi.
- Prema količini enterokoka na lokalitetu Duboko voda je tokom većine meseci pripadala II klasi, dok je na lokalitetu Višnjica tokom svih meseci pripadala III kategoriji, izuzev u aprilu kada su zabeležene najviše koncentracije i IV klasa kvaliteta.
- Više koncentracije svih indikatorskih mikroorganizama fekalnog zagađenja i lošiji kvalitet vode zabeleženi su na lokalitetu Višnjica što ukazuje da je on izložen većem pritisku netretiranih gradskih otpadnih voda.
- Prema količini heterotrofnih bakterija i indeksu fosfatazne aktivnosti pokazano je veće prisustvo organskog zagađenja na lokalitetu Višnjica, što može biti poreklom od velike količine fekalnog otpada kome je ovaj lokalitet izložen, ali i drugih antropogenih aktivnosti.

- Prema indeksu zagađenja metalima (MPI) na oba lokaliteta pokazano je da su škrge organ koji je kvantitativno i kvalitativno pod najvećim pritiskom metala i metaloida iz životne sredine.
- Prema koncentracijama elemenata u četiri analizirana tkiva i vrednostima MPI može se zaključiti da su ribe na lokalitetu Duboko pod većim pritiskom zagađenja metalima i metaloidima, što ukazuje da voda verovatno nije bila glavni izvor unosa metala, već sediment, jer su više vrednosti metala i metaloida zabeležene u vodi reke Dunav.
- Uočeno je više značajnih razlika među tkivima u akumulaciji određenih metala, nego razlika tokom različitih meseci u okviru pojedinačnih tkiva.
- Na oba lokaliteta pokazana je specifičnost škrge u akumuliranju Al, Ba, Cr, Mn, Mo i Sr, kao i jetre u akumuliranju Cu, Pb i As. Gonade su pokazale sklonost ka akumuliranju As, Pb i Co. Akumulacija elemenata u mišiću bila je niža nego u drugim tkivima.
- U ovoj studiji, nijedan od elemenata za koje su propisane MDK u mišiću (Pb, As, Cu, Fe i Zn) nije prešao propisane vrednosti.
- Na oba lokaliteta, tokom većine meseci, krv je bila tkivo sa najvišim nivoom DNK oštećenja, potom slede škrge, dok je jetra tokom većine meseci imala najniži nivo DNK oštećenja.
- Na oba lokaliteta uočeni su slični odgovori tkiva tokom meseci sa sličnom temperaturom, što ukazuje da je DNK oštećenje pouzdan biomarker za diskriminisanje sezonskih razlika u odgovoru riba na zagađenje.
- Najveći broj značajnih razlika u DNK oštećenju tokom različitih meseci na lokalitetu Duboko uočen je za krv što potencijalno ukazuje na dovoljnu osetljivost ćelija krvi da diskriminišu različite uslove sredine tokom različitih meseci.
- Jetra je bila tkivo sa najmanjim brojem značajnih razlika tokom različitih meseci, što ukazuje na njen kapacitet da održi balans, u pogledu DNK oštećenja, u različitim uslovima životne sredine.

- Korelacija DNK oštećenja krvi sa DNK oštećenjem škrge i jetre uočena na lokalitetu Višnjica, i sa DNK oštećenjem škrge na lokalitetu Duboko, ukazuje da bi krv mogla biti tkivo od izbora prilikom sprovođenja komet testa u ekogenotoksikologiji, kao tkivo koje neprekidno cirkuliše između škrge i jetre.
- Više vrednosti DNK oštećenja u ćelijama krvi zabeležene su na lokalitetu Višnjica, a u ćelijama škrge na lokalitetu Duboko, dok su maksimalne vrednosti DNK oštećenja u ćelijama jetre na oba lokaliteta bile približno jednake.
- Na lokalitetu Duboko škrge su pri najvećim vrednostima histopatološkog indeksa škrge (GI) bile blago do umereno oštećene, a na lokalitetu Višnjica umereno do teško oštećene.
- U škragama riba na oba lokaliteta, uočene su značajne pozitivne korelacije između regresivnih i cirkulatornih promena, koje su bile višeg intenziteta u odnosu na progresivne promene.
- Na oba lokaliteta, jetra je bila organ sa većim obimom histopatoloških promena i višim ukupnim histopatološkim indeksom u odnosu na škrge.
- U jetri riba na oba lokaliteta dominirale su cirkulatorne i regresivne promene, dok su progresivne i inflamatorne promene bile nižeg intenziteta. Na oba lokaliteta uočena je značajna pozitivna korelacija između progresivnih i inflamatornih promena, tj. fibroze i infiltracije leukocita u jetri.
- U pogledu histopatoloških promena, u škragama su uočene promene koje nastaju relativno brzo i lako su reverzibilne, dok su promene u jetri ukazivale na hronično izlaganje riba zagađenju.
- Sveukupno, škrge kao prvi organ u direktnom kontaktu sa zagađivačima iz vode pokazuju viši odgovor u pogledu DNK oštećenja i veću akumulaciju praćenih elemenata, dok jetra kao glavni organ za procesuiranje zagađivača iz vode i hrane pokazuje viši nivo histopatoloških promena.

- Praćenje nivoa DNK oštećenja alkalnim komet testom pokazalo se kao osetljiv biomarker kako za procenu efekata prirodnih i antropogenih stresora, tako i za procenu odgovora riba tokom različitih sezona.
- Praćenje histopatoloških promena pokazalo se kao pouzdan biomarker za procenu efekata akutnog i hroničnog izlaganja zagađenju.
- Ovi rezultati pokazuju da gradske otpadne vode imaju visok potencijal da indukuju odgovore na različitim nivoima biološke organizacije u ribama i ističu hitnu potrebu za implementacijom postrojenja za preradu otpadnih voda.
- Ova studija je pokazala i potencijal poplava da indukuju promene na različitim nivoima biološke organizacije, kako je na lokalitetu Duboko uočen porast i DNK oštećenja i histopatoloških promena neposredno nakon poplava.
- Kako se očekuje da će klimatske promene uticati na povećanje učestalosti i ozbiljnosti poplava i suša, neophodno je smanjiti zagađenje vodenih ekosistema čiji se efekti na izložene organizme pojačavaju prilikom prirodnih nepogoda.
- Ispitivane vrste riba, deverika, krupatica i crnooka deverika, pokazale su se kao pogodni bioindikator za *in situ* ispitivanja efekata zagađenja na različite nivoe biološke organizacije.
- Oštećenje DNK jedan je od prvih odgovora organizama na zagađenje i predstavlja rani signal upozorenja, dok prisustvo histopatoloških promena reflektuje stanje izazvano dugotrajnim izlaganjem zagađivačima i ukazuje na potencijane štetne efekte i na višim nivoima biološke organizacije.

7 | LITERATURA

7 LITERATURA

- 1881/2006/EC- Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. European Union, 2006.
- Abdel-Moneim, A. M., Al-Kahtani, M. A., Elmenshawy, O. M. (2012). Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88(8), 1028-1035.
- Aboka, E. R., Jian, Z., Shengming, S., Wuxiao, Z., Han, Y., Li, S. Y., Jiahui, Y., Jiabin, Z. (2017). Histopathological changes in gills, liver, and kidney tissues of Bighead carp (*Aristichthys nobilis*) due to the effects of acute high-temperature stress. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, IJA_69.2017.1372*.
- 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.
- Adams, S. M., Greeley, M. S. (2000). Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123(1-4), 103-115.
- Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley Jr, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCarthy, J. F., Hinton, D. E. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, 28(1-4), 459-464.
- Agah, H., Leermakers, M., Elskens, M., Fatemi, S. M. R., Baeyens, W. (2009). Accumulation of trace metals in the muscle and liver tissues of five fish species from the Persian Gulf. *Environmental monitoring and assessment*, 157(1-4), 499.

- Akcha, F., Hubert, F. V., Pfhof-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(1), 21-32.
- Akpoilih, B. U. (2012). Fish ecogenotoxicology: an emerging science, an emerging tool for environmental monitoring and risk assessment. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, Volume 2, 53-64.
- Alazemi, B. M., Lewis, J. W., Andrews, E. B. (1996). Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology*, 17(3), 225-238.
- Albering, H. J., van Leusen, S. M., Moonen, E. J., Hoogewerff, J. A., Kleinjans, J. C. (1999). Human health risk assessment: A case study involving heavy metal soil contamination after the flooding of the river Meuse during the winter of 1993-1994. *Environmental Health Perspectives*, 107(1), 37.
- Alhashemi, A. H., Sekhavatjou, M. S., Kiabi, B. H., Karbassi, A. R. (2012). Bioaccumulation of trace elements in water, sediment, and six fish species from a freshwater wetland, Iran. *Microchemical Journal*, 104, 1-6.
- Alonso, J. L., Soriano, A., Carbajo, O., Amoros, I., Garelick, H. (1999). Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5 C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3746-3749.
- Ameur, W. B., de Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Driss, M. R., Borràs, M. (2012). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Marine pollution bulletin*, 64(2), 241-251.

- Antić, N., Radišić, M., Radović, T., Vasiljević, T., Grujić, S., Petković, A., Dimkić, M., Laušević, M. (2015). Pesticide residues in the Danube River Basin in Serbia—a survey during 2009–2011. *CLEAN—Soil, Air, Water*, 43(2), 197-204.
- Arukwe, A. (2001). Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 643-655.
- Atamanalp, M., Sisman, T., Geyikoglu, F., Topal, A. (2008). The histopathological effects of copper sulphate on Rainbow trout liver (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3, 291-297.
- Atif, F., Kaur, M., Ansari, R. A., Raisuddin, S. (2008). *Channa punctata* brain metallothionein is a potent scavenger of superoxide radicals and prevents hydroxyl radical-induced in vitro DNA damage. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22(3), 202-208.
- ATSDR-Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2002). Arsenic toxicity: case studies in environmental medicine. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin*, 48(9-10), 817-834.
- Authman, M. M., Zaki, M. S., Khallaf, E. A., Abbas, H. H. (2015). Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4), 1.
- Avenant-Oldewage, H. M. (2000). Bioaccumulation of chromium, copper and iron in the organs and tissues of *Clarias gariepinus* in the Olifants River, Kruger National Park. *Water SA*, 26(4), 569-582.
- Azevedo, I., Ramos, S., Mucha, A. P., Bordalo, A. A. (2013). Applicability of ecological assessment tools for management decision-making: a case study from the Lima estuary (NW Portugal). *Ocean & coastal management*, 72, 54-63.

- Baba, A. (2000). Leaching characteristics of wastes from Kemer koy (Mugla-Turkey) power plant. *Global NEST International Journal*, 2(1), 51-57.
- Bagde, U. S., Rangari, A. K. (1999). Periodicity of coliform bacteria in an aquatic environment. *Water science and technology*, 40(7), 151-157.
- Banerjee, T. K. (2007). Histopathology of respiratory organs of certain air-breathing fishes of India. *Fish physiology and biochemistry*, 33(4), 441.
- Barcina, I., Arana, I., Iriberry, J., Egea, L. (1986). Factors affecting the survival of *E. coli* in a river. *Hydrobiologia*, 141(3), 249-253.
- Barišić, J., Dragun, Z., Ramani, S., Filipović Marijić, V., Krasnići, N., Čož-Rakovac, R., Kostov, V., Rebok, K., Jordanova, M. (2015). Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. *Ecotoxicology and environmental safety*, 118, 158-166.
- Bartel, R., Wiśniewolski, W., Prus, P. (2007). Impact of the Włocławek dam on migratory fish in the Vistula River. *Archives of Polish Fisheries*, 15(2), 141-156.
- Becaria, A., Campbell, A., Bondy, S. C. (2002). Aluminum as a toxicant. *Toxicology and Industrial Health*, 18(7), 309-320.
- Belpaeme, K., Cooreman, K., Kirsch-Volders, M. (1998). Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415(3), 167-184.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), 25-34.
- 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.

