



UNIVERZITET U NOVOM SADU

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



**Biomarkeri kod riba u monitoringu
statusa akvatičnih ekosistema i
identifikaciji efekata hemijskog stresa
*in situ***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Ivana Teodorović

Kandidat:

Dina Tenji

Novi Sad, 2022. godine

Zahvalnica

Zahvaljujem se Prirodno-matematičkom fakultetu i Departmanu za biologiju i ekologiju, na omogućenoj izradi ove doktorske disertacije u okviru FP7 projekta "Solutions for present and future emerging pollutants in land and water resources management" (SOLUTIONS) čiji je koordinator za Srbiju bila prof. dr Ivana Teodorović i projekta "Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću: reproduktivni, metabolički, razvojni odgovori i mehanizam dejstva kod odabranih model organizama i ćelijskih linija" koji je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a koordinisala prof. dr Radmila Kovačević. Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Ivani Teodorović, na pruženoj prilici da budem deo istraživačkog tima pod njenim rukovodstvom. Hvala za svaki savet, sugestiju, pomoć i podršku tokom saradnje; za uspostavljene saradnje sa drugim institucijama; za podršku tokom izrade i pisanja doktorske disertacije. Ništa manju zahvalnost iskazujem prof. dr Sonji Kaišarević za ogromnu stručnu pomoć, savete, sugestije i ideje tokom celog procesa doktorskih studija i tokom svih faza izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem se za stručne savete, sugestije, ažurnu i prijatnu komunikaciju dr Stoimiru Kolareviću. Izuzetnu zahvalnost za izradu ove doktorske disertacije dugujem mojoj kolegini i drugarici Bojani Mičić. Hvala za podršku i savete na svim nivoima od prijateljskog do stručnog, kao i tehničku pomoć pri pripremi i analizi velikog dela celokupnog uzorka. Zahvaljujem se koleginicama koje su me uputile u način rada tokom savladavanja novih metoda, tehnika rada i procedura na početku ovog puta, dr Bojani Stanić i Jeleni Hrubik, kao i Šandoru Šipošu za sve terenske postavke i sve izlovljene jedinke riba. Zahvaljujem se dr Varji Knežević i dr Tanji Tomić na svim savetima, druženju i eksperimentalnoj i moralnoj podršci sve ove godine, Bojani Radeljević i Tamari Ivković na pomoći pri analizi dela uzoraka. Veliko hvala dugujem dr Marku Dukoviću za podršku i podstrek tokom rada na ovoj tezi i u svakodnevnom životu, kao i računarsko-tehničku pomoć kad god je bila potrebna. Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, prijateljima i dragim ljudima koji pripadaju u obe kategorije za emotivnu, mentalnu, finansijsku i tehničko-logističku podršku koju su mi nesebično pružili. Hvala mami, tati, babi Mariji, Marku, Sari, Sanji, Maji, Lari, Vlaci, Aci, Meli, Milici, Miši, Mikiju i Mirku, što su mi bili velika podrška na putu usavršavanja i značajno pomogli pri finalizaciji zvaničnog školovanja.

Novi Sad, 2022. godine

Dina Tenji

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Дина Тењи
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	др Ивана Теодоровић, редовни професор, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет
Наслов рада:	Биомаркери код риба у мониторингу статуса акватичних екосистема и идентификацији ефеката хемијског стреса <i>in situ</i>
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница _____ 191 _____ Поглавља _____ 8 _____ Референци _____ 521 _____ Табела _____ 20 _____ Слика _____ 54 _____ Графикона _____ 0 _____ Прилога _____ 31 _____
Научна област:	Екологија, биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Заштита животне средине
Кључне речи / предметна одредница:	Биомаркери, мултипараметарски приступ, загађење, рибе, акватични екосистеми
Резиме на језику рада:	Акватични екосистеми су константно изложени мултистрес условима, јер на њих симултано делују различити типови притисака - од глобалних промена, преко хидроморфолошких измена водних тела до загађења пореклом из концентрисаних и расутих извора. Ефикасност управљачких мера у циљу заштите или унапређења статуса акватичних екосистема зависе у великој мери од поуздане процене ризика и прецизне идентификације кључних притисака, што у мултистрес условима није једноставно. Регулаторно условљени мониторинг програми имају за циљ пре свега процену хемијског и еколошког статуса (потенцијала) водних тела. Међутим, дугогодишња искуства показују да по правилу, оцене статуса на основу ова два кључна критеријума нису сагласне, па је тешко установити јасне узрочно – последичне везе између загађења хазардним супстанцама и промена на нивоу акватичних животних заједница. Једна од могућности за превазилажење овог проблема је примена

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

биоаналитичких (махом *in vitro*) метода и биомаркера (код експонираних јединки и популација) у ретроспективној процени ризика као споне између хемијског и биолошког мониторинга. Биомаркери као рани показатељи присуства и / или ефеката хемијског стреса могу допринети идентификацији приоритених локација, хазардних супстанци и њихових смеша и повезати изложеност одређеним класама полутаната или њиховим смешама у животној средини, са ефектима уоченим на вишим нивоима биолошке организације. Одабир оптималне батерије комплементарних општих и специфичних екосистемски релевантних биомаркера, различитих нивоа биолошке организације, од молекуларних до физиолошких, применљивих у различитим просторно-временским оквирима, и даље представља истраживачки изазов и стога је и предмет истраживања ове докторске дисертације. Општи циљ истраживања је био одабир, оптимизација и интеграција батерије физиолошких, ензимских и молекуларних биомаркера код риба, као кључног сегмента комплексног мултипараметарског дијагностичког приступа за идентификацију хемијског стреса који представља значајан притисак на акватичне екосистеме у реалним мултистрес условима. Специфични циљеви су везани за задатке две студије случаја у оквиру којих је истраживање спроведено. У оквиру студије случаја Нови Сад процењено је да је токсични притисак на одабраним локалитетима низак, али ипак виши у градској зони Новог Сада у односу на узводне локалитете. На основу ефеката узорка воде са истих локалитета *in vitro* pERK1/2 есеј се показао као потенцијално користан алат за мониторинг ефекта загађења у акватичним екосистемама, задовољавајуће осетљивости, којом је могуће детектовати одговор при третману комплексним узорцима из животне средине који садрже једињења која утичу на ERK1/2 сигнални пут. Ограничење ове методе, као самосталног алата представља је ниска специфичност ERK1/2 сигналног пута на који може утицати велики број супстанци са различитим начинима деловања, па се његов потенцијал огледа у примени са комплементарним методама у оквиру комплексних батерија *in vitro* биосеја. Студија случаја Нови Сад је у фокусу имала и унапређење теренских протокола и експерименталних поставки који омогућавају примену биомаркера на различитим просторно-временским скалама у истражним мониторинг програмима са акцентом на велике реке, а који подразумевају кавезни систем излагања јединки риба и процену ефеката хемијског стреса код јединки из природних популација. Применом кавезне поставке излагања јединки *C. carpio* је потврђено да је за употребу биометријских параметара као биомаркера потребно дуже време излагања, док су најосетљивији параметри били активност ензима каталаза, параметри имуног одговора и аутофагије као и биомаркери неуротоксичности, међу којима се посебно истакао ген за базни протеин мијелина. Заједно са детектованим супстанцама у серуму и мишићном ткиву јединки, одговори биомаркера неуротоксичности су указали на заступљеност ове групе полутаната на анализираним локалитетима. Резултати анализе биомаркера код јединки риба из природних популација истичу значај новоидентификованих улога различитих гена и протеина који су уобичајено сматрани биомаркерима ефекта, показујући да промене у овим параметрима не морају нужно указивати на погоршање здравља јединки риба, већ би се требале тумачити као адаптивни одговор на хемијски стрес, пре него директан доказ еколошког утицаја загађења *in situ*. У оквиру студије случаја на широј просторној скали-ток реке Дунав извршена је анализа ефеката полутаната у природним популацијама *Alburnus alburnus*, при чему нису уочене разлике између анализираних локалитета услед природне варијабилности и мале величине узорка, као и недостатка адекватног рефералног локалитета. Међу анализираним

	<p>параметрима, најосетљивија је била генска експресија <i>erk2</i> гена, која је била у највишем нивоу корелације са леком опипрамом. На резултатима анализе биомаркера из обе студије случаја, примењен је систем за агрегацију одговора батерије биомаркера и дијагностички мултипараметарски сет алата за квантитацију <i>in situ</i> ефеката смеша полутаната на нивоу јединки, популација и заједница. Резултатима мултипараметарске анализе резултата студије случаја Нови Сад је потврђено да загађење које доспева путем непрећишћених отпадних вода града Новог Сада, представља значајан притисак на Дунав. Примена мултипараметарског сета алата на широј просторној скали (студија случаја Дунав) је омогућила трансформацију великог броја података у јединствене матрице за квалитативну евалуацију анализираних локалитета, који су подељени у класе са сличним обрасцима ефеката и тумачени на основу матрица, уз ограничења и уочене недостатке као што су недостатак података о хроничној токсичности великог броја детектованих супстанци, недостатак адекватног рефералног локалитета (због чега било би корисно дефинисање опсега одговора за биомаркере за најчешће коришћене врсте) и велика природна варијабилност одговора биомаркера (која би се делимично могла неутралисати довољно великим узорком јединки из природних популација). Код природних популација као биомаркере ефекта је погодно користити параметре који представљају кумулативан ефекат излагања као што су телесни индекси, биоакмулација супстанци и параметри генотоксичности.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>17. 05. 2018.</p>
<p>Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)</p>	
<p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник: др Соња Каишаревић, редовни професор, Природно-математички факултет, Нови Сад Ментор: др Ивана Теодоровић, редовни професор, Природно-математички факултет, Нови Сад Члан: др Стоимир Коларевић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“</p>
<p>Напомена:</p>	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Dina Tenji
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Ivana Teodorović, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Thesis title:	Fish biomarkers in aquatic ecosystem status assessment and identification of chemical stress effects <i>in situ</i>
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages__191_____ Chapters__8_____ References__521_____ Tables__20_____ Illustrations__54_____ Graphs__0_____ Appendices__31_____
Scientific field:	Ecology, Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Environmental protection
Subject, Key words:	Biomarkers, multiparametric approach, pollution, fish, aquatic ecosystems
Abstract in English language:	Aquatic ecosystems are constantly exposed to multistress conditions, because they are simultaneously affected by different types of pressures - from global changes, through hydromorphological changes of water bodies to pollution originating from concentrated and bulk sources. The effectiveness of management measures to protect or improve the status of aquatic ecosystems depends to a large extent on reliable risk assessment and accurate identification of key pressures, which is not easy in multistress conditions. Regulatory conditioned monitoring programs are primarily aimed at assessing the chemical and environmental status (potential) of water bodies. However, many years of experience show that, status assessments based on these two key criteria do not agree, so it is difficult to establish clear cause-and-effect links between hazardous substance pollution and changes in aquatic communities. One of the possibilities for overcoming this problem is the application of bioanalytical (mostly <i>in vitro</i>) methods and biomarkers (in exposed individuals and populations) in retrospective risk assessment as a link between chemical and biological monitoring. Biomarkers as early indicators of the presence and / or effects of chemical stress can contribute to the identification of priority sites,

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5b – Statement on the authority,

5b – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

hazardous substances and their mixtures and link exposure to certain classes of pollutants or their mixtures in the environment with effects observed at higher levels of biological organization. Selecting the optimal battery of complementary general and specific ecosystemically relevant biomarkers, different levels of biological organization, from molecular to physiological, applicable in different space-time frameworks, is still a research challenge and therefore the subject of this doctoral dissertation. The general goal of the research was to select, optimize and integrate batteries of physiological, enzymatic and molecular biomarkers in fish, as a key segment of a complex multiparameter diagnostic approach to identify chemical stress that puts significant pressure on aquatic ecosystems in real multistress conditions. The specific objectives are related to the tasks of the two case studies within which the research was conducted. Within the case study Novi Sad, it was estimated that the toxic pressure at selected localities is low, but still higher in the urban zone of Novi Sad comparing to the upstream localities. Based on the effects of water samples from the same sites *in vitro* pERK 1/2 assay showed to be a potentially useful tool for monitoring the effects of pollution in aquatic ecosystems, relatively sensitive, which can detect the response in the treatment of complex environmental samples containing compounds that affect ERK 1/2 signal path. The limitation of this method, as an independent tool, is the low specificity of the ERK 1/2 signaling pathway, which can be affected by a large number of substances with different modes of action, so its potential is reflected in application with complementary methods within complex *in vitro* bioassay batteries. The case study of Novi Sad also focused on the improvement of field protocols and experimental settings that enable the use of biomarkers on different spatial and temporal scales in investigative monitoring programs with emphasis on large rivers, which include a cage system from natural populations. Using a caging system for *C. carpio*, it was confirmed that the use of biometric parameters as biomarkers requires a longer exposure time, while the most sensitive parameters were catalase enzyme activity, immune response and autophagy parameters and neuromarkers of neurotoxicity, especially the myelin basic protein. Together with the detected substances in the serum and muscle tissue of the individuals, the responses of the biomarkers of neurotoxicity indicated the presence of this group of pollutants at the analyzed localities. The results of biomarker analysis in fish from natural populations highlight the importance of newly identified roles of different genes and proteins commonly considered biomarkers of the effect, showing that changes in these parameters do not necessarily indicate deterioration in fish health but should be interpreted as an adaptive response to chemical stress, rather than direct evidence of the environmental impact of *in situ* pollution. The case study on the wider spatial scale of the Danube River analyzed the effects of pollutants in natural populations of *Alburnus alburnus*, with no differences between the analyzed localities due to natural variability and small sample size, as well as the lack of adequate reference locality. Among the analyzed parameters, the most sensitive was the gene expression of the *erk2* gene, which had the highest level of correlation with the drug opipramol. Based on the results of biomarker analysis from both case studies, a system for aggregation of biomarker battery responses and a diagnostic multiparametric set of tools for quantifying the *in situ* effects of pollutant mixtures at the individual level, populations and communities were applied. The results of the multiparameter analysis of the results of the Novi Sad case study confirmed that the pollution from untreated wastewater of the city of Novi Sad, represents a significant pressure on the Danube. The application of a multiparametric toolbox on a wider spatial scale (Danube case study) enabled the transformation of a large amount of data into unique matrices for qualitative evaluation of analyzed sites, divided into classes with similar patterns and interpreted based on matrices, with limitations and shortcomings

	such as the lack of data on the chronic toxicity of a large number of detected substances, the lack of an adequate reference locality (which would be useful in defining the range of responses for biomarkers for commonly used species) and the high natural variability of biomarker responses. In natural populations, it is convenient to use parameters that represent the cumulative effect of exposure, such as body indices, bioaccumulation of substances and genotoxicity parameters, as biomarkers of the effect.
Accepted on Scientific Board on:	17. 05. 2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: dr Sonja Kaišarević, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Mentor: dr Ivana Teodorović, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: dr Stoimir Kolarević, Senior research associate, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković"
Note:	

Sadržaj

Lista skraćenica.....	
Rezime.....	
Abstract.....	
1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. Multistres uslovi u akvatičnim ekosistemima.....	6
2.1.1. Hemijski stres kao činilac ukupnog stresa u akvatičnim ekosistemima.....	7
2.2. Zagađenje akvatičnih ekosistema.....	9
2.2.1. Smeše polutanata.....	9
2.3. Merenje i predviđanje efekta smeša na biološke sisteme.....	10
2.3.1. Predviđanje toksičnosti smeša.....	11
2.4. Propisi u oblasti upravljanja vodama.....	12
2.4.1. Okvirna Direktiva o vodama.....	12
2.5. Monitoring hemijskog statusa.....	14
2.5.1. Tehnike uzorkovanja vode.....	15
2.5.2. Pristupi u detekciji polutanata hemijskim analizama.....	17
2.6. Biomarkeri.....	18
2.6.1. Primena biomarkera u ekotoksikologiji.....	19
2.6.2. Najčešće korišćeni biomarkeri.....	20
2.6.3. Razvoj i unapređivanje metoda za analize biomarkera.....	24
2.6.4. Eksperimentalne postavke za procenu efekata hemijskog stresa <i>in situ</i> upotrebom biomarkera.....	26
2.7. <i>In vitro</i> bioeseji.....	32
2.7.1. Najčešće korišćeni <i>in vitro</i> bioeseji.....	32
2.7.2. Primena bioanalitičkih metoda u proceni kvaliteta voda.....	33
2.8. Kombinovana upotreba analitičkih i bioanalitičkih metoda.....	36
2.9. Multiparametarski pristup proceni uticaja hemijskog stresa na akvatične ekosisteme.....	36
3. CILJEVI.....	40
4. MATERIJAL I METODE.....	43
4. 1. Eksperimentalni pristup.....	44

4.2. Studija slučaja Novi Sad	46
4.2.1. <i>In vitro</i> pERK 1/2 enzimski imunoesej (ELISA) sa LVSPE uzorcima vode Dunava	46
4.2.2. Kavezni sistem izlaganja riba	53
4.2.3. Prirodne populacije <i>Abramis brama</i>	55
4.2.4. Podaci drugih istraživačkih grupa iz studije slučaja Novi Sad	58
4.3. Studija slučaja Dunav	59
4.3.1. Prirodne populacije <i>Alburnus alburnus</i>	59
4.3.2. Ostali podaci iz JDS3 kampanje korišćeni u tezi	62
4.4. Biomarkeri kod riba	62
4.4.1. Biometrijski parametri riba	62
4.4.2. Određivanje aktivnosti enzima	62
4.4.3. Analiza genske ekspresije	67
4.5. Procena hroničnog toksičnog pritiska pomoću pristupa Toksičnih Jedinica (TU)	71
4.6. Statistička analiza i grafički prikaz rezultata	72
5. REZULTATI	73
5.1. Studija slučaja Novi Sad	75
5.1.1. Procena hroničnog toksičnog pritiska na odabranim lokalitetima	75
5.1.2. <i>In vitro</i> bioeseji u proceni efekata LVSPE uzoraka vode Dunava	80
5.1.3. Kavezni sistem izlaganja - <i>C. carpio</i>	84
5.1.4. Analizirani biomarkeri kod jedinki <i>A. brama</i> iz prirodnih populacija	95
5.2. Studija slučaja Dunav	100
5.2.1. Analiza genske ekspresije (RQ-PCR) kod jedinki vrste <i>A. alburnus</i>	100
5.3. Biomarkeri u multiparametarskom pristupu proceni efekta i uticaja hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima	106
5.3.1. Studija slučaja Novi Sad	107
5.3.2. Studija slučaja Dunav (JDS3)	112
6. DISKUSIJA	116
6.1. Studija slučaja Novi Sad	117
6.1.1. Potvrda hemijskog pritiska u urbanoj zoni Novog Sada	117
6.1.2. pERK imunoesej kao dijagnostički alat za procenu efekata kompleksnih smeša iz životne sredine	117
6.1.3. Biomarkeri kod riba u studiji slučaja Novi Sad	119
6.1.4. Hemijski stres na lokalitetima u okviru studije slučaja Dunav	129
6.1.5. Biomarkeri kod <i>A. alburnus</i> iz studije slučaja Dunav	129

6.1.6. Veza između rezultata <i>in vitro</i> analiza sa LVSPE uzorcima vode i biomarkera kod riba iz prirodnih populacija	133
6.2. Prednosti i mane različitih eksperimentalnih postavki u <i>in situ</i> istraživanjima	134
6.3. Perspektive primene biomarkera u monitoringu akvatičnih ekosistema	138
6.4. Biomarkeri i multiparametarski pristup identifikaciji hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima	139
6.4.1 Agregacija signala baterije biomarkera	140
6.4.2 Integracija ABR u multiparametarski sistem	142
7. ZAKLJUČCI	146
8. LITERATURA	150
PRILOG DOKTORSKE DISERTACIJE	I
I Hemijske analize	II
II Toksični pritisak	XXIX
III <i>In vitro</i> eseji	XXXVIII
IV Biomarkeri	XLI
V Multiparametarski pristup	LIV
BIOGRAFIJA	

Lista skraćenica

ABR	Srednji odgovor biomarkera
AChE	Acetilholinesteraza
AOP teorija	Teorija puteva koji vode negativnim ishodom (engl. Adverse outcome pathways)
BEQ _{bio}	Bioanalitički ekvivalenti koncentracija
BQE	Biološki elementi kvaliteta
CAT	Katalaza
CES	Karboksilesteraza
CF	Kondicioni factor, integrativni pokazatelj zdravstvenog statusa jedinki riba
CM	Komet esej
conc _i	Koncentracija kvantifikovane supstance
CT	Pragovni ciklus PCR amplifikacije gena, u kom fluorescencija raste značajno iznad pozadinske fluorescencije
CYP enzim	Citohrom P450 enzim (engl. cytochrome P450 enzyme)
Df	Faktor razblaženja (engl. <i>dillution factor</i>)
DMSO	Dimetil sulfoksid
EBM	Biološke metode za monitoring efekta
EBT	Bioanatičke tehnike za monitoring efekta
EC	Efektivna koncentracija (engl. effective concentration)
EC _{IR0.5}	Efektivna koncentracija koja indukuje koja izaziva indukcioni odnos od 0.5
EC _{IR1.5}	Efektivna koncentracija koja indukuje koja izaziva indukcioni odnos od 1.5
EDA	Efektom usmerene analize (engl. effect-directed analysis).
EDCs	Ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću
EEQ	Ekvivalent estradiola
Ef	Faktor obogaćenja (engl. <i>enrichment factor</i>)
EGF	Epidermalni faktor rasta (engl. Epidermal growth factor)
EPA	Agencija za zaštitu životne sredine (eng. <i>environmental protection agency</i>)
EQS	Standard kvaliteta životne sredine (eng. <i>environmental quality standard</i>). WFD definiše ove standarde kao koncentraciju određenog polutanta ili grupe polutanata u vodi, sedimentu ili bioti koja ne treba da se premaši sa ciljem očuvanja ljudskog zdravlja i životne sredine
ERA	Ekološka procena rizika (engl. ecological risk assessment)

EROD	7-etoksirezorufin-O-deetilaza
GC	Lokalitet pod neposrednim uticajem ispusta komunalnih otpadnih voda Novog Sada (GC skraćeno od general collector)
GSI	Gonadosomatski indeks
GST	Glutation S-transferaza
HSI	Hepatosomatski indeks
IBA	Važno područje za ptice (engl. <i>Important bird area</i>)
ICPDR	Međunarodna komisija za zaštitu reke Dunav (engl. <i>International Commission for the Protection of the Danube River</i>)
<i>In situ</i> testovi	Ekotoksikološki eksperimenti koji se izvode na terenu koristeći organizme postavljene u kavezu kako bi se izmerili efekti zagađenja u realnim uslovima životne sredine. Detaljnije u Baird (2007).
IoC	Indeks kauzalnosti (engl. <i>index of causality</i>). Mera ukupne jačine dokaza da je određena supstanca ili smeša odgovorna za uočeni efekat.
IoEEI	Indeks očekivanog ekološkog uticaja (engl. <i>index of expected ecological impact</i>). Mera za ukupni očekivani ekološki uticaj (kao npr od izdvojenih efekata na jedinke ili populacije laboratorijskih test organizama)
IPA	Važno područje za biljke (engl. <i>Important plant area</i>)A
IR	Indukcioni odnos (engl. <i>induction ratio</i>)
IUCN	Međunarodna unija za zaštitu prirode (engl. <i>International Union for Conservation of Nature</i>)
JDS3	Treća zajednička kampanja istraživanja reke Dunav (engl. <i>Joint Danube Survey 3</i>)
LOE	Linija (nivo) dokaza (engl. <i>line of evidence</i>). Odnosi se na pojedinačno (tip) ekotoksikološko istraživanje koje obezbeđuje određeni set podataka i tip dokaza u kontekstu šireg cilja istraživanja. Što su sličniji rezultati koji se dobiju iz nezavisnih LOE, opšte izvođenje zaključaka istraživanja je jače (→WoE). U ovom dokumentu izdvojene linije dokaza su →EDF, →EDA, →in situ tests, →STU.
LVSPE	Ekstrakcija čvrste faze uzoraka vode iz velikih zapremina (engl. <i>large volume solid phase extraction</i>)
MN	Mikronukleus esej
MoA	Mehanizam toksičnog dejstva (engl. <i>mode of action</i>)
NE	Normalizovana genska ekspresija
NOEC	Najviša koncentracija test supstance koja ne izaziva statistički značajan efekat (engl. <i>No Observed Effect Concentration</i>).
PAHs	Policiklični aromatičnu ugljovodonici

PCA	Analiza glavnih komponenata (engl. <i>Principal component analysis</i>)
pERK 1/2	Fosfo-ERK1/2 ELISA test
PNEC	Predviđena koncentracija bez efekta (engl. <i>predicted no effect concentration</i>)
POPs	Perzistentni organski polutanti
qRT-PCR	Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
QSAR	Kvantitativna veza strukture hemijskog jedinjenja sa njegovom biološkom aktivnošću (engl. <i>quantitative structure-activity relationship</i>)
REACH	Uredba Evropske Unije (EC 1907/2006) o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničenjima hemikalija
REF	Vrednost ekvivalentna koncentraciji uzorka, izražena kao relativni factor obogaćenja (engl. <i>Relative enrichment factor</i>)
RL	Referentni lokalitet: uzvodno od ispusta komunalnih otpadnih voda Novog Sada (LVSPE uzorkovanje i kavezna postavka), Specijalni rezervat prirode "Gornje Podunavlje" (uzorkovanje jedinki iz prirodnih populacija deverika)
SA	Lokalitet u reci Sava, nizvodno od Šapca
SD	Standardna devijacija
SEPA	Agencija za zaštitu životne sredine Republike Srbije
SQT	Sediment quality triad
STU	Aritmetička suma toksičnih jedinica (TU)
SU	Lokalitet 7 km nizvodno od Novog Sada u blizini ribarskog naselja Subić
SUM TU	Suma toksičnih jedinica
TBE	Test pomoću kog se određuje broj živih ćelija u suspenziji (engl. <i>Trypan blue exclusion test</i>)
TCDD	dioksin, 2,3,7,8-tetrahlordi-benzo-p-dioksin (engl. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine)
TSCA	Inventar toksičnih supstanci (engl. <i>Toxic Substances Control Act Chemical Substance Inventory</i> (TSCA Inventory))
TU	Toksična jedinica (engl. <i>toxic unit</i>) Odnos između koncentracije supstance izmerene ili procenjene u životnoj sredini i mere njene ekotoksičnosti (npr. EC50, NOEC) ili pragovne vrednosti u životnoj sredini (npr PNEC).
Tua	Akutne toksične jedinice
TUch	Hronične toksične jedinice
TUch	hronične toksične jedinice
US EPA	Agencija SAD za zaštitu životne sredine (engl. <i>United States Environmental Protection Agency</i>)

WEQ	Ekvivalent zapremine uzorka vode (engl. <i>volume water equivalent</i>)
WFD	Okvirna Direktiva o vodama
WoE	Metod korišćen za utvrđivanje kauzalnosti između efekta i stresora dodavanjem težinskih faktora različitim linijama dokaza (engl. <i>Weight-of-evidence</i>)

Rezime

Akvatični ekosistemi su konstantno izloženi multistres uslovima, jer na njih simultano deluju različiti tipovi pritisaka - od globalnih promena, preko hidromorfoloških izmena vodnih tela do zagađenja poreklom iz koncentrisanih i rasutih izvora. Efikasnost upravljačkih mera u cilju zaštite ili unapređenja statusa akvatičnih ekosistema zavise u velikoj meri od pouzdane procene rizika i precizne identifikacije ključnih pritisaka, što u multistres uslovima nije jednostavno. Regulatorno uslovljeni monitoring programi imaju za cilj pre svega procenu hemijskog i ekološkog statusa (potencijala) vodnih tela. Međutim, dugogodišnja iskustva pokazuju da po pravilu, ocene statusa na osnovu ova dva ključna kriterijuma nisu saglasne, pa je teško ustanoviti jasne uzročno – posledične veze između zagađenja hazardnim supstancama i promena na nivou akvatičnih životnih zajednica. Jedna od mogućnosti za prevazilaženje ovog problema je primena bioanalitičkih (mahom *in vitro*) metoda i biomarkera (kod eksponiranih jedinki i populacija) u retrospektivnoj proceni rizika kao spona između hemijskog i biološkog monitoringa. Biomarkeri kao rani pokazatelji prisustva i / ili efekata hemijskog stresa mogu doprineti identifikaciji prioritetnih lokacija, hazardnih supstanci i njihovih smeša i povezati izloženost određenim klasama polutanata ili njihovim smešama u životnoj sredini, sa efektima uočenim na višim nivoima biološke organizacije. Odabir optimalne baterije komplementarnih opštih i specifičnih ekosistemski relevantnih biomarkera, različitih nivoa biološke organizacije, od molekularnih do fizioloških, primenljivih u različitim prostorno-vremenskim okvirima, i dalje predstavlja istraživački izazov i stoga je i predmet istraživanja ove doktorske disertacije. Opšti cilj istraživanja je bio odabir, optimizacija i integracija baterije fizioloških, enzimskih i molekularnih biomarkera kod riba, kao ključnog segmenta kompleksnog multiparametarskog dijagnostičkog pristupa za identifikaciju hemijskog stresa koji predstavlja značajan pritisak na akvatične ekosisteme u realnim multistres uslovima. Specifični ciljevi su vezani za zadatke dve studije slučaja u okviru kojih je istraživanje sprovedeno. U okviru studije slučaja Novi Sad procenjeno je da je toksični pritisak na odabranim lokalitetima nizak, ali ipak viši u gradskoj zoni Novog Sada u odnosu na uzvodne lokalitete. Na osnovu efekata uzoraka vode sa istih lokaliteta *in vitro* pERK 1/2 esej se pokazao kao potencijalno koristan alat za monitoring efekta zagađenja u akvatičnim ekosistemima, zadovoljavajuće osetljivosti, kojom je moguće detektovati odgovor pri tretmanu kompleksnim uzorcima iz životne sredine koji sadrže jedinjenja koja utiču na ERK1/2 signalni put. Ograničenje ove metode, kao samostalnog alata predstavlja je niska specifičnost ERK1/2 signalnog puta na koji može uticati veliki broj supstanci sa različitim načinima delovanja, pa se njegov potencijal ogleda u primeni sa komplementarnim metodama u okviru kompleksnih baterija *in vitro* bioeseja. Studija slučaja Novi Sad je u fokusu imala i unapređenje terenskih protokola i eksperimentalnih postavki koji omogućavaju primenu biomarkera na različitim prostorno-vremenskim skalama u istražnim monitoring programima sa akcentom na velike reke, a koji podrazumevaju kavezni sistem izlaganja jedinki riba i procenu efekata hemijskog stresa kod jedinki iz prirodnih populacija. Primenom kavezne postavke izlaganja jedinki *C. carpio* je potvrđeno da je za upotrebu biometrijskih parametara kao biomarkera potrebno duže vreme izlaganja, dok su najosetljiviji parametri bili aktivnost enzima katalaza, parametri imunog odgovora i autofagije kao i biomarkeri neurotoksičnosti, među kojima

se posebno istakao gen za bazni protein mijelina. Zajedno sa detektovanim supstancama u serumu i mišićnom tkivu jedinki, odgovori biomarkera neurotoksičnosti su ukazali na zastupljenost ove grupe polutanata na analiziranim lokalitetima. Rezultati analize biomarkera kod jedinki riba iz prirodnih populacija ističu značaj novoidentifikovanih uloga različitih gena i proteina koji su uobičajeno smatrani biomarkerima efekta, pokazujući da promene u ovim parametrima ne moraju nužno ukazivati na pogoršanje zdravlja jedinki riba, već bi se trebale tumačiti kao adaptivni odgovor na hemijski stres, pre nego direktan dokaz ekološkog uticaja zagađenja in situ. U okviru studije slučaja na široj prostornoj skali tok reke Dunav izvršena je analiza efekata polutanata u prirodnim populacijama *Alburnus alburnus*, pri čemu nisu uočene razlike između analiziranih lokaliteta usled prirodne varijabilnosti i male veličine uzorka, kao i nedostatka adekvatnog referalnog lokaliteta. Među analiziranim parametrima, najosetljivija je bila genska ekspresija *erk2* gena, koja je bila u najvišem nivou korelacije sa lekom opipramolom. Na rezultatima analize biomarkera iz obe studije slučaja, primenjen je sistem za agregaciju odgovora baterije biomarkera i dijagnostički multiparametarski set alata za kvantitaciju in situ efekata smeša polutanata na nivou jedinki, populacija i zajednica. Rezultatima multiparametarske analize rezultata studije slučaja Novi Sad je potvrđeno da zagađenje koje dospeva putem neprečišćenih otpadnih voda grada Novog Sada, predstavlja značajan pritisak na Dunav. Primena multiparametarskog seta alata na široj prostornoj skali (studija slučaja Dunav) je omogućila transformaciju velikog broja podataka u jedinstvene matrice za kvalitativnu evaluaciju analiziranih lokaliteta, koji su podeljeni u klase sa sličnim obrascima efekata i tumačeni na osnovu matrica, uz ograničenja i uočene nedostatke kao što su nedostatak podataka o hroničnoj toksičnosti velikog broja detektovanih supstanci, nedostatak adekvatnog referalnog lokaliteta (zbog čega bilo bi korisno definisanje opsega odgovora za biomarkere za najčešće korišćene vrste) i velika prirodna varijabilnost odgovora biomarkera (koja bi se delimično mogla neutralisati dovoljno velikim uzorkom jedinki iz prirodnih populacija). Kod prirodnih populacija kao biomarkere efekta je pogodno koristiti parametre koji predstavljaju kumulativan efekat izlaganja kao što su telesni indeksi, bioakumulacija supstanci i parametri genotoksičnosti.

