

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Margareta J. Kračun-Kolarević

**Primena akvatičnih oligoheta (Tubificidae) u  
*in situ* i *ex situ* ekogenotoksikološkim  
istraživanjima**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Margareta J. Kračun-Kolarević

**Application of aquatic oligochaetes  
(Tubificidae) in ecogenotoxicological *in situ*  
and *ex situ* studies**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE**

### **Mentori:**

**Dr Branka Vuković-Gačić**, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

**Dr Momir Paunović**, naučni savetnik,

Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

### **Komisija:**

**Dr Zoran Gačić**, naučni savetnik,

Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane \_\_\_\_\_ 2017. godine

*Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije urađena su na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, kao i na Katedri za mikrobiologiju, Centra za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Instituta za botaniku, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Istraživanja su sprovedenja kroz realizaciju sledećih projekata:*

*Projekat TR 37009 „Merenje i modeliranje fizičkih, hemijskih, bioloških i morfodinamičkih parametara reka i vodnih akumulacija“, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije*

*Projekat 265264 Evropske Unije OP7 Cytothreat – „Fate and effects of cytostatic pharmaceuticals in the environment and identification of biomarkers for an improved risk assessment on environmental exposure“*

*Projekat 603629-ENV-2013-6.2.1. Globaqua – „Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity“*

*Projekat Austrijskog fonda za nauku (Austrian Science Fund –FWF) – „Establishing the basic microbial faecal pollution pattern along a large river: testing the longitudinal continuum vs. lateral discontinuum hypothesis at the River Danube“*

*Zahvaljujem se Republičnom hidrometeorološkom zavodu, Republike Srbija i Agenciji za zaštitu životne sredine, Republike Srbije na ustupljenim podacima.*

*Svoju veliku zahvalnost dugujem mentorki, dr Branki Vuković-Gačić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na poverenju koje mi je ukazala prilikom izbora teme, kao i na nesebičnoj pomoći u svim fazama izrade doktorske disertacije. Hvala Vam profesorka na strpljenju, trudu, razumevanju i korekcijama da ova disertacija poprimi svoju konačnu formu.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem i mentoru dr Momiru Paunoviću, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu na bezrezervnoj podršci i ukazanom poverenju od samog početka u realizaciji i oblikovanju*

*ideja ove doktorske disertacije. Mulțumesc Momo što si mi omogućio da budem deo tima, da realizujem svoje ideje i na konstruktivnim razgovorima.*

*Zahvalnost dugujem i dr Zoranu Gačiću, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu na dragocenim savetima i korekcijama, pomoći prilikom statističkih analiza. Zoki hvala Vam na strpljenju i savetima o osnovnim statističkim nedoumicama.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dragoj Ani Atanacković za nesebičnu pomoć prilikom obrade uzoraka oligoheta, na savetima i rešavanju nedoumica identifikacije crva i na iskrenoj podršci.*

*Svojim dragim kolegama i prijateljima, Mariji Ilić i Vanji Marković zahvaljujem se za pomoć prilikom kupanja crvića, za podršku, drugarstvo, strpljenje i za smeh koji me je od početka uveseljavao i ohrabrivao u radu.*

*Veliku zahvalnost dugujem članovima našeg tima Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu Božici Vasiljević, Katarini Zorić, Jeleni Tomović, Bojani Tubić, Vesni Đikanović, Nataši Popović, Maji Raković, Jeleni Đuknić, Jeleni Čanak Atlagić, Stefanu Anđusu i Nikoli Marinkoviću na sjajnoj atmosferi, smehu, pomoći i na divnoj saradnji.*

*Dragim kolegama sa Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu Karolini Sunjog, Jovani Kostić, Bojani Vasiljević, Ivici Dimkiću, Ivanu Nikoliću i Tamari Janakiev želim da se zahvalim za prijatnu i prijateljsku radnu atmosferu.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojim porodicama Kračun, Kolarević i Janković.*

*Mama, tata i Korina hvala Vam na podršci, na strpljenju i što ste mi omogućili da steknem obrazovanje koje sam želela, a naročito za bezgraničnu ljubav.*

*Kolarevići i Jankovići hvala Vam što ste me prihvatili da budem deo porodice, na ljubavi, poštovanju i podršci.*

*Posebnu zahvalnost dugujem i svojim levim i desnim smetalima, Figaru i Sokratu, bez kojih bi pisanje ove doktorske teze bilo manje veselo i maštovito.*

*Stoimiru, mojoj ljubavi, dugujem najveću zahvalnost za neizmernu pomoć, ideje, realizaciju, oblikovanje ovog rada, za bezrezervnu podršku, strpljenje, a najviše za svu sreću i svu ljubav koja me pokreće*

## **Primena akvatičnih oligoheta (Tubificidae) u *in situ* i *ex situ* ekogenotoksikološkim istraživanjima**

### **Izvod**

Familija Tubificidae (Oligochaeta), po brojnosti jedinki i po biomasi, je jedna od najznačajnijih grupa u zajednicama akvatičnih makroinvertebrata. Ovi organizmi su prepoznati kao pouzdani bioindikatorski organizmi koji se koriste u proceni ekološkog potencijala akvatičnih ekosistema. U ovoj studiji akvatične oligohete su korišćene kao eksperimentalni organizmi u ekogenotoksikološkim istraživanjima. Uticaj različitih stresora *in situ*, kao i odabranih grupa zagađivača *ex situ* na integritet DNK molekula celomocita i hemocita, praćen je komet testom, a za procenu nivoa oštećenja korišćen je parametar TI (*eng.* Tail intensity).

*In situ* istraživanje rađeno je tokom 2014. i 2015. godine na lokalitetu Duboko (Sava), i tokom 2014. godine na lokalitetu Višnjica (Dunav) na vrsti *Branchiura sowerbyi*, i mešovitom uzorku tubificidnih vrsta (Mix uzorak). Rezultati ukazuju na osetljivost celomocita i hemocita u detekciji sredinskog stresa. Nivo oštećenja DNK molekula kod različitih vrsta imao je sličan trend pri odgovoru na sredinske uslove i pokazao je značajne korelacije sa praćenim mikrobiološkim i fizičko-hemijskim parametrima kvaliteta vode. Vodostaj je izdvojen kao bitan stresor koji je tokom istraživanja znatno uticao na ostale praćene parametre. Brojnost jedinki i divezitet populacija akvatičnih oligoheta se nije menjala sa promenom stresora (poplave, ispuštanje otpadnih voda, spiranje zemljišta), s druge strane, uticaj stresora bio je evidentan na oštećenje DNK molekula.

U *ex situ* istraživanju praćen je uticaj citostatika 5-fluorouracila i etopozida, kao i model mutagena kadmijum hlorida, na nivo oštećenja DNK molekula vrste *Limnodrilus udekemianus*. Sve supstance su značajno povećale nivo oštećenja DNK molekula.

**Ključne reči:** *in situ* i *ex situ* istraživanja, mikrobiološko i hemijsko zagađenje, citostatici, akvatične Oligochaeta, familija Tubificidae, ekogenotoksikologija, komet test, oštećenje DNK

**Naučna oblast:** Biologija i ekologija

**Uža naučna oblast:** Hidroekologija, Ekogenotoksikologija, Mikrobiologija

**UDK broj:** [574.64:595.142.33]:57.081.15:57.085(497.11)(043.3)



## **Application of aquatic oligochaetes (Tubificidae) in ecogenotoxicological *in situ* and *ex situ* studies**

According to the number of individuals and their biomass, family Tubificidae (Oligochaeta) is one of the most important groups in the communities of aquatic macroinvertebrates. As bioindicators these organisms are used in the assessment of the ecological potential of aquatic ecosystems. In this study aquatic oligochaetes are used as experimental organisms in ecogenotoxicological assessment. For *in situ* studies impact of different stressors on the integrity of the DNA molecule of coelomocytes and haemocytes was evaluated, while the impact of a selected group of pollutants was studied *ex situ*. The comet assay was used for the evaluation of the genotoxic potential and parameter TI (Tail intensity) for the assessment of the level of DNA damage.

*In situ* research was conducted on the species *Branchiura sowerby* and in the mixed sampled of tubificid species from the sampling sites Duboko (Sava) and Višnjica (Danube). Coelomocytes and haemocytes have shown to be sensitive to environmental stress. The level of DNA damage in different species showed a similar trend in response to environmental conditions and significantly correlated with microbial, physical and chemical water quality parameters. Water level was recognized as an important stressor that had significant impact on the other environmental parameters. Different stressors (floods, wastewater discharge, and runoffs) did not affect the number of individuals and the diversity of aquatic oligochaetes populations. On the other hand, the impact of stressors was evident on the level of DNA damage.

The effects of cytostatic, 5-fluorouracil and etoposide and of model mutagen CdCl<sub>2</sub>, on the level of DNA damage of *Limnodrilus udekemianus* was examined *ex situ*. All tested substances significantly increased the level of DNA damage.

**Key words:** *in situ* and *ex situ* studies, microbial and chemical pollution, cytostatics, aquatic Oligochaeta, family Tubificidae, ecogenotoxicology, comet assay, DNA damage

**Research field:** Biology and Ecology

**Specific research field:** Hydroecology, Ecogenotoxicology, Microbiology

**UDC no.:** [574.64:595.142.33]:57.081.15:57.085(497.11)(043.3)

## Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

5-FU – 5-fluorouracil

AO – akridin oranž

BMWP - *eng.* Biological Monitoring Working Party

DMSO – dimetil sulfoksid

EB – etidijum bromid

EDTA – *eng.* Ethylenediaminetetraacetic acid

ET – etopozid

FC – *eng.* Faecal Coliforms – fekalni koliformi

FE – *eng.* Faecal Enterococci – fekalne enterokoke

HPK – Hemijska potrošnja kiseonika

LBSS – *eng.* Lumbricus Balanced Saline Solution

JDS – *eng.* The Joint Danube Survey – udruženo nadgledanje Dunava

LC<sub>50</sub> – Lethal Concentration 50%

LMP – *eng.* Low Melting Point

MPN – *eng.* The Most Probable Number – metod najverovatnijeg broja

NMP – *eng.* Normal Melting Point

ONPG - orto-nitrofenil-β-D-galaktoriranozid

ODV - *eng.* *Water Framework Directive* – Okvirna direktiva o vodama

OTM - *eng.* Olive tail moment

PEC – *eng.* Predicted Environmental Concentration – predviđena koncentracija u životnoj sredini

rpm – *eng.* Rounds Per Minute

rkm – rečni kilometar

PBS – *eng.* Phosphate Buffered Saline Solution

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

SD – Standardna devijacija

SI - saprobni indeks

SE – *eng.* Standard Error – standardna greška

TC – *eng.* Total Coliforms – ukupni koliformi

TENT - Termoelektrana „Nikola Tesla“

TI – *eng.* Tail Intensity – itenzitet repa

TL – *eng.* Tail Length – dužina repa

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Slatkovodni ekosistemi .....	1
1.2. Zagađivači slatkovodnih ekosistema .....	2
1.3. Mikrobiološki i fizičko-hemijski kvalitet vode .....	5
1.4. Biomonitoring .....	6
1.5. Bioindikatori.....	7
1.5.1. Akvatični makroinvertebrati kao bioindikatori .....	9
1.5.1.1. Akvatične oligohete – familija Tubificidae .....	10
1.6. Ekogenotoksikološka istraživanja .....	12
1.6.1. <i>In situ</i> istraživanja .....	14
1.6.2. <i>Ex situ</i> istraživanja.....	18
<b>2. CILJEVI</b> .....	22
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	24
3.1. Materijal .....	24
3.1.1. Rastvori .....	24
3.1.2. Citostatici .....	28
3.2. Područje istraživanja .....	28
3.3. Metode.....	33
3.3.1. Ekološka istraživanja.....	33
3.3.1.1. Prikupljanje i laboratorijska obrada materijala makroinvertebrata za procenu sastava zajednice makroinvertebrata .....	33
3.3.1.2. Procena ekološkog statusa – biološki parametri.....	34
3.3.2. Ekotoksikološka istraživanja .....	36
3.3.2.1. Uspostavljanje laboratorijske kulture i aklimacija .....	36
3.3.2.2. Komet test .....	38
3.3.2.3. Metode uzorkovanja hemocita i celomocita.....	39
3.3.2.4. Preživljavanje ćelija – diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB).....	40

3.3.3.	<i>In situ</i> istraživanja .....	42
3.3.3.1.	Prikupljanje i priprema materijala Oligochaeta za komet test.....	42
3.3.3.2.	Mikrobiologija – prikupljanje i priprema materijala vode .....	43
3.3.3.3.	Mikrobiološki parametri.....	44
3.3.3.3.1.	Koliformi – metod najverovatniji broj .....	44
3.3.3.3.2.	Fekalne enterokoke – metod najverovatniji broj .....	45
3.3.4.	<i>Ex situ</i> istraživanja – ekotoksikološka istraživanja .....	47
3.3.4.1.	Eksperimentalni dizajn – izlaganje <i>L. udekemianus</i> u 5 – FU, ET, i CdCl <sub>2</sub> tretmanima .....	47
3.3.4.2.	Vijabilnost adulta <i>L. udekemianus</i> .....	49
3.4.	Statistička obrada podataka .....	49
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>51</b>
4.1.	<i>In situ</i> istraživanje – lokalitet Duboko .....	52
4.1.1.	Hidrološki uslovi, fizičko-hemijski i hemijski kvalitet vode .....	53
4.1.2.	Mikrobiološki kvalitet vode .....	57
4.1.2.1.	Korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima .....	58
4.1.3.	Sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta.....	63
4.1.3.1.	Ocena ekološkog potencijala lokaliteta Duboko na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta .....	73
4.1.4.	Ekogenotoksikološka istraživanja .....	74
4.1.4.1.	Vijabilnosti celomocita i hemocita.....	75
4.1.4.2.	Uspostavljanje laboratorijske kulture i određivanje bazalnog oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste <i>B. sowerbyi</i> .....	76
4.1.4.3.	Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste <i>B. sowerbyi</i> i u Mix uzorku tokom 2014. godine .....	77
4.1.4.4.	Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste <i>B. sowerbyi</i> i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2014. godine .....	80
4.1.4.5.	Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste <i>B. sowerbyi</i> i u Mix-u tokom 2015. godine .....	82
4.1.4.6.	Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula vrste <i>B. sowerbyi</i> i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2015. godine .....	85

4.2.	<i>In situ</i> istraživanje – lokalitet Višnjica .....	87
4.2.1.	Hidrološki uslovi i fizičko-hemijski kvalitet vode .....	88
4.2.2.	Mikrobiološki kvalitet vode .....	90
4.2.2.1.	Korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima .....	91
4.2.3.	Sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta.....	93
4.2.3.1.	Ocena ekološkog potencijala lokaliteta Višnjica na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta .....	101
4.2.4.	Ekogenotoksikološka istraživanja .....	102
4.2.4.1.	Vijabilnosti celomocita i hemocita.....	103
4.2.4.2.	Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste <i>B. sowerbyi</i> i Mix uzorka.....	104
4.2.4.3.	Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula vrste <i>B. sowerbyi</i> i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametarima kvaliteta vode.....	107
4.3.	Korelacije sastava zajednice akvatičnih Oligochaeta i nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste <i>B. sowerbyi</i> i kod Mix uzorka.....	108
4.3.1.	Korelacije rezultata komet testa i sastava zajednice Oligochaeta na lokalitetu Duboko .....	109
4.3.2.	Korelacije rezultata komet testa i sastava zajednice Oligochaeta na lokalitetu Višnjica .....	113
4.4.	<i>Ex situ</i> istraživanja .....	116
4.4.1.	Uspostavljanje laboratorijske kulture vrste <i>L. udekemianus</i> .....	116
4.4.2.	Efekat CdCl <sub>2</sub> , 5-FU i ET na preživljavanje jedinki <i>L. udekemianus</i> .....	116
4.4.3.	Efekat CdCl <sub>2</sub> , 5 – FU i ET na preživljavanje celomocita i hemocita <i>L. udekemianus</i> .....	117
4.4.4.	Efekt CdCl <sub>2</sub> , 5 – FU i ET na nivo oštećenja DNK molekula celomocita i hemocita <i>L. udekemianus</i> .....	118
5.	DISKUSIJA.....	121
5.1.	<i>In situ</i> istraživanja .....	122
5.1.1.	Lokaliteti .....	122
5.1.1.1.	Korelacije vodostaja sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima .....	125
5.1.1.2.	Korelacije mikrobioloških parametara kvaliteta vode sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima.....	126
5.1.1.3.	Sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta.....	127

5.1.1.4.	Ocena ekološkog potencijala lokaliteta na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta .....	129
5.1.1.5.	In situ ekogenotoksikološka istraživanja.....	130
5.1.2.	Korelacije sastava zajednice akvatičnih Oligochaeta i nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste <i>B. sowerbyi</i> i kod Mix uzorka.....	136
5.2.	<i>Ex situ</i> istraživanja .....	138
5.2.1.	Efekat CdCl <sub>2</sub> , 5-FU i ET na preživljavanje jedinki i celomocita i hemocita <i>L. udekemianus</i> .....	139
5.2.2.	Efekt CdCl <sub>2</sub> , 5 – FU i ET na nivo oštećenja DNK molekula celomocita i hemocita <i>L. udekemianus</i> .....	141
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>143</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>146</b>
<b>PRILOG 1</b>	.....	<b>168</b>
<b>PRILOG 2</b>	.....	<b>180</b>
<b>PRILOG 3</b>	.....	<b>187</b>



# UVOD

## 1. UVOD

*The river is everywhere at the same time, at the source and at the mouth, at the waterfall, at the ferry, at the current, in the ocean and in the mountains, everywhere – only the present exists for it, not the shadow of the past nor the shadow of the future.*

*Hermann Hesse, Siddhartha*

### 1.1. Slatkovodni ekosistemi

Površinske vode imaju veoma važnu ulogu za biosferu obzirom da prenose vodu i nutrijente iz kontinentalnog dela u mora, a takođe, često i definišu strukturu i funkcionalnost okolnih terestričnih ekosistema (Bailey i sar., 2004). Slatkovodni ekosistemi imaju presudnu ulogu i kao jedan od najbitnijih resursa za ljudsku civilizaciju. Slatkovodne ekosisteme, pored abiotičke komponente (voda, hidrologija, sediment, itd.), čini i biotička komponenta, mnogobrojni organizmi koji pripadaju različitim grupama (makroinvertebrati, ribe, makrofite, alge, plankton, bakterije, itd.) koji, ako ne čitav životni ciklus, onda bar jedan deo životnog ciklusa (na primer larvalni stupanj kod nekih insekata), završavaju u akvatičnoj sredini. Svako vodno telo je poseban akvatični ekosistem sa specifičnim fizičko-hemijskim osobinama. U ovakvim uslovima dolazi do interakcija između svih komponenti ovog sistema, koje na kraju utiču na sastav zajednica organizama u okviru određenog akvatičnog ekosistema.

Voda se odlikuje većom uniformnošću u odnosu na ostale sredine. Promene u vodenoj sredini zavise od doba godine. Na primer, nivo vode može značajno da varira zavisno od sezonskog rasporeda količina padavina ili nakon zime, kada se tope snežni

nanosi na planinama, dok se na kraju leta promene odnose na smanjene nivoa vode usled isparavanja i većeg utroška vode od strane čoveka (navodnjavanje, za rekreaciju, itd.). Temperatura je, takođe, sezonski zavisna, ali i hemijski sastav koji se može promeniti nakon padavina, kada dolazi do spiranja okolnog zemljišta, a samim tim i do upliva organskih i neorganskih materija.

Praćenje posledica zagađenja vodenih ekosistema značajno je za pripremu efikasnih mera zaštite, jer se beleže značajne negativne promene u vodenoj sredini koje nastaju aktivnošću čoveka, što direktno ispuštanjem otpadnih voda, ali i indirektno uvođenjem invazivnih vrsta (Bailey i sar., 2004).

## **1.2. Zagađivači slatkovodnih ekosistema**

Danas su akvatični ekosistemi pod velikim antropogenim pritiskom s obzirom da primaju velike količine otpadnih voda (Rajaguru i sar., 2003), ali i zbog toga što se sve veće količine vode troše za namirivanje potreba urbanih naselja i prateće infrastrukture (Navarro-Ortega i sar., 2015.).

Zagađivači akvatičnih ekosistema mogu se podeliti na koncentrisane i rasute. U okviru koncentrisanih zagađivača nalaze se industrijski i komunalni kanalizacioni sistemi, ali i procedne vode sa deponija otpada. S druge strane, spiranje poljoprivrednih zemljišta koja su pod uticajem agrotehničkih mera, drumski i plovni saobraćaj i naselja bez sistema kanalizacije pripadaju rasutim zagađivačima (Katastar otpadnih voda Srbije – [www.sepa.gov.rs](http://www.sepa.gov.rs)).

Termin otpadne vode ima široko značenje, odnosno podrazumeva upotrebljene vode iz urbanih naselja, iz domaćinstava i različitih ustanova (škole, bolnice, ugostiteljski objekti), ali i industrijske vode. Dok se sastav gradskih otpadnih voda ne menja značajno (postoje dnevno/noćne fluktuacije, pre svega u kvantitetu), sastav industrijskih otpadnih voda može biti veoma raznovrstan, zavisno od karakteristika proizvodnog procesa (da li je

u pitanju metalurgija, hemijska industrija, rudarstvo, petrohemija, prehrambena industrija, tekstilna industrija, itd.). U odnosu na izvor otpadnih voda, u njima se mogu naći različite supstance sa najraznovrsnijim efektima, koje kada se neprečišćene ispuste u reke, kanale ili jezera, mogu dovesti do negativnih efekata u životnoj sredini.

U Srbiji se prerađuje samo 5-10 % komunalnih otpadnih voda, dok više od 65 % industrijskih postrojenja ne prečišćava otpadne vode (CEDEF, 2015). Veliki gradovi, kao što su Beograd, Novi Sad i Niš ispuštaju komunalne vode direktno u površinke vode bez prethodnog tretmana. Na ozbiljnost situacije u kojoj se nalaze akvatični ekosistemi ukazuje i podatak da u slivu Dunava u Srbiji živi oko 3,5 miliona stanovnika, a od ukupne količine otpadnih voda samo oko 4,3 % ima tretman koji je zadovoljavajući i 9,7 % ima neki vid tretmana koji nije potpun (CEDEF, 2015).

Da bi se regulisalo upravljanje vodama 2010. godine usvojen je Zakon o vodama („Službeni Glasnik Republike Srbije“, broj 30/10), koji je delimično usklađen sa regulativom Evropske unije. Iako postoji Pravilnik o metodologiji za izradu integralnog katastra zagađivača („Sl. Glasnik RS“, br. 94/2007), veliki problem u Srbiji je nepostojanje potpunog katastra zagađivača, među kojima i zagađivača akvatičnih ekosistema. Podaci koji bi se nalazili u ovom dokumentu su podaci „o izvorima, vrstama, količinama, načinu i mestu ispuštanja zagađujućih materija u vazduhu i vodi, kao i o količinama, vrsti, sastavu i načinu tretmana i odlaganja otpada“ („Sl. Glasnik RS“, br. 94/2007). Ovi podaci koristili bi se za determinisanje stvarnog stanja životne sredine, a ne da se u odnosu na procene koje se razlikuju u odnosu na korišćenje metode za dobijanje podataka preduzimaju mere zaštite životne sredine.

Idealan tretman otpadnih voda ne postoji, a sa druge strane, potrebe ljudi su sve kompleksnije što utiče na ubrzano formiranje i korišćenje raznovrsnih sintetičkih jedinjenja za poboljšanje kvaliteta života. Procenjeno je da postoji više od 14 miliona hemikalija, od kojih se 100.000 koristi u industriji. Veliki broj ovih jedinjenja, kao i produkti njihove transformacije u okruženju ukazuju da je neophodno da se optimizuje broj supstanci koje bi

bile uključene u monitoring, ali i u postupak procene rizika (*eng.* „risk assessment“) (von der Ohe i sar., 2011).

Zahvaljujući razvoju modernih analitičkih metoda u hemiji (poboljšanje nivoa detekcije i kvantifikacije, moguća detekcija koncentracija ng/L), danas je moguća detekcija mnogobrojnih supstanci u akvatičnoj sredini koje ranije nisu bile registrovane, a što ne znači da nisu bile prisutne. Lista postojećih polutanata akvatičnih ekosistema svake godine se proširuje za 400 do 500 novih jedinjenja (Kolarević, 2014).

Zavisno od aktivnosti koje se obavljaju duž rečnog toka sastav polutanata može biti različit. Potrebe za proizvodnjom hrane su se povećale sa globalnim demografskim kretanjima, te se sa ciljem bržeg dobijanja kvalitetnijeg i obimnijeg prinosa gajenih kultura upotrebljavaju različite agrotehničke mere, kao što su primena đubriva, pesticida, herbicida, itd. Na negativne uticaje poreklom od poljoprivrednih aktivnosti ukazuju povećane koncentracije soli fosfata, nitrata i azota u vodi koje verovatno vode poreklo od đubriva koja se koriste u poljoprivredne svrhe (Shuval i Gruener, 1972; Vrzal, 2016), zatim prisustvo hemikalija koje se koriste u proizvodima za zaštitu useva, na primer pesticidi na bazi triazina (Hildebrandt i sar., 2008), karbamidi, organohlorni pesticidi. S druge strane, spiranjem okolnog zemljišta, različiti industrijski zagađivači mogu dospeti u vodotokove. Na primer, termoelektrane su smeštene uz reke (radi korišćenja vode za hlađenje sistema), kao i deponije pepela koji nastaje sagorevanjem uglja (velika količina vode se koristi za „stabilizaciju pepela“). Ocedne vode peplišta bogate su gvožđem, hromom, arsenom, niklom, olovom, manganom, kadmijumom i drugim elementima (Hynes, 2009; Gajić i sar., 2016), s toga ovi potencijalni zagađivači završavaju u površinskim, a često i u podzemnim vodama. Primer zagađivača koji imaju široku upotrebu su fenolna jedinjenja koja se koriste u industriji uglja, drva, metala, proizvodnji deterdženata (Caza, 1998; Lupetii i sar., 2004; Lanças i sar., 2007), herbicida i insekticida (Lacorte i Barcelo, 1994; Davi i Gnudi, 1999). Ova jedinjenja mogu imati različite efekte na živi svet, toksične, mutagene, antibakterijske i antimikotične (Vinson i sar., 1998).

### 1.3. Mikrobiološki i fizičko-hemijski kvalitet vode

Osnovni uzročnik eutrofikacije akvatičnih ekosistema su antropogene aktivnosti. Mikroorganizmi doprinose biodegradaciji organske materije (Kapetanović i sar., 2015). Ispuštanjem velike količine otpadne vode iz domaćinstava, koja je delimično prerađena ili neprerađena, doprinosi unosu patogenih vrsta u vodotokove, kao i različitih polutanata, što dovodi do smanjenja njenog kvaliteta. Ako kvalitet vode nije zadovoljavajuć smanjuje se mogućnost korišćenja ovog resursa bilo u rekreativne svrhe, za navodnjavanje ili u proizvodnji pijaće vode za stanovništvo (Kolarević, 2014). Zato je neophodno praćenje mikrobiološkog kvaliteta vode, jer mikrobiološki parametri mogu indirektno da ukažu na jačinu uticaja otpadnih voda.

Za procenu mikrobiološkog kvaliteta vode utvrđeno je da je bolje da se koriste koliformne bakterije i fekalne enterokoke u odnosu na enterične patogene, za koje je proces izolacije skup i vremenski zahtevan (Rompre i sar, 2002). Ipak, nisu sve koliformne bakterije koje su dospele u akvatični sistem poreklom iz otpadnih voda. Na primer, neke vrste rodova *Enterobacter* i *Citrobacter* mogu se naći i u zemljištu, koje spiranjem dospevaju u vodene ekosisteme. Zbog toga se danas pribegava korišćenju molekularnih metoda za identifikaciju bakterijskih sojeva koji su specifični za ljude, odnosno za određene grupe životinja koje se gaje na farmama (Reischer i sar., 2008).

Kao što je pomenuto, jedan od načina zagađivanja površinskih voda različitim hemijskim sredstvima događa se putem izliva različitih otpadnih voda. Komunalne otpadne vode sadrže u većoj meri kućnu hemiju, proizvode za negu, lekove (Lishman i sar., 2006), ali i druga hemijska sredstva koja se koriste u industriji (Chan i sar., 2009). S druge strane, industrijske otpadne vode se u velikoj meri razlikuju i često imaju svoju posebnu infrastrukturu (Chan i sar., 2009). Kao što je rečeno, jedan od značajnih načina zagađivanja događa se i nakon obimnih padavina ili poplava, kada dolazi do otpuštanja nutrijenata, pesticida i drugih hazardnih supstanci koji se upotrebljavaju u poljoprivredi, u vodotokove (Wallach, 1991; Granato, 1996).

Na osnovu korelacija pojedinih mikrobioloških i fizičko-hemijskih parametara moguće je da se utvrdi poreklo mikroorganizama detektovanih u površinskim vodama. Odnosno, ako se prate mikrobiološki parametri kvaliteta vode sa organskim jedinjenjima, koja na primer mogu biti u sastavu đubriva (nitrati, fosfati, pesticidi, insekticidi, itd.) (Shuval i Gruener, 1972) može da se ukaže da je njihovo poreklo sa poljoprivrednih površina, dok mikroorganizmi koji korelišu sa, na primer, proizvodima za ličnu upotrebu ili lekovima vode poreklo iz komunalnih otpadnih voda.

#### **1.4. Biomonitoring**

Biološki monitoring (biomonitoring) predstavlja sistematično korišćenje živih organizama, odnosno biološkog odgovora, u određivanju uslova ili promena u životnoj sredini (Rosenberg, 1998; Gerhardt, 2002; Oertel i Salánaki, 2003). Pored podataka o stanju živih organizama, biomonitoringom se prikupljaju i podaci o zagađivaču, o prisustvu, distribuciji izvora zagađenja, ali i o prenošenju zagađivača (Munn, 1973). Bioindikacija se može vršiti na različitim nivoima biološke organizacije, od nižih kao što je molekularni ili ćelijski nivo organizma, ali i na nivou organizma, populacije, zajednica ili ekosistema.

U studijama koje se bave ekotoksikologijom ili ekogenotoksikologijom, biomonitoring se može vršiti *in situ* ili *ex situ* (Wright i Welbourn, 2002; Kolarević, 2014).

*In situ* studije podrazumevaju da se biomonitoring vrši u prirodnom okruženju, odnosno na određenom lokalitetu, direktno u životnoj sredini. U životnoj sredini organizmi su pod uticajem mnogobrojnih abiotičkih i biotičkih faktora, koji međusobno mogu imati različite interakcije (aditivne, sinergistične, antagonističke ili neutralne). Zbog toga je neophodno da se tokom svakog izlaska na teren, pored stanja bioindikatora i biomarkera, prate i fizičko-hemijski uslovi u datom trenutku. S obzirom na kompleksan sistem uslova koji se nalaze u životnoj sredini i na njihove međusobne interakcije, veoma je teško, ili čak nemoguće, razgraničiti efekat pojedinačnog faktora. Odnosno, treba voditi računa o zaključcima koji se izvode, da li je odgovor ili nedostatak odgovora biomarkera, rezultat

izlaganja (ili neizlaganja) određenoj supstanci od interesa, ili je to odgovor mešovitog uticaja drugih hemijskih agenasa (Forbes i sar., 2006). Stoga je za pouzdanu interpretaciju rezultata, neophodno imati kvalitativne i poredive podatke ne samo o biomarkerima koji se istražuju, već i rezultate merenja pratećih parametara, kako bi se mogli povezati složeni procesi u sistemu. Ovo povezivanje se vrši pomoću korelacija ili multiple regresije između fizičko-hemijskih i hemijskih faktora i biomarkera.

*Ex situ* studije vrše se u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. U ovako organizovanim eksperimentima moguće je kontrolisati više faktora, moguća je selekcija faktora (isključivanje ili dodavanje), analiza uticaja jedne supstance ili smeše supstanci kojima se zna početna koncentracija. Tretmani se mogu organizovati kao statični, semi-statični ili dinamični (protočni) sistemi. Izbor sistema u okviru kojeg će se istraživanje vršiti zavisi od tipa supstance čiji efekat se ispituje, od njene stabilnosti, odnosno tempa degradacije.

### **1.5. Bioindikatori**

Biološke indikatore, odnosno bioindikatore, čine organizmi ili zajednice organizama, koji svojim prisustvom ili odsustvom, brojnošću, morfologijom, fiziologijom i ponašanjem ukazuju na postojanje i jačinu uticaja određenog kritičnog faktora, odnosno ukazuju da se određena fizička ili hemijska varijabla nalazi van svog optimuma (Martin i Caughtrey, 1982; Gerhardt, 2002). Pored odgovora na hronično delovanje nekog faktora ili grupe faktora, bioindikatori moraju biti sposobni da reaguju i na nagle promene u životnoj sredini (Li i sar., 2010).

U odnosu na primenu bioindikatora, razlikujemo tri kategorije (Gerhardt, 2002):

1. Indikatori životne sredine – vrste ili grupa različitih vrsta, kod kojih se odgovor na negativne promene u životnoj sredini može predvideti. Ove vrste su najčešće sedentarne, sa mogućnošću akumulacije različitih materija. One se najčešće koriste u biotestovima.



2. Ekološki indikatori – u ovu grupu spadaju vrste koje su osjetljive na zagađenje, na fragmentaciju habitata i na druge stresove. Odgovor ovih bioindikatora se može ekstrapolirati na nivo zajednice.

3. Indikatori vezani za raznovrsnost – bogatstvo vrste (eng. *species richness*) indikatorskog taksona se koristi kao bogatstvo vrsta zajednice. Pored ovog kriterijuma, ove vrste mogu sadržati i druge osobine kao što je endemizam, ili određene genetičke parametre, specifične osobine populacija ili specifične osobine u preferenciji habitata.

Bioindikatori moraju biti sposobni da akumuliraju visoke koncentracije zagađivača, ali da istovremeno stopa smrtnosti bude niska, takođe, najčešće su to sesilni organizmi (slabo pokretni), te se njihov odgovor na uticaj raznih polutanata povezuje sa lokalitetom gde su uzorkovani (Zhou i sar., 2008). Druge osobine koje bi trebalo da poseduju su: široka rasprostranjenost i lako uzorkovanje – tako se rezultati mogu uporediti između lokaliteta u okiru jednog vodotoka, ali i između lokaliteta koji se nalaze na različitim vodotokovima, pa čak i među vodotokovima na različitim kontinentima; dugačak životni vek – bitno za ispoljavanje dejstva zagađivača; visoka abudanca, ili veličina tela – različite analize zahtevaju određenu količinu materijala; lako laboratorijsko gajenje – ova osobina je bitna za dodatna *ex situ* istraživanja, to jest izlaganje ovih organizama u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (Zhou i sar., 2008).

U rekama se kao bioindikatori najčešće koriste makroinvertebrati (Rosenberg i Resh, 1993; Lenat i Barbour, 1994; Statzner i sar., 2001; Buffagni i sar., 2004), perifiton (Whitton i Rott, 1996; Vis i sar., 1998; Prygiel i Coste, 1999 ; Coste i sar., 2009 ) i ribe (Fausch i sar., 1990; Joy i Death, 2002; Oberdorff i sar., 2002; Pont i sar., 2006). Od velikog značaja za bolji uvid stanja određenog akvatičnog ekosistema su studije koje se bave grupama organizama koje pripadaju različitim trofičkim nivoima (Soininen i Könönen, 2004; Scuri i sar., 2006; Carlisle i sar., 2008; Birk i Hering, 2009, Torrisi i sar., 2014; Aborgiba i sar., 2016).

### 1.5.1. Akvatični makroinvertebrati kao bioindikatori

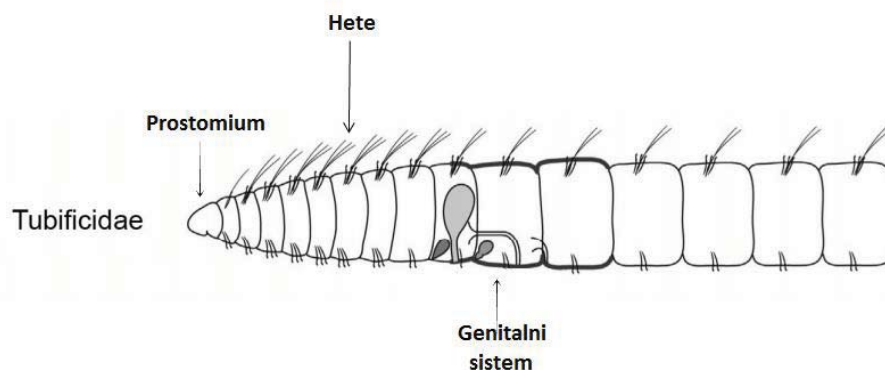
Akvatični makroinvertebrati su organizmi koji bar deo životnog ciklusa naseljavaju vodene ekosisteme (Rosenbert i Resh, 1993). Da bi se organizmi svrstali u akvatične makroinvertebrate, pored kriterijuma staništa – da naseljavaju vodu, moraju da ispune i drugi kriterijum, odnosno da budu veći od 500  $\mu\text{m}$ . U okviru grupe makroinvertebrata nalaze se organizmi koji naseljavaju različite tipove staništa u okviru vodenog ekosistema. Jedni mogu živeti pri površini vode (neuston), drugi naseljavaju dno (bentos), ali mogu živeti i među submerznom vegetacijom (epifloral).

U odnosu na pomenute osobine koje je neophodno da bioindikatori poseduju, može se reći da je grupa akvatičnih makroinvertebrata zahvalna za korišćenje u svrhe biomonitoringa (Paunović, 2007; Marković, 2014; Popović, 2014; Raković, 2015; Zorić, 2015; Tomović, 2015; Atanacković, 2015). Odnosno, kod mnogih grupa akvatičnih makrobeskičmenjaka poznata je njihova ekologija (životni ciklus, preferencije za stanište, ishranu, reprodukciju, itd.). Mnoge vrste koje pripadaju ovoj grupi su, takođe, slabo pokretne, osetljive na promene u životnoj sredini, imaju široku rasprostranjenost. Makrobeskičmenjaci su načelno raznovrsna grupa i vodene zajednice se često odlikuju velikom brojnošću vrsta.

Pored mikrobioloških, fizičko-hemijskih i hemijskih parametara kvaliteta vode (pojedini hemijski parametri specifični za sliv/područje spadaju u parametre ekološkog statusa), za procenu ekološkog statusa ili potencijala, neophodno je da se koriste i biološki indeksi koji su prilagođeni određenim grupama organizama, na primer grupi akvatičnih invertebrata. Da bi se utvrdio stepen organskog zagađenja, opšte degradacije vodenog ekosistema, kao i tip i intenzitet drugih negativnih pritisaka, mogu se koristiti indeksi koji su zasnovani na parametrima raznovrsnosti, biodiverziteta, saprobnosti, zatim grupa indeksa koji su zasnovani na osetljivosti vrsta i/ili zajednica bentosnih beskičmenjaka, kao i učešće familije Tubificidae u uzorcima (ODV, 2000/60/EC; Shannon i Weaver, 1949; Zelinka – Marvan, 1961; Armitage, 1983).

### 1.5.1.1. Akvatične oligohete – familija Tubificidae

Oligohete su parafiletska grupa čiji predstavnici mogu da naseljavaju terestrične ekosisteme, da budu amfibijski ili da naseljavaju akvatične ekosisteme (Timm, 2009). Ova grupa akvatičnih invertebrata pripada celomatama. One imaju zatvoreni krvni sistem kojeg čine dorzalni i ventralni krvni sudovi, koji su međusobno spojeni manjim poprečnim krvnim sudovima. U celomskoj tečnosti nalaze se leukocitne celomocite koje imaju ulogu u imunom odgovoru (Salzet et al. 2006), a u krvnom sistemu hemocite. Kao što im ime kaže, Oligochaeta su maločekinjasti crvi koji su segmentisani i čija je telesna organizacija bilateralno simetrična. Za njih je karakteristično da imaju po dva dorzalno i isto toliko ventralno postavljena snopa heta koje su hitinozne prirode. Broj, oblik i položaj heta je pouzdana taksonomska karakteristika (Slika 1.1.). Usni otvor se nalazi u prednjem delu dela, prostomium. Ovaj deo kod nekih vrsta može biti izdužen i tada se naziva proboscis. Neke vrste akvatičnih oligoheta imaju očne mrlje. Zadnji deo tela, pigidijum, sadrži analni otvor. Što se tiče razmnožavanja, oligohete su hermafroditi. Položaj genitalnih organa je, takođe, taksonomska karakteristika. Neke vrste mogu da se razmnožavaju i aseksualno, fragmentacijom, paratomijom i partenogenezom (van Haaren i Soors, 2013). Respiracija se obavlja preko površine tela. Neke vrste imaju razvijene posebne adaptacije, kao što su škrge koje povećavaju površinu preko koje se vrši respiracija. Oligohete se kreću peristaltičkim pokretima, a neke mogu plivajući da prelaze kraća rastojanja.



Slika 1.1. Glavne taksonomske karakteristike Oligochaeta (primer Tubificidae) (modifikovana slika, Timm, 2009;)

Familija Tubificidae je parafiletska grupa čiji je status u okviru Annelida u naučnim krugovima predmet debate. Na koji način će se tretirati ova familija, da li samostalno, ili u okviru familije Naididae, još uvek je otvoreno pitanje (Atanacković, 2014). Predstavnici familije Tubificidae naseljavaju sve regione, pa i Antarktiku, odnosno imaju kosmopolitsko rasprostranjenje (Atanacković, 2014). Pripadnici ove familije su detrivori, koji žive u sedimentu, prednjim delom tela zarivenim u podlogu, dok se zadnji deo tela nalazi u vodenoj sredini i preko njega se vrši respiracija. Nemaju očne mrlje i sve vrste su neplivači. Razmnožavaju se polnim putem ili fragmentacijom. Fragmentacija, autotomija, ne dešava se samo tokom aseksualnog razmnožavanja. Kod nekih vrsta tubificida, autotomija se javlja kao odgovor na mehaničke ili hemijske draži (Stephenson, 1930; Cameron, 1932; Rasmussen, 1953), tj. predstavlja način odbrane, ali i detoksifikacije organizma od uticaja, na primer, teških metala, ili drugih polutanata (Back, 1990; Lucan-Bouché i sar., 2000, 2003; Lagauzère i sar., 2009). Prilikom napada predatora ili nakon akumulacije određene koncentracije nekih polutanata, ovi crvi odbacuju repni region koji se regeneriše (Bouché i sar., 2000).

Tubificidae su često povezane sa lokalitetima bogatim organskim materijama i smanjenom oksigenacijom. Njihova zastupljenost u ukupnom uzorku akvatičnih invertebrata ukazuje na stepen zagađenja lokaliteta, odnosno veća zastupljenost ove familije ukazuje na veće organsko zagađenje. Jedna od važnijih osobina staništa koja odgovara ovoj grupi životinja jeste podloga u kojoj dominiraju sitnije frakcije sedimenta. Male planinske reke koje su izolovanije, a samim tim i pod manjim antropogenim pritiscima, često se karakterišu podlogom koju čine frakcije većih dimenzija (krupniji pesak, šljunak, kamenje, itd.). Akvatični crvi žive zariveni u sediment, tako da im staništa sa krupnijom podlogom ne odgovaraju. Muljevita podloga koja najviše odgovara tubificidama nalazi se u ravničarskim rekama, jezerima i barama, odnosno u ekosistemima koji su pod većim antropogenim pritiscima.

Tubificidae se često koriste u ekotoksikološkim ispitivanjima (Rodriguez i Reynoldson, 2011). U ovim studijama vršena su istraživanja bioakumulacije metala, policikličnih aromatičnih ugljovodonika, herbicida i insekticida, bihevioralna istraživanja,

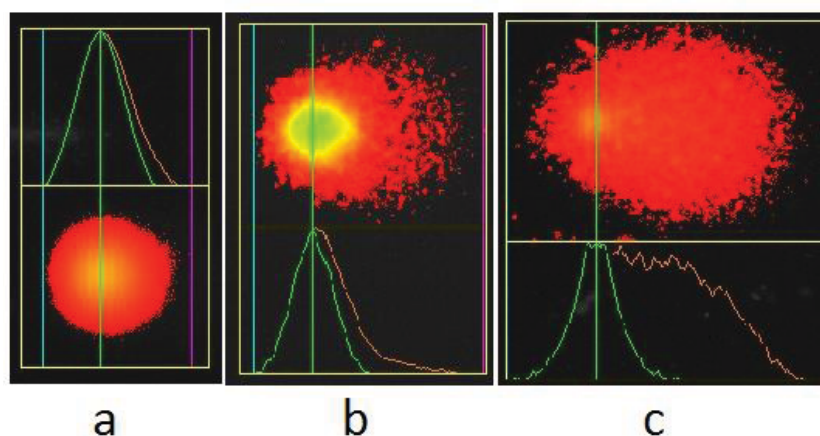
uticaja na gornje slojeve sedimenta (Keilty i sar., 1988; Bouche i sar., 2000; Millward i sar., 2001; O'Gara i sar., 2004; Ciutat i sar., 2005; Steen Redeker i sar., 2007; Paris-Palacios i sar., 2010). Usled načina života one su pod uticajem različitih polutanata preko sedimenta (ingestijom) ili vode (epidermalnim kontaktom).

### **1.6. Ekogenotoksikološka istraživanja**

Ekogenotoksikologija predstavlja subdisciplinu genetičke toksikologije koja primenjuje znanja iz oblasti molekularne genetike, DNK reparacije, mutageneze, populacione genetike, matematičkog modeliranja i statistike. Metodama u genotoksikologiji detektuju se efekti i posledice izlaganja genotoksičnim agensima. Ekogenotoksikologija primenjuje principe i tehnike genotoksikologije za utvrđivanje efekata zagađivača spoljašnje sredine (Shugart i Theodorakis, 1994), odnosno proučava hemijski i fizički indukovane promene genetičkog materijala u organizmima. Istraživanja u ovoj oblasti su usmerena na biološki monitoring mutagena spoljašnje sredine u određenim ekosistema i na direktne konsekvence oštećenja DNK molekula u *in situ* i *ex situ* istraživanjima.

Komet test ili elektroforeza pojedinačnih ćelija na gelu (*eng.* Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE) je jedna od metoda koja se često koristi za procenu genotoksičnog potencijala. Alkalna verzija ovog testa omogućava detekciju jednolančanih i dvolančanih prekida na DNK molekulu, kao i detekciju alkalno labilnih mesta (Singh i sar., 1988). Ova tehnika se zasniva na osobini DNK molekula, koji je negativno naelektrisan, da migrira kroz električno polje ka pozitivno naelektrisanjoj elektrodi, anodi. Po završetku migracije kretanje DNK molekula ostavlja jedinstven šablon za svaku ćeliju, odnosno za jedro (Tice i sar., 2000) koji liči na nebesko telo kometu po čemu je metoda dobila popularno ime (Slika 1.2). Ranije se analiza dobijenih kometa radila na osnovu podele jedara u kategorije (0 – neoštećeno jedro do 4 – jako oštećeno jedro) (Collins i sar., 1997), dok se danas koriste posebni programski paketi koji mere fluorescenciju. Odnosno, neophodno je da se DNK oboji nekom fluorescentnom bojom, na primer etidijum bromidom (EB), akridin oranžom

(AO) ili nekom drugom bojom koja može da se vezuje za DNK molekul. U ovom istraživanju korišćen je Comet IV Computer Software (Perceptive Instrumnts, UK) koji meri parametre: intenzitet repa (*eng.* Tail Intensity – TI; intenzitet fluorescencije repa komete u odnosu na fluorescenciju čitave komete), dužina repa (*eng.* Tail Length – TL; dužina repa komete) i momenat repa (*eng.* Olive Tail Moment – OTM; izveden parametar iz TI i udaljenosti centra mase glave i repa).



Slika 1.2. Prikaz komete: a) neoštećena ćelija; b) blago oštećena ćelija; c) oštećena ćelija

Iako postoje literaturni podaci o proceni nivoa oštećenja DNK molekula kod različitih grupa akvatičnih invertebrata (Pavlica i sar., 2001; Štambuk i sar., 2009; Sobkowiak i Lesicki, 2009; Mihaljević i sar., 2009; Kolarević i sar., 2013; Martínez-Paz i sar., 2013; Vuković-Gačić i sar., 2014), u slučaju akvatičnih tubificida ova metoda je bila prvi put primenjena u našem istraživanju uticaja citostatika na integritet DNK molekula vrste *Limnodrilus udekemianus*, a zatim i u *in situ* istraživanjima i na vrstama *Branchiura sowerbyi*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Limnodrilus claparedeanus* i *Tubifex tubifex*.