- Bhattacharya, A., Bhattacharya, S. (2007). Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 178-187.
- Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., van de Bund, W., Zampoukas, N., Hering, D. (2012). Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 18, 31-41.
- Bitton, G. (2005). *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Blust, R. (2011). Cobalt. In: *Fish Physiology* (Vol. 31, pp. 291-326). Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA.
- 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), 11-17.
- Bonde, G. J. (1977). Bacterial indication of water pollution. In: *Advances in aquatic microbiology* (pp. 273-364). Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA.
- Breukelaar, A. W., Lammens, E. H., Breteler, J. G. K., Tatrai, I. (1994). Effects of benthivorous bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*) on sediment resuspension and concentrations of nutrients and chlorophyll a. *Freshwater biology*, 32(1), 113-121.
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Cofalla, C., Roger, S., Kammann, U., Giesy, J. P., Hecker, M., Wiseman, S., Zhang, X., Wölz, J., Schüttrumpf, H., Hollert, H. (2010). A combined hydraulic and toxicological approach to assess re-suspended sediments during simulated flood events. Part I—multiple biomarkers in rainbow trout. *Journal of soils and sediments*, 10(7), 1347-1361.

- Brown, E. R., Hazdra, J. J., Keith, L., Greenspan, I., Kwapinski, J. B. G., Beamer, P. (1973). Frequency of fish tumors found in a polluted watershed as compared to nonpolluted Canadian waters. *Cancer Research*, 33(2), 189-198.
- Budnick, G. E., Howard, R. T., Mayo, D. R. (1996). Evaluation of Enterolert for enumeration of enterococci in recreational waters. *Applied and environmental microbiology*, 62(10), 3881-3884.
- Burger, J. (2006). Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. *Environmental Bioindicators*, 1(1), 22-39.
- Bury, N. R., Walker, P. A., Glover, C. N. (2003). Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of experimental biology*, 206(1), 11-23.
- Bury, N., Grosell, M. (2003). Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(2), 97-105.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C. (2003). Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 81-92.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A. J. M., Rizzoni, M. (2004). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed *in situ* to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(2), 119-129.
- Butler, J. M., Field, K. E., Maruska, K. P. (2016). Cobalt chloride treatment used to ablate the lateral line system also impairs the olfactory system in three freshwater fishes. *PloS one*, 11(7), e0159521.
- Byamukama, D., Mach, R. L., Kansiime, F., Manafi, M., Farnleitner, A. H. (2005). Discrimination efficacy of fecal pollution detection in different aquatic habitats of a

- high-altitude tropical country, using presumptive coliforms, *Escherichia coli*, and *Clostridium perfringens* spores. Applied and environmental microbiology, 71(1), 65-71.
- Cabral, J. P. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. International journal of environmental research and public health, 7(10), 3657-3703.
- Camargo, M. M., Martinez, C. B. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotropical ichthyology, 5(3), 327-336.
- Canale, R. P., Patterson, R. L., Gannon, J. J., Powers, W. F. (1973). Water quality models for total coliform. Journal (Water Pollution Control Federation), 325-336.
- Canpolat, Ö., Çalta, M. (2003). Heavy metals in some tissues and organs of *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843) fish species in relation to body size, age, sex and seasons. Fresenius Environmental Bulletin, 12(9), 961-966.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Ecological applications, 8(3), 559-568.
- Carvalho, M. L., Santiago, S., Nunes, M. L. (2005). Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382(2), 426-432.
- Castro-González, M. I., Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. Environmental toxicology and pharmacology, 26(3), 263-271.
- Çavaş, T., Ergene-Gözükar, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquatic Toxicology, 74(3), 264-271.

- 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 field caging study. *Ecological indicators*, 38, 104-112.
- Celik, U., Oehlenschläger, J. (2004). Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. *Food Chemistry*, 87(3), 343-347.
- Cerqueira, C. C., Fernandes, M. N. (2002). Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(2), 83-91.
- Chezian, A., Senthamilselvan, D., Kabilan, N. (2012). Histological changes induced by ammonia and pH on the gills of fresh water fish *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(7), 588-596.
- Chorvatovičová, D., Kováčiková, Z., Šandula, J., Navarová, J. (1993). Protective effect of sulfoethylglucan against hexavalent chromium. *Mutation Research Letters*, 302(4), 207-211.
- Chowdhury, M. J., Blust, R. (2012). Strontium. In: Wood, C. M., Farrell, A. P., Brauner, C. J. (eds). *Fish Physiology 31(B): Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*. Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA, pp 351-390.
- Clarke, A., Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of animal ecology*, 68(5), 893-905.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. (2016). Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of The Total Environment*, 540, 307-323.
- Corbett, P. A., King, C. K., Stark, J. S., Mondon, J. A. (2014). Direct evidence of histopathological impacts of wastewater discharge on resident Antarctic fish

- (*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica. Marine pollution bulletin, 87(1-2), 48-56.
- Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T., A., Costa, M. H. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. Aquatic toxicology, 92(3), 202-212.
- Culotta, V. C., Yang, M., Hall, M. D. (2005). Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell, 4(7), 1159-1165.
- Ćujić, M., Dragović, S., Đorđević, M., Dragović, R., Gajić, B. (2016). Environmental assessment of heavy metals around the largest coal fired power plant in Serbia. Catena, 139, 44-52.
- da Silva Montes, C., Rosa Filho, J. S., Rocha, R. M. (2011). Histological Biomarker as Diagnostic Tool for Evaluating the Environmental Quality of Guajará Bay – PA – Brazil. Environmental Monitoring, Dr Ema Ekundayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-724-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-monitoring/histological-biomarker-as-diagnostic-tool-forevaluating-the-environmental-quality-of-guajara-bay-pa>.
- da Silva, F. J. R., Lima, F. R. S., do Vale, D. A., do Carmo, M. V. (2013). High levels of total ammonia nitrogen as NH_4^+ are stressful and harmful to the growth of Nile tilapia juveniles. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 35(4), 475-481.
- Dallinger, R., Prosi, F., Segner, H., Back, H. (1987). Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. Oecologia, 73(1), 91-98.
- Dalzell, D. J. B., Macfarlane, N. A. A. (1999). The toxicity of iron to Brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. Journal of Fish Biology, 55(2), 301-315.

- Dalzochio, T., Rodrigues, G. Z. P., Petry, I. E., Gehlen, G., da Silva, L. B. (2016). The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *International Aquatic Research*, 8(4), 283-298.
- Davis III, J. A., Jacknow, J. (1975). Heavy metals in wastewater in three urban areas. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 2292-2297.
- Dawson, A. S., Grimm, A. S. (1980). Quantitative seasonal changes in the protein, lipid and energy content of the carcass, ovaries and liver of adult female plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology*, 16(5), 493-504.
- 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 b). 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 Andrade, V. M., de Freitas, T. R., Da Silva, J. (2004 a). Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560(1), 57-67.
- 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.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 442-448.
- Demirak, A., Yilmaz, F., Tuna, A. L., Ozdemir, N. (2006). Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere*, 63(9), 1451-1458.

- Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P. D. (2002). The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere*, 46(2), 225-233.
- Dobšíková, R., Blahová, J., Modrá, H., Škorič, M., Svobodová, Z. (2012). The effect of acute exposure to herbicide Gardoprim Plus Gold 500 SC on haematological and biochemical indicators and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 80(4), 359-363.
- Doledec, S., Statzner, B. (2008). Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an assessment of specific types of human impact. *Freshwater biology*, 53(3), 617-634.
- Dolomatov, S., Zukow, W., Skomarovskiy, D. (2011). Features nitrogen metabolism fish and methods neutralize the product of nitrogen metabolism fish aquaculture. *Journal of Health Sciences*, 1(3), 13-37.
- Dorronsoro, C., Martin, F., Ortiz, I., García, I., Simón, M., Fernández, E., Aguilar, J., Fernández, J. (2002). Migration of trace elements from pyrite tailings in carbonate soils. *Journal of environmental quality*, 31(3), 829-835.
- Dragun, Z., Roje, V., Mikac, N., Raspor, B. (2009). Preliminary assessment of total dissolved trace metal concentrations in Sava River water. *Environmental Monitoring and Assessment*, 159(1-4), 99.
- Duda, A. M. (1993). Addressing nonpoint sources of water pollution must become an international priority. *Water Science and Technology*, 28(3-5), 1-11.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International journal of physical sciences*, 2(5), 112-118.

- Dus, L., Svobodová, Z., Janous, D., Vykusová, B., Jarkovský, J., Šmíd, R., Pavlis, P. (2005). Bioaccumulation of mercury in muscle tissue of fish in the Elbe River (Czech Republic): multispecies monitoring study 1991–1996. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 61(2), 256-267.
- Eckner, K. F. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3079-3083.
- Einsporn, S., Broeg, K., Köhler, A. (2005). The Elbe flood 2002—toxic effects of transported contaminants in flatfish and mussels of the Wadden Sea. *Marine pollution bulletin*, 50(4), 423-429.
- Eisler, R. (1989). Molybdenum hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. No. FWS-85 (1.19). Patuxent wildlife research center Laurel MD.
- El-Aziz, E. A. A., El-Habashi, N., Yones, E. M. (2011). Histopathological Alterations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Induced by Environmental Contamination In Lake Burullus, Egypt. *Egyptain journal of comparative pathology and clinical pathology*, 24, 93-117.
- Erickson, R. J., Nichols, J. W., Cook, P. M., Ankley, G. T. (2008). Chapter 2. Bioavailability of chemical contaminants in aquatic systems. In: *The Toxicology of Fishes*. Edited by Di Giulio, R.T., Hinton., D. E., CRC Press, Boca Raton. pp. 9-54.
- Escher, M., Wahli, T., Büttner, S., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. (1999). The effect of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*): a cage experiment. *Aquatic Sciences*, 61(2), 93-110.
- 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, 2000.

- European Parliament & Council, 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing directive 76/160/EEC. Official Journal, L 064 (2006), pp. 37-51.
- Exley, C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(3), 380-387.
- Exley, C., Chappell, J. S., Birchall, J. D. (1991). A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *Journal of theoretical biology*, 151(3), 417-428.
- Fanta, E., Rios, F. S. A., Romão, S., Vianna, A. C. C., Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), 119-130.
- Farkas, A., Salánki, J., Specziár, A. (2003). Age-and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low-contaminated site. *Water Research* 37(5):959–964.
- Farkas, A., Salánki, J., Varanka, I. (2000). Heavy metal concentration in fish of Lake Balaton. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 2000(5): 271–279.
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(2), 158-165.
- Fatima, M., Usmani, N., Hossain, M. M. (2014). Heavy metal in aquatic ecosystem emphasizing its effect on tissue bioaccumulation and histopathology: A review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 7(1), 1.

- Fernandes, C., Fontaínhas-Fernandes, A., Cabral, D., Salgado, M. A. (2008). Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal. *Environmental monitoring and assessment*, 136(1-3), 267-275.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., Fontaínhas-Fernandes, A. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(3), 103-109.
- Figueras, M. J., Borrego, J. J., Pike, E. B., Robertson, W., Ashbolt, N. (2000). Sanitary inspection and microbiological water quality. World Health Organization. *Monitoring bathing waters: a practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes*. WHO, 114-167.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary toxicology*, 5(2), 47-58.
- Florea, L., Gheorghe, D. C. (2008). The evolution of freshwater fish feeding groups in Danube River, Braila areas. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 65(2).
- Forbes, V. E., Palmqvist, A., Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), 272-280.
- 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.
- Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D. C., Dunbar, M. J., Edwards, F. K., Grey, J., Hayes, R. B., Hildrew, A. G., Lamouroux, N., Trimmer, M., Woodward, G. (2011). Biomonitoring of human impacts in freshwater ecosystems: the good, the bad and the ugly. In *Advances in ecological research* (Vol. 44, pp. 1-68) Ed: Woodward Guy. Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA, 2011.