Abstract

Aquatic ecosystems are constantly exposed to multistress conditions, because they are simultaneously affected by different types of pressures - from global changes, through hydromorphological changes of water bodies to pollution originating from concentrated and bulk sources. The effectiveness of management measures to protect or improve the status of aquatic ecosystems depends to a large extent on reliable risk assessment and accurate identification of key pressures, which is not easy in multistress conditions. Regulatory conditioned monitoring programs are primarily aimed at assessing the chemical and environmental status (potential) of water bodies. However, many years of experience show that, status assessments based on these two key criteria do not agree, so it is difficult to establish clear cause-and-effect links between hazardous substance pollution and changes in aquatic communities. One of the possibilities for overcoming this problem is the application of bioanalytical (mostly *in vitro*) methods and biomarkers (in exposed individuals and populations) in retrospective risk assessment as a link between chemical and biological monitoring. Biomarkers as early indicators of the presence and / or effects of chemical stress can contribute to the identification of priority sites, hazardous substances and their mixtures and link exposure to certain classes of pollutants or their mixtures in the environment with effects observed at higher levels of biological organization. Selecting the optimal battery of complementary general and specific ecosystemically relevant biomarkers, different levels of biological organization, from molecular to physiological, applicable in different space-time frameworks, is still a research challenge and therefore the subject of this doctoral dissertation. The general goal of the research was to select, optimize and integrate batteries of physiological, enzymatic and molecular biomarkers in fish, as a key segment of a complex multiparameter diagnostic approach to identify chemical stress that puts significant pressure on aquatic ecosystems in real multistress conditions. The specific objectives are related to the tasks of the two case studies within which the research was conducted. Within the case study Novi Sad, it was estimated that the toxic pressure at selected localities is low, but still higher in the urban zone of Novi Sad comparing to the upstream localities. Based on the effects of water samples from the same sites *in vitro* pERK 1/2 assay showed to be a potentially useful tool for monitoring the effects of pollution in aquatic ecosystems, relatively sensitive, which can detect the response in the treatment of complex environmental samples containing compounds that affect ERK 1/2 signal path. The limitation of this method, as an independent tool, is the low specificity of the ERK 1/2 signaling pathway, which can be affected by a large number of substances with different modes of action, so its potential is reflected in application with complementary methods within complex *in vitro* bioassay batteries. The case study of Novi Sad also focused on the improvement of field protocols and experimental settings that enable the use of biomarkers on different spatial and temporal scales in investigative monitoring programs with emphasis on large rivers, which include a cage system from natural populations. Using a caging system for *C. carpio*, it was confirmed that the use of biometric parameters as biomarkers requires a longer exposure time, while the most sensitive parameters were catalase enzyme activity, immune response and autophagy parameters and neuromarkers of neurotoxicity, especially the myelin basic protein. Together with the detected substances in the serum and muscle tissue of the individuals,

the responses of the biomarkers of neurotoxicity indicated the presence of this group of pollutants at the analyzed localities. The results of biomarker analysis in fish from natural populations highlight the importance of newly identified roles of different genes and proteins commonly considered biomarkers of the effect, showing that changes in these parameters do not necessarily indicate deterioration in fish health but should be interpreted as an adaptive response to chemical stress, rather than direct evidence of the environmental impact of in situ pollution. The case study on the wider spatial scale of the Danube River analyzed the effects of pollutants in natural populations of *Alburnus alburnus*, with no differences between the analyzed localities due to natural variability and small sample size, as well as the lack of adequate reference locality. Among the analyzed parameters, the most sensitive was the gene expression of the *erk2* gene, which had the highest level of correlation with the drug opipramol. Based on the results of biomarker analysis from both case studies, a system for aggregation of biomarker battery responses and a diagnostic multiparametric set of tools for quantifying the *in situ* effects of pollutant mixtures at the individual level, populations and communities were applied. The results of the multiparameter analysis of the results of the Novi Sad case study confirmed that the pollution from untreated wastewater of the city of Novi Sad, represents a significant pressure on the Danube. The application of a multiparametric toolbox on a wider spatial scale (Danube case study) enabled the transformation of a large amount of data into unique matrices for qualitative evaluation of analyzed sites, divided into classes with similar patterns and interpreted based on matrices, with limitations and shortcomings such as the lack of data on the chronic toxicity of a large number of detected substances, the lack of an adequate reference locality (which would be useful in defining the range of responses for biomarkers for commonly used species) and the high natural variability of biomarker responses. In natural populations, it is convenient to use parameters that represent the cumulative effect of exposure, such as body indices, bioaccumulation of substances and genotoxicity parameters, as biomarkers of the effect.

1. UVOD

Na akvatične ekosisteme simultano utiče mnoštvo stresora kao što su globalne klimatske promene, degradacija staništa, zagađenje i prisustvo invazivnih vrsta, pri čemu ovakvi multistres uslovi često dovode do pogoršanja ekološkog statusa (Ormerod i sar., 2010). Kao najznačajniji pritisak, pored degradacije staništa, veliki broj autora ističe zagađenje (Vörösmarty i sar., 2010; Schinegger i sar., 2012; Dahm i sar., 2013), koje u površinskim vodama najčešće čine kompleksne smeše polutanata koje uključuju pesticide, lekove, industrijske hemikalije i njihove transformacione produkte. Polutanti u vodotoke dospevaju preko tačkastih izvora kao što su ispusti otpadnih komunalnih i industrijskih voda i preko rasutih izvora, spiranjem sa urbanih i poljoprivrednih površina ili remobilizacijom iz sedimenata (Hug i sar., 2014). Ove supstance, pojedinačno i u smešama mogu prouzrokovati negativne efekte u akvatičnim organizmima i dovesti do narušavanja ekološkog statusa (Loos i sar., 2009; Heeb i sar., 2012). Polutanti koji dospevaju u akvatične ekosisteme mogu na organizme delovati tako što izazivaju oksidativni stres, narušavaju funkciju imunog sistema, nervnog sistema, oštećuju nasledni materijal, a kao posebno značajna grupa supstanci se ističu ksenobiotici sa hormonskim delovanjem koji remete brojne procese u organizmima što za posledicu može imati smanjenje ili izostanak reprodukcije kod akvatičnih životinja, koja predstavlja osnovu održanja populacija (Zhou i sar., 2010; Orton i Tyler, 2014). Propisi i upravljačke mere koje su sprovedene prethodnih decenija su kao rezultat dali smanjenje emisije polutanata koji su prepoznati kao rizik za akvatične ekosisteme i izazivali akutne efekte. Danas se polutanti u životnoj sredini sreću najčešće u relativno niskim koncentracijama. Međutim, kontinuirana izloženost organizama može dovesti do pojave subletalnih i hroničnih efekata na eksponiranim jedinkama, a efekti mogu propagirati i na više nivoje biološke organizacije u vidu smanjenja brojnosti populacija direktno pogođenih vrsta, što se dalje može reflektovati na promene na nivou celih životnih zajednica (Liu i sar., 2015). Okvirna direktiva o vodama (WFD, 2000/60/EC) Evropske Unije je napravila konceptualni pomak u regulativi koja u decenijama koje su prethodile WFD, nije bila biološki i ekosistemski orijentisana. WFD definiše monitoring programe za procenu hemijskog i ekološkog statusa vodnih tela. Međutim, hemijski status je određen isključivo sadržajem prioriternih supstanci. Iako se lista prioriternih supstanci periodično revidira i dopunjuje (Direktiva 2013/39/EU, Odluka 2015/495), ove supstance čine samo mali procenat ukupnog broja supstanci koje se nalaze u realnim uslovima u akvatičnim ekosistemima, pri čemu informacije o supstancama koje nisu na listi ili koje su nepoznate, kao i o dejstvu supstanci u smešama, izostaju. S druge strane, procena ekološkog statusa se zasniva na biološkim elementima kvaliteta vodnih tela koji se određuju na osnovu sastava i strukture akvatičnih zajednica (fitoplanktona, bentosnih beskičmenjaka, akvatičnih makrofita i riba), hidro-morfoloških i osnovnih fizičko-hemijskih pokazatelja kvaliteta vode. Ekološki status predstavlja integralni kriterijum, koji bi trebao da oslikava uticaj svih prisutnih stresora, koji se odražava na nivo životnih zajednica (Sanchez i Porcher, 2009; Altenburger i sar., 2015). Međutim, brojna istraživanja pokazuju da po pravilu, ocene statusa na osnovu ova dva ključna kriterijuma nisu saglasne, pa je teško ustanoviti jasne uzročno – posledične veze između zagađenja hazardnim supstancama i promena na nivou akvatičnih životnih zajednica. Glavni nosioci toksičnosti u površinskim vodama često nisu pojedinačne supstance sa prioriternih liste, već

su u pitanju smeše regulisanih i neregulisanih supstanci, zbog čega se napori i velika finansijska sredstva koja se ulažu za uklanjanje i monitoring ovih supstanci često pokazuju kao neefikasne. Zbog toga identifikacija ključnih pritisaka, ali i glavnih hemijskih stresora i njihovih smeša, kao i pronalaženje efikasnih rešenja za smanjenje zagađenja i dalje predstavlja istraživački i upravljački izazov (Malaj i sar., 2014; Brack i sar., 2015).

Osnovni ciljevi WFD - dostizanje dobrog hemijskog i barem dobrog ekološkog statusa do 2015. godine svih vodnih tela u Evropi nisu postignuti, između ostalog i zbog problema kod identifikacije ključnih pritisaka i stresora koji izazivaju negativne efekte u akvatičnim ekosistemima. čime je onemogućeno adekvatno usmeravanje upravljačkih mera. Pokazalo se da je revizija Direktive neophodna i započeta je 2019. godine. Zbog prisustva teško procenjivog i nepredvidivog broja polutanata u vodi, ciljane hemijske analize nisu dovoljne, a uspostavljeni hemijski monitoring i paralelna procena ekološkog statusa ne uspevaju da identifikuju relevante nosioce efekata u životnoj sredini, a upravljačke mere koje se donose na osnovu njih su često neefikasne (Busch i sar., 2016). Sa ciljem otklanjanja uočenih nedostataka trenutno važećih propisanih monitoring programa razvijaju se metode koje uključuju napredne tehnike uzorkovanja, hemijske ciljane i neciljane analize, in vivo, in vitro i in situ biološke metode za unapređenje hemijskog monitoringa, ali što je važnije, za integraciju tzv monitoringa efekta u proces procene statusa vodnih tela i uspostavljanje uzročno-posledničnih veza između stresora i uočenih efekata (Altenburger i sar., 2019).

Biološke metode za monitoring efekta, (engl. *Effect Based Methods* - EBM) koje nazivamo još i bioanalitičkim tehnikama ili alatima kao što su bioeseji i testovi akutne toksičnosti na bakterijama, algama, zooplanktonu i embrionima riba su integrativne tehnike pomoću kojih se mogu identifikovati i u određenom broju slučajeva kvantifikovati efekti smeša bez neophodne identifikacije prisutnih supstanci, ali i identifikovati ključni hemijski stresori koji su nosioci efekta na osnovu različitih obrazaca odgovora (Backhaus i sar., 2017; Brack i sar., 2017; Escher i sar., 2018; Wernersson i sar., 2015). Bioanalitičkim pristupom, posebno efektom usmerenim analizama (EDA), koje se dominantno zasnivaju na savremenim analitičkim tehnikama i celularnim in vitro esejima se analiziraju biološki efekti svih prisutnih hemijski detektovanih i nedetektovanih aktivnih supstanci i smeša u frakcionisanim ekstraktima uzoraka iz životne sredine (otpadne vode, površinske vode, sediment) (Neale i sar., 2015). EDA je prepoznata kao dobar i efikasan pristup u identifikaciji ključnih biološki aktivnih supstanci i smeša. Takozvani monitoring efekta predložen je kao dopuna monitoring programima u predstojećoj reviziji Okvirne Direktive o vodama. Međutim, pitanje ekosistemske relevantnosti ovakvog pristupa ostaje otvoreno, odnosno, primenom ovakvih metodologija izostaju informacije o vezi između efekata uočenih in vitro i potencijalnih efekata in situ a posebno njihove propagacije na nivo populacija i životnih zajednica (Escher i sar., 2018).

Efekti koji se mere na nivou biomarkera u akvatičnim organizmima koji su izloženi *in situ*, upravo mogu da služe kao veza između bioanalitičkog i biološkog pristupa, prikazujući holistički posledice na zdravstveni status organizama usled izloženosti polutantima u realnim uslovima (Allan i sar., 2006; Sanchez i Porcher, 2009). Tako, *in situ* metode koje podrazumevaju analizu biomarkera kod jedinki iz prirodnih populacija ili kod

jedinki odabrane model vrste koje su izložene u kavezima na lokalitetima od interesa pružaju direktnu meru integrisanih bioloških odgovora organizama koji su izloženi kompleksnim smešama supstanci i ne-hemijskim stresorima na datim lokalitetima, pri čemu su ribe, pored pojedinih beskičmenjačkih vrsta, najčešće korišćena grupa organizama za ovakve pristupe.

Trenutno važeći pristupi u monitoringu imaju za cilj identifikaciju prisustva i intenziteta promena na ekosistemskom nivou, ali ne obezbeđuju informacije o uzročno-posledničnim vezama između zagađenja i pogoršanja ekološkog statusa, što je neophodno za odabir i primenu adekvatnih upravljačkih strategija i mera (Backhaus i sar., 2019).

Biomarkeri predstavljaju komplementarni alat hemijskim, bioanalitičkim i ekološkim analizama u multiparametarskom pristupu za procenu ekološkog efekta hemijskog stresa *in situ* i mogu imati značajnu ulogu u povezivanju različitih linija dokaza (Backhaus i sar., 2017).

Usled prisustva velikog broja polutanata u vodenoj sredini i različitih efekata koje izazivaju, uključujući i efekte smeša, ne postoji univerzalni biomarker, pa se teži upotrebi baterija komplementarnih biomarkera (Lavado i sar., 2006; Sanchez i sar., 2008; Cazenave i sar., 2009). Odabir optimalne baterije opštih i specifičnih ekosistemski relevantnih biomarkera, različitih nivoa biološke organizacije, od molekularnih do fizioloških, primenljivih u različitim prostorno-vremenskim okvirima, definisanje njihovih individualnih težinskih faktora i integracija u kompleksne dijagnostičke multiparametarske alate zasnovane na optimalnom korišćenju svih raspoloživih informacija o lokalitetu od interesa predstavlja preduslov za šire prihvatanje i korišćenje biomarkera u politikama i praksi upravljanja vodnim resursima.

2. PREGLED LITERATURE

U ovom poglavlju obuhvaćen je predmet istraživanja disertacije uključujući probleme multistres uslova u akvatičnim ekosistemima, sa akcentom na hemijski stres. Opisana je primena različitih pristupa za identifikaciju i kvantitaciju hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima kao i predviđanje efekata smeša na akvatične organizme koji su obuhvaćeni trenutnim regulatornim okvirima i onih koji bi trebalo da budu uvršteni pri reviziji istih. Dat je kraći pregled primene metoda za procenu efekata zagađenja kao što su biomarkeri na nivou individue i *in vitro* bioanalitičke metode uključujući efektom usmerene analize i multiparametarski "weight of evidence" pristup. Pored konceptualnog aspekta, navedene su tehnike koje se primenjuju pri uzimanju uzoraka vode za hemijske i bioanalitičke metode, kao i eksperimentalne postavke izlaganja model organizama za analizu biomarkera *in situ*. Većina primera koji se odnose na pristup baziran na analizi biomarkera uključuje ribe kao model organizam, korišćen u istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji.

2.1. Multistres uslovi u akvatičnim ekosistemima

Na akvatične ekosisteme utiče mnoštvo stresora koji su povezani sa poljoprivredom, brojnim drugim privrednim granama i uopšteno antropogenim aktivnostima, što doprinosi pogoršanju njihovog ekološkog statusa (Ormerod i sar., 2010). Najznačajniji uticaj među stresorima imaju degradacija staništa, prisustvo invazivnih vrsta i zagađenje širokim spektrom supstanci (Vörösmarty i sar., 2010; Carpenter i sar., 2011).

Brojna su istraživanja koja se bave ispitivanjem uticaja različitih stresora na slatkovodne ekosisteme, pri čemu su tri studije na široj prostornoj skali identifikovale zagađenje vode i degradaciju staništa kao ključne uzročnike pogoršanja ekološkog statusa. Vörösmarty i sar., 2010 su istraživanjem obuhvatili uticaj 23 stresora na biodiverzitet na globalnom nivou, koji su uključivali upotrebu zemljišta, zagađenje vode (opterećenost nutrijentima, prisustvo pesticida), upotrebu vodnih resursa (degradaciju staništa, upotrebu vode) i biološke faktore (invazivne vrste, intenzivno ribarenje). Istakli su da je 65% slatkovodnih ekosistema umereno do visoko ugroženo, pri čemu izdvajaju zagađenje kao glavni uzrok pogoršanja biodiverziteta sa najvećim rizikom po biodiverzitet u slučajevima gde se više pomenutih stresora prostorno poklapa. Nakon zagađenja kao faktor sa najvišom korelacijom u odnosu na smanjenje biodiverziteta ističu intenzivnu upotrebu vodnih resursa. Dodatno, isti autori ističu da su procene antropogenih uticaja na akvatične ekosisteme ograničene pouzdanosti i informativnosti usled ograničenosti podataka o zagađujućim supstancama kao i brojnim drugim ugrožavajućim faktorima i njihovim međusobnim interakcijama.

Slično prethodno navedenom istraživanju, Schinegger i sar., 2012 su analizom obuhvatili podatke sa 9330 lokaliteta u evropskim rekama, pri čemu su u obzir uzeti zagađenje vode i degradacija staništa. Kao ugrožavajući faktor su takođe istakli zagađenje, koje je bilo detektovano na 59% lokaliteta, dok je degradacija staništa uslovljena hidrološkim pritiscima bila prisutna na 41% lokaliteta, a pritisci izazvani morfološkim promena vodotoka na 39% i remećenje povezanosti vodotokova na 35% lokaliteta.

Dodatno, Dahm i sar., 2013 su kao rezultat istraživanja koje je obuhvatilo analizu ekoloških efekata četiri stresora (hidromorfološka degradacija, zagađenje vode, načini korišćenja priobalnih zona i načini korišćenja slivnog područja) na 2302 reke u Nemačkoj i Austriji, kao dominantne nosioce potencijalnih ekoloških efekata na beskičmenjake, ribe i zajednice dijatomeja istakli zagađenje vode i načine korišćenja zemljišta u slivnom području.

Tipično, u rekama su izraženi multistres uslovi, zbog čega upravljačke mere, koje su fokusirane na pojedinačne stresore mogu biti nedovoljno efikasne za smanjenje ekološkog rizika. Zbog toga su integrativni koncepti, koji obuhvataju podatke hemijskih, ekotoksikoloških i ekoloških analiza esencijalni za suočavanje sa upravljačkim izazovima koji su vezani za efekte simultanog delovanja većeg broja stresora u rečnim ekosistemima (Schäfer i sar., 2016).

2.1.1. Hemijski stres kao činilac ukupnog stresa u akvatičnim ekosistemima

U realnim uslovima u akvatičnim ekosistemima, različiti stresori se često javljaju istovremeno, uz potencijalne međusobne interakcije, pri čemu su podaci o relativnom uticaju toksičnih supstanci na ukupni stres u akvatičnim ekosistemima oskudni (Amberg i sar., 2016). Veliki broj istraživanja koja se bave efektima različitih stresora u slatkovodnim ekosistemima je fokusiran na nutrijente (opterećenje organskom materijom), promenu klime, invazivne vrste i degradaciju staništa, dok aspekt toksičnih supstanci često ostaje zanemaren i pored njihove opšte prisutnosti i potencijalnih ekoloških efekata (Schwarzenbach i sar., 2006; Beketov i sar., 2013; Kohler i Tribskorn, 2013; Malaj i sar., 2014; Schäfer i sar., 2016; Thompson i sar., 2016).

Schäfer i sar., 2016 navode da organski polutanti u rekama značajno doprinose riziku od narušavanja ekološkog statusa, približnim intenzitetom kao invazivne vrste, dok su degradacija staništa i povećano prisustvo nutrijenata dominantni stresori.

Pojedini autori su primenili matematičke modele koji predviđaju uticaj toksičnih supstanci na sastav zajednica u rekama. Ipak, većina istraživanja je ograničena na mali broj lokaliteta (Belden i sar., 2007; Schäfer i sar., 2012), mali broj supstanci (de Zwart i sar., 2006) ili ne uzima u obzir povezanost toksičnih supstanci sa drugim stresorima (Malaj i sar., 2014).

Procene udela hemijskog u sveobuhvatnom stresu, kom su akvatični ekosistemi izloženi, se u najvećem broju slučajeva svode na predviđanje negativnih efekata na osnovu informacije o toksičnosti individualnih zagađujućih supstanci, koje se dobijaju laboratorijskim ispitivanjima. Pri tome, samo mali broj istraživanja koji se bavi uticajem organskih toksičnih supstanci na slatkovodne organizme na individualnom, populacionom nivou i nivou zajednica je izveden *in situ*. Zbog toga, informacije o istovremenoj pojavi organskih polutanata sa drugim stresorima i o relativnom uticaju polutanata na ukupni ekološki rizik u rekama ostaju nedorečene (Beketov i Liess, 2012; Schäfer i sar., 2016).

2.1.1.1. Efekti hemijskog stresa na akvatične organizme

U zagađenim ekosistemima, brojne supstance koje su prisutne u različitim ambijentalnim koncentracijama, dospevaju u tkiva organizama uključujući životinje i ljude (dos Santos i sar., 2021; Ansari i sar., 2021; Calatayud Arroyo i sar., 2021), predstavljajući ekološki rizik sa mogućim uticajem na ljudsko zdravlje (Malaj i sar., 2014).

Akvatični organizmi koji pripadaju različitim trofičkim nivoima imaju različite životne strategije, metaboličke puteve i stoga različite odgovore na hemijski pritisak (Ergene i sar., 2007; Aborgiba i sar., 2016; Pavlaki i sar., 2016). Tako, polutanti koji se nalaze u vodotocima, na ribe mogu negativno delovati na različite načine kao što su izazivanje oksidativnog stresa, narušavanje funkcije endokrinog, imunog i nervnog sistema, a mogu dovesti i do oštećenja naslednog materijala (Ahmad i sar., 2006; Bervoets i sar., 2008; Ings i sar., 2011; Gagnaire i sar., 2015; Deutschman i sar., 2016). Zagađenje predstavlja faktor koji se često povezuje sa smanjenjem populacija ribljih vrsta. Katastrofalni događaji kao što su pomori riba uslovljeni akutnim toksičnim efektima, kao i izumiranje brojnih ribljih vrsta tokom 1950-ih i 1960-ih godina u Evropi i Severnoj Americi je uslovlilo podizanje svesti o negativnim posledicama ispuštanja polutanata u akvatične ekosisteme. Veliki broj ovih događaja i uočenih negativnih efekata je bio uslovljen "makropolutantima" koji su u vodotocima detektovani u visokim koncentracijama ($\mu\text{g/L}$ - mg/L). Primenom mera kao što je striktnije regulisanje supstanci (povlačenje ili ograničenje upotrebe) i unapređenje tehnologija tretmana otpadnih voda je znatno smanjeno opterećenje akvatičnih ekosistema makropolutantima, nakon čega su uočeni problemi vezani za prisustvo "mikropolutanata" koji se nalaze u niskim koncentracijama (ng/L do niskih vrednosti izraženih u mg/L). Mikropolutanti obuhvataju supstance koje mogu biti biološki aktivne u niskim koncentracijama, pa kontinuirano izlaganje može dovesti do pojave subletalnih i hroničnih efekata kod izloženih jedinki. Mikropolutanti mogu uticati na različite aspekte opšteg stanja individue kao što su ponašanje ili reprodukcija, koja predstavlja najvažniji element održanja populacija (Ferguson-Cradler, 2018; Escher i sar., 2021), što se dalje može odraziti na nestanak vrsta sa nekog lokaliteta i na strukturu životnih zajednica (Liu i sar., 2015). Termin polutanti koji će se koristiti u daljem tekstu disertacije se odnosi na mikropolutante.

Među brojnim hemijskim stresorima koji dospevaju u površinske vode kao poseban problem su prepoznate supstance sa hormonskom aktivnošću (engl. *endocrine-disrupting chemicals*, EDCs) koje remete brojne procese koji se u organizmima akvatičnih životinja odvijaju pod uticajem hormona, što za posledicu može imati promenu ponašanja, smanjenje ili izostanak reprodukcije (Zhou i sar., 2010; Orton i Tyler, 2014). Zbog ekološke relevantnosti ove grupe supstanci, brojna istraživanja su bila usmerena na prisustvo i efekte estrogena u otpadnim vodama koje se ulivaju u površinske vode (Sumpter, 1998; Vethaak i sar., 2005), dok se interesovanje i broj istraživanja o supstancama koje utiču na druge fiziološke procese povećalo poslednjih godina, pa su se pojedine studije fokusirale na efekte smeša koje utiču na regulaciju progestogena, glukokortikoida, adaptivne odgovore na stres kao što su oksidativni stres i inflamacija (Escher i sar., 2012, 2014; Schriks i sar., 2010).

2.2. Zagađenje akvatičnih ekosistema

Diverzitet i kvantitet sintetičkih supstanci koje se proizvode, distribuiraju i otpuštaju u ekosisteme je u konstantnom porastu poslednjih decenija, pri čemu stopa porasta daleko prevazilazi ostale činioce promena u životnoj sredini, predstavljajući globalni problem i jedan od najvećih izazova za očuvanje i zaštitu integriteta ekosistema, a posledni problem i za očuvanje zdravlja ljudi (Bernhardt i sar., 2017; Naidu i sar., 2021).

Globalna distribucija polutanata nije ravnomerna, a zemlje u razvoju su pod najvećim pritiskom s obzirom na rastuću proizvodnju, što predstavlja dodatne izazove u razvoju propisa vezanih za hemikalije i izgradnju infrastrukture, posebno postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (Landrigan i sar., 2018).

O konstantnom porastu broja registrovanih supstanci svedoči podatak da se u junu 2015. godine u registru Američkog Hemijskog Društva (CAS registar) nalazilo 100 miliona supstanci, a u julu 2021. godine preko 183 miliona supstanci, pri čemu se dnevno u registar unese oko 15000 novih supstanci (CAS registry, <https://www.cas.org>). Ipak, u komercijalnoj upotrebi se nalazi daleko manje u odnosu na ukupan broj svih registrovanih supstanci, ali i ovaj broj beleži kontinuiran rast poslednjih godina. Broj supstanci koje se nalaze u upotrebi se suštinski razlikuje između država, odnosno regiona, a liste supstanci su brojne i nisu usaglašene. Wang i sar., 2020 su analizom 22 liste supstanci iz 19 država procenili da je na globalnom tržištu za proizvodnju i upotrebu registrovano preko 350000 supstanci i njihovih smeša. Pored njih, identitet preko 50 000 hemikalija nije dostupan javnosti jer je deklarisan kao poverljiv ili su one dvosmisleno opisane, što je slučaj za preko 70 000 hemikalija (Wang i sar., 2020).

Lista koja evidentira toksične supstance (engl. *Toxic Substances Control Act Chemical Substance Inventory*, TSCA) Agencije za zaštitu životne sredine (engl. *United States Environmental Protection Agency*, EPA) je u februaru 2022. godine sadržala 86631 supstanci, od kojih su 42039 supstance u komercijalnoj upotrebi. Pri tome se na ovoj listi ne nalaze supstance koje su regulisane drugim statutima u SAD kao za pesticide, hranu i aditive, lekove, kozmetičke proizvode, duvan i duvanske proizvode, nuklearne materijale i municiju (<https://www.epa.gov/tsca-inventory/how-access-tsca-inventory>).

2.2.1. Smeše polutanata

Površinske vode su obično opterećene kompleksnim smešama polutanata koje čine desetine, pa i stotine hiljada različitih supstanci koje obuhvataju pesticide, biocide, lekove, industrijske hemikalije, proizvode za ličnu higijenu i njihove metabolite i transformacione produkte (Brack i sar., 2019a).

Ove supstance dospevaju u vodotoke preko tačkastih izvora kao što su ispusti otpadnih komunalnih i industrijskih voda i preko rasutih izvora, spiranjem sa urbanih i poljoprivrednih površina. Pojedinačne supstance i njihove smeše mogu prouzrokovati

negativne efekte u akvatičnim organizmima i dovesti do narušavanja hemijskog i ekološkog statusa vodotoka i predstavljati rizik za zdravlje ljudi (Loos i sar., 2009; Heeb i sar., 2012). Često, glavni nosioci toksičnosti u površinskim vodama nisu pojedinačne supstance koje se nalaze na prioritetnoj listi, već smeše brojnih regulisanih i neregulisanih supstanci. Supstance koje se nalaze u smešama mogu doprineti toksičnosti u kompleksnoj smeši čak i kada se nalaze u koncentracijama koje su niže od onih koje izazivaju efekte kod određenih organizama samostalno, ili čak ako se nalaze ispod detekcionih limita primenjenih analitičkih metoda (Kortenkamp i Faust, 2018). Istraživanje koje potkrepljuje ove tvrdnje je sprovedeno od strane Junghans (2004) i pokazuje da je smeša 43 supstance u individualnim koncentracijama u visini desetine koncentracije NOEC vrednosti (vrednosti koncentracija bez uočenog efekta) ipak izazvala značajan biološki efekat.

2.3. Merenje i predviđanje efekta smeša na biološke sisteme

Hronološki gledano, do prethodne decenije, zagađenje se pripisivalo određenim grupama industrijskih supstanci, a procena rizika i regulatorna tela su smatrala rizik od smeša zanemarljivim dokle god je izloženost svim pojedinačnim supstancama u smeši ispod nivoa za koje je procenjeno da su bezbedni za svaku pojedinačnu supstancu (Evropska komisija, 2011; Martin i sar., 2013). Sa porastom količine naučnih podataka o efektima smeša, poslednjih godina, raste svest o činjenici da su ekosistemi izloženi koktelima supstanci, od kojih je samo deo identifikovan, a da zanemarivanje efekta smeša može dovesti do potcenjivanja rizika po živi svet i životnu sredinu.

Iako su međunarodna tela poput svetske zdravstvene organizacije (WHO), prepoznala potrebu da se smeše uvrste u procenu rizika i propise, proces prevođenja dokaza o efektima smeša u funkcionalniju regulativu je izuzetno spor, tako da se sa nekoliko izuzetaka, regulatorni sistemi širom sveta i dalje oslanjaju pretežno na procene efekata pojedinačnih supstanci (Meek i sar., 2011; Kortenkamp i Faust, 2018). Svest o potrebi da se kompleksne smeše prepoznaju kao problem i rešenja usmere ka njemu, je porasla uvođenjem koncepta ekspozoma, koji objedinjuje izloženost ljudi hemijskim i ostalim stresorima sa zdravstvenim efektima, što se odnosi na svu biotu (Wild, 2005; Escher i sar., 2020). Za procenu toksičnosti smeša se koriste dva koncepta, jedan koji podrazumeva da smeše čine supstance sa istim načinom delovanja i drugi koji pretpostavlja da smeše čine supstance sa različitim načinom delovanja (Kortenkamp, 2014). Iako se može pretpostaviti da se smeše u životnoj sredini koje sadrže desetine i stotine hiljada supstanci ponašaju na osnovu modela, ostaje nepoznat doprinos neidentifikovanih supstanci efektu smeša, zbog čega se razvijaju naprednije bioanalitičke metode, kao i kompleksni multiparameterski sistemi za kvantitativnu procenu efekata smeša (Backhaus i sar., 2017, 2019).

2.3.1. Predviđanje toksičnosti smeša

Procena toksičnosti smeša različitih supstanci na prirodne populacije, zajednice i ekosistemski integritet je dugo predmet istraživanja, ali i dalje predstavlja istraživački izazov (Altenburger i sar., 2013; Carvalho i sar., 2014). Jedan od razloga je konstantan porast broja različitih supstanci u životnoj sredini, što čini nemogućim testiranje toksičnosti svih mogućih kombinacija (Panizzi i sar., 2017). Iz ovog razloga se primenjuje predviđanje toksičnosti smeša na osnovu matematičkih modela (Løkke, 2010).