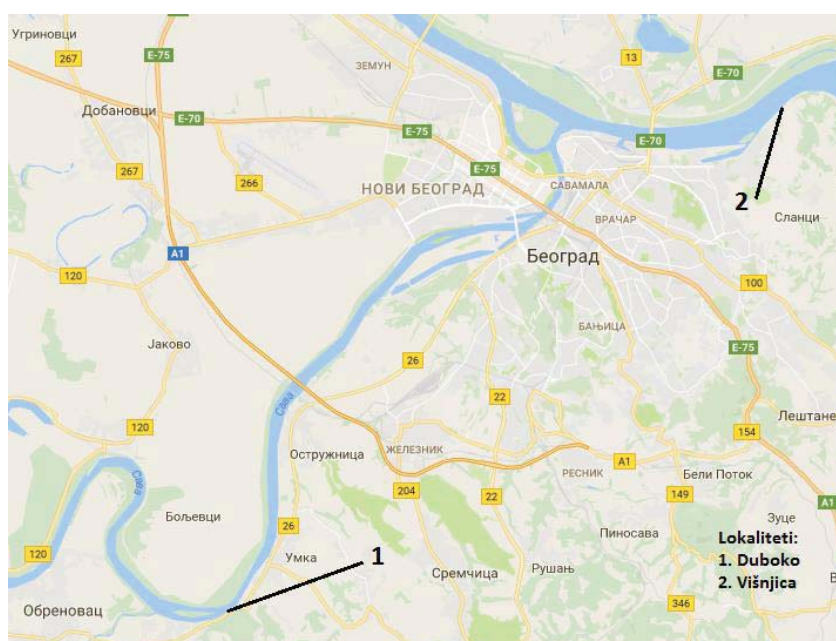
Istraživanje je rađeno na celomocitama i hemocitama tubificidnih vrsta. Prema literaturnim podacima izolacija celomocita je moguća neinvazivnim metodama. U ovu svrhu, na primer, može se koristiti rastvor koji dovodi do iritacije crva te oni izbacuju celomocite van tela (Engelmann i sar., 2004), ili se izolacija može raditi ultrasoničnim talasima ili električnom stimulacijom koje, takođe, dovode do izbacivanja celomocita u spoljašnju sredinu (Sauve i sar., 2002; Hendawi i sar., 2004; Irizar i sar., 2014). U slučaju

našeg istraživanja neinvazivnim metodama nije dobijen dobar prinos ćelija, ali ni prihvatljiva vijabilnost ćelija za genotoksikološke studije, te je za izolaciju ćelija bilo neophodno da se životinje žrtvuju. Na ovaj način dobijena je suspenzija ćelija, sačinjena od celomocita i hemocita na kojima je kasnije analiziran nivo oštećenja DNK molekula.

U ovoj disertaciji ekogenotoksikološka istraživanja su organizovana kao *in situ* i *ex situ* studije.

### 1.6.1. *In situ* istraživanja

U ovoj studiji *in situ* istraživanja su vršena na dva lokaliteta, jednom na Savi (lokalitet Duboko) i jednom na Dunavu (lokalitet Višnjica) (Slika 1.3).



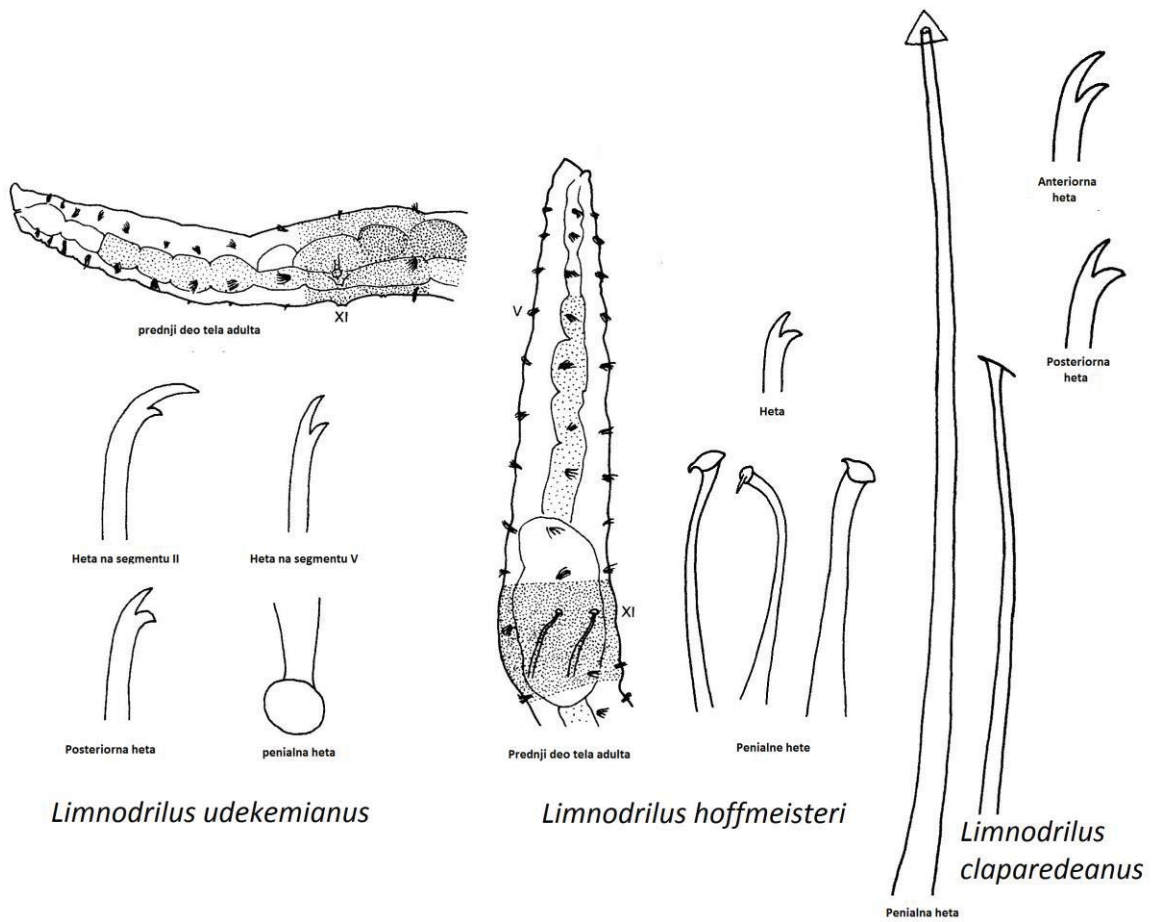
Slika 1.3. Lokaliteti: 1. Duboko; 2. Višnjica

Sava protiče kroz Srbiju svojim donjim tokom koji se karakteriše tipičnim nizijskim odlikama. Kod Sremske Mitrovice prosečan godišnji protok je  $1500 \text{ m}^3/\text{s}$ . Dunav protiče kroz Srbiju svojim srednjim tokom. Na njegove hidrološke uslove u velikoj meri utiču

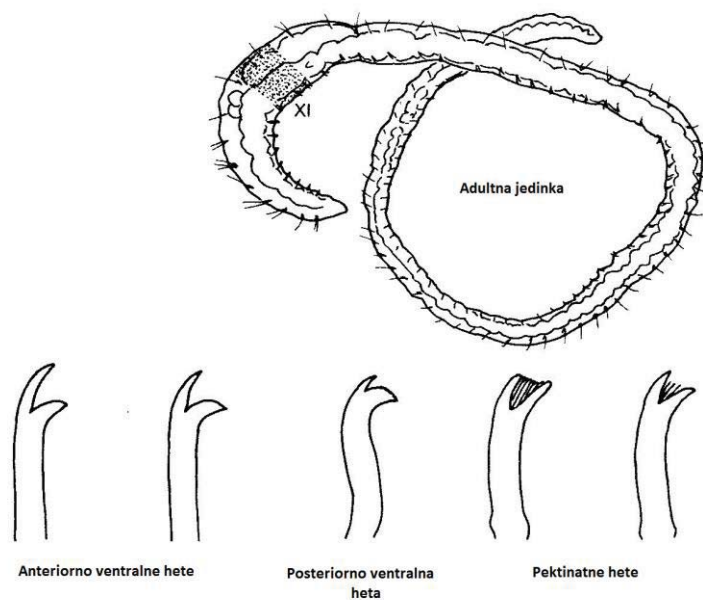
velike pritoke (Simonović i sar., 2010), naročito Sava nakon koje je srednji višegodišnji protok 5310 m<sup>3</sup>/s (Atanacaković, 2015). Lokaliteti Duboko na Savi i Višnjica na Dunavu trpe jake antropogene uticaje. Lokalitet Duboko se nalazi uzvodno u odnosu na Beograd i pod uticajem je višestrukih stresora kao što su otpadne vode grada od 50.000 stanovnika, poljoprivredne aktivnosti, a od naručitog značaja se izdvaja aktivnost termoelektrane „Nikola Tesla I i II“ i pridruženih pepelišta. S druge strane, lokalitet Višnjica se nalazi nizvodno u odnosu na Beograd. Na ovom lokalitetu je izražen uticaj otpadnih voda s obzirom da se uzvodno od njega nalazi glavni kolektor otpadnih voda Beograda. Takođe, na suprotnoj, levoj obali izražene su poljoprivredne aktivnosti.

Za *in situ* istraživanja su korišćene vrste iz familije Tubificidae: *L. udekemianus*, *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *T. tubifex* i *B. sowerbyi* (Slike 1.4. – 1.6.). Nabrajane vrste imaju kosmopolitsko rasprostranjenje. Preferiraju staništa koja su bogata organskom materijom i važna su karika u lancu ishrane. Takođe, vrste kao što su *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus* i *T. tubifex* čine jednu od glavnih komponenti u zajednicama akvatičnih invertebrata, a uočeno je da poslednje nestaju sa staništa u slučaju povećanog zagađenja (Lucan-Bouché i sar., 1999; Paris-Palacios i sar., 2010). *B. sowerbyi* je za razliku od ostalih vrsta monofiletska alohtona vrsta za naše krajeve koja potiče iz tropskih predela. Ova vrsta ima veće dimenzije tela sa karakterističnim filiformnim škragama sa dorzalne i ventralne strane zadnje trećine tela. Pošto unosi velike količine substrata (Wang i Matisoff, 1997) modifikuje poroznost substrata, ali utiče i na fluks nutrijenata i na ciklus ugljenika i azota u svojoj neposrednoj blizini (Fakuhara i sar., 1980). Ekologija vrste *B. sowerbyi* ukazuje da ima veliki uticaj na fizičko-hemijsku i biološku dinamiku gornjih slojeva sedimenta (Matisoff i sar., 1999). Glavne taksonomske karakteristike pomenutih vrsta date su na slikama 1.4-1.6.

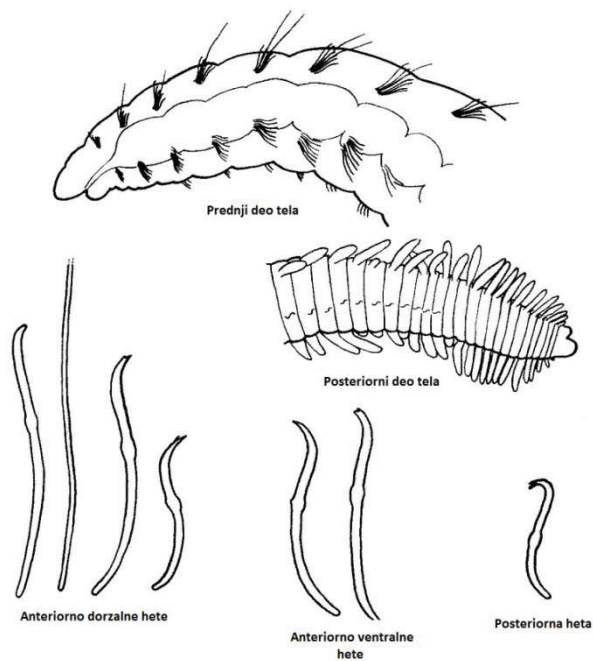




Slika 1.4. Šematski prikazi glavnih taksonomskih karakteristika kod *L. udekemianus*, *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus* (modifikovano Timm, 2009)



Slika 1.5. Šematski prikaz glavnih taksonomskih karakteristik vrste *T. tubifex* (modifikovano Timm, 2009)



Slika 1.6. Šematski prikaz glavnih taksonomskih karakteristik vrste *B. sowerbyi* (modifikovano Timm, 2009)

Većina *in situ* istraživanja rade se na pojedinačnim vrstama, na primer na određenim vrstama školjki *Unio pictorum*, *Unio tumidus*, *Sinanodonta woodiana* (Guidi i sar., 2010; Kolarević i sar., 2013), na ribama *Squalius cephalus*, *Abramis brama*, *Alburnus alburnus* (Sunjog i sar., 2014; Kostić i sar., 2016; Deutschmann i sar., 2016), itd. U slučaju akvatičnih oligoheta zbog malih dimenzija tela i taksonomskih karaktera, nemoguće je odrediti vrstu bez korišćenja mikroskopa, sem u slučaju nekoliko vrsta koje imaju specifične adaptacije kao što je kod vrste *B. sowerbyi* prisustvo filiformnih škruga. Razlog nedostatka literaturnih podataka o korišćenju ove grupe životinja u *in situ* ekogenotoksikološkim istraživanjima može se upravo naći u načinu determinacije, prilikom koga može doći do njihovog oštećenja što se može odraziti na rezultate istraživanja.

U ovoj doktorskoj disertaciji uticaj životne sredine praćen je na DNK materijalu vrste *B. sowerbyi*, kao i na uzorcima slučajno izabranih jedinki iz oligohetne faune. Kao što je rečeno, tubificidne vrste naseljavaju staništa koja su pod antropogenim pritiscima zbog čega je nemoguće naći jedinke koje nastanjuju nezagađene referentne lokalitete. Stoga su za dobijanje referentnih vrednosti oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* korišćene jedinke koje su gajene u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Kao parametri za procenu uticaja sredinskih faktora korišćeni su preživljavanje crva i ćelija, kao i nivo oštećenja DNK molekula.

### **1.6.2. *Ex situ* istraživanja**

*Ex situ* istraživanja se izvode u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Za pravilno izvođenje eksperimenata u *ex situ* uslovima ne smeju da se koriste životinje koje su uzete neposredno pre postavke eksperimenata iz životne sredine. Životinje koje se koriste u ovako organizovanim eksperimentima mogu imati dvojako poreklo, direktno iz životne sredine ali sa bitnim preduslovom da su u kontrolisanim laboratorijskim uslovima prošle aklimaciju ili da to budu životinje iz laboratorijskih kultura. Proces aklimacije životinja je bitan zbog prilagođavanja životinja optimalnim uslovima u kojima su eliminisani stresni faktori koji ne mogu biti isključeni u prirodnom okruženju. Istraživanja na različitim

životinjama ukazuju da nakon procesa aklimacije dolazi do smanjenja DNK oštećenja kod životinja (Rigonato i sar., 2005; Labieniec i sar., 2007; Kolarević, 2014).

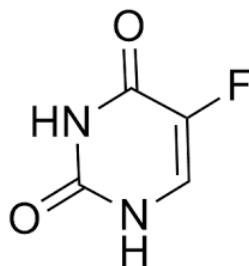
Za ovo istraživanje korišćene su jedinke vrste *L. udekemianus* koje su gajene u kontrolisanim laboratorijskim uslovima, odnosno jedinke koje su formirale stabilnu laboratorijsku kulturu.

Predmet *ex situ* istraživanja bio je ispitivanje uticaja dva farmaceutika, citostatika 5-fluorouracila (5 – FU) i etopozida (ET), na integritet DNK molekula vrste *L. udekemianus*. Kao pozitivna kontrola eksperimenata korišćeni su tretmani sa model mutagenom CdCl<sub>2</sub>.

Kao što je pomenuto, usled razvoja osetljivih hemijskih metoda danas se mogu detektovati niske koncentracije različitih polutanata u akvatičnoj sredini, među kojima i farmaceutika kojima treba posvetiti veliku pažnju pošto mogu imati ozbiljne posledice po akvatične ekosisteme. Danas se farmaceutici dizajniraju tako da imaju jače dejstvo, da budu potentniji ali i da budu otporniji na degradaciju. Mnogi lekovi nisu selektivni (mogu da utiču na većinu eukariotskih ćelija) i pravljeni su da utiču na ciljne proteine u relativno malim dozama. Zbog ove osobine mnogi farmaceutici ne samo da utiču na ciljne grupe organizama, nego mogu imati i dejstvo na neciljane organizme (*eng.* „non-target organisms“) što proširuje njihovo štetno dejstvo (Gunnarsson et al., 2008). Aktivni sastojci nekih farmaceutika koji se nalaze u akvatičnoj sredini mogu biti povezani sa ozbiljnim efektima u razviću akvatičnih organizama (Jobling et al, 2002; Khetan and Collins ,2007). Velika opasnost ovih supstanci nalazi se u činjenici da pokazuju genotoksični efekat u izuzetno malim koncentracijama. Prisustvo genotoksičnih i potencijalno karcinogenih supstanci u akvatičnim ekosistemima predstavlja veliki rizik po ljude ali i za organizme koje nastanjuju ove sredine (Houk and Waters 1996; Ohe et al. 2004; Nehls and Segner 2005; Park et al. 2006).

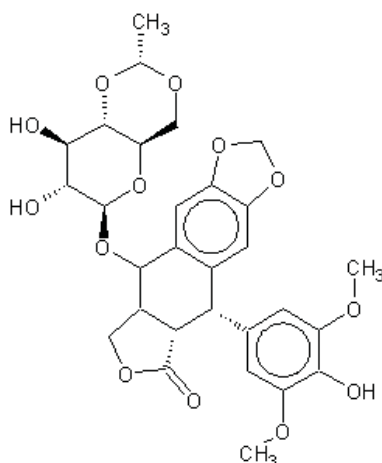
Jedna grupa farmaceutika koja je od posebne važnosti za zaštitu životne sredine jeste grupa citostatika koji mogu stići u akvatične ekosisteme nepromenjeni ili kao metaboliti. Citostatici imaju karcinogeni, mutageni, citotoksični, genotoksični ili embriotoksični potencijal (Kümmerer, 2001).

5 – FU ima široku upotrebu u terapijama različitih kancera. Pokazao se kao izuzetno efektivan u terapiji kancera debelog creva. Po hemijskoj strukturi, 5 – FU je analog uracila sa atomom fluora na poziciji C-5 (Slika 1.7). Kao antimetabolit može inhibirati esencijane biosintetske procese ili se može ugrađivati u makromolekule, kakvi su RNK i DNK i na taj način narušiti njihovo normalno funkcionisanje (Longley i sar., 2003). Od esencijalnih biosintetskih puteva inhibira rad timidilat sintaze i sintezu RNK molekula, a kao fluoronukleotid se inkorporira u RNK ili DNK. Ova dva mehanizma dejstva su povezana, obzirom da usled nefunkcionisanja timidilat sintaze ne dolazi do formiranja timina, čime se omogućava metabolitu 5 – FU, dezoksi uridin trifosfatu (dUTP) da se ugrađuje u DNK molekul. Tokom popravke dolazi do ekscizije pogrešnih baza ili nukleotida. Ako je napravljen veliki broj prekida dolazi do programirane ćelijske smrti, odnosno do apoptoze (Longley i sar., 2003).



Slika 1.7. Hemijska struktura 5 – fluorouracil (slika preuzeta sa interneta)

Citostatik sa drugačijim mehanizmom dejstva u odnosu na 5 – FU je antineoplastični farmaceutik ET. ET je derivat podofilotoksina koji se koristi u terapijama tumora pluća, limfoma, testisa, leukemije, itd. (Van Maanen i sar., 1988) (Slika 1.8.). Mehanizam dejstva ovog citostatika odvija se inhibicijom rada enzima topoizomeraze II. Paveći dvolančane prekide DNK molekula čime se omogućava prolazak drugog dvolančanog segmenta kroz prekid, topoizomeraza II sprečava preterano uvrtnje DNK molekula (Hande, 1998) tokom replikacije, transkripcije, segregacije hromozoma i DNK rekombinacije. ET ne utiče na katalitičku funkciju topoizomeraze II već se vezivanjem za nju formira kompleks ET-topoizomeraza II čime se sprečava njegova uloga kao ligaze, odnosno spajanja nastalih prekida.



1.8.. Hemijska struktura etopozida (slika preuzeta sa interneta)

Kao što je rečeno, za proveru eksperimentalne postavke korišćen je tretman crva sa  $\text{CdCl}_2$ . Koncentracija ovog metala u vodi zavisi od mineralnog sastava stena i okolnog zemljišta, ali najveći uticaj svakako dolazi od ljudske aktivnosti (korišćenje u industriji baterija, izlivanje otpadnih voda različitih industrija u rekama, koristi se kao sredstvo protiv korozije, kao pigment, produkt sagorevanja fosilnih goriva, ulazi u sastavu fosfatnih đubriva, itd.) (CCME, 2014). Usled dugačkog poluživota, dolazi do akumulacije ovog zagađivača u biljkama i životinjama, pa i u čoveku (Filipič, 2012), a pošto je toksični metal koji dovodi do genomske nestabilnosti treba mu dati posebnu pažnju obzirom da može imati dalekosežne negativne efekte na biotu. Pošto je u mnogobrojnim tkivima potentan karcinogen Međunarodna Agencija za Istraživanja Kancera (International Agency for Research on Cancer, IARC) klasifikovala je kadmijum kao humani karcinogen (Waalkes i sar., 2003). Iako kadmijum nije redoks aktivan element i ne učestvuje direktno u Fentonovoj reakciji povećava koncentraciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). U tretiranim ćelijama dovodi do smanjenje intraćelijske koncentracije glutaciona i redukuje aktivnost ćelijskih antioksidativnih enzima (superoksid disutaze, peroksidaze i katalaze) čime se povećava oksidativni stres u ćelijama (Hussain i sar, 1987; Casalino, 2002; Nemmiche i sar., 2011; Filipič, 2012). Giaginis i sar. (2006) ukazuju da kadmijum sprečava normalnu reparaciju DNK molekula, a Filipič (2012) skreće pažnju i na njegovo dejstvo u apoptozi i proliferaciji ćelija.

**CILJEVI**

## 2. CILJEVI

Akvatične Oligochaeta, naručito vrste familije Tubificidae, nastanjuju sve tipove vodenih staništa, na svim kontinentima i čine jednu od najznačajnijih grupa, po brojnosti jedinki i biomasi, u zajednicama akvatičnih invertebrata. Pošto nastanjuju staništa koja su pod velikim antropogenim pritiscima, a kao slabo pokretni organizmi, imaju ulogu bioindikatora zagađenih akvatičnih ekosistema. Brojni su literaturni podaci o upotrebi ovih organizama u toksikološkim studijama, ali nisu dostupni pisani izvori o upotrebi ove grupe životinja u *in situ* i *ex situ* ekogenotoksikološkim ispitivanjima.

Imajući u vidu pomenute činjenice, definisani su sledeći ciljevi ovog rada:

- da se, na osnovu mikrobioloških i fizičko-hemijski parametara, proceni kvalitet vode na lokalitetima Duboko na Savi i Višnjica na Dunavu,
- da se ispita korelacija između mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode,
- da se utvrdi sastav zajednice akvatičnih Oligochaeta na lokalitetima Duboko i Višnjica,
- da se odredi ocena ekološkog potencijala na lokalitetima Duboko i Višnjica na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta,
- da se uspostave laboratorijske kulture *Brachiura sowerbyi* i *Limnodrilus udekemianus*,
- da se komet test optimizuje i prilagodi primeni na ćelijama celomske tečnosti i krvnog sistema oligoheta iz familije Tubificidae,



- da se odredi bazalni nivo oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi*,
- da se ispita osetljivost celomocita i hemocita vrste *B. sowerbyi* u detekciji oštećenja DNK molekula usled sredinskog stresa *in situ*,
- da se ispita osetljivost celomocita i hemocita poreklom iz mešovitog uzorka akvatičnih oligoheta (*L. claparedeanus*, *L. hoffmeisteri*, *L. udekemianus*, *B. sowerbyi* i *Tubifex tubifex*) u detekciji oštećenja DNK molekula usled sredinskog stresa *in situ*,
- da se utvrde korelacije nivoa oštećenja DNK molekula oligoheta sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode u *in situ* istraživanjima,
- da se utvrde korelacije oštećenja DNK molekula u uzorcima *B. sowerbyi* i u mešovitim uzorcima sa sastavom zajednice Oligochaeta,
- da se odredi bazalni nivo oštećenja DNK molekula vrste *L. udekemianus*,
- da se ispita toksični uticaj CdCl<sub>2</sub>, 5-fluorouracila i etopozida na preživljavanje adulta i celomocita i hemocita vrste *L. udekemianus* u *ex situ* istraživanjima i
- da se ispita uticaj CdCl<sub>2</sub>, 5-fluorouracila i etopozida na nivo oštećenja DNK molekula celomocita i hemocita vrste *L. udekemianus* u *ex situ* istraživanjima.

# **MATERIJAL I METODE**

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Materijal**

##### **3.1.1. Rastvori**

###### **Rastvor za fiksiranje uzoraka makroinvertebrata**

4% rastvor formaldehida „ZORKA Pharma“ Šabac (Formaldehid HCHO 35%, M = 30,03 g/mol).

95-96 % rastvor etanola (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) „ZORKA Pharma“ Šabac.

###### **Lumbricus Balanced Salt Solution – LBSS**

Za 1 L rastvora potrebno je:

71,5 mM NaCl .....	3,93 g
4,8 mM KCl .....	0,358 g
1,1 mM MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O .....	0,27 g
0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,054 g
0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O .....	0,043 g
4,2 mM NaHCO <sub>3</sub> .....	0,353 g
dH <sub>2</sub> O .....	1000 mL

pH se podešava na 7,3; Osmotski pritisak rastvora je 300 mOsm;

**Rastvor za lizu (pH 10)**

Za 1 L rastvora potrebno je:

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

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

**Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)**

Za 1 L rastvora potrebno je:

10 M NaOH „Superlab“ (Beograd, Srbija) .....	30 mL
0,2 M EDTA „Sigma“ (St. Louis, MO, USA) .....	5 mL
dH <sub>2</sub> O .....	965 mL

Ne podešavati pH.

**10 M NaOH**

Za 500 mL rastvora je potrebno:

NaOH „Superlab“ (Beograd, Srbija) .....	200 g
dH <sub>2</sub> O .....	do 500 mL

**0,2 M EDTA**

Za 500 mL rastvora je potrebno:

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

dH<sub>2</sub>O ..... do 500 mL

**Rastvor za neutralizaciju (pH 7,5)**

Za 1 L rastvora potrebno je:

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

dH<sub>2</sub>O ..... 1000 mL

Nakon podešavanja pH rastvora treba čuvati u frižideru.

**1% NMP za prvi sloj**

Za 100 mL rastvora potrebno je:

NMP „Eurobio“ (Francuska)..... 1 g

dH<sub>2</sub>O ..... 99 mL

**1% NMP za drugi sloj**

Za 100 mL rastvora potrebno je:

NMP „Eurobio“ (Francuska) ..... 1 g

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

**1% LMP**

Za 100 mL rastvora potrebno je:

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

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

**1xPBS**

Za 1000 mL rastvora potrebno je:

10xPBS ..... 100 mL

Sterilna dH<sub>2</sub>O ..... 900 mL

**Etidijum bromid SI**

10 mg/mL „Sigma“ (St. Louis, MO, USA)

**Akridin oranž SI**

10 mg/mL „Sigma“ (St. Louis, MO; USA)

**Akridin oranž/etidijum bromid**

Za 1 mL rastvora potrebno je:

Akridin oranž SI ..... 10 µL

Etidijum bromid ..... 10 µL

dH<sub>2</sub>O ..... 980 µL

**Akridin oranž za komet test**

2 µg/ml „Sigma“ (St. Louis, MO, USA)

**CdCl<sub>2</sub> primarni stok 10 mg/mL**

CdCl<sub>2</sub> „Sigma“ (St. Louis, MO; USA) ..... 10 mg

dH<sub>2</sub>O ..... 1 mL

### **3.1.2. Citostatici**

Citostatici 5-fluorouracil (CAS br. 51-21-8) i etopozid (33419-42-0) firme „Sigma-Aldrich“. Primarni stokovi 5-fluorouracila pravljene su u koncentraciji 1 mg/ml u destilovanoj vodi. Primarni stok etopozida pripremljen je u dimetil sulfoksidu (DMSO) u finalnoj koncentraciji 50 mM. Citostatici su rastvarani neposredno na dan eksperimenta.

#### **5-fluorouracil primarni stok 1 mg/mL**

Za 10 mL rastvora potrebno je:

5-fluorouracil „Sigma“ (St. Louis, MO; USA) ..... 10 mg  
dH<sub>2</sub>O ..... 10 mL

Etopozid primarni stok 50 mM

Za 1 mL rastvora potrebno je:

Etopozid „Sigma“ (St. Louis, MO, USA) ..... 29,4 mg  
DMSO ..... 10 mL

### **3.2. Područje istraživanja**

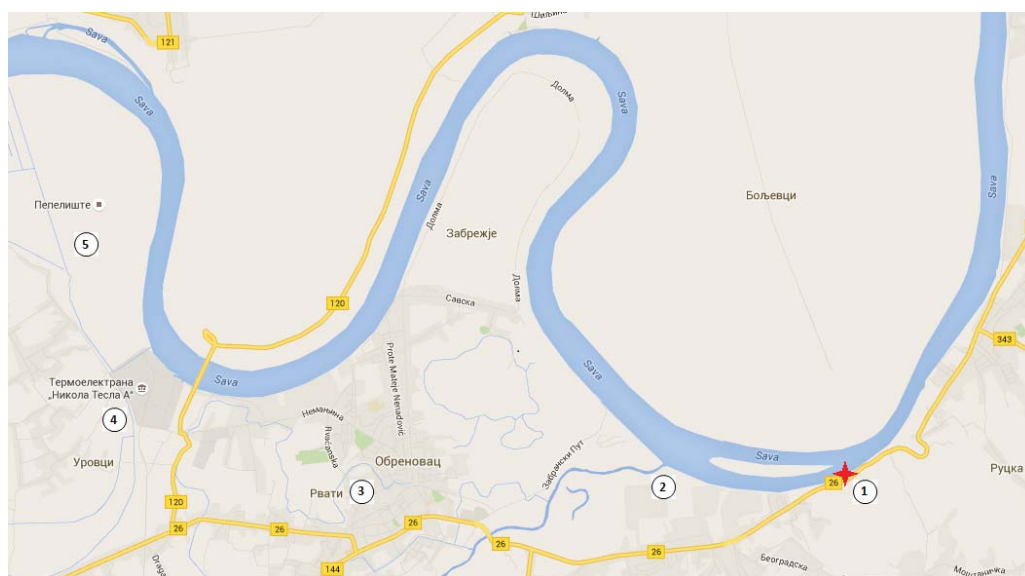
Ovom doktorskom disertacijom obuhvaćeno je istraživanje na Savi i Dunavu koja su vršena tokom 2014. i 2015. godine.

**Sava** (dužina 945 km; površina sliva 97,713 km<sup>2</sup>) je desna pritoka Dunava i najveća reka koja se na teritoriji Srbije uliva u Dunav. Svojom tokom prolazi kroz 4 države: Sloveniju, Hrvatsku, Bosna i Hercegovinu i Srbiju. Gornji tok Save pripada alpskom tipu, a od Hrvatske do ušća Sava je tipična ravničarska reka. Na Savi se mogu uočiti različiti tipovi pritisaka. Hidrogeološke promene su izražene u gornjem toku Save, a u srednjem i donjem toku od velikog značaja su uticaji koji dolaze od velikih naselja (neprečišćena otpadna

voda), kao i uticaji intezivne industrijske aktivnosti (teška industrija, hemijska industrija, itd.) i poljoprivrede (spiranja zemljišta). Od ukupne dužine Save Srbiji pripada 207 km rečnog toka. Kroz Srbiju duž njenih obala nalazi se više zaštićenih područja, plavnih područja, močvara, mrtvaja, a najveće pritoke su Drina, Bosut i Kolubara.

### **Sava – lokalitet Duboko**

Deo istraživanja u okviru ove doktorske disertacije rađeno je na lokalitetu Duboko (25 rkm; 44°39'39.77" N 20°16'52.57" E) na Savi tokom 2014. i 2015. godine. Tokom 2014. godine na ovom lokalitetu, uzorkovanje je vršeno tokom 9 meseci (januar, februar, mart, maj, jun, jul, avgust, oktobar i decembar), a tokom 2015. godine tokom 10 meseci (mart, april, maj, jun, jul, avgust, septembar, oktobar, novembar i decembar). Ovaj lokalitet se nalazi nizvodno od Obrenovca i ušća reke Kolubare (27 rkm), a uzvodno od Beograda (Slika 3.1. - 3.3.). Duboko je pod uticajem otpadnih neprečišćenih voda Obrenovca i Bariča, pod uticajem Termoelektrana „Nikola Tesla“ (TENT A i B) i deponija pepela u sklopu TENT-a. Ovaj lokalitet se karakteriše prosečnim protokom vode od oko 3.000 m<sup>3</sup>/s i dobrom aeracijom (Vuković-Gačić i sar., 2014). Od maja do septembra 2014. godine ovaj lokalitet je bio pod uticajem velikih poplava koje su se desile u slivu Save.



Slika 3.1. Lokalitet Duboko i značajni zagađivači: 1. mesto uzorkovanja; 2. ušće Kolubare; 3. grad Obrenovac; 4. termoelektrana „Nikola Tesla A“; 5. pepelište





Slika 3.2. Lokalitet Duboko za vreme poplava (2014. godina)



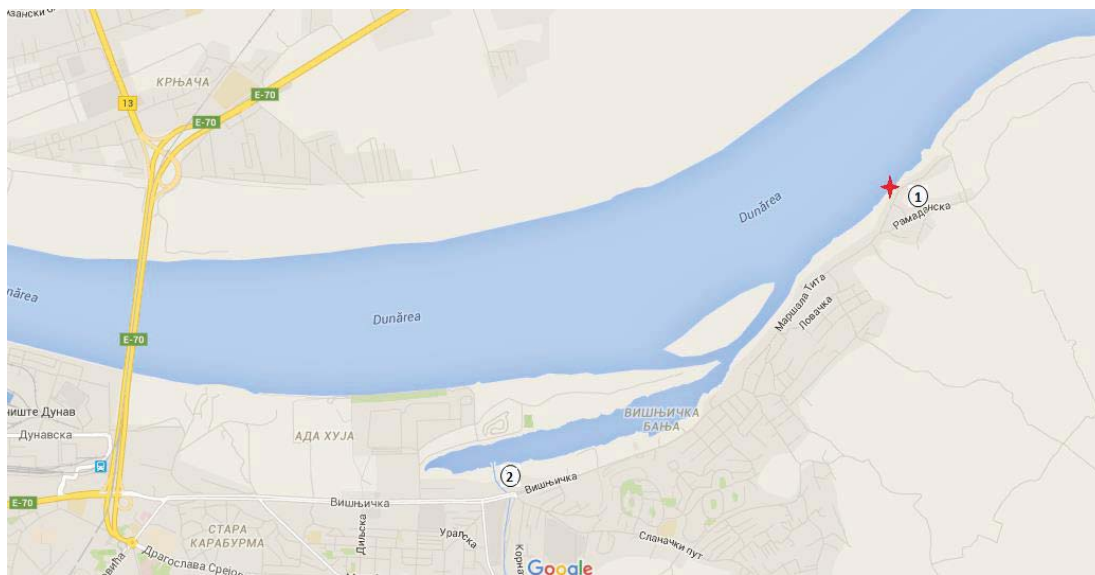
Slika 3.3. Lokalitet Duboko – normalan vodostaj

**Dunav** je druga najduža reka u Evropi (2.850 km) i najznačajniji evropski plovni put. Poput Save, Dunav je međunarodna reka koja prolazi kroz 10 država (Nemačka, Austrija, Slovačka, Mađarska, Hrvatska, Srbija, Rumunija, Bugarska, Moldova i Ukrajina), a njegovom velikom slivnom području (801.093 km<sup>2</sup>) pripadaju dodatnih 9 evropskih država (Italija, Poljska, Švajcarska, Češka, Slovenija, Bosna i Hercegovina, Crna Gora,

Makedonija i Albanija). Kako bi se jasnije uvideo značaj Dunava treba reći da u okviru 19 evropskih država koje povezuje, u njegovom slivnom području živi 165 miliona ljudi (Paunović i sar., 2007). Obzirom da prolazi kroz velike gradove, Dunav je pod velikim antropogenim pritiscima, što od velike količine otpadnih voda (prečišćenih i neprečišćenih), od industrije koja prati velike urbane centre (industrija za proizvodnju električne energije, hemijska industrija, rafinerije nafte, itd.), takođe na Dunavu je izgrađeno više hidroelektrana koja svojim položajem menjaju hidromorfološke odlike reke. Od ukupne dužine Dunava Srbiji pripada 588 km. Većim delom toka kroz Srbiju Dunav je ravničarska reka, a spiranje zemljišta u ovom sektoru je glavni uzrok zagađenja (sa zemljištem se ispiraju i hemijska sredstva koja se koriste u poljoprivredne svrhe). Glavne pritoke Dunava kroz Srbiju su Tisa, Sava i Velika Morava.

#### **Dunav – lokalitet Višnjica**

Lokalitet Višnjica na Dunavu (1165 rkm; 44°50'22.60" N 20°33'29.31" E; kod restorana „Dunavska terasa“) nalazi se pod uticajem otpadnih voda Beograda (Slika 3.4. - 3.5.). U blizini ovog lokaliteta, u rukavcu kod Ade Huje ispušta se otpadna voda iz glavnog kolektora Beograda, a u neposrednoj blizini ispuštaju se otpadne vode iz domaćinstava i restorana koji se nalaze na obali Dunava. Na ovom lokalitetu uzorkovanje je rađeno tokom 10 meseci (februar, mart, april, maj, jun, jul, septembar, oktobar, novembar i decembar) 2014. godine.



Slika 3.4. Lokalitet Višnjica: 1. mesto uzorkovanja; 2. mesto ispusta glavnog kolektora otpadnih voda Beograda.



Slika 3.5. Lokalitet Višnjica (slika je preuzeta sa interneta)

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1. Ekološka istraživanja**

##### **3.3.1.1. Prikupljanje i laboratorijska obrada materijala makroinvertebrata za procenu sastava zajednice makroinvertebrata**

Uzorkovanje faune dna vršeno je ručnom bentološkom mrežom (promer okca 500 i 250  $\mu\text{m}$ ), ili uz pomoć bentološkog bagera tipa Van Veen (zahvatna površina 270  $\text{cm}^3$ ) na podlozi koja je muljevita sa manjim prisustvom čestica peska, sitnog šljunka i detritusa. U slučaju kada su uzorci sedimenta uzimani bagerom, isti su zatim prebačeni u bentološku mrežu i pažljivo prosejani, kako bi se biološki materijal odvojio od sedimenta, a kako bi se izbeglo povređivanje uzorkovanih organizama. Tokom uzorkovanja uzimani su uzorci u duplikatu. Jedan uzorak je fiksiran 4 % formaldehidom ili 95-96 % etanolom i koristio se za determinaciju sastava zajednice makroinvertebrata i za procenu ekološkog potencijala lokaliteta. Drugi uzorak ostavljen je u svežem, nefiksiranom, stanju u vodi sa datog lokaliteta i dalje je korišćen za procenu genotoksičnog potencijala na datim lokalitetima istraživanja. Uzorci su pakovani u odgovarajuće obeleženu ambalažu, a zatim su transportovani do laboratorije.

Laboratorijska obrada materijala akvatičnih makroinvertebrata vršena je na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda (Institut za Biološka Istraživanja „Siniša Stanković“). Prvi korak u obradi uzoraka bilo je ispiranje tekućom vodom od fiksativa kada se ujedno radi i dodatno prosejavanje sa ciljem prečišćavanje uzorka od zaostalih nečistoća (čestice sedimenta, detritusa, lišća, itd.). Nakon ispiranja vrši se odvajanje i sortiranje organizama po grupama i skladištenje u 4 % formalinu (plastične samostojeće mikrotube od 2 ml sa zavrtajem, plastične posude od 20 ili 250 ml). Sortiranje organizama je rađeno pomoću binokularne lupe Zeiss, Semi 2000-C (Carl Zeiss Microscopy, GmbH, 37081 Gottingen, Germany).

Nakon što su uzorci očišćeni, a organizmi klasifikovani pristupilo se determinaciji organizama iz uzoraka. Determinacija bentosnih organizama vršena je do nivoa vrste, odnosno do najnižeg pouzdanog taksonomskog nivoa, binokularnom lupom (uvećanje do 40x) i mikroskopom (uvećanje do 63x) (Zeiss, AXIO, Lab.A1; Carl Zeiss Microscopy, GmbH, 37081 Gottingen, Germany). Za identifikaciju makroinvertebrata korišćeni su odgovarajući ključevi za determinaciju i literatura zavisno od grupe organizama (Oligochaeta – Brinkhurst, 1971 a, b; Timm, 1999; Timm, 2009; Mollusca – Pflieger, 1998; Glöer i Meier-Brook, 2003; Beran, 2009; nomenklatura i klasifikacija ostalih grupa makroinvertebrata data je prema fauni Evrope – De Jong, 2013). Sa ciljem da se dobije što tačnija slika o stanju biodiverziteta zajednice vodenih beskičmenjaka, iz analize su isključene prazne ljuštore mekušaca i pupalni oblici holometabolnih insekata.

### **3.3.1.2. Procena ekološkog statusa – biološki parametri**

Biološki parametri koji su korišćeni za ocenu stanja ispitivanih vodenih ekosistema su sledeći:

- **raznovrsnost** je određena preko broja zabeleženih taksona. Prema Okvirnoj direktivi o vodama (eng. *Water Framework Directive*, ODV) (ODV, 2000/60/EC) koristi se za organsko zagađenje, degradaciju vodenog toka, kao i za acidifikaciju.
- **biodiverzitet** je određen uz pomoć Šenonovog indeksa diverziteta (H) (Shannon i Weaver, 1949), koji predstavlja meru raznovrsnosti zastupljenosti vrsta (AQEM, 2002). Prema ODV predlaže se da se koristi za organsko zagađenje, hidromorfološku i opštu degradaciju i za acidifikaciju.

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

U formuli je:  $p_i = N_i/N$ ;  $N_i$  – broj individua  $i$ -te vrste;  $N$  – ukupan broj individua u uzorku;  $s$  – ukupan broj vrsta.

- **saprobni indeks** (SI) po metodi Zelinka – Marvan (1961) uvodi saprobnu valencu (kseno-, oligo-, beta-meso, alfa-meso i poli saproban), koja omogućava da organizmi imaju više stupnjeva saprobnosti (0 – 10) (AQEM, 2002). Prema ODV ovaj parametar može da se koristi u slučaju organskog zagađenja, hidro-morfoloških i opštih degradacija i u slučaju acidifikacije.

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n s h g}{\sum_{i=1}^n h g}$$

U formuli je:  $s$  – saprobni indeks svake vrste;  $h$  – procenjena frekvencija vrste;  $g$  – indikativna vrednost vrste

- **BMWP indeks** (eng. *biological monitoring working party*) (Armitage, 1983) pokazuje vrednost osetljivosti zajednice bentosnih beskičmenjaka na organsko zagađenje. Ovaj parametar daje svakoj porodici u zajednici bentosnih beskičmenjaka vrednost od 1 do 10. Porodice koje su izuzetno osetljive na organsko zagađenje po ovom indeksu nose vrednosti 10, dok one koje su tolerantne imaju manju vrednost indeksa. Prema ODV ovaj indeks se koristi za organsko zagađenje, za opštu i hidro-morfološku degradaciju i acidifikaciju.
- **Učešće familije Tubificidae** u zajednici makroinvertebrata (% Tubificidae) – u zavisnosti od prisustva različitih grupa vodenih makroinvertebrata u uzorku može se utvrditi o kakvom lokalitetu se radi. Obzirom da Tubificidae preferiraju muljevit supstrat, bogat organskim materijama veća % zastupljenost Tubificidae u zajednici vodenih makroinvertebrata ukazuje da je dati lokalitet pod većim organskim pritiskom koji ne odgovara taksonomskim grupama koje su osetljivije (npr. Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera.)

### **3.3.2. Ekotoksikološka istraživanja**

#### **3.3.2.1. Uspostavljanje laboratorijske kulture i aklimacija**

U kontrolisanim uslovima uspešno su uspostavljene laboratorijske kulture vrsta *B. swoerbyi* i *L. udekemianus*.

Laboratorijska kultura vrste *B. sowerbyi* je uspostavljena tokom 2014 godine. Jedinke od kojih je uspešno uspostavljena laboratorijska kultura donete su sa lokaliteta Duboko na Savi. Sediment je uzorkovan bentološkim bagerom (Van Veen, zahvatna površina 270 cm<sup>3</sup>) nakon čega je prebačen u ručnu bentološku mrežu (promer okca 250µm) i pažljivo je ispran na lokalitetu. Čitava zajednica akvatičnih makroinvertebrata je prebačena u plastičnu posudu (500 ml) i transportovana na hladnom (u rashladnoj torbi, 4 °C) do laboratorije. U laboratoriji je još jednom pažljivo očišćen uzorak (treba voditi računa pošto jedinke vrste *B. sowerbyi* lako odbacuju zadnji deo tela bez kojeg se ne može sa sigurnošću reći koja je vrsta a da se ne koristi mikroskop) i cele neoštećene jedinke su prebačene u akvarijumima napunjenim sa 3 L odstajale vode, dok je kao podloga korišćena 200 g „prirodna glina“<sup>TM</sup> („Riznica Prirode“). Fotoperiod je 12h mrak/12 h dan, temperatura vode je održana na 22±1 °C, a aeracija je konstantna. Crvi su hranjeni jednom nedeljno sa TetraMin (Nemačka) hranom za ribice, a voda je menjana nedeljno.

Zahvaljujući kolegama sa Instituta za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu dobili smo jedinke *L. udekemianus* koje su korišćene za uspostavljanje laboratorijske kulture 2012. godine. Kao i u slučaju *B. sowerbyi*, za uspostavljanje kulture *L. udekemianus* su korišćene jedino neoštećene čitave jedinke koje su stavljene u akvarijumima od 8 L sa odstajalom dehlorisanom vodom koja je menjana jedanput nedeljno, podlogom „prirodna glina“<sup>TM</sup> („Riznica Prirode“). Kao i kod ostalih laboratorijskih kultura, crvi su hranjeni hranom za ribice (TetraMin, Nemačka), fotoperiod je održan na 12h mrak/12 h dan, aeracija konstantna srednje jačine, temperatura vode 22±1 °C.

Nalaz kokona i juvenilnih jedinki je bila potvrda da su laboratorijske kulture uspešno uspostavljanje, odnosno da je došlo do razmnožavanja crva u kontrolisanim uslovima (Slika 3.9).



Slika 3.6. Razviće *B. sowerbyi* – kokoni sa juvenilnim jedinkama i njihov izlazak iz kokona

Za određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* i *L. udekemianus* korišćeni su crvi iz laboratorijske kulture za koje se podrazumeva, pošto su gajeni u optimalnim uslovima duže vreme, da su prošli aklimaciju.



### 3.3.2.2. Komet test

Za procenu nivoa DNK oštećenja primenjena je alkalna verzija komet testa (Singh i sar., 1988). Svi koraci ove metode rađeni su pod indirektnim žutim svetlom. Gelovi su sačinjeni od 3 sloja agaroze. Prvi sloj agaroze normalne tačke topljenja (1 % NMP, eng. *Normal Melting Point*) je stavljen 24 h pre početka komet testa na prethodno očišćene mikroskopske pločice, a zatim su ostavljene da se osuše na sobnoj temperaturi. Kao i prvi sloj agaroze, i drugi sloj je sačinjen od NMP, na dva mesta na pločici stavlja se po 80 µl 1 % NMP agaroze koji se prekrivaju pokrovnim staklima – da bi se agarozna ravnomerno rasporedila. Ove mikroskopske pločice se zatim stavljaју 5 min na 4 °C – da bi se agarozna stegla, odnosno polimerizovala. Nakon 5 minuta pokrovna stakla se skidaju, a na ova dva mesta na pločici stavlja se po 70 µl suspenzije koja je dobijena mešanjem 30 µl suspenzije ćelije i 70 µl 1 % agaroze niske tačke topljenja (eng. *Low Melting Point* – LMP) i prekrivaju pokrovnim staklima. Nakon 5 minuta na 4 °C pokrovna stakla se skidaju, te se mikroskopske pločice potapaju u hladan i svež pripremljen rastvor za lizu na 1h (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10, 4°C). Nakon ovog koraka, pločice se pažljivo vade iz rastvora za lizu i ređaju se u kadicu za elektroforezu u koju se stavlja hladan rastvor za denaturaciju i elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Nakon procesa denaturacije koji traje 20 minuta na 4 °C bez struje, sledi elektroforeza (0,5 V/cm, 300 mA, 20 min, 4°C) u istom rastvoru. Po završetku elektroforeze pločice se vade iz kadice za elektroforezu i stavljaју se na neutralizaciju (rastvor za neutralizaciju: 0,4 M Tris, pH 7,5, 4 °C) na 15 minuta. Kod studija rađenih *ex situ* nije rađena fiksacija preparata, dok je kod *in situ* studija fiksacija preparata rađena potapanjem pločica u hladan metanol na 15 minuta. Pre analize, bojenje svakog gela je vršeno sa 20 µl AO (2 µg/ml). Pločice su analizirane fluorescentnim mikroskopom (Leica, DMLS, Austria, uvećanje 400x, filter ekscitacije 510 – 560 nm, ekscitacija 590 nm). Za analizu preparata korišćen je program Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Za procenu genotoksičnog potencijala analizirano je od 50 do 200 fotografija jedara. Izuzetno oštećena jedra (eng. *hedgehogs*) bila su izuzeta iz analize.

Parametar korišćen za procenu DNK ošćenja je intenzitet repa komete (eng. *tail intensity* (TI) – predstavlja procenat DNK u repu komete određen uz pomoć fluorescencije).