- 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.
- Gál, J., Hursthouse, A., Tatner, P., Stewart, F., Welton, R. (2008). Cobalt and secondary poisoning in the terrestrial food chain: data review and research gaps to support risk assessment. *Environment international*, 34(6), 821-838.
- García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Galar-Martinez, M., Cortéz-Barberena, E., Gómez-Oliván, L. M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. (2011). Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(1), 113-118.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, 32(1), 147-156.
- Geldreich, E. E. (1968). *Fecal coliform concepts in stream pollution*. Bureau of Sanitary Engineering, California State Department of Public Health, 1968.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*. Science Publishers, New Hampshire, USA, 2009.
- Giari, L., Dezfuli, B. S., Lanzoni, M., Castaldelli, G. (2012). The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. *Ecotoxicology and environmental safety*, 77, 18-27.
- Goodale, B. C., Walter, R., Pelsue, S. R., Thompson, W. D., Wise, S. S., Winn, R. N., Mitani, H., Wise Sr, J. P. (2008). The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Aquatic toxicology*, 87(1), 60-67.

- Goodyear, K. L., McNeill, S. (1999). Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review. *Science of the Total Environment*, 229(1-2), 1-19.
- Gül, A., Uzel, N., Özkul, A., Erkmen, B., Düzel, S., Gül, G. (2013). Effects of some physicochemical properties of water on histopathological and hematological picture of fish inhabiting Emet Stream.
- Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F. (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International*, 30(5), 605-609.
- Hachich, E. M., Di Bari, M., Christ, A. P. G., Lamparelli, C. C., Ramos, S. S., Sato, M. I. Z. (2012). Comparison of thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* densities in freshwater bodies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 675-681.
- Hadi, A. A., Alwan, S. F. (2012). Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(11).
- Hamilton, S. J., Mehrle, P. M. (1986). Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115(4), 596-609.
- Handy, R. D., Eddy, F. B. (1989). Surface absorption of aluminium by gill tissue and body mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure. *Journal of Fish Biology*, 34(6), 865-874.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.

Has-Schön, E., Bogut, I., Strelec, I. (2006). Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(4), 545-551.

Hermenean, A., Damache, G., Albu, P., Ardelean, A., Ardelean, G., Ardelean, D. P., Horge, M., Nagy, T., Braun, M., Zsuga, M., Kéki, S., Costache, M., Dinischiotu, A. (2015). Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania. *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 198-205.

Hollert, H., Duerr, M., Erdinger, L., Braunbeck, T. (2000). Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the Neckar River (Germany) during a winter flood. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), 528-534.

Hou, X., Amais, R. S., Jones, B. T., Donati, G. L. (2000). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Encyclopedia of analytical chemistry*.

Howe, P., Malcolm, H., Dobson, S. (2004). *Manganese and Its Compounds: Environmental Aspects*, p. 63. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

<http://botanika.biologija.org/exp/comet/Comet-principles.pdf>.

<http://www.fishbase.org/summary/Abramis-brama.html>.

<http://www.fishbase.org/summary/Ballerus-sapa.html>.

<http://www.fishbase.org/summary/Blicca-bjoerkna.html>.

http://www.ittiofauna.org/webmuseum/pesciossei/cypriniformes/cyprinidae/abramis/abramis_brama/index.htm.

http://www.ittiofauna.org/webmuseum/pesciossei/cypriniformes/cyprinidae/blicca/blicca_bjoerkna/index.htm.

http://www.ittiofauna.org/webmuseum/pesciossei/cypriniformes/cyprinidae/ballerus/ballerus_sapa/index.htm.

<http://www.maine.gov/dhhs/mecdc/environmentalhealth/dwp/pws/totalColiform.shtml>.

<https://sites.google.com/a/cord.edu/analytical-chemistry-lab-manual---fall-2015/experiments/icp-aes>.

Huerta-Diaz, M. A., Morse, J. W. (1990). A quantitative method for determination of trace metal concentrations in sedimentary pyrite. *Marine Chemistry*, 29, 119-144.

Iordache, M., Borza, I. (2011). Study of the acute toxicity of some pesticides on earthworms *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). *Research Journal of Agricultural Science*, 43(4), 95-100.

Iqbal, F., Qureshi, I. Z., Ali, M. (2005). Histopathological changes in the liver of a farmed cyprinid fish, *Cyprinus carpio*, following exposure to nitrate. *Pakistan Journal of Zoology*, 37(4), 297-300.

ISO 9308-2 (2012) Water Quality - Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria - Part 2: Most Probable Number Method. Geneva: International Standards Organization.

Jarić, I., Višnjić-Jeftić, Ž., Cvijanović, G., Gačić, Z., Jovanović, L., Skorić, S., Lenhardt, M. (2011). Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98(1), 77-81.

Javed, M., Usmani, N. (2013). Assessment of heavy metal (Cu, Ni, Fe, Co, Mn, Cr, Zn) pollution in effluent dominated rivulet water and their effect on glycogen metabolism and histology of *Mastacembelus armatus*. *SpringerPlus*, 2(1), 390.

Jeziarska, B., Witeska, M. (2006). The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation* (pp. 107-114). Springer, Dordrecht.

- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- Jovanović, J., Kolarević, S., Milošković, A., Radojković, N., Simić, V., Dojčinović, B., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Kostić, J., Sunjog, K., Timilijić, J., Djordjević, J., Gačić, Z., Žegura, B., Vuković-Gačić, B. (2017). Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin *in vitro* and *in situ*. *Science of The Total Environment*, 621, 1289-1299.
- Jovičić, K., Lenhardt, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Đikanović, V., Skorić, S., Smederevac-Lalić, M., Jaćimović, M., Gačić, Z., Jarić, I., Hegediš, A. (2014). Assessment of fish stocks and elemental pollution in the Danube, Sava and Kolubara rivers on the territory of the city of Belgrade, Serbia. *Acta zoologica bulgarica*, 179-184.
- Kamunde, C., Clayton, C., Wood, C. M. (2002). Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(1), R69-R78.
- Kaoud, H. A., El-Dahshan, A. R. (2010). Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. *Nature and science*, 8(4), 147-156.
- Kavka, G. G., Kasimir, G. D., Farnleitner, A. H. (2006). Microbiological water quality of the River Danube (km 2581-km 15): Longitudinal variation of pollution as determined by standard parameters. In "Proceedings 36th International Conference of IAD. Austrian Committee Danube Research/IAD, Vienna," 978-3-9500723-2-7, pp. 415–421.
- Kime, D. E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H. D. M., Ollevier, F. (1996). Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic toxicology*, 36(3-4), 223-237.

- Kirk, R. S., Lewis, J. W. (1993). An evaluation of pollutant induced changes in the gills of rainbow trout using scanning electron microscopy. *Environmental Technology*, 14(6), 577-585.
- Kirschner, A. K. T., Kavka, G., Reischer, G. H., Sommer, R., Blaschke, A. P., Stevenson, M., Vierheilig, J., Mach, R. L., Farnleitner, A. H. (2014). Microbiological water quality of the Danube River: status quo and future perspectives, in: Liska, I. (Ed.), *The Danube River Basin, The Handbook of Environmental Chemistry*, 39: 439–468. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.
- 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.
- 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.
- Kleinow, K. M., Nichols, J. W., Hayton, W. L., Mckim, J. M., Barron, M. G. (2008). Chapter 3. Toxicokinetics in Fishes. In: *The Toxicology of Fishes*. Edited by Di Giulio, R.T., Hinton., D. E., CRC Press, Boca Raton, pp. 55–152.
- Koca, S., Koca, Y. B., Yildiz, Ş., Gürcü, B. (2008). Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes River, Turkey. *Biological Trace Element Research*, 122(3), 276-291.
- Kohl, W. (1975). Über die Bedeutung bakteriologischer Untersuchungen für die Beurteilung von Fließgewässern, dargestellt am Beispiel der österreichischen Donau. *Veröffentlichungen der Arbeitsgemeinschaft Donauforschung*, 392-461.

- Koivusaari, U., Harri, M., Hänninen, O. (1981). Seasonal variation of hepatic biotransformation in female and male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 70(2), 149-157.
- 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., Vuković-Gačić, B. (2016 a). Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. *PloS one*, 11(9), e0162450.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2011). Assessment of the microbiological quality of the river Tisa in Serbia. *Water Research and Management*, 1(2), 57-61.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Kračun, M., Vasiljević, B., Tomović, J., Vuković-Gačić, B., Gačić, Z. (2013). Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere*, 93(2), 243-251.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Vasiljević, B., Kračun, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2012). Seasonal variations of microbiological parameters of water quality of the Velika Morava river Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 64(3), 1017-1027.
- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2016 b). 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.
- Koponen, K., Myers, M. S., Ritola, O., Huuskonen, S. E., Lindström-Seppä, P. (2001). Histopathology of feral fish from a PCB-contaminated freshwater lake. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, 30(3), 122-126.

- 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, 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.
- Kraal, M. H., Kraak, M. H., DeGroot, C. J., Davids, C. (1995). Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31(2), 179-183.
- Kračun-Kolarević, M. (2017). Primena akvatičnih oligoheta (Tubificidae) u *in situ* i *ex situ* ekogenotoksikološkim istraživanjima. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Krüger, R., Pietrock, M., Meinelt, T., Yoshida, T., Steffens, W., Steinberg, C. (1996). Distribution of macrophage centres in bream (*Abramis brama* L.) liver from the Oder river (Germany/Poland) within the nature reserve "Unteres Odertal" near the town of Schwedt. *International Review of Hydrobiology*, 81(4), 635-644.
- Kumar, V., Gill, K. D. (2009). Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Archives of toxicology*, 83(11), 965-978.
- 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.
- Labry, C., Delmas, D., Herbland, A. (2005). Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318(2), 213-225.

- Laurent, P., Dunel-Erb, S. (1984). 9 The Pseudobranch: Morphology and Function. *Fish physiology*, 10, 285-323.
- Laznik, M., Stålnacke, P., Grimvall, A., Wittgren, H. B. (1999). Riverine input of nutrients to the Gulf of Riga—temporal and spatial variation. *Journal of Marine Systems*, 23(1-3), 11-25.
- Lease, H. M., Hansen, J. A., Bergman, H. L., Meyer, J. S. (2003). Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 134(4), 491-500.
- Lee, R. F., Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1), 43-64.
- Lenhardt, M., Jarić, I., Višnjić-Jeftić, Ž., Skorić, S., Gačić, Z., Pucar, M., Hegediš, A. (2012). Concentrations of 17 elements in muscle, gills, liver and gonads of five economically important fish species from the Danube River. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (407), 02.
- Lenhardt, M., Poleksić, V., Vuković-Gačić, B., Rašković, B., Sunjog, K., Kolarević, S., Jarić, I., Gačić, Z. (2015). Integrated use of different fish related parameters to assess the status of water bodies. *Slovenian Veterinary Research*, 52(1).
- Li, L., Zheng, B., Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia environmental sciences*, 2, 1510-1524.
- Liber, K., Goodfellow, W., Den Besten, P., Clements, W., Galloway, T., Gerhardt, A., Green, A., Simpson, S. (2007). *In situ*-based effects measures: considerations for improving methods and approaches. *Integrated environmental assessment and management*, 3(2), 246-258.

- Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodník, J. (2015). Joint Danube Survey 3-A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. Final Scientific Report, International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, Austria, 335.
- Lloyd, R. (1961). Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Journal of Experimental Biology*, 38(2), 447-455.
- Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157(2), 561-568.
- Loos, R., Locoro, G., Contini, S. (2010). Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water research*, 44(7), 2325-2335.
- Lujić, J., Matavulj, M., Poleksić, V., Rašković, B., Marinović, Z., Kostić, D., Miljanović, B. (2015). Gill reaction to pollutants from the Tamiš River in three freshwater fish species, *Esox lucius* L. 1758, *Sander lucioperca* (L. 1758) and *Silurus glanis* L. 1758: a comparative study. *Anatomia, histologia, embryologia*, 44(2), 128-137.
- Lynn, S., Lai, H. T., Gurr, J. R., Jan, K. Y. (1997). Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis*, 12(5), 353-358.
- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630-648.
- Manning, F. C., Blankenship, L. J., Wise, J. P., Xu, J., Bridgewater, L. C., Patierno, S. R. (1994). Induction of internucleosomal DNA fragmentation by carcinogenic chromate: relationship to DNA damage, genotoxicity, and inhibition of macromolecular synthesis. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 3), 159.

- Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192, 3-16.
- Marchand, M. J., Van Dyk, J. C., Barnhoorn, I. E., Wagenaar, G. M. (2012). Histopathological changes in two potential indicator fish species from a hyper-eutrophic freshwater ecosystem in South Africa: a baseline study. *African journal of aquatic science*, 37(1), 39-48.
- Marchand, M. J., Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M., Barnhoorn, I. E. J., Bornman, M. S. (2009). Histopathological alterations in the liver of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in South Africa. *Environmental toxicology*, 24(2), 133-147.
- Markert, B. (2007). Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 77-82.
- Martin, S., Griswold, W. (2009). Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology briefs for citizens*, 15, 1-6.
- Martins Silva Santos, D., Ferreira Cruz, C., Pestana Pereira, D., Coelho Alves, L. M., Ruas de Moraes, F. (2012). Microbiological water quality and gill histopathology of fish from fish farming in Itapecuru-Mirim County, Maranhão State. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 34(2).
- Matavulj, M., Gajin, S., Erbeznik, M., Bokorov, M., Petrovic, O. (1989). Phosphatase activity of water as a parameter of the river tisa water monitoring. *Tiscia TSCAB* 8, 23, pp. 29-36.
- McNeely, R. N., Neimanis, V. P., Dwyer, L. (1979). Molybdenum. *Water Quality Sourcebook: A Guide to Water Quality Parameters*. Water Quality Branch, Inland Waters Directorate, Environment Canada, Ottawa, ON. PMID, 25121236.

- Mendel, J., Marešová, E., Papoušek, I., Halačka, K., Vetešník, L., Šanda, R., Koničková, M., Urbánková, S. (2012). Molecular biodiversity inventory of the ichthyofauna of the Czech Republic, analysis of genetic variation in animals. In: Analysis of Genetic Variation in Animals. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 287-314.
- Michael, M. I., Hilmy A. M., El-Domiaty N. A., Wershana K. (1987). Serum transaminases activity and histopathological changes in *Clarias lazera* chronically exposed to nitrite. Comparative Biochemistry and Physiology C, 86, 255–262.
- Mishra, A. K., Mohanty, B. (2008). Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Environmental Toxicology and Pharmacology, 26(2), 136-141.
- Mishra, A. K., Mohanty, B. (2009). Chronic exposure to sublethal hexavalent chromium affects organ histopathology and serum cortisol profile of a teleost, *Channa punctatus* (Bloch). Science of the total environment, 407(18), 5031-5038.
- Mitchelmore, C. L., Chipman, J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399(2), 135-147.
- Mohamed, F. A. (2008). Bioaccumulation of selected metals and histopathological alterations in tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from Lake Nasser, Egypt. Global Veterinaria, 2(4), 205-218.
- Mohamed, F. A. (2009). Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. World Journal of Fish and Marine Sciences, 1(1), 29-39.
- Molnár, K., Cech, G., Székely, C. (2011). Histological and molecular studies of species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea) in the gills of *Abramis*, *Blicca* and *Vimba* spp.(Cyprinidae), with the redescription of *M. macrocapsularis* Reuss, 1906 and *M. bliccae* Donec & Tozzyakova, 1984. Systematic parasitology, 79(2), 109-121.

- Monteiro, V., Cavalcante, D. G. S. M., Viléla, M. B. F. A., Sofia, S. H., Martinez, C. B. R. (2011). *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*, 104(3-4), 291-298.
- Mueller, M. E., Sanchez, D. A., Bergman, H. L., McDonald, D. G., Rhem, R. G., Wood, C. M. (1991). Nature and time course of acclimation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. Gill histology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(10), 2016-2027.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., Blazer, V. (2007). *Fish Histology and Histopathology*, U.S. Fish and Wildlife Services (USFWS). National Conservation Training Center (NCTC).
- Mustafa, S. A., Al-Subiai, S. N., Davies, S. J., Jha, A. N. (2011). Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology*, 20(6), 1455-1466.
- Ng, J. C., Wang, J., Shraim, A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, 52(9), 1353-1359.
- Nussey, H. H. (2000). Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water SA*, 26(2), 269-284.
- Obiri-Danso, K., Jones, K. (1999). Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in northwest England. *Journal of Applied Microbiology*, 87(6), 822-832.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2), 109-149.
- Olmedo, P., Pla, A., Hernández, A. F., Barbier, F., Ayouni, L., Gil, F. (2013). Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish

- and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environment international*, 59, 63-72.
- Olojo, E. A. A., Olurin, K. B., Oluwemimo, A. D. (2005). Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 117.
- Omar, W. A., Zaghloul, K. H., Abdel-Khalek, A. A., Abo-Hegab, S. (2013). Risk assessment and toxic effects of metal pollution in two cultured and wild fish species from highly degraded aquatic habitats. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 65(4), 753-764.
- Oremland, R. S., Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939-944.
- Ormerod, S. J., Dobson, M., Hildrew, A. G., Townsend, C. (2010). Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 55(s1), 1-4.
- Osman, A. G., Abuel-Fadl, K. Y., Kloas, W. (2012). *In situ* evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(1), 14-21.
- Ostling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.
- Ouyang, Y., Nkedi-Kizza, P., Wu, Q. T., Shinde, D., Huang, C. H. (2006). Assessment of seasonal variations in surface water quality. *Water research*, 40(20), 3800-3810.
- Overstreet, R. M. (1988). Aquatic pollution problems, Southeastern US coasts: histopathological indicators. *Aquatic Toxicology*, 11(3-4), 213-239.

- Paerl, H. W., Pinckney, J. L., Fear, J. M., Peierls, B. L. (1998). Ecosystem responses to internal and watershed organic matter loading: consequences for hypoxia in the eutrophying Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 17-25.
- Pailler, J. Y., Guignard, C., Meyer, B., Iffly, J. F., Pfister, L., Hoffmann, L., Krein, A. (2009). Behaviour and fluxes of dissolved antibiotics, analgesics and hormones during flood events in a small heterogeneous catchment in the Grand Duchy of Luxembourg. *Water, air, and soil pollution*, 203(1-4), 79-98.
- Paolini, A., Berti, M., D'Angelo, A., Giansante, C. (2005). Use of histopathologic indicators on chubs (*Leuciscus cephalus*) and brown trout (*Salmo trutta fario*) in evaluating river environments. *Veterinaria italiana*, 41(3), 189-198.
- Paulino, M. G., Benze, T. P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M. M., Fernandes, J. B., Fernandes, M. N. (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the Total Environment*, 497, 293-306.
- Pavlović, P., Mitrović, M., Djurdjević, L. (2004). An ecophysiological study of plants growing on the fly ash deposits from the “Nikola Tesla–A” thermal power station in Serbia. *Environmental management*, 33(5), 654-663.
- Perea, S., Böhme, M., Zupančič, P., Freyhof, J., Šanda, R., Özuluğ, M., Abdoli, A., Doadrio, I. (2010). Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 265.
- Pereira, P., De Pablo, H., Vale, C., Pacheco, M. (2010). Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system—Gills reflect environmental contamination. *Marine environmental research*, 69(2), 53-62.

- Pereira, S., Cavalie, I., Camilleri, V., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C. (2013). Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 750(1), 19-26.
- Petrović, A. M., Dragičević, S. S., Radić, B. P., Pešić, A. Z. M. (2015). Historical torrential flood events in the Kolubara river basin. *Natural Hazards*, 79(1), 537-547.
- Petrović, O., Gajin, S., Matavulj, M., Radnović, D., Svirčev, Z. (1998). Mikrobiološko ispitivanje kvaliteta površinskih voda. Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju.
- Pinsino, A., Matranga, V., Roccheri, M. C. (2012). Manganese: a new Emerging Contaminant in the Environment. In: *Environmental Contamination*, Jatin Srivastava ed, pp. 17-36. InTech Open Access Publisher: Rijeka, Croatia.
- Playle, R. C. (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment*, 219(2-3), 147-163.
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sanchez-Pérez, J. M., Pinelli, E. (2011). Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 126-134.
- Polat, I. M., Durmaz, S., Yağci, I. P., Korkmaz, Ö (2016, August). The effects of lactation on reproductive parameters in mares. Poster session presented at 1st international congress on advances in veterinary sciences and technics (ICAVST), Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.
- Poleksić, V., Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, 339-52.
- Popović, N. Z., Đuknić, J. A., Atlagić, J. Ž. Č., Raković, M. J., Marinković, N. S., Tubić, B. P., Paunović, M. M. (2016). Application of the Water Pollution Index in

- the Assessment of the Ecological Status of Rivers: a Case Study of the Sava River, Serbia. *Acta Zoologica Bulgarica*, 68 (1), 97-102.
- Popović, V., Subić, J., Jeločnik, M. (2012). Sustainable land management in agriculture-Obrenovac Municipality (Serbia) case study. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*.
- Pruski, A. M., Dixon, D. R. (2002). Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic toxicology*, 57(3), 127-137.
- Rašković, B., Jarić, I., Koko, V., Spasić, M., Dulić, Z., Marković, Z., Poleksić, V. (2013). Histopathological indicators: a useful fish health monitoring tool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) culture. *Open Life Sciences*, 8(10), 975-985.
- Rašković, B., Poleksić, V., Višnjić-Jeftić, Ž., Skorić, S., Gačić, Z., Djikanović, V., Jarić, I., Lenhardt, M. (2015). Use of histopathology and elemental accumulation in different organs of two benthophagous fish species as indicators of river pollution. *Environmental toxicology*, 30(10), 1153-1161.
- Rašković, B., Poleksić, V., Živić, I., Spasić, M. (2010). Histology of carp (*Cyprinus carpio* L.) gills and pond water quality in semiintensive production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16(3), 253-262.
- Regoli, F. (1998). Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(1), 48-63.
- Regoli, L., Van Tilborg, W., Heijerick, D., Stubblefield, W., Carey, S. (2012). The bioconcentration and bioaccumulation factors for molybdenum in the aquatic environment from natural environmental concentrations up to the toxicity boundary. *Science of the Total Environment*, 435, 96-106.