Za ispitivanje toksičnosti smeša se koriste dva pristupa. Jedan je zasnovan na konceptu ispitivanja ukupne toksičnosti smeše ili uzorka (engl. *whole mixture approach*), pri čemu efekti mogu biti empirijski utvrđeni testiranjem uzorka ili procenjeni na osnovu podataka o smeši sličnog sastava (npr. sličnog sastava u kontekstu prisutnih komponenti i njihovih koncentracija). Testovima ukupne toksičnosti uzimaju se u obzir sve neidentifikovane supstance i interakcije među komponentama smeše, ali se po pravilu ne identifikuju supstance koje su nosioci efekta, niti se kvantifikuje udeo pojedinačnih komponenti u ukupnoj toksičnosti smeše. Drugi pristup se zasniva na podacima o delovanju identifikovanih i kvantifikovanih pojedinačnih supstanci koje čine smešu (engl. *component mixture approach*) i generalno je primenljiv kada su komponente u smeši poznate (Kortenkamp i sar., 2009; Bopp i sar., 2015).

Za procenu efekata smeša na osnovu podataka o delovanju pojedinačnih supstanci koje ulaze u sastav smeše su razvijeni različiti matematički modeli, među kojima su dva osnovna i najčešće korišćena modela, model adicije koncentracija (engl. *concentration addition model*, CA) i model nezavisnog dejstva (engl. *independent model*, IA) (Altenburger i sar., 2000; Backhaus i sar., 2000). Uopšteno, u slučaju kada supstance u smeši imaju sličan mehanizam toksičnog dejstva CA model se smatra odgovarajućim u proceni njihove toksičnosti, dok se u slučaju različitog mehanizma toksičnog dejstva supstanci, preporučuje primena IA modela (Faust i sar., 2001; Altenburger i sar., 2003; Arrhenius i sar., 2004).

CA model su prvi put upotreбили Loewe i Muischnek, 1926. Godine za dvokomponentne smeše, dok ga je kao model za predviđanje efekta višekomponentne smeše formulisao Berenbaum, 1985, a u tom obliku se i danas koristi (Junghans i sar., 2003). CA model se primenjuje univerzalno. Iako podrazumeva da supstance koje čine smešu imaju isti način delovanja (Altenburger i sar., 2000). Prema ovom modelu svaka pojedinačna supstanca koja se nalazi u smeši doprinosi ukupnoj toksičnosti na osnovu svoje relativne potentnosti i koncentracije, što znači da pojedinačne supstance koje su prisutne čak i u koncentracijama koje samostalno ne izazivaju efekat mogu uticati na ukupnu toksičnost smeše, ukoliko se u smeši nađe dovoljno veliki broj takvih supstanci (Kortenkamp i sar., 2009).

CA model je predstavljen matematičkim izrazom:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1 \quad (2.1)$$

Pri tome c_i predstavlja koncentraciju i -te supstance u n -komponentnoj smeši koja dovodi do $x\%$ efekta, a najčešće se koristi EC50. Frakcija c_i/EC_{xi} se označava i kao toksična jedinica (TU) (Sprague, 1970 – cit. Junghans i sar., 2003). Svaka frakcija c_i/EC_{xi} odnosno TU predstavlja relativnu toksičnost supstance na osnovu njene koncentracije u smeši i relativne potentnosti. Smatra se da se supstance u smeši ponašaju aditivno ukoliko je suma toksičnih jedinica jednaka 1. Model je univerzalno prihvaćen i primenjuje se u regulatornim dokumentima i procedurama kako preventivne tako i retrospektivne procene rizika kod predviđanja ili modelovanja toksičnog efekta smeše poznatih kvantifikovanih komponenti

2.4. Propisi u oblasti upravljanja vodama

Propisi iz oblasti upravljanja vodama su jedna od najstarijih i najrazvijenih sfera propisa vezanih za zaštitu životne sredine (Josefsson, 2012). U Evropskoj Uniji na snazi je veći broj propisa vezanih za slatkovodne ekosisteme, među kojima je Okvirna Direktiva o vodama (WFD) krovni i najznačajniji akt.

2.4.1. Okvirna Direktiva o vodama

Najvažniji akt u oblasti integrisanog upravljanja vodnim resursima, koji je stupio na snagu 22. decembra 2000. godine, je Okvirna Direktiva Evropske Unije o vodama (*eng. Water Framework Directive, WFD, 2000/60/EC*). Direktiva propisuje okvire za sveobuhvatnu zaštitu površinskih, podzemnih i voda obalnog mora, uz uvažavanje principa održivog razvoja i integrisanog upravljanja vodnim resursima koji uključuju monitoring i utvrđivanje statusa vodenih ekosistema i kvaliteta voda sa ciljem zaštite, očuvanja i unapređenja postojećih vodnih resursa. Svaka država članica EU je odgovorna za dostizanje konkretnih ciljeva na nacionalnom nivou, za nacionalne vodotoke i slivna područja primenjujući zajednički pristup sa opštim ciljem. Kod međunarodnih slivnih područja, po pravilu se uspostavlja internacionalna institucija zadužena za upravljanje slivnim područjem, uz učešće svih država koje nekim delom svoje teritorije pripadaju predmetnom slivnom području. Proces implementacije principa, pojmova i terminologije Direktive u nacionalni zakonski okvir Republike Srbije, koji podrazumeva strategije i propise koji se odnose na monitoring i zaštitu akvatičnih ekosistema je započet donošenjem Zakona o vodama iz 2010. godine (Sl. glasnik RS, br. 30/2010) i kasnije njegovim izmenama i dopunama (Sl. glasnik RS, br. 93/2012, 101/2016, 95/2018 i 95/2018), koji su delimično harmonizovani sa Okvirnom Direktivom o vodama. Republika Srbija je kao potpisnik Konvencije o zaštiti reke Dunav (Sofijska konvencija, 1994) punopravni član Internacionalne Komisije za zaštitu Dunava (*eng. International Commission for the Protection of the Danube River, ICPDR*), implementaciono telo Konvencije, koje od 2000. godine sprovodi EU politiku u oblasti voda definisanu Direktivom.

Osnovni zadatak postavljen Direktivom je bio postizanje dobrog hemijskog i najmanje dobrog ekološkog statusa svih evropskih voda do 2015. godine, odnosno u vremenskom roku od 15 godina od njenog stupanja na snagu, što direktno doprinosi zaštiti

i poboljšanju kvaliteta akvatičnih ekosistema, predstavljajući preduslov za održivi razvoj i korišćenje prirodnih resursa (Radulović i Teodorović, 2011).

2.4.1.1. WFD kao regulatorni pomak u zaštiti i upravljanju vodama

Okvirna Direktiva o vodama je predstavljena nakon skoro 30 godina, tokom kojih je zakonodavstvo vezano za vode bilo fokusirano na rešavanje pojedinačnih problema sa manjim ili većim pomakom (European Environment Agency, 2012). Ovom aktu su prethodile Direktive koje definišu standarde kvaliteta na osnovu korisničkih principa poput Rezolucije o ekološkom kvalitetu površinskih voda iz 1975., zatim više ekosistemski orijentisane poput Rezolucije o politici podzemnih voda (1988, 1992, 1996, 1997), nakon kojih je usledio predlog WFD.

Usvajanjem Direktive je uspostavljen zajednički okvir za upravljanje vodama i zaštitu životne sredine, koji je zasnovan na konceptu planskog upravljanja rečnim slivovima. Ovakav pristup je bio nov u kontekstu ciljeva i načina upravljanja, zbog čega je WFD smatrana za najambiciozniji i najkompleksniji zakonodavni akt o životnoj sredini koji je donet u Evropskoj Uniji (Grimeaud, 2004; Prieto, 2009), a smatrana je i potencijalnim šablonom i pilotom za buduće propise vezane za životnu sredinu (Voulvoulis i sar., 2017).

WFD je bila revolucionarna u smislu uvođenja brojnih inovacija u restrukturiranju nadležnosti za upravljanje vodama i zaštiti životne sredine (Chave, 2007; Bielsa i Cazcarro; 2015; Richter i sar., 2013). Od zemalja članica je zahtevano da spreče pogoršanje kvaliteta voda i postignu dobar ekološki status voda efikasnim i integrisanim upravljanjem resursima koje uključuje obezbeđivanje potreba korisnika voda (Bone i sar., 2011; Chon i sar., 2010). Upravljanje rečnim slivovima je decentralizovano, pri čemu je uzeto u obzir da akvatični ekosistemi imaju socijalnu i ekonomsku dimenziju koja mora biti adekvatno integrisana u ukupnom procesu donošenja odluka (Vugteveen i sar., 2006).

Uvođenjem WFD je uveden i pojam ekološki status kao izraz koji definiše ekosistemski integritet na osnovu bioloških, hidromorfoloških, hemijskih i fizičko-hemijskih elemenata kvaliteta, dok je hemijski status posebno definisan i odnosi se na standarde kvaliteta, poštovanje emisionih graničnih vrednosti, a posebna pažnja je posvećena prioritetnim supstancama (Radulović i Teodorović, 2011). Pri tome su uzeti u obzir ekološka varijabilnost voda u Evropi, a rečni baseni posmatrani kao jedan povezan sistem na osnovu prirodnih i hidroloških granica umesto političkih (Grizzetti i sar., 2017). Ekološki cilj WFD je bio da sva vodna tela u Evropskoj Uniji postignu visok ili barem dobar ekološki status, koji je definisan kao stanje akvatičnog ekosistema u odsustvu antropogenih pritisaka ili neznatno biološko odstupanje od stanja koje bi bilo očekivano u nenarušenim ili referentnim uslovima (Voulvoulis i sar., 2017).

Do donošenja Direktive, akcenat je bio na kvalitetu voda, a sve procene su se dominantno oslanjale na fizičko-hemijske parametre, mikrobiološke (sanitarni aspekt kvaliteta voda) i pojedine biološke elemente (fauna dna u zapadnoj i severnoj Evropi, planktonske zajednice u centralnoj i istočnoj Evropi). Ocena kvaliteta voda definisanjem

njihovog statusa je predstavila nov pristup, imajući u vidu dotadašnje tipove klasifikacije vodotoka na osnovu pretežno hemijskih parametara kvaliteta i korisničkog principa.

Okvirna Direktiva propisuje monitoring hemijskog i ekološkog statusa ili potencijala u slučaju izmenjenih i veštačkih vodnih tela) površinskih voda prema striktno navedenim elementima kvaliteta, u određenoj dinamici. Od bioloških elemenata, fitoplankton se na pr. analizira na svakih 6 meseci, makrofite, fauna dna i ribe jednom u 3 godine, dok se opšti fizičko-hemijski elementi kvaliteta prate tromesečnom, a prioritete supstance mesečnom dinamikom. Dobar status podrazumeva dobar hemijski i ekološki status. Referentnim stanjem (referalnim uslovima) pri proceni kvaliteta ekosistema, odnosno njihove degradacije se smatra prirodno stanje, odnosno lokaliteti bez ili pod minimalnim uticajem čovekovih aktivnosti, što često predstavlja problem jer u realnom svetu takvi ekosistemi ne postoje (Radulović i Teodorović, 2011).

2.4.1.2. Problemi u implementaciji i postizanju ciljeva WFD

Uprkos značajnim naporima uložnim u koordinaciju implementacije WFD među zemaljama članicama EU i striktnih vremenskih okvira, proces implementacije je bio vrlo izazovan i napredak prema postizanju ciljeva WFD i poboljšanju ekološkog statusa voda u Evropi je bio spor. U 2015. godini, skoro polovina vodnih tela u Evropskoj Uniji nije postigla dobar ekološki status, dok je za 40% vodnih tela ekološki status bio nepoznat (European Commission 2012a), sa velikim brojem slučajeva kršenja i neprimenjivanja propisa (European Commission 2016a).

Između ostalog, uočeni su nedostaci u proceni hemijskog statusa površinskih voda, pa je tako 2009. godine, skoro deceniju nakon donošenja Direktive čak 40% ostalo nepoznatog statusa (European Commission 2012d). Pored toga, nisu praćene sve prioritete supstance i broj vodnih tela u kojima je sproveden monitoring je bio ograničen (Brack i sar., 2017). Takođe, ekološki status oko 15% površinskih vodnih tela u EU je bio nepoznat (European Commission, 2009b). Dodatno se uočava nedostatak informacija o pritiscima i analizama uticaja kod čak 74% država članica, razvoj adekvatnih metodologija za procenu (nivo osetljivosti na pritisak) kod 85% država članica i monitoring statusa voda kod 81% zemalja članica (European Commission, 2015).

Efektivnost Direktive kao upravljačkog instrumenta je dosta kritikovana zbog navedenih problema (Boscheck, 2006; Josefsson, 2012; Moss, 2008) i revizija direktive je započeta 2019. sa ciljem predlaganja potrebnih amandmana.

2.5. Monitoring hemijskog statusa

Istraživanja u svrhu procene kvaliteta i monitoringa voda su ranijih godina bila usmerena na prisustvo hidrofobnih perzistentnih organskih polutanata, koji se akumuliraju u zemljištu, sedimentu ili organizmima, u tkivima koja su bogata lipidima. Fokus

istraživanja se kretao u smeru uključivanja u analize polarnih supstanci koje se nalaze u površinskim i podzemnim vodama kao i izvorima vode za piće (Bexfield i sar., 2019).

Obavezan monitoring hemikalija propisan Okvirnom Direktivom o vodama i Direktivom o prioritetnim supstancama je ograničen na merenje koncentracija prioritetnih supstanci za potrebe procene hemijskog statusa i specifičnih polutanata koji su definisani na nivou slivnih područja za potrebe procene ekološkog statusa. Pored ovoga, preporučuje se monitoring supstanci koje se nalaze na dodanoj listi za praćenje (engl. *Watch List*), a koju čine supstance koje su kandidati za proširenje liste prioritetnih supstanci (EC 2000, 2013c). Supstance dospevaju na prioritetne liste na osnovu retrospektivne ekološke procene rizika (engl. *ecological risk assessment*, ERA) koja pokaže da pojedinačno ili u smeši predstavljaju značajan rizik po životnu sredinu i zdravlje ljudi. Pojedine supstance koje se nalaze na trenutnoj listi prioritetnih supstanci su davno povučene iz upotrebe, ali su zbog perzistentnosti i dalje prisutne u životnoj sredini i predstavljaju tzv. istorijsko zagađenje. Sa druge strane, neke od prioritetnih supstanci su i dalje u upotrebi u Evropskoj Uniji, poput pojedinih pesticida (<http://www.ec.europa.eu>) ali zbog specifičnih svojstava predstavljaju supstance čija se emisija i ambijentalne koncentracije ograničavaju i prate.

Zahvaljujući razvoju analitičkih metoda i njihove primene u savremenim istraživanjima omogućena je detekcija pa i kvantitacija sve većeg broja supstanci po uzorku, pri čemu se među njima često detektuje veliki broj pesticida, industrijskih supstanci, lekova, njihovih metabolita i degradacionih proizvoda (Backhaus i Faust, 2012; Brack i sar., 2015; Altenburger i sar., 2015).

2.5.1. Tehnike uzorkovanja vode

Da bi se identifikovale supstance i smeše supstanci koje predstavljaju najveći rizik po akvatične ekosisteme, neophodno je da uzorkovanje i plan monitoringa prate njihovu prostornu i vremensku varijabilnost (Ort i sar., 2010). U daljem tekstu će biti opisane metodologije uzorkovanja koje se primenjuju u proceni i monitoringu kvaliteta voda.

2.5.1.1. Jednokratno uzorkovanje

Okvirna Direktiva o vodama za karakterizaciju hemijskog statusa površinskih voda propisuje strategiju uzorkovanja vode jednokratnim uzimanjem pojedinačnih uzoraka vode (engl. *grab sample*) za hemijske analize koje služe za određivanje prisustva i koncentracija prioritetnih polutanata. Sugerisana dinamika uzorkovanja podrazumeva jednokratno sakupljanje i analizu uzoraka na svakih 1-3 meseca, pri čemu je za određivanje učestalosti uzorkovanja neophodno uzeti u obzir i varijacije u parametrima koje potiču od prirodnih i antropogenih faktora (European Commission, 2000).

Ovakav pristup može obezbediti adekvatne rezultate za vodna tela u koja se ulivaju otpadne vode, a koja imaju niske stope variranja protoka i izmene vode, sa stabilnim hemijskim sastavom (Castiglioni i sar., 2006; Hollender i sar., 2009). Međutim ovakva strategija uzorkovanja nije adekvatna za sve tipove vodnih tela i tipove zagađenja. Na primer, uzorkovanjem vode na ovaj način se ne može proceniti realna izloženost

ekosistema pesticidima, ako se uzme u obzir činjenica da se pikovi koncentracije javljaju stohastično, kao što je slučaj nakon obilnijih padavina koje spiraju tretirana zemljišta ili nakon same primene pesticida (Schulz, 2004). Istraživanja Xing i sar., 2013 i Stehle i sar., 2013 navode da se uzorkovanjem vode zahvatanjem, dinamikom uzorkovanja na nedeljnom i mesečnom nivou, potencijalno značajno mogu potceniti maksimumi izloženosti pesticidima koji se javljaju usled spiranja zemljišta u površinske vode. Čak i u slučajevima kada se intervali između uzorkovanja skrate i dostupnost materijalnih sredstava ne predstavlja ograničavajući faktor, uzorkovanje vode na prethodno pomenuti način u tačno određenim intervalima, nije adekvatno za procenu obrazaca izlaganja pesticidima dugoročno (Stehle i sar., 2013).

2.5.1.2. Kompozitno uzorkovanje

Reprezentativniji način uzorkovanja je kompozitno uzorkovanje vode u određenim intervalima, pri čemu kompozitni uzorak vode predstavlja smešu pojedinačnih uzoraka vode uzetih u jednakim vremenskim intervalima (npr. tokom 24h). Ovaj način uzorkovanja povećava reprezentativnost uzoraka i potencijalno se tačnije mogu uočiti obrasci izlaganja polutantima, ali kao i kod jednokratnog uzorkovanja u tačno određenim intervalima moguće je zanemariti supstance koje se u vodotocima javljaju određenom dinamikom (Rabiet i sar., 2010; Stehle i sar., 2013; Petersen i sar., 2012).

2.5.1.3. Pasivno uzorkovanje

Tehnike pasivnog uzorkovanja predstavljaju alternativne metode uzorkovanja koje se mogu primeniti na terenu ili u laboratoriji (Zabiegała i sar., 2010). Ove tehnike su zasnovane na slobodnom toku molekula analita iz vode u recipijentnu fazu uzorkivača koja ih zadržava kao rezultat razlike između hemijskih potencijala analita u dva medijuma. Protok analita između vode i medijuma koji čini recipijentnu fazu uzorkivača se odvija dok se ne uspostavi ravnoteža u sistemu ili do prekida perioda uzorkovanja (Gorecki i sar., 2002). Uzorkovanje se odvija samo na osnovu razlike u hemijskom potencijalu, bez upotrebe dodatne energije. Recipijentne faze mogu biti rastvarači, porozni adsorbenti ili najčešće polimeri poput polietilena, poliuretana ili silikona, u zavisnosti od konkretne namene (Vrana i sar., 2005; Escher i sar., 2020).

Potencijalne prednosti primene tehinka pasivnog uzorkovanja u odnosu na ostale uključuju mogućnost integracije prisutnih nivoa polutanata tokom dužeg vremenskog perioda (do nekoliko nedelja), kao i mogućnost specijacije *in situ* koja je važna za istraživanja koja uključuju analize metala. Dodatna prednost pasivnog uzorkovanja je relativno niska cena uzorkivača i što ne zahtevaju postavku druge infrastrukture što ih čini pogodnim za pojedine monitoring zadatke (Vrana i sar., 2005; Knutsson i sar., 2013). Primenjivani su u brojnim istraživanjima sa ciljem skrininga prisustva polutanata u jezerskoj vodi (Herve i sar., 1995), monitoringa obrazaca zagađenja uslovljenih temporalno na primeru organohlornih supstanci u moru (Bergqvist i sar 1998; Booij i sar., 2001), monitoringa prostorne distribucije zagađenja i traženja izvora zagađenja u rekama (McCarthy i sar., 2000; Litten i sar., 2002; Shaw i sar., 2004; Poiger i sar., 2004).

2.5.1.4. Uzorkovanje pomoću poluautomatizovanih i automatizovanih uređaja

Često, za hemijske analize i bioanalize uzoraka vode, a kako bi se obuhvatile i supstance sa specifičnom dinamikom pojavljivanja i realne koncentracije, potrebno je sakupljanje velikih zapremina vode, što je zahtevno finansijski i logistički. Jedan od pristupa za rešenje ovih izazova je uređaj za ekstrakciju čvrste faze iz velikih zapremina vode (eng. *Large Volume Solid Phase Extraction*, LVSPE) koji je razvijen u okviru projekta Solutions. Ovim uređajem je omogućeno ekstrahovanje smeša prisutnih supstanci iz velikih zapremina vode (i do 1000 l) na odabranim lokalitetima ili monitoring stanicama (Schulze i sar., 2017). Detaljne hemijske analize i set *in vitro* testova su potvrdili efikasnost ove metode, na osnovu uočenih razlika među analiziranim uzorcima sa više lokaliteta (Neale i sar., 2015; König i sar., 2017; Hashmi i sar., 2018, 2020).

Pored navedenog, radi bolje procene maksimalnih koncentracija i dinamike izloženosti vodenih ekosistema zagađenju mogu se koristiti i automatizovani uređaji za uzorkovanje koji su opremljeni sensorima koji detektuju protok i opterećenje vode, zahvaljujući čemu se smanjuje verovatnoća propuštanja uzoraka sa pikovima koncentracija polutanata (Bundschuh i sar., 2014; Supowit i sar., 2016).

2.5.2. Pristupi u detekciji polutanata hemijskim analizama

Razvoj i dostupnost masene spektrometrije visoke rezolucije (engl. *high-resolution mass spectrometry*, HR-MS) je otvorila novo poglavlje u kontekstu detekcije ogromnog broja različitih supstanci i kompleksnosti različitih medijuma životne sredine (Hollender i sar., 2017). Masena spektrometrija se često koristi u kombinaciji sa gasnom ili tečnom hromatografijom što omogućava detekciju desetina hiljada tačnih molekulskih masa koje su povezane sa nepoznatim supstancama u uzorcima, koje se na osnovu strukture preciznije identifikuju (Schymanski i sar., 2014a, 2014b, 2015).

Ciljane analize (engl. *target analysis*) predstavljaju osnovu procene rizika od hemikalija iako ovaj pristup otkriva samo mali deo supstanci koje se nalaze u uzorcima iz životne sredine, pri čemu se lako može prevideti prisustvo nepoznatih polutanata ili polutanata koji nisu očekivani da budu detektovani u datom uzorku.

Trenutno aktuelan pristup koji omogućava semikvantitativne analize kompleksnih smeša kakve se nalaze u akvatičnoj životnoj sredini je skrining supstanci od interesa (engl. *suspect screening*) koji podrazumeva upotrebu rezultata masene spektrometrije i lista poznatih supstanci od interesa (engl. *suspect list*) kako bi se identifikovali polutanti bez prethodnog znanja o njihovom prisustvu (Hollender i sar., 2017).

S druge strane, neciljane analize (engl. *non-target analysis*, NTA) omogućavaju identifikaciju i praćenje čak i nepoznatih supstanci u životnoj sredini, a time i detekciju novih i neregulisanih polutanata, čime pokrivaju dosta širi spektar supstanci. Masena spektrometrija se u savremenim istraživanjima koristi u različite svrhe kao što su dnevni

monitoring vode u rekama i retrospektivni skrining nereguliranih supstanci (Hollender i sar., 2017; Alygizakis i sar., 2019).

Porastom upotrebe NTA, može se uočiti brzo povećanje broja listi supstanci i baza podataka kao što su CompToxChemicals Dashboard, Norman mreža, i PubChem koje sadrže informacije o predviđenim fizičko-hemijskim svojstvima i toksičnosti na osnovu strukture supstanci. NTA analize zajedno sa skriningom klasa supstanci sa suspect listi mogu predstavljati komplementarne tehnike ciljanim analizama.

Ipak samostalna primena i najsavremenijih hemijskih analiza obezbeđuje samo deo informacija o supstancama koje su nosioci toksičnosti u kompleksnim smešama, zbog čega bi se trebale koristiti u kombinaciji sa bioanalitičkim tehnikama (Hollender i sar., 2019; Escher i sar., 2020).

2.6. Biomarkeri

Biomarkeri se mogu definisati kao indikatori merljivih promena u biološkim sistemima, na molekularnom, biohemijskom, celularnom, fiziološkom, patološkom ili bihevioralnom nivou (Peakall, 1994; Gupta, 2019), koji predstavljaju različite pokazatelje interakcije između biološkog sistema i potencijalnih štetnih hemijskih, fizičkih ili bioloških faktora (WHO, 1993).

U ekotoksikološkom smislu biomarkerima se mogu smatrati biološki odgovori na različite hemijske stresore iz životne sredine na subindividualnom nivou, koji se mere unutar samog organizma ili u njegovim produktima, a koji ukazuju na odstupanje od normalnog stanja organizma (Van Gestel i Van Brummelen, 1996 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2015).

Biomarkeri pružaju informacije o izloženosti organizma ksenobiotiku, efektu koji je izloženost ksenobiotiku imala na organizam i osetljivosti organizma na ksenobiotike, pa se na osnovu tog kriterijuma mogu podeliti u tri kategorije. Biomarkeri izloženosti daju informacije o tome da li je organizam bio izložen određenom ksenobiotiku, biomarkeri efekta određuju da li je usled izloženosti organizma ksenobiotiku nastao efekat, a biomarkeri osetljivosti sugerišu o osetljivosti odnosno rezistentnosti organizma na štetne efekte nekog ksenobiotika, pri čemu biomarkeri efekta istovremeno mogu predstavljati i biomarkere izloženosti (Van der Oost i sar., 2003; Estévez i sar., 2019).

Posebna prednost upotrebe biomarkera u analizama kvaliteta životne sredine se, između ostalog, ogleda i u tome što biomarkeri predstavljaju integrisan signal izlaganja i/ili efekta smeše polutanata kojima je organizam izložen u realnim uslovima životne sredine, što znači da mereni signal predstavlja rezultat potencijalnih sinergističkih ili antagonističkih interakcija između jedinjenja u smeši, i na taj način stvarni odraz efekata date specifične smeše ksenobiotika (Kaišarević, 2011 – cit. Teodorović i Kaišarević, 2015).

Pojedini biomarkeri su specifični u odnosu na tip supstanci ili stresora na koji reaguju, dok su pojedini opšti odnosno manje specifični i njihov odgovor zavisi od šireg spektra različitih stresora i promena kao što su nutritivni status, uzrast, pol, temperatura i UV zračenje. Jedan od primera biomarkera koji predstavljaju opšti odgovor na stres su proteini toplotnog šoka (engl. *heat shock protein*, hsp). Njihova uloga je u sprečavanju denaturacije proteina (Feder i Hofmann, 1999), što može biti efekat delovanja različitih stresora iz životne sredine. Drugi odgovori su indukovani samo određenom grupom ksenobiotika ili stresora. Tako se acetilholinesteraza smatra specifičnijim biomarkerom koji je osetljiv na neuroaktivne supstance kao što su organofosforni i karbamatni pesticidi i pojedini lekovi, a čiji je primarni mehanizam dejstva inhibicija ovog enzima (Laetz i sar., 2009). Specifičnim biomarkerom smatra se i indukcija žumančanog proteina vitelogenina kod mužjaka kao odgovor na pristustvo supstanci koje se ponašaju kao estrogeni (Broeg i sar., 2005).

Pošto su promene na molekularnom i biohemijskom nivou prve koje se mogu detektovati, značaj biomarkera se ogleda u tome što njihova primena omogućuje daleko bržu i specifičniju procenu prisustva različitih toksičnih supstanci u životnoj sredini i blagovremenu detekciju promena koje one izazivaju, pre nego što se štetni efekti ispolje na višim nivoima biološke organizacije (Van der Oost i sar., 2003). Zbog toga se mogu smatrati ranim upozoravajućim signalima (McCarthy i Shugart, 1990). Izlaganje organizma ksenobiotcima pokreće kaskadu bioloških odgovora od kojih bi svaki, teoretski posmatrano, mogao poslužiti kao biomarker. Uopšteno, promene koje se odigravaju na ćelijskom nivou relativno su univerzalne u poređenju sa promenama koje se ispoljavaju na višim nivoima biološke organizacije, tako da biohemijski odgovori na prisustvo ksenobiotika mogu biti veoma slični kod različitih vrsta organizama (Van der Oost i sar., 2003).

2.6.1. Primena biomarkera u ekotoksikologiji

Primena pristupa analize biomarkera vodi poreklo iz medicinske toksikologije gde su se biomarkeri pokazali kao veoma korisni indikatori izloženosti ljudi specifičnim supstancama ili kao rani indikatori određenih bolesti ili sindroma (Timbrell, 1998). Tokom poslednje tri decenije veliki broj istraživanja je bio usmeren ka razvoju i primeni biomarkera u ekotoksikološke svrhe i ekološkoj proceni rizika, zbog potrebe razvoja indikatora koji mogu prikazati rani odgovor, pre efekata koji su merljivi na višim nivoima biološke organizacije, na populacionom nivou kao i na nivou zajednice (Hook i sar., 2014).

Pošto biomarkeri mogu ukazivati na izlaganje jednoj ili više supstanci sa sličnim načinom delovanja i mogu biti specifični za određenu klasu polutanata, istraživanja koja su sprovedena prethodnih decenija su koristila biomarkere za detekciju prisustva supstanci i smeša sa određenim načinom delovanja ili za procenu efekta određenih smeša kakve se nalaze u tačkastim izvorima zagađenja poput industrijskih ili komunalnih efluenata (Hinton i sar., 2008). Metaboliti policikličnih aromatičnih ugljovodonika u žuči riba mogu ukazivati na izloženost uljima iz proizvodnje nafte pa su često korišćeni za praćenje vremensko – prostornog aspekta zagađenja ovim tipom polutanata (Myers i sar., 1991, 1994, 2003; Aas i sar., 2000; Vuorinen i sar., 2006). Kao biomarker prisustva

(kseno)estrogena u životnoj sredini, često meren biomarker kod mužjaka ili juvenilnih riba je žumančani protein vitelogenin (Folmar i sar., 1996; Jobling i sar., 1998; Mellanen i sar., 1999; Denslow i sar., 2004). Povećani nivoi vitelogenina su u većem broju istraživanja povezivani sa prisustvom lekova u kanalizacionim ispustima (Folmar i sar., 1996; Jobling i sar., 1998) i fitoestrogenima u efluentima drvne industrije i proizvodnje papira (Mellanen i sar., 1999; Denslow i sar., 2004). Takođe, često korišćen biomarker izloženosti karbamatnim i organofosfornim pesticidima je inhibicija enzima acetiholin esteraze kod riba (Castro i sar., 2004). U istraživanjima koja su pomenuta i sličnim primerima, usled nedostupnosti detaljnih hemijskih analiza koje bi detektovale veliki broj supstanci i njihove smeše, primena biomarkera ima za cilj skrining određenog tipa zagađenja i usmeravanje upravljačkih mera.

Uloga biomarkera se vremenom menja uporedo sa razvojem novih analitičkih metoda, pa tako sve veći broj istraživanja koristi biomarkere kao potvrdu efikasnosti sprovedenih mera, poput različitih tretmana otpadnih voda ili netretiranih efluenata kako bi se procenila isplativost ulaganja u tretmane. Pored detaljnih hemijskih analiza koje detektuju više stotina supstanci po uzorku, odgovor biomarkera ukazuje na efekat koji samostalnom primenom hemijskih analiza može ostati zanemaren usled efekta smeša koji može biti rezultat interakcija među supstancama u smeši, prisustva supstanci koje nisu poznate, a samim time nisu uključene u hemijske analize ili se nalaze ispod limita detekcije. Tako su Martinović-Weigelt i sar., 2014 testirali efekte efluenata postrojenja za preradu otpadnih voda, na biotu, integrisanom primenom ciljanih hemijskih analiza i analiza biomarkera. Za analize biomarkera primenjena je metodologija zasnovana na transkriptomici (microarray analiza), koja je obuhvatila analizu ekspresije 15000 gena kod jedinki vrste *Pimephales promelas* eksponiranih na lokalitetima od interesa. Rezultati ovog istraživanja su ukazali na prisustvo grupa supstanci koje hemijske analize mogu propustiti i potencijalne negativne ishode kod organizama koji nastanjuju ovaj vodotok, kao i izdvajanje lokaliteta na osnovu intenziteta zagađenja. Pored navedenog, rezultati ukazuju na potencijal primenjene metodologije u monitoringu i proceni relativnog uticaja tačkastih izvora zagađenja i efikasnosti sprovedenih mera remedijacije.

Dodatno, biomarkeri mogu služiti i kao potvrda prisustva hemijskog opterećenja na koje se pojedini akvatični organizmi adaptiraju, tako da promene u aktivnosti biomarkera ne ukazuju nužno na pogoršanje stanja riba, kao što je ranije smatrano (Tenji i sar., 2021). Zato biomarkeri u modernim istraživanjima često služe kao metode za dobijanje ranih informacija o prisustvu određenih pritisaka na osnovu stanja biote. Tako Danilenko i Lukyanova, 2014 ukazuju na adaptaciju komercijalno korišćenih vrsta riba na lokalitetima koji su pod antropogenim uticajima na osnovu indukcije biomarkera oksidativnog stresa i metabolizma ksenobiotika.