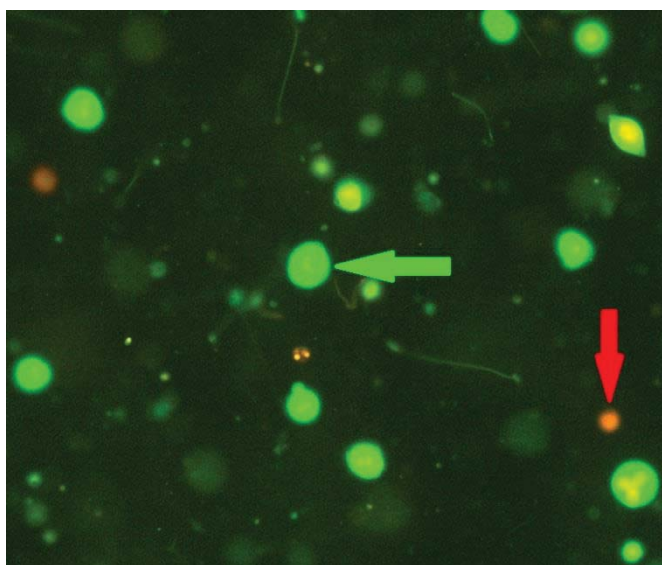
### **3.3.2.3. Metode uzorkovanja hemocita i celomocita**

Oligohete imaju dve grupe slobodnih ćelija. Jedne se nalaze u celomskoj tečnosti (celomocite), dok se druge nalaze u krvnom sistemu (hemocite). Suspenzija ćelija (celomocite i hemocita) dobijena je seckanjem vijabilnih crva u 200  $\mu$ l balansiranom rastvoru soli za *Lumbricus* (eng. Lumbricus Balanced Salt Solution – LBSS) ili u 200  $\mu$ l  $\frac{1}{2}$  LBSS-a (Brousseau i sar., 1997). Za pravilno izvođenje komet testa neophodno je da broj ćelija bude  $5 \times 10^4$  ćelija/ml. U *ex situ* istraživanjima žrtvovano je po 50 (ili manje, kada je preživljavanje adulta bilo manje) jedinki po koncentraciji ili po negativnoj i kontroli rastvarača. U *in situ* istraživanjima maksimalan broj jedinki *B. sowerbyi* koji je bio žrtvovan po uzorku je 15, ali ćelije su izolovane i iz manjeg broja jedinki kada je njihov broj u uzorku bio manji. U Mix uzorcima maksimalan broj slučajno izabranih jedinki iz uzorka je bio 100 (rađeno je po dva poduzorka u kojima je bilo po 50 jedinki) ili je broj bio manji u slučaju kada nisu bili prisutni u dovoljnom broju u uzorcima.

Nakon seckanja crva, pažljivo da se ne pokupe nečistoće i delovi tela, suspenzija ćelija je sakupljena i prebačena u mikrotube od 2 ml koje su bile napunjene LBSS (u *ex situ* istraživanjima) ili  $\frac{1}{2}$  LBSS-om (u *in situ* istraživanjima). Suspenzija ćelija je zatim centrifugirana (3000 rpm – u *ex situ* istraživanjima ili 2500 rpm – u *in situ* istraživanjima, 10 min, 4 °C) i resuspendovana u 80  $\mu$ l LBSS-a.

### 3.3.2.4. Preživljavanje ćelija – diferencijalno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)

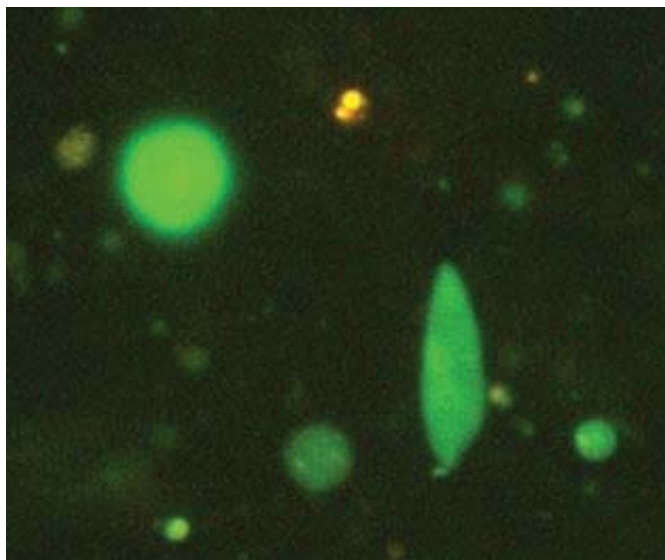
Preživljavanje ćelija je dobijeno pomoću diferencijalnog bojenja (akridin oranž/etidijum bromid – AO/EB) (Squier i Cohen, 2001). Ova metoda zasniva se na diferencijalnoj permeabilnosti membrane. Ćelije kod kojih je integritet membrane očuvan boje se AO bojom (u ovom slučaju samo ova boja može da difunduje u žive ćelije) i na fluorescentnom mikroskopu vide se kao ćelije kod kojih jedro fluorescira zeleno, dok se ćelije kod kojih je narušen integritet membrane (membrana je oštećena) boje i EB bojom i na fluorescentnom mikroskopu se vide kao ćelije kod kojih jedra fluoresciraju crveno (Slika 3.7).



Slika 3.7. Diferencijalno AO/EB bojenje ćelija celomocita i hemocita *L. udekemianus* – zelena strelica ukazuje na živu ćeliju koja se boji zeleno, dok crvena strelica ukazuje na mrtvu ćeliju koja se boji crveno

Na mikroskopsku pločicu stavlja se 20  $\mu$ l ćelijske suspenzije koja se meša sa 2  $\mu$ l AO/EB boje (2  $\mu$ g/ml). Obojena suspenzija ćelija prekriva se pokrovnim staklom nakon čega se ćelije posmatraju na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria). Filter za ekscitaciju koji je korišćen je od 510 – 560 nm, emisija od 590 nm, dok je uvećanje pod kojim su se gledale ćelije 400x. Tokom posmatranja ćelija na fluorescentnom mikroskopu zapažene su ćelije različitih dimenzija i oblika što ukazuje na njihovo različito poreklo

(celomska tečnost i krvni sistem) (Slika 3.8). Kako bi se izbegao lažni rezultat povećanja DNK oštećenja usled povećane apoptoze i/ili nekroze, prag za preživljavanje ćelija koji bi se smatrao kao genotoksičan efekat izabranih supstanci je postavljen na 70 % (Tice i sar., 2000).



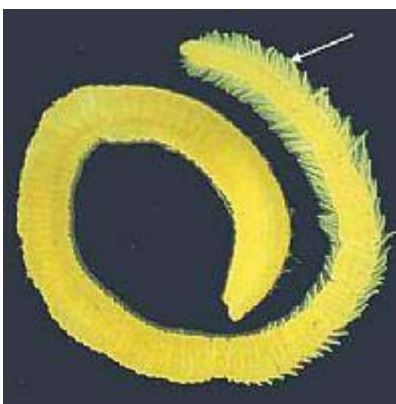
Slika 3.8. Ćelije različitih oblika i veličina kod vrste *L. udekemianus*

### 3.3.3. *In situ* istraživanja

#### 3.3.3.1. Prikupljanje i priprema materijala *Oligochaeta* za komet test

U poglavlju 3.2.2.1. spomenuto je da su tokom svakog izlaska na teren uzeti dupli uzorci – uzorak koji je bio fiksiran na terenu je korišćen za procenu sastava zajednica akvatičnih makrobeskičmenjaka, dok je drugi, sveži, uzorak korišćen za procenu genotoksičnog potencijala. Uzorak za genotoksikologiju je zatim transportovan do laboratorije u rashladnoj torbi (4 °C), a potom se pristupilo laboratorijskoj obradi materijala.

Laboratorijska obrada materijala podrazumevala je dodatno čišćenje uzoraka pomoću vode sa lokaliteta gde je uzorkovano. Iz prečišćenog uzorka su izvađene oligohete i stavljene su u petri šolje u kojima se nalazila voda sa lokaliteta. Oligohete su zatim bile klasifikovane. Za determinaciju oligoheta potrebno je da se koristi mikroskop obzirom da su karakteri za identifikaciju (somatske hete, genitalne hete i genitalni organi, itd.) dobro vidljivi na većem uvećanju (40x ili 63x). Jedna od retkih vrsta koja se može deteminisati uz pomoć binokularne lupe je *Branchiura sowerbyi*. U slučaju ove vrste kao karakter za determinaciju koristi se prisustvo filiformnih škrge koje se nalaze u kaudalnom delu tela (Slika 3.6).



Slika 3.9. *B. sowerbyi* – u kaudalnom delu označene filiformne škrge (slika je preuzeta sa interneta)

Iz uzoraka je izdvojeno 15 jedinki *B. sowerbyi* (ili manje u slučaju kada su bile prisutne u manjem broju) za dalja ekogenotoksikološka istraživanja. Pored toga, izdvojene su i dva puta po 50 slučajno izabranih oligoheta (Mix uzorci) koji su činili dva poduzorka. Tačan sastav vrsta Mix uzoraka nije poznat. Razlog zbog čega se nije pristupilo identifikaciji crva iz mešovitog uzorka je neizlaganje ovih jedinki mehaničkom oštećenju, a samim tim i dodatnom stresu tokom manipulacije koji bi mogao da utiče na rezultat komet testa. Izvađene grupe crva, grupa *B. sowerbyi* i dve grupe Mix uzoraka, prebačene su u posude od 25 ml u kojima se nalazila voda sa lokaliteta. Oligohete su u vodi sa lokaliteta bile stavljene na hladnom (4 °C) do nastavka eksperimenta, odnosno do izvođenja komet testa.

### **3.3.3.2. Mikrobiologija – prikupljanje i priprema materijala vode**

Uzorci vode za mikrobiološka ispitivanja uzeti su u sterilnim staklenim flašama. Prilikom uzimanja uzorka treba voditi računa o sterilnom radu. Za mikrobiološko istraživanje koristi se flaša u koju se uzima uzorak koja se prethodno ne ispira vodom sa lokaliteta (kao što se radi prilikom uzimanja uzoraka za hemiju). Flaša se u vodu ubacuje otvorom okrenutim ka dole (sprečava se da se uzima površinska voda), otvara se pod vodom, grlo flaše se okreće ka strujanju vode i sačeka se da se flaša napuni vodom. Nakon što se napunila flaša, ona se zatvara. Treba voditi računa o položaju tela u odnosu na flašu – osoba koja uzorkuje treba da se nađe nizvodno u odnosu na flašu. Pravilno obeleženi uzorci su zatim transportovani na hladnom (u rashladnoj torbi, 4 °C) do laboratorije na dalju analizu.

### **3.3.3.3. Mikrobiološki parametri**

Mikrobiološki indikatori fekalnog zagađenja koji su korišćeni su broj koliforma i fekalnih enterokoka pomoću metode najverovatniji broj (eng. *the most probable number* – MNP).

#### **3.3.3.3.1. Koliformi – metod najverovatniji broj**

Koliformne bakterije su analizirane pomoću sistema Colilert 18 (ISO 9308-2:2012) (IDEXX, Ludwigsburg, Germany) MNP metodom. Koliformi poseduju enzim  $\beta$ -galaktozidazu čija se aktivnost može detektovati pomoću ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktoriranozid) supstrata. Usled aktivnosti koliforma oslobađa se ONP koji ima žutu boju. Za *E. coli* je karakterističan enzim glukuronidaza koji reaguje sa metilumberiferil- $\beta$ -glukuronid (MUG) supstratom. Nakon ove reakcije oslobađa se metilumberiferon koji fluorescira plavom bojom. Uzorak vode sa lokaliteta može da se testira u nerazblaženom obliku ili može da bude razblažen u destilovanoj vodi. U 100 ml nerazblaženog ili razblaženog uzorka stavlja se Colilert 18 supstrat. Treba voditi računa da se supstrat rastvori, a nakon toga se ovako spremljen uzorak sipa u ploču Quanti-Tray/2000 koja ima 97 komora. Zatvaranje ploča se vrši pomoću Quanti-Tray zavarivača, nakon čega se stavljalju na inkubaciju (37 °C, 24±6 h). Za određivanje najverovatnijeg broja ukupnih koliforma broje se žuti bunari, dok je za određivanje najverovatnijeg broja *E. coli* neophodno staviti ploče pod UV lampu (365 nm) – bunari koji se broje fluoresciraju plavom bojom (Slika 3.10). Za određivanje najverovatnijeg broja ovih bakterija u uzorku koriste se statističke tablice koje su dobijene od proizvođača.



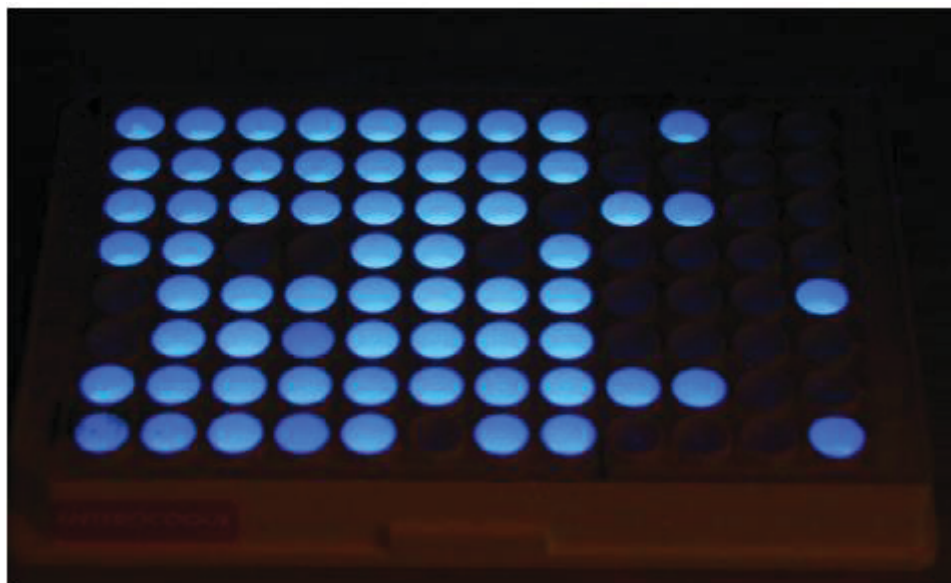
Slika 3.10. Totalni koliformi i *E. coli* – metod najverovatnijeg broja pomoću Colilert 18 sistema (slika preuzeta iz Kolarević, 2014)

#### 3.3.3.3.2. Fekalne enterokoke – metod najverovatniji broj

Broj fekalnih enterokoka je dobijen MPN metodom. Za njihovu izolaciju su korišćene MUD/SF mikrotitarske ploče (BIORAD, Vienna, Austria). Izolacija je rađena po standardnoj metodi ISO 7899-1:1998. Za izolaciju ovih bakterija na jakim zagađenjima lokalitetima koriste se razblaženja  $\frac{1}{2}$  i  $\frac{1}{20}$ , ili  $\frac{1}{200}$  i  $\frac{1}{2000}$  u DSM medijumu. Manje razblaženje se radi u 64 bunara, a veće razblaženje u 32 bunara – u svaki bunar se stavlja 200  $\mu$ l. Razlivenne ploče se zatvaraju providnom folijom nakon čega se inkubiraju 48 h na 44 °C. Po završetku inkubacije, ploče se stavljaju pod UV lampu (365 nm) – kao pozitivan rezultat se broje bunari koji fluoresciraju plavom bojom (Slika 3.11). Za određivanje



najverovatnijeg broja fekalnih enterokoka u uzorku koriste se statističke tablice koje su dobijene od proizvođača.



Slika 3.11. Fekalne enterokoke – određivanje najverovatnijeg broja pomoću Biorad MPN ploča (slika preuzeta iz Kolarević, 2014)

Mikrobiološki kvalitet vode procenjuje se na osnovu broja koliforma i enterokoka koji je određen Pravilnikom o parametrima hemijskog i ekološkog statusa („Službeni glasnik RS“ br. 74/2011) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Mikrobiološki kvalitet vode u odnosu na broj koliforma i fekalnih enterokoka

	<b>Klasa</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
Ukupni koliformi	<b>100 mL</b>	<b>≤ 500</b>	<b>≤10.000</b>	<b>≤ 100.000</b>	<b>≤ 1.000.000</b>	<b>&gt; 1.000.000</b>
Fekalni koliformi	<b>100 mL</b>	<b>≤ 100</b>	<b>≤ 1.000</b>	<b>≤ 10.000</b>	<b>≤ 100.000</b>	<b>&gt; 100.000</b>
Fekalne enterokoke	<b>100 mL</b>	<b>≤ 40</b>	<b>≤ 400</b>	<b>≤ 4.000</b>	<b>≤ 40.000</b>	<b>&gt; 40.000</b>

### **3.3.4. *Ex situ* istraživanja – ekotoksikološka istraživanja**

*Ex situ* studije se izvode u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Za ovu doktorsku disertaciju *ex situ* istraživanja su bila organizovana kao statički sistemi u kojima je predmet ispitivanja bio uticaj 5 – FU i ET, i poznatog mutagena CdCl<sub>2</sub> na DNK integritet vrste *L. udekemianus*.

#### **3.3.4.1. Eksperimentalni dizajn – izlaganje *L. udekemianus* u 5 – FU, ET, i CdCl<sub>2</sub> tretmanima**

*In vivo* studije su rađene u statičnim uslovima (bez menjanja vode za vreme trajanja tretmana) samo u vodenoj sredini bez korišćenja sedimenta (eng. *water-only test*) tokom 96-h. Za citostatike 5 – FU i ET, kao i za CdCl<sub>2</sub> eksperimenti su rađeni u duplikatu, odnosno kao dva nezavisna tretmana. Kao vodeni medijum u kojem su rađeni tretmani korišćena je voda poznatog sastava (flaširana voda Rosa<sup>TM</sup>, Srbija: Ca<sup>2+</sup>, 10 mg/L; Na<sup>+</sup>, 2,7 mg/L; K<sup>+</sup>, <1 mg/L; Mg<sup>2+</sup>, 0,91 mg/L; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 42,7 mg/L; SiO<sub>2</sub>, 13,7 mg/L; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 5,4 mg/L; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,3 mg/L; Cl<sup>-</sup>, <1 mg/L). Svetlosni režim za vreme trajanja tretmana bio je podešen na 12-h mrak/12-h dan, a temperatura je bila 22±1 °C, dok je aeracija bila konstantna.

Tretmani su rađeni u staklenim posudama (250 ml) u 100 ml rastvora izabranih koncentracija citostatika (5 – FU – primarni stok je pripremljen u dH<sub>2</sub>O – 1 mg/ml; ET – primarni stok je pripremljen u DMSO – 50 mM; CdCl<sub>2</sub> – primarni stok je pripremljen u dH<sub>2</sub>O – 1 mg/ml) (Slika 3.12).



Slika 3.12. Staklene posude u kojima su vršeni *in vivo* tretmani (5 – FU, ET i CdCl<sub>2</sub> tretmani)

Da bi se sprečila interakcija između hrane, odnosno sadržaja digestivnog sistema, i testiranih supstanci životinje koje su korišćene u eksperimentima nisu bile hranjenje tri dana pre početka tretmana, ali i za vreme trajanja eksperimenata.

Za svaku testiranu koncentraciju izabranih supstanci (5 – FU, ET i CdCl<sub>2</sub>) i za svaku negativnu kontrolu, izabrano je po 50 crva sličnih dimenzija (isti stadijum razvića) iz laboratorijske kulture oligoheta *L. udekemianus*. Pod binokularnom lupom crvi su bili pažljivo očišćeni od čestica sedimenta, a nakon toga su bili stavljeni u 100 ml Rosa<sup>TM</sup> vode sa slabom aeracijom 12 h pre početka eksperimenta.

Nominalne koncentracije testiranih supstanci su sledeće: 5 – FU: 0,004, 0,04, 0,4, 4 i 40 μM; ET: 0,004, 0,04, 0,4 i 4 μM. Kao pozitivna kontrola korišćen je CdCl<sub>2</sub> tretman (nominalne koncentracije: 0,004, 0,04, 0,4, 4 i 40 μM). Obzirom da ne postoje podaci o osnovnim, bazalnim vrednostima oštećenja DNK molekula kod *L. udekemianus*, za svaki eksperiment negativne kontrole su rađene u duplikatu u 100 ml Rosa<sup>TM</sup>. Kao što je spomenuto, 5 – FU i CdCl<sub>2</sub> su bili rastvoreni u dH<sub>2</sub>O, a ET u DMSO. Zbog toga je kao kontrola rastvarača za ET tretman bio korišćen 0,008 % rastvor DMSO (odgovara koncentraciji rastvarača za 4 μM ET). Koncentracije DMSO koje odgovaraju manjim

koncentracijama ET nisu bile testirane, smatrajući da je u tim slučajevima koncentracija DMSO u rastvorima suviše niska (80 ppb – 8 ppm DMSO).

#### **3.3.4.2. Vijabilnost adulta *L. udekemianus***

Nakon 96 h tretmani su zaustavljeni tako što su crvi izvađeni iz rastvora u kojima su rađeni eksperimenti i prebačeni u čiste posude sa čistom Rosa<sup>TM</sup>. Preživljavanje tretiranih crva je determinisano uz pomoć binokularne lupe. Individue koje nisu reagovalе pokretom na fizički nadražaj (dodir pincetom) smatrane su mrtve. Nakon toga pristupilo se izolaciji ćelija, proceni vijabilnosti ćelija i izvođenju komet testa koji su objašnjeni u prethodnim potpoglavljima.

#### **3.4. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada mikrobioloških, fizičko-hemijskih, hemijskih parametara kvaliteta vode i nivoa oštećenja DNK molekula urađena je korišćenjem programa Statistika 6.0. (StatSoft, Inc., 2001) i SPSS 20.0 (Inc., Chicago, IL, USA), dok je za procenu ekološkog potencijala korišćen softverski paket ASTERICS 4.03 (AQEM, 2002).

Za *ex situ* studiju, ispitivanje uticaja odabranih citostatika i CdCl<sub>2</sub> na DNK integritet vrste *L. udekemianus*, prvo su analizirani podaci da li su u saglasnosti sa normalnom distribucijom pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Pošto je dobijeno da je u svakom pojedinačnom uzorku distribucija bila normalna bili su ispunjeni uslovi za korišćenje parametrijskog Studentovog testa (*t* test) ( $p < 0.05$ ). Rezultati dobijeni za svaku koncentraciju bili su poređeni sa rezultatima dobijeni za odgovarajuću negativnu kontrolu.

Kao i u slučaju *ex situ* istraživanja, i u *in situ* istraživanjima prvo je Kolmogorov-Smirnov testom provereno da li su podaci u saglasnosti sa normalnom raspodelom. Pošto nisu svi podaci bili u saglasnosti sa normalnom raspodelom, neparametrijski Kruskal-

Wallis test (Kruškal-Valis test) je korišćen da se vidi da li postoje statističke značajne razlike između podataka. U slučaju kada je Kruškal-Valis test pokazao da postoje razlike između podataka, kod *B. sowerbyi* kada se upoređivalo oštećenje DNK molekula tokom godine sa bazalnom vrednošću, korišćen je Mann-Whitney U test (Man Vitni U test) sa Bonferroni korekcijom (Bonferoni korekcija) p vrednosti. Ovim testom dobijeno je između kojih meseci i bazalne vrednosti postoji statističko značajno odstupanje. U ostalim slučajevima kada se tražila statistički značajna razlika između meseci korišćen je Kruškal-Valis test sa Dann korekcijom (Danova korekcija).

Za računanje korelacija upotrebljen je parametrijski Pirsonov ( $p < 0,05$ ), ili neparametrijski Spirmanov ( $p < 0,05$ ) test, u zavisnosti da li su podaci imali ili nisu imali normalnu raspodelu.

# **REZULTATI**

#### 4. REZULTATI

Tubificidae je familija Oligochaeta (Annelida) koja obuhvata veliki broj široko rasprostranjenih vrsta, zastupljenih na gotovo svim tipovima vodenih staništa (Timm, 2009). Ovo su slabo pokretni organizmi koji mogu dostići veliku brojnost i biomasu u sredinama koje su bogate organskom materijom (Martin i sar., 2008; Atanacković, 2015). Zbog navedenih osobina i njihove bitne uloge u lancima ishrane, razvijeni su protokoli za njihovo korišćenje u toksikološkim ispitivanjima (OECD, 2008), a procedure gajenja u laboratorijskim uslovima dobro su ustanovljene.

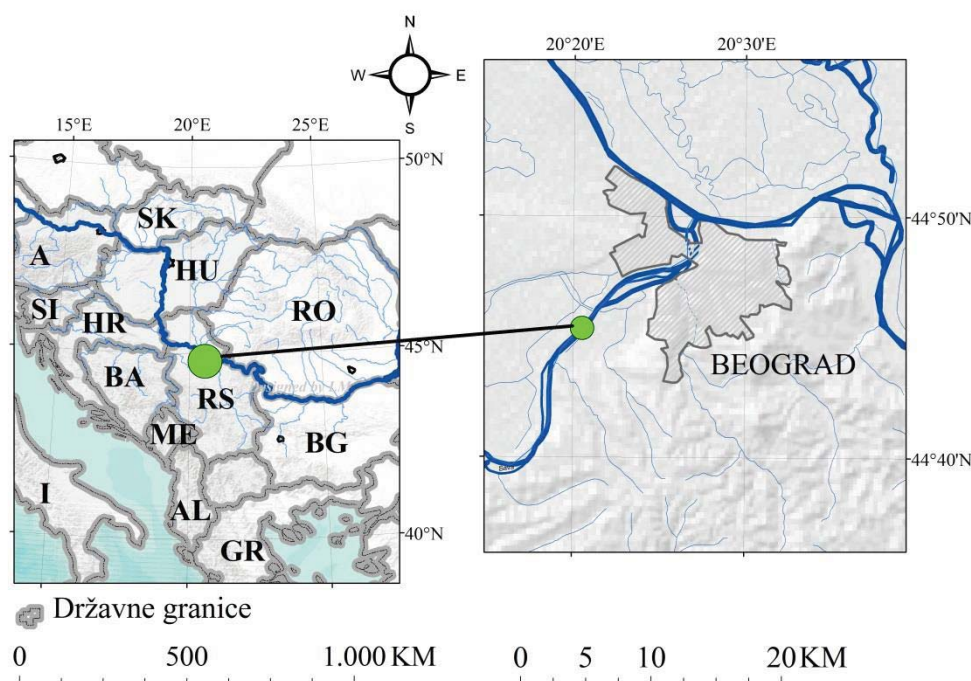
Poznata je primena predstavnika familije Tubificidae u toksikološkim studijama, a ovom doktorskom disertacijom ovi organizmi su uključeni i u ekogenotoksikološka istraživanja.

U ovom radu korišćene su ćelije celomske tečnosti (celomocite) i ćelije krvnog sistema (hemocite) za koje je adaptiran protokol alkalnog komet testa (Singh i sar., 1988) kojim se prati nivo oštećenja DNK molekula (Kračun-Kolarević i sar., 2015; Aborgiba i sar., 2016). Istraživanja su uključila *in situ* studije gde je praćen nivo oštećenja DNK molekula na lokalitetu Duboko na Savi tokom 2014. – 2015. godine i na lokalitetu Višnjica na Dunavu tokom 2014. godine., i *ex situ* studije, gde je praćen efekat citostatika 5 – fluorouracila i etopozida, i efekat poznatog mutagena CdCl<sub>2</sub> na integritet DNK molekula.

Na lokalitetima Duboko i Višnjica, pored ekogenotoksikološkog ispitivanja, utvrđeni su i hidrološki uslovi, hemijski, fizičko-hemijski i mikrobiološki kvalitet vode i sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta, kao i drugih grupa akvatičnih makroinvertebrata.

#### 4.1. *In situ* istraživanje – lokalitet Duboko

Lokalitet Duboko (25 rkm) na reci Savi svojim položajem omogućava praćenje uticaja različitih sredinskih faktora, kao što su efekat reke Kolubare i otpadnih voda Obrenovca i okolnih sela, deponije pepela i rad termoelektrane „Nikola Tesla I i II“ (Slika 4.1). Pored toga, praćene su i sezonske promene u okviru ovog lokaliteta.



Slika 4.1. Lokalitet Duboko

Istraživanje na lokalitetu Duboko obavljeno je tokom dve uzastopne godine, 2014. i 2015. Godine su se međusobno razlikovale po klimatskim prilikama, a samim tim i u vodnim režimima koji su vladali tokom uzorkovanja. Sliv reke Save je bio pod uticajem velikih poplava tokom 2014. godine. U maju iste godine vodostaj je dostigao vrhunac (Šabac 665 cm, Beljin 755 cm i Beograd 586 cm ) (Hidrološki godišnjak površinskih voda Republičkog hidrometeorološkog zavoda Republike Srbije – RHMZ za 2014. godinu), što je dovelo do toga da su grad Obrenovac i okolna sela bili potpuno poplavljeni, a stanovništvo evakuisano (Slike 4.2 i 4.3).





Slika 4.2. Poplave 2014. godine – Obrenovac (slike su preuzete sa interneta)



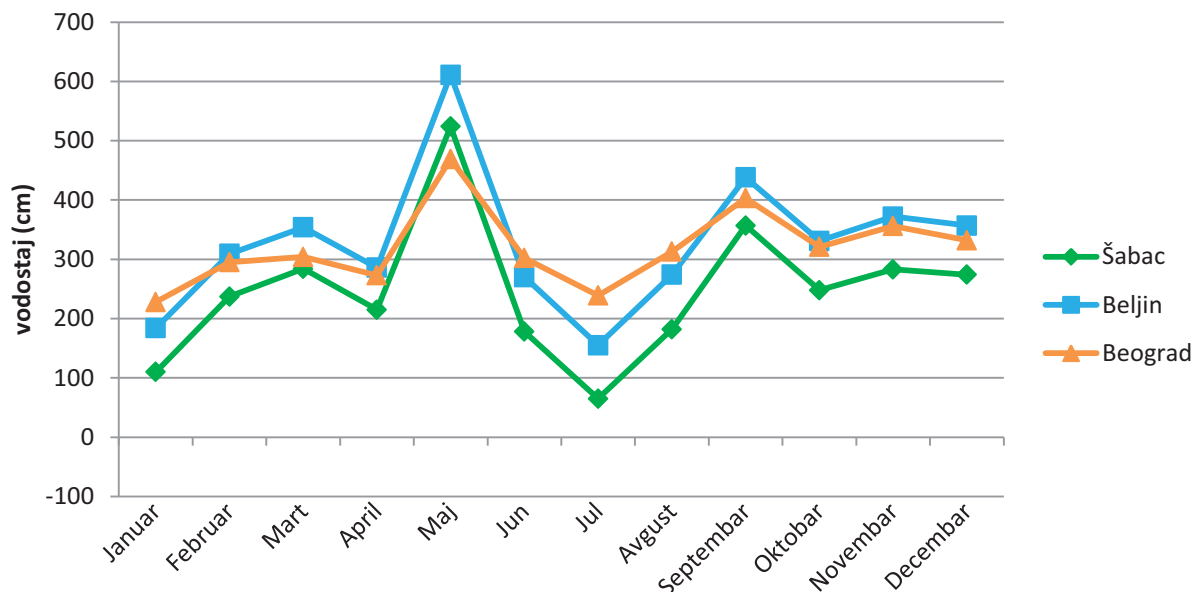
Slika 4.3. Poplave 2014. godine – TENT A i okolina (slika je preuzeta sa interneta)

#### **4.1.1. Hidrološki uslovi, fizičko-hemijski i hemijski kvalitet vode**

Na reci Savi RHMZ vrši merenja vodostaja na nekoliko lokaliteta. Pošto merenja nisu rađena neposredno na lokalitetu Duboko dat je pregled podataka vodostaja dva uzvodna lokaliteta, Šabac i Beljin, i jednog nizvodnog lokalitet, Beograd za 2014. i 2015. godinu (Slike 4.4 i 4.5).

Tokom 2014. godine najveći vodostaji na tri merne tačke (Šabac, Beljin i Beograd) zabeleženi su u maju (srednji mesečni vodostaji: 524, 611 i 469 cm) i u septembru (srednji mesečni vodostaji: 357, 438 i 403 cm), a najniža vrednost vodostaja bila je izmerena u

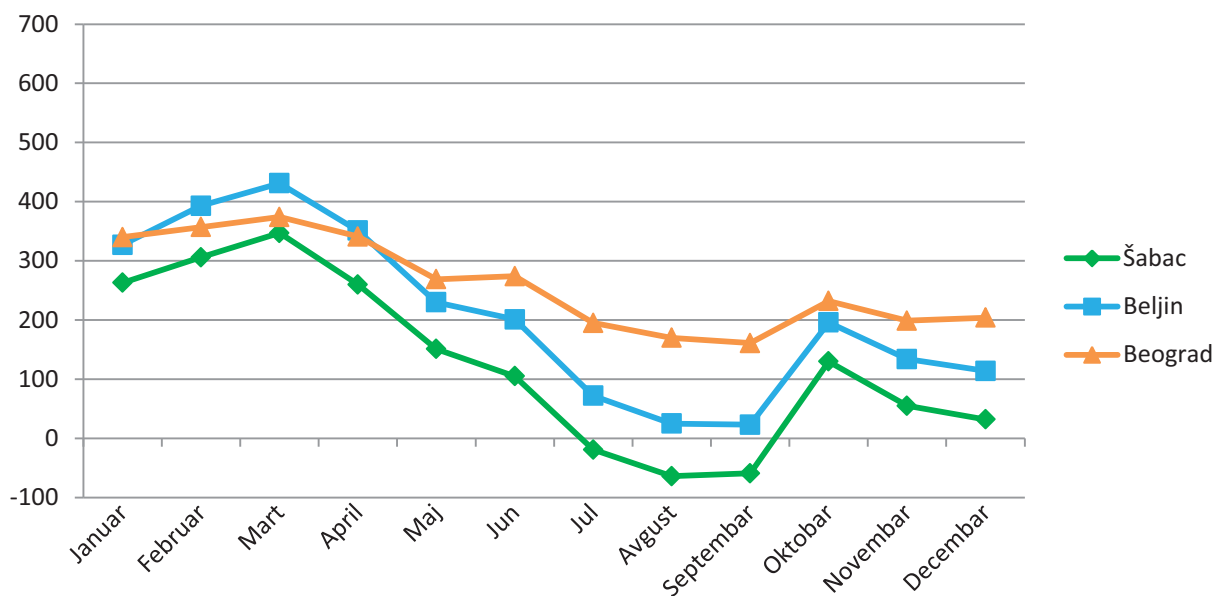
januaru (srednji mesečni vodostaji: 110, 184 i 228 cm) i julu (srednji mesečni vodostaji: 65, 155 i 239) (Slika 4.4).



Slika 4.4. Prosečne vrednosti mesečnih vodostaja za lokalitete Šabac, Beljin i Beograd tokom 2014; \* podaci su preuzeti iz Hidrološkog godišnjaka površinskih voda RHMZ-a za 2014. godinu.

U odnosu na lokalitet Duboko slične hidrogeološke karakteristike ima merna tačka RHMZ na 67,5 rkm (Beljin), te su se podaci za vodostaje na ovoj mernoj tački koristili kao reprezentativni.

U poređenju sa 2014. godinom, prva četiri meseca 2015. godine karakterisali su se većim vrednostima vodostaja, dok su ostali meseci imali manje vrednosti vodostaja. Najveće vrednosti vodostaja 2015. godine bile su izmerene u martu (srednji mesečni vodostaji: Šabac – 347 cm; Beljin – 431 cm; Beograd – 374 cm), dok su vrednosti najnižih vodostaja bile izmerene u avgustu za Šabac (-64 cm) i u septembru za Beljin (23 cm) i Beograd (161 cm) (Slika 4.5). Vrednosti srednjih godišnjih vodostaja za ove tri merne tačke su 123, 208 i 260 cm.



Slika 4.5. Prosečne vrednosti mesečnih vodostaja za lokalitete Šabac, Beljin i Beograd tokom 2015; \* podaci su preuzeti iz Hidrološkog godišnjaka površinskih voda RHMZ-a za 2015. godinu.

Tokom uzorkovanja mereni su osnovni fizičko-hemijski parametri (pH, temperatura vode, elektroprovodljivost, rastvoreni kiseonik ( $O_2$  mg/L), zasićenje vode kiseonikom ( $O_2$  %),  $NO_2$ ,  $NO_3$ ,  $NH_4$  i  $PO_4$ ) (Tabela 4.1. i 4.2.). Detaljni podaci o koncentraciji karbonata, azota i fosfora i njihovih komponenti, alkalitetu, aciditetu, o katjonima i anjonima, metalima, metaloidima i nemetalima, organskim determinantama, halokarbonatima, aromatima, poliaromatičnim hidrokarbonatima, fenolima, pesticidima na bazi triazina, fosfatima, tiofosfatima, acetamidima, N-substituisanim karbamidima, organohlornim pesticidima i drugih pesticida za 2014. godinu dobijeni su od Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije, za lokalitet Ostružnica (Prilog 1, Tabela 1 i 2). Dobijene vrednosti analiziranih jedinjenja i elemenata upoređene su sa vrednostima preporučenim od strane Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (ICPDR, 2002).

Tabela 4.1. Fizičko-hemijski parametri na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine

Lokalitet	Duboko (Sava) 2014								
	Meseci	Jan.	Feb.	Mart	Maj	Jun	Jul	Avg.	Okt.
pH		8,5	8,5	8,8	7,8	8,6	8,7	8,3	7,7
t (°C)		8,9	8,7	11,8	19,7	21,6	22	23,2	16,9
cond (µS)		373	338	376	365	/	372	439	405
O <sub>2</sub> (mg/L)		11,2	11,48	12	8,51	9,65	/	5,79	7,13
O <sub>2</sub> (%)		/	99	120	90,3	108,6	/	67,7	73
NO <sub>2</sub> (mg/L)		0,074	0,051	0,059	0,08	0,06	0,047	0,05	0,04
NO <sub>3</sub> (mg/L)		5,86	5,05	1,59	1,1	1,46	1,26	0,6(<1,0)	2,6
NH <sub>4</sub> (mg/L)		1,743	1,322	1,877	1,245	0,534	0,598	0,57	0,11
PO <sub>4</sub> (mg/L)		0,37	0,27	0,24	0,2	0,22	0,19	14,7	1,2

/-vrednosti nisu izmerene

Tabela 4.2. Fizičko-hemijski parametri na lokalitetu Duboko tokom 2015. godine

Lokalitet	Duboko (Sava) 2015										
	Meseci	Mart	Apr.	Maj	Jun	Jul	Avg.	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.
pH		7,5/7,6	7,9	8,02	8,13	7,63	7,4	6,6	8,2	7,8	7,8
t (°C)		9	16,5	17,7	23,8	29,2	25,8	18,8	12,3	9,8	7,2
cond (µS)		378	433	440	417	431	442	493	341	504	432
O <sub>2</sub> (mg/L)		11,1	9,9	8,25	7,04	11,28	5,2	7,39	9,92	8,61	9,54
O <sub>2</sub> (%)		95,7	93,4	87,9	76,5	149,7	65,9	82,8	92,8	77,6	81,1
NO <sub>2</sub> (mg/L)		0,08	0,04	0,07	0,03	0,02	0,02	0,02	0,07	0,04	0,095
NO <sub>3</sub> (mg/L)		4,4	2,2	3,7	3,2	3,4	5,7	4,7	4,4	0,85	5,4
NH <sub>4</sub> (mg/L)		0,14	0,05	0,15	0,06	0,06	0,07	0,1	0,09	0,597	0,051
PO <sub>4</sub> (mg/L)		3,2	0,6 (<1 mg/L)	2,6	1	8,3	1	4,6	12	0,38	0,51

/-vrednosti nisu izmerene

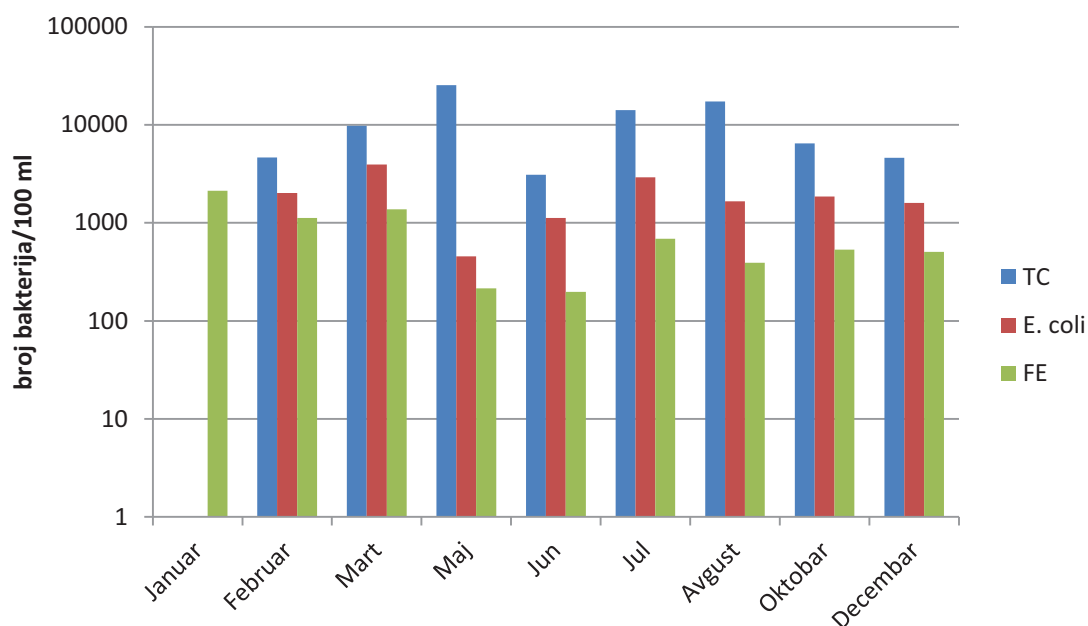
Tokom 2014. godine veće vrednosti mogu se uočiti za cink u januaru, februaru, maju i oktobru (5,8; 9,4; 23,20; 42 µg/L), za bakar u januaru, avgustu i oktobru (2,3; 8,5; 16 µg/L), hrom u avgustu (2,4 µg/L), olovo u junu i oktobru (1,3 i 2 µg/L) i za nikel u martu,

maju, junu, avgustu, oktobru i decembru (1,5; 2,8; 2,1; 3,6; 2,7; 2;6 µg/L) (Prilog 1, Tabela 1).

#### 4.1.2. Mikrobiološki kvalitet vode

Na lokalitetu Duboko tokom 2014. i 2015. godine, od mikrobioloških parametara kvaliteta vode mereni su ukupni koliformi (TC), *E. coli* i fekalne enterokoke (FE).

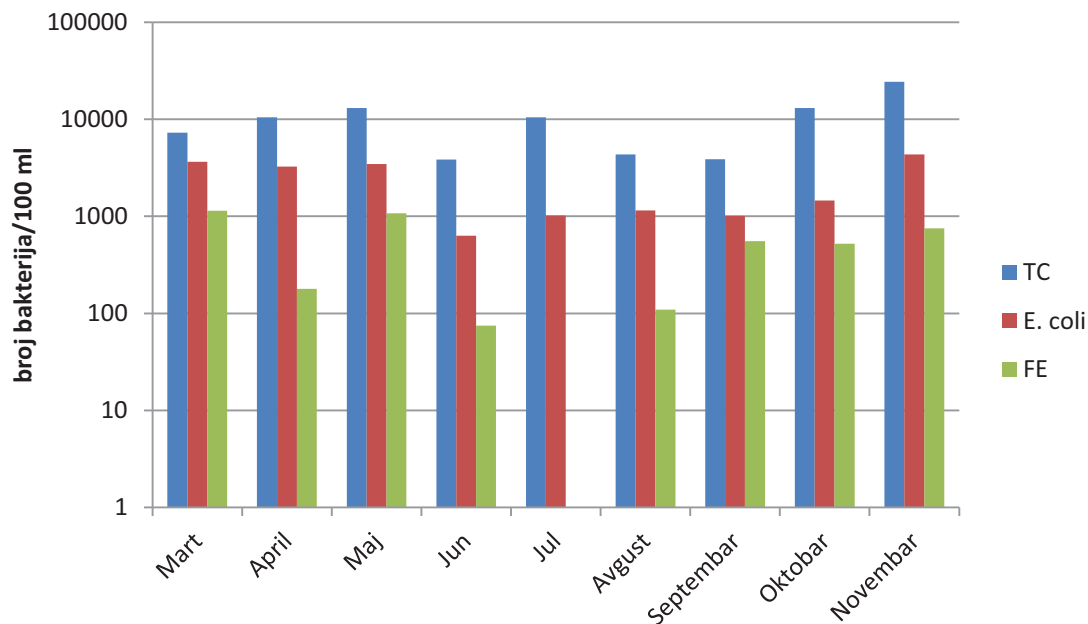
Na slici 4.6. prikazani su rezultati mikrobiološkog kvaliteta vode tokom 2014. godine. Najniže vrednosti mikrobioloških parametara zabeležene su u februaru i decembru za ukupne koliforme (TC), u maju za *E. coli*, u maju i junu za fekalne enterokoke (FE). Najveće vrednosti su bile zabeležene u maju za TC, u martu za *E. coli* i u januaru za FE.



Slika 4.6. Broj ukupnih koliforma (TC), *E. coli* i fekalnih enterokoka (FE) na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine

Na slici 4.7. prikazani su rezultati mikrobiološkog kvaliteta vode za 2015. godinu. Tokom 2015. godine registrovane su niže vrednosti za TC u junu i septembru, za *E. coli* i

EF u junu. Najveće brojnosti indikatora fekalnog zagađenja su zabeležene u maju, oktobru i novembru za TC, u martu, aprilu i maju za *E. coli* i u martu i maju za FE.



Slika 4.7. Broj ukupnih koliforma (TC), *E. coli* i fekalnih enterokoka (FE) na lokalitetu Duboko tokom 2015. godine

Mikrobiološki kvalitet vode na lokalitetu Duboko tokom 2014. i 2015. godine kretao se u okviru II i III klase (Kirschner i sar., 2009) (Slike 4.6 i 4.7).

#### 4.1.2.1. Korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima

Za 2014. i 2015. godinu analizirane su korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima, kao i vodostaja sa mikrobiološkim i fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima. Ukoliko su podaci bili u saglasnosti sa normalnom raspodelom rađena je Pirsonova, a ukoliko nisu rađena je Spirmanova korelacija. U tabelama su date samo statistički značajne pozitivne ili negativne korelacije.

U tabeli 4.3. prikazane su značajne Pirsonove korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima za 2014. godinu. Uočena je korelacija između TC i organskog azota, ortofosfata, ukupnog fosfora, natrijuma, gvožđa, hroma, arsena, nikla, atrazina, desetilterbutilazina, terbutilazina, acetohlor i metolahlor. U slučaju *E. coli* dobijene su korelacije sa gvožđem i ukupnim fosforom, dok su za FE dobijene korelacije sa rastvorenim kiseonikom, kalcijumom, rastvorenim niklom i kalijumom.

Tabela 4.3. Korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima za 2014. godinu;  $p < 0,05$ ;

	<b>TC</b>
<b>Organski azot (N)</b>	0,7542
<b>Ortofosfati (PO<sub>4</sub>-P)</b>	0,8892
<b>Ukupni fosfor (P)</b>	0,7512
<b>Natrijum (Na<sup>2+</sup>)</b>	-0,7943
<b>Gvožđe (Fe)</b>	0,7447
<b>Hrom (Cr)-ukupni rastvoreni</b>	0,8773
<b>Arsen (As)</b>	0,8247
<b>Nikl (Ni)</b>	0,8082
<b>Atrazin</b>	0,8889
<b>Desetilterbutilazin</b>	0,9451
<b>Terbutilazin</b>	0,9521
<b>Acetohlor</b>	0,9581
<b>Metolahlor</b>	0,9499
	<b><i>E. coli</i></b>
<b>Gvožđe (Fe)</b>	0,8455
<b>Ukupni fosfor (P)</b>	-0,7378
	<b>FE</b>
<b>Kiseonik (O<sub>2</sub> mg/L)</b>	0,7081
<b>Kalcijum (Ca<sup>2+</sup>)</b>	-0,7834
<b>Nikl (Ni) - rastvoreni</b>	-0,757
<b>Kalijum (K<sup>+</sup>)</b>	-0,765

Analiza korelacije nivoa vode i mikrobioloških, fizičko-hemijskih i hemijskih parametara rađena je Pirsonovim testom, jer su parametri imali normalnu raspodelu (2014. godina) (Tabela 4.4.). Negativne statistički signifikantne korelacije sa vodostajem imali su

parametri nitrati, natrijum, kalcijum i hloridi, dok su organski azot, gvožđe, mangan, ukupni hrom, olovo i HPK (Cr) imali statistički signifikantne pozitivne korelacije.

Tabela 4.4. Korelacije vodostaja sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima tokom 2014. godine;  $p < 0,05$ ;

	<b>Vodostaj</b>
<b>Nitrati (NO<sub>3</sub>-N)</b>	-0,8163
<b>Organski azot (N)</b>	0,7544
<b>Natrijum (Na<sup>2+</sup>)</b>	-0,8731
<b>Kalcijum (Ca<sup>2+</sup>)</b>	-0,8278
<b>Hloridi (Cl)</b>	-0,7526
<b>Gvožđe (Fe)</b>	0,8718
<b>Mangan (Mn)</b>	0,8556
<b>Hrom (Cr) – ukupni</b>	0,8088
<b>Olovo (Pb)</b>	0,8699
<b>HPK (Cr)</b>	0,9278

U tabeli 4.5. prikazane su pozitivne i negativne Pirsonove i Spirmanove korelacije mikrobioloških parametara iz 2015. godine i petogodišnjih (2009. do 2013. godine) proseka fizičko-hemijskih i hemijskih parametara. Od parametara koji su odstupali od normalne raspodele za koje je korišćen Spirmanov test, dobijena je značajna korelacija *E. coli* sa ukupnim hromom (pozitivna korelacija) i pentahlorfenolom (negativna korelacija). Za ostale parametre korelacije su analizirane Pirsonovim testom. U slučaju TC je dobijena pozitivna korelacija sa kalcijumom, rastvorenim gvožđem i rastvorenim niklom, dok je sa sulfatima dobijena negativna korelacija. U slučaju *E. coli* zabeležene su pozitivne korelacije sa rastvorenim kiseonikom i rastvorenim cinkom, negativne sa temperaturom vode, elektroprovodljivošću, natrijumom, hloridima, rastvorenim bakrom, terbutinom, desizopropilatrazinom, alahlorom, diuronom i gama HCH (Lindan). Zastupljenost FE je pokazala pozitivnu korelaciju sa mutnoćom vode, kadmijumom i aluminijumom, a negativnu sa pH i BPK-5.