- Reid, S. D. (2002). Physiological impact of acute molybdenum exposure in juvenile kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(3), 355-367.
- Reid, S. D. (2011) Molybdenum and Chromium. In: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Wood CM, Farrell AP, Brauner C, editors. *Fish Physiology Vol. 31A*. Elsevier, pp. 375–416.
- Reischer, G. H., Haider, J. M., Sommer, R., Stadler, H., Keiblinger, K. M., Hornek, R., Zerobin, W., Mach, R. L., Farnleitner, A. H. (2008). Quantitative microbial faecal source tracking with sampling guided by hydrological catchment dynamics. *Environmental microbiology*, 10(10), 2598-2608.
- Rocha, E., Monteiro, R. A., Pereira, C. A. (1995). Microanatomical organization of hepatic stroma of the brown trout, *Salmo trutta fario* (Teleostei, Salmonidae): A qualitative and quantitative approach. *Journal of Morphology*, 223(1), 1-11.
- Rocha, E., Monteiro, R. A., Pereira, C. A. (1997). Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. *The Anatomical Record*, 247(3), 317-328.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roubin, M. R., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of microbiological methods*, 49(1), 31-54.
- Roth, J. A. (2006). Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biological research*, 39(1), 45-57.
- Rydberg, B., Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. *DNA repair mechanisms*. Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA, pp 465-468.
- Salanki, J., Katalin, V., Berta, E. (1982). Heavy metals in animals of Lake Balaton. *Water Research* 16(7), 1147–1152.

- Salem, Z. B., Capelli, N., Laffray, X., Elise, G., Ayadi, H., Aleya, L. (2014). Seasonal variation of heavy metals in water, sediment and roach tissues in a landfill draining system pond (Etueffont, France). *Ecological Engineering*, 69, 25-37.
- Sandhu, S. S., Lower, W. R. (1989). *In situ* assessment of genotoxic hazards of environmental pollution. *Toxicology and industrial health*, 5(1), 73-83.
- Santos, D., Melo, M. R. S., Mendes, D. C. S., Rocha, I. K., Silva, J. P. L., Cantanhêde, S. M., Meletti, P. C. (2014). Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *International journal of environmental research and public health*, 11(12), 12927-12937.
- Schlenk, D., Benson, W. H. (Eds.). (2003). Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: Organs. CRC press, London and New York: Taylor and Francis.
- Schmidt, H., Bernet, D., Wahli, T., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. (1999). Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. *Journal of Fish Biology*, 54(3), 585-596.
- Schoonen, M. A. (2004). Mechanisms of sedimentary pyrite formation. *Special papers-geological society of America*, 117-134.
- Seki, E., Schwabe, R. F. (2015). Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*, 61(3), 1066-1079.
- 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.
- Shahi, N., Sarma, D., Pandey, J., Das, P., Sarma, D., Mallik, S. K. (2016). Impact of acid mine drainage on haematological, histopathological and genotoxic effects in golden mahaseer, *Tor putitora*. *Journal of environmental biology*, 37(4), 509.

- Shi, H., Hudson, L. G., Liu, K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 582-593.
- Shugart, L. R. (2000). DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9(5), 329-340.
- Simonović, P. (2001). *Ribe Srbije*. Biološki fakultet, Zavod za zaštitu prirode Srbije i NNK International, Beograd.
- 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.
- Sinton, L. W., Donnison, A. M., Hastie, C. M. (1993). Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part II: Sanitary significance, survival, and use. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 27(1), 117-137.
- Slooff, W., Van Kreijl, C. F., Baars, A. J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4(1), 1-14.
- Službeni glasnik RS (2011). Pravilnik o parametrima hemijskog i ekološkog statusa br. 74/2011.
- Službeni glasnik RS (2012). Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje br. 50/12.
- 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.

- Sollid, J., Nilsson, G. E. (2006). Plasticity of respiratory structures—adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(1-2), 241-251.
- Sorensen, E. M., Henry, R. E., Ramirez-Mitchell, R. (1979). Arsenic accumulation, tissue distribution and cytotoxicity in teleosts following indirect aqueous exposures. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 21(1), 162-169.
- Sorensen, E. M., Ramirez-Mitchell, R., Harlan, C. W., Bell, J. S. (1980). Cytological changes in the fish liver following chronic, environmental arsenic exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 25(1), 93-99.
- Sörme, L., Lagerkvist, R. (2002). Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *Science of the Total Environment*, 298(1-3), 131-145.
- Squier, M. K., Cohen, J. J. (2001). Standard quantitative assays for apoptosis. *Molecular biotechnology*, 19(3), 305-312.
- Srivastava, A. K., Agrawal, S. J. (1983). Changes induced by manganese in fish testis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 39(11), 1309-1310.
- Stalović, B., Đorđević, S. (2013). Optička emisiona spektroskopija sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP/OES) kao analitička tehnika za detekciju teških metala u biološkom materijalu. *Medical Data Review*, 5(1), 053-057.
- Stevens, A., Wilson, I. (1996). The haematoxylin and eosin. In: Bancroft JD, Stevens A, Turner DR, editors. *Theory and practice of histological techniques*, 4th ed. Hong Kong: Churchill Livingstone; 1996 p. 99-112.
- Subotić, S., Spasić, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Hegediš, A., Krpo-Ćetković, J., Mićković, B., Skorić, S., Lenhardt, M. (2013). Heavy metal and trace element bioaccumulation in target tissues of four edible fish species from the Danube River (Serbia). *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 196-202.

- Sunjog, K., Gačić, Z., Kolarević, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Jarić, I., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2012). Heavy metal accumulation and the genotoxicity in barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube River pollution. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2013). Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(14), 4879-4885.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Gačić, Z., Skorić, S., Đikanović, V., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2014). Variability in DNA damage of chub (*Squalius cephalus* L.) blood, gill and liver cells during the annual cycle. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(3), 967-974.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Skorić, S., Gačić, Z., Lenhardt, M., Vasić, N., Vuković-Gačić, B. (2016). Assessment of status of three water bodies in Serbia based on tissue metal and metalloid concentration (ICP-OES) and genotoxicity (comet assay). *Environmental Pollution*, 213, 600-607.
- Sushil, S., Batra, V. S. (2006). Analysis of fly ash heavy metal content and disposal in three thermal power plants in India. *Fuel*, 85(17-18), 2676-2679.
- Svobodová, Z., Lloyd, R., Máchová, J., Vykusová, B. (1993). Water quality and fish health. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Szkoda, J., Żmudzki, J., Nawrocka, A., Kmiecik, M. (2014). Toxic elements in free-living freshwater fish, water and sediments in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58(4), 589-595.
- Teh, S. J., Adams, S. M., Hinton, D. E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, 37(1), 51-70.

- Temmink, J. H. M., Bouwmeister, P. J., De Jong, P., Van Den Berg, J. H. J. (1983). An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic toxicology*, 4(2), 165-179.
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, F., Jovančić, P., Jabučar, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the total environment*, 399(1-3), 66-77.
- Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O., Singh, N. P. (1991). The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. In *Biological Reactive Intermediates IV* (pp. 157-164). Springer, Boston, MA.
- Triebkorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H. R. (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment*, 141(1-3), 177-188.
- 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(1-3), 47-57.
- Tuzen, M., Soylak, M. (2007). Determination of trace metals in canned fish marketed in Turkey. *Food Chemistry*, 101(4), 1378-1382.
- 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.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.

- Van Dyk, J. C., Cochrane, M. J., Wagenaar, G. M. (2012). Liver histopathology of the sharp-tooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87(4), 301-311.
- Van Dyk, J. C., Marchand, M. J., Smit, N. J., Pieterse, G. M. (2009). A histology-based fish health assessment of four commercially and ecologically important species from the Okavango Delta panhandle, Botswana. *African Journal of Aquatic Science*, 34(3), 273-282.
- Vasanthi, L. A., Revathi, P., Mini, J., Munuswamy, N. (2013). Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere*, 91(8), 1156-1164.
- Vega, M., Pardo, R., Barrado, E., Debán, L. (1998). Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water research*, 32(12), 3581-3592.
- Velimirović, D. (2013). Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u realnim uzorcima, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu.
- Velma, V., Tchounwou, P. B. (2010). Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 698(1), 43-51.
- Velma, V., Vutukuru, S. S., Tchounwou, P. B. (2009). Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Reviews on environmental health*, 24(2), 129-146.
- Venkateswarlu, V. (1986). Ecological studies on the rivers of Andhra Pradesh with special reference to water quality and pollution. *Proceedings: Plant Sciences*, 96(6), 495-508.

- Verstraeten, S. V., Aimo, L., Oteiza, P. I. (2008). Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of toxicology*, 82(11), 789-802.
- Vicente-Martorell, J. J., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., Granado-Castro, M. D. (2009). Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), 823-836.
- Vinodhini, R., Narayanan, M. (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science & Technology*, 5(2), 179-182.
- Višnjić-Jeftić, Ž., Jarić, I., Jovanović, L., Skorić, S., Smederevac-Lalić, M., Nikčević, M., Lenhardt, M. (2010). Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). *Microchemical journal*, 95(2), 341-344.
- Vrana, B., Smedes, F., Rusina, T., Okonski, K., Allan, I., Grung, M., Hilscherova, K., Novák, J., Tarábek, P., Slobodnik, J., (2015). Passive sampling: chemical analysis and toxicological profiling. In: Liska, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodnik, J. (Eds.), *Joint Danube survey 3. A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality*. ICPDR — International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, pp. 304–315.
- Vranković, J. (2015). Environmental impact on the antioxidant responses in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Veneroida: Corbiculidae) from the Danube River. *Italian journal of zoology*, 82(3), 378-386.
- Vrzel, J., Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Gačić, Z., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Aborgiba, M., Farnleitner, A., Reischer, G., Linke, R., Paunović, M., 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, Z., Radenković, M., Stanković, S. J., Vuković, D. (2011). Distribution and accumulation of heavy metals in the water and sediments of the River Sava. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(5), 795-803.
- Wang, S. (2006). Cobalt—Its recovery, recycling, and application. *Journal of The Minerals, Metals and Materials Society (JOM)*, 58(10), 47-50.
- Wang, Y. S., Gonzalez, R. J., Patrick, M. L., Grosell, M., Zhang, C., Feng, Q., Du, J., Walsh, P. J., Wood, C. M. (2003). Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134: 409-421.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151(1-4), 185-207.
- 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.
- Wendelaar Bonga, S. E., Lock, R. A. C. (1991). Toxicants and osmoregulation in fish. *Netherlands Journal of Zoology*, 42(2), 478-493.
- Wepener, V., Van Vuren, J. H. J., Chatiza, F. P., Mbizi, Z., Slabbert, L., Masola, B. (2005). Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 30(11-16), 751-761.
- White, P. A., Rasmussen, J. B. (1998). The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 410(3), 223-236.

- WHO 1958. International standards for drinking-water. World Health Organisation, Geneva (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43845/1/a91160.pdf?ua=1>).
- WHO 1998. Copper. Environmental Health Criteria 200. IPCS-International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.
- WHO 2003. Barium in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/76) (http://www.who.int/water_sanitation_health/waterquality/guidelines/chemicals/barium-background-jan17.pdf).
- Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker, N., Topp, E., Lapen, D. R. (2009). Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water research*, 43(8), 2209-2223.
- Wolf, J. C., Wolfe, M. J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 75-85.
- Wood, C. M. (2001). Toxic responses of the gill. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts, 1, 1-89.
- Wood, C. M. (2011). An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In *Fish physiology* (Vol. 31, pp. 1-51). Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA.
- Wurgler, F. E., Kramers, P. G. N. (1992). Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*, 7(5), 321-327.
- Yamaguchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B. C., Miura, T. (2007). Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and

organochlorines on spermatogenesis in fish: monitoring at Mekong Delta area and *in vitro* experiment. *Aquatic toxicology*, 83(1), 43-51.

Yildirim, M. Z., Benli, A., Selvi, M., Özkul, A., Erkoç, F., Koçak, O. (2006). Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. *Environmental toxicology*, 21(6), 614-620.

Yılmaz, A. B., Sangün, M. K., Yağlıoğlu, D., Turan, C. (2010). Metals (major, essential to non-essential) composition of the different tissues of three demersal fish species from Iskenderun Bay, Turkey. *Food chemistry*, 123(2), 410-415.