2.6.2. Najčešće korišćeni biomarkeri

U narednom tekstu će biti ukratko opisana primena najčešće korišćenih biomarkera u ekotoksikološkim istraživanjima, koji su navedeni na osnovu kategorija bioloških odgovora na zagađenje.

2.6.2.1. Enzimi biotransformacije ksenobiotika

Među najčešće korišćenim biomarkerima su enzimi biotransformacije ksenobiotika koji učestvuju u metabolizmu i detoksifikaciji ksenobiotika, a mogu se meriti na nivou aktivnosti enzima i genske ekspresije (Van der Oost i sar., 2003). Aktivnost ovih enzima može se meriti u organima (najčešće jetri) jedinki odabranih vrsta u cilju procene nivoa kontaminacije u ekosistemu (Stanić i sar., 2006). Jedan od najčešće merenih biomarkera iz ove grupe je merenje indukcije citohrom P4501A (CYP1A) na nivou mRNA, proteina ili katalitičke aktivnosti enzima kao biomarker izlaganja i efekta velikog broja supstanci, tipično iz grupe perzistentnih organskih polutanata. U okviru istraživanja koje su sproveli Bhutia i sar., 2015 ukupni sadržaj CYP450 i CYP1A (merena preko EROD aktivnosti) su indukovane u jetri jedinki vrste ribe *Channa punctatus*, koje su bile tretirane insekticidom cipermetrinom, pri čemu se kao najosetljivija izoforma pokazao CYP1A. Povišeni nivoi CYP450 i EROD aktivnosti kod jedinki riba sa zagađenih lokaliteta na ušćima reka koje su opisali Havelkova i sar., 2008, kao i smanjenje nivoa aktivnosti u jetri jegulja koje su bile kavezno izložene u luci (Ahmad i sar., 2004) takođe ističu značaj ovih biomarkera u monitoringu i proceni zagađenja vodotoka.

2.6.2.2. Parametri oksidativnog stresa

Često korišćeni biomarkeri su i parametri oksidativnog stresa pošto veliki broj ksenobiotika i njihovih metabolita svoje toksične efekte ostvaruje putem oksidativnog stresa, koji se ispoljava preko štetnih efekata koje izazivaju reaktivne kiseonične čestice (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Van der Oost i sar., 2003). Enzimi antioksidativne zaštite (engl. *antioxidant enzymes*, AOE) imaju ključnu ulogu u odbrani organizma i detoksifikaciji reaktivnih kiseoničnih čestica i prevođenju u nereaktivne molekule. Među enzimima antioksidativne zaštite se kao značajni biomarkeri ističu superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-S-peroksidaza (GSH-Px) i glutation reduktaza (GR). Takođe, često korišćeni biomarkeri oksidativnog stresa su i lipidna peroksidacija (LPO), oksidacija DNK i dr. (Kaišarević, 2011- cit. Teodorović i Kaišarević, 2015). Aktivnost enzima antioksidativne zaštite merena u tkivima akvatičnih organizama se pokazala kao dobar indikator ekološkog statusa određenih lokaliteta, gde je aktivnost SOD, CAT i GSH-Px u jetri kečiga sa staništa koje je bilo pod visokim hemijskim opterećenjem bila viša u odnosu na ribe sa kontrolnog lokaliteta, što je ukazalo da su organizmi na analiziranom lokalitetu bili izloženi većem oksidativnom stresu (Stanić i sar., 2006). Takođe, u istraživanju koje su izveli Ahmad i sar., 2004 u jetrama jegulja kavezno izloženih u luci je uočeno povećanje LPO, kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Cazenave i sar., 2014 su na osnovu povišenih aktivnosti antioksidativnih enzima i LPO zaključili da su kavezno izložene jedinke u blizini kanalizacionog ispusta pod većim oksidativnim stresom u odnosu na jedinke izložene na drugim lokalitetima.

2.6.2.3. Proteini stresa

Ova grupa proteina učestvuje u zaštiti i reparaciji ćelije. Indukcija ovih proteina može biti posledica izloženosti brojnim stresorima kao što su visoka ili niska temperatura, UV zračenje, oksidativni stres, anoksična sredina, izloženost teškim metalima i brojnim

ksenobioticima (Van der Oost i sar., 2003). Često korišćeni biomarkeri su proteini toplotnog stresa (engl. *heat shock proteins*, hsp), čija se sinteza dramatično povećava pri izlaganju visokoj temperaturi, ali i drugim fizičkim i hemijskim stresorima, uključujući i ksenobiotike. Sanders i sar., 1991 su pokazali značajnu indukciju hsp 60 kod školjki *Mytilus edulis* koje su bile izložene bakru u koncentracijama nižim od onih koje dovode do fizioloških pogoršanja što je ukazalo na korisnost upotrebe ovog biomarkera kao ranog upozoravajućeg signala za detekciju subletalnih nivoa zagađenja pre nego što se pokažu promene na višim nivoima kao što su populacije i zajednice. Druga grupa su metalotioneini koji učestvuju u homeostatskoj regulaciji esencijalnih metala, Cu i Zn, i detoksifikaciji neesencijalnih metala kao što su Cd i Hg. Primenjuju se kao biomarkeri efekta za prisustvo toksičnih metala u životnoj sredini više decenija (Roesijadi, 1980, 1995; Teodorović, 2001).

2.6.2.4. Parametri imunog sistema

Pošto veliki broj ksenobiotika ima potencijal da naruši funkciju imunog sistema tokom hroničnog ili ponovljenog akutnog izlaganja, pojedini parametri mogu služiti kao biomarkeri. Često praćeni biomarkeri ovog tipa odgovora su morfologija i brojnost leukocita i limfocita, funkcija makrofaga, imunoglobulini, T limfociti, interleukini i drugi (Van der Oost i sar., 2003). Jokinen i sar., 1995 i Aaltonen i sar., 1997, 2000a, 2000b su pokazali da subhronično (kavezno *in situ* i laboratorijsko) izlaganje bodorki jezerskoj vodi u koju se ulivaju industrijske otpadne vode utiče na imunitet posredovan antitelima, snižene imunoglobuline u serumu i manju antigensku osetljivost na osnovu nivoa imunoglobulina u serumu, kao i kinetiku i sintezu specifičnih antitela u slezini.

2.6.2.5. Reproductivni i endokrini parametri

Veliki broj ksenobiotika ima sposobnost da remeti funkcije endokrinog sistema (tzv. ksenobiotici sa hormonskom aktivnošću (engl. *endocrine disruptors*, EDCs). Odgovor organizma na prisustvo ovakvih jedinjenja može da se reflektuje na različitim nivoima, pa se kao biomarkeri mogu koristiti različiti elementi endokrinog sistema (Van der Oost i sar., 2003). Funkcija svih hormonskih sistema potencijalno može biti narušena delovanjem EDCs: reproduktivni hormoni, tireoidni hormoni, kortikosteroidi, hormon rasta, hormoni hipotalamusa i hipofize. Ipak, ekotoksikološka istraživanja su u najvećoj meri usmerena na praćenje efekata EDCs na seksualne steroide, prevashodno zbog značaja funkcionisanja reproduktivnog sistema za opstanak vrsta, a time ekosistemske relevantnosti ove grupe supstanci. Niz istraživanja baziranih na merenju reproduktivnih i endokrinih parametara i poremećaja u produkciji androgena potvrdio je štetne efekte različitih ksenobiotika, pa čak i pad populacija (Metcalf i sar., 2001; Kidd i sar., 2007; Minarik i sar., 2014). Mellanen i sar., 1999 su detekcijom povećane ekspresije gena za vitelogenin u jetri vrste ribe *Coregonus lavaretus*, koje su kavezno izlagali u blizini industrijskih postrojenja, utvrdili prisustvo kontaminacije estrogenima u industrijskim efluentima. Schultz i sar., 2013 su potvrdili efekat prisustva EDCs, koje su detektovane hemijskim analizama na lokalitetima koji su pod uticajem efluenta prerađenih otpadnih voda. Povišen nivo vitelogenina u serumu je uočen kod mužjaka native vrste riba koje su

sakupljene iz prirodnih populacija i kod mužjaka kavezno izloženih šarana na tim lokalitetima.

2.6.2.6. Neurotoksični parametri

Među biomarkerima koji su zasnovani na neurotoksičnim efektima ksenobiotika često korišćen biomarker je aktivnost acetilholinesteraze (AChE), koju inhibišu mnogi organofosforni i karbamatni pesticidi (Van der Oost i sar., 2003). Takođe kao biomarkeri neurotoksičnih efekata se koriste brojni parametri koji učestvuju u ćelijskim procesima koji obezbeđuju pravilan razvoj i funkcionisanje nervnog sistema. U svrhu biomonitoringa se AChE najčešće meri u mozgu i krvi, ali je ovaj enzim prisutan i u drugim organima kod životinja. Tako je istraživanje koje su sprovedeli Stien i sar., 1998 ukazalo na prisustvo organofosfornih i karbamatnih supstanci u morskoj vodi u luci, na osnovu smanjene aktivnosti AChE u mišićima jedinki riba koje su bile izložene na tim lokalitetima u odnosu na jedinke sa referentnih lokaliteta. Nekoliko istraživanja je ukazalo na smanjenu aktivnost AChE u mozgu riba koje su bile laboratorijski izložene polutantima (Jarrard i sar., 2004; Song i sar., 2006), dok su pojedina istraživanja koja su uključila izlaganje jedinki *in situ* pokazala obrnut odnos između AChE aktivnosti u mozgu i izloženosti polutantima (de la Torre i sar., 2000, 2007). Pored uticaja organskih polutanata kao što su pomenuti pesticidi na smanjenje aktivnosti AChE, pojedina istraživanja su pokazala inhibiciju aktivnosti i usled izloženosti metalima (Frasco i sar., 2005; Jebali i sar., 2006).

2.6.2.7. Genotoksični parametri

Genotoksični efekti koje izazivaju ksenobiotici na genetskom materijalu se mogu posmatrati kroz promene u strukturi same DNK, i kroz produkte izmenjenog gena, što kao efekat može imati dugotrajne nasledne efekte. Često primenjivani biomarkeri su zasnovani na merenju adukta ksenobiotik-DNK, sekundarnih modifikacija DNK (npr. promene u sastavu baza, prekid DNK lanca i dr.) i ireverzibilnih genotoksičnih efekata odnosno promena u ostvarivanju funkcije ćelija (Van der Oost i sar., 2003). Često korišćene metode za detekciju genotoksičnih efekata su mikronukleus (MN) i komet test. Ali i sar., 2008 su istakli MN test kao osetljiv biomarker za procenu genotoksičnog potencijala vode, koristeći tri vrste ciklida čije su jedinke sakupljene sa jezerskih lokaliteta sa različitim nivoom zagađenja, dok su Kumar i sar., 2012 isti parametar prepoznali kao dobar indikator zagađenja izlaganjem jedinki slatkovodne vrste *Chana punctatus* različitim koncentracijama dva pesticida. Pored MN, često korišćen parametar za detekciju genotoksičnih efekata zagađenja u biomonitoringu životne sredine je komet esej. Tako su Šrut i sar., 2010 istakli primenjivost MN i komet eseja u istraživanju koje u eksperimentalnoj postavci podrazumevalo izlaganje jedinki *Dicentrarchus labrax* na odabranim lokalitetima pomoću kaveznog sistema izlaganja. Oba eseja su primenjena i u istraživanjima koja su sprovedena u okviru projekta Solutions i JDS3 kampanje kao i ova doktorska disertacija, sa delimično podudarnim lokalitetima uzorkovanja. U okviru JDS3 kampanje, Deutschman i sar., 2016 su ustanovili da na pojavu DNK oštećenja u eritrocitima jedinki riba *Alburnus alburnus* duž toka Dunava najviše utiče zagađenje poreklom od otpadnih voda gusto naseljenih regiona. Na jednoj od prepoznatih crnih tačaka zagađenja u Dunavu, u urbanoj zoni Novog Sada, Jovanović Marić i sar., 2020 su ukazali

na važnost adekvatnog odabira model organizama u biomonitoringu zagađenja životne sredine, istakavši veću podložnost eukariotskih modela genotoksičnim efektima u odnosu na prokariotske kao i veću osetljivost riba vrste *C. carpio* u odnosu na školjke vrste *Sinanodonta woodiana* zbog mogućeg postojanja dodatnih zaštitnih mehanizama organizma kod školjki.

2.6.2.8. Fiziološki i morfološki parametri

Kao biomarkeri mogu koristiti i odgovori organizama na višim nivoima koji su najčešće indikatori ireverzibilnih promena. Među ovim parametrima su histopatološki parametri i parametri koji mogu biti pokazatelji rasta i razvoja organizma (Van der Oost i sar., 2003). Jedan od primera upotrebe ovih biomarkera u detekciji efekata EDCs je pojava histopatoloških promena uključujući prisustvo tkiva ovarijuma u muškim reproduktivnim organima (interseks). Ove promene su uočene u većem broju istraživanja u kojima su analizirani efekti zagađenja na ribama u akvatičnim ekosistemima koji su pod uticajem efluenta iz urbanih zona (Jobling i sar., 1998; Tanna i sar., 2013; Vajda i sar., 2008, 2011; Woodling i sar., 2006).

2.6.2.9. Somatski indeksi

Često korišćeni biometrijski parametri kao indikatori opšteg zdravstvenog stanja i uhranjenosti riba su kondicioni faktor (CF) i hepatosomatski indeks (HSI), na koje mogu uticati zagađenje i ishrana riba (Teubner i sar., 2015). Oba parametra su korišćena u velikom broju istraživanja kao dodatni pokazatelji stanja jedinki uz druge, često specifičnije biomarkere (Bervoets i sar., 2009; de Souza Azevedo i sar., 2012), dok su pojedina istraživanja kao dodatni parametar koristila gonadosomatski indeks (GSI) koji ukazuje na razvoj reproduktivnog sistema riba, koji pored uzrasta riba može biti uslovljen prisustvom EDCs (Miller i sar., 2011; Schultz i sar., 2013).

2.6.3. Razvoj i unapređivanje metoda za analize biomarkera

Razvojem savremenih metoda molekularne biologije su unapređivane i razvijane i nove metode kvantitacije odgovora biomarkera. Ranije razvijeni biomarkeri su bili zasnovani na biohemijskim metodama, a napredak u molekularnoj biologiji je proširio koncept primene biomarkera na nivo analize ekspresije gena, pa se isti biomarkeri mogu meriti na različitim nivoima i različitim metodama, a poslednjih godina u pojedina istraživanja su uključene i "omik" metode koje podrazumevaju analize velikog broja transkriptata, metabolita i proteina.

Pojedini biomarkeri se koriste već nekoliko decenija poput parametra faze I metabolizma ksenobiotika, indukcije enzima iz citohrom P450 superfamilije koji učestvuju u metabolizmu velikog broja supstanci (Guengerich, 2008). Citohrom P450 1A (CYP1A), je jedan od najviše korišćenih i validiranih biomarkera zagađenja u životnoj sredini (Goksøyr i Förölin, 1992; Bucheli i Fent, 1995). Sadržaj i aktivnost indukovano CYP1A kod riba ima dozno-zavisan odgovor u odnosu na koncentracije aromatičnih i polihlorovanih aromatičnih ugljovodonika u organizmu i životnoj sredini (Stegeman i

Lech, 1991; Stegeman i Hahn, 1994). Merenje indukcije CYP1A je često sprovedeno preko merenja EROD aktivnosti koja predstavlja katalitičku meru indukcije CYP1A. Ovaj biomarker kod riba je korišćen u velikom broju istraživanja. Jedan od primera je analiza gradijenta zagađenja u vodnom telu uslovljenog industrijskim efluentima kod kavezno izloženih jedinki riba (Soimasuo i sar., 1995) i analiza indukcije EROD aktivnosti kod kavezno izloženih jedinki riba proceni kvaliteta voda iz zaliva (Stien i sar., 1998).

Pored merenja EROD aktivnosti, indukcija CYP1A enzima se može određivati imunološki, pomoću antitela ELISA ili Western blott metodom ili histoheimijskim tehnikama (Bucheli i Fent, 1995). Pošto je indukcija CYP1A proteina uslovljena indukcijom CYP1A na mRNK nivou, merenje ekspresije na mRNK nivou Northern blot analizom je postala jedna od često korišćenih metoda (Sarasquete i Segner, 2000). Tokom poslednje decenije određen broj istraživanja, koja su primenjivala pristup analize biomarkera u proceni kvaliteta životne sredine, primenjuju kvantitaciju ekspresije gena u realnom vremenu (engl. *real-time PCR*), metodu koja ima brojne prednosti u odnosu na klasičan PCR, poput dinamike, osetljivosti, specifičnosti, brzine dobijanja i obrade podataka (Wong i Medrano, 2005). Jedan od primera je istraživanje koje su sproveli Brammel i sar., 2010. U ovom istraživanju pored merenja EROD aktivnosti korišćena je i kvantitacija ekspresije CYP1A gena kod jedinki pastrmke koje su bile kavezno izložene polutantima, sa ciljem identifikacije lokaliteta sa različitim nivoom zagađenja PAH jedinjenjima.

Veliki napredak u biološkim disciplinama pa i ekotoksikologiji se desio razvojem „omik” tehnologija koje proučavaju celokupni genetički material - genom, kompletan set transkriptata RNK koje genom produkuje, kompletan set proteina i metabolita pa se nazivaju genomika, transkriptomika, proteomika i metabolomika. Omik metode imaju veliki potencijal u ekološkoj proceni rizika obezbeđivanjem informacija o mehanizmima delovanja različitih polutanata, istovremenim skriningom velikog broja odgovora u organizmima. U savremenim istraživanjima tzv. „microarray” tehnologija omogućuje profilisanje na hiljade genskih sekvenci pomoću komplementarne hibridizacije i detekcije na mikroskopskom čipu koji predstavlja kolekciju DNK segmenata, proba, koje tokom hibridizacije vezuju specifičnu sekvencu nukleinske kiseline koja odgovara određenom genu, pri čemu se ekspresija određenog gena kvantifikuje merenjem intenziteta signala (fluorescencije ili boje) koji nastaje vezivanjem specifične sekvence za obeleženu probu (Jaluria i sar., 2007). Prednost ovakvog pristupa je velika brzina dobijanja podataka jer jedna analiza može obuhvatiti i do nekoliko desetina hiljada proba što dramatično ubrzava istraživanja (Teodorović i Kaišarević, 2015).

Neki od primera ekotoksikoloških istraživanja u kojima su primenjene omik metode su istraživanja sprovedena od strane Ings i sar., 2011 i Berninger i sar., 2014 koji su primenom microarray tehnologije analizirali odgovore kod jedinki riba koje su bile izložene efluentima tretiranih otpadnih voda. Ings i sar., 2011 su pokazali izmenjenu ekspresiju većeg broja gena koji učestvuju u odgovoru na stres, hormonskih receptora, transportera glukoze, gena koji učestvuju u imunom odgovoru, proteina toplotnog šoka i cithohrom P4501A1 kod jedinki pastrmke koje su bile izložene efluentima tretmana otpadnih voda, a Berninger i sar., 2014 promene na nivou većeg broja gena koji učestvuju u hormonskoj regulaciji. Primer primene metabolomike u ekotoksikologiji je istraživanje

koje su sproveli Southam i sar., 2011 koji su izlagali bodorke ekološki relevantnim koncentracijama organofosfornog pesticida fenitrotona i analizom metaboloma uočili remećenje funkcije fosfagenog sistema u jetri i prethodno nepoznate efekte ovog pesticida na metabolizam fenilalanina u jetri i testisima.

2.6.4. Eksperimentalne postavke za procenu efekata hemijskog stresa *in situ* upotrebom biomarkera

U cilju monitoringa kvaliteta voda, procene efekata i akumulacije različitih tipova polutanata veliki broj vrsta riba i beskičmenjaka (u najvećem broju slučajeva školjki) se široko primenjuju decenijama kao model organizmi za analizu odgovora biomarkera (Bervoets i sar., 2009; Tsangaris i sar., 2010). Za procenu efekata zagađenja vodnih tela ili specifičnih izvora zagađenja kao što su industrijski ili komunalni efluenti se generalno primenjuje nekoliko načina izlaganja u zavisnosti od cilja istraživanja i tipa vodnog tela i oni najčešće podrazumevaju izlaganje model organizama u laboratorijskim uslovima ili *in situ* uključujući izlaganje organizama u kavezima ili drugim jedinicama i procenu efekata kod jedinki iz prirodnih populacija na odabranim lokalitetima. Takođe, postavke se razlikuju na osnovu odabira vrsta, baterije biomarkera koji se analiziraju, odabira uzrasta i pola jedinki u slučaju kada se koriste ribe kao model organizam. Svaki od pomenutih pristupa ima prednosti i mane, koje treba uzeti u obzir pri dizajnu eksperimenta i tumačenju rezultata (Luís de Sá Salomão i sar., 2020).

2.6.4.1. Procena efekata zagađenja pristupom izlaganja jedinki u laboratorijskim uslovima

Testovi koji se sprovode u laboratorijskim uslovima su finansijski manje zahtevni i omogućavaju veću kontrolu ostalih stresora u odnosu na istraživanja koja se sprovode na terenu *in situ*. Zbog toga su pogodni za istraživanje različitih scenarija izlaganja kao što je poređenje pulsog i kontinuiranog izlaganja zagađenju kao i oporavka i perioda aklimatizacije (McCahon i Pascoe, 1990; Ashauer i sar., 2006; Angel i sar., 2010). Nedostatak je što se ovakvim načinom izlaganja drugi stresori poput parazita, predatora i fluktuacija ostalih parametara u životnoj sredini ne mogu uzeti u obzir, a rezultati znatno zavise od eksperimentalne postavke, zbog čega ne moraju biti ekosistemski relevantni, a zaključivanje o efektu ne mora reflektovati efekte koji bi nastali u realnim uslovima (Panter i sar., 2000; Diamond i sar., 2006; Gauthier i sar., 2006).

Veći broj istraživanja je pokazao da je ovakav način izlaganja pogodan za procenu efekata industrijskih efluenata, pri čemu su jedinke riba izlagane u akvarijumima filtriranim, aerisanim i razblaženim efluentima uz kontrolisane temperaturne uslove i fotoperiode. Jedan od primera je istraživanje koje su sproveli Parvez i sar., 2006. Ovi autori su jedinke vrste *Chana punctata* izlagali u akvarijumima efluentima iz drvne industrije sa ciljem validacije ATP-aza kao potencijalnih biomarkera koji bi se mogli uključiti u biomonitoring programe. Dosta složenije istraživanje koje je koristilo ovakav način postavke je istraživanje koje su sproveli Zaibel i sar., 2019. Analizom baterije biomarkera koji predstavljaju različite biološke odgovore kod jedinki gupike (*Poecilla reticulata*), uz

hemijsku detekciju ciljano merenih organskih supstanci i metala, su potvrdili bezbednost upotrebe komunalnih otpadnih voda nakon tercijernog tretmana za potrebe akvakultura u aridnim predelima.

2.6.4.2. Procena efekata zagađenja *in situ*

Testovi koji se sprovode na jedinkama izloženim *in situ* pružaju realističnije uslove nego što su laboratorijski uslovi, a time veću ekosistemsku relevantnost. Ovakvim pristupom je moguća procena efekata polutanata na organizme koji nastanjuju akvatični ekosistem. Pored toga, omogućena je procena efekata koja uzima u obzir interakcije među različitim varijablama koje se odnose na fizičku, hemijsku i biološku složenost koja je prisutna u realnim akvatičnim ekosistemima (Lazarus i sar., 2015). Ipak, ovakvi pristupi su često komplikovaniji za izvođenje u odnosu na laboratorijski sistem izlaganja zbog logističkih pitanja i visokih troškova uz nemogućnost kontrole eksperimentalnih uslova (McCahon i Pascoe, 1990; Ashauer i sar., 2006; Angel i sar., 2010).

2.6.4.2.1. Procena efekata zagađenja na jedinkama iz prirodnih populacija

Jedan od načina analize efekata zagađenja na akvatične organizme *in situ* je merenje odabranih parametara u slobodnoživećim organizmima sa odabranih lokaliteta. Praćenje efekata na prirodnim populacijama ima niz prednosti uključujući činjenicu da efekti reflektuju realno stanje u populacijama kao što su dugoročni efekti izlaganja pa je moguće analizirati integrativne biomarkere koji su pokazatelji opšteg stanja organizma poput somatskih indeksa ili bioakumulaciju određenih supstanci, za čije merljive promene je potrebna hronična izloženost. Dodatno, efekti uočeni na jedinkama iz prirodnih populacija uzimaju u obzir i realne rute izlaganja (preko vodenog stuba, preko hrane i slično), što se može razlikovati između vrsta. Na primer u slučaju procene efekata metala na biomarkere kod riba je važno uzeti u obzir rute izlaganja pošto pojedine vrste kao što su bentivore zbog načina ishrane i života bivaju izložene metalima preko sedimenta, vodenog stuba i hrane (Andres i sar., 2000; Schmitt i sar., 2005, 2007). Pored metala i efekti drugih supstanci se razlikuju u odnosu na rute usvajanja, što su prikazali Pickford i sar., 2003 na primeru ksenobiotika sa hormonskom aktivnošću, 4-nonilfenola koji pokazuje jače efekte na posmatrane biomarkere kada supstanca dospeva u krvotok preko škrge i kože putem vode, nego kad su jedinke izložene alimentarnim putem.

U pojedinim istraživanjima su korišćene jedinke riba iz prirodnih populacija za procenu genotoksičnih efekata zagađenja. Jedan od primera je istraživanje koje su sproveli Deutchmann i sar., 2016 koji su analizirali genotoksični potencijal vode u reci Dunav, na jedinkama uklije (*Alburnus alburnus*), što je omogućilo izdvajanje lokaliteta na kojima je izraženo prisustvo supstanci sa genotoksičnim potencijalom. Pored toga istraživanje je omogućilo korelaciju sa pojedinim supstancama koje su nosioci efekta, u vodenom stubu, suspendovanoj materiji i sedimentu na datim lokalitetima, ali ne i povezivanje rezultata odgovora biomarkera genotoksičnosti sa opštim stanjem jedinki. Drugi primer istraživanja je procena efekata ksenobiotika sa hormonskom aktivnošću na dve vrste riba (bodorka i grgeč), u jezeru koje je pod uticajem spiranja javne deponije (Noaksson i sar., 2001). U okviru ovog istraživanja su uočeni brojni efekti na biomarkere koji ukazuju na poremećaj

aktivnosti endokrinog sistema na različitim nivoima uključujući nivoe hormona u krvi, aktivnost enzima aromataze u mozgu, smanjen gonadosomatski indeks, kao i generalno pogoršanje zdravstvenog stanja. Pri tome ciljane hemijske analize sedimenta i drugi biomarkeri nisu ukazali na prisustvo supstanci iz grupe PAHs i PCBs koje bi mogle prouzrokovati ovakve efekte.

Izazovi koji se susreću pri ovakvom pristupu se često odnose na odabir referentnog lokaliteta i problematiku sakupljanja dovoljno velikog broja jedinki, adekvatne polne strukture i uzrasta. Velika varijabilnost uzorka, koja je rezultat različite i najčešće nepoznate istorije kretanja jedinki zbog ishrane i razmnožavanja, pri čemu jedinke mogu biti izložene drugim stresorima ili manje izložene analiziranom izvoru zagađenja, može umanjiti statističku moć detekcije ekološki relevantnih efekata. Pored navedenih aspekata, u pojedinim slučajevima prirodne populacije riba mogu razviti rezistentnost na hemijski pritisak kom su izložene, pa izostanak promena u primenjenoj bateriji biomarkera, može dovesti do pogrešnih zaključaka (Backhaus i sar., 2017).

2.6.4.2.2. Procena efekata zagađenja izlaganjem jedinki u polu-protocnim jedinicama (ex situ)

Ovakav sistem omogućava kontrolu temperature i ishrane što obezbeđuje identifikaciju zagađenja kao primarnog uzročnika uočenih efekata. U nekoliko istraživanja primenjene su mobilne monitoring jedinice za izlaganje jedinki riba efluentima fabrike za tretman otpadnih voda i rasutim izvorima zagađenja. U ovim jedinicama su ribe bile izložene na terenu, pri čemu je u sistem ulazila površinska voda sa tih lokaliteta uz statičku izmenu ili kontinualni protok. Skelton i sar., 2014 su ovaj pristup izlaganja koristili za evaluaciju primene metabolomike u monitoringu izloženosti riba zagađenju, dok su Berninger i sar., 2014 evaluirali primenu transkriptomike u iste svrhe, pri čemu su uočene razlike između lokaliteta potvrdile potencijal primene testiranih metoda, a Martinović-Weigelt i sar., 2014 identifikovali efluente fabrike za preradu otpadnih voda kao značajan izvor EDCs.

2.6.4.2.3 Procena efekata zagađenjenja izlaganjem jedinki u kaveznom sistemu izlaganja

In situ izlaganje jedinki u kavezima nudi veliki broj prednosti u odnosu na ostale načine izlaganja i analizu efekata kod slobodnoživećih jedinki, kao što su precizno određivanje lokacije i trajanja izlaganja, poznata i ujednačena istorija jedinki, genetička osnova i adekvatan uzrast. Takođe, ovim pristupom se može eliminisati mogućnost pogrešne interpretacije rezultata usled adaptivnih mehanizama koji se javljaju u prirodnim populacijama koje su izložene stresu (Brammell i sar., 2005, 2010; Jung i sar., 2008; Šrut i sar., 2010). Jedan od primera uspešne primene ovakvog pristupa je istraživanje koje su sprovedli Cazenave i sar., 2014. U okviru ovog istraživanja su kavezno izložene jedinke vrste *Prochilodus lineatus* koja je lokalno ekološki i ekonomski relevantna, sa ciljem procene efekata efluenata netretiranih komunalnih otpadnih voda na zdravstveni status ove vrste riba. Značajni efekti su uočeni pomoću primenjene baterije biomarkera poput parametara oksidativnog stresa, biohemijskih i hematoloških parametara kao i morfoloških indeksa, pri čemu su definisani ključni biomarkeri za razlikovanje intenziteta hemijskog pritiska na uzvodnim i nizvodnim lokalitetima u odnosu na izvor efluenata. Još jedan

primer uspešne primene kaveznog izlaganja kao pristupa je istraživanje koje su sproveli He i sar., 2011 sa ciljem evaluacije primenljivosti kombinovanog pristupa hemijskih analiza i odabranog seta biomarkera u proceni rizika od dominantno prisutnih polutanata na lokalitetima, koji su pod različitim tipovima hemijskog pritiska, i stoga sadrže različite smeše prioriternih polutanata, kao što su lokaliteti blizu gusto naseljenih urbanih sredina, blizu fabrika za preradu otpadnih voda, industrije i poljoprivrede. Pri tome je potvrđena upotrebna vrednost kombinovanog seta biomarkera na različitim nivoima (molekulanom i enzimskom) u proceni toksičnih efekata smeša u akvatičnim ekosistemima.

2.6.4.3. Dizajn i postavka kaveznog sistema izlaganja

Postavka kaveza za pristup procene efekata zagađenja upotrebom kaveznog sistema izlaganja je specifično dizajnirana za svako istraživanje i ne postoje standardizovane postavke.

Pored razlike u primenjenim materijalima i dimenzijama kaveza koje zavise od vrste koja se na ovaj način izlaže, među istraživanjima se mogu uočiti razlike u dubini postavke kaveza što je uslovljeno odabirom rute izlaganja polutantima (preko vodenog stuba ili sedimenta / resuspenzije). Pošto je sediment značajan depo pojedinih grupa polutanata poput metala i izrazito nepolarnih jedinjenja i pošto preko njega organizmi mogu biti značajno izloženi, veći broj istraživanja je koristio bentosne vrste riba koje su bile izložene u kavezima koji su delimično ukopani u sediment ili pričvršćeni na nekoliko centimetara iznad što omogućava izloženost polutantima preko hrane ili čestica sedimenta. Reynders i sar., 2008 su analizirali bioakumulaciju metala i odgovore biomarkera kod jedinki *C. carpio* u blizini topionice cinka, dok su Abrahamson i sar., 2007 koristili ovakav tip postavke za poređenje osetljivosti biomarkera CYP1A u različitim tkivima, izlaganjem jedinki riba na lokalitetima gde je u sedimentu bilo očekivano značajno prisustvo PAHs.

U okviru istraživanja koja su fokusirana na izlaganje putem vodenog stuba najčešće su korišćeni kavezi koji su napravljeni od plutajućih materijala i potopljeni na odgovarajuću dubinu i pričvršćeni za teške objekte poput ograda i betonskih blokova. Stien i sar., 1998 su upotrebili ovakav način izlaganja riba za evaluaciju primene biomarkera u proceni kvaliteta vode u zalivu, dok su Brammel i sar., 2010 analizirali indukciju enzima CYP1A kod kavezno izloženih pastrmki sa ciljem identifikacije lokaliteta sa različitim nivoom zagađenosti PAHs.

Takođe, u okviru nekoliko istraživanja je kombinovana postavka kaveza na sediment i iznad njega, čime je omogućeno razlikovanje ruta izlaganja u zagađenim ekosistemima (Bervoets i sar., 2009; Kerambrun i sar., 2011; Oikari i sar., 2010).