Tabela 4.5. Korelacije mikrobioloških (2015. godina) sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima (petogodišnji prosek, 2009-2013);  $p < 0,05$ ;

	<b>TC</b>
<b>Kalcijum (Ca<sup>2+</sup>)</b>	0,7086*
<b>Sulfati (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>	-0,7309*
<b>Gvožđe (Fe) – rastvoreno</b>	0,7095*
<b>Nikl (Ni) - rastvoreni</b>	0,7824*
	<b><i>E. coli</i></b>
<b>Temperature vode (°C)</b>	-0,8424*
<b>O<sub>2</sub> (mg/l)</b>	0,8523*
<b>Elektroprovodljivost</b>	-0,7897*
<b>Natrijum (Na<sup>2+</sup>)</b>	-0,7282*
<b>Hloridi (Cl)</b>	-0,7271*
<b>Cink (Zn) rastvoreni</b>	0,8616*
<b>Bakar (Cu) - rastvoreni</b>	0,6687*
<b>Terbutin</b>	-0,6799*
<b>Desizopropilatrazin</b>	-0,6699*
<b>Alahlor</b>	-0,7561*
<b>Diuron</b>	-0,7675*
<b>Gama HCH (Lindan)</b>	0,6798*
<b>Hrom (Cr) – ukupni</b>	0,7619**
<b>Pentahlorfenol</b>	-0,6758**
	<b>FE</b>
<b>Mutnoća</b>	0,7516*
<b>pH</b>	-0,7083*
<b>Kadmijum (Cd)</b>	0,7727*
<b>Aluminijum (Al)</b>	0,8084*
<b>BPK-5</b>	-0,7190*

\* Pirsonova korelacija;

\*\* Spirmanova korelacija

Značajne korelacije vodostaja za 2015. godinu sa mikrobiološkim parametrima (2015. godina) i petogodišnjim fizičko-hemijskim i hemijskim prosecima (2009-2013. godina) prikazane su u tabeli 4.6. Jedino vrednosti fenolnog indeksa nisu imale normalnu raspodelu i u njihovom slučaju dobijena je značajna negativna Spirmanova korelacija. U slučaju ostalih parametara, vrednosti vodostaja za 2015. godinu pokazale su pozitivnu

korelaciju sa nitritima, a negativnu sa elektroprovodljivošću, natrijumom, hloridima i rastvorenim arsenom.

Tabela 4.6. Korelacije vodostaja (2015. godina) sa mikrobiološkim (2015. godina), fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima (petogodišnji prosek, 2009-2013);  $p < 0,05$ ;

	<b>Vodostaj</b>
<b>Elektroprovodljivost</b>	-0,7792*
<b>Nitriti (NO<sub>2</sub>-N)</b>	0,6325*
<b>Natrijum (Na<sup>2+</sup>)</b>	-0,7894*
<b>Hloridi (Cl)</b>	-0,7157*
<b>Arsen (As) - rastvoreni</b>	-0,8084*
<b>Fenolni indeks</b>	-0,7136**

\* Pirsonova korelacija;

\*\* Spirmanova korelacija

### **4.1.3. Sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta**

Tokom 2014. i 2015. godine na lokalitetu Duboko zabeleženo je po 11 taksona akvatičnih oligoheta (Tabele 4.7. i 4.10.). Identifikovane vrste se mogu, prema Timm (2009) i Brinkhurst i Gelder (2001), svrstati u dve familije, Tubificidae i Lumbriculidae. Takođe, tokom uzorkovanja zabeleženo je i prisustvo drugih grupa akvatičnih makroinvertebrata, a rezultati su dati u tabeli 4.13.

Tabela 4.7. Lista zabeleženih taksona i odgovarajućih viših taksonomskih nivoa akvatičnih oligoheta na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine.

#### **Classis Clitellata**

##### **Subclassis Oligochaeta**

##### **Ordo Tubificida**

##### **Fam. Tubificidae**

##### **Subfamilia Rhyacodrilinae**

*Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892

##### **Subfamilia Tubificinae**

*Isochaetides michaelsoni* (Lastockin, 1937)

*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862

*Limnodrilus claparedeanus* Ratzel 1868

*Limnodrilus udekemianus* Claparede, 1862

*Limnodrilus sp.*

*Potamothrix vejnovskyi* (Hrabe, 1941)

*Psammoryctides barbatus* (Grube, 1861)

*Tubifex tubifex* Muller 1774

*Tubifex sp.*

**Ordo Lumbriculida**

**Fam. Lumbriculidae**

*Stylodrilus heringianus* Claparede, 1862

Tokom 2014. godine zabeleženo je 9 vrsta koje se mogu svrstati u 7 rodova (Tabela 4.8.).

Tabela 4.8. Raznovrsnost oligohetne faune na lokalitetu Duboko tokom 2014. godine

*Isochaetides michaelsoni* (Lastockin, 1937)

*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862

*Limnodrilus claparedeanus* Ratzel 1868

*Limnodrilus udekemianus* Claparede, 1862

*Limnodrilus sp.*

*Potamothrix vejnovskyi* (Hrabe, 1941)

*Psammoryctides barbatus* (Grube, 1861)

*Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892

*Tubifex tubifex* Muller 1774

*Tubifex sp.*

*Stylodrilus heringianus* Claparede, 1862

Najzastupljenije su bile vrste *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus*. Sledeće po zastupljenosti bile su vrste *T. tubifex* i *B. sowerbyi*. Vrste koje su najređe bile uzorkovane su *I. michaelsoni* (jedna jedinka u maju), *P. barbatus* (po jedna jedinka u maju i junu), *P. vejnovskyi* (jedna jedinka u avgustu) i *S. heringianus* (dve jedinka u oktobru) (Tabela 4.9.).

Tabela 4.9. Broj i procentualna zastupljenost vrsta akvatičnih Oligochaeta tokom 2014. godine

Duboko 2014. godina	Mart		Maj		Jun		Jul		Avgust		Oktobar	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
<b>Oligochaeta</b>	44		239		107		143		236		250	
<b>Tubificidae</b>												
<i>Isochaetides michaelseni</i> (Lastockin, 1937)	/	/	1	0,4	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparede, 1862	29	65,9	109	45,4	72	67,3	96	67,1	90	38	122	48,4
<i>Potamothrix vej dovskiyi</i> (Hrabe, 1941)	/	/	/	/	/	/	/	/	1	0,4	/	/
<i>Psammoryctides barbatus</i> (Grube, 1891)	/	/	1	0,4	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Branchyura sowerbyi</i> Beddard, 1892	4	9,1	5	2,1	1	0,9	1	0,7	18	7,6	20	7,9
<i>Limnodrilus udekemianus</i> Claparede, 1862	/	/	7	2,9	/	/	/	/	3	1,3	1	0,4
<i>Limnodrilus claparedeanus</i> Ratzel 1868	5	11,4	75	31,3	28	26,2	41	28,7	113	47,7	92	36,5
<i>Limnodrilus</i> sp.	5	11,4	13	5,4	5	4,7	4	2,8	5	2,1	8	3,2
<i>Tubifex tubifex</i> , Muller 1774	1	2,3	21	8,8	1	0,9	1	0,7	6	2,5	7	2,8
<i>Tubifex</i> sp.	/	/	8	3,3	/	/	/	/	1	0,4	/	/
<b>Lumbriculidae</b>												
<i>Stylochdrilus heringianus</i> Claparede, 1862	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2	0,8

/ - nisu zabeležene u uzorku;

Tabela 4.10. Lista zabeleženih taksona i odgovarajućih viših taksonomskih nivoa akvatičnih oligoheta na lokalitetu Duboko tokom 2015. godine.

**Classis Clitellata**

**Subclassis Oligochaeta**

**Ordo Tubificida**

**Fam. Tubificidae**

**Subfamilia Rhyacodrilinae**

*Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892

**Subfamilia Tubificinae**

*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862

*Limnodrilus claparedeanus* Ratzel 1868

*Limnodrilus udekemianus* Claparede, 1862

*Potamothrix vej dovskyi* (Hrabe, 1941)

*Potamothrix moldaviensis* Vejdovsky & Mrázek, 1902

*Potamothrix hammoniensis* (Michael sen, 1901)

*Psammoryctides albicola* (Michael se, 1901)

*Tubifex tubifex* Muller 1774

**Ordo Lumbriculida**

**Fam. Lumbriculidae**

*Lumbriculus variegatus* (Muller 1774)

*Stylodrilus heringianus* Claparede, 1862

Tokom 2015. godine zabeleženo je 11 vrsta koje se mogu svrstati u 7 rodova (Tabela 4.11.).

Tabela 4.11. Raznovrsnost oligohetne faune na lokalitetu Duboko tokom 2015. godine

*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862

*Limnodrilus claparedeanus* Ratzel 1868

*Limnodrilus udekemianus* Claparede, 1862

*Potamothrix moldaviensis* Vejdovsky & Mrázek, 1902

*Potamothrix vejdoskyi* (Hrabe, 1941)

*Potamothrix hammoniensis* (Michaelsen, 1901)

*Psammoryctides albicola* (Michaelse, 1901)

*Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892

*Tubifex tubifex* Muller 1774

*Stylodrilus heringianus* Claparede, 1862

*Lumbriculus variegatus* (Muller 1774)

Prema podacima za 2015. godinu, najzastupljenije su vrste *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus*, dok su vrste *P. moldaviensis*, *P. vejdoskyi*, *P. albicola*, *L. variegatus* i *S. heringianus* bile najređe uzorkovane, od jedne do četiri jedinke u jednom uzorku tokom čitavog perioda uzorkovanja tokom ove godine (Tabela 4.12.).



Tabela 4.12. Broj i procentualna zastupljenost vrsta akvatičnih Oligochaeta tokom 2015. godine

Duboko 2015. godina	Mart		April		Maj		Jun		Jul		Avg.		Sept.		Okt.		Nov.		Dec.	
	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
<b>Oligochaeta</b>	119		211		216		185		85		197		91		48		84		114	
<b>Tubificidae</b>																				
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparede, 1862	61	73,5	150	77,7	167	83,9	163	93,1	57	85,1	171	95,5	77	89,5	29	80,6	58	96,7	85	77,7
<i>Limnodrilus claparedeanus</i> Ratzel 1868	12	14,5	23	11,9	24	12,1	9	5,1	3	4,5	8	4,5	4	47	5	13,9	1	1,7	10	9,1
<i>Limnodrilus udekemianus</i> Claparede, 1862	/	/	/	/	/	/	/	/	2	3,0	/	/	/	/	/	/	/	/	3	2,7
<i>Potamothrix moldaviensis</i> Vejdovsky & Miráček, 1902	/	/	2	1,0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Potamothrix vejdoskyi</i> (Hrabe, 1941)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	3,5	/	/	/	/	/	/
<i>Tubifex tubifex</i> , Muller 1774	/	/	2	1,0	4	2,0	2	1,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	0,9
<i>Potamothrix hammoniensis</i> (Michaelsen, 1901)	1	1,2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	1,2	/	/	1	1,7	3	2,7
<i>Psammoryctides albicola</i> (Michaelsen, 1901)	/	/	2	1,0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Branchiura sowerbyi</i> Beddard, 1892	9	10,8	10	5,2	4	2,0	/	/	5	7,5	/	/	1	1,2	2	5,6	/	/	8	7,3
<b>Lumbriculidae</b>																				
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Muller 1774)	/	/	/	/	/	/	1	0,6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Styolodrilus heringianus</i> Claparede, 1862	/	/	4	2,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

/ - nisu zabeležene u uzorku;

Zabeleženo je prisustvo i drugih grupa akvatičnih makroinvertebrata (Tabela 4.13.).

Tabela 4.13. Lista taksona zabeleženih grupa akvatičnih makroinvertebrata na lokalitetu Duboko tokom 2014. i 2015. godine.

**Phylum Porifera**

**Fam. Spongillidae**

*Spongilla lacustris* (Linnaeus, 1758)

**Phylum Nematoda**

**Phylum Annelida**

**Classis Polychaeta**

**Fam. Ampharetidae**

*Hypania invalida* (Grube, 1860)

**Phylum Mollusca**

**Class Bivalvia**

**Fam. Corbiculidae**

*Corbicula fluminea* (O. F. Muller 1774)

**Fam. Unionidae**

*Unio tumidus* Philipson 1788

*Anodonta (Sinanodonta) woodiana* (Lea, 1834)

**Phylum Arthropoda**

**Subphylum Crustacea**

**Class Malacostraca**

**Subordo Gammaridea**

**Ordo Decapoda**

**Subordo Pleocyemata**

**Fam. Astacidae**

*Astacus leptodactylus* Eschscholtz 1823

**Fam. Cambaridae**

*Orconectes limosus* (Rafinesque 1817)

**Fam. Corophiidae**

*Chelicorophium curvispinum* (G.O Sars, 1895)

**Class Branchiopoda**

**Ordo Conchostraca**

**Subphylum Hexapoda**

**Class Insecta**

**Ordo Ephemeroptera**

**Fam. Polymitarcyidae**

*Ephoron virgo* (Olivier 1791)

**Ordo Odonata**

**Fam. Gomphidae**

*Gomphus flavipes* (Charpentier 1825)

**Ordo Trichoptera**

**Fam. Ecnomidae**

*Ecnomus tenellus* (Rambur 1842)

**Ordo Diptera**

**Fam. Chironomidae**

**Fam. Ceratopogonidae**

Od pomenutih grupa makroinvertebrata najzastupljenija je bila familija Chironomidae, zatim iz klase Bivalvia vrsta *Corbicula fluminea*, dok se iz podtipa Crustacea izdvaja familija Corophiidae sa vrstom *Chelicorophium curvispinum*. Zanimljiv je nalaz vrste *Ephoron virgo* (Ephemeroptera) koja do sada nije bila zabeležena na široj teritoriji grada Beograda. Najverovatniji razlog nalaska ove vrste može se naći u načinu uzorkovanja, odnosno u korišćenju bentološkog bagera, zato što ova vrsta živi zarivena u mulj, za razliku od ostalih vrsta iz grupe Ephemeroptera koje preferiraju staništa, kao što su kamenito dno ili vodene biljke.

#### 4.1.3.1. Ocena ekološkog potencijala lokaliteta Duboko na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta

U tabeli 4.9. date su brojnost i procentualne zastupljenosti vrsta akvatičnih oligoheta koje su uzorkovane tokom 2014. godine, a u tabeli 4.13. dat je zajednički pregled grupa i vrsta akvatičnih makroinvertebrata za 2014. i 2015. godinu. Najzastupljenija taksonomska grupa tokom svih meseci uzorkovanja 2014. godine bila je grupa Oligochaeta (mart – 97,06 %; maj – 99,45 %; jun – 95,25 %; jul – 100 %; avgust – 97,93 %; oktobar – 98,95 %), dok su ostale grupe makroinvertebrata bile mnogo manje zastupljene (Nematoda – avgust 0,12 %; Bivalvia – mart 2,94 %; Polychaeta – oktobar 0,53 %; Crustacea – maj 0,55 %, jun 2,97 %, avgust 0,83 %; Ephemeroptera – jun 1,79 %; Diptera – avgust 0,69 %, oktobar 0,13 %). U okviru grupe Oligochaeta familija Tubificidae bila je 100 % zastupljena u skoro svim uzorcima. Izuzetak je bio oktobar kada je zastupljenost tubificida bila 99,21 %, odnosno kada je zabeleženo i prisustvo familije Lumbriculidae – zastupljenost 0,79 %. Veliko učešće tubificida u uzorcima ukazuje na lošu do veoma loše ocene ekološkog potencijala (IV-V klasa kvaliteta vode). Ostali indeksi su dati u tabeli 4.14.

Tabela 4.14. Biološki parametri ocene ekološkog potencijala – Duboko 2014. godina.

ZNAČAJNO IZMENJENA VODNA TELA						
Akumulacije formirane na vodnim telima TIPA 1						
	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar
<b>saprobni indeks (metoda Zelinka i Marvan)</b>	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V
<b>BMWP skor</b>	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V
<b>Indeks diverziteta (metoda Shannon - Weaver)</b>	III-IV	II-III	III-IV	III-IV	III-IV	II-III
<b>Ukupan broj taksona</b>	III-IV	II-III	III-IV	III-IV	III-IV	II-III

Brojnost i procentualna zastupljenost akvatičnih oligoheta za 2015. godinu prikazana je u tabeli 4.12., dok je lista zabeleženih grupa i vrsta akvatičnih makroinvertebrata za 2014. i 2015. godinu prikazana u tabeli 4.13. Slično kao i prethodne godine i tokom 2015. godine najzastupljenija taksonomska grupa je bila grupa Oligochaeta (mart – 92,91%; april – 88,53%; maj – 96,60 %; jun – 93,09 %; jul - 94,37 %; avgust – 93,72 %; septembar – 93,14 %; oktobar – 89,26 %; novembar – 85,71 %; decembar – 94,83 %). Sledeća po zastupljenosti je bila grupa Diptera (mart – 7,09 %; april – 4,13 %; maj – 0,49 %; jun – 3,37 %; avgust – 5,24 %; septembar

– 3,25 %; oktobar – 5,79 %; novembar – 10,48 %; decembar – 2,30 %). Prisutne ali manje zastupljene bile su i grupe Bivalvia (maj – 0,32 %; jul – 0,94 %; septembar – 2,89 %; oktobar – 4,96 %; novembar – 0,95 %; deembar – 0,58 %), Polychaeta (april – 7,34 %; maj – 1,62 %; jun – 3,55 %), Crustacea (maj – 0,97 %; jul – 4,70 %; avgust – 0,70 %; septembar – 0,72 %; novembar – 2,86 %; decembar – 2,30 %) i Trichoptera (avgust – 0,35 %). U okviru oligoheta familija Tubificidae je dominantna, zastupljena 100 %, sem u slučaju aprila (97,93 %) i juna (99,43 %) kada je bilo zabeleženo i prisustvo familije Lumbriculidae. Visoka zastupljenost Oligochaeta – Tubificidae ukazuje na loš/vrlo loš ekološki potencijala (IV-V klasa kvaliteta vode). Indeks saprobnosti, BMWP skor, indeks diverziteta i ukupan broj taksona dati su u tabeli 4.15.

Tabela 4.15. Biološki parametri ocene ekološkog potencijala – Duboko 2015. godina.

ZNAČAJNO IZMENJENA VODNA TELA										
Akumulacije formirane na vodnim telima TIPA 1										
	mart	apr.	maj	jun	jul	avg.	sep.	okt.	nov.	dec.
<b>saprobni indeks (metoda Zelinka i Marvan)</b>	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V
<b>BMWP skor</b>	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V
<b>Indeks diverziteta (metoda Shannon - Weaver)</b>	III-IV	II-III	III-IV	III-IV	III-IV	IV-V	III-IV	III-IV	IV-V	III-IV
<b>Ukupan broj taksona</b>	III-IV	II-III	III-IV	III-IV	III-IV	IV-V	III-IV	IV-V	IV-V	III-IV

#### 4.1.4. Ekogenotoksikološka istraživanja

Na lokalitetu Duboko ekogenotoksikološka istraživanja su vršena tokom 2014. i 2015. godine. Tokom obe godine istraživanja, broj uzorkovanih jedinki vrste *B. sowerbyi* korišćenih u ekogenotoksikološkim istraživanjima je varirao tokom meseci. Broj analiziranih jedinki *B. sowerbyi* dat je u tabeli 1, Prilog 3.

Pored toga, istraživanja su vršena i na slučajno izabranim jedinkama iz uzoraka (dalje u tekstu označene kao Mix), odnosno na čitavoj zajednici akvatičnih oligoheta iz datog uzorka. U većini slučaja eksperimenti su rađeni na 100 jedinki mešovite zajednice (Mix). Izuzeci su bili meseci kada je u uzorku bilo zabeležen manji broj akvatičnih oligoheta (Tabela 1, Prilog 3): mart

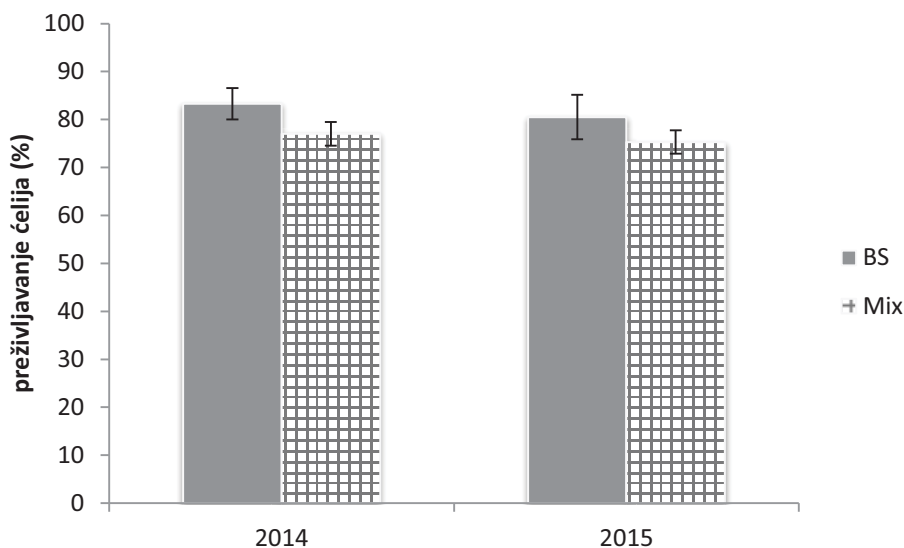
2014. godine (91 jedinka), oktobar, novembar i decembar 2015. godine (41, 77 i 50 jedinki) (Tabela 2, Prilog 3).

#### **4.1.4.1. Vijabilnosti celomocita i hemocita**

Preživljavanje celomocita i hemocita iz suspenzije ćelija određeno je diferencijalnim akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB) bojenjem (Squier i Cohen, 2001).

U slučaju vrste *B. sowerbyi* prosečno preživljavanje ćelija na lokalitetu Duboko tokom 2014. god. je bilo 83,3 % (Slika 4.8). Preživljavanje ćelija veće od 90 % zabeleženo je u oktobru, januaru i martu (99, 91,7, 91 %), dok je veće od 80 % dobijeno je u junu, februaru, i maju (87, 83 i 81 %). Vrednosti za preživljavanja ćelija preko 70 % dobijene su u julu, decembru i avgustu (74, 73 i 70 %). Tokom 2015. god. zabeleženo je prosečno preživljavanje ćelija kod *B. sowerbyi* od 80.5 % (Slika 4.8). Visoko preživljavanje ćelija ove vrste, iznad 90 % zabeleženo je u mesecima: mart, oktobar, novembar i decembar (95, 92, 93 i 93 %), 86 i 82 % u avgustu, odnosno julu, 79 % u septembru, a niže vrednosti vijabilnosti ćelija su dobijene za jun, april i maj (68, 66 i 51 %).

U slučaju Mix uzorka, prosečno preživljavanje ćelija je bilo 77 % za 2014., odnosno 75,3 % za 2015. godinu (Slika 4.8). Vijabilnost suspenzije ćelija Mix uzorka 2014. godine iznad 90 % zabeležena je jedino u oktobru (94 %). Preživljavanje ćelija oko 80 % zabeleženo je u decembru i julu (80,5 i 80 %), a u ostalim mesecima bilo je oko 70 % (maj – 78 %; februar – 73,5 %; avgust – 73 %; januar – 72,5 %; jun – 71,5 %; mart – 70 %). Tokom 2015. godine nije zabeležena vijabilnost ćelija iz Mix uzorka iznad 90 %. Meseci koji su imali najveće preživljavanje ćelija bili su novembar i septembar (81,5 %). U većini slučajeva zabeležena je vijabilnost ćelija oko 70 % (oktobar – 79 %; mart i avgust – 77,5 %; decembar – 77 %; jun – 76 %; jul – 75 %; maj 73,5 %). Niže vrednosti vijabilnosti ćelija zabeležene su u aprilu (54,5 %). Preživljavanje celomocita i hemocita prikazano je u Tabeli 1 i 2 (Prilog 3).



Slika 4.8. Grafički prikaz preživljavanja celomocita i hemocita (srednja vrednost  $\pm$  SE) kod vrste *B. sowerbyi* i kod Mix uzorka na lokalitetu Duboko tokom 2014. i 2015. godine

Iz dobijenih rezultata može se uočiti da preživljavanje ćelija celomske tečnosti i krvnog sistema kod vrste *B. sowerbyi* ima veće vrednosti u odnosu na one zabeležene kod jedinki iz mešovito uzorka, označenog kao Mix.

#### 4.1.4.2. Uspostavljanje laboratorijske kulture i određivanje bazalnog oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste *B. sowerbyi*

Za određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* korišćene su jedinke iz laboratorijske kulture. Laboratorijska kultura vrste *B. sowerbyi* uspostavljena je 2014. godine pomoću jedinki koje su sakupljane na terenu. Uspostavljanje laboratorijske kulture uključuje razmnožavanje jedinki, odnosno formiranje novih generacija u kontrolisanim laboratorijskim uslovima, što je potvrđeno nalaskom kokona i juvenilnih jedinki u akvarijumima u kojima su gajene jedinke uzete sa terena.

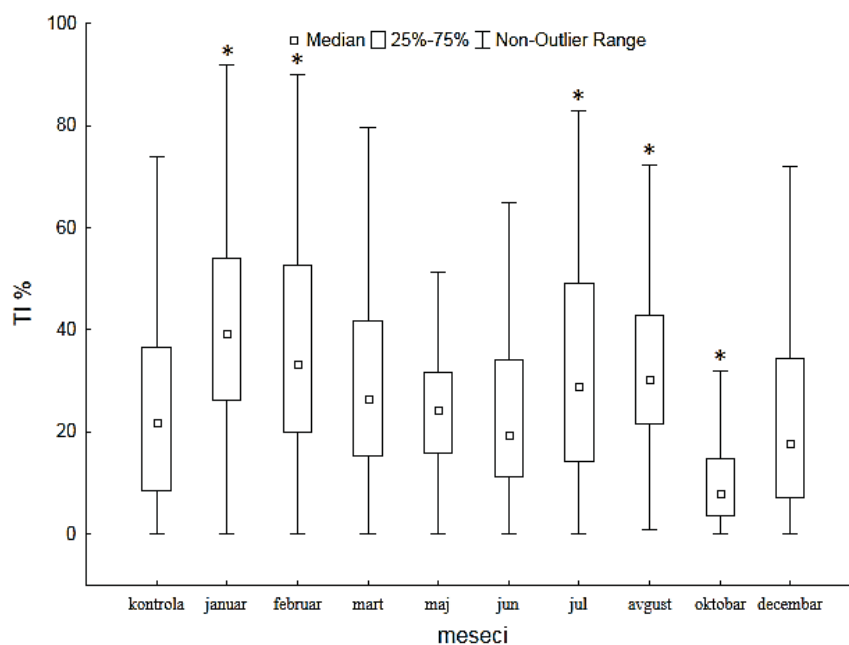
Za određivanje bazalnog nivoa oštećenja DNK molekula za komet test su korišćene jedinke *B. sowerbyi* iz laboratorijske kulture koje su prošle aklimaciju. Srednja vrednost oštećenja DNK molekula ( $TI \pm SE = 24,6 \pm 1,3$ ) je korišćena kao referentna vrednost, odnosno kao kontrola DNK oštećenja za vrstu *B. sowerbyi* u svim *in situ* istraživanjima.



#### 4.1.4.3. Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste *B. sowerbyi* i u Mix uzorku tokom 2014. godine

Tokom 2014. godine nivo oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi*, kao i Mix uzoraka praćen je tokom devet meseci (januar, februar, mart, maj, jun, jul, avgust, oktobar i decembar). Kao što je već rečeno, bazalni nivo DNK oštećenja jedinki *B. sowerbyi* gajenih u optimalnim uslovima u laboratorijskoj kulturi korišćen je kao kontrola.

Na slici 4.9. prikazan je nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama vrste *B. sowerbyi* sa lokaliteta Duboko tokom 2014. godine. Statistički značajna razlika između nivoa oštećenja DNK molekula proverena je neparametrijskim Kruškal-Valis testom. Korišćenjem Man Vitni U testa sa Bonferoni korekcijom dobijeno je za *B. sowerbyi* statističko značajno povećanje oštećenja DNK molekula u odnosu na bazalne vrednosti ( $TI \pm SE = 24,6 \pm 1,3$ ) za mesece januar, februar, jul i avgust. DNK oštećenje u maju, junu i decembru imalo je niže vrednosti nego bazalni nivo, ali nije bilo statistički značajno. S druge strane, mesec oktobar karakterisao se statistički značajno manjom vrednošću TI parametra ( $TI \pm SE = 12,2 \pm 0,9$ ) u odnosu na bazalni nivo oštećenja DNK molekula (Slika 4.9).



Slika 4.9. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama vrste *B. sowerbyi* sa lokaliteta Duboko 2014. godine; \* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu dobijena je Mann Whitney U testom sa Bonferroni korekcijom;  $p < 0,05$

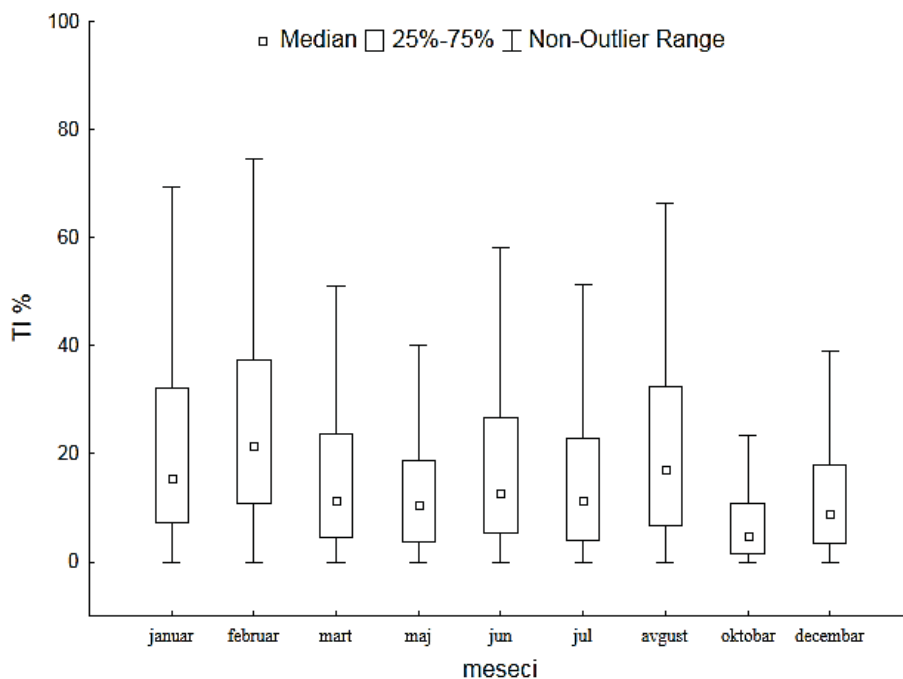
Statističke značajnosti prikazane su u tabeli 4.16. za 2014. godinu. Da bi se dobio uvid da li postoje statistički značajne razlike kada se meseci međusobno upoređuju, korišćen je Kruškal-Valis test sa Danovom korekcijom. Rezultati ukazuju da se vrednosti DNK oštećenja u oktobru statistički značajno razlikuju od vrednosti dobijenih za ostale mesece. Za januar nisu dobijene razlike jedino upoređivanjem sa februarom, dok su sa ostalim mesecima dobijene statističke značajne razlike. Pored pomenute sličnosti sa januarom, za februar se nije dobila statistički značajna razlika i sa julom, dok je sa ostalim mesecima dobijena. Pored pomenutih statistički značajnih razlika, u martu su dobijene razlike i sa decembrom, u maju i sa avgustom, u junu sa julom i avgustom, dok u decembru nisu dobijene razlike jedino upoređivanjem vrednosti sa vrednostima iz maja i juna.

Tabela 4.16. Statistička značajnost oštećenja DNK molekula kod *B. sowerby* između meseci tokom 2014. godine;  $p < 0,05$

	januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar
januar		–	√	√	√	√	√	√	√
februar	–		√	√	√	–	–	√	√
mart	√	√		–	–	–	–	√	√
maj	√	√	–		–	–	√	√	–
jun	√	√	–	–		√	√	√	–
jul	√	–	–	–	√		–	√	√
avgust	√	–	–	√	√	–		√	√
oktobar	√	√	√	√	√	√	√		√
decembar	√	√	√	–	–	√	√	√	

– nema statističke značajnosti; √ ima statističke značajnosti;

Na slici 4.10. dat je grafički prikaz nivoa oštećenja DNK molekula u Mix uzorcima tokom 2014. godine. Iz grafika se može videti da se februar karakterisao najvećim vrednostima oštećenja DNK molekula, a oktobar je imao najmanje vrednosti DNK oštećenja.



Slika 4.10. Nivo oštećenja DNK molekula kod jedinki Mix uzorka sa lokaliteta Duboko tokom 2014. godine

Statističke značajnosti za Mix uzorke tokom 2014. godine dobijene su Kruškal-Valis testom sa Danovom korekcijom i prikazane su u tabeli 4.17. U tabeli se može videti da februar i oktobar pokazuju statističko značajno povećanje, odnosno smanjenje oštećenja DNK molekula kada se upoređuje sa svim ostalim mesecima u 2014. godini. Statistički značajna odstupanja ne beleže se poređanjem nivoa oštećenja DNK molekula između januara sa junom i avgustom. Statistički značajne razlike postoje između marta sa januarom, februarom, avgustom i oktobrom. Za maj i jul su zabeležene razlike u poređenju sa uzorcima iz januara, februara, avgusta i oktobra. Statistički značajne razlike su zabeležene i između juna sa februarom, oktobra i decembra, između avgusta i februara, marta, maja, jula, oktobra i decembra, dok su za decembar zabeležene sa januarom, februarom, junom, avgustom i oktobrom.

Tabela 4.17. Statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod Mix uzorka između meseci tokom 2014. godine;  $p < 0,05$

	januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar
januar		√	√	√	–	√	–	√	√
februar	√		√	√	√	√	√	√	√
mart	√	√		–	–	–	√	√	–
maj	√	√	–		–	–	√	√	–
jun	–	√	–	–		–	–	√	√
jul	√	√	–	–	–		√	√	–
avgust	–	√	√	√	–	√		√	√
oktobar	√	√	√	√	√	√	√		√
decembar	√	√	–	–	√	–	√	√	

– nema statističke značajnosti; √ ima statističke značajnosti.

#### 4.1.4.4. Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2014. godine

U ovom potpoglavlju prikazane su značajne pozitivne ili negativne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* i kod Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2014. godine. U zavisnosti da li su parametri bili u saglasnosti sa normalnom raspodelom ili ne korelacije su dobijene pomoću Pirsonovog ili Spirmanovog testa.

U tabeli 4.18. date su statistički značajne Spirmanove korelacije nivoa oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametarima kvaliteta vode. Pozitivna korelacija je dobijena sa brojem fekalnih enterokoka, zasićenosti vode kiseonikom, hloridima i rastvorenim gvožđem, a negativna korelacija sa rastvorenim olovom, HPK (Mn), UV-ekstinkcijom (245 nm), kalijumom i rastvorenim cinkom.

Tabela 4.18. Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2014. godine;  $p < 0,05$ .

	<b>BS</b>
<b>FE</b>	0,6815
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	0,7979
<b>Cl</b>	0,7163
<b>Fe - rastvoreno</b>	0,6695
<b>Pb - rastvoreno</b>	-0,8107
<b>HPK (Mn)</b>	-0,8674
<b>UV-ekstinkcija (254nm)</b>	-0,7825
<b>K<sup>+</sup></b>	-0,7157
<b>Zn - rastvoreno</b>	-0,7078

Statistički značajne korelacije koje su dobijene Spirmanovim testom između nivoa oštećenja DNK molekula Mix uzoraka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode za 2014. godinu prikazane su u tabeli 4.19. Zabeležena je pozitivna korelacija jedino sa parametrom O<sub>2</sub> (%), dok je negativna korelacija zabeležena sa parametrima HPK (Mn) i UV – ekstinkcijom (254 nm).

Tabela 4.19. Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula Mix uzorka i fizičko-hemijskih i hemijskih parametara tokom 2014. godine;  $p < 0,05$ .

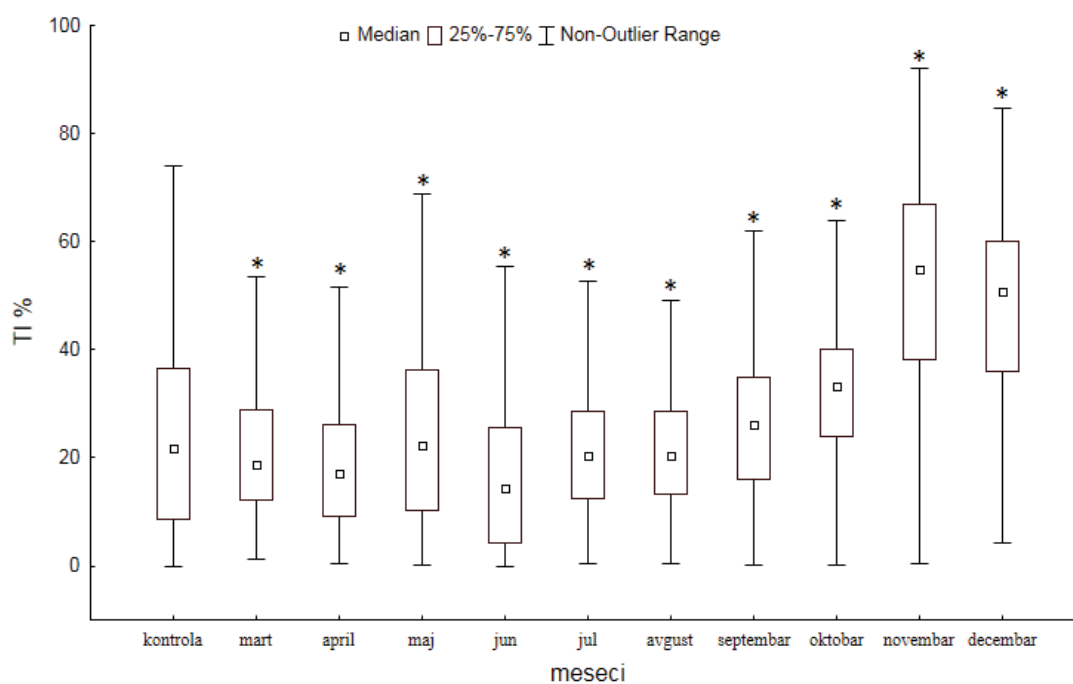
	<b>Mix</b>
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	0,6858
<b>HPK (Mn)</b>	-0,82
<b>UV-ekstinkcija (254nm)</b>	-0,6799

Treba napomenuti da nisu dobijene statistički značajne korelacije nivoa oštećenja *B. sowerbyi* i uzoraka Mix sa vodostajem za 2014. godinu.

#### 4.1.4.5. Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula u celocitama i hemocitama vrste *B. sowerbyi* i u Mix-u tokom 2015. godine

Nivo oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* i Mix uzoraka tokom 2015. godine praćen je tokom deset meseci (mart, april, maj, jun, jul, avgust, septembar, oktobar, novembar i decembar). Kao i za 2014. godinu, bazalni nivo DNK oštećenja *B. sowerbyi* koji je korišćen kao kontrola određen je kod laboratorijskih životinja koje su gajene u optimalnim uslovima.

Za procenu značajnih razlika nivoa oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* između bazalnih vrednosti i onih dobijenih tokom istraživanja korišćen je Kruškal-Valis test kao i Man Vitni U test sa Bonferoni korekcijom, a rezultati su prikazani na slici 4.11. Statističko značajno povećanje nivoa DNK oštećenja u odnosu bazalne vrednosti dobijeno je za maj, avgust, septembar, oktobar, novembar i decembar. Dobijene su i statistički značajno manje vrednosti DNK oštećenja u odnosu na bazalnu vrednost za mart, april, jun i jul.



Slika 4.11. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama vrste *B. sowerbyi* sa lokaliteta Duboko 2015. godine; \* - statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu dobijena je Man Vitni U testom sa Bonferoni korekcijom

U tabeli 4.20. prikazane su statističke značajnosti oštećenja DNK molekula za vrstu *B. sowerbyi* tokom 2015. godine koje su dobijene neparametrijskim Kruškal-Valis testom sa Danovom korekcijom. Uočava se da je mesec oktobar bio statistički značajno različit od svih ostalih uzorkovanih meseci. Vrednosti oštećenja DNK molekula za novembar i decembar jedino kada se međusobno upoređuju nisu statistički značajno različite, dok su u odnosu na ostale mesece statistički značajno različite. Pored gore pomenutih statistički različitih meseci, za septembar dobijene su i razlike sa aprilom i junom, a dobijene su statistički značajne razlike i između maja i juna.

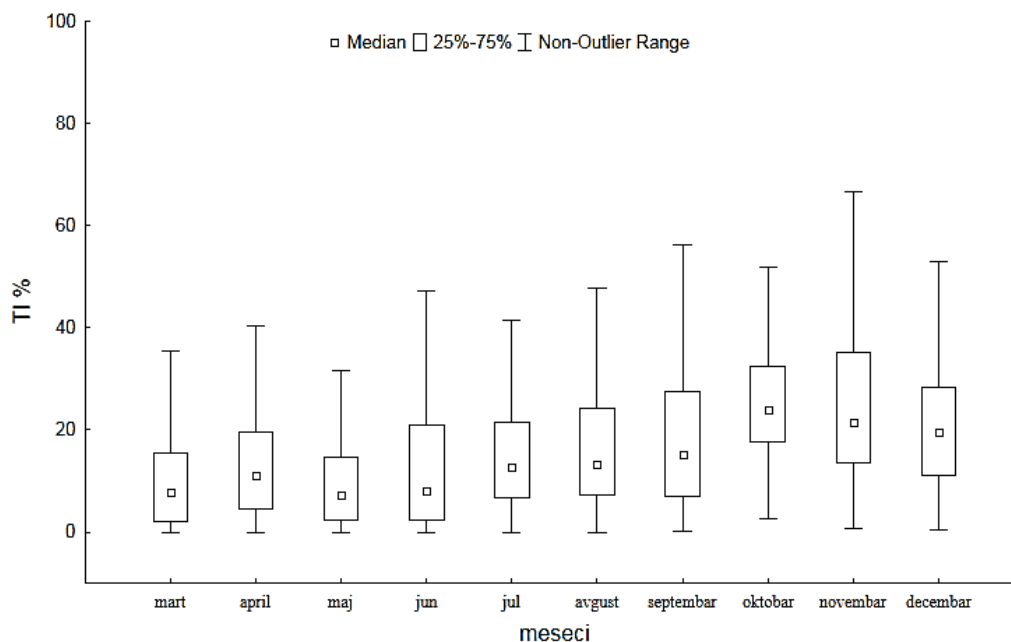
Tabela 4.20. Statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod jedinki *B. sowerbyi* tokom 2015. godine;  $p < 0,05$

	mart	april	maj	jun	jul	avg.	sep.	okt.	nov.	dec.
mart		–	–	–	–	–	–	√	√	√
april	–		–	–	–	–	√	√	√	√
maj	–	–		√	–	–	–	√	√	√
jun	–	–	√		–	–	√	√	√	√
jul	–	–	–	–		–	–	√	√	√
avgust	–	–	–	–	–		–	√	√	√
septembar	–	√	–	√	–	–		√	√	√
oktobar	√	√	√	√	√	√	√		√	√
novembar	√	√	√	√	√	√	√	√		–
decembar	√	√	√	√	√	√	√	√	–	

– nema statističke značajnosti; √ ima statističke značajnosti.

Upoređivanjem vrednosti oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* odgovarajućih meseci (mart, maj, jun, jul, avgust oktobar i decembar) tokom dve uzastopne godine, 2014. i 2015., nisu dobijene statistički značajne korelacije (Pirsonova korelacija,  $p < 0,05$ ).

Na slici 4.12. prikazane su rezultati oštećenja DNK molekula u Mix uzorcima tokom 2015. godine. Najniže vrednosti oštećenja dobijene su tokom marta i maja, dok su najviše vrednosti dobijene u oktobru i novembru.



Slika 4.12. Nivo oštećenja DNK molekula kod jedinki Mix uzorka sa lokaliteta Duboko tokom 2015. godine;

Statističke značajnosti za Mix uzorak tokom 2015. godinu koje su dobijene Kruškal-Valis testom sa Danovom korekcijom prikazane su u tabeli 4.21. Tokom ove godine razlike nisu zabeležene između marta sa majom i junom, aprila sa junom i julom, maja sa martom i junom, junom sa martom, aprilom i majom, julom sa aprilom, avgustom i septembrom, avgustom sa julom i septembrom, oktobrom sa novembrom, novembrom sa oktobrom i decembrom.

Tabela 4.21. Statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod Mix uzorka tokom 2015. godine;  $p < 0,05$

	mart	april	maj	jun	jul	avg.	sep.	okt.	nov.	dec.
mart		√	–	–	√	√	√	√	√	√
april	√		√	–	–	√	√	√	√	√
maj	–	√		–	√	√	√	√	√	√
jun	–	–	–		√	√	√	√	√	√
jul	√	–	√	√		–	–	√	√	√
avgust	√	√	√	√	–		–	√	√	√
septembar	√	√	√	√	–	–		√	√	–
oktobar	√	√	√	√	√	√	√		–	√
novembar	√	√	√	√	√	√	√	–		–
decembar	√	√	√	√	√	√	–	√	–	

– nema statističke značajnosti; √ ima statističke značajnosti



Upoređivanjem vrednosti koje su dobijene za oštećenje DNK molekula u Mix uzorcima za odgovarajuće mesece (mart, maj, jun, jul, avgust, oktobar i decembar) tokom 2014. i 2015. godine nisu dobijene statistički značajne korelacije (Pirsonova korelacija,  $p < 0,05$ ).

**4.1.4.6. Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2015. godine**

Kao i za 2014. godinu, i za narednu, 2015. godinu, praćene su korelacije nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* i kod Mix uzoraka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode. Korelacije su dobijene Pirsonovim ili Spirmanovim testom u zavisnosti da li su podaci bili u saglasnosti sa normalnom raspodelom.

U tabeli 4.22. prikazane su značajne korelacije sa nivoom oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* tokom 2015. godine. Dobijene su samo pozitivne Pirsonove korelacije sa brojem TC, nitritima, rastvorenim gvožđem i niklom.

Tabela 4.22. Statistički značajne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode tokom 2015. godine;  $p < 0,05$ .

	<b>BS</b>
<b>TC</b>	0,8638
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	0,8325
<b>Fe - rastvoreno</b>	0,8201
<b>Nikl - rastvoreni</b>	0,8397

Što se tiče korelacija nivoa oštećenja DNK molekula Mix uzorka za 2015. godinu dobijene su značajne pozitivne Pirsonove korelacije sa nitritima, rastvorenim gvožđem i antimonom, a negativna Spirmanova korelacija sa acetohlorom (Tabela 4.23.).

Tabela 4.23. Statistički značajne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula Mix uzorka i fizičko-hemijskih i hemijskih parametara tokom 2015. godine;  $p < 0,05$ .

	<b>Mix</b>
<b>NO<sub>2</sub>-N</b>	0,8867*
<b>Fe – rastvoreni</b>	0,6525*
<b>Antimon</b>	0,8534*
<b>Acetohlor</b>	-0,7599**

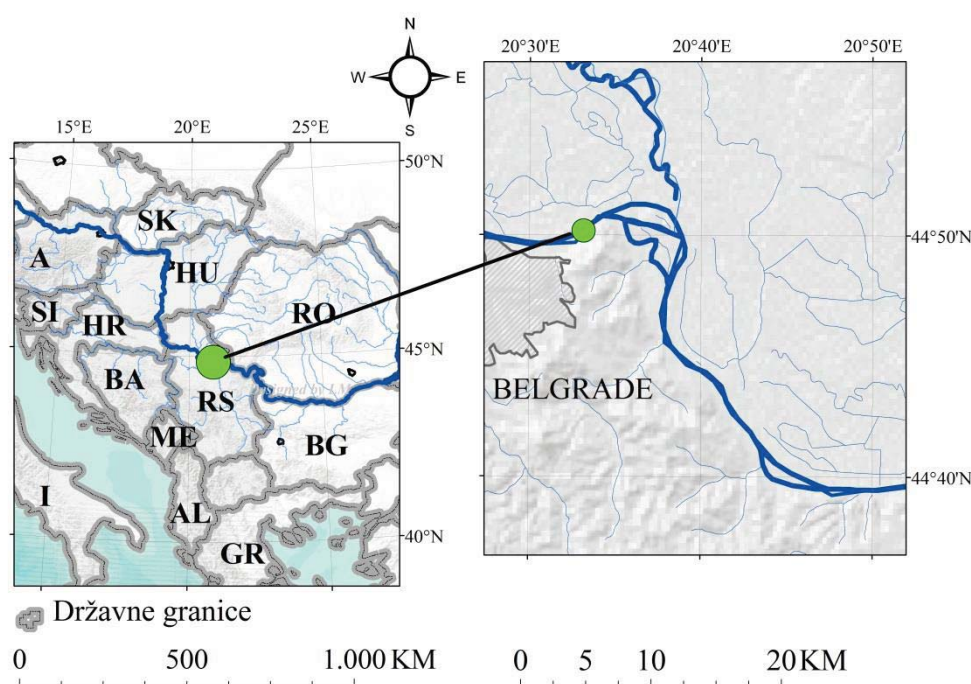
\* Pirsonova korelacija;

\*\* Spirmanova korelacija

Kao i tokom 2014. godine, ni 2015. godine nisu dobijene korelacije nivoa oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* i Mix uzoraka sa vodostajem.