Younis, E. M., Abdel-Warith, A. A., Al-Asgah, N. A., Ebaid, H., Mubarak, M. (2013). Histological changes in the liver and intestine of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to sublethal concentrations of cadmium. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(3), 833-841.

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.

Zhu, Y., Wang, J., Bai, Y., Zhang, R. (2004). Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 72(1), 78-86.

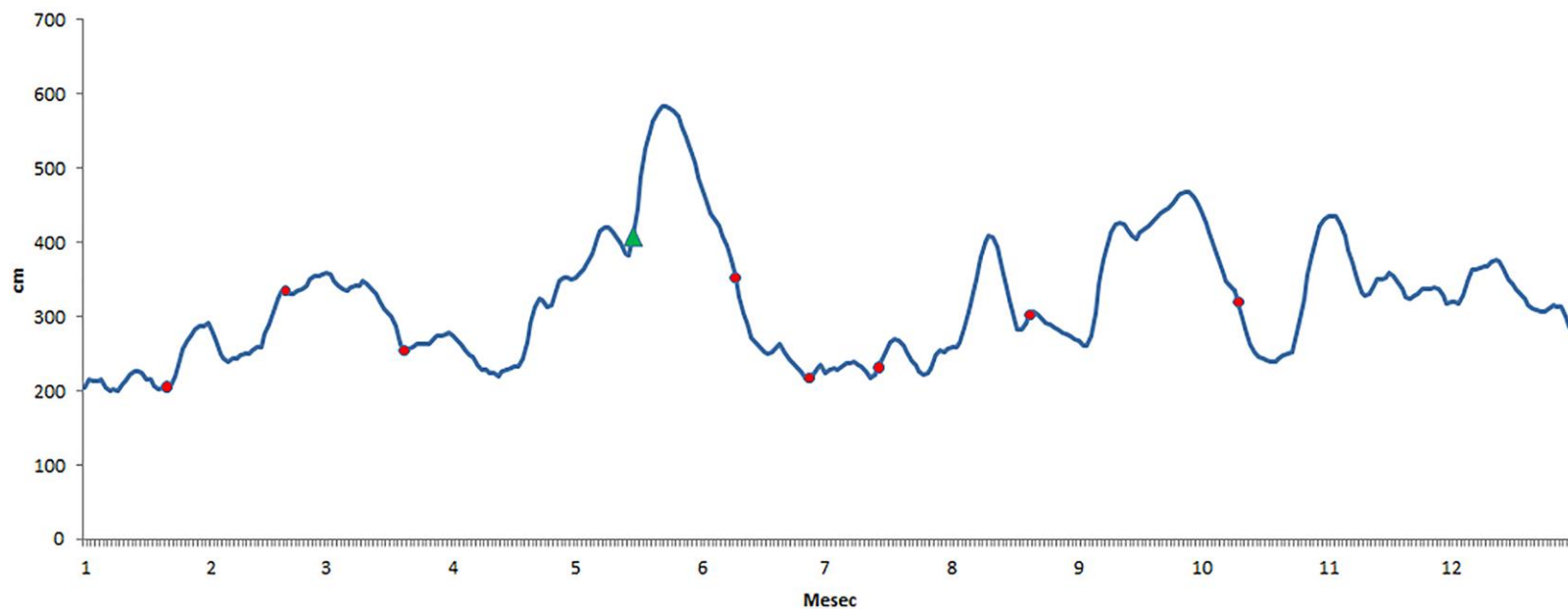
8 | PRILOG

8 PRILOG

Tabela 8.1. Koncentracije specifičnih zagađujućih materija u vodi sa merne stanice Ostružnica

		Januar	Februar	Mart	Maj/Jun (Sr. vr. ±SD)	Jul	Avgust	Oktobar
Gvožđe (Fe)	µg/L	403,7	645,0	306,5	418,7±22,9	151,9	399,1	165,0
Mangan (Mn)	µg/L	28,0	32,8	31,7	50,0±24,9	25,6	35,3	34,0
Cink (Zn)	µg/L	11,8	19,9	32,9	19,9±9,5	< 1	28,2	44,0
Bakar (Cu)	µg/L	4,2	6,6	5,0	4,7±0,5	1,6	10,6	20,0
Hrom (Cr)-uk	µg/L	2,2	1,7	2,2	1,8±0,3	2,2	5,9	3,6
Olovo (Pb)	µg/L	1,3	1,9	1,2	2,4±0,4	0,7	1,4	< 2,0
Kadmijum (Cd)	µg/L	0,06	0,05	0,05	0,08±0,03	0,03	0,08	/
Nikl (Ni)	µg/L	1,7	2,2	6,0	3,9±0,1	2,2	10,2	/
Aluminijum (Al)	µg/L	315,2	401,5	194,0	270,9±7,3	103,7	330,9	/
Kobalt (Co)	µg/L	0,6	0,6	0,8	0,9±0,3	0,6	0,7	/
Bor (B)	µg/L	19,8	18,7	14,2	21,7±6,3	23,2	17,1	/
Arsen (As)	µg/L	1,6	0,9	0,8	1,6±0,8	1,7	3,0	< 1,1
Gvožđe (Fe)-r	µg/L	142,2	73,0	20,5	49,7±31,7	43,2	44,8	< 20,0
Mangan (Mn)-r	µg/L	25,8	< 10,0	< 10,0	19,9±9,5	12,8	11,4	24,0
Cink (Zn)-r	µg/L	5,8	9,4	2,4	1,8	< 1,0	/	42,0
Bakar (Cu)-r	µg/L	2,3	1,5	1,5	1,3±0,3	< 1,0	8,5	16,0
Hrom (Cr)-uk.r	µg/L	0,7	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,4	1,3
Olovo (Pb)-r	µg/L	< 0,5	< 0,5	< 0,5	1,3	< 0,5	0,8	< 2,0
Kadmijum (Cd)- r	µg/L	0,03	0,05	0,05	0,08	0,03	/	/
Nikl (Ni)-r	µg/L	0,8	0,8	1,5	1,6±0,6	1,4	3,6	2,7
Aluminijum (Al)-r	µg/L	154,5	91,0	10,8	59,3	59,2	47,3	/
Kobalt (Co)- r	µg/L	< 0,5	< 0,5	0,5	0,6	< 0,5	< 0,5	/
Bor (B)- r	µg/L	19,8	18,7	13,0	16,3±3,7	20,5	17,1	/
Arsen (As)-r	µg/L	1,6	0,7	0,5	1,1±0,8	1,7	1,6	< 1,1
Atrazin	µg/L	/	0,008	0,005	0,009±0,004	/	/	< 0,01
Terbutilazin	µg/L	/	0,006	0,005	0,100±0,052	/	/	0,052
Desetilterbutilazin	µg/L	/	0,003	0,003	0,011±0,006	/	/	< 0,01
Acetohlor	µg/L	/	0,005	< 0,001	0,092±0,077	/	/	< 0,01
Metolahlor	µg/L	/	0,006	0,004	0,050±0,028	/	/	0,022

* uk- ukupni; r- rastvoreni

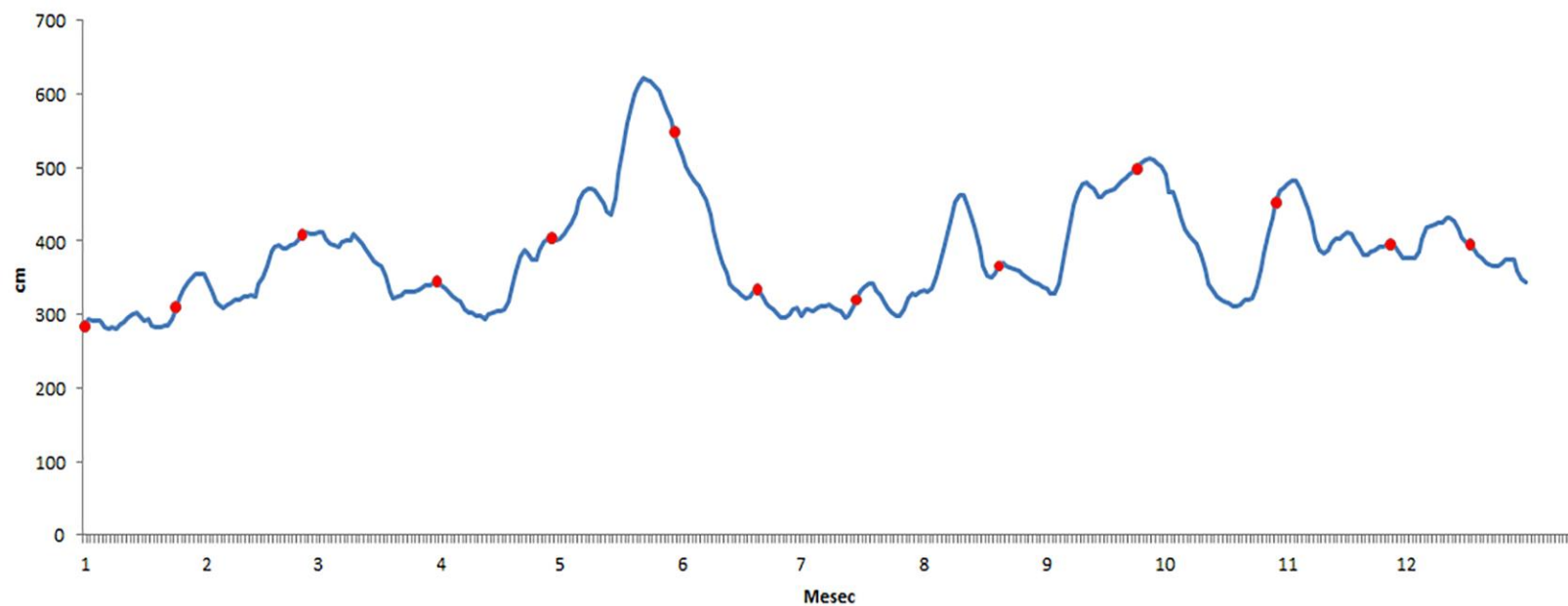


Slika 8.1. Vrednosti vodostaja reke Save izmerene na mernoj stanici Beograd tokom 12 meseci 2014. godine (RHMZ). Crvenom tačkom označene su vrednosti izmerene na dan uzorkovanja, a zeleni trougao označava dan kada su nastupile poplave na ispitivanom lokalitetu

Tabela 8.2. Koncentracije specifičnih zagađujućih materija u vodi sa merne stanice Vinča