Dodatni aspekt pri dizajnu kavezne postavke je dužina izlaganja jedinki istraživanom izvoru zagađenja i ona u većini istraživanja varira od nekoliko sati do 6 nedelja. Pored praktičnih razloga, koji podrazumevaju dodatnu ishranu riba u slučaju izlaganja dužeg od dve nedelje (Miller i sar., 2011; Baker i sar., 2014), dužina izlaganja u najvećoj meri zavisi od parametara koji se analiziraju. U istraživanjima gde su korišćeni biomarkeri čiji se odgovor može brzo uočiti poput enzima antioksidativne zaštite, EROD aktivnosti i genske ekspresije, izlaganje jedinki je trajalo nekoliko sati do nekoliko dana

(Ahmad i sar., 2004, 2006; Santos i sar., 2004; Abrahamson i sar., 2007; He i sar., 2011; Cazenave i sar., 2014), dok je u slučajevima analize parametara koji se sporije menjaju, poput somatskih indeksa, promena u funkciji imunog sistema, reprodukcije i bioakumulacije, izlaganje trajalo nekoliko nedelja (Reynders i sar., 2008; Miller i sar., 2011; Kerambrun i sar., 2011).

Pošto analiza biomarkera kod jedinki sakupljenih iz prirodnih populacija i kod jedinki koje su izložene u kavezima na odabranim lokalitetima, mogu obezbediti informacije o dugoročnim i kratkoročnim efektima zagađenja, pojedini autori sugerišu upotrebu oba tipa izlaganja (Reynders i sar., 2008; Bolognesi i Cirilo, 2014), što je i primenjeno u studiji slučaja Novi Sad za potrebe ove doktorske disertacije.

2.6.4.4. Odabir vrste model organizma

Najčešće korišćeni organizmi za procenu hemijskog stresa *in situ* su školjke i ribe (Crane i sar., 2007). Iako se terenski bazirane metode često koriste, jedini standardizovani pristup je sa školjkama (ASTM, 2002), dok se ostali pristupi prilagođavaju za specifične studije.

Školjke su široko primenjivan model u biomonitoring programima jer su slabo pokretni organizmi, koji relativno dugo žive, hrane se filtraciono i imaju veliki potencijal da bioakumuliraju širok spektar polutanata. Pored toga imaju široku geografsku distribuciju što doprinosi relevantnosti njihove upotrebe kao modela, a upotreba u različitim eksperimentalnim postavkama je jednostavna. Tsangaris i sar., 2010 i Pereira i sar., 2011 su analizirali baterije biomarkera (parametri oksidativnog stresa, metabolizma ksenobiotika, metalotioneina i dr.) kod školjki u kaveznom sistemu izlaganja na različitim lokalitetima, sa ciljem procene efekata zagađenja u priobalnom području. Među marinskim školjkama u najvećem broju istraživanja korišćene su vrste *Mytilus galloprovincialis* i *M. edulis* (Stien i sar., 1998; Klobučar i sar., 2008; Tsangaris i sar., 2010; Brooks i sar., 2011 i drugi). U istraživanjima koja su sprovedena u slatkovodnim ekosistimima često korišćena vrsta je *Dreissena polymorpha*. Ova vrsta je u istraživanju sprovedenom od strane Klobučar i sar., 2003 kavezno izložena na više lokaliteta u rekama sa ciljem detekcije genotoksičnog potencijala, dok su istu vrstu Vethaak i sar., 2002 koristili u okviru multiparametarskog pristupa za detekciju ksenoestrogena u vodotocima. Pored školjki, od beskičmenjačkih vrsta, u pojedinim istraživanjima su korišćene druge vrste specifične za oblast, kao što su puževi i hironomide (Franz i sar., 2013; Kellar i sar., 2014; Moreno-Gonzalez i sar., 2016).

U odnosu na beskičmenjake, ribe imaju složeniju fiziologiju sa većim brojem potencijalnih biomarkera koji se mogu koristiti za procenu hemijskog stresa i koristan su model zbog svoje uloge u lancima ishrane, ljudskoj ishrani, potencijalu bioakumulacije toksičnih supstanci, osetljivosti čak i na niske koncentracije mutagena, podložne su uticaju kumulativnih efekata više stresora (van der Oost i sar., 2003; Bervoets i sar., 2009; Visnjic-Jeftic i sar., 2010; Cazenave i sar., 2014; Deutchman i sar., 2017). Iz navedenih razloga su široko korišćene u *in situ* istraživanjima od 80ih godina (Wilde i Parrot, 1984; Jones i Sloan, 1989).

Vrste riba koje su sitnijih dimeznija poput vrsta iz porodice Poecillidae su pogodne za različite postavke izlaganja iz logističkih razloga pošto zauzimaju manje prostora, zahtevaju manje kompleksne kaveze i obično imaju kraći životni ciklus u odnosu na krupnije vrste riba (Castro i sar., 2004). Međutim jedinke ovih vrsta ne obezbeđuju velike količine tkiva za analize biomarkera i hemijske analize. Iz tog razloga u *in situ* istraživanjima češće se koriste krupnije vrste kao što su salmonidne vrste (Abrahamson i sar., 2007; Brammell i sar., 2010; Oikari i sar., 2010; Ings i sar., 2011), ciprinidne vrste (Reynders i sar., 2008; Bervoets i sar., 2008; Scarcia i sar., 2014), ribe list (Goksøyr i sar., 1996; Wall i sar., 1998; Kerambrun i sar., 2011) ili jegulje (Van der Oost i sar., 1996; Fenet i sar., 1998; Pacheco i Santos, 2002; Ahmad i sar., 2004, 2006; Santos i sar., 2004).

Izbor vrste za *in situ* istraživanja se uglavnom zasniva na dostupnosti dovoljnog broja jedinki u ispitivanoj oblasti, a time i ekosistemskoj relevantnosti, pogodnim karakteristikama za izlaganje u kavezima, tolerantnosti/osetljivosti na zagađenje, ponašanje i načinu ishrane (Kerambrun i sar., 2011).

Zbog svoje rasprostranjenosti u nizijskim rečnim sistemima, šaran (*Cyprinus carpio*) i bodorka (*Rutilus rutilus*), su često bili uključeni u biomonitoring studije (Barak i Mason, 1990; Aaltonen i sar., 2000a, 2000b; Lavado i sar., 2006; Oikari i sar., 2006; Bervoets i sar., 2009; Reynders i sar., 2008; Benejam i sar., 2010; Gagnaire i sar., 2015). Osim široke distribucije, *C. carpio* se često koriste zbog relativne tolerantnosti na hemijski izmenjene uslove sredine i time mogućnosti preživljavanja na zagađenim lokalitetima, čime mogu obezbediti informacije o subletalnim parametrima (Bervoets i sar., 2009; Benejam i sar., 2010). U pojedinim oblastima, druge ekološki i ekonomski relevantne vrste su korišćene u proceni kvaliteta životne sredine kao što su *Prochilodus lineatus* (Bacchetta i sar., 2011; Troncoso i sar., 2012; Cazenave i sar., 2014), dok je brancin (*Dicentrarchus labrax*) najčešće korišćen marinski model (Stien i sar., 1998; Šrut i sar., 2010; Kerambrun i sar., 2011).

Pored ekosistemski relevantnih vrsta, povremeno se koriste i standardne vrste poput zebrica, gupika i japanske medake. Ove vrste su široko korišćene u akvatičnoj toksikologiji a nude niz prednosti u *in situ* eksperimentalnim postavkama, kao što je mala dimenzija tela, a sa tim u vezi olakšani logistički aspekti eksperimeta. Dodatno, kod ovih vrsta postoje različite linije i specifični mutanti, što omogućava genetičku homogenost u eksperimentu, a time smanjenje broja potrebnih jedinki za donošenje validnih zaključaka, što ima prednosti u etičkom i praktičnom kontekstu. Međutim, ove vrste se ne koriste često za *in situ* postavke iz razloga što ne predstavljaju deo autohtone faune, pa je njihova upotreba ograničena pojedinim propisima koji se tiču introdukcije alohtonih vrsta. Dodatno, njihova upotreba je često sezonski ograničena zbog temperaturnih razlika na koje ove vrste nisu adaptirane (EEC, 1992; OECD, 1982; Castro i sar., 2004; Oikari, 2006). Osim standardnih vrsta, u istraživanjima u kojima se primenjuju savremene *omik* metode kao što su transkriptomika i metabolomika, koriste se vrste sa sekvencioniranim genomom kao što su kalifornijska pastrmka i *Pimephales promelas* (Brammell i sar., 2010; Ings i sar., 2011; Sellin Jeffries i sar., 2012; Skelton i sar., 2014; Martinovic-Weigelt i sar., 2014; Diaz de Cerio i sar., 2018).

2.7. *In vitro* bioeseji

Bioeseji (biotestovi/biološki testovi) predstavljaju vrstu analiza u kojima se prate efekti određenih supstanci i/ili njihovih smeša na biološki sistem koji im je izložen. U toksikologiji se tradicionalno primenjuju *in vivo* bioeseji na laboratorijskim životinjama kao modelima za identifikaciju polaznih tačaka za procenu rizika (Schilter i sar., 2019). *In vitro* bioeseji se u najvećoj meri izvode na ćelijama, ali i izolovanim tkivima (metabolički aktivni homogenati jetre ili drugih organa) i ekstraktima enzima. S obzirom na to da se ćelijska kultura (humane, sisarske, riblje i druge ćelije) može uspostaviti bez žrtvovanja životinja, ove metode imaju etičku prednost u odnosu na *in vivo* eseje (Blaauboer, 2002; Hartung, 2010).

Jedna od prednosti *in vitro* eseja je što se za njihovo izvođenje koriste manje zapremine uzoraka i često su praktičniji za analizu uzoraka iz životne sredine koji sadrže niske koncentracije polutanata. Takođe prednost primene ovakvih metoda se ogleda u visokoj produktivnosti zbog mogućnosti automatizacije čime se omogućava skrining koji je vremenski i cenovno efikasan (Attene-Ramos i sar., 2013). Dodatna prednost *in vitro* eseja je njihova veća osetljivost u odnosu na ostale metode koja se postiže genetičkom modifikacijom ćelijskih linija iako su pojedini *in vivo* biomarkeri takođe osetljivi i informativni indikatori (poput vitelogenina kao biomarkera poremećaja funkcije hormonske regulacije) (Purdom i sar., 1994 - cit. Escher i sar, 2021).

In vivo bioeseji su značajni u ekotoksikološkoj proceni čistih supstanci, ali je njihova primena za monitoring kvaliteta vode generalno ograničena na testiranje toksičnosti celih uzoraka vode, direktno ili u razblaženom obliku, pa samo vode sa relativno visokim stepenom zagađenja mogu da pokažu efekat.

Suprotno tome, uzorci vode za primenu u *in vitro* bioesejima se uglavnom ekstrahuju i obogaćuju što proširuje spektar tipova uzoraka koji se mogu testirati, od otpadnih voda do vode za piće (Escher i sar., 2020). Pri tome, primena *in vitro* bioeseja je bliža rešenju problema procene toksičnosti uzoraka iz životne sredine gde se supstance često nalaze u previše niskim koncentracijama da bi se u *in vivo* testovima detektovao efekat. Na ovaj način je moguće dobiti pouzdane rezultate primenom čak i niskih koncentracija, čime je omogućeno izvođenje zaključaka o niskim efektivnim koncentracijama, kao što su EC10 vrednosti. Iako su i ove koncentracije više u odnosu na one koje se pojavljuju u realnim uslovima u akvatičnoj životnoj sredini, ekosistemske su realnije u odnosu na laboratorijske testove sa životinjama. *In vitro* eseji odlikuju se i manjom varijabilnošću kontrola u odnosu na *in vivo* eseje, što dodatno doprinosi njihovoj osetljivosti (Neale i sar., 2020).

2.7.1. Najčeće korišćeni *in vitro* bioeseji

Iako se velikom broju eseja putevi toksičnosti i mehanizmi toksičnog delovanja preklapaju, Escher i Leusch, 2012 predlažu klasifikaciju bioeseja na pet širih kategorija koje su zasnovane na pojednostavljenim putevima citotoksičnosti:

Prva kategorija podrazumeva merenje bioloških odgovora u toksikokinetičkoj fazi metabolizma ksenobiotika koja podrazumeva merenje indukcije jetrenih enzima kao što su CYP enzimi ili stimulaciju bioloških puteva koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika kao što su aril hidrokarbonski receptor (AhR), peroksizom proliferator-aktiviranih receptora (PPAR), pregnan X receptor (PXR) ili konstitutivni androstanski receptor (CAR) (Leusch i Snyder, 2015).

Druga kategorija su eseji nespecifične toksičnosti koji mere parametre nespecifičnog ometanja osnovnih ćelijskih funkcija poput narušavanja integriteta membrane, proizvodnje ATPa ili unutarćelijske homeostaze. Odgovori ovih eseja se često mere kao citotoksičnost (Leusch i Snyder, 2015).

Treća kategorija su eseji specifične toksičnosti koji mere interferenciju supstanci sa specifičnim biološkim molekulima kao što su enzimi, nuklearni receptori i transkripcioni faktori. Primer je endokrina aktivnost, posebno estrogeni efekat, koji se često meri kao parametar toksičnosti uzoraka. Neki od primera specifičnih eseja su CALUX eseji poput AhR-CALUX, androgen blazer i GeneBLAzer za procenu indukcije laktamaza reportera (Leusch i Snyder, 2015)

Četvrta kategorija su eseji reaktivne toksičnosti koja je uzrokovana direktnom reakcijom ili kovalentnim vezivanjem između ksenobiotika i molekula u ćeliji kao što su DNK ili proteini. DNK oštećenja mogu voditi nastanku kancera kod životinja mutagenim delovanjem (promenom u sekvenci DNK) ili putem genotoksičnosti (oštećenje DNK strukture). Primeri testova koji detektuju reaktivnu toksičnost su Ames test, mikronukleus i komet esej (Leusch i Snyder, 2015).

Peta kategorija predstavlja eseje adaptivnih odgovora na stres koje se baziraju na merenju citoprotektivnih mehanizama koji štite ćeliju od hemijski indukovanih oštećenja. Oni uključuju npr. proizvodnju proteina i enzima za popravljavanje DNK oštećenja ili neutralizaciju reaktivnih kiseoničnih čestica. Neki od primera ovih testova su Toxscreen i Microtox (Watson i sar., 2012; Tang i sar., 2013; Leusch i Snyder, 2015).

In vitro bioeseji su često zasnovani na upotrebi takozvanih "reporterskih" gena za detekciju efekata, koji detektuju određeni specifičan način delovanja supstanci (engl. *mode of action*, MOA), kao što je vezivanje supstanci za hormone receptore, aktivacija enzima metabolizma ksenobiotika kao što je aril-hidrokarbonski receptor ili adaptivni odgovori na stres. Ovi eseji se izvode na ćelijskim linijama koje su modifikovane tako da sadrže veliki broj kopija gena koji kodira reporterski ciljni protein, kao što je bioluminiscentni protein luciferaza. U zavisnosti od efekta testiranog uzorka ekspresija ciljnog proteina se menja (Escher i sar., 2020).

2.7.2. Primena bioanalitičkih metoda u proceni kvaliteta voda

Celularni eseji se koriste za monitoring kvaliteta vode od 1960-ih godina. Ranije primenjivane analize su uglavnom bile usmerene na detekciju karcinogenosti (preko eseja reaktivne toksičnosti) ili opšte (nespecifične) toksičnosti. Jedan od primera testova koji se koristi za monitoring genotoksičnog potencijala vode već više decenija je Ames test (Ames

i sar., 1975). Takođe, dugo primenjivan esej je Microtox esej koji meri inhibiciju bioluminiscencije kod marinske bakterije *Aliivibrio fisheri* kao indikator citotoksičnosti (Chang i sar., 1981).

U istraživanjima se primenjuju pojedinačni testovi i baterije bioeseja za procenu kvaliteta vode. Proširenjem fokusa istraživanja od zagađenih lokaliteta i efluenata do površinskih voda i voda tretiranih savremenim tehnikama prečišćavanja, znatno je učestalija primena baterija *in vitro* testova, posebno u toku poslednje decenije. Jedan od prvih primera primene baterije testova je istraživanje koje su sprovedli Sanchez i sar., 1988, za procenu toksičnosti industrijskih efluenata, a baterija testova je bila sastavljena od pet testova toksičnosti (tri bakterijska, jedan *in vivo* i jedan molekularni) i tri testa mutagenosti (Ames test, *Escherichia coli* i *Saccharomyces cervisie* eseji reverzne mutagenosti).

Fokus istraživanja sa reaktivne i opšte toksičnosti se 1990-ih godina proširio na monitoring ksenobiotika sa hormonskom aktivnošću (EDCs), zbog ekosistemske relevantnosti efekata ovih jedinjenja, posebno efekata na reprodukciju riba (Jobling i sar., 1998). Eseji koji se izvode na sisarskim ćelijama su počeli više da se primenjuju u testiranju kvaliteta vode, kako se fokus istraživanja proširio sa stanja ekosistema u kontekstu kvaliteta površinskih voda i tretmana otpadnih voda, na zdravlje ljudi uključujući napredne tretmane vode za piće i kvalitet vode (Brand i sar., 2013; Leusch i sar., 2014a, 2014b; Hebert i sar., 2018).

Poslednjih godina, često se sprovodi skrining kvaliteta otpadnih voda, tretiranih voda, voda za piće i rekreaciju. Značajan napredak u kontekstu širine spektra uzoraka vode koji se mogu testirati, od uzoraka vode sa visokim stepenom zagađenja do vode visokog kvaliteta poput prečišćenih voda i voda za piće, je omogućen razvojem metoda za pripremu uzoraka i obogaćenja kao i uvođenjem osetljivijih parametara u bioesejima. Jedan od primera je istraživanje koje su sprovedli Conley i sar., 2017, u okviru kog su analizirali *in vitro* estrogenu aktivnost uzorka vode sa izvora i nakon tretmana vode za piće iz više fabrika, dok su Leusch i sar., 2017 sprovedli analizu osetljivosti *in vitro* bioeseja za androgenu, progestagenu, glukokortikoidnu, tiroidnu i estrogenu aktivnost, kao i njihove primenjivosti u analizama vode za piće.

Pored testiranja kvaliteta različitih uzoraka vode, bioeseji imaju važnu primenu u proceni efikasnosti određenih tretmana kao što su tretmani otpadnih voda i tretmani vode za piće, kao i procesa u različitim fazama tretmana i poređenja kvaliteta uzoraka vode različitog porekla (Prasse i sar., 2015). Neki od primera poređenja efikasnosti tretmana otpadnih voda su pokazali da napredni tretmani koji koriste flokulaciju i oksidaciju ozonom, praćenu biološkim tretmanom značajno smanjuju specifičnu toksičnost (npr. estrogenost) ispod limita kvantitacije kao i nespecifičnu toksičnost otpadnih voda (Kim i sar., 2007; Tsuno i sar., 2008; Escher i sar., 2009; Stalter i sar., 2011). Suprotno tome, druga istraživanja koja su primenjivala bioeseje za procenu efikasnosti tretmana ozonizacijom i aktivnim ugljem su pored uočenog smanjenja toksičnosti ustanovila da su koncentracije polutanata ipak ostale dovoljno visoke da izazovu odgovore u pojedinim bioesejima (Volker i sar., 2019). U ovim primerima bioeseji su omogućili evaluaciju različitih koraka procesa u tretmanima.

2.7.2.1. Izražavanje podataka dobijenih pomoću *in vitro* bioeseja

Za specifične eseje toksičnosti, rezultati se često izražavaju kao toksični ekvivalenti ili bioanalitički ekvivalenti koncentracija (BEQ_{bio}), koji se zasnivaju na referentnoj supstanci za dati esej, koja ima takav MOA (Escher i sar., 2020). Tako se npr estrogena aktivnost često izražava kao ekvivalent estradiola (EEQ) (Macova i sar., 2010; Wagner i sar., 2013) ili za aktivnost aril hidrokarbonskog receptora posredovanu dioksinom se rezultati izražavaju kao ekvivalent TCDDa (TCDDDEQ) (Tillitt i sar., 1991).

Poslednjih godina su ustanovljene pragovne vrednosti koncentracija koje izazivaju efekat (engl. *Effect-based trigger values*), u svrhu diferencijacije između prihvatljivog i lošeg kvaliteta vode i široko se primenjuju za različite svrhe, pri čemu postoje različite metode za njihovo izvođenje. Većina pragovnih vrednosti koje su zasnovane na prihvatljivim BEQ_{bio} je za različite bioeseje izvedena na osnovu vrednosti iz vodiča za kvalitet vode za piće i na osnovu standarda kvaliteta životne sredine, uz određene korekcije (Escher i sar., 2021). Pragovne vrednosti koncentracija za bioeseje su prepoznate kao ključ u interpretaciji rezultata procene kvaliteta vode i verovatnoće da li će neka smeša izazvati efekat kod organizama koji nastanjuju vodno telo, pa je predložena njihova regulatorna implementacija u monitoring kvaliteta životne sredine koji uključuje smeše (Brack i sar., 2019a).

2.7.2.2. Ograničenja i perspektiva primene bioanalitičkih metoda

Bioanalitičke *in vitro* metode mogu imati tehnička ograničenja kao što je smanjenje osetljivosti pojedinih eseja u prisustvu koekstrahovane organske supstance i lipida iz uzorka (Jahnke i sar., 2016). Pored toga specifični efekti koji se detektuju ovim bioesejima mogu biti zamaskirani usled citotoksičnosti uzoraka, ali se taj uticaj minimizuje paralelnim testovima citotoksičnosti (Judson i sar., 2016).

Ipak pored ograničenja koja poseduju, metode zasnovane na praćenju efekata su neophodne za detekciju efekta svih supstanci u smeši, pošto svaka supstaca može doprinosti toksičnosti čak i kada se nalazi ispod instrumentalnog detekcionog limita ili ispod najniže efektivne koncentracije za svaku pojedinačnu supstancu.

Pored toga, značajni naponi se ulažu u razvoj i primenu *in vitro* metoda za identifikaciju i karakterizaciju hazarda. Na primer, u primeni koncepta puteva negativnih ishoda (engl. *adverse outcome pathway*, AOP), se očekuje važna uloga *in vitro* metoda u identifikaciji i karakterizaciji molekularnih inicirajućih i ključnih događaja koji vode toksičnim efektima (Schilter i sar., 2019). Iako je primena *in vitro* eseja u regularno uslovljenoj ekološkoj proceni rizika i obaveznom zakonski definisanom monitoringu kompleksnih uzoraka iz životne sredine tek u povoju, predstavlja potencijal za unapređenje procene rizika i smanjenje upotrebe životinja u testiranju (Villeneuve i sar., 2019).

2.8. Kombinovana upotreba analitičkih i bioanalitičkih metoda

Kao što je u prethodnom tekstu navedeno, akvatični sistemi sadrže kompleksne smeše polutanata, a pristup proceni rizika koji je propisan trenutnom regulativom je zasnovan na merenju prioriternih supstanci i predviđanju toksičnosti na osnovu pojedinačnih supstanci. Ovi pristupi ne daju informacije o efektima, osim u slučajevima kada su poznati ključni polutanti. Neciljane analize omogućavaju detekciju šireg spektra supstanci ali su finansijski i vremenski zahtevne za rutinsku primenu u monitoringu, a informacije o efektu detektovanih supstanci izostaju. Procena toksičnosti pomoću bioeseja predstavlja alternativni pristup za procenu hazarda od kompleksnih smeša u životnoj sredini i predstavlja integrativni parametar prisustva supstanci koje utiču na primenjeni test sistem, pri čemu nisu potrebne informacije o prisustvu ključnih polutanata, a interakcije među supstancama učestvuju u formiranju rezultata. Ipak, samostalna primena bioanaliza ne daje informacije o supstancama koje izazivaju izmerene efekte i stoga rezultati ne predstavljaju dovoljnu osnovu za sprovođenje adekvatnih mera poput smanjenja emisije ili remedijacije (Brack, 2003).

Zbog navedenih razloga je razvijen pristup koji se naziva efektom-usmerene analize (engl. *effect directed analysis*, EDA) koji kombinuje hemijske analize sa fizičko-hemijskom frakcionacijom i bioesejima. Ovaj pristup je postao koristan za identifikaciju toksičnih supstanci koje se nalaze u smešama u životnoj sredini, posebno onima koje su uzročnici specifičnih negativnih efekata (Hong i sar., 2016). Efektom usmerene analize (engl. *Effect-directed analysis*, EDA) mogu da se koriste za identifikaciju supstanci koje su nosioci toksičnosti u kompleksnim smešama i da izdvoje bioaktivne supstance koje u suprotnom mogu biti zamaskirane efektima ostatka smeše i testiranog medijuma životne sredine (Brack i sar., 2016). Ekstrakti uzoraka za ove analize se odvajaju na osnovu mase, hidrofobnosti ili polarnosti hromatografijom ili fizičkim razdvajanjem na frakcije koje se testiraju pojedinačno u bioesejima. Svaka bioaktivna frakcija se dalje frakcioniše dok se ne identifikuju jedna ili više bioaktivnih podfrakcija koje sadrže supstance koje objašnjavaju većinu uočenih efekata (Brack i sar., 2016), pri čemu ovaj pristup omogućava povezivanje izmerenih koncentracija i efekata modelovanjem (Tousova i sar., 2017).

2.9. Multiparametarski pristup proceni uticaja hemijskog stresa na akvatične ekosisteme

Većina akvatičnih ekosistema se nalazi pod pritiskom različitih stresora, a uspostavljanje uzročno-posledničnih veza između stresora i efekata na akvatične sisteme je izazovno s obzirom na visoku varijabilnost prirodnih sistema i velikog broja faktora koji mogu istovremeno delovati (Burton i sar., 2005; Adams, 2003; Segner i sar., 2014). Ipak, informacije o ovim vezama su neophodne kako bi se preduzele adekvatne upravljačke mere (Chapman i Hollert, 2006).

Specifičan problem predstavlja procena uticaja hemijskog stresa na ekološki status ili još šire na ekosistemski integritet akvatičnih ekosistema. Na osnovu prethodno iznetog pregleda, jasno je da regulatorno uslovljena (WFD) paralelna procena i monitoring hemijskog i ekološkog statusa ne predstavljaju idealan pristup za utvrđivanje uticaja hemijskog stresa na akvatične ekosisteme. Veza između hemijskog statusa sa jedne, i sastava i strukture životnih zajednica (kao osnovni parametar ekološkog statusa) nije ustanovljena. Most između hemijskobirang i biološkog monitoringa možemo videti u primeni bioanalitičkih tehnika i biomarkera, odnosno korišćenju svih raspoloživih setova podataka koje obezbeđuju različiti a komplementarni pristupi:

1. Hemijska karakterizacija uzorka, koja uz empirijske ili ekstrapolirane podatke o efektu pojedinačnih kvantifikovanih supstanci može poslužiti za modelovanje, odnosno predviđanje ukupnog toksičnog efekta smeše identifikovanih supstanci u uzorku. Po pravilu se primenjuje CA model (set podataka 1 – u daljem tekstu se koristi skraćenica LOE1 (engl. *Line of evidence*))
2. Rezultati procene / monitoring efekta dobijeni bioanalitičkim metodama (LoE2)
3. Rezultati dobijeni in situ metodama (biomarkeri) iz prirodnih populacija ili kaveznog sistema izlaganja odabranog biološkog modela (LoE3)
4. Rezultati biomonitoringa – tipično, sastav i struktura životnih zajednica (ili populaciona dinamika ako je focus istraživanja samo na jednoj vrsti) (LoE4)

Svaki od navedenih pristupa može proizvesti jedan ili više setova podataka, (LoE). Da bi se postigli usaglašeni, pravilni zaključci koji će omogućiti primenu adekvatnih upravljačkih mera, sve dostupne setove podataka (linije dokaza) je potrebno povezati. Više LoE se uglavnom povezuje u okviru procesa procene u kom se pojedinačnim linijama dokaza dodaju različiti težinski faktori ("Weigh of evidence" (WoE) pristup). Ovim kompleksnim multiparametarskim pristupom baziranom na ekspertskim stavovima se pouzdanije mogu utvrditi uzročno-posledične veze između zagađenja i uočenih ili predviđenih ekoloških efekata i ustanoviti da li je određen lokalitet pod uticajem stresora i identifikovati pritiske koji doprinose pogoršanju stanja (Wolfram i sar., 2012).

Multiparametarski pristup je u procenu ekološkog rizika (ERA) uveden kao okvir za integrisanje pojedinačnih linija dokaza, pomoću metoda koje su ili kvalitativne (na osnovu karakterisika efekata) ili kvantitativne (na osnovu jačine efekata) kako bi se izveli zaključci o stepenu pogoršanja stanja ili rizika (Linkov i sar., 2009). Ovaj pristup uzima u obzir prednosti i mane različitih tipova podataka kako bi izabrale adekvatne upravljačke mere (Hull i Swanson, 2006; Hope i Clarkson, 2014).

Prvi primer implementacije multiparametarskog pristupa za procenu efekata zagađenja na ekosisteme je korišćen kod procene kvaliteta sedimenta (Sediment Quality Triad - SQT) (Long i Chapman, 1985; Chapman, 1990). Ovaj pristup obezbeđuje okvire za procenu efekata koji su specifični za lokalitet kombinovanjem informacija o hemijskom

sastavu sedimenta, toksičnosti sedimenta i strukturi betosnih zajednica (Chapman i Hollert, 2006).

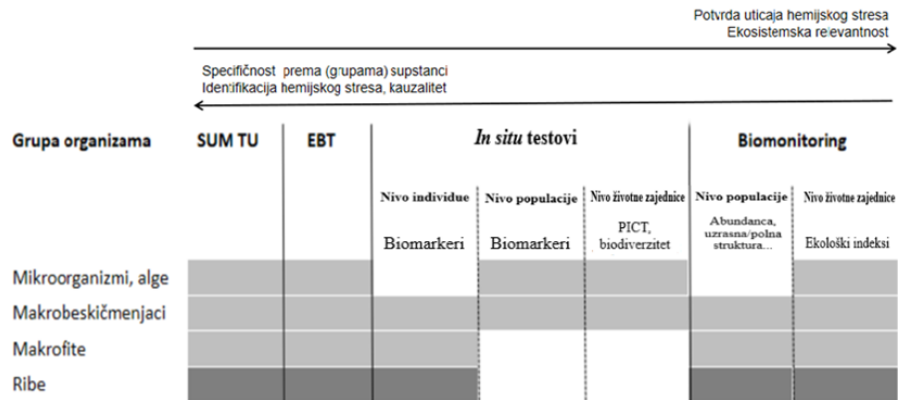
Multiparametarski pristupi se pominju u regulatornim okvirima kao što su vodiči u WFD, ali su ovi dokumenti dosta kritikovani zbog nedostatka jasnih uputstava (Hope and Clarkson, 2014; Ågerstrand and Beronius, 2016), jer striktna pravila ne mogu biti uspostavljena pošto se takve procene zasnivaju na proceni eksperata, a time i subjektivnosti, što je istovremeno i jedno od najviše kritikovanih pitanja ovog pristupa (Good, 1991; Linkov i sar., 2009; Suter i Cormier, 2011).

Jedan od primera primene ovog pristupa je istraživanje koje su sproveli Kellar i sar., 2014., sa ciljem definisanja uzročno-posledičnih veza između uočenih negativnih bioloških efekata i zagađenja metalima i pesticidima u urbanoj oblasti. Prilikom izvođenja ovog istraživanja je primenjeno više linija dokaza koje obuhvataju podatke o efektima na individualnom, populacionom nivou, nivou zajednice a koji su dobijeni na osnovu laboratorijskih i terenskih analiza, kao i podatke hemijskih analiza. Ovim pristupom je uključeno više tipova bioloških testova, koji su identifikovali klase polutanata koje su odgovorne za uočene toksične/negativne efekte u analiziranom rečnom potezu. Evaluirani dokazi su obuhvatili hemijske analize sedimenta, analize zajednica beskičmenjaka, testove toksičnosti na hironomidama, podatke dobijene kaveznim izlaganjem puževa, biomarkere koji mere efekte oksidativnog stresa i hormonski delujućih supstanci kod dve vrste riba iz prirodnih populacija. Ovi autori ističu da je teško identifikovati uzrok pogoršanja bioloških elemenata u rekama pošto isti stresori uzrokuju različite negativne efekte kod različitih organizama, zbog čega je važno analizirati efekte kod više taksona uključujući laboratorijske i in situ pristupe. Ukoliko su uočeni efekti izazvani istim polutantom i kada je prepoznat izvor zagađenja, moguće je sprovesti adekvatne mere. U ovom slučaju se pokazalo da veću "težinu" imaju izvori zagađenja kao što je kombinacija metala i pesticida, u odnosu na povremeno izlivanje kanalizacije.