#### 4.2. *In situ* istraživanje – lokalitet Višnjica

Lokalitet Višnjica na kojem je rađeno *in situ* istraživanje nalazi se na desnoj obali Dunava na izlasku iz Beograda u naselju Višnjička Banja (1162 rkm) (Slika 4.13). U ovom delu grada nalazi se rukavac Ade Huje u kome je smešten izliv glavnog kolektora otpadnih voda Beograda. Pored pritisaka koji dolaze od izliva otpadnih voda glavnog kolektora, ovaj lokalitet je i pod uticanjm otpadnih voda iz manjih rasutih izvora koji dolaze od pojedinačnih domaćinstava, kao i raznih ugostiteljskih objekata koji su smešteni na obali Dunava.

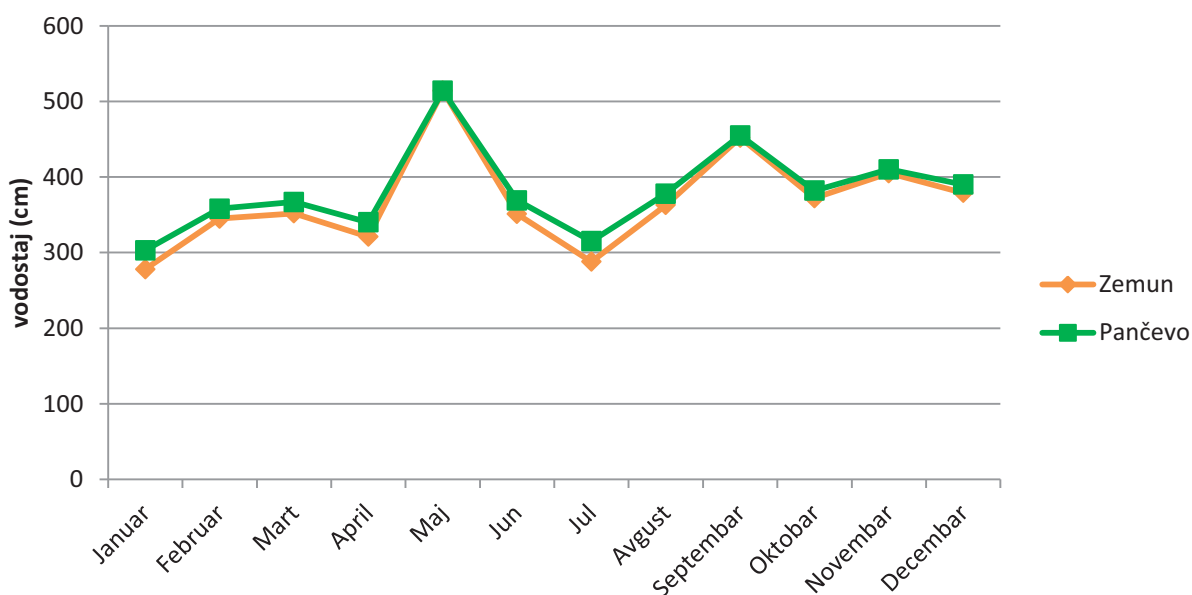


4.13. Lokalitet Višnjica

#### 4.2.1. Hidrološki uslovi i fizičko-hemijski kvalitet vode

Neposredno na lokalitetu Višnjica ne vrše se merenja vodostaja, te su se vrednosti vodostaja jedne uzvodne (Zemun) i jedne nizvodne (Pančevo) merne tačke RHMZ koristile da se prikažu hidrološki uslovi koji su vladali u ovom delu Dunava tokom 2014. godine.

Slično kao i na lokalitetu Duboko na Savi, i na lokalitetu Višnjica su izmereni viši vodostaji, odnosno i ovaj lokalitet je bio pod uticajem poplava tokom 2014. godine (slika 4.14). Iz datog grafika (Slika 4.14) može se zaključiti da je variranje vrednosti vodostaja između mernih tačaka, Zemun i Pančevo, minimalno. Najviše vrednosti srednjih godišnjih vodostaja bile su zabeležene u maju (514 cm na obe merne tačke) i septembru (452 i 455 cm), dok su najniže vrednosti bile su izmerene u januaru (278 i 303 cm) i julu (288 i 315 cm).



Slika 4.14. Vrednosti vodostaja za lokalitete Zemun i Pančevo tokom 2014; \* podaci su preuzeti iz Hidrološkog godišnjaka površinskih voda RHMZ za 2014. godinu.

Kao i na lokalitetu Duboko, i na lokalitetu Višnjica su mereni osnovni fizičko-hemijski parametri. Vrednosti izmerenih fizičko-hemijskih parametara prikazani su u tabeli 4.24. Podaci opširnih merenja hemijskih parametara (karbonata, anjona, katjona, pesticida, fenola, itd.) Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije za lokalitet Vinča dati su u tabeli 1, Prilog 2.

Tabela 4.24. Fizičko-hemijski parametri na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine

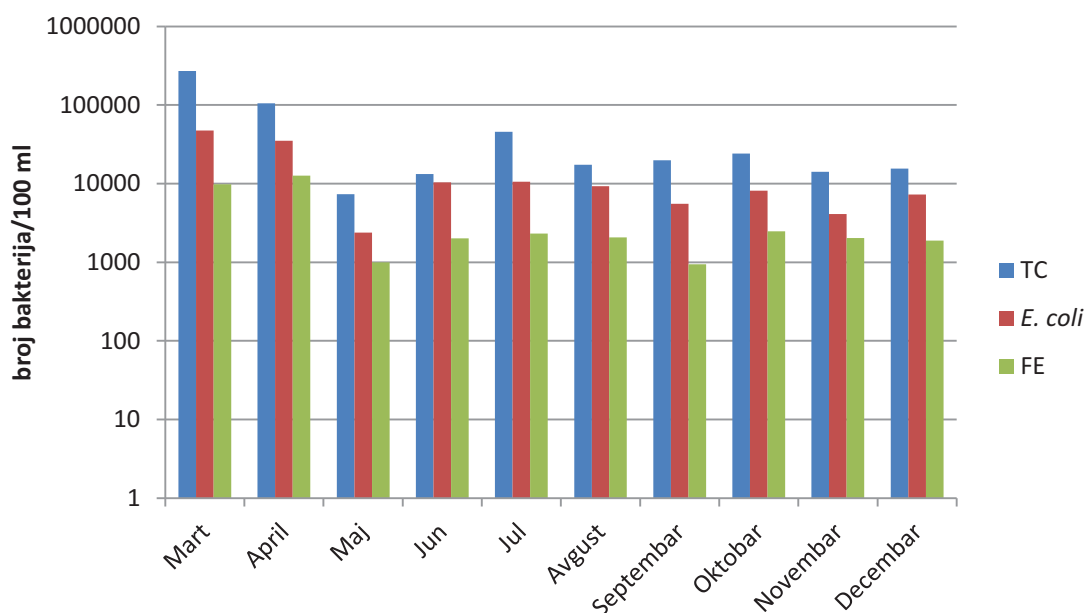
Lokalitet	Višnjica (Dunav) 2014											
	Jan.	Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avg.	Sep.	Okt.	Nov.	Dec.
<b>Meseci</b>	Jan.	Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avg.	Sep.	Okt.	Nov.	Dec.
<b>pH</b>	9,2	8,9	9,4	8,3	8,5	7,7	8,2	8	7,77	8,02	7,82	7,91
<b>t (°C)</b>	7,4	9,4	14,6	16,2	18,9	21,6	23,8	23,3	14,9	11	8,6	7,5
<b>cond (µS)</b>	413	350	412	337	360	/	360	407	410	391	382	3
<b>O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	10,57	8,29	12,15	13,39	8,24	5,75	/	5,03	5,26	6,9	6,53	7,18
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	86,8	67,5	117,7	/	89,4	65,7	/	54,4	52	68,1	55,4	62,6
<b>NO<sub>2</sub> (mg/L)</b>	0,052	0,055	0,05	0,062	1,28	0,082	0,065	0,06	0,13	0,07	0,02	0,04
<b>NO<sub>3</sub>(mg/L)</b>	6,42	7,74	5,16	1,05	0,078	1,17	1,36	5,1	2,5	3,5	2	3,6
<b>NH<sub>4</sub> (mg/L)</b>	1,732	2,331	1,826	2,164	0,666	1,241	1,228	0,12	0,5	0,05	0,17	0,08
<b>PO<sub>4</sub> (mg/L)</b>	0,24	<0,20	0,24	0,2	0,19	0,27	0,24	6,1	3,4	5,5	9	1,3

U odnosu na preporučene vrednosti od strane Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (ICPDR, 2002) mogu se uočiti povišene vrednosti za rastvoreni cink (µg/L) (februar 12,70; april 5; avgust 18,30; decembar 15,9), za rastvoreni bakar (µg/L) (april 5; maj 2,20; avgust 4,8; decembar 3,5), za hrom (februar 0,9 µg/L; avgust 4,10 µg/L). Vrednosti za rastvoreni kadmijum bile su na granici maksimalno preporučenih vrednosti za ovaj element. Rastvoreni nikel (µg/L) je čak sedam puta (mart 1,5; april 1,; maj 2,9; jun 0,9; jul 1,6; avgust 1,8; decembar 1,3) bio detektovan u koncentracijama koje su veće od preporučenih vrednosti. Vrednosti za ovaj element su se kretale od granice maksimalnih preporučenih do tri puta većih vrednosti u maju 2014. godine (Prilog 2, Tabela 1).

#### 4.2.2. Mikrobiološki kvalitet vode

Mikrobiološki kvalitet vode na lokalitetu Višnjica praćen je preko broja ukupnih koliforma, *E. coli* i fekalnih enterokoka.

Na slici 4.15. prikazani su rezultati mikrobiološkog ispitivanja kvaliteta vode na ovom lokalitetu. Može se uočiti da je u martu i aprilu detektovan najniži kvalitet vode (klasa IV) u odnosu na sve tri grupe indikatora fekalnog zagađenja. Klasa IV je zabeležena u junu i julu za *E. coli*. Jedino je broj ukupnih koliforma u maju uvrstio ovaj lokalitet u II klasu. Za sve ostale mesece u odnosu na mikrobiološke indikatore dobijene su vrednosti koje odgovaraju klasi III.



Slika 4.15. Broj ukupnih koliforma (TC), *E. coli* i fekalnih enterokoka (FE) na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine

Tokom 2014. godine mikrobiološki kvalitet vode na lokalitetu Višnjica kretao se u okviru III i IV klase (Slika 4.15).

#### 4.2.2.1. Korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima

Odnos mikrobioloških i fizičko-hemijskih i hemijskih parametara, kao i odnos vodostaja sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode za 2014. godinu na lokalitetu Višnjica dobijeni su pomoću Pirsonove ili Spirmanove korelacije u zavisnosti da li su parametri imali ili nisu imali normalnu raspodelu.

U tabeli 4.25. prikazane su statistički značajno pozitivne i negativne korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima za lokalitet Višnjica. Dobijene su pozitivne Pirsonove korelacije TC sa FE i cinkom, dok su negativne korelacije dobijene sa amonijumom, sulfatima, kalijumom i arsenom. Pošto nitrati nisu imali normalnu raspodelu, u njihovom slučaju dobijena je negativna značajna Spirmanova korelacija sa TC. Kao i za nitrate, u slučaju *E. coli* nije dobijena normalna raspodela te se radila Spirmanova korelacija. U ovom slučaju dobijena je pozitivna korelacija sa gvožđem, a negativna sa UV-ekstinkcijom (254 nm). Za FE dobijena je jedino negativna Pirsonova korelacija sa parametrom kalijumom ( $K^+$ ).

Tabela 4.25. Korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima;  $p < 0,05$ ;

	<b>TC</b>
<b>FE</b>	0,6366*
<b>Amonijum (<math>NH_4-N</math>)</b>	-0,6238*
<b>Sulfati (<math>SO_4^-</math>)</b>	-0,6077*
<b>Nitriti (<math>NO_2-N</math>)</b>	-0,72488**
<b>Kalijum (<math>K^+</math>)</b>	-0,9015*
<b>Cink (Zn)</b>	0,7695*
<b>Arsen (As)</b>	-0,8604*
<b>Arsen (As)-rastvoreni</b>	-0,9333*
	<b><i>E. coli</i></b>
<b>Gvožđe (Fe)</b>	0,681818**
<b>UV-ekstinkcija (254nm)</b>	-0,62415**
	<b>FE</b>
<b>Kalijum (<math>K^+</math>)</b>	-0,8563*

\* Pirsonova korelacija;

\*\* Spirmanova korelacija

Značajne korelacije nivoa vode sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima prikazane su u tabeli 4.26. Parametrijskim Pirsonovim testom dobijene su pozitivne korelacije vrednosti vodostaja i sledećih parametara: ukupni fosfor i hrom, gvožđe, mangan, olovo, nikl, kobalt, rastvoreni nikl, UV – ekstinkcija, atrazin, desetilterbutilazin, terbutilazin, acetohlor i metolahlor. Negativna korelacija je dobijena sa nitratima i zasićenosti vode kiseonikom.

Tabela 4.26. Korelacije vodostaja sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima;  $p < 0,05$ ;

	<b>Vodostaj</b>
<b>Nitrati (NO<sub>3</sub>-N)</b>	-0,6492
<b>Kiseonik (O<sub>2</sub> %)</b>	-0,7389
<b>Ukupni fosfor (P)</b>	0,7458
<b>Gvožđe (Fe)</b>	0,9387
<b>Mangan (Mn)</b>	0,8796
<b>Hrom ukupni</b>	0,8710
<b>Olovo (Pb)</b>	0,8215
<b>Nikl (Ni)</b>	0,9042
<b>Kobalt (Co)</b>	0,8792
<b>Nikl (Ni) rastvoreni</b>	0,7642
<b>UV – ekstinkcija (254 nm)</b>	0,7410
<b>Atrazin</b>	0,9548
<b>Desetilterbutilazin</b>	0,9867
<b>Terbutilazin</b>	0,9792
<b>Acetohlor</b>	0,9771
<b>Metolahlor</b>	0,9783



### 4.2.3. Sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta

Tokom istraživanja na lokalitetu Višnjica praćen je sastav akvatičnih Oligochaeta. Utvrđeno je prisustvo 20 taksona akvatičnih Oligochaeta (Tabela 4.27.) koje se mogu svrstati, prema Timm (2009) i Brinkhurst i Gelder (2001), u tri familije Naididae, Tubificidae i Enchytraeidae.

Tabela 4.27. Lista zabeleženih taksona i odgovarajućih viših taksonomskih nivoa akvatičnih oligoheta na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine.

#### **Classis Clitellata**

##### **Subclassis Oligochaeta**

##### **Ordo Tubificida**

##### **Fam. Naididae**

*Nais barbata* Muller 1774

*Nais bretscheri* Michaelsen 1899

*Nais elinguis* Muller 1774

*Nais sp.*

*Ophidonais serpentina* (Muller 1774)

*Paranais frici* Hrabe 1941

*Stylaria lacustris* (Linnaeus 1767)

*Uncinaiis uncinata* (Orsted 1842)

*Vejdovskyella comata* (Vejdovsky 1884)

##### **Fam. Tubificidae**

##### **Subfamilia Rhyacodrilinae**

*Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892

**Subfamilia Tubificinae**

Tubificidae Gen. sp.

*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862

*Limnodrilus claparedeanus* Ratzel 1868

*Limnodrilus udekemianus* Claparede, 1862

*Limnodrilus* sp.

*Potamothrix vej dovskyi* (Hrabe, 1941)

*Potamothrix hammoniensis* (Michaelsen, 1901)

*Psammoryctides barbatus* (Grube, 1861)

*Tubifex tubifex* Muller 1774

**Fam. Enchytraeidae**

Raznovrsnost oligohetne faune na lokalitetu Višnjica je veća u odnosu na onu koja je zabeležena na lokalitetu Duboko iste godine. U Višnjici je bilo zabeleženo prisustvo 17 vrsta koje se mogu svrstati u 11 rodova (Tabela 4.28.). Treba napomenuti da je za predstavnike familije Enchytraidae rađena indentifikacija samo do nivoa familije.

Tabela 4.28. Raznovrsnost oligohetne faune na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine

*Nais barbata* Muller 1774

*Nais bretscheri* Michaelsen 1899

*Nais elinguis* Muller 1774

*Potamothrix vej dovskyi* (Hrabe, 1941)

*Potamothrix hammoniensis* (Michaelsen, 1901)

*Psammoryctides barbatus* (Grube, 1861)

*Tubifex tubifex* Muller 1774

*Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede, 1862

*Limnodrilus claparedeanus* Ratzel 1868

*Limnodrilus udekemianus* Claparede, 1862

*Ophidonais serpentina* (Muller 1774)

*Paranais frici* Hrabec 1941

*Stylaria lacustris* (Linnaeus 1767)

*Uncinaiis uncinata* (Orsted 1842)

*Vejdovskyella comata* (Vejdovsky 1884)

Vrste *L. claparedeanus* i *L. hoffmeisteri* bile su prisutne u svim uzorcima i sa najvećom abundancom. Vrste *L. udekemianus*, *T. tubifex* i *B. sowerbyi* su nađene skoro u svim uzorcima, ali sa znatno manjom gustinom populacije. Prisustvo nekoliko jedinki vrsta *Nais barbata*, *N. bretscheri*, *Stylaria lacustris*, *Uncinaiis uncinata* bilo je zabeleženo u najviše dva uzorka. Samo u maju je uzorkovana jedna jedinka iz familije Enchytraeidae (Tabela 4.29.)

Tabela 4.29. Broj i procentualna zastupljenost vrsta akvatičnih Oligochaeta na lokalitetu Višnjica 2014. godine

Višnjica 2014. godina	Feb.		Mart		April		Maj		Jun		Jul		Avg.		Sept.		Okt.		Nov.		Dec.	
	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
Oligochaeta	192		417		476		84		327		432		68		199		339		605		529	
<b>Naididae</b>																						
<i>Nais barbata</i> (Müller, 1773)	/	/	1	0,3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Nais bretscheri</i> Michaelsen, 1899	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5	1,6	/	/	/	/
<i>Nais elinguis</i> Müller 1773	3	1,8	11	3,2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Nais</i> sp.	2	1,2	/	/	/	/	2	2,8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Ophiodonais</i> <i>serpentina</i> (Müller, 1773)	3	1,8	2	0,6	/	/	4	5,6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6	1,0	/	/
<i>Paranais frici</i> (Hrabe, 1941)	/	/	25	7,4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	101	24,5
<i>Stylaria</i> <i>lacustris</i> (Linnaeus, 1767)	/	/	/	/	/	/	3	4,2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Uncinaiis</i> <i>uncinata</i> (Ørsted, 1842)	1	0,6	1	0,3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Vejdovskiyella</i> <i>comata</i> (Vejdovsky, 1883)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21	5,1
<b>Tubificidae</b>																						
<i>Branchiyura</i> <i>sowerbyi</i> Beddard, 1892	4	2,4	4	1,2	2	0,4	/	/	1	0,3	7	1,6	1	1,5	5	2,9	/	/	18	3,0	/	/

Višnjica 2014. godina	Feb.		Mart		April		Maj		Jun		Jul		Avg.		Sept.		Okt.		Nov.		Dec.	
	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
<i>Limnodrilus claparedeanus</i> Ratzel, 1868	29	17,7	102	30	155	33,6	11	15,5	134	41,1	201	46,9	5	7,4	34	19,4	24	7,9	157	26,5	37	9
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparede, 1862	97	59,2	142	41,7	174	37,7	35	49,3	142	43,6	179	41,7	55	80,9	104	59,4	213	69,8	339	57,3	185	44,8
<i>Limnodrilus udekemianus</i> Claparede, 1862	6	3,7	8	2,3	11	2,4	/	/	2	0,6	4	0,9	/	/	13	7,4	5	1,6	6	1,0	11	2,7
<i>Potamothrix hammoniensis</i> (Michaelsen, 1901)	/	/	2	0,6	/	/	/	/	1	0,3	/	/	/	/	8	4,6	29	9,5	6	1,0	37	9
<i>Potamothrix vej dovskiy</i> (Hrabe, 1941)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	1,7	5	1,6	6	1,0	5	1,2
<i>Psammoreycitides barbatus</i> (Grube, 1861)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6	1,0	/	/
<i>Tubifex tubifex</i> (Müller, 1774)	13	7,9	22	6,8	93	20,1	15	21,1	34	10,4	27	6,3	7	10,3	8	4,6	24	7,9	48	8,1	16	3,9
<i>Limnodrilus</i> sp.	6	3,7	20	5,9	27	5,8	/	/	12	3,7	11	2,6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Enchytraeidae</b>	/	/	/	/	/	/	1	1,4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Lista taksona zabeleženih grupa akvatičnih makroinvertebrata na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine prikazana je u tabeli 4.30. Od zabeleženih grupa najzastupljenija je bila familija Chironomidae, pa grupa Nematoda. Mesec sa najvećim diverzitetom različitih grupa makroinvertebrata bio je oktobar kada je, pored familije Chironomidae, bila zastupljena i klasa Gastropoda sa vrstama *T. fluviatilis*, *L. naticoides*, *P. acuta* i *B. naticina*. Takođe, u oktobru su bile prisutne vrste *D. villosus*, *C. curvispinum*, jedna jedinka *J. istri* i jedan juvenilni predstavnik familije Pontogammaridae.

Tabela 4.30. Lista taksona zabeleženih grupa akvatičnih makroinvertebrata na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine.

### **Phylum Nematoda**

### **Phylum Mollusca**

#### **Classis Bivalvia**

##### **Fam. Corbiculidae**

*Corbicula fluminea* (O. F. Muller 1774)

##### **Fam. Dreissenidae**

*Dreissena polymorpha* (Pallas 1771)

*Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897)

#### **Classis Gastropoda**

##### **Fam. Neritidae**

*Theodoxus fluviatilis* (Linnaeus 1758)

##### **Fam. Hydrobiidae**

*Lithoglyphus naticoides* (C. Pfeiffer 1828)

##### **Fam. Physidae**

*Physella acuta* (Draparnaud, 1805)

**Fam. Valvatidae**

*Boryshenia naticina* (Menke 1845)

**Phylum Arthropoda**

**Subphylum Crustacea**

**Classis Malacostraca**

**Subordo Gammaridea**

**Fam. Gammaridae**

*Dikerogammarus villosus* (Sowinsky 1894)

**Fam. Corophiidae**

*Corophium curvispinum* Sars 1895

**Fam. Pontogammaridae (juv.)**

**Ordo Isopoda**

**Suborder Asellota**

*Jaera istri* Veuille 1979

**Classis Maxillopoda**

**Subclass Copepoda**

**Subphylum Hexapoda**

**Classis Insecta**

**Ordo Diptera**

**Fam. Chironomidae**

**Fam. Ceratopogonidae**

**Phylum Annelida**

**Class Hirudinea**

*Glossiphonia sp.*

**Phylum Plathelminthes**

**Ordo Tricladida**

*Planaria sp.*



#### **4.2.3.1. Ocena ekološkog potencijala lokaliteta Višnjica na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta**

Na osnovu sastava zajednice akvatičnih oligoheta vršena je ocena ekološkog potencijala ovog lokaliteta, a rezultati su prikazani u tabeli 4.31.

U ukupnim uzorcima, oligohete su bile najzastupljenija grupa makroinvertebrata u svim mesecima osim u maju (33,92 %). Zastupljenost u februaru, martu, aprilu, junu i julu bila je 100 %, u avgustu 99,03 %, septembru 92,92 %, novembru 97,80 % i u decembru 98,73 %. Najzastupljenija familija u okviru oligoheta na lokalitetu Višnjica bila je familija Tubificidae (april, jun, jul, avgust i septembar – 100 %; februar – 94,51 %; mart – 88,24 %; maj – 85,92 %; oktobar – 98,36 %; novembar – 98,99 %; decembar – 70,46 %). Bilo je zabeleženo i prisustvo predstavnika iz familije Naididae (februar – 5,49 %; mart – 11,76 %; maj – 12,68 %; oktobar – 1,64 %; novembar – 1,01 %; decembar – 29,54 %) i Enchytraidae (maj – 1,41 %) (Tabela 4.29.). I ovaj lokalitet se karakteriše veoma lošom ocenom ekološkog potencijala (IV-V klasa kvaliteta vode) u odnosu na % učešće Oligochaeta – Tubificidae u uzorcima.

Od ostalih grupa akvatičnih makroinvertebrata Diptere su bile u maju dominantne (zastupljenost 64,64 %), dok su ostalim mesecima bile zastupljene u manjem broju (septembar – 1,77 %; oktobar – 0,53 %; novembar – 1,27 %; decembar – 0,16 %). Predstavnici iz grupe Crustacea bili su prisutni u pet uzoraka – maj 0,64 %; septembar 3,19 %; oktobar 0,64 %; novembar 0,33 %; decembar 0,32 %. Druge grupe makroinvertebrata čije je prisustvo bilo zabeleženo u jednom do četiri uzorka su grupa Turbellaria (maj – 0,16 %; decembar – 0,16 %), Nematoda (maj – 0,64 %; oktobar – 0,85 %; novembar – 0,39 %; decembar – 0,64 %), Gastropoda (septembar – 1,77 %; oktobar – 0,42 %; novembar – 0,11 %), Bivalvia (septembar – 0,35 %; oktobar – 0,64 %; novembar – 0,11 %) i Hirudinea (avgust – 0,97 %).

Tabela 4.31. Biološki parametri ocene ekološkog potencijala - Višnjica 2014. godina

ZNAČAJNO IZMENJENA VODNA TELA											
Akumulacije formirane na vodnim telima TIPA 1											
	feb.	mart	apr.	maj	jun	jul	avg.	sep.	okt.	nov.	dec.
<b>saprobni indeks (metoda Zelinka i Marvan)</b>	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V
<b>BMWP skor</b>	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V	IV-V
<b>Indeks diverziteta (metoda Shannon - Weaver)</b>	II-III	II-III	II-III	II-III	III-IV	III-IV	III-IV	II-III	III-IV	II-III	II-III
<b>Ukupan broj taksona</b>	II-III	II-III	III-IV	II-III	III-IV	III-IV	III-IV	III-IV	II-III	II-III	II-III

#### 4.2.4. Ekogenotoksikološka istraživanja

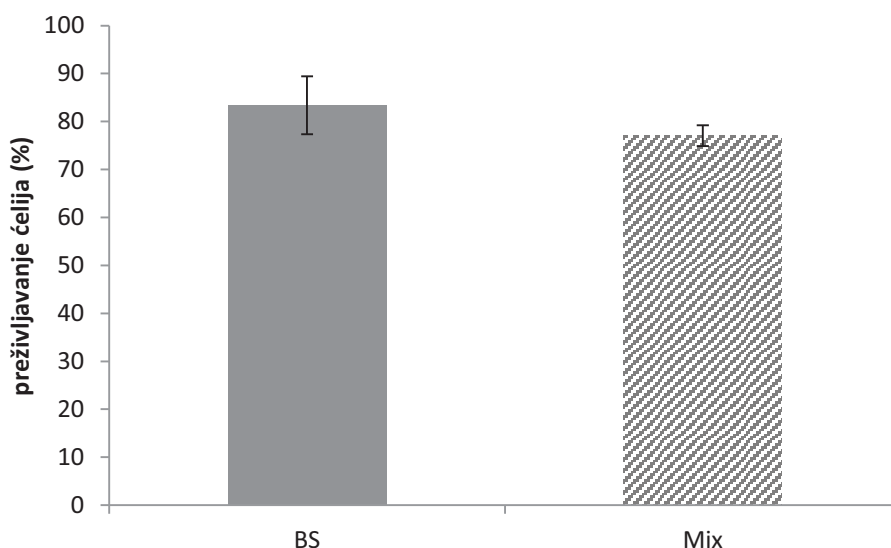
Na lokalitetu Višnjica ekogenotoksikološka istraživanja su rađena samo tokom 2014. godine na uzorcima vrste *B. sowerbyi* i na mešovitim uzorcima tubificida (Mix uzorak). Kao i u slučaju istraživanja na lokalitetu Duboko, i na ovom lokalitetu bazalna vrednost oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* koja je korišćena kao kontrola određena je kod jedinki koje su gajene u laboratorijskim kontrolisanim uslovima.

Broj jedinki vrste *B. sowerbyi* u uzorcima Oligochaeta varirao je tokom godine zbog čega je različit broj individua ove vrste bio korišćen za ekogenotoksikološka istraživanja. U maju, septembru i oktobru jedinke vrste *B. sowerbyi* nisu nađene u uzoraku. Najveći broj individua *B. sowerbyi* korišćenih u komet testu bio je 15, u martu, aprilu i junu a najmanje 3 jedinke u avgustu. U februaru je korišćeno 12, u julu 11, u novembru 8 a u decembru 7 jedinki (Tabela 1, Prilog 3).

Sa izuzetkom avgusta, kada je Mix uzorak bio sačinjen od 50 slučajno izabranih individua, u ostalim mesecima je po 100 jedinki bilo-u Mix uzorcima (Tabela 2, Prilog 3).

#### 4.2.4.1. Vijabilnosti celomocita i hemocita

Vijabilnost ćelija je određena diferencijalnim bojenjem (AO/EB). Na lokalitetu Višnjica, prosečno preživljavanje ćelija *B. sowerbyi* bilo je 83,37 %, dok je za Mix uzorak bilo 77,04 % (Slika 4.16.), što su slične vrednosti preživljavanju ćelija na lokalitetu Duboko iste, 2014., godine.



Slika 4.16. Grafički prikaz preživljavanja celomocita i hemocita (srednja vrednost  $\pm$  SE) kod vrste *B. sowerbyi* i kod Mix uzorka na lokalitetu Višnjica tokom 2014. godine

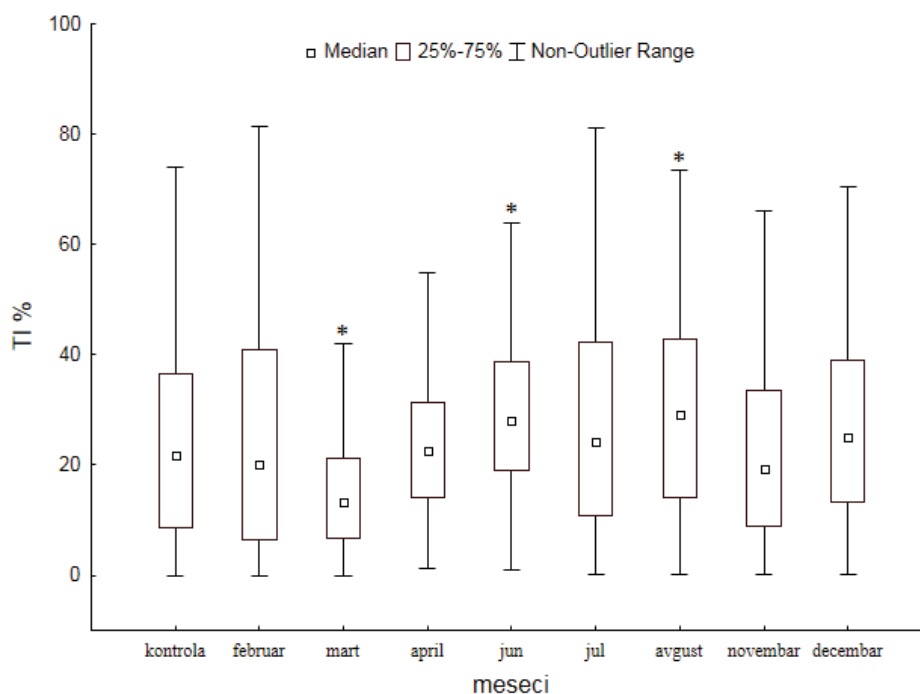
Visoko preživljavanje ćelija (>90 %) kod vrste *B. sowerbyi* je zabeleženo u junu (98 %), avgustu (98 %), aprilu (93 %) i u martu (90 %). U julu i novembru bila je zabeležena vijabilnost od 87 %, dok su niže vrednosti bile zabeležene u decembru (62 %) i u februaru (52 %) (Tabela 1, Prilog 3).

Vijabilnost ćelija kod Mix uzorka jedino je u oktobru imala vrednosti oko 90 % (90,5 %). Vijabilnost ćelija od oko 80 % je zabeležena u julu, aprilu i septembru (84, 83 i 80 %), iznad 70 % u maju, martu, novembru i februaru (78,5, 77, 75 i 73,8 %), dok je u junu, avgustu i decembru preživljavanje bilo veće od 60 % (69,7, 69 i 67 %) (Tabela 2, Prilog 3).

#### 4.2.4.2. Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste *B. sowerby* i Mix uzorka

Na lokalitetu Višnjica oštećenje DNK molekula kod vrste *B. sowerby* bilo je praćeno tokom osam meseci (februar, mart, april, jun, jul, avgust, novembar i decembar), a u Mix uzorcima tokom deset meseci (februar, mart, april, maj, jun, jul, avgust, septembar, oktobar i novembar).

U odnosu na bazalni nivo oštećenja ( $TI \pm SE = 24,6 \pm 1,3$ ), statistički značajno veće oštećenje DNK molekula vrste *B. sowerby* zabeleženo je u junu i avgustu, dok je u martu oštećenja bilo značajno manje ( $TI \pm SE = 16,36 \pm 0,89$ ) (Slika 4.17.).



Slika 4.17. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama vrste *B. sowerby* sa lokaliteta Višnjica 2014. godina; \* - statistička značajnost u odnosu na kontrolu (dobijena Man Vitni U testom sa Bonferoni korekcijom);  $p < 0,05$ ;

Za međusobno upoređivanje oštećenja DNK molekula kod jedinki *B. sowerby* tokom analiziranih meseci korišćen je neparametrijski Kruškal-Valis test sa Danovom korekcijom. Statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerby* sa

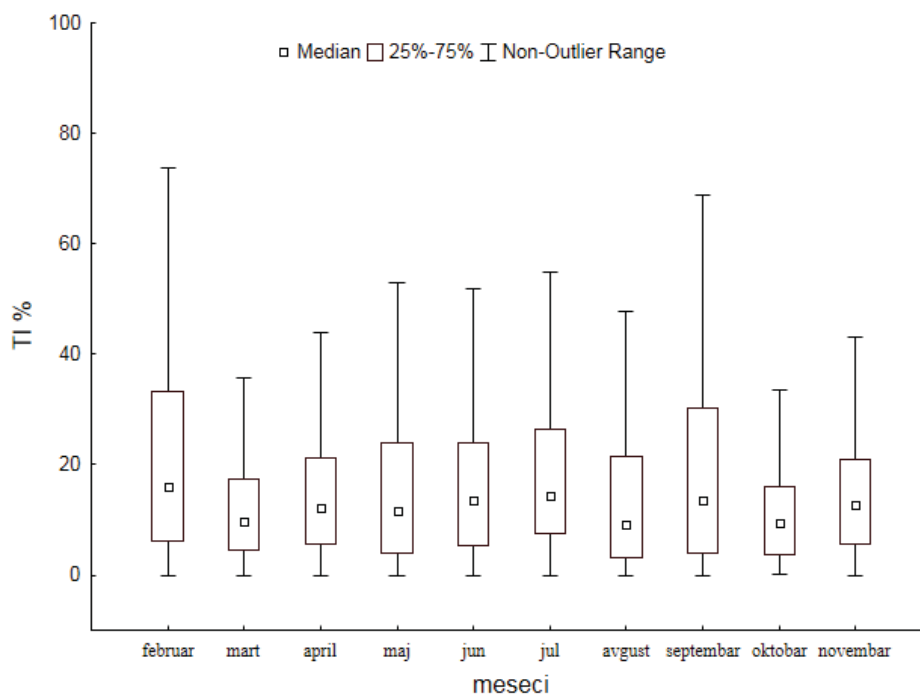
lokaliteta Višnjica tokom 2014. godine prikazana je na tabeli 4.32. U odnosu na nivo oštećenja DNK molekula koje je bilo zabeleženo u martu, ostali meseci (februar, april, jun, jul, avgust, novembar i decembar) imali su statistički značajno veće vrednosti oštećenja DNK molekula. U odnosu na februar statistički značajno veće oštećenje DNK molekula je zabeleženo u junu i avgustu, dok su jun i avgust imali statistički značajno veće vrednosti u odnosu na novembar.

Tabela 4.32. Statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* sa lokaliteta Višnjica tokom 2014. godine;  $p < 0,05$

	februar	mart	april	jun	jul	avgust	novembar	decembar
februar		√	-	√	-	√	-	-
mart	√		√	√	√	√	√	√
april	-	√		-	-	-	-	-
jun	√	√	-		-	-	√	-
jul	-	√	-	-		-	-	-
avgust	√	√	-	-	-		√	-
novembar	-	√	-	√	-	√		-
decembar	-	√	-	-	-	-	-	

- nema statističke značajnosti; √ ima statističke značajnosti.

Grafički prikaz nivoa oštećenja DNK molekula kod slučajno izabranih jedinki iz oligohetne zajednice (Mix) prikazana je na slici 4.18. Najveće vrednosti oštećenja DNK molekula kod Mix uzorka je zabeleženo u februaru ( $TI \pm SE = 21,9 \pm 0,98$ ), zatim u julu ( $TI \pm SE = 19,0 \pm 0,8$ ) i septembru ( $TI \pm SE = 19,5 \pm 0,9$ ). Najniži nivo oštećenja DNK molekula bio je detektovan u oktobru ( $TI \pm SE = 11,3 \pm 0,5$ ) i u martu ( $TI \pm SE = 13,2 \pm 0,6$ ).



Slika 4.18. Nivo oštećenja DNK molekula u jedinkama Mix uzorka sa lokaliteta Višnjica 2014. godina;

U tabeli 4.33. prikazana je statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod Mix uzorka sa lokaliteta Višnjica tokom 2014. godine dobijena neparametrijskim Kruškal-Valis testom sa Danovom korekcijom p-vrednosti. U februaru je dobijen statistički značajan viši nivo oštećenja DNK molekula u odnosu na mart, april, maj, avgust, oktobar i novembar. Mart se karakterisao statistički značajno nižim vrednostima u odnosu na februar, jun, jul i septembar, dok su u aprilu statistički značajno veće vrednosti bile zabeležene u odnosu na oktobar, a statistički značajno niže vrednosti u odnosu na februar i jul. U odnosu na maj statističko značajno veće oštećenje DNK molekula bilo je dobijeno za februar i jul. Pored statistički značajno većih vrednosti za jun i za septembar u odnosu na mart dobijene su slične vrednosti i u odnosu na oktobar. U julu su zabeležene veće vrednosti koje su statistički značajne u odnosu na one koje su dobijene u martu, aprilu, maju, avgustu i oktobru. Pomenuto je da su najniže zabeležene vrednosti oštećenja DNK molekula zabeležene u oktobru, te je ovaj mesec ima statistički značajno manje vrednosti ovog parametra u odnosu na iste parametre u februaru, aprilu, junu, julu, septembru i novembru.

Tabela 4.33. Statistička značajnost nivoa oštećenja DNK molekula kod Mix uzorka sa lokaliteta Višnjica tokom 2014. godine;  $p < 0,05$

	feb.	mart	april	maj	jun	jul	avg.	sep.	okt.	nov.
februar		√	√	√	-	-	√	-	√	√
mart	√		-	-	√	√	-	√	-	-
april	√	-		-	-	√	-	-	√	-
maj	√	-	-		-	√	-	-	-	-
jun	-	√	-	-		-	-	-	√	-
jul	-	√	√	√	-		√	-	√	-
avgust	√	-	-	-	-	√		-	-	-
septembar	-	√	-	-	-	-	-		√	-
oktobar	√	-	√	-	√	√	-	√		√
novembar	√	-	-	-	-	-	-	-	√	

- nema statističke značajnosti; √ ima statističke značajnosti.

#### 4.2.4.3. Korelacije nivoa oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametarima kvaliteta vode

Kao i na lokalitetu Duboko, i na lokalitetu Višnjica analiziran je odnos oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* i Mix uzoraka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode.

U Tabeli 4.34. prikazane su statističke značajne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima koje su dobijene neparametrijskim Spirmanovim testom. Dobijena je pozitivna korelacija sa amonijumom i kalijumom, dok je negativna korelacija dobijena sa brojem *E. coli*.

Tabela 4.34. Statistički značajne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametarima kvaliteta vode tokom 2014. godine na lokalitetu Višnjica;  $p < 0,05$ .

	<b>BS</b>
<i>E. coli</i>	-0,7364
$\text{NH}_4^+$	0,7084
$\text{K}^+$	0,8546

U tabeli 4.35. iznete su vrednosti značajnih korelacija oštećenja DNK molekula iz Mix uzorka sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametarima. U ovom slučaju dobijena je pozitivna korelacija samo sa dva parametra, rastvorenim gvožđem i aluminijumom.

Tabela 4.35. Statistički značajne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula Mix uzorka sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametarima tokom 2014. godine na lokalitetu Višnjica;  $p < 0,05$ .

	<b>Mix</b>
<b>Fe - rastvoreno</b>	0,837
<b>Al - rastvoreno</b>	0,9244

### **4.3. Korelacije sastava zajednice akvatičnih Oligochaeta i nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* i kod Mix uzorka**

Pošto su se u Mix uzorcima nalazile slučajno izabrane jedinice različitih vrsta, čiji udeo nije bio stalan, bilo je bitno utvrditi kako vrste i njihova brojnost utiču na nivo oštećenja DNK molekula. Moglo se pretpostaviti da rezultati oštećenja DNK u Mix uzorcima zavise od njihovog sastava.

Kao parametar za korelaciju oštećenja DNK molekula Mix uzorka uveden je relativni diverzitet koji je jednak broju vrsta koje se uzimaju u obzir za korelacije.



#### 4.3.1. Korelacije rezultata komet testa i sastava zajednice *Oligochaeta* na lokalitetu Duboko

Lokalitet Duboko se tokom 2014. godine nije karakterisao velikom raznovršnošću vrsta (Tabela 4.9.). Dominantne su bile vrste iz roda *Limnodrilus*, *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanu*, dok je *L. udekemianus* bio prisutan u malom broju u maju, avgustu i oktobru. Stalno su bile prisutne vrste *B. sowerbyi*. i *T. tubifex*, ali ne u velikom broju (1 – 26 jedinki). Ispitivane su korelacije nivoa oštećenja DNK molekula i sastava zajednica, odnosno navedenih vrsta. Ostale vrste koje su uzorkovane (*L. michaelsoni* – maj: jedna jedinka/0,42 %; *P. vejsovskyi* – avgust: jedna jedinka/0,42 %; *P. barbatus* – jedna jedinka/0,42 %; fam. Lumbriculidae: *S. heringianus* – oktobar: dve jedinke/0,79 %) nisu uzete u obzir za korelacije jer su detektovane samo tokom jednog meseca u manje od 1 % uzoraka te njihovo prisustvo nije moglo značajnije uticati na nivo oštećenja DNK.

Kolmogorov-Smirnov testom pokazano je da odabrani parametri: TI BS, Ti Mix, relativni diverzitet, broj *L. hoffmeisteri*, broj *L. claparedeanus*, broj *L. udekemianus*, broj *B. sowerbyi*, broj *T. tubifex*, % *L. hoffmeisteri*, % *L. claparedeanus*, % *L. udekemianus*, % *B. sowerbyi* i % *T. Tubifex*, imaju normalnu raspodelu, te se za korelaciju koristio Pirsonov test.

Pirsonovim testom dobijena je signifikantna pozitivna korelacija samo između parametra TI BS i TI Mix ( $r=0,8189$ ;  $p=0,046$ ) (Tabela 4.36.). Veći nivo negativne korelacije dobijen je između parametra TI BS i broja *L. hoffmeisteri* ( $r=-0,47$ ;  $p=0,346$ ), kao i između TI BS i broja *B. sowerbyi* ( $r=-0,39$ ;  $p=0,445$ ).

Tabela 4.36. Korelacija TI kod vrste *B. sowerbyi*, TI kod Mix uzorka sa brojem i procentualnom zastupljenošću tubificidnih vrsta u uzorcima iz 2014. godine; crvenom bojom označeni su uzorci kod kojih postoji statistički značajna korelacija.

N=6	TI BS		TI Mix	
<b>TI BS</b>	r=1,0000	p= ---	<b>r=0,8189</b>	<b>p=0,046</b>
<b>TI Mix</b>	<b>r=0,8189</b>	<b>p=.046</b>	1,0000	p= ---
<b>broj vrsta</b>	r=-0,3771	p=0,461	r=-0,1382	p=0,794
<b>% <i>L. hoffmeisteri</i></b>	r=0,1477	p=0,780	r=-0,0860	p=0,871
<b>% <i>L. claparedeanus</i></b>	r=-0,0547	p=0,918	r=0,0757	p=0,887
<b>% <i>B. sowerbyi</i></b>	r=-0,1436	p=0,786	r=-0,2359	p=0,653
<b>% <i>T. tubifex</i></b>	r=-0,2132	p=0,685	r=0,1077	p=0,839
<b>Broj <i>L. hoffmeisteri</i></b>	r=-0,4709	p=0,346	r=-0,3959	p=0,437
<b>Broj <i>L. claparedeanus</i></b>	r=-0,2006	p=0,703	r=-0,0550	p=0,918
<b>Broj <i>B. sowerbyi</i></b>	r=-0,3896	p=0,445	r=-0,3533	p=0,492
<b>Broj <i>T. tubifex</i></b>	r=-0,2685	p=0,607	r=0,0588	p=0,912
N=3	TI BS		TI Mix	
<b>% <i>L. udekemianus</i></b>	r=-0,0303	p=0,955	r=0,3117	p=0,548
<b>Broj <i>L. udekemianus</i></b>	r=-0,0389	p=0,942	r=0,3030	p=0,559

Na lokalitetu Duboko je zabeležen nešto veći diverzitet u 2015. godini u odnosu na prethodnu godinu (Tabela 4.12.). Najdominantnije su bile vrste *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus*, dok je *L. udekemianus* zabeležen u julu (2,99 %) i decembru (2,73 %). Vrsta *B. sowerbyi* je uzorkovana tokom osam meseci. Vrsta *T. tubifex* bila je prisutna u aprilu, maju, junu i decembaru. Za razliku od 2014. godine kada prisustvo vrste *P. hammoniensis* nije zabeleženo, u 2015. godini ova vrsta je uzorkovana u–martu – 1 jedinka/1,2 %; septembaru – 1 jedinka/1,16 %; novembaru – 1 jedinka/1,67 %; decembaru – 3 jedinke/2,73 %. Vrste *P. vej dovskyi*, *P. moldaviensis*, *P. albicola*, *L. variegatus*, *S. heringianus* su uzorkovane samo jednom tokom deset meseci istraživanja sa po jednom do maksimalno tri jedinke u uzorcima. Za 2015. godinu za relativni diverzitet uzete su vrste *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *B. sowerbyi*, *T. tubifex* i *P. hammoniensis*.

Parametri: TI BS, TI Mix, relativni diverzitet, broj *L. hoffmeisteri*, broj *L. claparedeanus*, broj *L. udekemianus*, broj *B. sowerbyi*, broj *P. hammoniensis*, broj *T. tubifex*, % *L. hoffmeisteri*, % *L. claparedeanus*, % *L. udekemianus*, % *B. sowerbyi*, % *T. tubifex* i % *P. hammoniensis*, imaju normalnu raspodelu pa je za dobijanje korelacija korišćen Pirsonov test.

Tokom 2015. godine zabeležena je pozitivna korelacija između parametra TI BS i TI Mix ( $r=0,7801$ ;  $p=0,008$ ) (Tabela 4.37.). Za parametar TI BS dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija za sa brojem ( $r=0,6870$ ;  $p=0,028$ ) i zastupljenošću ( $r=0,7695$ ;  $p=0,009$ ) jedinki *P. hammoniensis*. Parametar TI Mix je statistički značajno negativno korelisan sa brojem jedinki *L. claparedeanus* ( $r=-0,6519$ ;  $p=0,041$ ). Za ostale parametre nisu dobijene statistički signifikantne korelacije. Između parametra TI Mix i broja *L. hoffmeisteri* ( $r=-0,5746$ ;  $p=0,082$ ), i između parametra TI Mix i broja *T. tubifex* ( $r=-0,5086$ ;  $p=0,133$ ) postoji veća negativna korelacija koja nije signifikantna.

Tabela 4.37. Korelacija TI kod vrste *B. sowerbyi*, TI kod Mix uzorka sa brojem i procentualnom zastupljenošću tubificidnih vrsta u uzorcima iz 2015. godine; crvenom bojom označeni su uzorci kod kojih postoji statistički značajna korelacija.