	Januar	Februar	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Septembar	Oktobar	Novembar	Decembar
Gvožđe (Fe)	555,5	552,9	1797,0	280,2	624,5	333,7	139,9	354,5	479,1	140,0	712,0	311,3
Mangan (Mn)	22,3	35,5	151,6	27,3	41,4	41,8	23,4	27,4	42,9	48,0	59,0	24,4
Cink (Zn)	19,1	40,0	36,0	10,5	14,3	8,0	5,5	21,3	18,4	54,0	35,0	26,5
Bakar (Cu)	4,3	14,4	6,5	6,8	4,8	3,6	3,7	8,3	5,4	18,0	29,2	5,6
Hrom (Cr)-uk	5,4	2,4	5,4	1,6	2,3	0,9	1,3	4,2	2,5	4,7	1,9	2,3
Olovo (Pb)	1,2	2,5	5,5	1,3	1,6	1,6	1,4	1,1	1,6	< 2,0	2,2	1,2
Kadmijum (Cd)	0,06	0,09	0,11	0,06	/	0,03	0,06	0,04	0,04	/	0,08	/
Nikl (Ni)	3,1	3,5	6,1	1,7	3,7	2,2	2,1	5,1	3,6	8,0	3,0	2,2
Aluminijum (Al)	462,8	359,0	1131,0	161,8	376,1	220,2	93,3	240,8	333,0	/	/	194,9
Kobalt (Co)	0,5	0,6	1,8	0,7	0,8	0,9	0,6	0,5	0,6	/	/	0,6
Bor (B)	24,1	18,5	16,9	20,1	19,1	26,8	28,4	13,7	29,9	/	/	28,0
Arsen (As)	1,5	0,9	1,7	1,0	1,2	2,2	2,1	2,9	1,6	< 1,1	< 1,1	1,2
Gvožđe (Fe)-r	148,8	75,8	11,6	< 10,0	38,5	41,8	26,8	16,3	56	< 20,0	150,0	18,9
Mangan (Mn)-r	10,5	< 10,0	< 10,0	< 10,0	36,6	14,9	10,1	10,4	< 10,0	12,0	12,0	< 10,0
Cink (Zn)-r	7,3	12,7	3,5	5,0	/	< 1,0	2,0	18,3	3,4	31,0	30,0	15,9
Bakar (Cu)-r	1,2	< 1,0	1,2	5,0	4,1	< 1,0	1,4	4,8	2,8	14,0	7,1	3,5
Hrom (Cr)-uk.r	0,6	< 0,5	2,7	< 0,5	0,8	< 0,5		4,1	< 0,5	1,2	1,1	< 0,5
Olovo (Pb)-r	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	1,1	0,7	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 2,0	< 1,0	0,7
Kadmijum (Cd)- r	0,06	0,09	< 0,02	0,05	0,16	< 0,02	0,04	0,11	< 0,02	/	0,05	0,07
Nikl (Ni)-r	0,9	0,6	0,6	1,0	1,1	0,9	1,6	1,8	1,7	1,4	2,2	1,3
Aluminijum (Al)-r	169,9	81,6	< 10,0	< 10,0	92,6	36,5	33,8	18,8	88,0	/	/	23,1
Kobalt (Co)- r	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	/	/	< 0,5
Bor (B)- r	19,6	18,5	15,0	19,9	15,0	18,8	20,0	12,3	21,4	/	/	25,1
Arsen (As)-r	1,5	< 0,5	0,6	0,9	0,6	1,7	1,8	1,4	1,2	< 1,1	< 1,1	0,8
Fluoranten				0,003	/	0,002	/	0,002	/	/	/	/
Atrazin	/	/	/	0,008	/	0,007	/	0,005	/	< 0,01	/	/
Terbutilazin	/	/	/	0,012	/	0,052	/	0,012	/	0,047	/	/
Desetilterbutilazin	/	/	/	< 0,001	/	0,008	/	0,004	/	< 0,01	/	/
Acetohlor	/	/	/	0,020	/	0,014	/	0,005	/	< 0,01	/	/
Metolahlor	/	/	/	0,009	/	0,028	/	0,007	/	0,019	/	/

* uk- ukupni, r- rastvoreni. /- nije izmereno. Koncentracije su izražene u µg/L.



Slika 8.2. Vrednosti vodostaja reke Dunav izmerene na mernoj stanici Pančevo tokom 12 meseci 2014. godine (RHMZ). Crvenom tačkom označene su vrednosti izmerene na dan uzorkovanja

Tabela 8.3. Korelacije između histoloških indeksa, nivoa DNK oštećenja i koncentracija metala u škragama na lokalitetu Duboko (Spearman, $p < 0,05$)

	LI	GI	HI	I GP	I GC	I GR	Škrge TI %	Al škrge	Ba škrge	Cr škrge	Cu škrge	Fe škrge	Mn škrge	Mo škrge	Sr škrge	Zn škrge
LI	1,00	0,32	0,82	0,20	0,23	0,29	0,04	-0,03	0,15	0,05	0,24	-0,03	0,22	-0,03	-0,01	0,11
GI	0,32	1,00	0,77	0,49	0,73	0,80	0,21	0,19	0,23	0,35	0,12	0,23	0,47	0,30	-0,02	0,21
HI	0,82	0,77	1,00	0,45	0,53	0,65	0,14	0,15	0,19	0,28	0,22	0,16	0,43	0,19	-0,02	0,26
I GP	0,20	0,49	0,45	1,00	0,00	0,21	-0,19	0,51	-0,13	0,44	-0,23	0,22	0,26	0,14	-0,04	-0,47
I GC	0,23	0,73	0,53	0,00	1,00	0,47	0,22	0,01	0,33	0,26	0,15	0,19	0,46	0,40	0,28	0,46
I GR	0,29	0,80	0,65	0,21	0,47	1,00	0,25	-0,07	0,03	-0,03	0,12	0,11	0,03	0,01	-0,31	0,11
Škrge TI %	0,04	0,21	0,14	-0,19	0,22	0,25	1,00	0,16	0,20	0,24	0,28	0,27	0,19	0,42	0,01	0,58
Al škrge	-0,03	0,19	0,15	0,51	0,01	-0,07	0,16	1,00	0,09	0,80	0,06	0,56	0,44	0,52	0,04	0,02
Ba škrge	0,15	0,23	0,19	-0,13	0,33	0,03	0,20	0,09	1,00	0,44	0,70	0,10	0,68	0,34	0,46	0,47
Cr škrge	0,05	0,35	0,28	0,44	0,26	-0,03	0,24	0,80	0,44	1,00	0,17	0,71	0,65	0,73	0,35	0,32
Cu škrge	0,24	0,12	0,22	-0,23	0,15	0,12	0,28	0,06	0,70	0,17	1,00	0,14	0,51	0,21	0,37	0,49
Fe škrge	-0,03	0,23	0,16	0,22	0,19	0,11	0,27	0,56	0,10	0,71	0,14	1,00	0,49	0,76	0,37	0,44
Mn škrge	0,22	0,47	0,43	0,26	0,46	0,03	0,19	0,44	0,68	0,65	0,51	0,49	1,00	0,62	0,48	0,56
Mo škrge	-0,03	0,30	0,19	0,14	0,40	0,01	0,42	0,52	0,34	0,73	0,21	0,76	0,62	1,00	0,36	0,60
Sr škrge	-0,01	-0,02	-0,02	-0,04	0,28	-0,31	0,01	0,04	0,46	0,35	0,37	0,37	0,48	0,36	1,00	0,54
Zn škrge	0,11	0,21	0,26	-0,47	0,46	0,11	0,58	0,02	0,47	0,32	0,49	0,44	0,56	0,60	0,54	1,00

* LI- histopatološki indeks jetre, GI- histopatološki indeks škrge, HI- ukupni histopatološki indeks, I GP, I GC, I GR- progresivne, cirkulatorne i regresivne promene u škragama

+

+Tabela 8.4. Korelacije između histoloških indeksa, nivoa DNK oštećenja i koncentracija metala u jetri na lokalitetu Duboko (Spearman, $p < 0,05$)

	LI	HI	ILP	ILC	ILR	ILI	Jetra TI %	Al jetra	As jetra	Cr jetra	Cu jetra	Fe jetra	Mn jetra	Mo jetra	Pb jetra	Sr jetra	Zn jetra
LI	1,00	0,82	0,46	0,38	0,49	0,47	0,16	0,17	-0,22	-0,25	0,01	0,09	-0,06	-0,81	0,17	0,13	-0,04
HI	0,82	1,00	0,51	0,25	0,45	0,44	0,09	0,10	0,06	-0,39	0,06	0,16	0,13	-0,54	0,22	0,28	-0,17
ILP	0,46	0,51	1,00	0,11	-0,08	0,52	-0,20	-0,26	-0,17	-0,20	-0,29	0,12	-0,18	0,13	0,04	-0,40	-0,26
ILC	0,38	0,25	0,11	1,00	-0,38	0,32	0,14	0,12	-0,41	0,14	0,02	-0,19	0,16	-0,71	-0,10	0,06	0,22
ILR	0,49	0,45	-0,08	-0,38	1,00	-0,25	0,17	0,37	-0,05	-0,39	0,07	0,25	-0,05	-0,82	0,31	0,29	-0,40
ILI	0,47	0,44	0,52	0,32	-0,25	1,00	-0,04	0,01	0,04	-0,14	0,20	0,32	0,00	-0,31	0,09	0,29	0,27
Jetra TI %	0,16	0,09	-0,20	0,14	0,17	-0,04	1,00	-0,35	-0,07	-0,29	-0,26	0,21	-0,01	-0,89	-0,16	0,04	0,13
Al jetra	0,17	0,10	-0,26	0,12	0,37	0,01	-0,35	1,00	-0,05	-0,06	0,51	-0,05	0,04	0,03	0,12	0,45	-0,13
As jetra	-0,22	0,06	-0,17	-0,41	-0,05	0,04	-0,07	-0,05	1,00	-0,35	0,03	-0,08	-0,30	0,71	0,15	0,26	-0,03
Cr jetra	-0,25	-0,39	-0,20	0,14	-0,39	-0,14	-0,29	-0,06	-0,35	1,00	0,37	-0,05	0,53	0,26	-0,05	0,04	0,57
Cu jetra	0,01	0,06	-0,29	0,02	0,07	0,20	-0,26	0,51	0,03	0,37	1,00	0,26	0,47	0,37	-0,09	0,61	0,22
Fe jetra	0,09	0,16	0,12	-0,19	0,25	0,32	0,21	-0,05	-0,08	-0,05	0,26	1,00	0,40	0,26	0,34	0,39	-0,06
Mn jetra	-0,06	0,13	-0,18	0,16	-0,05	0,00	-0,01	0,04	-0,30	0,53	0,47	0,40	1,00	0,31	0,08	0,51	0,17
Mo jetra	-0,81	-0,54	0,13	-0,71	-0,82	-0,31	-0,89	0,03	0,71	0,26	0,37	0,26	0,31	1,00	0,31	0,09	0,20
Pb jetra	0,17	0,22	0,04	-0,10	0,31	0,09	-0,16	0,12	0,15	-0,05	-0,09	0,34	0,08	0,31	1,00	0,30	-0,03
Sr jetra	0,13	0,28	-0,40	0,06	0,29	0,29	0,04	0,45	0,26	0,04	0,61	0,39	0,51	0,09	0,30	1,00	-0,05
Zn jetra	-0,04	-0,17	-0,26	0,22	-0,40	0,27	0,13	-0,13	-0,03	0,57	0,22	-0,06	0,17	0,20	-0,03	-0,05	1,00

* LI- histopatološki indeks jetre, HI- ukupni histopatološki indeks, ILP, ILC, ILR i ILI- progresivne, cirkulatorne, regresivne i inflamatorne promene u jetri

Tabela 8.5. Korelacije između histoloških indeksa, nivoa DNK oštećenja i koncentracija metala u škragama na lokalitetu Višnjica (Spearman, $p < 0,05$)