Mnogi istraživači su integrisali rezultate hemijskih analiza i različite biološke parametre u zavisnosti od problema / cilja istraživanja. Wiseman i sar., 2010 su analizirali povezanost pada gustine salmonidnih riba i abundance makroinvertebrata sa potencijalnim stresorima kao što su polutanti, povećana temperatura vode, sedimentacija, slaba rastvorljivost kiseonika, bazan pH, redukovana količina detritusa i degradacija staništa, pri čemu su temperatura vode i sedimentacija izdvojeni kao najverovatniji uzroci. Manfra i sar., 2021 su koristili multiparametarski pristup za procenu hazarda koji predstavljaju sedimenti u okolini naftnih platformi za životnu sredinu. Četiri linije dokaza su obuhvatale hemijske analize, testove toksičnosti, bioakumulaciju PAHs i metala u polihetama i bateriju biomarkera kod poliheta, čijom integracijom je potvrđeno prisustvo hazarda povezanog sa sedimentima i omogućena bolja identifikacija supstanci koje najviše doprinose uočenim efektima.

Integrativan multiparametarski konceptualni okvir za procenu uticaja hemijskog stresa na akvatične ekosisteme (Slika 2.1) koji se u oslanja na sadašnje zahteve WFD ali anticipira i predstojeće revizije predložili su nedavno Backhaus i sar. 2017, 2019. Ukratko, integracijom rezultata hemijskih i svih raspoloživih bioanalitičkih i bioloških metoda (na različitim nivoima biološke organizacije), za svaku od osnovnih grupa akvatičnih

organizama (receptor ili bioloških elemenata kvaliteta u kontekstu WFD) procenjuje se da li i u kojoj meri zagađenje predstavlja ključan pritisak na izabrani receptor ili akvatični ekosistem. Na osnovu dobijenih rezultata moguće je sugerisati jedan od 16 mogućih scenarija sa predloženim remedijacionim merama (Tabela P31. u prilogu). Predloženi konceptualni okvir primenjen je u analizi rezultata ove doktorske disertacije na mikro i makroskali, odnosno, odabranim studijama slučaja.



Slika 2.1. Konceptualna šema multiparametarkog pristupa za identifikaciju i potvrdu uticaja hemijskog stresa.

SUM TU-suma toksičnih jedinca, EBT-bioanalitičke metode, PICT- promene životnih zajednica indukovane zagađenjem (engl. pollution-induced community tolerance). Četiri kolone predstavljaju različite pristupe (LoE) koji se primenjuju u multiparametarskom pristupu za procenu hemijskog stresa. Pojedinačano, daju informacije u uzročnicima efekata ili samom efektu na različitim nivoima biološke organizacije, pri čemu sa leva na desno ekosistemska relevantnost raste, a specifičnost prema grupama supstanci koje predstavljaju uzročnike stresa opada. Prazna polja označavaju da za neke receptore i nivoe biološke organizacije nije moguće primeniti svaki od četiri pristupa (prerađeno iz Backhaus i sar., 2019)

3. CILJEVI

Imajući u vidu kompleksnost problematike identifikacije hemijskog stresa i povezivanja uočenih efekata *in situ* sa uzrocima promena u realnim multistres uslovima, cilj ove doktorske disertacije je selekcija, optimizacija i integracija baterije fizioloških, enzimskih i molekularnih biomarkera kod riba, kao ključnog segmenta kompleksnog multiparametarskog dijagnostičkog pristupa za identifikaciju hemijskog stresa kao značajnog pritiska na akvatične ekosisteme u realnim multistres uslovima.

Istraživanja u okviru doktorske disertacije su izvedena u okviru dve studije slučaja, od kojih je svaka imala nekoliko zadataka sa specifičnim ciljevima.

U okviru studije slučaja koja je sprovedena na mikrolokalitetu Novi Sad, specifični ciljevi su bili:

- Proceniti toksični pritisak na lokalitetima koji su relevantni za područje koje je obuhvaćeno studijom slučaja, na osnovu koncentracija detektovanih supstanci i podataka o njihovoj individualnoj toksičnosti (suma toksičnih jedinica).
- Proceniti efekte frakcionisanih uzoraka vode sa odabranih lokaliteta u blizini tačkastog izvora zagađenja (neprečišćene otpadne vode grada Novog Sada) pomoću *in vitro* pERK 1/2 imunoeseja na ćelijskoj liniji HepG2 i evaluirati osetljivost ovog imunoseja u odnosu na specifične grupe supstanci kao i u odnosu na druge *in vitro* eseje opšteg odgovora na stres, koji su primenjeni i validirani na istim uzorcima vode u okviru projekta FP7 Solutions.
- Proceniti primenjivost pERK 1/2 imunoeseja, koji je prethodno validiran za upotrebu sa pojedinačnim supstancama, kao samostalnog dijagnostičkog alata ili kao dodatnog testa u okviru baterije *in vitro* testova za procenu efekata kompleksnih uzorka iz životne sredine koji sadrže smeše velikog broja supstanci.
- Unaprediti terenske protokole i eksperimentalne postavke koji podrazumevaju kavezni sistem izlaganja jedinki riba i procenu efekata hemijskog stresa kod jedinki iz prirodnih populacija, a koji će omogućiti primenu biomarkera na različitim prostorno-vremenskim skalama za potrebe različitih ciljeva istražnih monitoring programa, sa posebnim akcentom na velike reke, kao što su Dunav i Sava.
- Primeniti i razviti sistem za agregaciju odgovora dobijenih analizom baterije biomarkera *in situ* kod kavezno izloženih *C. carpio* i *A. brama* iz prirodnih populacija (ABR indeks), pri čemu upotrebljena baterija biomarkera kod riba obuhvata pokazatelje opšteg stanja jedinki kao i širok spektar fizioloških procesa od opšteg odgovora na stres, antioksidativne zaštite, metabolizma ksenobiotika, endokrine regulacije, imunog odgovora, neurotoksičnosti, autofagije, homeostaze glukoze i gvožđa.
- Primeniti multiparametarski sistem razvijen u okviru projekta FP 7 Solutions na studiju slučaja Novi Sad i unaprediti njegove dijagnostičke potencijale

- Doprineti proceni uticaja odabranih tačkastih zagađivača i stanja ekosistema na odabranim kritičnim lokacijama u našoj zemlji.

Specifični ciljevi u okviru studije slučaja na široj prostornoj skali - tok reke Dunav, bili su:

- Detektovati prisustvo hemijski indukovanih toksičnih efekata u prirodnim populacijama riba vrste *Alburnus alburnus* duž toka Dunava, na osnovu odgovora biomarkera, radi identifikacije lokaliteta na kojima su organizmi najviše izloženi hemijskom stresu (Crne tačke)
- Proceniti povezanost odgovora biomarkera sa detektovanim supstancama kako bi se identifikovale supstance ili grupe supstanci koje su nosioci efekata
- Evaluirati primenjivost odabrane baterije biomarkera u proceni hemijskog stresa *in situ* kod riba iz prirodnih populacija na nivou velike reke.
- Integrisati rezultate analize genske ekspresije kod vrste *A. alburnus* u agregirani indeks biomarkera (ABR) i dijagnostički multiparametarski sistem za kvantitaciju *in situ* efekata smeša polutanata na nivou jedinki, populacija i zajednica, a koji je razvijan u okviru FP7 projekta Solutions

Na osnovu rezultata izvešće se zaključci o primenljivosti biomarkera, individualno i u okviru dijagnostičkog multiparametarskog protokola u proceni uticaja kompleksnih smeša polutanata iz tačkastih zagađivača, identifikaciji kritičnih sektora velikih reka i sagledaće se veze između biološkog odgovora eksponiranih riba sa potencijalnim uticajem na više nivoa biološke organizacije i populacije. Primenljivost, eksperimentalne postavke, terenskih protokola i odabranih biomarkera biće kritički procenjena i ukazaće se na sve prednosti, nedostatke i kritične korake primenjene metodologije u monitoringu velikih reka.

4. MATERIЈAL I METODE

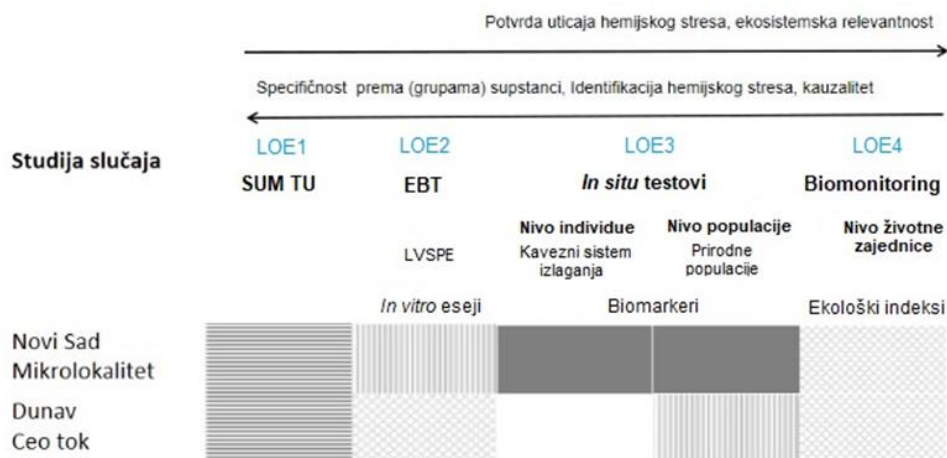
4. 1. Eksperimentalni pristup

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je izveden u formi dve studije slučaja, u okviru FP7 projekta Solutions (<https://www.solutions-project.eu/>), finansiranog od strane Evropske Komisije i maršutnog istraživanja reke Dunav JDS3 (<http://www.danubesurvey.org/jds3/>) organizovanog od strane Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (engl. *International Commission for the Protection of the Danube river*, ICPDR).

Dve studije slučaja zauzimaju različite prostorne skale: mikrolokalitet Novi Sad (opisan u poglavlju 4.2.) i na makroskali više lokaliteta duž celog toka Dunava – studija slučaja Dunav (opisani u poglavlju 4.3.). Obe studije slučaja obuhvataju analizu podataka 4 linije dokaza (LoE) u okviru multiparametarskog sistema za identifikaciju i potvrdu hemijskog stresa:

- LoE 1 – procenu ukupnog toksičnog pritiska na osnovu odnosa individualnih koncentracija i toksičnosti kvantifikovanih supstanci u uzorcima (sume toksičnih jedinica - SUM TU),
- LoE 2 – rezultate monitoringa biološkog efekta (EBT) zasnovane na *in vitro* metodama sa uzorcima dobijenim pomoću uređaja za ekstrakciju čvrste faze iz velikih zapremina vode (Large volume solid phase extraction, LVSPE)
- LOE 3 – *in situ* testove na nivou individue:
 - *LoE3a* – analizu biomarkera kod jedinki riba iz kaveznog sistema izlaganja)
 - *LoE3b* – analizu biomarkera kod jedinki iz prirodnih populacija riba
- LoE 4 – biomonitoring koji podrazumeva i analizu sastava i strukture životnih zajednica (predstavljeno ekološkim indeksima).

Podaci i iskustva dobijeni istraživanjem u okviru ove disertacije zajedno sa rezultatima dobijenim radom drugih istraživačkih grupa angažovanih na projektu FP 7 Solutions, korišćeni u interpretaciji rezultata i integraciji u kompleksni dijagnostički multiparametarski set alata (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Multiparametarski pristup za identifikaciju i potvrdu uticaja hemijskog stresa u dve studije slučaja.

Tamnim poljima su označene linije dokaza zasnovane na podacima sopstvenih istraživanja (biomarkeri različitih nivoa biološke složenosti kod riba); Vertikalnom šrafurom su označene linije dokaza koje čine rezultati sopstvenih istraživanja zajedno sa rezultatima drugih istraživačkih grupa (in vitro testovi studije slučaja Novi Sad, biomarkeri kod riba u studiji slučaja Dunav); Horizontalnom šrafurom su označene linije dokaza dobijene, u okviru ove doktorske disertacije, preračunavanjem podataka drugih istraživačkih grupa (toksične jedinice); Ukrštenom šrafurom su označene linije dokaza u kojima se nalaze podaci drugih istraživačkih grupa, a korišćeni za interpretaciju naših rezultata (podaci o biološkim zajednicama); Prazno polje označava liniju dokaza koja je analizirana samo na mikroskali, u okviru studije slučaja Novi Sad (nivo individue u sistemu kaveznog izlaganja).

4.2. Studija slučaja Novi Sad

Istraživanje u okviru studije slučaja Novi Sad obuhvata tri seta eksperimenata različitih nivoa biološke organizacije:

- *in vitro* pERK 1/2 enzimski imunoesej (ELISA) na HepG2 ćelijama sa uzorcima dobijenim pomoću uređaja za ekstrakciju čvrste faze iz velikih zapremina vode (Large volume solid phase extraction, LVSPE) koji su uzorkovani na odabranim lokalitetima (poglavlje 4.2.1.),
- analizu biomarkera na nivou individue kod riba iz kaveznog sistema izlaganja (poglavlje 4.2.2): analizu biometrijskih parametara, analizu aktivnosti enzima i analizu genske ekspresije,
- analizu biomarkera na nivou prirodnih populacija riba (poglavlje 4.2.3.): analizu biometrijskih parametara, analizu aktivnosti enzima i analizu genske ekspresije

Pored eksperimenata, hronični toksični pritisak na lokalitetima od interesa je procenjen pomoću TU koncepta (poglavlje 4.5.).

4.2.1. *In vitro* pERK 1/2 enzimski imunoesej (ELISA) sa LVSPE uzorcima vode Dunava

4.2.1.1. Izbor lokaliteta

Uzorci vode za pERK 1/2 imunotest i ostale *in vitro* testove sprovedene u okviru projekta Solutions, su sakupljeni na tri lokaliteta na Dunavu u blizini grada Novi Sad (Slika 4.2.). Prvi lokalitet uzorkovanja (RL), na slici označen brojem 1 se nalazi 2 km uzvodno od ispusta neprečišćenih komunalnih otpadnih voda grada Novog Sada i predstavlja referentni lokalitet koji nije pod uticajem ispusta. Drugi lokalitet (GC), na slici označen brojem 2 se nalazi 236 m nizvodno od ispusta gradskog kanalizacionog sliva 1 (GC1) i pod njegovim je direktnim uticajem. Treći lokalitet (SU), na slici označen brojem 3, se nalazi 7 km nizvodno od kanalizacionog ispusta GC1, u blizini ribarskog naselja Subić. Treći lokalitet se nalazi van gradske zone, pri čemu se između lokaliteta GC i SU nalazi drugi ispust kanalizacionih voda grada Novog Sada (GC2) koji predstavlja ispust mešanih komunalno-industrijskih otpadnih voda u Dunav ali i nekoliko manjih direktnih ispusta otpadnih voda industrijskog porekla.



Slika 4.2. Lokalizacije uzorkovanja vode Dunava za *in vitro* testove

4.2.1.2. Uzorkovanje vode Dunava

Uzorkovanje vode Dunava na pomenuta tri lokaliteta je sprovedeno tokom novembra 2014. godine pomoću uređaja za ekstrakciju čvrste faze iz velikih zapremina vode (Large volume solid phase extraction, LVSPE) (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Uređaj za ekstrakciju čvrste faze iz velikih zapremina vode (LVSPE)

LVSPE uređaj čine vakuumski sistem za uzorkovanje, filtracioni uređaj povezan za dovodnu cev, komora pritiska od hirurškog čelika i ekstrakcioni kertridž od hirurškog čelika koji je napunjen neutralnim sorbentom, kopolimerom polistiren-divinilbenzena (PS-DVB; HR-X). Princip uzorkovanja podrazumeva ponavljano usisavanje po 500 ml vode i provođenje kroz ekstrakcioni kertridž pod pritiskom. Repetitivnim sakupljanjem po 500 ml vode na lokalitetu uzvodno od kanizacionog ispusta (RL) ekstrahovana je ukupna zapremina od 1000 l tokom 48h. Na lokalitetu pod neposrednim uticajem kanizacionog ispusta (GC) ekstrahovano je 850 l tokom 60h, a na lokalitetu 7 km nizvodno od kanizacionog ispusta (SU) 1000 l tokom 24h. Napunjeni sorbenti su osušeni zamrzavanjem i čuvani na -20 °C do eluiranja. Sorbenti su eluirani u Laboratoriji za efektom-usmerene analize UFZ Centra za ispitivanje životne sredine, Lajpcig, Nemačka. Ukratko, eluiranjem pomoću neutralnog (smeša 1:1 metanola i etil acetata), kiselog (metanol sa mravljom kiselinom) i baznog (amonijak u metanolu) rastvarača, dobijene su neutralna, kisela i bazna frakcija za svaki lokalitet uzorkovanja. U neutralnoj frakciji su ekstrahovane neutralne polarne i polupolarne organske supstance, u kiseljoj supstance koje se pri tipičnoj pH za površinske vode nalaze u anjonskoj formi, a u baznoj supstance koje se pri pH vode 6-8 nalaze u katjonskom obliku. pH kiselog i baznog eluata je podešena na neutralnu, a eluati dodatno profiltrirani radi uklanjanja preostalih precipitata i redukovani do suva uz pomoć uparivača (na 40°C) i mlaza azota, nakon čega su čuvani na -20°C do dalje obrade (König i sar., 2017).

4.2.1.3. pERK 1/2 enzimski imunoesej (ELISA) na HepG2 ćelijskoj liniji

Analiza je urađena prema metodi prvobitno opisanoj od strane Versteeg i sar., 2000, sa određenim modifikacijama. Eksperimentalni uslovi su optimizovani i metoda je validirana testiranjem humanog epidermalnog faktora rasta kao pozitivne kontrole (engl. *epidermal growth factor*, EGF) i pojedinačnih supstanci koje pripadaju različitim grupama ksenobiotika (Stanić i sar., 2021).

Aktivacija ERK 1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*) signalnog puta predstavlja rani odgovor u ćelijama izloženim ksenobioticima, što zahteva kratkotrajno izlaganje testiranim uzorcima. Rezultati optimizacije metode su pokazali da su pogodni inkubacioni periodi 15 min i 120 min, pa su ova vremena trajanja tertmana korišćena u eksperimentima. Uzorci su testirani u 2 do 4 nezavisna eksperimenta u duplikatu. Pored uzoraka, svaka ploča je sadržala slepu probu (netretirane ćelije, bez dodavanja primarnog antitela) i kontrolne bunarčiče (koji su procesuirani na isti način kao i tretman izuzev dodavanja uzoraka vode). Kao pozitivna kontrola za tretman je korišćen EGF u finalnoj koncentraciji 100 ng/mL, u trajanju od 15 min.

4.2.1.4. Hemikalije korišćene za ELISA-pERK 1/2 esej

Medijum za gajenje ćelijskih kultura Minimum Essential Medium Eagle (MEM), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonična kiselina (HEPES), rastvor penicilin (10 000 IU/mL)-streptomycin (10 mg/mL), 0.25% rastvor tripsin-EDTA, dimetil sulfoksid (DMSO), 0.4% tripan plavo (engl. *Trypan Blue*), humani epidermalni faktor rasta (EGF), paraformaldehid (PFA), polietilen glikol sorbitan monolaurat (Tween-20), 30% rastvor vodonik peroksida (H₂O₂), albumin iz govedeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA), o-fenilendiamin dihidrohlorid (OPD), Crystal Violet, natrijum piruvat i natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*,

SDS) su proizvodi Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Sterilni fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) kupljen je od PAA Laboratories (Pasching, Austria). Fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primarno antitelo je proizvod Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), dok je kozje anti-zečije sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (engl. *horse radish peroxidase*, HRP) nabavljeno od Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Ostale hemikalije bile su analitičke čistoće.

4.2.1.5. Ćelijska kultura i sađenje ćelija

Za pERK 1/2 imunoesej (ELISA) korišćena je kontinualna linija humanih hepatoma ćelija Hep G2 (ATCC® HB8067™), izolovanih iz hepatocelularnog karcinoma koje su po morfologiji epitelne, adherentne ćelije. Ćelijska kultura je gajena jednoslojno u flaskovima površine 75 cm² u inkubatoru, gde su uslovi podrazumevali 37°C i vlažnu atmosferu sa 5% CO₂. Kompletan medijum za održavanje kulture i sađenje ćelija je sadržao Minimum Essential Medium Eagle (MEM) medijum sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), streptomicina (100 mg/L), penicilin (100 000 IU/L) (u obliku penicillin-streptomicin rastvora-1% kompletnog medijuma), 1.5g/L NaHCO₃, 0.11 g/L natrijum piruvata i 10 mM HEPES pufera; pH 7.4. Ćelije su pasažirane i sađene za eksperimente pri konfluentnosti 80-90%. Prilikom pasažiranja, nakon uklanjanja medijuma, ćelije su ispirane dva puta PBS rastvorom (engl. *phosphate buffered saline*: 140 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7.4), radi uklanjanja ostataka medijuma i inhibitora tripsina iz FBS-a. Ćelije su zatim tripsinizovane sa 0.25% rastvorom tripsin-EDTA (270 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM D-glukoza, 14 mM NaHCO₃, 0.25% tripsin, 0.53 mM EDTA u destilovanoj vodi; pH 7.2) tokom 7-8 minuta u inkubatoru do potpunog odlepljivanja od podloge. Nakon toga, ćelije su resuspendovane u kompletnom medijumu i centrifugirane na 300xg 5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven i talog je resuspendovan u svežem medijumu. Broj ćelija u suspenziji je određivan TBE testom (engl. *Trypan Blue Exclusion Test*). Pri pripremi uzorka za TBE test, ćelijska suspenzija razblaživana je 8 puta.

Za eksperiment, ćelije su sađene u ploče sa 96 bunarčića, u gustini 20 000 ćelija u 200 µL kompletnog medijuma po bunarčiću. Nakon 24h oporavka od manipulacije tokom sađenja, ćelije su ispirane PBS-om, a zatim izložene starvaciji u trajanju od 24h u medijumu bez seruma (200 µL / bunarčiću). Starvacija je sprovedena u cilju boljeg odgovora ćelija na stimulaciju i smanjenja pozadinskog šuma u analizi. Nakon starvacije, ćelije su tretirane ispitivanim uzorcima.

4.2.1.6. Priprema uzoraka i tretman

Priprema uzoraka za pERK 1/2 imunoesej, doziranje i izračunavanje efekta su izvedeni na osnovu uniformisanih JDS2013/Solutions instrukcija za sve bioeseje rađene u okviru projekta, a pripremljenih na osnovu Escher i sar., 2006, Escher i Leusch, 2012 i Escher i sar., 2014.

Suvi ekstrakti uzoraka rastvoreni su u 15 µL DMSO, tako da se postigne odgovarajući faktor obogaćenja (engl. *enrichment factor*, Ef), koji predstavlja odnos između početne

zapremine uzorka vode odnosno ekvivalenata vode ($V_{uzorka \text{ vode}}$) i konačne zapremine uzorka ($V_{ekstrakta}$), odnosno:

$$Ef = \frac{V_{uzorka \text{ vode}}}{V_{ekstrakta}} \quad (4.1)$$

Suvi ekstrakti uzoraka RL i SU odgovarali su količini od 1.5 L ekvivalenata vode pa je Ef vrednost nakon rastvaranja u 15 μ L DMSO iznosila 100 000. Suvi ekstrakti GC uzoraka odgovarali su količini od 0.3 L ekvivalenata vode pa je Ef vrednost nakon rastvaranja u 15 μ L DMSO iznosila 20 000.

Ovako pripremljeni uzorci su za potrebe tretmana dalje rastvarani u DMSO, sukcesivno, do željenih koncentracija, koje su izražene kao relativni faktor obogaćenja (engl. *relative enrichment factor*, REF). REF vrednost ekvivalentna je koncentraciji uzorka, a izračunava se kao proizvod faktora razblaženja u analizi (engl. *dilution factor*, Df) i Ef vrednosti, odnosno:

$$REF = Df_{bioeseja} \times Ef_{uzorka} \quad (4.2)$$

Uzorci su testirani u sedam različitih finalnih koncentracija u opsegu od 0.032 do 500 REF (za uzorke sa lokaliteta RL i SU) ili 0.0064 do 100 REF (za uzorke sa lokaliteta GC).

4.2.1.7. Merenje pERK 1/2 odgovora

Po isteku tretmana medijum iz ploče je odliven, a ćelije fiksirane 4% rastvorom paraformaldehida u PBS-u, pH 6.9, tokom 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon fiksiranja, ćelije su ispirane četiri puta 0.1% Tween-20 (PBS/Tween) rastvorom, 100 μ L/bunarčiću. Zatim je u ćelijama blokirana endogena peroksidaza inkubacijom sa 0.6% H_2O_2 u PBS/Tween (100 μ L/bunarčiću) 30 min, nakon čega su ćelije ponovo ispirane četiri puta PBS/Tween rastvorom. Nespecifična mesta blokirana su sa 5% BSA u PBS/Tween tokom 90 min na sobnoj temperaturi (50 μ L/bunarčiću). Nakon blokiranja dodavano je 25 μ L primarnog antitela razblaženog u PBS/Tween-5% BSA (pERK antitelo; razblaženja 1:1000), i usledila je inkubacija preko noći na 4 °C, u vlažnoj atmosferi. Nakon inkubacije, ćelije su ispirane sa PBS/Tween četiri puta u trajanju od 5 min na laboratorijskoj mešalici, 100 rpm, a zatim inkubirane sa 25 μ L sekundarnog antitela (kozije anti-zečije HRP konjugovano antitelo; razblaženja 1:1000) u PBS/Tween-5% BSA, 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, ćelije su ispirane četiri puta sa PBS/Tween i dva puta sa PBS u trajanju od 5 min na laboratorijskoj mešalici, 100 rpm. Zatim su ćelije inkubirane sa 25 μ L rastvora koji sadrži 0.4 mg/mL o-fenilendiamin dihidrohlorid (OPD), u 0.05 M fosfocitratnom puferu (0,1 M Na_2HPO_4 i 0.05 M limunska kiselina; pH 5.0) sa 0.015% H_2O_2 tokom 15 min na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija je zaustavljena sa 25 μ L 1 M H_2SO_4 , nakon čega je izmerena apsorbanca na 492 nm i 650 nm pomoću Multiscan EX sprektrofotometra (Thermo Labsystems, Champaign, IL, SAD). Konačna apsorbanca je predstavljena kao razlika izmerenih apsorbanca ($A_{492}-A_{650}$).

4.2.1.8. Crystal violet test vijabilnosti ćelija

U cilju normalizacije pERK 1/2 odgovora na broj ćelija u bunarčićima u kojima je meren signal, ćelije su bojene Crystal violet bojom, pri čemu rezultat Crystal violet testa predstavlja meru sadržaja živih ćelija u bunarčićima.

Nakon merenja pERK 1/2 signala, ćelije su isprane dva puta sa 100 μL PBS/Tween i dva puta sa 100 μL dH_2O i sušene 5 minuta nakon čega je dodato 100 μL Crystal violet rastvora (0.04% Crystal violet u 4% etanolu). Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi, na laboratorijskoj mešalici, 50 rpm, ploče su isprane četiri puta sa 100 μL dH_2O , posle čega su inkubirane sa 1% rastvorom natrijum dodecil sulfata (SDS), rastvorenim u dH_2O . Inkubacija je trajala 1h na sobnoj temperaturi, uz intenzivno mešanje (150 rpm).

Nakon inkubacije, izmerena je apsorbance na 595 nm (A_{595}), pomoću Multiscan EX spektrofotometra (Thermo Labsystems, Champaign, IL, SAD). Vrednost apsorbance direktno je proporcionalna broju ćelija, te je korišćena za normalizaciju pERK odgovora u ELISA testu:

$$\text{Normalizovani pERK odgovor} = \frac{A_{492} - A_{650}}{A_{595}} \quad (4.3)$$

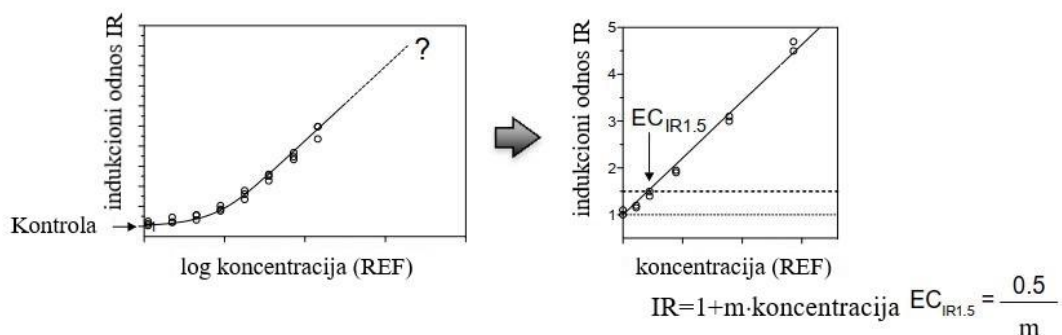
4.2.1.9. Izračunavanje i prikaz rezultata pERK 1/2 imunotesta

Nakon normalizacije na broj ćelija, od svih vrednosti oduzeta je slepa proba koja predstavlja pozadinski šum poreklom od sekundarnog antitela (netretirane ćelije, bez dodavanja primarnog antitela). Konačan rezultat predstavljen je kao indukcioni odnos (engl. *induction ratio*, IR), koji predstavlja odnos izmerenog pERK 1/2 signala indukovanog tretmanom u odnosu na bazalni pERK odgovor (kontrolni bunarčići), odnosno:

$$IR = \frac{Signal_{uzorka}}{Signal_{kontrola}} \quad (4.4)$$

IR vrednosti su korišćene za konstrukciju krive dozne zavisnosti sa logaritmovanim REF vrednostima. Linearnom regresijom pomoću efekta kontrole, za koju IR ima vrednost 1, su izvedene efektivne koncentracije koje izazivaju indukcioni odnos od 1.5 ($EC_{IR1.5}$) u slučaju stimulatornog efekta, odnosno 0.5 ($EC_{IR0.5}$) u slučaju inhibitornog efekta ispitivanog uzorka (Slika 4). Vrednosti $EC_{IR1.5}$, odnosno $EC_{IR0.5}$ izračunate su kroz funkciju linearne regresije:

$$EC_{IR1.5} = \frac{0.5}{nagib\ prave\ (m)} \quad (4.5)$$



Slika 4.4. Procena podataka za biotestove gde ne postoji maksimum efekta ili se on ne može postići (zbog prirode merenog parametra, kao što je u slučaju pERK 1/2 testa).

m predstavlja nagib prave. Šema je preuzeta i prerađena iz Escher i sar., 2014.

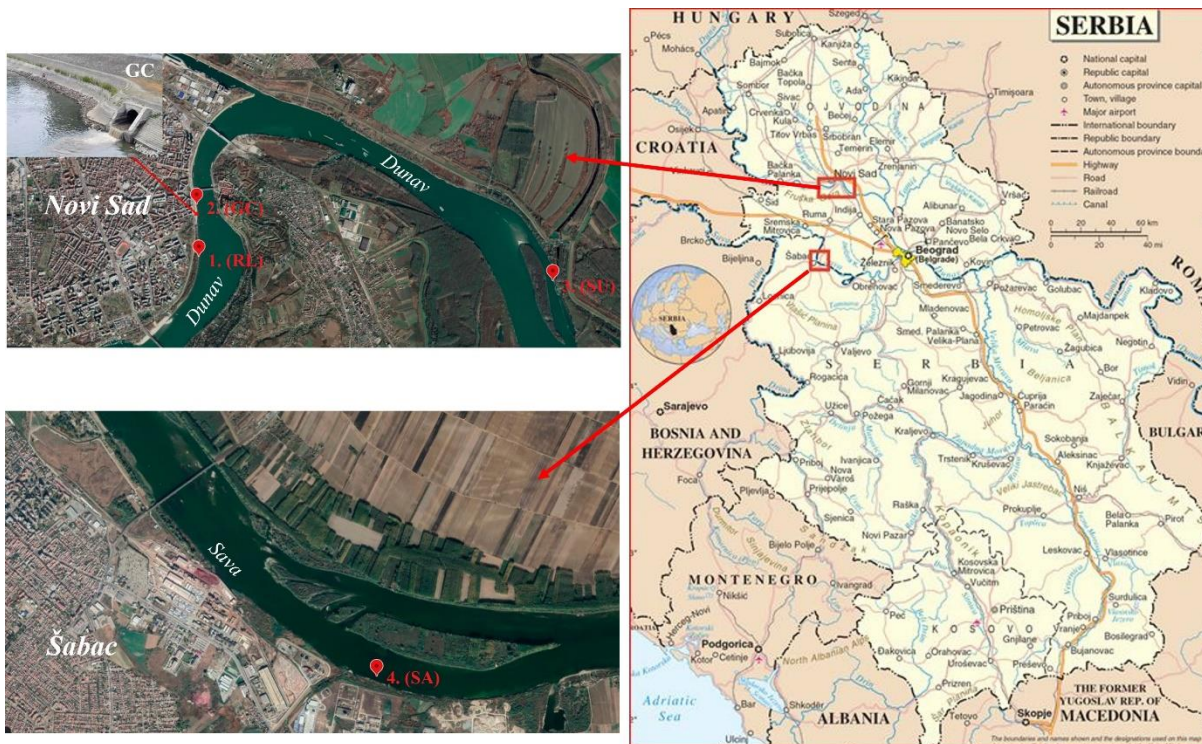
4.2.2. Kavezni sistem izlaganja riba

Kavezno izlaganje jedinki vrste *Cyprinus carpio* na odabranim lokalitetima je izvedeno tokom septembra 2016. godine u trajanju od 9 dana. Na svakom lokalitetu su bila postavljena dva kaveza sa po 10 jedinki, među kojima su bila zastupljena oba pola.