N=10	TI BS		TI Mix	
TI (%) BS	r=1,0000	p= ---	r=0,7801	p=0,008
TI (%) Mix	r=0,7801	p=0,008	r=1,0000	p= ---
relativni diverzitet	r=0,2471	p=0,491	r=-0,1559	p=0,667
% <i>L. hoffmeisteri</i>	r=0,0902	p=0,804	r=0,2767	p=0,439
% <i>L. claparedeanus</i>	r=-0,2189	p=0,543	r=-0,3025	p=0,396
Broj <i>L. hoffmeisteri</i>	r=-0,4740	p=0,166	r=-0,5746	p=0,082
Broj <i>L. claparedeanus</i>	r=-0,3768	p=0,283	r=-0,6519	p=0,041
N=7	TI BS		TI Mix	
% <i>B. sowerbyi</i>	r=-0,0394	p=0,914	r=-0,1990	p=0,582
Broj <i>B. sowerbyi</i>	r=-0,0862	p=0,813	r=-0,3962	p=0,257
N=4	TI BS		TI Mix	
% <i>T. tubifex</i>	r=-0,1590	p=0,661	r=-0,4551	p=0,186
Broj <i>T. tubifex</i>	r=-0,2458	p=0,494	r=-0,5086	p=0,133
% <i>Potamothrix hammoniensis</i>	r=0,7695	p=0,009	r=0,3968	p=0,256
Broj <i>Potamothrix hammoniensis</i>	r=0,6870	p=0,028	r=0,3229	p=0,363

#### **4.3.2. Korelacije rezultata komet testa i sastava zajednice Oligochaeta na lokalitetu Višnjica**

Iako su na lokalitetu Višnjica zastupljene i vrste iz familije Naididae (*N. barbata*, *N. bretscheri*, *N. elinguis*, *O. serpentina*, *P. frici*, *S. lacustris*, *U. uncinata* i *V. comata*), usled malih dimenzija, one su izostavljene iz ekogenotoksikoloških ispitivanja. Zabeleženo je i prisustvo jedne jedinke familije Enchytraidae u maju (zastupljenost u uzorku 1,41 %), koja nije uzeta u obzir za korelacije usled male brojnosti i malih dimenzija tela. Dominantne su bile vrste *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus*, zatim *L. udekemianus*, *B. sowerbyi*, *T. tubifex* i *P. hammoniensis*. Vrsta *B. sowerbyi* je zabeležena u većini uzoraka (nije detektovana u maju, oktobru i decembru). Za korelacije sa nivoom oštećenja DNK molekula korišćene su brojnost individua i zastupljenost (%) vrsta: *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *L. udekemianus*, *B. sowerbyi*, *T. tubifex* i *P. hammoniensis*, te je maksimalan relativni diverzitet bio 6. Iz familije Tubificidae za korelacije nisu bile uzete vrste koje su uzorkovane retko i u malom broju, *P. vej dovskyi* (septembar tri, 1,71 %; oktobar pet, 1,64 %; novembar šest, 1,01 %; decembar pet, 1,21 %) i *P. barbatus* (novembar šest, 1,01 %) (Tabela 4.29.).

Parametri: TI BS, TI Mix, relativni diverzitet, broj *L. hoffmeisteri*, broj *L. claparedeanus*, broj *L. udekemianus*, broj *B. sowerbyi*, broj *T. tubifex*, broj *P. hammoniensis*, % *L. hoffmeisteri*, % *L. claparedeanus*, % *L. udekemianus*, % *B. sowerbyi*, % *T. tubifex* i % *P. hammoniensis*, pokazali su normalnu raspodelu podataka (Kolmogorov-Smirnov test) pa su njihove korelacije testirane Pirsonovim testom.

U zavisnosti od prisustva vrsta tokom svih meseci istraživanja za parametar TI Mix N je bio deset, osam ili pet. U tabeli 4.39. može se videti da nisu dobijene signifikantne korelacije analiziranih parametara. Vrednosti N za parametar TI BS su bile osam, sedam i četiri. Slično kao i za parametar TI Mix ni za parametar TI BS nisu dobijene statističke značajne korelacije sa analiziranim parametrima (Tabela 4.38 i 4.39).

Tabela 4.38. Korelacija TI kod vrste *B. sowerbyi* sa brojem i procentualnom zastupljenošću tubificidnih vrsta u uzorcima; crvenom bojom označeni su uzorci kod kojih postoji signifikantna korelacija.

N=8	TI BS	
relativni diverzitet	r=0,1697	p=0,618
% zastupljenost <i>L. hoffmeisteri</i>	r=-0,1768	p=0,603
% zastupljenost <i>L. claparedeanus</i>	r=0,3504	p=0,291
% zastupljenost <i>T. tubifex</i>	r=-0,1469	p=0,666
realan broj <i>L. hoffmeisteri</i>	r=0,1648	p=0,628
realan broj <i>L. claparedeanus</i>	r=0,4345	p=0,182
realan broj <i>T. tubifex</i>	r=0,2349	p=0,487
N=7	TI BS	
TI Mix	r=-0,0256	p=0,952
% zastupljenost <i>B. sowerbyi</i>	r=-0,2200	p=0,601
realan broj <i>B. sowerbyi</i>	r=-0,3600	p=0,381
% zastupljenost <i>L. udekemianus</i>	r=-0,4392	p=0,276
realan broj <i>L. udekemianus</i>	r=-0,5339	p=0,173
N=4	TI BS	
% zastupljenost <i>Potamothrix hammoniensis</i>	r=0,1202	p=0,777
realan broj <i>Potamothrix hammoniensis</i>	r=0,1148	p=0,787

Tabela 4.39. Korelacija parametra TI kod Mix-a sa brojem i procentualnom zastupljenošću tubificidnih vrsta u uzorcima; crvenom bojom označeni su uzorci kod kojih postoji signifikantna korelacija

N=10	TI Mix	
relativni diverzitet	r=0,0777	p=0,831
% zastupljenost <i>L. hoffmeisteri</i>	r=-0,1113	p=0,760
% zastupljenost <i>L. claparedeanus</i>	r=0,2277	p=0,527
% zastupljenost <i>T. tubifex</i>	r=-0,2564	p=0,474
realan broj <i>L. hoffmeisteri</i>	r=-0,2509	p=0,484
realan broj <i>L. claparedeanus</i>	r=0,0334	p=0,927
realan broj <i>T. tubifex</i>	r=-0,2956	p=0,407
N=8	TI Mix	
% zastupljenost <i>L. udekemianus</i>	r=0,4518	p=0,190
realan broj <i>L. udekemianus</i>	r=0,1451	p=0,689
% zastupljenost <i>B. sowerbyi</i>	r=0,6027	p=0,065
realan broj <i>B. sowerbyi</i>	r=0,2130	p=0,555
N=5	TI Mix	
% zastupljenost <i>Potamothrix hammoniensis</i>	r=-0,3693	p=,294
realan broj <i>Potamothrix hammoniensis</i>	r=-0,4738	p=,167

#### **4.4. *Ex situ* istraživanja**

Osetljivost tubificida da detektuju genotoksične agense i da se mogu koristiti u ekogenotoksikološkim studijama praćeno je u *ex situ* uslovima. Za ispitivanje je izabrana vrsta *L. udekemianus* kod koje je praćen efekat citostatika 5 – fluorouracila i etopozida. Paralelno sa ispitivanjem uticaja izabranih citostatika u eksperimentima su rađene i kontrole rastvarača. Pošto je 5 – FU rastvorljiv u vodi, voda je uzimana kao negativna kontrola. ET je rastvaran u DMSO, pa je 0,008 % DMSO korišćen kao kontrola rastvarača. Ova koncentracija DMSO odgovara koncentraciji rastvarača najveće koncentraciji ET (4  $\mu$ M). Obzirom da nižim koncentracijama ET odgovaraju izuzetno niske koncentracije rastvarača DMSO (80 ppb – 8 ppm) ostale koncentracije rastvarača nisu testirane. CdCl<sub>2</sub> je odabran kao model mutagen koji se rastvara u vodi, te su u ovom slučaju, kao i za 5 – FU, kontrola rastvarača i negativna kontrola iste (voda).

##### **4.4.1. Uspostavljanje laboratorijske kulture vrste *L. udekemianus***

Laboratorijska kultura vrste *L. udekemianus* je uspostavljena 2012. godine kada su jedinke ove vrste dobijene od kolega sa Instituta za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu. Tokom rutinskih provera kulura zabeleženo je prisustvo kokona, odnosno potvrđeno je uspešno razmnožavanje laboratorijskih životinja, što je glavni preduslov za uspostavljanje funkcionalne laboratorijske kulture.

##### **4.4.2. Efekat CdCl<sub>2</sub>, 5-FU i ET na preživljavanje jedinki *L. udekemianus***

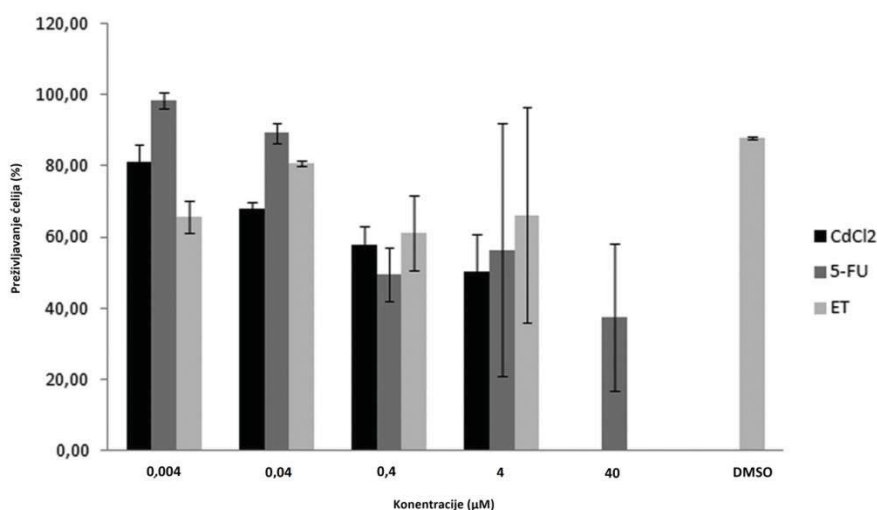
U okviru testiranih koncentracija CdCl<sub>2</sub> (0,004, 0,04, 0,4, 4 i 40  $\mu$ M), preživljavanje jedinki *L. udekemianus* na dozi od 4  $\mu$ M bilo je manje od 50 % (prosečno 46 %). Na ovoj koncentraciji primećene su morfološke promene (degradacija tela) i autotomija. Letalan efekat, bez ijedne preživele jedinke (totalni mortalitet) zabeležen je na 40  $\mu$ M.



Testirane koncentracije 5 – FU (0,004, 0,04, 0,4, 4 i 40  $\mu\text{M}$ ) i ET (0,004, 0,04, 0,4 i 4  $\mu\text{M}$ ), nisu pokazale toksičan efekat, preživljavanje jedinki *L. udekemianus* je bilo 100 %. U okviru primenjenih koncentracija nijedan od citostatika nije doveo do morfoloških promene na crvima.

#### 4.4.3. Efekat $\text{CdCl}_2$ , 5 – FU i ET na preživljavanje celomocita i hemocita *L. udekemianus*

Ukoliko je citotoksičan efekat veći od 30 %, odnosno preživljavanje manje od 70 %, u odnosu na zabeleženo preživljavanje kod negativne kontrole onda se te koncentracije ne koriste za detekciju genotoksičnog potencijala (Tice i sar., 2000). Na koncentracijama  $\text{CdCl}_2$  (0,4 i 4  $\mu\text{M}$ ), 5 – FU (0,4, 4 i 40  $\mu\text{M}$ ) i ET (4  $\mu\text{M}$ ) preživljavanje ćelija je bilo manje od 70 % (Slika 4.19.). U slučaju sve tri supstance, koncentracija 4  $\mu\text{M}$  je bila izuzeta za procenu genotoksičnog efekta. Iako su  $\text{CdCl}_2$  i 5 – FU na koncentraciji 0,4  $\mu\text{M}$  redukovali preživljavanje ćelija ispod 70 %, a ista koncentracija za ET bila je na granici citotoksičnosti, ova doza je uključena u procenu genotoksičnog potencijala obzirom da je bila na granici preporučenog preživljavanja za genotoksikološke studije.



Slika 4.19. Preživljavanje celomocita i hemocita *L. udekemianus* nakon tretmana sa  $\text{CdCl}_2$ , 5 – FU i ET.

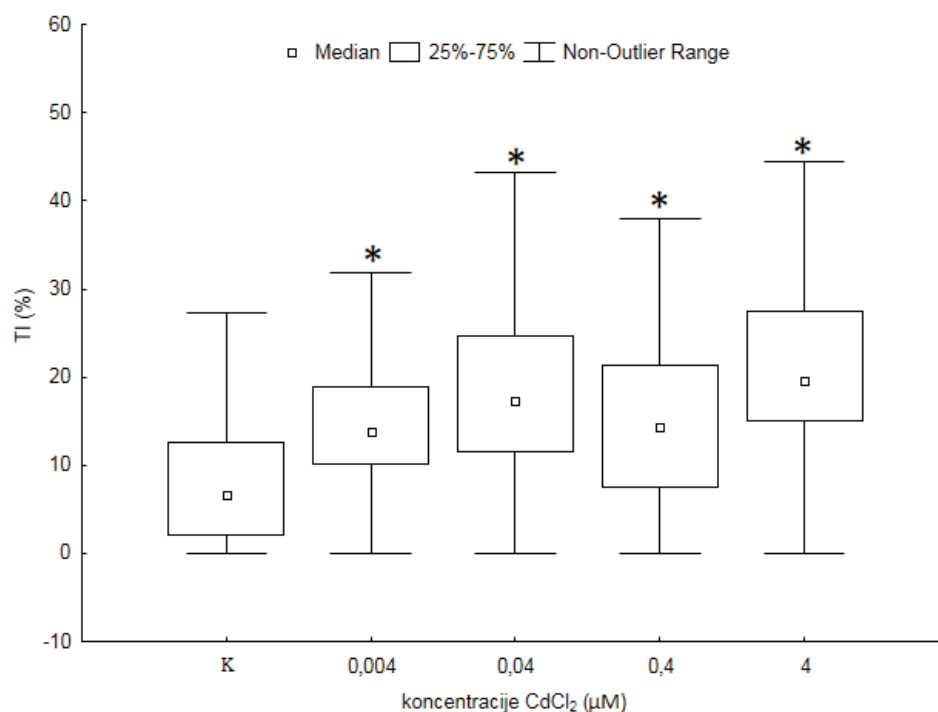
DMSO je kontrola rastvarača za ET. Viabilnost ćelija je određena AO/EB diferencijalnim bojenjem.

Vrednosti predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  SD nakon dva nezavisna eksperimenta

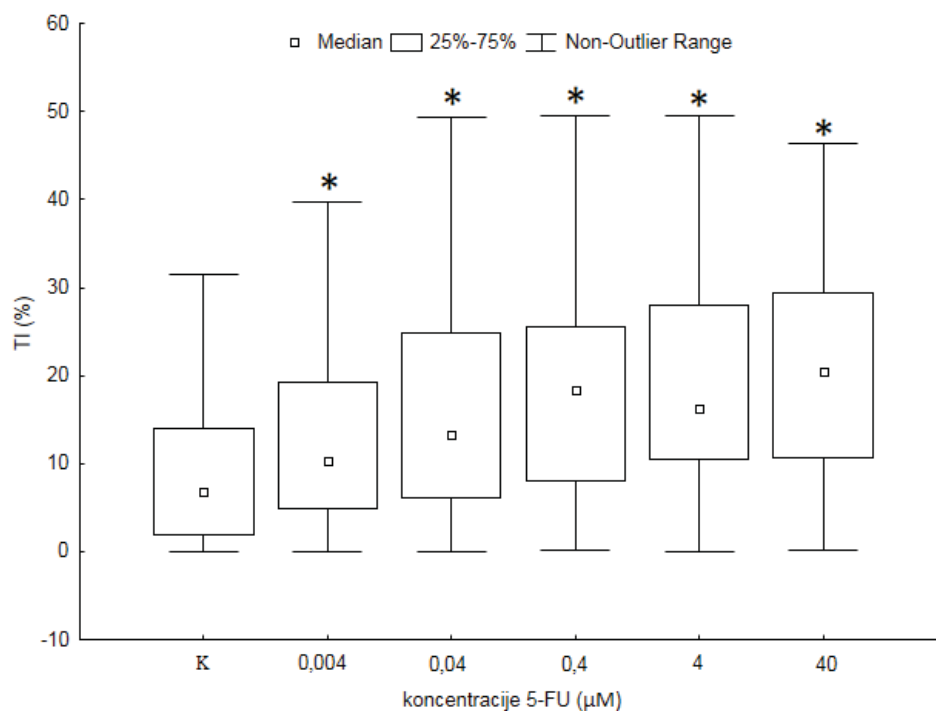
**4.4.4. Efekt CdCl<sub>2</sub>, 5 – FU i ET na nivo oštećenja DNK molekula celomocita i hemocita *L. udekemianus***

Bazalni nivo oštećenja DNK molekula celomocita i hemocita jedinki *L. udekemianus*, koji je ujedno služio i kao negativna kontrola, za parametar TI kretao se u opsegu od 6,87 do 15,92 (srednja vrednost  $\pm$  SD=10,33 $\pm$ 2,77). U poređenju sa vrednostima oštećenja DNK molekula koje su zabeležene u negativnim kontrolama CdCl<sub>2</sub> i 5 – FU, u eksperimentima sa ET vrednosti negativnih kontrola bile su značajno veće (p<0,05).

Sve testirane koncentracije CdCl<sub>2</sub> (0,004, 0,04, 0,4 i 4  $\mu$ M), i 5 – FU (0,004, 0,04, 0,4, 4 i 40  $\mu$ M), dovele su do značajnog povećanja (p<0,05) oštećenja DNK molekula u dva nezavisna eksperimenta (Slike 4.20 i 4.21).

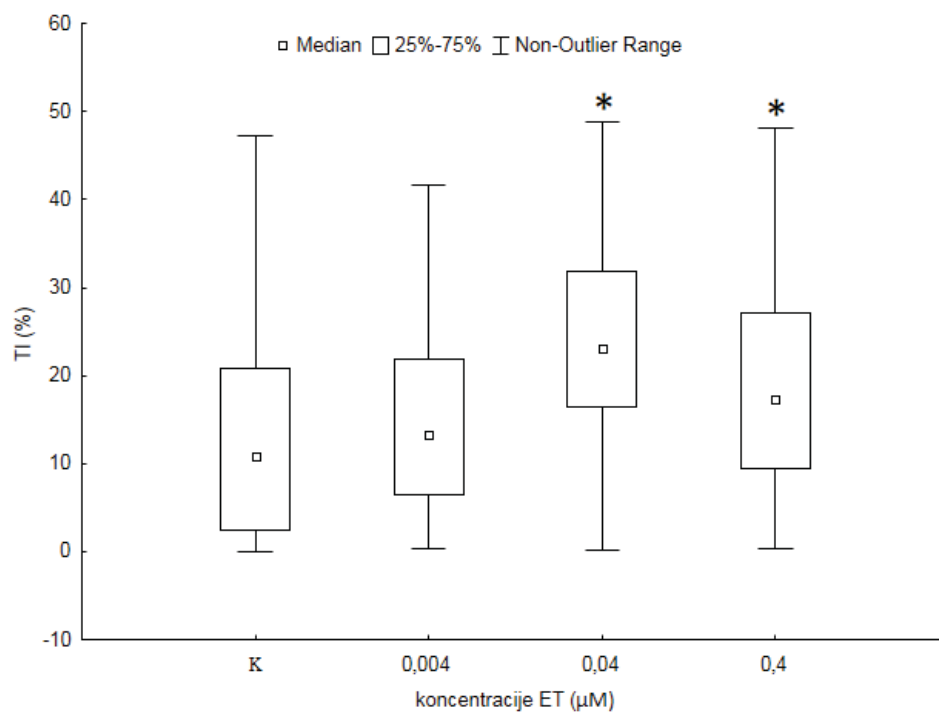


Slika 4.20. Nivo oštećenja DNA molekula u ćelijama *L. udekemianus* nakon izlaganja CdCl<sub>2</sub>. Za svaku koncentraciju i negativnu kontrolu (K) oštećenje DNK molekula je procenjeno na 100 jedara (50 po eksperimentu); \* Statistička značajnost Studentovog t-testa (p<0,05)



Slika 4.21. Nivo oštećenja DNA molekula u ćelijama *L. udekemianus* nakon izlaganja 5 - FU. Za svaku koncentraciju i negativnu kontrolu (K) oštećenje DNK molekula je procenjeno na 100 jedara (50 po eksperimentu); \* Statistička značajnost Studentovog t-testa ( $p < 0,05$ )

U slučaju tretmana sa ET koncentracije 0,04 i 0,4 μM indukovale su značajno povećanje oštećenja DNK molekula ( $p < 0,05$ ) u odnosu na negativnu kontrolu. Najniža koncentracija (0,004 μM) ET nije imala značajan efekat na nivo oštećenja DNK u odnosu na kontrolu (Slika 4.22).



**Slika 4.22.** Nivo oštećenja DNA molekula u ćelijama *L. udekemianus* nakon izlaganja ET. Za svaku koncentraciju i negativnu kontrolu (K) oštećenje DNK molekula je procenjeno na 100 jedara (50 po eksperimentu); \* Statistička značajnost Studentovog t-testa ( $p < 0,05$ )

# **DISKUSIJA**

## 5. DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija obuhvata ekogenotoksikološke *in situ* i *ex situ* studije na crvima familije Tubificidae. Ocena nivoa oštećenja DNK molekula praćena je komet testom, koji je prvi put korišćen na ćelijama celomske tečnosti i krvnog sistema vrsta *Branchiura sowerbyi*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Limnodrilus claparedeanus*, *Limnodrilus udekemianus* i *Tubifex tubifex* u istraživanjima *in situ* i vrste *L. udekemianus* u istraživanjima *ex situ*. Vrste *B. sowerbyi* i *L. udekemianus* uspešno su odgajene u optimalnim uslovima u laboratoriji i korišćene su za određivanje bazalnih vrednosti oštećenja DNK molekula. Jedinke *L. udekemianus* dobijene u kulturi, takođe, su korišćene u *ex situ* studiji. Pošto je komet test prvi put korišćen kod navedenih vrsta crva, eksperimentalni protokol za izolaciju hemocita i celomocita, kao i sam komet test, morali su biti prilagođeni.

*In situ* studije vršene su na dva lokaliteta, Duboko na Savi i Višnjica na Dunavu na individuama vrste *B. sowerbyi*, ali i na slučajno izabranim jedinkama oligoheta iz uzoraka, Mix uzorak sačinjen od različitih vrsta tubificida. Paralelno sa ekogenotoksikološkim istraživanjima pratili su se i mikrobioški i fizičko-hemijski parametri kvaliteta vode. Usled specifičnih hidroloških prilika tokom istraživanja posebna pažnja se posvetila vodostaju kao jednom od glavnih stresora.

*Ex situ* studija je obuhvatila praćenje efekta citostatika 5-fluorouracila i etopozida na integritet DNK molekula kultivisanih jedinki vrste *L. udekemianus*. U ovim eksperimentima kao model mutagen korišćen je  $CdCl_2$ .

## 5.1. *In situ* istraživanja

Kada se rade istraživanja u kojima se prati stanje biomarkera (oštećenje DNK, enzimi oksidativnog stresa, proteini, ponašanje, itd.) poželjno je da se zna koje je osnovno, odnosno optimalno stanje faktora koji se istražuju za datu vrstu – referentno stanje organizma, ili bazalne vrednosti biomarkera. Za određivanje bazalnih vrednosti mogu se koristiti organizmi sa „čistih, nezagađenih“ staništa, ili jedinke koje se gaje u kontrolisanim, optimalnim (adekvatna temperatura, podloga, aeracija, itd.) laboratorijskim uslovima, u kojima je stres sveden na minimum. Familija Tubificidae povezuje se sa staništima koja su pod antropogenim pritiskom (staništa bogata organskim materijama) i u kojima je smanjena kompeticija između vrsta. Pošto tubificide naseljavaju staništa bogata organskim materijama, teško da se može naći stanište u životnoj sredini koje je nezagađeno, odnosno referentno.

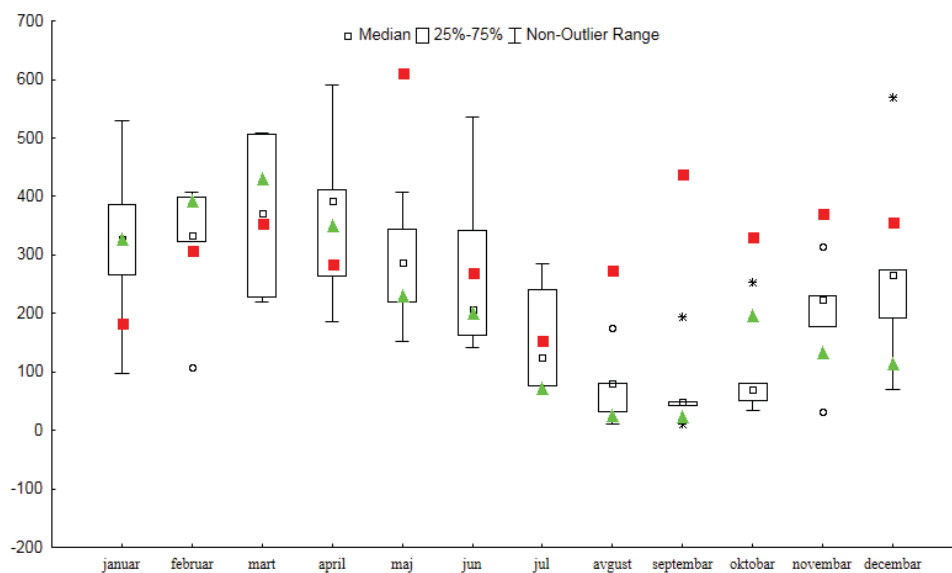
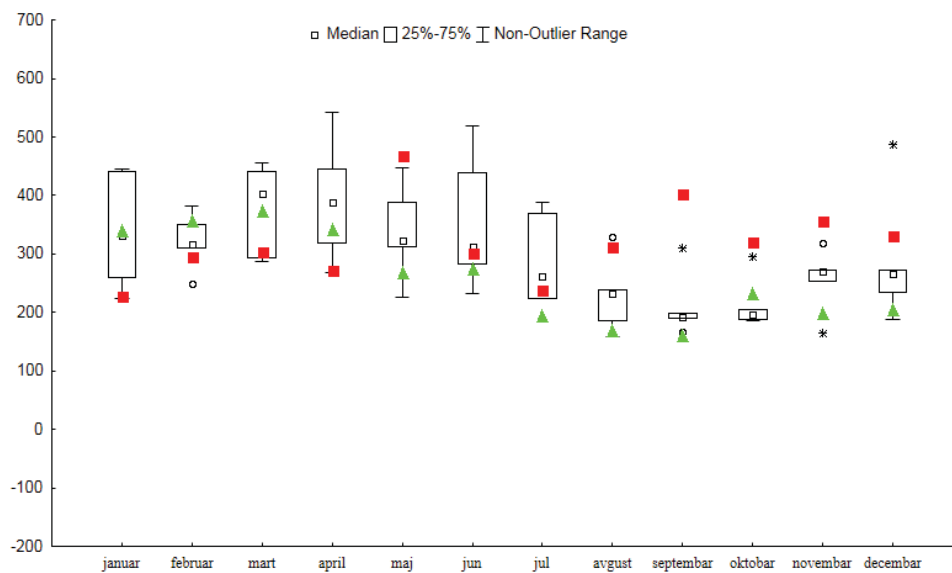
*In situ* studija je paralelno rađena na uzorcima vrste *B. sowerbyi*, kao i na uzorku koji je sačinjen od različitih vrsta (Mix uzorak). Veće dimenzije tela i prisustvo filiformnih škruga omogućile su da se uz minimalno manipulisanje determinišu jedinke vrste *B. sowerbyi* i da se odvoje za pokretanje laboratorijske kulture. Jedinke iz laboratorijske kulture su korišćene za dobijanje bazalnih vrednosti oštećenja DNK molekula ove vrste. Za sve *in situ* studije u kojima su analizirani uzorci *B. sowerbyi* korišćena je ista bazalna vrednost.

### 5.1.1. Lokaliteti

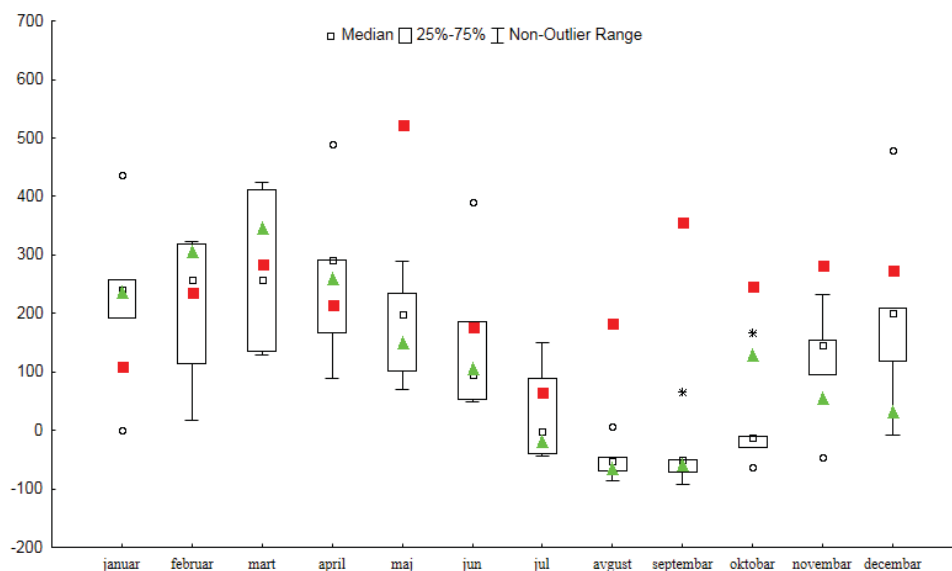
#### Lokalitet Duboko

Istraživanje na lokalitetu Duboko je rađeno tokom 2014. i 2015. godine i specifično je po hidrološkim promena koje su se desile u periodu uzorkovanja. Naime, 2014. godina je izdvojena kao najkišovitija godina u periodu od 1951. do 2015. godine (RHMZ godišnji bileten, 2014). Usled velikih količina padavina na teritoriji čitavog sliva reke Save došlo je

do poplava u maju i septembru 2014. godine. Slika 5.1. najbolje predočava ekstremno variranje u vodostaju.







Slika 5.1. Vodostaj na lokalitetima Beograd, Beljin i Šabac: boks plot dijagram – petogodišnji prosek vodostaja (2009-2013. godina); crveni kvadrati – vodostaj za 2014. godinu; zeleni trouglovi – vodostaj za 2015. godinu.

Ekstremni uslovi koji su vladali na terenu tokom 2014. godine omogućili su jedinstvenu priliku da se u prirodnim, *in situ*, uslovima istraži njihov uticaj. Tokom poplava, u maju 2014. godine, čitava populacija stanovnika Obrenovca i nekoliko okolnih sela od oko 50.000 stanovnika je bila iseljena pa je pritisak komunalnih otpadnih voda na životnu sredinu bio eliminisan. Međutim, izlivanjem reke iz korita, usled spiranja poljoprivrednog zemljišta i pepelišta TENT-a, može se govoriti o pojavi novih, različitih zagađivača u poplavnoj vodi, pojavi različitih ksenobiotika u akvatičnom ekosistemu.

Kada govorimo o spiranju sa okolnog poljoprivrednog zemljišta može se očekivati povećanje koncentracija soli azota i fosfora u vodi usled prisustva organskih materija, kao i neorganskih supstanci koje se koriste kao đubriva u poljoprivredne svrhe (Shuval i Gruener, 1972). Takođe, neophodno je pomenuti i pesticide na bazi trazina (atrazin, desetilterbutilazin, terbutilazin, acetohlor i metalohlor) koji se koriste kao zaštita useva (Hildebrandt i sar., 2008).

Sa druge strane, poznato je da se na poljima pepela koji pripadaju termoelektranama nalaze povišene koncentracije As, Cd, Cr, Pb, ali i esencijalnih elemenata kao što su B, Cu,

Mn, Mo, Ni (Adriano i sar., 1980; Hynes, 2009; Gajić i sar., 2016). Usled toga, nakon poplava, povratkom stanovništva i vraćanjem reke u svoje korito, bilo je moguće pratiti uticaje otpadnih voda i supstanci dospelih spiranjem okolnog zemljišta.

### **Lokalitet Višnjica**

Istraživanje na lokalitetu Višnjica, reka Dunav, je rađeno samo tokom 2014. godine. Pošto je Sava jedna od najznačajnijih pritoka Dunava koja se uliva uzvodno u odnosu na lokalitet Višnjica, poplave koje su pogodile sliv reke Save imale su uticaj i na ovaj lokalitet na Dunavu. Pored toga, sam lokalitet je pod pritiskom drugog tipa zagađenja u odnosu na lokalitet Duboko, tj. pod uticajem je izuzetno visoke količine neprerađenih otpadnih voda grada Beograda pošto se izliv glavnog kolektora nalazi uzvodno u odnosu na tačku gde je rađeno uzorkovanje. Takođe, u neposrednoj blizini ovog lokaliteta smešteni su ugostiteljski objekti i manje vikend naselje koji ispuštaju neprerađene otpadne vode u Dunav.

#### **5.1.1.1. Korelacije vodostaja sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima**

Uticaj poplava tokom 2014 je bio evidentan na oba lokaliteta. Na lokalitetu Duboko je zabeležena pozitivna korelacija između vodostaja i koncentracije Mn, Cr, Pb i Fe, što se može dovesti u vezu sa spiranjem ovih elemenata sa pepelišta prilikom poplavnog talasa. Detektovana je i pozitivna korelacija sa  $\text{NO}_2^-$ , što se može povezati sa spiranjem poljoprivrednog zemljišta (Vrzel et al., 2016). Međutim, sa povećanjem vodostaja dolazi do razblaženja, odnosno smanjenja koncentracije različitih jedinjenja u vodenoj sredini, što je potvrđeno negativnom korelacijom između vodostaja i parametara elektroprovodljivost, fenolni indeks i koncentracije  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  i  $\text{Cl}^-$ . Elektroprovodljivost vode zavisi od koncentracije rastvorenih soli. Negativna korelacija vodostaja sa elektroprovodljivošću, kao i sa ostalim parametrima ( $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  i rastvorenim As, fenolnim indeksom), može se objasniti povećanom dilucijom u situacijama visokog vodostaja, odnosno obrnuto u situacijama niskog vodostaja.

Sličan trend primećen je i na lokalitetu Višnjica. Vodostaj je bio u pozitivnoj korelaciji sa Fe, Mn, ukupnim Cr, Pb, Ni i rastvorenim Ni. Uticaj zagađenja koje je posledica spiranja poljoprivrednog zemljišta takođe je bilo evidentno ako se uzme u obzir pozitivna korelacija sa fosfatima kao i pesticidima na bazi triazina (atrazinom, desetilterbutilazinom, terbutilazinom, acetohlorom i metalohlorom). Negativna korelacija koja je dobijena između vodostaja i zasićenosti vode kiseonikom može biti rezultat obogaćivanja vode organskim materijama i povećane potrošnje kiseonika za njeno razlaganje.

#### **5.1.1.2. Korelacije mikrobioloških parametara kvaliteta vode sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima**

Otpadnim vodama u akvatične sredine, pored supstanci koje mogu imati negativni efekat na biotu, dospevaju i različiti mikroorganizmi (Kolarević, 2014). Mikrobiološko zagađenje vode predstavlja jedno od značajnijih vidova pritisaka na akvatične ekosisteme, stoga se posebna pažnja mora ukazati ovim parametrima kvaliteta vode (Kirschner i sar., 2009). Kada govorimo o mikrobiološkim pokazateljima zagađenja, neophodno je odvojiti grupu totalnih koliforma od fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka. Fekalni koliformi i fekalne enterokoke su pokazatelji nedavnog fekalnog zagađenja, s obzirom da kao mezofilni ili termotolerantni organizmi ne mogu dugo opstati u akvatičnim ekosistemima nakon dospevanja u otpadne vode (Kavka i Poetsch, 2002; Kolarević, 2014). Međutim, grupa totalnih koliforma obuhvata i vrste koje nisu strogo vezane za toplokrvne organizme i mogu imati i druge habitate, kao što je zemljište na obalama reka, te se ne moraju smatrati indikatorima fekalnog zagađenja. Upravo su iz ovog ugla i razmatrane korelacije mikrobioloških indikatora i drugih praćenih parametara. Pošto su odabrani lokaliteti pod uticajem više različitih izvora zagađenja i pošto je istraživanje rađeno u ekstremnim hidrološkim prilikama, treba sa oprezom tumačiti dobijene korelacije i uzimati u obzir da su neke od njih proizašle indirektno dejstvom nekog drugog parametra. Ipak na osnovu dobijenih rezultata se mogu uočiti određene pravilnosti.

Na oba lokaliteta su indikatori fekalnog zagađenja ukazali na konstantan uticaj otpadnih voda na kvalitet vode koji se najčešće kretao u okviru III klase, što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja na ovim lokalitetima (Kolarević, 2014; Vuković-Gačić et al., 2014; ICPDR, 2015). Pomenuti parametri su pokazali da su lokaliteti pod uticajem mešavine urbanih i industrijskih voda. Na primer, na oba lokaliteta zabeležena je pozitivna korelacija između brojnosti *E. coli* i koncentracije Fe u vodi. Visok vodostaj tokom poplava je imao uticaj i na indikatore fekalnog zagađenja u smislu razblaženja, ali treba uzeti u obzir i iseljavanje stanovništva iz poplavljenog područja što je dodatno uticalo na sniženje vrednosti ovih indikatora.

Sa druge strane, evidentno je da se broj totalnih koliforma povećavao sa vodostajem, što ukazuje da je ovaj parametar direktno povezan sa spiranjem zemljišta oko reka. Samim tim, dobijena je i pozitivna korelacija između totalnih koliforma i polutanata, koji se mogu dovesti u vezu sa pepelištem (ukupnim i rastvorenim Cr, As, Ni), ali i sa poljoprivrednim površinama (organskim N,  $\text{PO}_4^-$ , ukupnim P, atrazinom, desetilterbutilazinom, terbutilazinom, acetohlorom i metalohlorom.). Kauzalno, javljala se i negativna korelacija sa parametrima čija se vrednost direktno menjala sa promenom samog vodostaja (koncentracija različitih jona u vodi, elektroprovodljivost).

### **5.1.1.3. Sastav zajednica akvatičnih Oligochaeta**

Sa izuzetkom dela kroz Đerdapsku klisuru, u ostalom delu toka kroz Srbiju Dunav pripada tipičnom nizijskom tipu reke, dok je Sava čitavim tokom kroz Srbiju tipična ravničarska reka. Druge zajedničke osobine Dunava i Save su tip podloge (dominantna zastupljenost finih frakcija u sedimentu) i voda bogata organskim materijama. Ovakva staništa naseljavaju tipični predstavnici ravničarskih reka, potklasa Oligochaeta, razdeo Mollusca, od insekata familija Chironomidae, a od Crustacea red Amphipoda (Paunović, 2007).

Na lokalitetu Duboko na Savi tokom 2014. i 2015. godine zabeleženo je prisustvo istog broja taksona akvatičnih oligoheta koji se mogu svrstati u sedam rodova, odnosno dve familije, Tubificidae i Lumbriculidae. Veća raznovrstnost oligohetne faune bila je zabeležena 2015. godine kada je bilo zabeleženo prisustvo 11 vrsta, za razliku od 2014. godine kada je identifikovano devet vrsta. U uzorcima Oligochaeta dominantna je bila familija Tubificidae (zastupljenost >90 %) sa vrstama *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus* što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Paunović, 2007; Atanacković, 2015). Manja raznovrstnost 2014. godine može se objasniti uticajem poplava tokom kojih je verovatno došlo do zatrpavanja oligoheta nanosom sedimenta čime su bile nedostupnije za uzorkovanje. Slični nalazi sastava zajednice akvatičnih oligoheta su dobijeni 2011. i 2012. godine na lokalitetu Ostružnica (Lucić i sar., 2015). Za razliku od ove studije, Atanacković (2015) beleži veću raznovrstnost familija Oligochaeta, gde pored predstavnika familije Tubificidae i Lumbriculidae čije je prisustvo zabeleženo i u ovoj studiji, beleži i prisustvo predstavnika familije Naididae, Enchytraeidae i Lumbricidae koji nisu detektovani u našim istraživanjima. Razlog veće raznovrstnosti oligohetne faune u studiji Atanacković (2015) može se naći u načinu uzorkovanja, tj. u primeni multihabitat metode koja omogućava uzorkovanje vrsta sa različitih mikrostaništa.

Na Dunavu, lokalitet Višnjica se karakterisao većim diverzitetom oligohetne faune nego lokalitet Duboko na Savi što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Atanacković, 2015). Na ovom lokalitetu je zabeleženo prisustvo 17 vrsta koje se mogu svrstati u 11 rodova iz tri familije, Naididae, Tubificidae i Enchytraeidae. Kao i u Dubokom, i u Višnjici je udeo familije Tubificidae bio visok, skoro u svim uzorcima >90 %, a dominantne vrste su *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus*, praćene sa *B. sowerbyi*, *T. tubifex* i *L. udekemianus*. Za razliku od lokaliteta Duboko, u Višnjici je zabeleženo i prisustvo vrsti iz familije Naididae (*N. barbata*, *N. bretscheri*, *S. lacustris*, *U. uncinata*), kao i familije Enchytraeidae.

Na lokalitetu Duboko, u okviru ostalih grupa makroinvertebrata, najzastupljenija je bila familija Chironomidae (Insecta: Diptera), familija Corbiculidae iz klase Bivalvia i familija Corophiidae iz klase Malacostraca. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom Lucić i sar. (2015), s druge strane zabeležena je manja raznovrstnost u odnosu na studiju

Paunović (2007). Treba napomenuti nalaz vrste *Ephoron virgo* (Ephemeroptera) na lokalitetu Duboko, koji je prvi nalaz ove vrste na teritoriji grada Beograda.

Lokalitet Višnjica se karakterisao većom raznovrnošću akvatičnih makroinvertebrata u odnosu na lokalitet Duboko. Familija Chironomidae je bila dominantno zastupljena u odnosu na ostale grupe makroinvertebrata, kao i grupa Nematoda, Gastropoda, a retko i predstavnici Crustacea. Predstavnici Turbellaria bili su uzorkovani jedino u maju i decembru, a Hirudinea u avgustu. Kao i u slučaju zastupljenosti na lokalitetu Duboko, i na lokalitetu Višnjica je zabeležena manja raznovrsnost grupa makroinvertebrata u odnosu na studiju Paunović (2007).

#### **5.1.1.4. Ocena ekološkog potencijala lokaliteta na osnovu zajednice akvatičnih Oligochaeta**

Za procenu ekološkog potencijala vodenih ekosistema od indeksa koji su razvijeni za grupu makroinvertebrata korišćeni su: raznovrsnost, Šenonov indeks diverziteta, saprobni indeks po metodi Zelinka – Marvan (1961), BMWP indeks i učešće familije Tubificidae u zajednici makroinvertebrata.

U odnosu na saprobni indeks lokalitet Duboko tokom 2014. i 2015. godine karakterisao lošim/vrlo lošim ekološkim potencijalom (IV-V klasa) što je i očekivano u odnosu na visoku zastupljenost polisaprobnih vrsta u uzorcima. S obzirom da tubificide spadaju u organizme koji tolerišu organsko zagađenje, BMWP indeks je tokom obe godine istraživanja bio u okviru IV-V klase. Pošto je broj zastupljenih vrsta bio devet, odnosno 11 (2014/2015 godina) Šenonov indeks diverziteta ukazuje na umereno dobar/loš ekološki potencijal (III-IV klasa) tokom većeg dela godine, odnosno II-III klasom u oktobru 2014. i u aprilu 2015. godine. Ukupan broj taksona (11), odnosno raznovrstanost, ukazuje da se ovaj lokalitet karakteriše dobrim do lošim ekološkim potencijalom (III-IV klasa), dok je 2015. godine zabeležena IV-V klasa kvaliteta vode u avgustu, oktobru i novembru. Kao što je napomenuto, imajući u vidu tip reke (nizijska reka, muljevita podloga, visok organski

sadržaj) očekivano je da bude veća zastupljenost vrsta koje tolerišu organsko zagađenje tako da su dobijeni rezultati ekološkog potencijala lokaliteta očekivani i u saglasnosti su literaturnim podacima (Atanacković, 2015).

Lokalitet Višnjica karakteriše se visokom organskom produkcijom, tako da nije iznenađujuće što je, sa izuzetkom marta kada su Diptera bile dominantne, grupa Oligochaeta bila najzastupljenija u uzorcima, te se može reći da ovaj lokalitet ima loš/veoma loš ekološki potencijal (IV-V klasa). Kao i na lokalitetu Duboko, i u Višnjici najzastupljenija je bila familija Tubificidae, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Atanacković i sar., 2011; Atanacković i sar., 2013), usled čega se lokalitet karakteriše lošim/veoma lošim ekološkim potencijalom (IV-V klasa). Zanimljivo je prisustvo predstavnika familije Naididae, s obzirom da oni nisu indikatori akvatičnih sredina koje su bogate organskim materijama. Saprobni indeks (Zelinka – Marvan, 1961) i BMWP skor (Armitage, 1983) ukazuju na nezadovoljavajući ekološki potencijal na ovom lokalitetu (IV-V klasa). Pošto je diverzitet relativno visok, Šenonov indeks diverziteta (Shannon i Weaver, 1949) svrstava ovaj lokalitet u II-III klasu (dobar/umeren ekološki potencijal) u februaru, martu, aprilu, maju, septembru, novembru i decembru, a u III-IV klasu (umeren/loš ekološki potencijal) u junu, julu, avgustu i oktobru. U odnosu na parametar ukupan broj taksona lokalitet Višnjica ima dobar do umereno dobar ekološki potencijal (II-III klasa) u februaru, martu, maju, oktobru, novembru i decembru, a dobar do loš ekološki potencijal (III-IV klasa) u aprilu, junu, julu, avgustu i septembru.

#### **5.1.1.5. *In situ* ekogenotoksikološka istraživanja**

##### **Uspostavljanje laboratorijske kulture *B. sowerbyi* i određivanje bazalnog oštećenja DNK molekula**

Za referentne vrednosti u *in situ* istraživanjima korišćene su jedinice iz laboratorijske kulture *B. sowerbyi* gajene u kontrolisanim laboratorijskim uslovima optimalnim za ovu vrstu (Nascimento i Alves, 2008). Za razliku od *in situ* uslova u kojima

se ne kontrolišu uslovi spoljašnje sredine, laboratorijska kultura ima svoje prednosti jer se prevazilazi ovaj problem. Naime jedinke u laboratorijskoj kulturi žive u optimalnim uslovima za datu vrstu, u kojima su svi stresori svedeni na minimum, što se u prirodnom okruženju ne može dostići. Zbog navedenih razloga, u kontrolisanim uslovima koji odgovaraju potrebama analiziranog organizma mogu se dobiti bazalne vrednosti oštećenja DNK molekula. U literaturi ne postoje podaci o bazalnim vrednostima oštećenja DNK molekula kod tubificida, međutim, poređenjem dobijenih referentnih vrednosti oštećenja DNK molekula vrste *B. sowerbyi* ( $TI \pm SE = 24,6 \pm 1,3$ ) sa vrednostima kod školjki (*S. woodiana*  $3,4 \pm 0,7$ ; *U. pictorum*  $8,1 \pm 1$ ; *U. tumidus*  $9,5 \pm 1,3$ ) (Kolarević, 2014) koje su prošle aklimaciju u kontrolisanim uslovima, može se videti da su u slučaju crva vrednosti oštećenja DNK molekula veće.

### **Vijabilnosti celomocita i hemocita**

Da bi se pravilno tumačilo da li je u pitanju genotoksičan ili toksičan efekat Tice i sar. (2000) su postavili donju granicu od 70 % za preživljavanje ćelija. Sve vrednosti gde je zabeleženo niže preživljavanje od 70 % u odnosu na kontrolu treba oprezno tumačiti sa genotoksikološkog aspekta. Načelno, vrsta *B. sowerby* se karakterisala boljim preživljavanjem ćelija celomocita i hemocita u odnosu na Mix uzorak. Prosečno preživljavanje ove vrste kretalo se oko 80 % dok je Mix uzorak imao prosečnu vijabilnost ćelija nešto višu od donje genotoksične granice, 77 %. Za proučavane vrste trenutno nema literaturnih podataka o vijabilnosti ćelija po samoj izolaciji ali postoje podaci za vrstu *T. tubifex*, u radu Suavé i sar. (2002) preživljavanje ćelija kod ove vrste je takođe bilo oko 75%.

### **Oštećenje DNK molekula u celomocitama i hemocitama vrste *B. sowerbyi* i u Mix uzorku tokom 2014. i 2015. godine**

**Na lokalitetu Duboko**, kao što je pomenuto ranije, susreli smo se sa specifičnom hidrološkom situacijom tokom 2014. godine. Usled poplava u maju te godine stanovnici Obrenovca i okolnih sela su bili evakuisani, a uticaj otpadnih voda ovog grada i manjih naselja je eliminisano. Iste godine u septembru došlo je do novog poplavnog talasa. Ovi



ekstremni uslovi su imali veliki uticaj na praćene fizičko-hemijske parametre. Takođe, ova kompleksna situacija se odrazila i na nivo oštećenja DNK molekula kod praćenih grupa. Komet testom dobijene su manje vrednosti oštećenja DNK molekula kod *B. sowerbyi* tokom maja, koje su se zatim postepeno povećavale. Postepeno povećanje oštećenja DNK molekula ove vrste podudaralo se sa vraćanjem građana u svoje domove, odnosno sa ponovnim stvaranjem otpadnih voda. Druga redukcija u nivou DNK oštećenja koje je, čak, bilo niže nego kod referentne vrednosti, dobijeno je u oktobru posle poplava koje su se desile u septembru. Sama veza između genotoksičnog potencijala i priliva otpadnih voda je i statistički potvrđena visokom pozitivnom korelacijom između TI kod ove vrste i broja FE. Možemo zaključiti da su na integritet DNK molekula *B. sowerbyi* uticale smeše jedinjenja koje dospevaju na stanište ove vrste tokom ispusta otpadnih voda. Dobijena je i pozitivna korelacija TI sa Cl<sup>-</sup> koja se takođe može povezati sa otpadnim vodama. Hloridi se koriste u jedinjenjima za dezinfekciju koja su u ekstremnim količinama korišćena prilikom povratka stanovnika u Obrenovac. Poznato je da ova jedinjenja mogu dovesti do oksidativnog stresa (Caldeira-de-Araújo i sar., 1996; Evens i sar., 2004) što dalje može imati negativni uticaj na integritet naslednog materijala. Većina biologa koji imaju iskustva u gajenju akvatičnih organizama svesni su takođe toksičnosti hlorisane vodovodske vode (Brungs, 1973). U laboratorijskoj praksi primećeno je da hlorisana vodovodska voda dovodi do degradacije telesnog zida kod akvatičnih oligoheta.