	LI	GI	HI	I GP	I GC	I GR	Škrge TI %	Al škrge	Ba škrge	Co škrge	Cr škrge	Cu škrge	Fe škrge	Mn škrge	Mo škrge	Sr škrge	Zn škrge
LI	1,00	0,55	0,91	0,44	0,38	0,54	-0,40	-0,15	-0,08	-0,25	-0,18	-0,21	-0,16	-0,34	-0,18	0,03	-0,15
GI	0,55	1,00	0,82	0,69	0,83	0,73	-0,51	-0,28	-0,06	0,02	-0,29	-0,43	-0,37	-0,31	0,09	0,19	-0,10
HI	0,91	0,82	1,00	0,65	0,61	0,71	-0,45	-0,18	-0,03	-0,16	-0,18	-0,30	-0,23	-0,32	-0,06	0,19	-0,09
I GP	0,44	0,69	0,65	1,00	0,43	0,26	-0,51	0,00	0,17	-0,27	0,09	-0,20	-0,01	0,06	0,33	0,53	0,05
I GC	0,38	0,83	0,61	0,43	1,00	0,49	-0,33	-0,39	-0,17	0,30	-0,40	-0,51	-0,47	-0,29	-0,04	-0,02	-0,22
I GR	0,54	0,73	0,71	0,26	0,49	1,00	-0,35	-0,04	-0,14	0,11	-0,10	-0,23	-0,20	-0,42	-0,02	0,03	0,12
Škrge TI %	-0,40	-0,51	-0,45	-0,51	-0,33	-0,35	1,00	-0,22	-0,02	0,17	-0,07	0,16	-0,27	0,04	-0,41	-0,19	-0,09
Al škrge	-0,15	-0,28	-0,18	0,00	-0,39	-0,04	-0,22	1,00	0,38	0,17	0,77	0,49	0,68	0,26	0,46	0,56	0,66
Ba škrge	-0,08	-0,06	-0,03	0,17	-0,17	-0,14	-0,02	0,38	1,00	-0,32	0,47	0,60	0,58	0,75	0,38	0,77	0,72
Co škrge	-0,25	0,02	-0,16	-0,27	0,30	0,11	0,17	0,17	-0,32	1,00	-0,08	-0,19	-0,25	-0,43	0,04	-0,32	-0,08
Cr škrge	-0,18	-0,29	-0,18	0,09	-0,40	-0,10	-0,07	0,77	0,47	-0,08	1,00	0,71	0,81	0,45	0,50	0,62	0,75
Cu škrge	-0,21	-0,43	-0,30	-0,20	-0,51	-0,23	0,16	0,49	0,60	-0,19	0,71	1,00	0,83	0,49	0,40	0,44	0,67
Fe škrge	-0,16	-0,37	-0,23	-0,01	-0,47	-0,20	-0,27	0,68	0,58	-0,25	0,81	0,83	1,00	0,50	0,55	0,53	0,69
Mn škrge	-0,34	-0,31	-0,32	0,06	-0,29	-0,42	0,04	0,26	0,75	-0,43	0,45	0,49	0,50	1,00	0,18	0,54	0,56
Mo škrge	-0,18	0,09	-0,06	0,33	-0,04	-0,02	-0,41	0,46	0,38	0,04	0,50	0,40	0,55	0,18	1,00	0,58	0,58
Sr škrge	0,03	0,19	0,19	0,53	-0,02	0,03	-0,19	0,56	0,77	-0,32	0,62	0,44	0,53	0,54	0,58	1,00	0,66
Zn škrge	-0,15	-0,10	-0,09	0,05	-0,22	0,12	-0,09	0,66	0,72	-0,08	0,75	0,67	0,69	0,56	0,58	0,66	1,00

* LI- histopatološki indeks jetre, GI- histopatološki indeks škrge, HI- ukupni histopatološki indeks, I GP, I GC, I GR- progresivne, cirkulatorne i regresivne promene u škragama

Tabela 8.6. Korelacije između histoloških indeksa, nivoa DNK oštećenja i koncentracija metala u jetri na lokalitetu Višnjica (Spearman, $p < 0,05$)

	LI	HI	I LP	I LC	I LR	I LI	Jetra TI %	Al jetra	Co jetra	Cr jetra	Cu jetra	Fe jetra	Mn jetra	Mo jetra	Pb jetra	Sr jetra	Zn jetra
LI	1,00	0,91	0,62	0,61	0,73	0,58	0,03	-0,37	-0,01	-0,13	-0,03	0,16	-0,18	-0,22	-0,49	-0,07	-0,12
HI	0,91	1,00	0,54	0,58	0,69	0,53	0,04	-0,33	-0,08	-0,05	0,18	0,14	-0,26	-0,26	-0,31	-0,02	0,09
I LP	0,62	0,54	1,00	0,19	0,10	0,70	-0,05	-0,32	0,25	-0,18	-0,17	0,18	-0,22	-0,06	-0,09	0,14	-0,28
I LC	0,61	0,58	0,19	1,00	0,28	0,17	0,48	-0,12	-0,03	-0,14	-0,05	0,20	0,02	-0,16	-0,19	-0,27	0,01
I LR	0,73	0,69	0,10	0,28	1,00	0,05	-0,15	-0,34	-0,05	0,09	0,13	-0,03	-0,09	-0,17	-0,41	-0,13	0,02
I LI	0,58	0,53	0,70	0,17	0,05	1,00	-0,16	-0,19	0,05	-0,07	-0,12	0,47	-0,02	0,10	-0,28	0,33	-0,12
Jetra TI %	0,03	0,04	-0,05	0,48	-0,15	-0,16	1,00	0,21	0,17	0,15	0,17	0,09	0,27	0,15	0,29	0,21	0,08
Al jetra	-0,37	-0,33	-0,32	-0,12	-0,34	-0,19	0,21	1,00	-0,05	0,22	0,16	0,28	-0,03	-0,11	0,17	0,12	0,32
Co jetra	-0,01	-0,08	0,25	-0,03	-0,05	0,05	0,17	-0,05	1,00	0,01	-0,37	0,46	0,22	0,57	0,26	0,14	-0,42
Cr jetra	-0,13	-0,05	-0,18	-0,14	0,09	-0,07	0,15	0,22	0,01	1,00	0,22	0,29	0,58	0,40	0,15	0,20	0,46
Cu jetra	-0,03	0,18	-0,17	-0,05	0,13	-0,12	0,17	0,16	-0,37	0,22	1,00	0,02	0,06	-0,22	0,35	0,20	0,79
Fe jetra	0,16	0,14	0,18	0,20	-0,03	0,47	0,09	0,28	0,46	0,29	0,02	1,00	0,43	0,52	0,17	0,27	0,15
Mn jetra	-0,18	-0,26	-0,22	0,02	-0,09	-0,02	0,27	-0,03	0,22	0,58	0,06	0,43	1,00	0,70	0,04	0,38	0,22
Mo jetra	-0,22	-0,26	-0,06	-0,16	-0,17	0,10	0,15	-0,11	0,57	0,40	-0,22	0,52	0,70	1,00	0,08	0,32	-0,01
Pb jetra	-0,49	-0,31	-0,09	-0,19	-0,41	-0,28	0,29	0,17	0,26	0,15	0,35	0,17	0,04	0,08	1,00	-0,07	0,27
Sr jetra	-0,07	-0,02	0,14	-0,27	-0,13	0,33	0,21	0,12	0,14	0,20	0,20	0,27	0,38	0,32	-0,07	1,00	0,23
Zn jetra	-0,12	0,09	-0,28	0,01	0,02	-0,12	0,08	0,32	-0,42	0,46	0,79	0,15	0,22	-0,01	0,27	0,23	1,00

* LI- histopatološki indeks jetre, HI- ukupni histopatološki indeks, I LP, I LC, I LR i I LI- progresivne, cirkulatorne, regresivne i inflamatorne promene u jetri

Tabela 8.7. Opseg variranja ukupnih i rastvorenih metala i metaloida, i pesticida u vodi na mernim stanicama Ostružnica (reka Sava) i Vinča (reka Dunav)

µg/L	Ostružnica	Vinča	µg/L	Ostružnica	Vinča	µg/L	Ostružnica	Vinča
(Fe)	151,9-645,0	139,9-1797,0	(Fe)-r	< 20,0-142,2	< 10,0-148,8	Atrazin	0,005-0,009	0,005-0,008
(Mn)	28,0-50,0	22,3-151,6	(Mn)-r	< 10,0-25,8	< 10,0-36,6	Terbutilazin	0,005-0,100	0,012-0,052
(Zn)	<1,0-44,0	5,5-54,0	(Zn)-r	< 1,0-42,0	< 1,0-31,0	Desetilterbutilazin	0,003-0,011	< 0,001-0,008
(Cu)	1,6-20,0	3,6-29,2	(Cu)-r	< 1,0-16,0	< 1,0-14,0	Acetohlor	< 0,001-0,092	0,005-0,020
(Cr)-uk	1,7-5,9	0,9-5,4	(Cr)-uk.r	< 0,5-2,4	< 0,5-4,1	Metolahlor	0,006-0,050	0,007-0,028
(Pb)	0,7-2,4	1,1-5,5	(Pb)-r	< 0,5-1,3	< 0,5-1,1			
(Cd)	0,03-0,08	0,03-0,11	(Cd)-r	0,03-0,08	< 0,02-0,16			
(Ni)	1,7-10,2	1,7-8,0	(Ni)-r	0,8-3,6	0,8-2,2			
(Al)	103,7-401,5	93,3-1131,0	(Al)-r	10,8-154,5	< 10,0-169,9			
(Co)	0,6-0,9	0,5-1,8	(Co)-r	< 0,5-0,6	< 0,5-0,5			
(B)	14,2-23,2	13,7-29,9	(B)-r	13,0-20,5	12,3-25,1			
(As)	0,8-3,0	0,9-2,9	(As)-r	0,5-1,7	< 0,5-1,8			

Biografija

Jovana M. Kostić-Vuković rođena je 30.10.1986. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu, osnovnu muzičku školu „Stanislav Binički“ odsek klavir i III beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006 godine, studijska grupa Biologija, a diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,13 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Školske 2013/2014 godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Mikrobiologija. Od oktobra 2013. godine angažovana je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 173045 „Ribe kao bioindikator stanja kvaliteta otvorenih voda Srbije“. Na istom projektu je od januara 2016. godine angažovana kao istraživač saradnik. Od 2014. godine angažovana je kao student doktorskih studija u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju na predmetima Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji. Od 2013. do 2015. godine učestvovala je na međunarodnom projektu „Establishing the basic microbial faecal pollution pattern along a large river: testing the longitudinal continuum vs. lateral discontinuum hypothesis at the River Danube“, Austrijskog fonda za nauku (Austrian Science Fund (FWF)). Od 2016. do 2018. godine učestvovala je na bilateralnom projektu Srbija-Austrija „Implementation of Microbial Source Tracking (MST) method for assessment of faecal pollution in the Sava River and relation (potential relationship) to the presence of genotoxic agents“. Od 2013. godine član je Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog biološkog društva i Društva genetičara Srbije. Godine 2018. dobila je sertifikat o pohađanju radionice Američkog društva za mikrobiologiju (American Society for Microbiology) pod nazivom „ASM Workshop on Scientific Writing and Publishing“. Do sada je objavila 13 naučnih radova, od kojih su šest iz kategorije M21a, dva iz kategorije M21, četiri iz kategorije M22 i jedan iz kategorije M24. Takođe, učestvovala je sa 30 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Јована Костић-Вуковић _____

Број индекса _____ Б3050/2013 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Процена квалитета површинске воде на основу микробиолошких параметара и екогенотоксиколошких и хистопатолошких анализа ткива деверике *Abramis brama* (L., 1758), крупатице *Blicca bjoerkna* (L., 1758) и црнооке деверике *Ballerus sapa* (P., 1814)

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

Потпис аутора

У Београду, 20.04.2018.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Костић-Вуковић

Број индекса Б3050/2013

Студијски програм Биологија

Наслов рада Процена квалитета површинске воде на основу микробиолошких параметара и екогенотоксиколошких и хистопатолошких анализа ткива деверике *Abramis brama* (L., 1758), крупатице *Blicca bjoerkna* (L., 1758) и црнооке деверике *Ballerus sapa* (P., 1814)

Ментор Проф. др Бранка Вуковић-Гачић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 20.04.2018.



Изјава о коришћењу

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

Процена квалитета површинске воде на основу микробиолошких параметара и екогенотоксиколошких и хистопатолошких анализа ткива деверике *Abramis brama* (L., 1758), крупатице *Blicca bjoerkna* (L., 1758) и црнооке деверике *Ballerus sapa* (P., 1814)

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 20.04.2018.



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 прерада.** 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 прерада.** 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.