4.2.2.1. Lokaliteti postavke kaveza

Tri lokaliteta postavke kaveza su vezana za studiju slučaja Novi Sad i odgovaraju lokalitetima uzorkovanja vode za hemijske analize i *in vitro* testove u okviru iste studije slučaja (Slika 4.5.). Referentni lokalitet (RL), na slici označen brojem jedan, se nalazi oko 700 m uzvodno od ispusta netretiranih komunalnih otpadnih voda. Drugi lokalitet (GC), označen brojem dva na slici se nalazi u neposrednoj blizini ispusta (oko 235 m nizvodno), dok je treći lokalitet (SU), na slici obeležen brojem tri u blizini ribarskog naselja Subić, 7 km nizvodno od kanalizacionog ispusta.

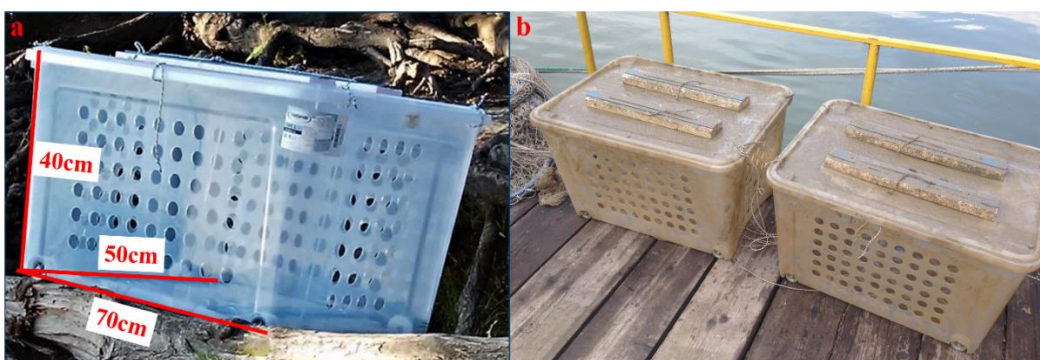
Dodatno, pored navedenih lokaliteta vezanih za studiju slučaja Novi Sad, kavezima su postavljani i na jedan lokalitet u reci Sava, nizvodno od industrijske zone grada Šapca, na slici obeležen brojem 4 (SA), radi procene primenljivosti odabranih biomarkera kao samostalnog alata za identifikaciju hemijskog stresa u odsustvu podataka hemijskih analiza.



Slika 4.5. Lokaliteti postavke kaveza u Dunavu i Savi

4.2.2.2. Dizajn kaveza

Kavezi su napravljeni od plastičnih kutija dimenzija 70x50x40 cm, koje su perforirane radi omogućavanja protoka vode (Slika 4.6.). Na poklopce kutija su pričvršćeni komadi stiropora kako bi se postigla odgovarajuća specifična težina kaveza u vodi da bi se tokom vremena izlaganja kavezi nalazili u vodenom stubu na dubini od 1 m iznad sedimenta i 1 m ispod površine vode. Kavezi su bili ukotvljeni na lokalitetima pomoću tegova, na oko 5 m od obale. Zbog velike brzine protoka Dunava kako bi se sprečilo kidanje i gubitak kaveza, kavezi su za tegove pričvršćeni konopcima koji su im omogućavali kretanje do 10 m od kotve u smeru toka vode. Kavezi su obeleženi privezanim plastičnim bocama koje su plutale na površini vode kako bi mogli biti uočeni radi svakodnevne provere postavke i mortaliteta riba tokom perioda izlaganja i radi prekida izlaganja nakon 9 dana.



Slika 4. 6. Kavezi u kojima su jединke *C. carpio* bile izložene in situ. a. izgled kaveza pre postavke sa obeleženim dimenzijama; b. kavezi nakon završenog devetodnevnog izlaganja

4.2.2.3. Vrsta *Cyprinus carpio* u kaveznom sistemu izlaganja

Cyprinus carpio (šaran) je široko rasprostranjena omnivorna vrsta iz porodice Cyprinidae koja se hrani najčešće bentosnim beskičmenjacima i nastanjuje eutrofna jezera i reke. Vrsta je nativna u Evropi i Aziji. Zbog primene u ljudskoj ishrani i rekreativnom ribolovu ima visoku ekonomsku vrednost, pa je poribljavanje vodotoka uslovalo introdukciju vrste na sve kontinente izuzev polova (Kottelat i Freyhof, 2007).

C. carpio je ekološki relevantna vrsta za ispitivano područje, a njena široka rasprostranjenost, posebno doprinosi relevantnosti primene ove vrste kao model organizma. Iako je vrsta široko rasprostranjena zbog poribljavanja i uzgoja u ribnjacima, prirodne populacije u Dunavu imaju status ranjive vrste na osnovu IUCN crvene liste, zbog degradacije staništa i hibridizacije sa srodnim vrstama. Vrsta *C. carpio* predstavlja deo prirodnih ribljih zajednica u Dunavu i Savi sa oko 0.1% ukupnog ulova čineći je pogodnom za ovu studiju slučaja, a bez rizika od introdukcije alohtonih vrsta (Freyhof i Kottelat, 2008; Piria i sar., 2016; Miljanović i sar., 2016). Jединke vrste *C. carpio* mogu da žive u manjim jatima zbog čega su pogodne za izlaganje u kaveznom sistemu (Smith, 1991). Takođe, vrsta *C. carpio* je tolerantna na velike promene osnovnih parametara kvaliteta vode (Maceda-Veiga i de Sostoa, 2011), što je činilo pogodnom za praćenje subletalnih parametara u našem istraživanju, koje je podrazumevalo

izlaganje jedinki na lokalitetu pod direktnim uticajem kanalizacionog ispusta, tokom kog je preživljavanje jedinki bilo neophodno. Dodatno, vrsta *C. carpio* je biološki i genetički detaljno okarakterisana što je čini pogodnim i često korišćenim modelom u ekotoksikološkim istraživanjima.

4.2.2.4. Eksperimentalne jedinke *C. carpio* korišćene u istraživanju

Jedinke *C. carpio*, starosti oko 2 godine, za kavezno izlaganje nabavljene su iz vojvođanskog ribnjaka Mužlja (slika 4.7). Starost jedinki je potvrđena na osnovu broja anulusa na krljuštima pod binokularnom lupom. Jedinke su imale prosečne vrednosti totalne dužine 288 mm i mase tela 447 g (za n=100 riba).



Slika 4. 7. Jedinka *C. carpio* tokom merenja biometrijskih parametara

Pre početka izlaganja, a nakon donošenja iz ribnjaka, jedinke su držane u bazenima sa čistom, odstajalom (u cilju isparavanja hlora), aerisanom česmenskom vodom 24h. Nakon perioda aklimatizacije u bazenima, nultog dana, 20 jedinki je žrtvovano, a ostale jedinke su postavljene u kaveze na odabranim lokalitetima.

Sa jedinkama je postupano u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (Sl. glasnik RS br. 41/2009) i Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Novom Sadu (Savet Univerziteta u Novom Sadu, 2011 sa izmenama i dopunama od 19. maja 2017. godine) i Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe, uz pozitivno mišljenje Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Univerziteta u Novom Sadu br: 01-126/14.

Jedinke su žrtvovane udarcem u glavu, nakon čega su izmerene standardna i totalna dužina tela, masa tela i jetre radi analize biometrijskih parametara, a delovi tkiva jetre i mozga izolovani i odvojeni za dalje analize. Uzorci tkiva za izolaciju RNK su stavljeni u tubice sa 1 mL RNK later rastvora (rastvor za čuvanje uzoraka za izolaciju RNK) i skladišteni na -20°C, a uzorci za analize enzimskih aktivnosti i merenje ukupnih proteina odmah zamrznuti u tečnom azotu a zatim prebačeni na -80°C gde su čuvani do dalje obrade. Dalja obrada uzoraka je opisana u potpoglavljima 4.4.2. i 4.4.3.

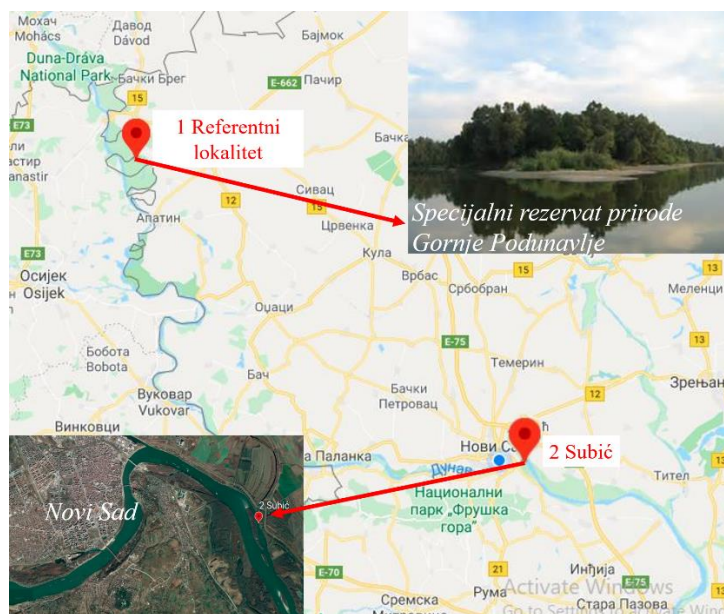
4.2.3. Prirodne populacije *Abramis brama*

Jedinke vrste *Abramis brama* (deverika) iz prirodnih populacija sa dva lokaliteta u Dunavu su izlovljene u proleće 2018. godine ribarskim mrežama pod ribarskom dozvolom br.

140-501-1316/2017-04 izdatom od Pokrajinskog sekretarijata za urbanizam i zaštitu životne sredine, Republike Srbije, pri čemu na njima nisu sprovedeni eksperimentalni tretmani.

4.2.3.1. Lokaliteti uzorkovanja jedinki *A. brama*

Za lokalitete uzorkovanja *A. brama* iz prirodnih populacija su odabrana dva lokaliteta u reci Dunav duž toka kroz Srbiju. Lokaliteti se razlikuju po tipu i intenzitetu antropogenog uticaja, najviše na osnovu razlike u zagađenju i ukupnom nivou urbanizacije u sektoru (Slika 4.8).



Slika 4.8. Lokaliteti uzorkovanja *A. brama*

Prvi lokalitet (na slici obeležen brojem 1) se nalazi u zaštićenoj oblasti i pripada Specijalnom rezervatu prirode “Gornje Podunavlje”, zaštićenom dobru prve kategorije. Zaštićeno područje se prostire na levoj obali Dunava, od 1367. do 1433. rečnog kilometra, zahvatajući oko 20000 ha. Oblast je zaštićena nacionalnim propisima, a kategorisana je kao IV kategorija (zaštićeno stanište ili vrsta) od strane Međunarodne unije za zaštitu prirode (IUCN). Takođe, oblast je imenovana za ramsarsko područje, važnu oblast za ptice (IBA), važnu oblast za biljke (IPA) i Emerald područje. Oblast rezervata Gornje Podunavlje predstavlja jedan od retkih autohtonih biotopa prekrivenih močvarnim poplavnim šumskim kompleksima u Evropi, sa bogatim biodiverzitetom što ga je kandidovalo i za Rezervat biosfere. Lokalitet koji pripada zaštićenoj oblasti je odabran kao referentni za naše istraživanje jer je pod niskim ukupnim antropogenim pritiskom, posebno hemijskim stresom.

Drugi lokalitet se nalazi u urbanoj zoni, nizvodno od grada Novi Sad, na levoj obali Dunava između 1250. i 1252. rečnog kilometra, pod većim antropogenim pritiskom (na slici obeležen brojem 2). Hemijsko opterećenje ove oblasti je više u odnosu na uzvodne lokalitete jer se komunalne otpadne vode grada Novi Sad, koji naseljava oko 300000 stanovnika ulivaju neprečišćene u Dunav, kao i delimično tretirani efluenati rafinerije nafte i brojnih industrijskih postrojenja. Manje od 10 km nizvodno od Novog Sada se nalazi Specijalni rezervat prirode

“Koviljsko-Petrovaradinski rit, površine 6000 ha, koji je, slično kao Gornje Podunavlje, imenovano za ramsarsko područje, IV kategoriju zaštićenog dobra od strane IUCN-a, IBA, IPA i Emerald područje. Rezervat predstavlja pogodno utočište za brojne reofilne vrste, uključujući fitolitofilnu vrstu *A. brama*, obezbeđujući adekvatno stanište za mrest populacije iz ove oblasti.

4.2.3.2. Odabir vrste

A. brama (deverika) je vrsta ribe iz porodice Cyprinidae koja prirodno nastanjuje većinu vodotoka u Evropi, Marmara i Aralski basen u Aziji, a introdukovana je i u druge vodotoke. Nastanjuje veliki broj jezera i srednjih i velikih reka. Jedinke dostižu masu do 6 kg i hrane se bentosnim beskičmenjacima, dok pri velikoj gustini zooplanktona mogu da pređu na filtracioni način ishrane. Vrsta *A. brama* se mresti u sporotekućim vodama sa gustom vodenom vegetacijom, poplavnim područjima i u blizini obala jezera. Najčešće žive u jatima jedinki slične starosti. Kod *A. brama* je česta pojava hibridizacije sa drugim vrstama riba iz porodice Cyprinidae, dok su hibridi sa *Rutilus rutilus* (bodorkom) često fertilni. Na osnovu IUCN crvene liste svrstana je u kategoriju neugroženih vrsta (Freyhof i Kottelat, 2008). Na osnovu istraživanja zajednica riba u Dunavu, populacije *A. brama* su stabilne, pri čemu je vrsta među pet najabundantnijih vrsta duž toka Dunava kroz Srbiju. U sektoru Dunava duž rezervata Gornje Podunavlje jedinke vrste *A. brama* čine 4%, nizvodno od rezervata 1.8%, a nizvodno od Novog Sada 1% ukupnog ulova. Vrsta nije posebno atraktivna za ribolov tako da se godišnje kvote izlova od 5.5 t za komercijalni i 3.5 t za rekreativni u gornjem toku Dunava teško dostižu (Miljanović i sar., 2016).

4.2.3.3. Uzorkovane jedinke

Na referentnom lokalitetu u okviru rezervata Gornje Podunavlje je uzeto 14, a na lokalitetu nizvodno od Novog Sada 11 jedinki. Nakon ulova su ubijene udarcem u glavu, nakon čega su izmerene standardna i totalna dužina tela, masa tela i jetre, radi računanja biometrijskih parametara (slika 4.9.). Na osnovu izgleda gonada su određeni polna zrelost i pol jedinki. Starost riba je procenjena na osnovu broja prstenova godišnjeg prirasta na krljuštima (anulusa) uzetih iz prvog reda iznad lateralne linije, a ispod dorzalnog peraja, sa leve strane tela. Na osnovu pregleda krljušti pod binokularnom lupom starost riba je procenjena na 3+ do 6+ godina.



Slika 4.9. *A. brama* izlovljene na referentnom lokalitetu (Gornje Podunavlje)

Nakon merenja, uzorci tkiva jetre i mozga su odmah zamrznuti u suvom ledu, dok su uzorci tkiva za analize genske ekspresije stavljeni u tubice sa 1 mL RNK later rastvora. Nakon povratka u laboratoriju uzorci za kvantifikaciju ukupnih proteina i enzimske eseje su čuvani na -80°C , a uzorci u RNK lateru na -20°C do dalje obrade koja je detaljno opisana u potpoglavljima 4.4.2. i 4.4.3.

4.2.4. Podaci drugih istraživačkih grupa iz studije slučaja Novi Sad

U interpretaciji rezultata radi procene osetljivosti i primenjivosti pERK1/2 testa kao alata za procenu hemijskog stresa *in situ*, korišćeni su rezultati *in vitro* testova i detaljnih hemijskih analiza LVSPE uzoraka publikovani u König i sar., 2017.

Pored biomarkera za koje su podaci dobijeni u sklopu našeg istraživanja za interpretaciju rezultata u širem kontekstu korišćeni su rezultati dobijeni iz istih jedinki: hemijske analize tkivnog sadržaja mišića i seruma, histopatološke analize (nepublikovani podaci projekta Solutions) i markeri genotoksičnosti (Jovanović Marić i sar., 2020).

Dodatno, u tumačenju rezultata uzeti su u obzir i rezultati hemijskih analiza LVSPE uzoraka vode Dunava sa odabраниh lokaliteta i *in vitro* testova (König i sar., 2017), *in vitro* testova publikovanih u Hashmi i sar., 2018, 2020 i Serra i sar., 2020.

4.3. Studija slučaja Dunav

Studija slučaja Dunav je izvedena u okviru trećeg zajedničkog istraživanja Dunava (engl. *Joint Danube Survey 3*, JDS 3 <http://www.danubesurvey.org/>), koje je predstavljalo istraživačku ekspediciju duž celog toka Dunava, koordinisanu od strane međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav (engl. *International commission for the protection of the Danube river*, ICPDR), čija članica je i Republika Srbija.

4.3.1. Prirodne populacije *Alburnus alburnus*

Kao deo studije slučaja Dunav jedinke vrsta *A. alburnus* i *Neogobius sp.* su sakupljene duž toka Dunava od mesta Hercegsanto u Mađarskoj do mesta Sulina u Rumuniji, sa ciljem prikupljanja uporedivih informacija za ceo tok Dunava o parametrima koji nisu obuhvaćeni trenutnim monitoring programima. Analiza biomarkera je bila deo projekta Solutions. (<https://www.solutions-project.eu/>) i Norman mreže (<https://www.norman-network.net/>). U sklopu seta biomarkera analiziranih kod riba analiza ekspresije gena kod vrste *A. alburnus* je izvedena u okviru ove disertacije, a izbor lokaliteta uzorkovanja i vrste ribe su objašnjeni u delovima 4.3.1.1. i 4.3.1.2.

4.3.1.1. Lokaliteti uzorkovanja

Kako bi se dobio širi uvid u obrasce odgovora biomarkera kod riba duž toka Dunava, u okviru JDS3 kampanje, odgovori biomarkera su mereni u uzorcima jedinki uzetih sa 20 lokaliteta, dok je za analizu genske ekspresije kod *A. alburnus* odabrano 9 lokaliteta (Tabela 4.1.). Dodatno, veći broj gena je analiziran u uzorcima sa tri lokaliteta (JDS31, JDS33, JDS48) duž toka Dunava kroz Republiku Srbiju. Radi se o lokalitetima na području Novog Sada (JDS33), uzvodno (JDS31) i nizvodno (JDS48) od njega, pošto je Novi Sad prepoznat kao prioritetni lokalitet za dalja istraživanja i kavezno izlaganje riba u okviru projekta Solutions (studija slučaja Novi Sad).

Tabela 4.1. Lokaliteti uzorkovanja *A. alburnus* u Dunavu u okviru JDS3 kampanje

Oznaka lokaliteta	Blizina mesta	Zemlja	Rečni kilometri	Dodatne informacije
JDS 31	Ilok/Bačka Palanka	Srbija/Hrvatska	1303-1300	
JDS 33	Nizvodno od Novog Sada	Srbija	1252-1250	Grad od oko 300 000 stanovnika, bez postrojenja za prečišćavanja otpadnih voda
JDS 36	Belegiš, nizvodno od ušća Tise, uzvodno od Save	Srbija	1200	Bez značajnih tačkastih izvora zagađenja
JDS 48	Nizvodno od ušća Timoka u Dunav	Srbija/Rumunija	845	Nizvodno od grada srednje veličine bez postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda
JDS 54	Zimniča/Svištov	Bugarska/Rumunija	1132	
JDS 60	Čiciu/Silistra	Bugarska/Rumunija	383- 373	Grad bez postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, nizvodno od ušća pritoke Arges
JDS 62	Nizvodno od Braile	Rumunija	172 -163	Grad srednje veličine bez postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda
JDS 65	Reni	Rumunija	130	Grad srednje veličine sa postrojenjem za prečišćavanje otpadnih voda
JDS 66	Vilkov, kanal Chilia	Rumunija	60	Nizvodno od grada srednje veličine sa postrojenjem za prečišćavanje otpadnih voda (biološki tretman), smanjen kapacitet razblaženja zbog račvanja toka
JDS 67	Sulina, Sulina kanal	Rumunija	21	Nizvodno od grada srednje veličine sa postrojenjem za prečišćavanje otpadnih voda (biološki tretman), smanjen kapacitet razblaženja zbog račvanja toka

4.3.1.2. Odabir vrste

U okviru istraživanja JDS3 biomarkeri su analizirani kod dve vrste riba čiji je odabir bio zasnovan primarno na dostupnosti dovoljnog broja jedinki iste vrste duž istraživanog poteza Dunava. U tu svrhu su odabrane dve vrste koje zauzimaju različite ekološke niše, *Alburnus alburnus* i *Neogobius melanostomus*. Pošto su obe vrste slabo genetički opisane, u DNK bazama podataka i u literaturi nisu pronađene sekvence prajmera specifične za vrstu, pa je za analize genske ekspresije odabrana samo vrsta *A. alburnus* zbog primenjivosti prajmera dizajniranih za vrste iz iste porodice (Cyprinidae) koji su dostupni u relevantnoj literaturi.

A. alburnus (uklija) je vrsta iz porodice Cyprinidae koja naseljava otvorene vode velikih jezera i srednjih i velikih reka (Slika 4.10.). Jedinke ove vrste žive u jatima, malih su dimenzija, maksimalne mase tela 60 g. Hrane se zooplanktonom ili beskičmenjacima sa površine vode (Kottelat i Freyhof, 2007). *A. alburnus* je euritopna vrsta, nativna za ceo tok Dunava, čineći najveći procenat ukupnog ulova sa 46%, a nizvodno od Novog Sada čak 70% (Bammer i sar., 2015; Miljanović i sar., 2016). Vrsta nije atraktivna za ribolov, osim kao mamac za predatorske vrste riba, tako da se godišnje kvote izlova od 141.2 t za komercijalni i 94 t za rekreativni ribolov ne dostižu. Na osnovu IUCN crvene liste svrstana je u kategoriju neugroženih vrsta, a istraživanja zajednica riba ukazuju na stabilnost populacija *A. alburnus* u Dunavu (Bammer i sar., 2015; Miljanović i sar., 2016).



Slika. 4. 10. *Alburnus alburnus* (Preuzeto iz Barbarroja-Escudero i sar., 2016)

4.3.1.3. Uzorkovane jedinke *A. alburnus*

U okviru JDS 3 kampanje na odabranim lokalitetima sakupljeno je 4-6 odraslih jedinki *A. alburnus* tokom avgusta i septembra 2013. godine. Ribe su izlovljene neletalnim elektro-ribolovom, koji je zasnovan na potencijalu visokog napona između dve elektrode, koje zaronjene u površinski sloj vode stvaraju električno polje koje utiče na nevoljno kretanje riba ka katodi koje se tada sakupljaju mrežom.

Nakon izlova, jedinke su ubijene udarcem u glavu praćenim decerebracijom, pri čemu nisu bile izložene eksperimentalnoj manipulaciji. Dužina i masa jedinki su izmerene radi računanja kondicionog faktora, nakon čega su izolovana tkiva za analizu seta biomarkera. Uzorci tkiva jetre namenjeni za analize genske ekspresije urađene u okviru ove doktorske disertacije su odloženi u vijale sa RNK laterom i čuvani na -20 °C do daljih analiza koje su opisane u delu 4.4.3.

4.3.2. Ostali podaci iz JDS3 kampanje korišćeni u tezi

U tumačenju rezultata analiza genske ekspresije korišćeni su rezultati drugih istraživača dobijeni u okviru iste kampanje:

- Biomarkeri riba: parametri genotoksičnosti kod vrste *A. alburnus* (Deutschman i sar., 2016), aktivnosti enzima kod vrsta *A. alburnus* i *Neogobius sp.*, histopatološke analize jetri *A. alburnus* i *Neogobius sp.* (Liška i sar., 2015; Focks i sar., 2016)
- Podaci o biološkim zajednicama, ekološki indeksi (Liška i sar., 2015; Focks i sar., 2016)
- Podaci o toksičnom pritisku na odabranim lokalitetima u Dunavu (Backhaus i sar., 2017)
- Podaci o *in vitro* efektima (Neale i sar., 2015; Shultze i sar., 2014; Serra i sar., 2020)

4.4. Biomarkeri kod riba

4.4.1. Biometrijski parametri riba

U obe studije slučaja kod riba je određen telesni kondicioni faktor (BCF) kao osnovni pokazatelj stanja jedinki.

BCF predstavlja odnos mase tela i totalne dužine i određen je prema formuli (4.7):

$$BCF = \frac{\text{ukupna masa tela (g)}}{\text{totalna dužina}^3 \text{ (cm)}} \times 100 \quad (4.7)$$

Kao dodatna mera opšteg stanja i uhranjenosti riba, u studiji slučaja Novi Sad, kod *C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja i *A. brama* iz prirodnih populacija je određen i hepatosomatski indeks (HSI) koji je izračunat prema formuli (4.8):

$$HSI = \frac{\text{masa jetre (g)}}{\text{ukupna masa tela (g)}} \times 100 \quad (4.8)$$

4.4.2. Određivanje aktivnosti enzima

Aktivnosti enzima su analizirane u obe studije slučaja (Tabela 4.2.), pri čemu je u okviru našeg istraživanja u tkivima jetre i mozga *C. carpio* i *A. brama* iz studije slučaja Novi Sad (bele ćelije u tabeli 4.2.) merena aktivnosti katalaze (CAT) kao enzima aktioksidativne zaštite,

glutation s-transferaze (GST) i karboksilesteraze (CES) kao enzima koji učestvuju u biotransformaciji ksenobiotika i detoksifikaciji i acetilholin esteraze (AChE) kao markera neurotoksičnih efekata ksenobiotika. U okviru studije slučaja Dunav, Deutschman i sar. (2016) su u tkivima jetre vrsta *A. alburnus* i *Neogobius sp.* osim navedena četiri enzima merili i aktivnost enzima biotransformacije ksenobiotika citohrom P4501A1/2 (CYP1A1/2) primenom 7 etoksirezorufin-o-deetilaznog (EROD) enzimskog eseja, (zasenčene ćelije u tabeli 4.2.), a rezultati su predstavljeni u izveštaju projekta Solutions (Focks i sar., 2016).

Tabela 4.2. Enzimski eseji

Enzimski esej										
Vrsta ribe/tkivo	CAT		GST		CES		AChE		EROD	
	jetra	mozak	jetra	mozak	jetra	mozak	jetra	mozak	jetra	mozak
<i>C. carpio</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>A. brama</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>A. alburnus</i>	+		+		+		+		+	
<i>Neogobius sp.</i>	+		+		+		+		+	

Simbolom + (plus) u tabeli je označeno kod koje vrste i u tkivu kog organa je aktivnost datog enzima merena. Bela polja u tabeli predstavljaju rezultate enzimskih eseja koji su dobijeni u okviru ove doktorske teze, a zasenčena polja su rezultati koje su dobili Deutschman i sar., 2016, a predstavljeni u izveštaju projekta Solutions (Focks i sar., 2016)

U svim enzimskim esejima, aktivnost enzima je određena fotometrijski pomoću Multiskan™ GO microplate spektrofotometra (Thermo Scientific). Aktivnost enzima svih uzoraka je merena u triplikatu u pločama sa 96 bunarčića.

4.4.2.1. Hemikalije korišćene u enzimskim esejima

Korišćene hemikalije albumin goveđeg seruma (BSA); vodonik peroksid; 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB); acetilholin jodid; vodonik peroksid; 4-nitrofenil acetat; acetonitril; glutation reduktaza iz pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*); redukovani L-glutation (GSH); 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) su od proizvođača Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), kit za kvantifikaciju proteina (Pierce BCA protein assay kit) od Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) od Centrohema (Stara Pazova, Srbija), trihlorsirćetna kiselina (TCA) od PanReac Applichem (Darmstadt, Germany). Ostale hemikalije su bile analitičke čistoće.

4.4.2.2. Homogenizacija tkiva

Tkiva mozga i jetre *C. carpio* i *A. brama* su homogenizovana u ledeno hladnom natrijum-fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2) u maseno zapreminskom odnosu 1:5. Homogenizacija tkiva *C. carpio* je urađena ručno u tubama od 1.5 ml, plastičnim špatulicama, na ledu, dok su tkiva *A. brama* homogenizovana na Disruptor Genie homogenizeru (Scientific industries, USA), 2 min za uzorke jetre i 1 min za uzorke mozga u 1.5 ml tubama sa 5 kuglica za homogenizaciju od nerđajućeg čelika (1.5 mm prečnika) i ~10 staklenih kuglica (0.5 mm prečnika), prethodno UV sterilisanih i autoklaviranih (proizvođač kuglica: Biospec products, SAD). Homogenati su centrifugirani 20 min / 9000xg na temperaturi od 4°C. Supernatanti dobijeni centrifugiranjem

su alikvotirani i čuvani na temperaturi od -80°C do analiza gde su korišćeni kao izvor enzima za merenje enzimskih aktivnosti.

4.4.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Ukupna koncentracija proteina u uzorcima homogenata tkiva jetre i mozga je određena pomoću kompleta Pierce BCA Protein Assay Kit, u triplikatima, prateći uputstvo proizvođača (www.thermofisher.com) u pločama sa 96 bunarčića. Koncentracije proteina uzoraka su određene pomoću standardne krive konstruisane na osnovu serije razblaženja standarda albumina iz goveđeg seruma (BSA) u seriji koncentracija od 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 $\mu\text{g/ml}$. Razblaženja standarda su pravljena u natrijum-fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2) kao i uzorci. U bunarčice ploča je dodato 25 μl nerazblaženog uzorka proteina jetre ili mozga ili svake koncentracije standarda (za konstrukciju standardne krive) i 200 μl radnog reagensa iz kompleta. Ploče su inkubirane 30 minuta na 37°C , ohlađene na sobnoj temperaturi nakon čega su merene apsorbance na 562 nm pomoću MultiskanTM GO microplate spektrofotometra (Thermo Scientific). Koncentracije proteina iz uzoraka tkiva *C. carpio* i *A. brama* su bile od 4-16 mg/ml, pri čemu su koncentracije u uzorcima tkiva mozga bile niže nego u tkivu jetre.

4.4.2.4. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) je merena metodom opisanom u radu Claiborne, 1985 i modifikovanom od strane Velki i sar., 2017. Za potrebe našeg istraživanja, procedura je prilagođena merenju u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića. U svakom bunarčiću reakciona smeša je sadržala: 120 μl (za uzorke jetre) ili 100 μl (za uzorke mozga) natrijum-fosfatnog pufera (0.1 M, pH 7.2) i 125 μl 0.04 M vodonik peroksida. Reakcija je započinjana dodavanjem 5 μl nerazblaženog uzorka proteina jetre ili 25 μl uzorka proteina mozga. Ukupna zapremina reakcije (V) po bunarčiću je bila 250 μl .