Poplavni talas je rezultovao razblaženjem i redukcijom emisije otpadnih voda sa jedne strane, ali je spiranjem okolnog zemljišta sa druge strane, na lokalitete je doneo nove grupe polutanata. Ovakva uzročno-posledična situacija je rezultovala negativnom korelacijom između TI sa rastvorenim Pb, HPK (Mn), UV-ekstinkcijom, K<sup>+</sup> i rastvorenim Zn. U pitanju su parametri koji ukazuju na prisustvo zagađenja u vodi. Poznato je da Pb ima negativan uticaj na DNK (Labrot i sar., 1999). Hemijska potrošnja kiseonika, HPK (Mn) i UV-ekstinkcija ukazuju na zagađenje vode organskim materijama. HPK (Mn) ukazuje i na zagađenje industrijskim vodama. Iako u većim koncentracijama Zn ima toksične efekte, u niskim koncentracijama Zn ulazi u sastav proteina kao kofaktor, čak i proteina koji učestvuju u sistemima za reparaciju (Asmuß i sar., 2000), stoga njegov

nedostatak može dovesti do negativnih promena na DNK molekulu (Ho, 2004). Međutim, treba uzeti u obzir da je tokom poplava došlo i do velikih nanosa sedimenta na lokalitetu i da su proučavani organizmi bili zatrpani dublje u slojevima sedimenta što je moglo dovesti do protektivnog efekta u smislu stvaranje fizičke barijere. U studiji Aborgiba i sar. (2016) u kojoj se komparativno evaluiralo oštećenje DNK molekula crva, školjki i riba obrazloženo je da upravo stepen izloženosti organizma zavisi od niše koju organizam naseljava tj. da li je u pitanju sediment, sediment-voda ili vodena faza ekosistema.

Dobijena je i pozitivna korelacija DNK oštećenja sa koncentracijom Fe u vodi, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima na Savi i Dunavu na školjkama (Vuković-Gačić i sar., 2014), kao i na primeru organizama koji pripadaju različitim trofičkim nivoima, crva, školjki i riba (Aborgiba i sar., 2016). Genotoksičnost Fe i smeše Fe i Cr dokumentovano je u studiji Godet i sar. (1996) u vrsti *Pleurodeles waltl*. Parametar TI je pozitivno korelisao i sa rastvorenim O<sub>2</sub>. Tubificidae se smatraju organizmima koji preferiraju staništa u kojima je nivo rastvorenog O<sub>2</sub> nizak, ali i u kojima postoji smanjena kompeticija, odnosno odsustvo predatora (Rodriguez i Reynoldson, 2011). U naučnim krugovima vodi se debata da li je tačno tradicionalno mišljenje da tubificidae preferiraju staništa koja su bogata organskim materijama u kojima je nivo O<sub>2</sub> nizak, ili naseljavaju ova staništa pošto je predatorstvo u njima smanjeno, jer oni kao sedentarni organizmi nemaju mogućnost da se brane. *B. sowerbyi* naseljava staništa sa smanjenom aeracijom i ima razvijenu adaptaciju na uslove smanjene koncentracije kiseonika u vidu filiformnih škrge u kaudalnom delu tela. Škrge povećavaju površinu respiracije, kao i strujanje vode oko tela. Značajna pozitivna korelacija oštećenja DNK molekula sa O<sub>2</sub> navodi na pretpostavku da sa višim koncentracijama O<sub>2</sub> dolazi do oksidativnog stresa i povećanja oštećenja DNK molekula.

Nivo TI parametra za Mix uzorak iz 2014. godine je pokazao isti trend kao u slučaju *B. sowerbyi*, ali sa nešto nižim vrednostima. Za vreme poplava oštećenje DNK molekula se smanjuje, a nakon poplava postepeno se povećava. Razlog može biti sličan kao i u slučaju *B. sowerbyi*. Smeše jedinjenja koje stižu otpadnim vodama u vodene ekosisteme imaju negativan uticaj na nasledni materijal crva. Slično kao i u slučaju *B. sowerbyi*, pozitivna korelacija je zabeležena između TI i rastvorenog O<sub>2</sub>, a negativna sa HPK (Mn) i UV-

ekstinkcijom. Za razliku od uzorka koji je bio sačinjen samo od vrste *B. sowerbyi*, Mix uzorak tokom 2014 godine je sačinjen od različitih vrsta. Najveći udeo u ovim uzorcima imale su vrste *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *L. udekemianus* i *T. tubifex*.

Naredne, 2015. godine oštećenje DNK molekula vrste *B. sowerbyi* tokom analiziranih meseci je značajno odstupalo od referentnih vrednosti TI. U poređenju sa referentnim TI vrednostima statistički značajno povećanje je dobijeno u maju, avgustu, septembru, oktobru, novembru i decembru, a statistički značajno smanjenje u martu, aprilu, junu i julu. U odnosu na 2014. godinu, 2015. godina se karakteriše nešto nižim vrednostima nivoa oštećenja DNK molekula u martu, junu, julu, avgustu, dok su vrednosti u oktobru, novembru i decembru bile veće, ali ove razlike nisu statistički značajne. Za razliku od prethodne godine kada je oštećenje DNK molekula pozitivno korelisalo sa FE, 2015. godine dobijena je korelacija sa drugom grupom indikatora mikrobiološkog zagađenja, sa TC. Takođe, dobijene su pozitivne korelacije i sa nitritima, rastvorenim gvožđem i niklom.

U Mix uzorcima primećuje se postepeno povećanje TI od proleća do zime. Kao i u slučaju rezultata koji su dobijeni za *B. sowerbyi*, oštećenje DNK molekula 2015. godine bilo je nešto niže nego prethodne godine, sem u oktobru i decembru kada su vrednosti bile veće. TI kod Mix uzorka je pozitivno korelisao sa  $\text{NO}_2^-$ , rastvorenim Fe i antimonom, metaloidom koji se upotrebljava u gašenju požara ili u industriji PET ambalaže. Njegova emisija u životnoj sredini je isključivo rezultat ljudske aktivnosti (WHO, 2003), naročito nakon sagorevanja uglja koji se koristi za rad termoelektrana (Nriagu i Pacyna, 1988). Pored toga, dobijena je negativna korelacija sa acetohlorom, herbicidom za koji dovodi do značajnog oštećenja DNK molekula vrste *Eisenia fetida* (Xiao et al., 2006) što može ukazati da crvi nisu bili pod njegovim uticajem duži vremenski period.

Načelno, ako uporedimo 2014. i 2015. godinu, možemo zaključiti da su ekstremni hidrološki uslovi definitivno imali veliki uticaj na stepen oštećenja DNK molekula, a samim tim i na procenu genotoksičnog potencijala i da ekstremne promene u vodostaju i protoku treba posmatrati kao jedan od vodećih stresora u akvatičnim ekosistemima koji mogu značajno da menjaju uticaj drugih stresora.

**Na lokalitetu Višnjica** istraživanje je rađeno samo tokom 2014. godine. Pošto su se hidrološki uslovi u slivu reke Save tokom 2014. i 2015. godine značajno razlikovali, teško je utvrditi koliki je bio uticaj ekstremnih vrednosti vodostaja na lokalitetu Višnjica. Ovaj lokalitet je pod konstantnim uticajem velike količine otpadnih voda što se može videti na osnovu indikatora fekalnog zagađenja čije razblaženje je bilo evidentno tokom maja. Ovo je verovatno i dovelo do toga da na lokalitetu Višnjica bude zabeležena negativna korelacija između nivoa oštećenja DNK i mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja, brojem *E. coli*, za razliku od lokaliteta Duboko gde je parametar TI kod vrste *B. sowerbyi* pozitivno korelisao sa mikrobiološkim parametrima kvaliteta vode. Rezultati studije Kolarević (2013) su pokazali da prisustvo fekalnog zagađenja na lokalitetima ne implicira direktno i prisustvo genotoksičnog zagađenja već je situacija specifična za svaki lokalitet, u zavisnosti od samog izvora otpadnih voda. Situacija postaje još kompleksnija ako se u obzir uzme i uticaj ekstremnih hidroloških promena.

Oštećenje DNK molekula vrste *B. sowerbyi* bilo je značajno veće u odnosu na referentne vrednosti u junu i avgustu, a u martu je bilo značajno manje. U ostalim mesecima nije zabeleženo značajno odstupanje oštećenja DNK molekula u odnosu na bazalne vrednosti. Povećano oštećenje u junu i avgustu može se pripisati povišenim koncentracijama metala u vodi. U junu bile su detektovane povišene koncentracije Ni, a u avgustu Zn, Cu, Cr i Ni. U Mix uzorcima visoko oštećenje DNK molekula bilo je zabeleženo u februaru, julu i septembru, a niže u martu i oktobru. Tokom februara su zabeležene povišene koncentracije Zn i Cr, a Ni u julu. U septembru nisu zabeležene povišene koncentracije metala u vodi, ali tog meseca desile su se poplave po drugi put te godine. Nivo oštećenja DNK molekula kod Mix uzorka je pozitivno korelisao sa rastvorenim Fe i Al. Ovo podržava teoriju da je na ovom lokalitetu izražen uticaj, ne samo otpadnih voda i organske materije, već i jedinjenja koja dospevaju u akvatične sisteme iz različitih industrija.

Osim polutanata sa kojima je dobijena značajna korelacija, na lokalitetu Višnjica kao značajne polutante treba izdvojiti Zn, Cu, Cr, Cd i Ni za koje su uočene povećane koncentracije u odnosu na preporučene vrednosti od strane Međunarodne komisije za

zaštitu reke Dunav (ICPDR, 2002). U niskim koncentracijama Zn i Cu prirodno se nalaze u vodama kao esencijalnim minerali, a takođe, kao što je već rečeno, imaju i fiziološku ulogu kao kofaktori u enzimima (Hogstrand i Wood, 1996). U većim koncentracijama ovi metali mogu imati toksične i genotoksične efekte na različite akvatične organizme (Eisler, 1998; Conradi i Depledge, 1999). Sinergistički genotoksični efekat ova dva metala na vrsti *Oncorhynchus mykiss* razmatran je u studiji Bagdonas i Vosyline (2006), a na vrsti *Mytilus* sp. u studiji Dixon i sar. (2002). U studiji Williams i Dusenbery (1990) dat je prikaz negativnog uticaja 14 metala, među kojima Cr, Cd i Ni na nematodi *Caenorhabditis elegans*. Takođe, u studiji Vincent-Hubert i sar. (2011) potvrđen je genotoksični uticaj Cd na nasledni materijal *Dreissena polymorpha*.

### **5.1.2. Korelacije sastava zajednice akvatičnih Oligochaeta i nivoa oštećenja DNK molekula kod vrste *B. sowerbyi* i kod Mix uzorka**

Determinacija akvatičnih Oligochaeta podrazumeva korišćenje većeg broja morfoloških karakteristika: anteriorni deo tela (da li je prisutan prisutan ili ne, oči, hete na prednjim segmentima), hete (oblik, broj), ili genitalni sistem (na kom se segmentu nalazi, oblik penijalnih heta, itd.) (Timm, 2009). S obzirom da su ovi organizmi sitni, a taksonomske karakteristike teško uočljive, neophodno je korišćenje mikroskopa za pouzdanu identifikaciju crva, što može dovesti do pojave stresa i do mehaničkih oštećenja kod analiziranih jedinki i na taj način do nepouzdanih, lažno pozitivnih ili negativnih, rezultata u ekogenotoksikološkim istraživanjima. Usled većih dimenzija tela od ostalih tubificidnih vrsta identifikacija vrste *B. sowerbyi* je olakšana, kao i njihova manipulacija prilikom eksperimenta, što čini ovu vrstu pogodnom za ekogenotoksikološke studije (Aborgiba, 2016). Pošto vrsta *B. sowerbyi* nije često prisutna ili je prisutna u malom broju u uzorcima prikupljenih *in situ*, u testiranje su uključene i slučajno izabrane jedinke mešovite zajednice oligoheta (Mix uzorci). Najčešće zastupljene u Mix uzorcima su vrste iz familije Tubificidae: *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *L. udekemianus*, *B. sowerbyi* i *T. tubifex*.

Pošto sastav vrsta u Mix uzorcima nije stalan, bitno je da se utvrdi da li sastav vrsta u ovim uzorcima utiče na rezultate ekogenotoksikoloških ispitivanja, odnosno da li veća ili manja zastupljenost nekih vrsta u uzorcima dovodi po povećanja ili smanjenja oštećenja DNK molekula u mešovitim uzorcima. Za dobijanje korelacija između sastava oligoheta u zajednici i rezultata komet testa korišćeni su sledeći parametri: broj individua određenih vrsta, procentualna zastupljenost određenih vrsta, kao i relativni diverzitet koji je jednak broju stalnih ili često prisutnih vrsta u uzorcima.

Kao što je rečeno, na lokalitetu Duboko nije zabeležena velika raznovrsnost zajednice akvatičnih oligoheta. Od zabeleženih vrsta stalno ili skoro u svim uzorcima prisutne su vrste *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *B. sowerbyi* i *T. tubifex*, dok je *L. udekemianus* bio prisutniji 2014. godine, a *P. hammoniensis* 2015. godine. Broj individua i zastupljenost nabrojanih vrsta, kao i relativni diverzitet korišćeni su za praćenje korelacija sastava zajednice oligoheta i rezultata komet testa.

Statistički značajna pozitivna korelacija za 2014. i 2015. godinu dobijena je između TI Mix uzorka i TI vrste *B. sowerbyi* iz čistih uzoraka. Ova korelacija ukazuje da različite tubificidne vrste reaguju na sličan način na uslove koji vladaju u životnoj sredini. Pozitivna statistički značajna korelacija za 2015. godinu dobijena je i između TI Mix uzorka i broja jedinki *L. claparedeanus*. *L. claparedeanus* tokom 2015. godine bio je manje zastupljen u uzorcima. Pošto su vrednosti oštećenja DNK molekula 2015. godine bile nešto niže nego one iz prethodne godine može se pretpostaviti da je vrsta *L. claparedeanus* osetljivija na negativne promene u životnoj sredini i da je zbog toga oštećenje DNK molekula bilo niže kada je ova vrsta bila manje zastupljena u uzorcima. Uočena je i veza između oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* i broja i zastupljenosti *P. hammoniensis*. Pozitivna korelacija između ovih vrsta može ukazati na sličan odgovor na stresore obzirom na slične ekološke preferencije.

U odnosu na lokalitet Duboko, na lokalitetu Višnjica je zabeležena veća raznovrstnost oligohetne faune. Usled malih dimenzija jedinki iz familije Naididae i Enchytraeidae nisu bile uključene u istraživanja. Za ekogenotoksikološka istraživanja uzete

su u obzir slične vrste kao i na lokalitetu Duboko, *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *L. udekemianus*, *B. sowerbyi*, *T. tubifex* i *P. hammoniensis*. Na lokalitetu Višnjica nisu zabeležene statistički značajne korelacije nivoa oštećenja DNK molekula Mix uzorka i sastava zajednice akvatičnih oligoheta.

Tokom svih uzorkovanja nije primećena veza između diverziteta i brojnosti jedinki različitih vrsta i oštećenja DNK molekula u Mix uzorcima. Diverzitet oligohetne faune se nije menjao sa promenom stresora (poplave, ispuštanje otpadnih voda, spiranje zemljišta), te se može reći da u ovom slučaju oni nisu uticali na diverzitet njihovih populacija i da vrste imaju sličan odgovor na promene u životnoj sredini. Takođe, evidentan je uticaj stresora na oštećenje DNK molekula što ukazuje na podjednaku osetljivost na stresore.

## **5.2. *Ex situ* istraživanja**

Za potrebe *ex situ* istraživanja uspostavljena je laboratorijska kultura vrste *L. udekemianus*. Jedinke ove vrste gajene u kulturi korišćene su za sve eksperimente, kao i za dobijanje bazalnih vrednosti koje su korišćene i kao negativna kontrola. Toksični efekat citostatika, 5 – fluorouracila i etopozida uključio je praćenje preživljavanja adultnih jedinki i ćelija celomocita i hemocita, a genotoksični efekat ovih supstanci praćen je preko nivoa oštećenje molekula DNK u celomocitama i hemocitama. Za proveru eksperimentalnog sistema, kao pozitivna kontrola, korišćen je poznati mutagen CdCl<sub>2</sub>. Svi eksperimenti su rađeni u vodenoj sredini (bez sedimenta) u kojima su crvi bili tretirani tokom 96h:

Kadmijum je izabran kao model mutagen jer je jedan od najtoksičnijih metala sa mutagenim i genotoksičnim efektom (Waalkes, 2003), koji uzrokuje oksidativni stres, sprečava reparaciju DNK molekula (Giaginis i sar., 2006), pravilno odvijanje ćelijske deobe i dovodi do apoptoze (Filipič, 2012).

Jedan od najčešće korišćenih citostatika je 5 – FU. Kao antimetabolit može inhibirati timidilat sintazu ili se može ugrađivati u makromolekule, kakvi su RNK i DNK i na taj način narušiti njihovo normalno funkcionisanje (Longley i sar., 2003).

Etopozid je antineoplastični farmaceutik koji inhibira rad topoizomerase II te dovodi do formiranja dvolančanih prekida, koji ako se ne poprave na kraju rezultiraju apoptozom (Hande, 1998).

### **5.2.1. Efekat CdCl<sub>2</sub>, 5-FU i ET na preživljavanje jedinki i celomocita i hemocita *L. udekemianus***

Toksične koncentracije na nivou jedinki za CdCl<sub>2</sub> detektovane su na koncentraciji od 4 μM (preživljavanje <50 %), dok je na 40 μM dobijen potpuni mortalitet (preživljavanje 0 %). Na koncentraciji od 4 μM uočene su i telesne promene kod crva, odnosno većina jedinki je bila fragmentisana. Ovo se može objasniti procesom autotomije koji je kod tubificidnih vrsta rasprostranjen. Autotomija podrazumeva gubitak repnog dela tela kao reakciju na stres ili kao mehanizam detoksifikacije nakon bioakumulacije metala (Bouché i sar., 2000). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom Maestre i sar. (2009) gde se takođe na većoj koncentraciji (LC<sub>50</sub> 0,4 mg/L Cd odgovara 4 μM CdCl<sub>2</sub>) beleži toksični efekat na adulte *T. tubifex*. U studiji Bouché i sar. (2000) koncentracije koje su dovele do toksičnog efekta nakon 96 h izlaganja bile su niže (LC<sub>50</sub> 0,03 mg/L Cd odgovara 0,3 μM CdCl<sub>2</sub>) u odnosu na koncentracije primenjene u našem istraživanju (LC<sub>50</sub> 0,45 mg/L Cd odgovara 4 μM CdCl<sub>2</sub>).

U slučaju tretmana sa citostatikom 5 – FU, u okviru testiranih koncentracija, nije dobijen toksični efekat na vijabilnost adulta, a nisu uočene ni morfološke promene kod tretiranih životinja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem Gačić i sar. (2014), koje je rađeno na školjkama (*U. pictorum* i *U. tumidus*) kod kojih, takođe, nije smanjeno preživljavanje adulta. I u studiji Kovács i sar. (2016) toksični efekat na preživljavanje adulta vrste *Danio rerio* nije dobijen nakon akutnog testiranja toksičnosti 5 – FU, ali je u



studiji hroničnog testiranja toksičnosti ovog citostatika (Kovács i sar., 2015) dobijeno smanjeno preživljavanje riba u F<sub>1</sub> i u F<sub>2</sub> generaciji na koncentracijama 0,01, 1 i 100 µg/L.

Kao i u slučaju eksperimenta sa 5 – FU, tretman sa ET nije imao toksičan efekat na adultne jedinke i morfološke degradacije tela nisu uočene. Ovi rezultati su u saglasnosti sa studijom Kolarević i sar. (2016) na školjkama, gde su upotrebljene veće koncentracije ET (4,40 i 100 µM ET) nego u našem istraživanju, ali i sa studijom Isidori i sar (2016) na embrionima žabe *Xenopus laevis* (raspon koncentracija 0,0051 – 51 µM), kao i sa studijom na vrsti ribe *Danio rerio* (0,17 mM) (Kovács i sar., 2016).

U istraživanjima u kojima se prate uticaji različitih polutanata i sredinskih faktora na tubificidnim vrstama najčešće se kao krajnji efekti prate preživljavanje crva, kokona, morfološke promene (autotomija), promene u ponašanju ili bioakumulacija određenih polutanata u telu (Keilty i sar., 1988; Bouché i sar., 2000; Ciutat i sar., 2005; Maestre i sar., 2009; Paris-Palacios i sar., 2010). Može se primetiti da je većina ovih efekata vidljiva golim okom i da se lako može evaluirati bez korišćenja komplikovanih metoda. S druge strane, postoji nedostatak literaturnih podataka uticaja različitih polutanata na preživljavanje ćelija.

U ovoj studiji, paralelno sa efektom testiranih jedinjenja na adulte, praćen je i njihov citotoksičan efekat. Citotoksičan efekat veći od 30 %, odnosno preživljavanje ćelija u suspenziji niže od -70 % zabeleženo je na koncentracijama 0,4 i 4 µM za CdCl<sub>2</sub>, 0,4, 4 i 40 µM za 5 – FU i 4 µM za ET. U studijama Gačić i sar., (2014), Kolarević (2014) i Kolarević i sar. (2016) korišćene su slične koncentracije mutagena CdCl<sub>2</sub>, kao i citostatika, 5 – FU i ET, kao i u našem istraživanju, ali za razliku od crva gde je zabeležen citotoksični efekat, kod hemocita školjki ove koncentracije kao i veće (40 i 100 µM) nisu dovele do redukcije vijabilnosti u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima.

### 5.2.2. Efekt CdCl<sub>2</sub>, 5 – FU i ET na nivo oštećenja DNK molekula celomocita i hemocita *L. udekemianus*

Ova studija skreće pažnju i na efekte koji nisu vidljivi golim okom, a koji mogu imati negativni uticaj na genetički materijal, te dovesti do pojava tumora, ali i do negativnih uticaja na čitave populacije smanjenjem reproduktivne sposobnosti jedinki. Genotoksični efekat CdCl<sub>2</sub>, 5 – FU i ET je praćen na jedinkama vrste *L. udekemianus*. Po našim saznanjima ne postoje literaturni podaci uticaja polutanata na integritet DNK molekula tubificidnih vrsta, te se rezultati dobijeni u ovoj studiji moraju upoređivati sa podacima koji su dobijeni kod drugih grupa organizama.

Prema literaturnim podacima uticaj kadmijuma na tubificide ispitan je u okviru toksikoloških studija (Rodriguez i Reynoldskon, 2011), dok njegov genotoksični potencijal na ovim vrstama nije analiziran. U ovoj ekogenotoksikološkoj studiji sve ispitivane koncentracije su dovele do značajnog povećanja oštećenja DNK molekula u odnosu na negativnu kontrolu. Upoređivanjem sa školjkama, kod kojih koncentracije od 40 i 100 µM dovode do značajnog oštećenja DNK molekula (Kolarević, 2016), dok na nižim koncentracijama nije zabeležeo značajno povećanje oštećenja. Može se reći da je tubificidna vrsta *L. udekemianus* osetljivija na uticaj ovog mutagena, pošto je dobijeno značajno veće oštećenje i na koncentracijama koje su 10.000 puta manje od onih korišćenih u pomenutoj studiji na školjkama. Rezultatima istraživanja uticaja CdCl<sub>2</sub> na integritet DNK molekula *L. udekemianus* treba dati značaj, s obzirom da se u toksikološkim istraživanjima skreće pažnja na toksične koncentracije koje su veće od onih korišćenih u ovoj studiji, a da je u ovoj studiji pokazano da i niže koncentracije koje ne dovode do spoljnih vidljivih oštećenja, a mogu dovesti do negativnih promena na genetičkom materijalu ako se ne poprave, mogu biti jednako štetne po ovaj organizam.

5 – FU je antimetabolitni citostatik koji sprečava sintezu DNK molekula inhibicijom timidilat sintaze i inkorporacijom metabolita ovog citostatika u RNK i DNK molekulima (Longley i sar., 2003), čime se narušava stabilnost DNK lanca dovodeći na kraju do apoptoze. Oštećenje DNK molekula koje je nastalo usled uticaja svih testiranih

koncentracija 5 – FU bilo je značajno povećano u odnosu na negativnu kontrolu. Iako je najniža testirana koncentracija (0,004  $\mu\text{M}$ /0,52  $\mu\text{g/L}$ ) viša od onih koje su predviđene odgovarajućim standardima za životnu sredinu (*predicted environmental concentration* – PEC <0,54 ng/L) (Kosjek i sar., 2013), mora se napomenuti su u ovim istraživanjima životinje testirane 96 h, a da su u životnoj sredini životinje izložene različitim agensima duži vremenski period, te se mora dati značaj i ovim koncentracijama koje su za kratko vreme imale negativan uticaj na integritet DNK molekula. Crvi su i ovaj put pokazali veću osetljivost na uticaj citostatika nego, na primer školjke (Gačić i sar., 2014; Kolarević i sar., 2016), ili ribe na kojima nisu bili nastavljeni eksperimenti kada doza od 100 mg/L nije dovela do uticaja na njihovo preživaljvanje (Kovács i sar., 2016).

ET je biljni alkaloid koji inhibira topoizomerazu II što na kraju rezultuje prekidom DNK lanca (Liu, 1989). Sa izuzetkom najniže koncentracije, ET je na ostalim koncentracija doveo do značajno povećanog oštećenja DNK molekula. Koncentracije ovog citostatika u otpadnim vodama bolnica (Catastini i sar., 2008; Yin i sar., 2010; Martin i sar., 2011) su daleko niže nego efektivne koncentracije koje su korišćene u ovom istraživanju (najniža efektivna koncentracija je 0,04  $\mu\text{M}$ /23,54  $\mu\text{g/L}$ ). Iz ovoga se može zaključiti da koncentracije koje su relevantne za životnu sredinu ne mogu dovesti do značajnog povećanja oštećenja DNK molekula vrste *L. udekemianus*.

# ZAKLJUČCI

## 6. ZAKLJUČCI

U odnosu na postavljene ciljeve i dobijene rezultate, izdvajamo najznačajnije zaključke ovog rada:

- Na osnovu mikrobioloških parametara kvaliteta vode lokalitet Duboko, tokom 2014. i 2015. godine se karakterisao II i III klasom, a lokalitet Višnjica tokom 2014., III i IV klasom kvaliteta vode.
- Na lokalitetu Duboko koncentracije cinka, bakra, hroma, olova i nikla su bile više od koncentracija preporučenih od Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav.
- Na lokalitetu Višnjica koncentracije cinka, bakra, hroma i nikla su bile više od koncentracija preporučenih od Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav dok su vrednosti za kadmijum bile na granici maksimalnih preporučenih vrednosti
- Na oba lokaliteta detektovane su korelacije mikrobioloških sa fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode
- Uticaj poplava tokom 2014. godine potvrđen je na oba lokaliteta statistički značajnom korelacijom vodostaja i organskih zagađivača koji se koriste u poljoprivredi (nitrati, fosfati i pesticidi), kao i korelacijom vodostaja i metala i metaloida karakterističnih za pepelišta.
- Na lokalitetu Duboko tokom 2015. godine zabeležena je veća raznovrstnost oligohetne faune u odnosu na 2014. godinu. Dominantna je bila familija Tubificidae sa vrstama *L. hoffmeisteri* i *L. claparedeanus*. Lokalitet Višnjica karakterisao se većim diverzitetom oligoheta u poređenju sa lokalitetom Duboko. Na Višnjici su, pored familije Tubificidae, koja je bila dominantna, zabeležene i vrste iz familije

Naididae i Enchytraidae. Na lokalitetu Višnjica, takođe, bila je dominantna familija Tubificidae, sa vrstama *L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus* i *T. tubifex*.

- Visoka zastupljenost (> 90 %) familije Tubificidae u uzorcima ukazuje da oba lokaliteta imaju loš/veoma loš ekološki potencijal (IV-V klasa) i da lokaliteti trpe veliki pritisak organskog zagađenja. Saprobní indeks i BMWP skor svrstava ove lokalitete u IV-V klasu, a indeks diverziteta i ukupan broj taksona u III-IV klasu.
- Stabilne laboratorijske kulture *B. sowerbyi* i *L. udekemianus* su uspešno uspostavljene. Iz laboratorijske kulture vrste *B. sowerbyi* dobijene su referentne vrednosti oštećenja DNK molekula za *in situ*, a iz kulture vrste *L. udekemianus* bazalne vrednosti oštećenja DNK molekula, korišćene kao negativna kontrola, u *ex situ* istraživanjima.
- Protokol za izolaciju ćelija celomske tečnosti (celomocite) i krvnog sistema (hemocite) kao i komet test na ovim ćelijama je uspešno prilagođen za grupu akvatičnih Oligochaeta.
- Prikazana je osetljivost celomocita i hemocita vrste *B. sowerbyi* da detektuje sredinski stres u *in situ* uslovima.
- Pokazana je osetljivost celomocita i hemocita iz mešovitog uzorka akvatičnih oligoheta (*L. hoffmeisteri*, *L. claparedeanus*, *L. udekemianus*, *B. sowerbyi* i *T. tubifex*) da detektuju sredinski stres u uslovima *in situ*.
- Postoji statistički značajna korelacija između oštećenja DNK molekula *B. sowerbyi* i Mix uzorka sa mikrobiološkim, fizičko-hemijskim i hemijskim parametrima kvaliteta vode na oba lokaliteta.

- Na lokalitetu Duboko tokom 2014. i 2015. godine zabeležene su statistički značajne korelacije parametra TI *B. sowerbyi* i TI Mix, što ukazuje na sličan odgovor različitih vrsta na uslove koji vladaju u životnoj sredini. Značajna negativna korelacija Ti Mix uzorka i broja jedinki *L. clapparedeanus* ukazuje na veću osetljivost ove vrste na stresore.
- Citostatici 5-fluorouracil i etopozid, i CdCl<sub>2</sub>, u okviru koncentracija koje se ne smatraju toksičnim, indukovali su oštećenja DNK molekula kod vrste *L. udekemianus* u *ex situ* istraživanjima.
- Koncentracije citostatika koje su dovele do oštećenja DNK molekula vrste *L. udekemianus* više su od onih koncentracija u kojima se ovi farmaceutici javljaju u površinskim vodama. Bitno je posvetiti posebnu pažnju farmaceuticima kao zagađivačima, s obzirom da su organizmi u životnoj sredini pod njihovim uticajem duži vremenski period.
- Osetljivost akvatičnih oligoheta za detekciju genotoksičnog potencijala u *in situ* i *ex situ* istraživanjima potvrđena je na osnovu dobijenih rezultata, zato se može zaključiti da je primena komet testa na ovoj grupi makroinvertebrata u ekogenotoksikološkoj proceni uticaja stresora u akvatičnim ekosistemima dobar eksperimentalni sistem.

# LITERATURA



## 7. LITERATURA

- 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.
- Adriano, D.C., Page, A.L., Elseewi, A.A., Chang, A.C., Straugan, I. (1980). Utilization and disposal of flay ash and other coal residues in terrestrial ecosstems: a review. *J. Environ. Qual.* 9, 333-344.
- AQEM (2002), Manual for the apppppplication of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0.
- Armitage, P.D., Moss, D., Wright, J.F., Furse, M.T. (1983). The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water research*, 17(3), 333-347.
- Asmuß, M., Mullenders, L.H., Hartwig, A. (2000). Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicology letters*, 112, 227-231.
- Atanacković, A. (2015). Akvatične oligohete (Annelida, Clitellata, Oligochaeta) u različitim tipovima tekućih voda u Srbiji. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Atanacković, A., Jakovčev-Todorović, D., Simić, V., Tubić, B., Vasiljević, B., Gačić, Z., Paunović, M. (2011). Oligochaeta community of the main Serbian waterways. *Water Research and Management*, 1(1), 47-54.
- Atanacković, A., Šporka, F., Csányi, B., Vasiljević, B., Tomović, J., Paunović, M. (2013). Oligochaeta of the Danube River—a faunistical review. *Biologia*, 68(2), 269-277.

- Back, H. (1990). Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia*, 85(2), 226-232.
- Bagdonas, E., Vosyliene, M.Z. (2006). A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologia* 1, 8-13.
- Bailey, C.R., Norris, H.R., Reynoldson, B.T. (2004). Bioassessment of Freshwater Ecosystems. Using the Reference Condition Approach. Editor: Robert C. Bailey, Richard H. Norris and Trefor B. Reynoldson. Springer Science + Business Media, LLC
- Beran, L. (2009). Vodni měkkyši ČR. Reegionalni centrum ČSOP, Vlašim.
- Birk, S., Hering, D. (2009). A new procedure for comparing class boundaries of biological assessment methods: a case study from the Danube Basin. *Ecological Indicators*, 9 (3), 528-539.
- Bouché, M.L., Biagianti-Risbourg, S., Arzac, F., Vernet, G. (1999). An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquatic toxicology*, 45 (1), 9-17.
- Bouché, M.L., Habets, F., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. (2000). Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 46 (3), 246-251.
- Bouché, M.L., Arnoult, F., Vernet, G. (2003). Caudal regeneration in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) following copper exposure. *Invertebrate Biology*, 122 (1), 42-51.
- Brinkhurst, R.O. (1971). A Guide for the Identification of British aquatic Oligochaeta. Kendal, Wilson: Freshwater Biological.
- Brinkhurst, R.O., Jamieson, B.G. (1971). Aquatic Oligochaeta of the world. University of Toronto Press, Toronto.

- Brinkhurst, R.O., Chapman, P.M., Farrell, M.A. (1983). A comparative study of respiration rates of some aquatic oligochaetes in relation to sublethal stress. *Hydrobiologia* 68, 683–699.
- Brinkhurst, R.O., Gelder, S.R. (2001). *Annelida: Oligochaeta, including Branchiobdellidae*. In: *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*, second edition (Thorp, J.H., Covich, A.P. Eds), Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Brousseau, P., Fugère, N., Bernier, J., Coderre, D., Nadeau, D., Poirier, G., Fournier, M. (1997). Evaluation of earthworms exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol Biochem*, 29, 681-684.
- Brungs, W. (1973). Effects of Residual Chlorine on Aquatic Life. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 45 (10), 2180-2193.
- Buffagni, A., Erba, S., Cazzola, M., Kemp, J. L. (2004). The AQEM multimetric system for the southern Italian Apennines: assessing the impact of water quality and habitat degradation on pool macroinvertebrates in Mediterranean rivers. In *Integrated Assessment of Running Waters in Europe*, pp. 313-329. Springer Netherlands.
- Caldeira-de-Araújo, A., Dantas, F.J.S., Moraes, M.O., Felzenszwalb, I., Bernardo-Filho, M. (1996). Stannous chloride participates in the generation of reactive oxygen species. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 48, 109-113.
- Cameron, G. R., 1932. Inflammation in earthworms. *J. Pathol. Bacteriol.* 35, 933–973.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME) (2014). In *Canadian Environmental Quality Guidelines 1999*. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment. *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Cadmium*.

- Carlisle, D. M., Hawkins, C. P., Meador, M. R., Potapova, M., Falcone, J. (2008). Biological assessments of Appalachian streams based on predictive models for fish, macroinvertebrate, and diatom assemblages. *Journal of the North American Benthological Society*, 27 (1), 16-37.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, C. (2002). Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179 (1), 37-50.
- Catastini, C., Mullot, J.U., Boukari, S., Mazellier, P., Levi, Y., Cervantes, P., Ormsby, J. N. (2008). Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *European Journal of Water Quality*, 39, 171-180.
- Caza, N.M. (1998). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. University of Windsor, Electronic Theses and Dissertations.
- Chan, Y.J., Chong, M.F., Law, C L., Hassell, D.G. (2009). A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 155 (1), 1-18.
- Chatarpaul, L., Robinson, J. B., & Kaushik, N. K. (1980). Effects of tubificid worms on denitrification and nitrification in stream sediment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(4), 656-663.
- Ciutat, A., Gerino, M., Mesmer-Dudons, N., Anschutz, P., Boudou, A. (2005). Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60 (3), 237-246.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997). The Comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 375, 183-193
- Conradi, M., Depledge, M.H. (1999). Effects of zinc on the life-cycle, growth and reproduction of the marine amphipod *Corophium volutator*. *Marine Ecology Progress Series*, 176, 131-138.

- Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., Delmas, F. (2009). Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators*, 9 (4), 621-650.
- Davi, M.L., Gnudi, F. (1999). Phenolic compounds in surface water. *Water Research*, 33, 3213-3219.
- De Jong, Y.S.D.M. (2013). Fauna Europea version 2.6. Dostupno na adresi <http://www.faunaeur.org>
- Deutschmann, B., Kolarević, S., Brack, W., Kaisarević, S., Kostić, J., Kračun-Kolarević, M., Liska, I., Paunović, M., Seiler, T.B., Shao, Y., Šipoš, S., Slobodnik, J., Teodorović, I., Vuković-Gačić, B., Hollert, H. (2016). Longitudinal profile of the tenotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. *Science of The Total Environment*, 573, 1441-1449.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N. (2002). Marine invertebrate ecogenotoxicity: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 495-507.
- Eisler, R. (1998). Copper Hazards to Fish, Wildlife and Invertebrates: A Synoptic Review. Biological Science Report USGS/BRD/BRS-1997-0002. Geological Survey Washington DC.
- Engelmann, P., Kiss, J., Csöngéi, V., Cooper, E. L., Németh, P. (2004). Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells *in vitro*. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 61 (1), 215-227.
- Evens, E., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermade, P., Perrodin, Y. (2004). Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environmental International*, 30, 891-900.

- Fausch, K. D., Lyons, J. O. H. N., Karr, J. R., Angermeier, P. L. (1990). Fish communities as indicators of environmental degradation. In American Fisheries Society Symposium, 8, 123-144.
- Filipič, M. (2012). Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat. Res./Fund. Mol. M.* 733, 69-77.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (1), 272-280.
- Fukuhara, H., Kikuchi, E., & Kurihara, Y. (1980). The effect of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae) on bacterial populations in submerged ricefield soil. *Oikos*, 88-93.
- Gačić, Z., Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., & Vuković-Gačić, B. (2014). The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environmental Pollution*, 191, 145-150.
- Gajić, G., Djurdjević, L., Kostić, O., Jarić, S., Mitrović, M., Stevanović, B., Pavlović, P. (2016). Assessment of the phytoremediation potential and an adaptive response of *Festuca rubra* L. sown on flay ash deposits: Native grass has a pivotal role in ecorestoration management. *Ecological Engineering* 93, 250-261.
- Gerhardt, A. (2002). Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Environmental Monitoring I. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO Eolss Publishers, Oxford.
- Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 213(3), 282-290.
- Glöer, P., Meier-Brook, C. (2003). Süßwassermollusken: Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. DJN, Hamburg, 138.

- Godet, F., Babut, M., Burnel, D., Veber, A.M., Vasseur, P. (1996). The genotoxicity of iron and chromium in electroplating effluents. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 370, 19-28.
- Godišnji bilten za Srbiju za 2014. godinu (2014). Republički hidrometeorološki zavod Srbije Republike Srbije (RHMZ).
- Granato, G. (1996). Deicing chemicals as source of constituents of highway runoff. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, (1533), 50-58.
- Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., Nigro, M. (2010). Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology* 100, 75-83.
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessment. *Environ Sci Technol* 42, 5807-5813.
- Hande, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European journal of cancer*, 34 (10), 1514-1521.
- Hendawi, M., Sauve, S., Ashour, M., Brousseau, P., Fournier, M. (2004). A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Safe*, 59, 17-22.
- Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barceló, D. (2008). Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research* 42, 3315-3326.
- Ho, E. (2004). Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(10), 572-578.

- Hogstrand, C., Wood, C.M. (1996). Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches. Cambridge University Press, Cambridge, England, 61-83.
- Houk, V.S., Waters, M.D. (1996). Genetic toxicology and risk assessment of complex environmental mixtures. *Drug Chem Toxicol*, 19, 187-219.
- Hussain, T., Shukla, G.S., Chandra, S.V. (1987). Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacology and toxicology*, 60 (5), 355-358.
- Hynes, H.B.N. (1960) The biology of polluted waters. Liverpool University Press, Liverpool, UK
- Hynes, R.J. (2009). Reclamation and revegetation of fly ash disposal sites – challenges and research needs. *J. Environ. Manage.*, 90, 43-53.
- ICPDR (2002). Water Quality in the Danube River Basin. TNMN Yearbook 2002. [http://www.icpdr.org/icpdr-pages/tnmn\\_yearbooks.htm](http://www.icpdr.org/icpdr-pages/tnmn_yearbooks.htm)
- ICPDR (2015). Joint Danube Survey 3. A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. Editors: Igor Liška, Franz Wagner, Manfred Sengl, Karin Deutsch and Jaroslav Slobodnik. ICPDR – International Commission for the Protection of the Danube River.
- Irizar, A., Duarte, D., Guilhermino, L., Marigómez, I., Soto, M. (2014). Optimization of NRU assay in primary cultures of *Eisenia fetida* for metal toxicity assessment. *Ecotoxicology*, 23 (7), 1326-1335.
- Isidori, M., Piscitelli, C., Russo, C., Smutná, M., Bláha, L. (2016). Teratogenic effects of five anticancer drugs on *Xenopus laevis* embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133, 90-96.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2002). Altered sexual maturation and gamete production in wild roach



(*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod*, 66, 272-281.

Joy, M. K., Death, R. G. (2002). Predictive modelling of freshwater fish as a biomonitoring tool in New Zealand. *Freshwater Biology*, 47 (11), 2261-2275.

Kapetanović, D., Vardić Smrzlić, I., Valić, D., Teskeredžić, E., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Kračun-Kolarević, M., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2015). Microbial Characterisation of the Sava River. In *The Sava River*, Editors: Milačić, R., Ščančar, J., Paunović, M.; Springer Heidelberg New York Dordrecht London.

Kavka, G., Poetsch, E. (2002). Joint Danube Survey: Microbiology. Technical Report of the International Commission for the Protection of the Danube River, 138-155.

Keilty, T.J., White, D.S., Landrum, P.F. (1988). Sublethal responses to endrin in sediment by *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae), and in mixed-culture with *Stygodrilus heringianus* (Lumbriculidae). *Aquatic Toxicology*, 13, 227-250.

Khetan, S.K., Collins, T.J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem Rev*, 107, 2319-2364.

Kirschner, A.K.T., 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, 3673-3684.

Kolarević, S. (2014). Primena komet testa na slatkovodnim školjkama *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758), *Unio tumidus* (Philipsson, 1788) i *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) u ekogenotoksikološkoj proceni akvatičnih ekosistema. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Kolarević, S., Gačić, Z., Kostić, J., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2016). Impact of Common Cytostatics

- on DNA Damage in Freshwater Mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. Clean Soil Air Water 44, 1471-1476.
- 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, 243-251.
- Korišćenje i tretman komunalnih i industrijskih otpadnih voda u republici srbiji. Central European Development Forum (CEDEF), 2015. <http://www.cedeforum.org>
- Kosjek, T., Perko, S., Žigon, D., Heath, E. (2013). Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. Journal of Chromatography A, 1290, 62-72.
- 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.
- Kovács, R., Bakos, K., Urbányi, B., Kövesi, J., Gazsi, G., Csepeli, A., János Appl, A., Bencsic, D., Csenki, Z., Horváth, A. (2016). Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. Environ Sci Pollut Res 23 (15), 14718-14729.
- Kovács, R., Csenki, Z., Bakos, K., Urbányi, B., Horváth, A., Garaj-Vrhovac, V., Gajski, G., Gerić, M., Negreira, N., López de Alda, M., Barceló, D., Heath, E., Kosjek, T., Žegura, B., Novak, M., Zajc, I., Baebler, Š., Rotter, A., Ramšak, Ž., Filipić, M. (2015). Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. Water research, 77, 201-212.
- Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Atanacković, A., Marković, V., Gačić, Z., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2015). Effects of 5-Fluorouracil, Etoposide and CdCl<sub>2</sub> in Aquatic Oligochaeta *Limnodrilus udekemianus* Claparede (Tubificidae) Measured by Comet Assay. Water Air Soil Pollut, 226:242.

- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45, 957-969.
- Labieniec, M., Gabryelak, T., Falcioni, G. (2003). Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 539 (1), 19-28.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Saint Denis, M., Ribera, D. (1999). Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 36 (2), 167-178.
- Lacorte, S., Barcelo, D. (1994). Rapid degradation of fenitrothion in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1159-1163.
- Lagauzère, S., Terrail, R., Bonzom, J. M. (2009). Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72 (2), 527-537.
- Lanças, F., Olivares, I., Alves, P. (2007). Development, validation and application of a method to analyze phenols in water samples by solid phase micro extraction-gas chromatography-flame ionization detector. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42 (5), 491-498.
- Lenat, D. R., Barbour, M. T. (1994). Using benthic macroinvertebrate community structure for rapid, cost-effective, water quality monitoring: rapid bioassessment. *Biological monitoring of aquatic systems*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 187-215.
- Li, L., Zheng, B., Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia environmental sciences* 2, 1510-1524.

- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Sevos, M., Beland, M., Seto, P. (2006). Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*, 367, 544-558.
- Liu, L.F. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 351-375.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3 (5), 330-338.
- Lucić, A., Paunović, M., Tomović, J., Kovačević, S., Zorić, K., Simić, V., Atanacković, A., Marković, V., Kračun-Kolarević, M., Hudina, S., Lajtner, J., Gottstein, S., Milošević, Đ., Anđus, S., Žganec, K., Jaklič, M., Simičič, T., Vilenica, M. (2015). Aquatic Macroinvertebrates of the Sava River. In *The Sava River*, Editors: Milačić, R., Ščančar, J., Paunović, M.; Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
- Lupetii, K.O., Rocha, F.R.P., Fatibello-Filho, O. (2004). An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. *Talanta* 62 (3), 463-467.
- Maestre, Z., Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P. (2009). Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(8), 2083-2089.
- Marković, V. (2014). Morfološka varijabilnost i distribucija roda *Theodoxus* Montfort, 1819 (Neritomorpha, Gastropoda) u centralnom delu Balkanskog poluostrva i na južnom obodu Panonske nizije. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Marrs, J., Wilkie, I.C., Sköld, M., Maclaren, W.M., McKenzie, J.D. (2000). Size-related aspects of arm damage, tissue mechanics and autotomy in the star fish *Asterias rubens*. *Marine Biol* 137,59–70.

- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E. (2011). Simultaneous determination of a selected group of cytostatic drugs in water using high-performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of separation science*, 34 (22), 3166-3177.
- Martin, M.H., Coughtrey, P.J. (1982). *Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution*, Applied Sci. Pub. London, 475.
- Martin, P., Martinez-Ansemil, E., Pinder, A., Timm, T., Wetzel, M.J. (2008). Global diversity of oligochaetous clitellates („Oligochaeta“; Clitellata) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 117-127.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1), 41-47.
- Matisoff, G., Wang, X., & McCall, P.L. (1999). Biological redistribution of lake sediments by tubificid oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *Journal of Great Lakes Research*, 25(1), 205-219.
- Mihaljević, Z., Ternjej, I., Stanković, I., Kerovec, M., Kopjar, N. (2009). Application of the comet assay and detection of DNA damage in haemocytes of medicinal leech affected by aluminium pollution: A case study. *Environmental Pollution*, 157(5), 1565-1572.
- Millward, R.N., Fleeger, J.W., Reible, D.D., Keteles, K.A., Cunningham, B.P., Zhang, L. (2001). Pyrene bioaccumulation, effects of pyrene exposure on particle-size selection and fecal pyren content in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae, Oligochaeta). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1359-1366.
- Munn, R.E. (1973). *Global Environmental Monitoring System (GEMS). Action Plan for Phase I*. Consultant appointed by SCOPE to the UN Inter-Agency Working Group on

- Monitoring, Commission on Environmental Monitoring and Assessment, Scope Report 3, Toronto, Canada, pp. 67.
- Nascimento, H.L.S., Alves, R.G. (2008). Cocoon production and hatching rates of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta: Tubificidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 25 (1), 16-19.
- Navarro-Ortega, A., Acuña, V., Bellin, A., Burek, P., Cassiani, G., Choukr-Allah, R., ... & Grathwohl, P. (2015). Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA project. *Science of the Total Environment* 503, 3-9.
- Nehls, S., Segner, H. (2005). Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environ Toxicol Chem*, 24, 2078-2087.
- Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Kadri, M., Guiraud, P. (2011). Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicology in Vitro*, 25 (1), 191-198.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.
- O’Gara, B. A., Bohannon, V. K., Teague, M. W., Smeaton, M. B. (2004). Copper-induced changes in locomotor behaviors and neuronal physiology of the freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Aquatic toxicology*, 69 (1), 51-66.
- Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., Porcher, J. P. (2002). Development and validation of a fish-based index for the assessment of ‘river health’ in France. *Freshwater Biology*, 47 (9), 1720-1734.
- OECD (2008). Test No. 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. Organization for Co-Operational Development, Publishing, Paris.

- Oertel, N., Salánki, J. (2003). Biomonitoring and bioindicators in aquatic ecosystems. In: Modern trends in applied aquatic ecology, Eds. Ambasht, R.S., Ambasht, N.K., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 219-246.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res*, 567, 109-149.
- Paris-Palacios, S., Mosleh, Y. Y., Almohamad, M., Delahaut, L., Conrad, A., Arnoult, F., Biagianni-Risbourg, S. (2010). Toxic effects and bioaccumulation of the herbicide isoproturon in *Tubifex tubifex* (Oligocheata, Tubificidae): a study of significance of autotomy and its utility as a biomarker. *Aquatic Toxicology*, 98 (1), 8-14.
- Park, S.Y., Lee, S.W., Choi, J. (2006). Evaluation of genetic toxicity from environmental pollutants in *Daphnia magna* and *Chironomus tentans* for application in ecological risk assessment. *Environ Eng Res*, 11, 277-284.
- Paunović, M. (2007). Struktura zajednica makroinvertebrata kao indikator tipova tekućih voda Srbije. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Paunović, M., Jakovčev-Todorović, D., Simić, V., Stojanović, B., Cakić, P. (2007). Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429-925), *Biologia, Bratislava*, 62, 1-9.
- Pavlica, M., Klobučar, G., Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D. (2001). Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.* 490, 209-214.
- Pfleger, V. (1998). *A Field Guide in Colour to Molluscs*. Blitz Editions.
- Pont, D., Hugueny, B., Beier, U., Goffaux, D., Melcher, A., Noble, R., Schmutz, S. (2006). Assessing river biotic condition at a continental scale: a European approach using functional metrics and fish assemblages. *Journal of Applied Ecology*, 43(1), 70-80.
- Popović, N. (2014). Ekološka analiza zajednica slatkovodnih makrobeskičmenjaka tri tipa tekućih voda na području Beograda. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- Prygiel, J., Coste, M. (1999). Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France. Use of Algae for Monitoring Rivers III. Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai, 165-179.
- Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M., Kalaiseivi, K. (2003). Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ Mol Mutagen*, 41, 85-91.
- Raković, M. (2015). Diverzitet mekušaca Dunava (1260-863,5 rkm) i taksonomska analiza rodova *Planorbarius*, *Radix*, *Physella* i *Ferrissia* (Pulmonata: Basommatophora). Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Rasmussen, E. (1953). Asexual reproduction in *Pygospio elegans* Claparède (Polychaeta sedentaria). *Nature* 171, 1161-1162.
- Redeker, E. S., Van Campenhout, K., Bervoets, L., Reijnders, H., Blust, R. (2007). Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environmental pollution*, 148 (1), 166-175.
- 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 tracing with sampling guided by hydrological catchment dynamics. *Environmental Microbiology* 10, 2598-2608.
- RHMZ (2014). Hidrološki godišnjak-1. Površinske vode za 2014. godinu. Republički hidrometeorološki zavod Srbije Republike Srbije.
- RHMZ (2015). Hidrološki godišnjak-1. Površinske vode za 2014. godinu. Republički hidrometeorološki zavod Srbije Republike Srbije.
- Rigonato, J., Mantovani, M. S., Jordão, B. Q. (2005). Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology*, 28 (3), 464-468.



- Rodriguez, P., Reynoldson, T.B. (2011). The pollution biology of aquatic oligochaetes. London: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Rompre, A.P., Sevais, J., Baudart, M., Roubin, R., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* 49, 31-54.
- Rosenberg, D.M. (1998). A national aquatic ecosystem health program for Canada: We should go against the flow. *Bull. Entomol. Soc. Can*, 30(4), 144-152.
- Rosenberg, D.M., Resh, V. H. (1993). Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Chapman & Hall, New York
- Salzet, M., Tasiemski, A., Cooper, E. (2006). Innate immunity in lophotrochozoans: the annelids. *Current pharmaceutical design*, 12 (24), 3043-3050.
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P., Fournier, M. (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52 (1), 21-29.
- Scuri, S., Torrisi, M., Cocchioni, M., Dell'Uomo, A. (2006). The European Water Framework Directive 2000/60/EC in the evaluation of the ecological status of watercourses. Case study: the river Chienti (central Apennines, Italy). *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 34(5), 498-505.
- Shannon, C.E., Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. The Univ. Of Illinois, Press, Urbana, IL.
- Shugart, L., Theodarkis, C. (1994). Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. *Environ. Health.Prospect.* 102, 13-17.
- Shuval, H.I., Gruener, N. (1972). Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment. *American journal of public health*, 62, 1045-1052.

- Shuval, H.I., Gruener, N. (1972). Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment. *American journal of public health*, 62, 1045-1052.
- Simonović, P., Simić, V., Simić, S., Paunović, M. (2010). The Danube in Serbia. Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management – Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research „Siniša Stanković“, University of Kragujevac, Faculty of Science, 339.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-191.
- Službeni glasnik Republike Srbije (2010). Zakon o vodama br. 30/10
- Službeni glasnik RS (2007). Pravilnik o metodologiji za izradu integralnog katastra zagađivača br. 94/2007
- Službeni glasnik RS (2011). Pravilnik o parametrima hemijskog i ekološkog statusa br. 74/2011.
- Smith, J.F., David, L. (1995). The ecological consequences of limb damage and loss in decapod crustaceans: A review and prospectus. *Exp Mar Biol Ecol* 193,197–223.
- Sobkowiak, R., Lesicki, A. (2009). Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug and chemical toxicology*, 32 (3), 252-257.
- Soininen, J., Könönen, K. (2004). Comparative study of monitoring South-Finnish rivers and streams using macroinvertebrate and benthic diatom community structure. *Aquatic Ecology*, 38 (1), 63-75.
- SPSS Inc. (2011). *IMB SPSS statistics for Windows*, version 20.0. Inc., Chicago, IL, USA.
- Squier M.K., Cohen J.J. (2001) Standard quantitative assays for apoptosis. *Molecular biotechnology*, 19: 305-312.

- StatSoft Inc. (2001) STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa OK: StatSoft, Inc. <http://www.statsoft.com>.
- Statzner, B., Bis, B., Dolédec, S., Usseglio-Polatera, P. (2001). Perspectives for biomonitoring at large spatial scales: a unified measure for the functional composition of invertebrate communities in European running waters. *Basic and Applied Ecology*, 2(1), 73-85.
- Stephenson, J. (1930). *The Oligochaeta*. Clarendon Press, Oxford
- 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.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Vignjević, G., Bolarić, B., Klobučar, G. (2009). Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*. *Ecotoxicology* 18, 430-439.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.E. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Timm, T. (1999). *A Guide to the Estonian Annelida*. Estonian Academy Publishers.
- Timm, T. (2009). A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. *Lauterbonia: International Journal of Faunistics and Floristics of European Inland Waters*, 66. Erik Mauch Verlag, Dinkelscherben.
- Tomović, J. (2015). *Ekologija, biodiverzitet i konzervacija slatkovodnih školjki familije Unionidae u Srbiji*. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- Torrise, M., Scuri, S., Dell'Uomo, A., Cocchioni, M. (2010). Comparative monitoring by means of diatoms, macroinvertebrates and chemical parameters of an Apennine watercourse of central Italy: The river Tenna. *Ecological Indicators*, 10(4), 910-913.
- van Haaren, T., Scoors, J. (2013). Aquatic oligochaetes of the Netherlands and Belgium. KNNV Publishing, Zeist, The Netherlands.
- Van Maanen, J.M.S., Retel, J., De Vries, J., Pinedo, H.M. (1988). Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *Journal of the National Cancer Institute*, 80 (19), 1526-1533.
- Vincent-Hubert, F., Arini, A., Gourlay-France, C. (2008). Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B(a)P and combination of B(a)P and Cd. *Mut. Res. Genetic Toxicol. Environ. Mutagen.* 723, 26-35.
- Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3630-3634.
- Vis, C., Hudon, C., Cattaneo, A., Pinel-Alloul, B. (1998). Periphyton as an indicator of water quality in the St Lawrence River (Quebec, Canada). *Environmental Pollution*, 101(1), 13-24.
- von der Ohe, P. C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R. U., ... & Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2064-2077.
- 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*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.213>

- Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. (2014). Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress. *Hydrobiologia* 735, 221-231.
- Waalkes, M.P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation research* 10, 107-120.
- Wallach, R. (1991). Runoff contamination by soil chemicals: Time scale approach. *Water resources research*, 27(2), 215-223.
- Wang, X., & Matisoff, G. (1997). Solute transport in sediments by a large freshwater oligochaete, *Branchiura sowerbyi*. *Environmental science & technology*, 31(7), 1926-1933.
- WFD (2000). Water Framework Directive – Directive of European Parliament and of the Council 2000/60/EC – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy.
- Whitton, B.A., & Rott, E. (Eds.). (1996). Use of algae for monitoring rivers II. Institut für Botanik. Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria.
- WHO/SDE/WSH (2003). Antimony in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization publication.
- Williams, P.L., Dusenbery, D.B. (1990). Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 1285-1290.
- Wright, D.A., Welbourn, P. (2002). *Environmental toxicology* (Vol. 11). Cambridge University Press.
- Xiao, N.W., Song, Y., Ge, F., Liu, X.H., Ou-Yang, Z.Y. (2006). Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere*, 65 (6), 907-912.

- Yin, J., Shao, B., Zhang, J., Li, K. (2010). A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 84 (1), 39-45.
- Zelinka, M., & Marvan, P. (1961). Zur präzisierung der biologischen klassifikation der reinheit fließender gewässer, *Arch. Hydrobiol*, 57(3), 389-407.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta* 606, 135-150.
- Zorić, K. (2015). Invazivnost alohtonih vrsta makroinvertebrata i riba Dunava. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

# **PRILOG**

PRILOG 1

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri na lokalitetu Ostružnica tokom 2014. godine

Lokalitet	Ostružnica desna obala											
	2014											
Godina	januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
Meseci	januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
Temperatura vode (°C)	10	10.2	11.6	18.1	21.6	23.4	22	17.1	8.1			
Mutnoća NTU	8.3	20.8	11.1	35.95	20	12	58.8	13.1	21.9			
Suspendovane materije mg/L	2	31	16	22.5	22	7	23	10	16			
Kiseonik %	88	90	85	72.5	78	88	84	73	85			
Kiseonik mg/L	9.9	10.1	9.2	6.85	6.9	7.5	7.4	7	10			
Alkalitet mmol/L	3.7	3.3	3.4	3.3	3.2	3.5	4	3.9	3.7			
Ukupna tvrdoća mg/L	214	203	206	195.5	215	215	237	215	206			
Rastvoren ugljendioksid (CO <sub>2</sub> ) mg/L	2.6	3	5.3	3.7	3.5	4.8	3.9	2.5	0			
Karbonati (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	6			
Bikarbonati (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) mg/L	225	202	210	208	196	218	244	239	215			
Ukupni alkalitet (CaCO <sub>3</sub> ) mg/L	185	166	172	171	161	179	200	196	185			
pH	8.1	8.1	7.8	7.95	8	7.8	7.9	8.2	8.3			
Elektroprovodljivost µS/cm	388	330	381	359.5	394	397	414	435	385			
Ukupne rastvorene soli mg/L	237	221	243	220	229	250	259	258	223			
Amonijum (NH <sub>4</sub> -N) mg/L	0.08	0.02	0.01	0.12	0.03	0.06	0.12	0.09	0.14			
Nitriti (NO <sub>2</sub> -N) mg/L	0.009	0.008	0.014	0.021	0.036	0.008	0.019	0.014	0.025			



Lokalitet		Ostružnica desna obala											
Godina		2014											
Meseci		januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
Nitrati (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	0.1	0.98	0.9	0.3	0.9	1.04	0.7	0.6	0.9			
Organski azot (N)	mg/L	/	0.3	0.3	0.9	0.4	0.2	0.4	0.2	0.1			
Ukupni azot (N)	mg/L	/	1.3	1.2	1.6	1.3	1.3	1.3	0.9	0.9			
Ortofosfati (PO <sub>4</sub> -P)	mg/L	0.06	0.018	0.043	0.11	0.032	0.045	0.1	0.04	0.05			
Ukupni fosfor (P)	mg/L	/	0.078	0.056	0.136	0.089	0.077	0.103	0.084	0.059			
Rastvoreni silikati (SiO <sub>2</sub> )	mg/L	/	4.4	5.3	9.9	5.6	5.8	8.5	8.7	7.9			
Natrijum (Na <sup>2+</sup> )	mg/L	/	6.8	7	4.9	7.1	7	6.7	6.8	6.9			
Kalijum (K <sup>+</sup> )	mg/L	/	0.9	0.9	1.7	1.5	1.3	1.86	2.16	1.71			
Kalcijum (Ca <sup>2+</sup> )	mg/L	36	65	63	60,5	72	75	68	71	67			
Magnezijum (Mg <sup>2+</sup> )	mg/L	12	10	12	10	8	8	16	9	10			
Hloridi (Cl)	mg/L	19	14	13	12	16	17	15	12	12			
Sulfati (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	mg/L	16	14	18	20	19	20	20	16	15			
Gvožđe (Fe)	µg/L	403.7	645	306,5	4392	402,5	151,9	399,1	165	254,2			
Mangan (Mn)	µg/L	28	32,8	31,7	178,1	67,6	25,6	35,3	34	43,5			
Gvožđe (Fe)- rastvoreno	µg/L	142.2	73	20.5	70.4	72.2	43.2	44.8	< 20	24.7			
Mangan (Mn)- rastvoreni	µg/L	25.8	< 10	< 10	< 10	26.7	12.8	11.4	24	16.1			
Cink (Zn)	µg/L	11.8	19.9	32.9	27.4	10.4	< 1	28.2	44	26.4			
Bakar (Cu)	µg/L	4.2	6.6	5	7.8	5.1	1.6	10.6	20	4.1			
Hrom (Cr)-ukupni	µg/L	2.2	1.7	2.2	15.5	1.6	2.2	5.9	3.6	1			
Olovo (Pb)	µg/L	1.3	1.9	1.2	9	2.7	0.7	1.4	< 2	1.1			
Kadmijum (Cd)	µg/L	0.06	0.05	0.05	0.1	0.06	0.03	0.08	/				
Živa (Hg)	µg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.1	< 0.1	0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1			

Lokalitet		Ostružnica desna obala											
Godina		2014											
Meseci		januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
Nikl (Ni)	µg/L	1.7	2.2	6	28.2	3.9	2.2	10.2	9	/			
Aluminijum (Al)	µg/L	315.2	401.5	194	2883	276.1	103.7	330.9	/	125.9			
Kobalt (Co)	µg/L	0.6	0.6	0.8	3.7	1.2	0.6	0.7	/	0.6			
Antimon (Sb)	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5	1.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	/	0.6			
Cink (Zn)-rastvoreni	µg/L	5.8	9.4	2.4	23.2	1.8	< 1	/	42	16.2			
Bakar (Cu)-rastvoreni	µg/L	2.3	1.5	1.5	1.8	1.1	< 1	8.5	16	3.9			
Hrom (Cr)-ukupni rastvoreni	µg/L	0.7	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	2.4	1.3	0.6			
Olov (Pb)-rastvoreni	µg/L	< 0.05	< 0.5	< 0.5	0.5	1.3	< 0.5	0.8	< 2	0.6			
Kadmijum (Cd)-rastvoreni	µg/L	0.03	0.05	0.05	0.07	< 0.02	0.03	/	/	0.07			
Živa (Hg)-rastvorena	µg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1			
Nikl (Ni)-rastvoreni	µg/L	0.8	0.8	1.5	2.8	2.1	1.4	3.6	2.7	2.6			
Aluminijum (Al)-rastvoreni	µg/L	154.5	91	10.8	109.2	59.3	59.2	47.3	/	10.6			
Kobalt (Co)-rastvoreni	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.6	< 0.5	< 0.5	/	< 0.5			
Antimon (Sb)-rastvoreni	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	/	/			
Arsen (As)	µg/L	1.6	0.9	0.8	4.4	2.2	1.7	3	< 1.1	1.1			
Arsen (As)-rastvoreni	µg/L	1.6	0.7	0.5	1	1.7	1.7	1.6	< 1.1	0.9			
Bor (B)	µg/L	19.8	18.7	14.2	24.4	26.2	23.2	17.1	/	21.1			
Bor (B)-rastvoreni	µg/L	19.8	18.7	13	15.8	18.9	20.5	17.1	/	/			
HPK (Mn)	mg/L	1.5	2.4	2.9	3.35	2.4	2.6	3.2	4.7	4			
HPK (Cr)	mg/L	/	13	16	34	14	7	9	20	12			

Lokalitet		Ostružnica desna obala											
Godina		2014											
Meseci		januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
<b>BPK-5</b>	mg/L	0.9	1.9	1.6	1.2	1.1	1.2	0.6	2.4	2.4			2.4
<b>TOC</b>	mg/L	/	5.8	4.9	7.2	3.2	5.2	5.5	6	6			4.2
<b>UV-ekstinkcija (254nm)</b>	cm-1	0.043	0.055	0.083	0.072	0.068	0.055	0.1	0.128	0.128			0.092
<b>Anijon aktivne supstance</b>	mg/L	< 0.01	0.01	0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.03	0.04	0.04			/
<b>Naftni ugljovodnici</b>	mg/L	/	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.013	< 0.01	0.09	< 0.01	< 0.01			< 0.001
<b>Fenolni indeks</b>	mg/L	/	0.001	< 0.001	0.002	0.002	/	0.002	0.001	0.001			/
<b>Heksahlor-1,3-butadien</b>	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	/	/			/
<b>Pentahlorbenzen</b>	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	< 0.001			/
<b>Antraceni</b>	µg/L	/	< 0.0005	< 0.0005	0.002	0.0005	/	/	/	/			/
<b>Benzo(a)piren</b>	µg/L	/	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	/	/	/	/			/
<b>Benzo(g,h,i)perilen</b>	µg/L	/	< 0.0005	< 0.0005	0.003	0.0005	/	/	/	/			/
<b>Benzo(b)fluoranten</b>	µg/L	/	0.003	< 0.0005	0.004	< 0.0005	/	/	/	/			/
<b>Benzo(k)fluoranten</b>	µg/L	/	0.002	< 0.0005	0.003	< 0.0005	/	/	/	/			/
<b>Fluoranten</b>	µg/L	/	0.004	< 0.0005	0.012	0.003	/	/	/	/			/
<b>Indeno(1,2,3-c,d)piren</b>	µg/L	/	< 0.0005	< 0.0005	0.004	< 0.0005	/	/	/	/			/
<b>Naftalen</b>	µg/L	/	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	/	/	/	/			/
<b>para-terc-Oktifenol</b>	µg/L	/	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	/	/			/
<b>4-n-Nonilfenol</b>	µg/L	/	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	/	/			/
<b>Atrazin</b>	µg/L	/	0.008	0.0005	0.037	0.006	/	/	< 0.01	< 0.01			/
<b>Simazin</b>	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	0.017	0.001	/	/	< 0.01	< 0.01			/
<b>Terbutrin</b>	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	0.001	0.002	/	/	< 0.01	< 0.01			/

Lokalitet		Ostružnica desna obala											
Godina		2014											
Meseci		januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
Prometrin	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	0.019	0.003	/	/	< 0.01	/		/	
Desetilatrazin	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.01	/		/	
Propazin	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.01	/		/	
Desefilterbutilazin	µg/L	/	0.003	0.003	0.061	0.007	/	/	< 0.01	/		/	
Terbutilazin	µg/L	/	0.006	0.005	1.2	0.063	/	/	0.052	/		/	
Desizopropilatrazin	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	0.001	< 0.001	/	/	< 0.01	/		/	
Acetohlor	µg/L	/	0.005	0.001	2.3	0.037	/	/	< 0.01	/		/	
Metolahlor	µg/L	/	0.006	0.004	0.46	0.03	/	/	0.022	/		/	
Hlorfenvinfos	µg/L	/	< 0.01	< 0.001	0.01	< 0.01	/	/	< 0.01	/		/	
Hlorpirifos	µg/L	/	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	/	/	< 0.005	/		/	
Alahlor	µg/L	/	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	/	/	< 0.01	/		/	
Diuron	µg/L	/	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	/	/	< 0.01	/		/	
Linuron	µg/L	/	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	/	/	< 0.01	/		/	
Izoproturon	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.01	/		/	
Metoksihlor	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	
Pentahlorfenol	µg/L	/	< 0.005	< 0.001	0.01	< 0.01	/	/	/	/		/	
Endosulfan-alfa	µg/L	/	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	/	/	< 0.005	/		/	
Endosulfan-beta	µg/L	/	/	< 0.005	< 0.005	< 0.005	/	/	< 0.001	/		/	
Heksahlorbenzen	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	
p,p'-DDT	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	
o,p'-DDT	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	
p,p'-DDD	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	
p,p'-DDE	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	
alfa-HCH	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/		/	

Lokalitet		Ostružnica desna obala											
Godina		2014											
Meseci		januar	februar	mart	maj	jun	jul	avgust	oktobar	decembar			
beta-HCH	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			
gama-HCH (Lindan)	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			
Aldrin	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			
Dieldrin	µg/L	/	< 0.001	< 0.002	< 0.002	< 0.002	/	/	< 0.02	/			
Endrin	µg/L	/	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	/	/	< 0.05	/			
Isodrin	µg/L	/	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	/	/	< 0.002	/			
Heptahlor-epoksid (Izomer B)	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			
Heptahlor	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			
Hlordan (cis+trans)	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			
Trifluralin	µg/L	/	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	/	/	< 0.001	/			

\*podaci preuzeti od Agencije za zaštitu životne sredine, Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Republika Srbija; /  
vrednosti nisu merene

Tabela 2. Prosečne vrednosti fizičko-hemijskih parametara na lokalitetu Ostružnica tokom 2009. – 2013. godine

		<b>Ostružnica</b>											
		<b>2009-2013 godina</b>											
		<b>mart</b>	<b>april</b>	<b>maj</b>	<b>jun</b>	<b>jul</b>	<b>avgust</b>	<b>septembar</b>	<b>oktobar</b>	<b>novembar</b>	<b>decembar</b>		
<b>Temperatura vode</b>	(°C)	8.60	13.65	17.68	23.44	26.20	27.38	22.62	15.70	11.62	5.90		
<b>Mutnoća</b>	NTU	29.76	16.23	42.05	8.69	31.38	8.55	7.64	5.84	13.58	17.93		
<b>Suspendovane materije</b>	mg/L	17.80	15.00	30.20	7.60	18.60	9.40	4.00	5.20	13.60	15.20		
<b>Kiseonik</b>	%	94.00	96.00	92.20	88.40	95.40	98.00	93.80	88.80	91.20	91.20		
	mg/L	11.03	9.80	8.72	7.46	7.69	7.73	8.07	8.78	9.80	11.41		
<b>Alkalitet</b>	mmol /L	3.64	3.41	3.35	3.57	3.63	3.46	3.81	3.43	3.59	3.68		
<b>Ukupna tvrdoća</b>	mg/L	205.20	182.50	191.00	199.00	211.80	204.80	212.20	207.80	210.80	198.00		
<b>Rastvoren ugljendioksid (CO<sub>2</sub>)</b>	mg/L	4.48	3.20	3.40	3.52	3.38	0.52	3.30	2.10	2.90	2.80		
<b>Karbonati (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)</b>	mg/L	1.08	1.50	0.60	/	/	6.72	4.12	0.72	1.50	2.74		
<b>Bikarbonati (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>	mg/L	220.60	204.50	202.80	218.40	223.40	197.40	215.20	207.00	216.20	215.80		
<b>Ukupni alkalitet (CaCO<sub>3</sub>)</b>	mg/L	182.40	170.25	167.20	179.20	181.60	173.00	190.20	170.60	179.80	181.60		
<b>pH</b>		7.86	8.10	7.832	7.99	7.81	8.25	8.02	8.02	8.13	8.11		
<b>Elektroprovodljivost</b>	µS/cm	367.80	345.75	345.40	389.20	408.20	425.60	437.40	396.60	369.20	389.40		
<b>Ukupne rastvorene soli</b>	mg/L	239.00	219.00	216.80	235.60	254.00	252.80	269.00	249.20	240.40	228.40		
<b>Amonijum (NH<sub>4</sub><sup>-</sup>N)</b>	mg/L	0.12	0.03	0.05	0.08	0.054	0.04	0.04	0.05	0.04	0.11		

		Ostružnica											
		2009-2013 godina											
		mart	april	maj	jun	jul	avgust	septembar	oktobar	novembar	decembar		
Nitriti (NO <sub>2</sub> -N)	mg/L	0.02	0.012	0.019	0.018	0.012	0.01	0.01	0.01	0.013	0.015		
Nitratni (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	0.35	0.38	0.346	0.432	0.29	0.42	0.57	0.79	0.74	0.85		
Organski azot (N)	mg/L	1.19	0.51	1.097	1.819	0.67	0.52	0.58	0.46	0.52	0.82		
Ukupni azot (N)	mg/L	1.73	0.85	1.498	2.334	0.976	0.97	1.34	1.30	1.33	2.00		
Ortofosfati (PO <sub>4</sub> -P)	mg/L	0.02	0.017	0.039	0.045	0.018	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03		
Ukupni fosfor (P)	mg/L	0.08	0.12	0.10	0.07	0.09	0.06	0.08	0.07	0.06	0.08		
Rastvoreni silikati (SiO <sub>2</sub> )	mg/L	5.55	4.90	4.70	8.43	5.10	4.03	3.85	4.15	5.25	4.93		
Natrijum (Na <sup>2+</sup> )	mg/L	6.65	4.67	5.77	7.38	9.00	9.90	11.23	9.05	6.84	9.97		
Kalijum (K <sup>+</sup> )	mg/L	1.05	0.90	1.03	0.88	0.90	1.23	1.10	1.08	1.12	1.20		
Kalcijum (Ca <sup>2+</sup> )	mg/L	59.20	58.75	60.00	61.20	63.60	60.40	59.60	60.00	67.40	60.40		
Magnezijum (Mg <sup>2+</sup> )	mg/L	14.14	8.75	10.04	11.26	13.16	13.00	14.60	14.40	9.80	14.00		
Hloridi (Cl)	mg/L	13.70	12.33	11.42	14.96	19.62	21.20	20.40	19.80	15.00	14.40		
Sulfati (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	mg/L	26.20	18.75	19.60	24.20	19.00	25.20	30.60	22.80	18.00	18.20		
Gvožđe (Fe)	µg/L	734.50	261.40	2180.00	74.40	384.90	391.50	144.30	78.70	419.60	< 10.00		
Mangan (Mn)	µg/L	51.70	21.20	56.20	14.20	23.30	56.30	17.80	15.20	32.80	< 10.00		
Gvožđe (Fe)-rastvoreno	µg/L	120.00	35.00	63.00	63.25	57.50	62.50	73.67	110.00	197.50	110.00		
Mangan (Mn)-rastvoreni	µg/L	22.47	117.20	15.00	12.50	30.00	10.00	129.43	12.85	12.50	15.00		
Cink (Zn)	µg/L	41	5.7	21.2	10	33.6	47.4	10.9	9.8	11.5	2.8		
Bakar (Cu)	µg/L	10.3	/	10	3.8	15.3	17.7	7.8	5.5	4.6	1.6		
Hrom (Cr)-ukupni	µg/L	8.5	/	5.2	4.4	< 0.5	1.9	1.1	9.2	99.3	< 0.5		

		Ostružnica												
		2009-2013 godina												
		mart	april	maj	jun	jul	avgust	septembar	oktobar	novembar	decembar			
Olovo (Pb)	µg/L	3.7	0.7	3.1	< 0.5	0.8	2.5	0.5	<	0.5	<	1.5	<	0.5
Kadmijum (Cd)	µg/L	0.1	0.03	0.06	< 0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.02	0.03	0.03	0.02
Živa (Hg)	µg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Nikl (Ni)	µg/L	7	1.4	9.2	1.2	1.4	13.5	1.4	1	1	0.8	2.2	2.2	0.8
Aluminijum (Al)	µg/L	993.7	123.3	1474	45.7	232.2	251.7	131.1	57.7	57.7	< 10	306.3	< 10	< 10
Kolbalt (Co)	µg/L	/	0.7	2.2	< 0.5	0.7	0.7	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	0.6	< 0.5	< 0.5
Antimon (Sb)	µg/L	/	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.7	0.8	0.8	0.6	0.7	< 0.6	< 0.6
Čink (Zn)- rastvoreni	µg/L	12.07	17.7	13.13	8.55	8.025	9.35	7.3	6.85	6.85	16.33	16.33	6.43	6.43
Bakar (Cu)- rastvoreni	µg/L	10.9	21.8	17.2	7.08	4.7	5.18	10.23	6.53	6.53	11.38	11.38	6.733	6.733
Hrom (Cr)-ukupni rastvoreni	µg/L	1.25	2.9	0.87	2.65	< 0.1	1.03	< 1	0.98	0.98	0.9	0.9	3.9	3.9
Olovo (Pb)- rastvoreni	µg/L	< 1	1.25	0.5	< 0.1	< 0.1	19.4	0.7	< 0.5	< 0.5	0.675	0.675	0.5	0.5
Kadmijum (Cd)- rastvoreni	µg/L	0.16	0.28	0.09	0.07	1.3	0.09	0.07	0.08	0.08	0.09	0.09	0.26	0.26
Živa (Hg)- rastvorena	µg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.5	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Nikl (Ni)- rastvoreni	µg/L	1.57	2.05	2.18	2.15	1.63	1.78	1.6	1.68	1.68	3.45	3.45	3.13	3.13
Aluminijum (Al)- rastvoreni	µg/L	14	10	30.45	19.3	14.55	13	< 10	11.53	11.53	18.77	18.77	12.8	12.8
Arsen (As)	µg/L	< 0.05	< 0.5	1.7	< 0.5	0.6	1.7	1.3	1.5	1.5	1.1	1.1	< 0.5	< 0.5
Arsen (As)- rastvoreni	µg/L	1.47	1.3	1.83	1.6	1.99	1.83	2.33	2	2	1.88	1.88	1.93	1.93
Bor (B)	µg/L	84.9	< 10	32.3	33.8	33.8	41.8	45.5	49.2	49.2	32.4	32.4	15	15



		Ostružnica											
		2009-2013 godina											
		mart	april	maj	jun	jul	avgust	septembar	oktobar	novembar	decembar		
HPK (Mn)	mg/L	2.96	3.33	2.96	3.37	2.98	3.222	2.74	3.3	2.86	3.64		
HPK (Cr)	mg/L	3	13.6	8.8	11.2	8.8	10.5	3.5	5	3.2	12		
BPK-5	mg/L	1.46	1.94	1.77	2.65	1.56	2.20	1.53	1.58	1.85	2.71		
TOC	mg/L	3.45	3.27	3.9	3.13	2.76	3.12	4.1	4.28	2.8	7.18		
UV-ekstinkcija (254nm)	cm-1	0.06	0.06	0.07	0.15	0.04	0.04	0.04	0.06	0.07	0.06		
Anijon aktivne supstance	mg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Naftni ugljovodnici	mg/L	< 0.01	< 0.01	0.012	< 0.01	0.013	0.016	0.01	0.011	0.01	0.014		
Fenolni indeks	mg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.0015	< 0.001	< 0.002	< 0.01	< 0.001	0.0017	0.0015		
Heksahlor-1,3-butadien	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Pentahlorbenzen	µg/L	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	0.0005	0.0005		
para-terc-Oktifenol	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
4-n-Nonifenol	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Atrazin	µg/L	0.0005	0.0045	0.0175	0.0138	0.02	0.009	0.0055	0.02	< 0.005	0.007		
Simazin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Terbutrin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.009	< 0.01	< 0.001	0.003	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Prometrin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.002	< 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Desetilatrazin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.02	0.014	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Propazin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.02	0.002	< 0.001	< 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Desetilbutilazin	µg/L	0.004	0.004	0.037	0.022	< 0.001	0.003	< 0.001	0.009	< 0.001	0.0005		

		Ostružnica											
		2009-2013 godina											
		mart	april	maj	jun	jul	avgust	septembar	oktobar	novembar	decembar		
Terbutilazin	µg/L	0.01	0.006	0.12	0.066	< 0.001	0.009	0.006	0.007	0.004	0.005		
Desizopropilatrazin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.02	< 0.02	< 0.001	< 0.004	< 0.02	< 0.001	< 0.001		
Acetohlor	µg/L	0.026	0.022	0.302	0.034	0.005	0.01	0.019	< 0.005	0.01	0.003		
Metolahlor	µg/L	< 0.001	0.008	0.228	0.046	0.004	< 0.001	< 0.004	< 0.005	0.005	< 0.001		
Hlorfenvinfos	µg/L	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01		
Hlorpirifos	µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.01	< 0.01	< 0.005	< 0.005	< 0.01	< 0.005	< 0.005		
Alahlor	µg/L	0.004	< 0.002	< 0.002	< 0.02	< 0.02	< 0.02	0.002	< 0.02	< 0.002	< 0.002		
Diuron	µg/L	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.02	< 0.02	< 0.02	0.002	< 0.02	< 0.002	< 0.002		
Linuron	µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.02	< 0.02	< 0.005	< 0.004	< 0.02	< 0.005	< 0.005		
Izoproturon	µg/L	< 0.001	< 0.002	< 0.001	< 0.02	< 0.02	< 0.001	< 0.004	< 0.02	< 0.001	< 0.001		
Metoksihlor	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
Pentahlorfenol	µg/L	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.2	< 0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.2	< 0.001	< 0.01		
Endosulfan-alfa	µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005		
Endosulfan-beta	µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005		
Heksahlorbenzen	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
p,p'-DDT	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
o,p'-DDT	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
p,p'-DDD	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
p,p'-DDE	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.001	< 0.001		
alfa-HCH	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	0.004	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
beta-HCH	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.005	0.004	< 0.001	< 0.001	< 0.005	< 0.001	< 0.001		
gama-HCH (Lindan)	µg/L	0.0005	0.0005	0.0005	0.003	0.0035	< 0.005	< 0.001	< 0.005	< 0.001	0.0005		
Aldrin	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.001	< 0.001		

		Ostružnica																			
		2009-2013 godina																			
		mart		april		maj		jun		jul		avgust		septembar		oktobar		novembar		decembar	
<b>Dieldrin</b>	µg/L	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002
<b>Endrin</b>	µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
<b>Isodrin</b>	µg/L	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002
<b>Heptahlor-epoksid (Izomer B)</b>	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>Heptahlor</b>	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>Hlordan (cis+trans)</b>	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>Trifluralin</b>	µg/L	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

\*podaci preuzeti od Agencije za zaštitu životne sredine, Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Republika Srbija; /

vrednosti nisu merene

PRILOG 2

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri na lokalitetu Vinča tokom 2014. godine

Lokalitet	Vinča											
	2014											
	Meseci	Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.
Temperatura vode (°C)	12.4	11.6	14.6	16.2	24.3	25.7	23.1	17.3	13.4	9.3	7.2	
Mutnoća NTU	21.9	11.1	22	131	22.6	9.3	43.3	15	21.8	8.6	13.8	
Suspendovane materije mg/L	25	16	15	37	10	8	34	12	34	8	8	
Kiseonik %	84	85	83	62	85	87	78	78	83	89	91	
Alkalitet mg/L	9.1	9.2	8.6	6.2	7.1	7.1	6.7	7.6	8.8	10.2	11	
Alkalitet mmol/L	3.1	3.4	3.5	2.7	2.9	3.1	3.3	3.7	3.5	3.7	4	
Ukupna tvrdoća mg/L	192	206	202	160	188	184	199	236	218	196	220	
Rastvoren ugljendioksid (CO <sub>2</sub> ) mg/L	5.7	5.3	3.1	6.6	3	5.7	2.6	2.2	2.6	0	2.2	
Karbonati (CO <sub>3</sub> <sup>--</sup> ) mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	
Bikarbonati (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) mg/L	196	210	212	164	177	193	201	226	213	214	245	
Ukupni alkalitet (CaCO <sub>3</sub> ) mg/L	161	172	174	134	145	158	165	186	175	187	201	
pH	8	7.8	7.9	7.6	8	7.8	8	8.1	8.1	8.4	8.1	
Elektroprovodljivost µS/cm	349	381	395	296	360	364	373	397	380	404	452	
Ukupne rastvorene soli mg/L	213	243	242	170	202	220	215	238	232	246	276	
Amonijum (NH <sub>4</sub> -N) mg/L	0.11	0.01	0.16	0.13	0.13	0.13	0.14	0.11	0.15	0.12	0.09	
Nitriti (NO <sub>2</sub> -N) mg/L	0.005	0.014	0.012	0.024	0.088	0.011	0.021	0.014	0.013	0.009	0.019	
Nitratni (No <sub>3</sub> -N) mg/L	0.5	0.9	1.08	0.3	1.1	1.1	0.8	0.4	0.3	1	0.9	

Lokalitet		Vinča													
		2014													
		Meseci	Godina	Jan	Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.
Organski azot (N)	mg/L		0	0.3		1.1	0.4	0.5	0.4						0.2
Ukupni azot (N)	mg/L		1.5	1.2		1.6	1.7	1.7	1.4						1.2
Ortofosfati (PO4-P)	mg/L		0.04	0.043	0.031	0.02	0.03	0.061	0.08	0.07	0.06	0.07	0.07	0.05	0.05
Ukupni fosfor (P)	mg/L		0.079	0.056	0.058	0.16	0.089	0.077	0.144						0.074
Rastvoreni silikati (SiO2)	mg/L		5.1	5.3		8.6	4.9	3.5	7.6						8.5
Natrijum (Na++)	mg/L		9.4	7		7.2	10	9.5	8						10.3
Kalijum (K+)	mg/L		1.3	0.9		3	2.3	1.9	2.08						2.39
Kalcijum (Ca++)	mg/L		53	63	58	46	64	58	58	61	62	62	62	59	59
Magnezijum (Mg++)	mg/L		15	12	15	11	7	7	13	16	15	15	10	17	17
Hloridi (Cl-)	mg/L		15	13	17	16	17	17	12	12	19	19	13	10	10
Sulfati (SO4--)	mg/L		19	18	24	21	22	20	22	23	23	23	21	27	27
Gvožđe (Fe)	µg/L		552.9	306.5	280.2	2144	333.7	139.9	354.5						311.3
Mangan (Mn)	µg/L		35.5	31.7	27.3	69.3	41.8	23.4	27.4						24.4
Gvožđe (Fe)-rastvoreno	µg/L		75.8	20.5	< 10	20.7	41.8	26.8	16.3						18.9
Mangan (Mn)-rastvoreni	µg/L		< 10	< 10	< 10	12.1	14.9	10.1	10.4						< 10
Cink (Zn)	µg/L		40	32.9	10.5	20	8	5.5	21.3						26.5
Bakar (Cu)	µg/L		14.4	5	6.8	5.5	3.6	3.7	8.3						5.6
Hrom (Cr)-ukupni	µg/L		2.4	2.2	1.6	6.3	0.9	1.3	4.2						2.3
Olovo (Pb)	µg/L		2.5	1.2	1.3	4.4	1.6	1.4	1.1						1.2
Kadmijum (Cd)	µg/L		0.09	0.05	0.06	0.05	0.03	0.06	0.04						
Živa (Hg)	µg/L		< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1						< 0.1
Niki (Ni)	µg/L		3.5	6	1.7	13.7	2.2	2.1	5.1						2.2
Aluminijum (Al)	µg/L		359	194	161.8	1501	220.2	93.3	240.8						194

Lokalitet		Vinča											
Godina		2014											
Meseci		Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	
Kobalt (Co)	µg/L	0.6	0.8	0.7	1.8	0.9	0.6	0.5				0.6	
Antimon (Sb)	µg/L	1.9	< 0.5	< 0.5	1.6	< 0.5	< 0.5	< 0.5				< 0.5	
Cink (Zn)-rastvoreni	µg/L	12.7	2.4	5		< 1	2	18.3				15.9	
Bakar (Cu)-rastvoreni	µg/L	< 1	1.5	5	2.2	< 1	1.4	4.8				3.5	
Hrom (Cr)-ukupni rastvoreni	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5		4.1				< 0.5	
Olov (Pb)-rastvoreni	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	0.7	< 0.5	< 0.5				0.7	
Kadmijum (Cd)-rastvoreni	µg/L	0.09	0.05	0.05	0.05	< 0.02	0.04	0.11				0.07	
Živa (Hg)-rastvorena	µg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1				< 0.1	
Nikl (Ni)-rastvoreni	µg/L	0.6	1.5	1	2.9	0.9	1.6	1.8				1.3	
Aluminijum (Al)-rastvoreni	µg/L	81.6	10.8	< 10	19	36.5	33.8	18.8				23.1	
Kobalt (Co)-rastvoreni	µg/L	< 0.5	0.5	0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5				< 0.5	
Antimon (Sb)-rastvoreni	µg/L	< 0.5	< 0.5	< 0.5	1.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5					
Arsen (As)	µg/L	0.9	0.8	1	3.3	2.2	2.1	2.9				1.2	
Arsen (As)-rastvoreni	µg/L	< 0.5	0.5	0.9	1.7	1.7	1.8	1.4				0.8	
Bor (B)	µg/L	18.5	14.2	20.1	29.9	26.8	28.4	13.7				28	
Bor (B)-rastvoreni	µg/L	18.5	13	19.9		18.8	20	12.3				25.1	
HPK (Mn)	mg/L	1.6	2.9	3.1	9.7	2.6	2.4	3	3.2	3	3.1	2	
HPK (Cr)	mg/L	10	16	13	17	18	5	9				12	
BPK-5	mg/L	1.1	1.6	1.2		0.9	1.9	1.7	1.4	1.6	1.4	1.4	
TOC	mg/L	6.1	4.9		8	3.2	5.3	4.9				4.9	
UV-ekstinkcija (254nm)	cm-1	0.069	0.083	0.054	0.17 9	0.057	0.057	0.092	0.124	0.151	0.09	0.079	

Lokalitet		Vinča											
Godina		2014											
Meseci		Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	
Anijon aktivne supstance	mg/L	0.01	0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.05					
Naftni ugljovodonici	mg/L		< 0.01	< 0.01	0.01 <sub>2</sub>	< 0.01		0.066					
Fenolni indeksi	mg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 <sub>3</sub>	0.001		0.001					
Heksahlor-1,3-butadien	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 <sub>1</sub>	< 0.001		< 0.001					
Pentahlorbenzen	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 <sub>1</sub>	< 0.001		< 0.001					
Antracen	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>05</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
Benzo(a)piren	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>05</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
Benzo(g,h,i)perilen	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>05</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
Benzo(b)fluoranten	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>2</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
Benzo(k)fluoranten	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>05</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
Fluoranten	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	0.003	0.00 <sub>05</sub>	0.002		0.002					
Indeno(1,2,3-c,d)piren	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>05</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
Naftalen	µg/L		< 0.000 <sub>5</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>	0.00 <sub>05</sub>	< 0.000 <sub>5</sub>		0.000 <sub>5</sub>					
para-terc-Oktifenol	µg/L		0.001	< 0.001	0.00 <sub>1</sub>	< 0.001		0.001					
4-n-Nonilfenol	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00	< 0.001		0.001					

Lokalitet		Vinča											
Godina		2014											
Meseci		Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	
Atrazin	µg/L		0.005	0.008	0.03 3	0.007		0.005					
Simazin	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.01 8	< 0.001		< 0.001					
Terbutrin	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 1	< 0.001		< 0.001					
Prometrin	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.01 9	0.002		< 0.001					
Desetilatrazin	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 1	< 0.001		< 0.001					
Propazin	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 1	< 0.001		< 0.001					
Desetilterbutilazin	µg/L		0.003	< 0.001	0.05 1	0.008		0.004					
Terbutilazin	µg/L		0.005	0.012	0.93 8	0.052		0.012					
Desizopropilatrazin	µg/L		< 0.001	< 0.001	0.00 1	< 0.001		< 0.001					
Acetohlor	µg/L		< 0.001	0.02	1.9	0.014		0.005					
Metolahlor	µg/L		0.004	0.009	0.41 6	0.028		0.007					
Hlorfenvinfos	µg/L		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01		< 0.01					
Hlorpirifos	µg/L		< 0.005	< 0.005	0.00 5	< 0.005		< 0.005					
Alahlor	µg/L		< 0.002	< 0.002	0.00 2	< 0.002		< 0.002					
Diuron	µg/L		< 0.002	< 0.002	< 0.00	< 0.002		< 0.002					



Lokalitet		Vinča											
Godina		2014											
Meseci		Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	
Linuron	µg/L		< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005		< 0.005					
Izoproturon	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
Metoksihlor	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
Pentahlorfenol	µg/L		< 0.01	< 0.001	< 0.01	< 0.01		< 0.01					
Endosulfan-alfa	µg/L		< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005		< 0.005					
Endosulfan-beta	µg/L		< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005		< 0.005					
Heksahlorbenzen	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
p,p'-DDT	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
o,p'-DDT	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
p,p'-DDD	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
p,p'-DDE	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
alfa-HCH	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
beta-HCH	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
gama-HCH (Lindan)	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					

Lokalitet		Vinča											
Godina		2014											
Meseci		Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	
Aldrin	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
Dieldrin	µg/L		< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002		< 0.002					
Endrin	µg/L		< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005		< 0.005					
Isodrin	µg/L		< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002		< 0.002					
Heptahlor-epoksid (Izomer B)	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
Heptahlor	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
Hlordan (cis+trans)	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					
Trifluralin	µg/L		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		< 0.001					

\*podaci preuzeti od Agencije za zaštitu životne sredine, Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Republika Srbija; /  
vrednosti nisu merene

**PRILOG 3**

Tabela 1. Broj analiziranih individua, nukleoida i preživljavanje ćelija kod vrste *B. sowerbyi* na lokalitetima Duboko (2014 i 2015. godina) i Višnjica (2014. godina).

<i>Branchiura sowerbyi</i>	Akomodacija		broj analiziranih individua	broj analiziranih ćelija	preživljavanje ćelija
Januar	Duboko	2014	15	200	92
	Duboko	2015	15	200	91.7
Februar	Višnjica	2014	/	/	/
	Duboko	2014	15	200	83
Mart	Višnjica	2015	/	/	/
	Duboko	2014	12	170	52
April	Duboko	2014	12	200	91
	Višnjica	2015	10	200	95
Maj	Duboko	2014	15	200	90
	Višnjica	2014	/	/	/
Jun	Duboko	2014	7	200	66
	Višnjica	2015	15	200	93
Jul	Duboko	2014	13	200	81
	Višnjica	2015	10	200	51
Avgust	Duboko	2014	9	200	87
	Višnjica	2015	-	200	68
Septembar	Duboko	2014	15	200	98
	Višnjica	2014	7	82	74
	Duboko	2015	5	200	82
	Višnjica	2014	11	200	87
	Duboko	2014	9	200	70
	Višnjica	2015	9	200	86
	Duboko	2014	3	200	98
	Višnjica	2014	/	/	/
	Duboko	2015	5	200	79
	Višnjica	2014	/	/	/

**PRILOZI**

<b><i>Branchiura</i></b>			broj analiziranih individualua	broj analiziranih ćelija	preživljavanje ćelija
Oktobar	Duboko	2014	14	200	99
	Višnjica	2015	6	200	92
Novembar		2014	/	/	/
	Duboko	2014	/	/	/
Decembar		2015	3	200	93
	Višnjica	2014	8	200	87
	Duboko	2014	7	-	73
	Višnjica	2015	2	200	93
		2014	7	200	62

Tabela 2. Broj analiziranih individua, nukleoida i preživljavanje ćelija kod Mix uzorka na lokalitetima Duboko (2014 i 2015. god.) i Višnjica (2014. god.).

Mix uzorak			broj analiziranih individua	broj analiziranih nukleoida	preživljavanje ćelija
Januar	Duboko	2014	100	300	72.5
	Višnjica	2015	/	/	/
Februar	Duboko	2014	100	400	73.5
	Višnjica	2015	/	/	/
Mart	Duboko	2014	91	400	70
	Višnjica	2015	100	400	77.5
April	Duboko	2014	/	/	/
	Višnjica	2015	100	400	54.5
Maj	Duboko	2014	100	400	83
	Višnjica	2015	100	400	78
Jun	Duboko	2014	100	400	73.5
	Višnjica	2015	100	400	78.5
Jul	Duboko	2014	-	400	71.5
	Višnjica	2015	100	400	76
Avgust	Duboko	2014	100	400	69.7
	Višnjica	2015	50	200	80
Septembar	Duboko	2014	/	/	75
	Višnjica	2015	100	400	84
Oktobar	Duboko	2014	100	400	73
	Višnjica	2015	41	200	77.5

**PRILOZI**

Mix uzorak	broj analiziranih individualua		broj analiziranih nukleoida	preživljavanje ćelija
	Višnjica	2014		
Novembar	Duboko	/	/	/
	Višnjica	77	400	81.5
Decembar	Višnjica	100	400	75
	Duboko	100	400	80.5
	Duboko	50	200	77
	Višnjica	100	400	67

## BIOGRAFIJA

Margareta Kračun-Kolarević je rođena 10.07.1982. godine u Pančevu. Osnovnu i srednju školu završila je u Alibunaru. Na Biološkom fakultetu (studijska grupa Biologija) Univerziteta u Beogradu upisala se školske 2002/03 godine, a diplomirala je 2011. godine. Diplomski rad pod nazivom „Analiza strukture trihoma i sadržaja fenolnih diterpena u listovima različitih vrsta žalfija (*Salvia* sp.)“ urađen je pod rukovodstvom dr Ane Simonović na Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i odbranjen je ocenom 10.

Školske 2011/12. Margareta Kračun-Kolarević upisuje doktorske studije na studijskoj grupi Biologija, modul Mikrobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od maja 2012. godine zaposlena je na mestu istraživač pripravnik na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na projektu: TR 37009 „Merenje i modeliranje fizičkih, hemijskih, bioloških i morfodinamičkih parametara reka i vodnih akumulacija“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a od marta 2013. godine na mesto istraživač saradnik. Od sticanja zvanja istraživač saradnik do danas, učestvuje u realizaciji više nacionalnih i međunarodnih projekata.

Od 2013. godine je član Srpskog biološkog društva i Srpskog društva za zaštitu voda. Usavršavala se tokom studijskog boravka 2015. godine na Nacionalnom Institutu za Biologiju, Ljubljana, Slovenija i 2016. godine na Tehnološkom Univerzitetu, Beč, Austrija. Tokom dosadašnjeg rada autor i koautor je na 22 međunarodna naučna rada (12 iz kategorije M21, 6 iz kategorije M22, 4 iz kategorije M23), tri poglavlja u monografiji, 8 u časopisima domaćeg značaja i 48 saopštenja na naučnim skupovima.