Smanjenje u apsorbanci koje se javlja usled razgradnje vodonik peroksida je mereno u triplikatima na talasnoj dužini od 240 nm tokom 3 minuta, u 7 koraka, na svakih 30 sekundi. Reakcija se odvijala na temperaturi od 25°C . Aktivnost katalaze je izražena kao μmol vodonik peroksida razgrađenog u jednom minutu po mg proteina. Molarni ekstinkcioni koeficijent (ϵ) korišćen za računanje iznosi $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.4.2.5. Određivanje aktivnosti karboksilesteraze

Aktivnost karboksilesterase (CES) je merena metodom opisanom u radu Hosokawa i Satoh, 2002, koristeći p-nitrofenil acetat (pNPA) kao supstrat. Protokol je modifikovan i prilagođen za merenje u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića od strane Velki i sar., 2017. Za razblaživanje uzoraka jetre i mozga pre dodavanja u analizu korišćen je GET rastvor (1:5 m/v 85% glicerola, 0.2M EDTA, 1M Tris-HCL u destilovanoj vodi, pH 7.4), pri čemu su uzorci jetre razblaženi 5 puta, a uzorci mozga 2.5 puta. U svakom bunarčiću, reakciona smeša je sadržala: 15 μl 1M Tris-HCl pufera (pH 8.0), 200 μl 1mM pNPA rastvorenog u acetonitrilu i 15 μl uzorka u GET rastvoru. Ukupna zapremina reakcije (V) po bunarčiću je bila 230 μl . Porast apsorbance usled formiranja p-nitrofenola (pNP) je meren u triplikatima na talasnoj dužini od 405 nm tokom

2 min, u 5 koraka, na svakih 30 sekundi. Reakcija se odvijala na temperaturi od 25°C. Aktivnost CES je izražena kao $\mu\text{mol pNP-a}$ formiranog u jednom minutu po mg proteina. Molarni ekstinkcioni koeficijent (ϵ) korišćen za računanje iznosi $16400 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.4.2.6. Određivanje aktivnosti glutathion s-transferaze

Aktivnost glutathion s-transferaze (GST) je merena metodom opisanom u radu Habig i Jakoby, 1981, korišćenjem 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) kao ultraljubičasto hromogenog supstrata. Protokol je prilagođen za merenje u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića od strane Velki i sar., 2017. U svakom bunarčiću reakciona smeša je sadržala: $180 \mu\text{l}$ 1mM CDNB, $5 \mu\text{L}$ nerazblaženog uzorka proteina jetre ili mozga i $50 \mu\text{l}$ 25mM GSH. Ukupna zapremina reakcije po bunarčiću je bila $235 \mu\text{l}$. Porast apsorbance usled formiranja konjugata (CDNB-SG) u reakciji između CDNB i GSH je meren u triplikatima, na talasnoj dužini od 340nm tokom 3 min, u 10 koraka, na svakih 20 sekundi. Reakcija se odvijala na temperaturi od 25°C. Aktivnost GST je izražena kao $\mu\text{mol konjugovanog GSH}$ u jednom minutu po mg proteina. Molarni ekstinkcioni koeficijent (ϵ) korišćen za računanje iznosi $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.4.2.7. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze

Aktivnost acetilholinesteraze (AChE) je merena metodom opisanom u radu Ellman i sar., 1961, koristeći acetiltioholin jodid kao supstrat. Protokol je prilagođen za merenje u pločama sa 96 bunarčića od strane Velki i sar., 2017. U svakom bunarčiću, reakciona smeša je sadržala: $190 \mu\text{l}$ (za uzorke proteina jetre) ili $200 \mu\text{l}$ (za uzorke proteina mozga) natrijum fosfatnog pufera (0.1M , $\text{pH } 7.2$), $10 \mu\text{l}$ 1.6mM DTNB, $20 \mu\text{l}$ nerazblaženog uzorka jetre ili $10 \mu\text{l}$ uzorka mozga. Reakcija je započeta dodavanjem $10 \mu\text{l}$ 156mM acetilholin jodida. Ukupna zapremina reakcije po bunarčiću je bila $230 \mu\text{l}$. Tokom reakcije, tioholin (hidrolizovan od acetiltioholin jodida delovanjem AChE) reaguje sa DTNB stvarajući žuto obojen proizvod (anjon 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline). Porast apsorbance je meren u triplikatima, na talasnoj dužini od 412nm tokom 5 min, u 15 koraka, na svakih 20 sekundi. Reakcija se odvijala na 25°C. Aktivnost AChE je izražena kao $\mu\text{mol acetiltioholin jodida hidrolizovanog}$ u jednom minutu po mg proteina. Molarni ekstinkcioni koeficijent (ϵ) korišćen za računanje iznosi $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.4.2.8. Izračunavanje specifične enzimske aktivnosti uzoraka

Aktivnost svih merenih enzima je računata na isti način, uz primenu konstanti navedenih u tabeli 4.3. za pojedinačne enzime na osnovu optimizovanih protokola.

Enzimske aktivnosti su računate preko formule (4.9):

$$\Delta n = \frac{V}{(\epsilon l) \Delta A} \quad (4.9)$$

Δn predstavlja aktivnost datog enzima, V – ukupnu zapreminu reakcije, ϵ – molarni ekstinkcioni koeficijent, l – pređeni put svetlosti kroz reakcionu smešu, ΔA – razliku u apsorbanci na početku i na kraju reakcije.

Pređeni put svetlosti kroz reakcionu smešu jednak je visini smeše u bunarčiću i može se izračunati iz zapremine reakcije preko formule (4.10):

$$l = \frac{V}{(r^2\pi)} \quad (4.10)$$

pri čemu je r poluprečnik bunarčića koji u korišćenim mikrotitar pločama iznosi 3.27 mm.

Tabela 4.3. Konstante korišćene za računanje aktivnosti enzima

Enzim	CAT	GST	CES	AChE
V reakcije (μl)	250	235	230	230
l (cm)	0.745	0.7	0.685	0.685
t reakcije (min)	3	3	2	5
ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	43.6	9600	16400	13600

Specifična aktivnost enzima je izračunata deljenjem vrednosti Δn sa količinom proteina (mg) u reakciji.

4.4.3. Analiza genske ekspresije

U Tabeli 4.4. je prikazan pregled gena čija je ekspresija analizirana kod tri vrste riba u tkivu jetre i/ili mozga.

Tabela 4.4. Pregled analiziranih gena na osnovu vrste i tkiva u kojima je ekspresija merena

Gen		Vrsta ribe				
		<i>C. carpio</i>		<i>A. brama</i>		<i>A. alburnus</i>
Skraćenica	Naziv	Tkivo				
		Jetra	Mozak	Jetra	Mozak	Jetra
Endogena kontrola						
<i>gapdh</i>	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza					+
<i>40s11</i>	40S ribozomalni protein s11	+	+	+	+	
Opšti stres						
<i>hsp70</i>	protein toplotnog šoka 70	+		+		
<i>cr</i>	receptor za kortizol	+		+		
<i>erk2</i>	ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 2	+		+		+
<i>cox1</i>	citohrom oksidaza subjedinica 1	+		+		
<i>mt</i>	metalotioneini	+				
Antioksidativna zaštita i metabolizam ksenobiotika						
<i>sod</i>	ekstracelularna superoksid dizmutaza			+		+
<i>gpx1</i>	glutation peroksidaza 1			+		+
<i>nrf2a</i>	nuklearni eritroidni faktor 2a			+		+
<i>cyp1a</i>	citohrom P450 1a			+		+
<i>mgst3a</i>	microzomalna glutation s-transferaza 3a			+		+
Endokrini regulacija						
<i>era</i>	estrogeni receptor α	+		+		
<i>erβ</i>	estrogeni receptor β	+		+		
<i>ar</i>	androgeni receptor	+				
<i>vtg</i>	vitelogenin	+				
Homeostaza glukoze						
<i>pc</i>	piruvat karboksilaza			+		+
<i>pygl</i>	jetrena izoforma glikogen fosforilaze			+		+
Homeostaza gvožđa						
<i>tfd</i>	transferin - d			+		+
Imuni odgovor						
<i>il1β</i>	interleukin 1 β		+			
<i>tnfa1</i>	faktor nekroze tumora α 1		+			
Autofagija						
<i>dyn</i>	dinein		+			
<i>lc3II</i>	LC3 (laki lanac 3 proteina mikrotubula1A/1B)		+			
Neurotoksičnost						
<i>mbp</i>	bazični protein mijelina		+		+	
<i>gabral</i>	receptor gama amino buterne kiseline α		+			
<i>syt10</i>	sinaptotagmin 10		+			
<i>tac3a</i>	tahikinin 3a		+			
<i>tac3b</i>	tahikinin 3b		+			

Simbolom + (plus) u tabeli je označeno kod koje vrste i u tkivu kog organa je analizirana ekspresija datog gena. Zasenčene ćelije u tabeli označavaju gene kod vrste *A. alburnus* čija ekspresija je analizirana kod jedinki sa devet lokaliteta, duž toka Dunava, dok su ostali geni kod iste vrste analizirani kod jedinki sa tri odabrana lokaliteta.

4.4.3.1. Hemikalije za izolaciju RNK, pravljenje cDNK i RQ-PCR

Korišćeni TRIzol reagens je nabavljen od proizvođača Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD), izopropanol, hloroform i etanol od Zorka Pharma - Hemija (Šabac, RS), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit i Power SYBR Green PCR Master Mix od Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific (Waltham, MA USA), DEPC-tretirana voda i RNK later od Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), dok su prajmeri za RQ-PCR sintetisani od strane proizvođača Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD).

4.4.3.2. Izolacija RNK

Izvor RNK za analizu genske ekspresije su bile jetre i mozgovi *C. carpio* i *A. brama*, dok je kod *A. alburnus* korišćeno samo tkivo jetre.

Ukupna RNK izolovana je upotrebom TRIzol Reagesa prateći uputstvo proizvođača (www.thermofisher.com). Radi izolacije RNK iz tkiva organa, tkiva su homogenizovana u eppendorf tubama, pogodnim za PCR, od 1.5 ml uz dodatak trizola (1 ml trizola na 100 mg tkiva). Homogenizacija uzoraka tkiva *C. carpio* i *A. alburnus* je rađena ručno, pomoću plastičnih špatulica, a uzorci tkiva *A. brama* su homogenizovani pomoću Disruptor Genie homogenizera (Scientific industries, USA). Homogenizacija uzoraka jetre na homogenizeru je trajala 2 minuta, a uzoraka mozga 1 minut uz dodavanje 5 kuglica od nerđajućeg čelika (1.5 mm prečnika) i ~10 staklenih kuglica (0.5 mm prečnika) u tubice. Kuglice za homogenizaciju su prethodno UV sterilisane i autoklavirane (Biospec products, SAD). Tečna (vodena) i organska faza su razdvojene dodavanjem 1/5 zapremine (0.2 ml) hloroforma na homogenat. Kada je dodat hloroform, tubice su promućkane i inkubirane 2 min u hladnom stalku, nakon čega su centrifugirane 15 min / 12000xg na 4°C. Nakon centrifugiranja, gornja faza koja sadrži RNK je sakupljena i precipitirana dodavanjem 0.5 ml izopropanola (1/2 zapremine u odnosu na zapreminu trizola dodatog pri homogenizaciji) 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga RNK je istaložena centrifugiranjem 15 min / 12000xg na 4°C i isprana sa 1 ml 75% etanola. Nakon isparavanja etanola, RNK je rastvorena u 30-50 µl DEPC tretirane vode. Koncentracija i čistoća RNK u uzorcima određene su pomoću aparata Biospec-Nano (Shimadzu, Japan). Koncentracija RNK je određena merenjem apsorbance na 260 nm u 1 µl uzorka. Prosečan prinos RNK je bio 1.5 µg/µL, a čistoća je praćena kroz odnose A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Prvi odnos ukazuje na kontaminaciju proteinima, a drugi na kontaminaciju komponentama za izolaciju. Čistoća RNK je na osnovu oba parametra bila u optimalnom opsegu (1.8-2.1).

4.4.3.3. Reverzna transkripcija

Ukupna RNK iz svih uzoraka je reverznom transkripcijom prevedena u cDNK koristeći komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit prema uputstvu proizvođača (www.thermofisher.com). Uzorci RNK su razblaženi DEPC tretiranom vodom tako da koncentracija svih uzoraka bude 2 µg u 10 µl. Reakciona smeša za pripremu cDNK je pripremljena u ukupnoj zapremini od 20 µL. Sadržala je 2 µg RNK u zapremini od 10 µl i 10 µl RT master miksa, pripremljenog prema uputstvu proizvođača, koji je sadržao elemente kompleta (pufer, miks dinukleotida, nasumične prajmere, enzim reverznu transkriptazu i DEPC tretiranu vodu). Reverzna transkripcija je izvedena u tubicama od 200 µl u Veriti Thermal Cycler

(Applied Biosystems) aparatu pod programom koji podrazumeva 4 koraka. Prvi korak reakcije (predenaturacija) se odvija na: 25°C tokom 10 min, drugi korak (ekstenzija prajmera) na 37°C tokom 120 min, treći korak (sinteza cDNK) na 85°C tokom 5 min, dok četvrti korak predstavlja završetak reakcije i hlađenje na 4°C. Na ovaj način je u svakoj reakciji sintetisano 2 µg cDNK u zapremini od 20 µl. Nakon završetka reakcije, uzorci su čuvani zamrznuti na -20 °C do dalje RQ-PCR analize.

4.4.3.3. Relativna kvantifikacija genske ekspresije lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (RQ-PCR)

Za relativnu kvantifikaciju ekspresije transkriptata korišćen je Power SYBR®Green Master Mix prema uputstvu proizvođača (www.thermofisher.com). RQ-PCR reakcije su izvođene u ukupnoj zapremini od 12.5 µL. U svakoj reakciji se nalazilo 30 ng cDNK u zapremini od 2,5 µl (preračunato i razblaženo u DEPC tretiranoj vodi bez nukleaza u odnosu na početnu koncentraciju RNK koja je uneta u reakciju reverzne transkripcije), specifični prajmeri (direktni i reverzni) u konačnoj koncentraciji od 500 nM i Power SYBR Green PCR Master Mix. RQ-PCR reakcije su izvođene u aparatu Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Nemačka) pod standardnim uslovima koji podrazumevaju temperaturu od 50°C tokom 2 minuta, 95°C tokom 10 minuta, 40 ciklusa od 15 sekundi na 95°C, i 60°C tokom 1 minuta. Za obradu rezultata je korišćen Mastercycler® eprealplex Software (Eppendorf).

Ekspresija gena za 40S ribozomalni protein s11 (*40s11*) i gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*gapdh*), kao endogene kontrole (referentnog gena), je praćena u svim uzorcima i služila je za korekciju varijacija u koncentraciji cDNA među uzorcima. Ekspresija gena korišćenih za endogenu kontrolu je bila ujednačena među svim uzorcima.

Prema našim saznanjima *A. brama* i *A. alburnus*, kao nestandardni model organizmi, nisu korišćene u istraživanjima koja uključuju analizu stres indukovane genske ekspresije i uopšteno su genetički slabo okarakterisane. Iz tog razloga u relevantnoj literaturi i dostupnim bazama podataka se ne mogu naći sekvence prajmera za stres inducibilne gene, odabrane za naše istraživanje. Kako DNK sekvencioniranje nije bilo u okviru plana ovog istraživanja, alternativno rešenje za PCR profilisanje stres indukovanih gena je pronađeno u upotrebi prajmera preuzetih iz literature, a dizajniranih na osnovu sekvenci DNK za druge vrste iz iste porodice (Cyprinidae) kao što su *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Rutilus rutilus*, *Cirrhinus molitorella* i *Carassius auratus*, što omogućava visoka evolutivna konzerviranost sekvenci velikog broja gena između ovih vrsta. Efikasnost amplifikacije svih prajmera preuzetih iz literature je testirana i data u tabeli 4.5. uz sekvence prajmera i navode referenci. Slovim iznad reference u tabeli 4.5. je označena vrsta ribe za koju su dizajnirani prajmeri.

Tabela 4.5. Sekvence prajmera korišćenih za RQ - PCR

Gen	Sekvenca prajmera (5'-3')	Preuzeto iz:	Efikasnost		
			<i>C. carpio</i>	<i>A. brama</i>	<i>A. alburnus</i>
Endogena kontrola					
<i>gapdh</i>	F: GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC R: GTGCAGGAGGCATTGCTTACA	McCurley i Callard, 2008 ^B	-	-	1.91
<i>40s11</i>	F: CCGTGGGTGACATCGTTACA R: TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	Szwejsjer i sar., 2017 ^A	1.99	2.05	
Opšti stres					
<i>hsp 70</i>	F: GGCAGAAAGTTTGTATGACCCA R: GCAATCTCCTTCATCTTACC	Sinha i sar., 2012 ^A	2.02	2.09	-
<i>cr</i>	F: GTGAGACTGCAAGTGTCCAA R: TCTCTTCACTATGGCCT	Sinha i sar., 2012 ^A	1.96	1.97	-
<i>erk2</i>	F: GTTGAAGACGCAGCACTTGA R: ACAGGTTTGTATGGCTTCAGG	Shi i Zhou, 2010 ^B	1.93	2.00	2.06
<i>cox1</i>	F: GGAACCTAGCCACGCA R: AAGCACGGATCAGACGA	Sinha i sar., 2012 ^A	2.02	1.92	-
<i>mt</i>	F: TGGAACCTGCAACTGTGGTG R: GGAGTTGCCCTTACACACG	Valenzuela i sar., 2015 ^A	2.00	-	-
Antioksidativna zaštita i metabolizam ksenobiotika					
<i>sod</i>	F: GAGTTCGACAACACAATCTATGCCAC R: CAGCCTTGACTGAGGTCTCC	Koglin i sar., 2016 ^C	-	2.01	2.06
<i>gpx1</i>	F: AGATGTCATTCTGCACACG R: AAGGAGAAGCTTCCTCAGCC	Malek i sar., 2004 ^B	-	2.07	1.90
<i>cyp1a</i>	F: TTCGGAGCCGGTTTCGACAC R: CCTCGAGGAGCGGCAGG	Koglin i sar., 2016 ^C	-	1.98	1.98
<i>mgst3a</i>	F: GATATGTGGCGCTAACCAGGA R: ACTGTACATTGTTGGATACGG	Glisic i sar., 2015 ^B	-	2.00	2.14
<i>nrf2a</i>	F: GAGCGGGAGAAATCACACAGAATG R: CAGGAGCTGCATGCACCTCATCG	Timme-Laragy i sar., 2012 ^B	-	1.96	1.74
Endokrini regulacija					
<i>era</i>	F: ACTGCCACAAAACCTCTCACC R: TGGGAATCATAGGCTCCAT	Szwejsjer i sar., 2016 ^A	2.01	2.05	-
<i>erβ</i>	F: CCAGGTCCATTGTTGGAGT R: TGAGGTCTGGGGAGAAAATG	Szwejsjer i sar., 2016 ^A	2.03	2.04	-
<i>ar</i>	F: AGAGAGCTGCTGAGGGGAAG R: AGCAGGTCATACAGAGGAAC	Liang i Fang, 2012 ^D	1.96	-	-
<i>vtg</i>	F: TGAACAGTGAGAAAAGAGATTGAAC R: ATTGATGGGAATGGCGTAGG	Bickley i sar., 2009 ^A	2.03	-	-
Homeostaza glukoze					
<i>pc</i>	F: GTAAAGTGAAAGCCAGGCCAG R: TCCCCTCCAGGCTGCTGTC	Koglin i sar., 2016 ^C	-	2.01	2.02
<i>pygl</i>	F: TGGCAATCACAGGATCGTTA R: TTCTCAATTGCCTCCACGTCA	Koglin i sar., 2016 ^C	-	2.02	1.94
Homeostaza gvožđa					
<i>tfd</i>	F: GGCACACTGGCAAGTTTACAT R: GGCTTTCAGGTGTCTTGACAG	Koglin i sar., 2016 ^C	-	2.09	2.03
Imuni odgovor					
<i>lc3II</i>	F: AGCAGCGGTGCAGGATGTA R: CCTCAGAAATGGCGGTGGAC	Xing i sar., 2015 ^A	1.99	-	-
<i>tnf1a</i>	F: GCTGTCTGCTTCACGCTCAA R: CCTTGAAGTGACATTTGCTTTT	Stolte i sar., 2008 ^A	2.05	-	-
Autofagija					
<i>dyn</i>	F: TCATGGGAGTAAGGCTGTATT R: TCTCAAAGGAATACAGGGGCT	Xing i sar., 2015 ^A	2.00	-	-
<i>Il1β</i>	F: AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT R: CCTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA	Stolte i i sar., 2008 ^A	1.96	-	-
Neurotoksičnost					
<i>mbp</i>	F: AATCAGCAGTTCTTCGGAGGAGA R: AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG	Wu i sar., 2016 ^B	1.90	1.91	-
<i>gabra1</i>	F: ATCGTTACTTCGTCATCCAGA R: GCTACCTTGGGGAGAGAGTTTC	Zhao i sar., 2016 ^E	2.01	-	-
<i>syt10</i>	F: TCCCTTGTCTATCTTCCCACG R: TCTCAGCCTCCGACCATCA	Wang i sar., 2016 ^B	2.01	-	-
<i>tac3a</i>	F: GGTGGCTCATAACTTGCTG R: TCCGCTGTGCCTGTTTCTG	Qi i sar., 2015 ^E	2.02	-	-
<i>tac3b</i>	F: ATGTCCTGCGGTGGTTGTC R: GGTGCTGTCGTCCTGGAAT	Qi i sar., 2015 ^E	2.00	-	-

^A*Cyprinus carpio*-, ^B*Danio rerio*-, ^C*Rutilus rutilus*-, ^D*Cirrhinus molitorella*-, ^E*Carassius auratus*-specifične sekvence

Relativna kvantifikacija ekspresije svih analiziranih gena za svaki uzorak je izvedena u 2 do 4 nezavisne RQ-PCR reakcije uz prisustvo endogene kontrole i kontrole bez cDNK matrice.

Normalizovana genska ekspresija (NE) je računata (prema formuli 4.11) kao što su prethodno opisali (Muller i sar., 2002):

$$NE = \frac{E_{referentnog\ gena}^{Ct_{referentnog\ gena}}}{E_{ciljnog\ gena}^{Ct_{ciljnog\ gena}}} \quad (4.11)$$

Pri čemu je NE normalizovana genska ekspresija; $E_{ciljnog\ gena}$ efikasnost PCR amplifikacije ciljnog gena; $E_{referentnog\ gena}$ – Efikasnost PCR amplifikacije endogene kontrole (referentnog gena); $Ct_{ciljnog\ gena}$ – pragovni ciklus PCR amplifikacije ciljnog gena; $Ct_{referentnog\ gena}$ – pragovni ciklus PCR amplifikacije referentnog gena. Ct se definiše kao ciklus u kom fluorescencija raste značajno iznad pozadinske fluorescencije.

4.5. Procena hroničnog toksičnog pritiska pomoću pristupa Toksičnih Jedinica (TU)

Ukupni hronični toksični pritisak na odabranim lokalitetima u našem istraživanju je procenjen pomoću pristupa toksičnih jedinica (TU). Koncentracije supstanci korišćene za računanje SUM TU iz životne sredine su preuzete iz zvaničnog izveštaja Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije (SEPA) ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda iz mesečnog monitoringa prioriternih supstanci u 2017. i 2018. godine (SEPA 2018, 2019a), detaljnih hemijskih analiza uzoraka vode uzetih u okviru Joint Danube Survey 3 (JDS3) i publikovanih u Liška i sar., 2015, kao i uzoraka vode iz uzorkovanja velikih zapremena (LSVPE) vode Dunava u oblasti Novog Sada (König i sar., 2017). Izmerene koncentracije kvantifikovanih supstanci su date u tabelama u prilogu P1-P4.

Hronične Toksične Jedinice (TU_{ch}) su izračunate za svaku kvantifikovanu supstancu deljenjem njene koncentracije izmerene u uzorku ($conc_i$) prosečnom hroničnom koncentracijom bez uočenog efekta (NOEC_i) za ribe, dafnije i alge (preračunato iz baze podataka od Posthuma i sar., 2019; dato u tabelama u prilogu P1-P4), preko formule 4.12. Ukupni hronični toksični pritisak je izračunat kao suma hroničnih toksičnih jedinica (TU_{ch}) i označen kao SUM TU_{ch}. Dodatno, na isti način je izračunat hronični pritisak poreklom od organskih supstanci i označen kao SUM TU_{ch} org.

$$SUM\ TU_{ch} = \sum_n^i \frac{conc_i}{NOEC_i} \quad (4.12)$$

4.6. Statistička analiza i grafički prikaz rezultata

Statistička analiza podataka i grafički prikaz rezultata su sprovedeni korišćenjem GraphPad Prism softvera (La Jolla, CA, USA), dok su pojedini grafici dodatno uređeni u CoreIDRAW 2019.

Pri analizi podataka *in vitro* fosfo-ERK1/2 ELISA testa statistička značajnost je prvo utvrđena analizom varijanse (ANOVA), a zatim je značajnost razlika između tretiranih grupa u odnosu na kontrolu utvrđena pomoću Dunnett's Multiple Comparison Test-a.

Dodatno, vrednosti efektivnih koncentracija ($EC_{IR1.5}$) izračunatih iz rezultata pERK 1/2 testa su poređene sa vrednostima dobijenim u *in vitro* testovima vezanim za metabolizam ksenobiotika i adaptivne odgovore na stres testiranjem istih uzoraka, publikovanih u König i sar., 2017.

Postojanje korelacija između odgovora *in vitro* pERK 1/2 testa i 125 supstanci koje su izmerili König i sar., 2017 u LVSPE uzorcima vode korišćenim u testu, je utvrđeno analizom glavnih komponenti (principal component analysis, PCA) u Excel dodatku (Addinsoft (2019), XLSTAT statistical and data analysis solution. Long Island, NY, USA <https://www.xlstat.com>). Pearsonovi korelacioni koeficijenti (R) su izračunati između svih vrednosti i varijabli (uključujući rezultate *in vitro* testova iz König i sar., 2017) sa nivoom značajnosti 0.05 ($p \leq 0.05$). Supstance koje su se izdvojile po visini korelacionog koeficijenta ($R > 0.6$) su prikazane tabelarno.

Pri analizi podataka biometrijskih parametara riba, enzimskih aktivnosti i genske ekspresije normalnost distribucije podataka je proverena pre daljih analiza (D'Agostino & Pearson omnibus i Shapiro-Wilk) testovima normalnosti. Normalno distribuirani podaci su analizirani parametarskim, a u slučajevima odsustva normalne distribucije neparametarskim testovima.

U cilju određivanja nivoa značajnosti razlike između dve grupe, kao što je bio slučaj u analizi podataka *A. brama* iz prirodnih populacija sa dva lokaliteta upotrebljen je parametarski neupareni t-test ili neparametarski Mann-Whitney test. Nivo značajnosti razlike između više grupa kao što je bio slučaj u analizi podataka kavezno izloženih *C. carpio* i *A. alburnus* iz prirodnih populacija sa više lokaliteta korišćeni su parametarski test jednosmerna ANOVA i post hoc Neuman-Keuls multiple comparisons test ili neparametarski Kruskal-Wallis test i post hoc Dunn's multiple comparisons test. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

Za sve statističke analize kao kriterijum statističke značajnosti uzimana je granica verovatnoće $p < 0,05$.

Rezultati analize biomarkera kod kavezno izloženih jedinki *C. carpio* za lokalitet SA su na graficima prikazani stubićima koji su odvojeni od ostalih lokaliteta isprekidanom linijom. Lokalitet SA predstavlja zaseban lokalitet u reci Savi, bez adekvatnog referentnog lokaliteta u istoj reci i dodatnih analiza koje su izvedene u okviru studije slučaja Novi Sad te je prikazan odvojeno od stubića koji se odnose na lokalitete u Dunavu.

5. REZULTATI

U petom poglavlju su prikazani i prokomentarisani rezultati analiza koje su rađene u okviru ove doktorske disertacije, u sklopu dve studije slučaja izvedene na različitim prostornim skalama. U prvom potpoglavljju su predstavljeni podaci koji se odnose na studiju slučaja mikrolokaliteta Novi Sad (5.1.), dok drugo obuhvata rezultate koji su deo studije slučaja Dunav u okviru koje je uzorkovanje izvršeno na većem broju lokaliteta, duž celog toka Dunava, obuhvatajući širu prostornu skalu (5.2.). Treći deo rezultata predstavlja integraciju rezultata različitih setova parametara dobijenih u sklopu studija slučaja u dijagnostički multiparametarski sistem za procenu ekoloških efekata smeša polutanata (5.3.). Posebna pažnja je posvećena agregaciji rezultata analize biomarkera kod riba u srednji odgovor biomarkera (ABR).

5.1. Studija slučaja Novi Sad

Potpoglavlje, koje se odnosi na studiju slučaja Novi Sad, će obuhvatiti prikaz i opis rezultata analize toksičnog pritiska koja je izvršena na osnovu izračunatih toksičnih jedinica, rezultate *in vitro* imunotesta pERK1/2, rezultate analiza biomarkera kod kavezno izloženih jedinki *C. carpio* na odabranim lokalitetima u Dunavu i Savi kao i *A. brama* iz prirodnih populacija u Dunavu. Gradska zona grada Novog Sada je odabrana kao područje istraživanja zbog direktnog ulivanja neprečišćenih komunalnih otpadnih voda u reku Dunav.

5.1.1. Procena hroničnog toksičnog pritiska na odabranim lokalitetima

Na osnovu zvaničnih podataka mesečnog monitoringa za 2017. i 2018. godinu koji obuhvata prioritetne supstance, prioritetne hazardne supstance, nekoliko polutanata specifičnih za slivno područje Dunava i odabrane pesticide u vodi (SEPA 2018, 2019, podaci su dati u prilogu, Tabele P1-P4), procenjeno je da je hronični toksični pritisak bio viši u zaštićenoj nego u gradskoj zoni, pri čemu je doprinos organskih supstanci ukupnom toksičnom pritisku skoro zanemarljiv (Max SUM TUch org 0.03) duž celog sektora reke koji je od interesa za ovo istraživanje (Tabele 5.1; 5.3-5.8).

Tabela 5.1. Hronični toksični pritisak izračunat na osnovu zvaničnih monitoring podataka (SEPA, 2018, 2019)

		Zaštićena zona		Gradska zona
		Bezdan	Bogojevo	Novi Sad
SUM TUch				
	2017	0.4133 (0.2372-0.7659)	0.502 (0.2882-1.6786)	0.3594 (0.2280-0.6007)
	2018	0.9219 (0.22502-2.6422)	0.7489 (0.0159-2.3934)	0.3646 (0.1163-1.0479)
	Proleće 2018	0.9463 (0.5706-1.6044)	0.3178 (0.1933-0.4084)	0.4510 (0.1865-0.7222)
SUM TUch org				
	2017	0.0015 (0-0.0089)	0.0009 (0-0.0058)	0.0010 (0-0.0045)
	2018	0.0041 (0.00005-0.0201)	0.0052 (0-0.0363)	0.0022 (0-0.0092)
	Proleće 2018	0.0126 (0.0008-0.0201)	0.0027 (0.0012-0.0038)	0.0045 (0.0021-0.0092)
Broj izmerenih organskih supstanci > LOQ				
	2017	4 (0-6)	3 (0-9)	4 (0-10)
	2018	6 (1-13)	6 (0-16)	5 (0-8)
	Proleće 2018	10 (5-13)	6 (5-7)	6 (6-6)

U tabeli su prikazane srednje vrednosti izračunate na osnovu 12 (2017, 2018 godina) ili 3 (proleće 2018) merenja. Minimalne i maksimalne vrednosti izmerene u navedenim periodima se nalaze u zgradama. SUM TUch predstavlja ukupan toksični pritisak koji je izračunat kao suma hroničnih toksičnih jedinica, SUM TUch org predstavlja hronični toksični pritisak poreklom od organskih supstanci, LOQ - limit kvantitacije. Tabela je preuzeta i prevedena iz Tenji i sar., 2020.

Na osnovu detaljnijih hemijskih analiza uzoraka vode uzetih tokom JDS3 kampanje u sektoru Dunava koji pripada zaštićenom prirodnom dobru, Specijalnom rezervatu prirode Gornje Podunavlje (Bogojevo) i u urbanoj zoni (Novi Sad) (Liška i sar., 2015), uočljive su značajne razlike u izračunatom hroničnom toksičnom pritisku između ova dva lokaliteta (Tabele 5.2., 5.9.). Hronični toksični pritisak je do 2.5 puta viši u urbanoj zoni (SUM TUch 0.82 i 1.36 naspram 0.54), dok je hronični toksični pritisak poreklom od organskih supstanci (kada se izuzmu metali) do tri puta viši u urbanoj zoni (SUM TUch org 0.65 i 1.21 naspram 0.41).

Na osnovu podataka dobijenih analizom LVSPE uzoraka vode Dunava (König i sar., 2017) su takođe izračunate visoke vrednosti SUM TUch org u gradskoj zoni Novog Sada (Tabela 5.2.). Na ispustu neprečišćenih komunalnih otpadnih voda (GC) detektovano je 119 supstanci (SUM TUch org 0.82), dok su na lokalitetu 2 km uzvodno od ispusta (RL) detektovane 74 supstance (SUM TUch org 0.14), a 7 km nizvodno od Novog Sada (SU) 87 supstanci (SUM TUch org 0.15).

Tabela 5.2. Hronični toksični pritisak u reci Dunav na lokalitetima od interesa

SUM TUch izračunat na osnovu podataka iz JDS 3 kampanje (Liška i sar. 2015)	Zaštićena zona	Urbana zona	
	Bogojevo	Novi Sad 1	Novi Sad 2
SUM TUch	0.54	1.36	0.82
Br. supstanci > LOQ korišćenih za SUM TUch računanje	144	145	141
SUM TUch org	0.41	1.21	0.65
Br. Organskih supstanci > LOQ korišćenih za SUM TUch org računanje	136	137	131
SUM TUch izračunat na osnovu podataka publikovanih u König i sar. (2017)	Uzvodno od Novog Sada (RL)	Urbana zona Grad Novi Sad (GC)	Nizvodno od Novog Sada (SU)
SUM TUch org	0.14	0.82	0.15
Br.organskih supstanci > LOQ	74	119	87
Br. Organskih supstanci > LOQ korišćen za SUM TUch org računanje	68	100	77

SUM TUch predstavlja ukupni toksični pritisak koji je izračunat kao suma hroničnih toksičnih jedinica TU, SUM TUch org hronični toksični pritisak poreklom od organskih supstanci, LOQ limit kvantitacije. Tabela je preuzeta i prevedena iz Tenji i sar., 2020.

Na osnovu srednjih vrednosti TUch pojedinačnih supstanci kvantifikovanih na lokalitetu Bezdan tokom 2017. godine (SEPA, 2018) u ukupnom hroničnom toksičnom pritisku, najveći doprinos imaju metali bakar, aluminium, gvožđe i nikl, čije su prosečne godišnje TUch iznosile 2.64×10^{-1} , 7.84×10^{-2} , 4.80×10^{-2} i 4.07×10^{-2} redom (Tabela P9 u prilogu). U zavisnosti od izmerenih koncentracija supstanci, hronični toksični pritisak bakra je bio najviši tokom jula, aluminijuma i gvožđa tokom aprila, a nikla tokom januara. Ni jedna od kvantifikovanih organskih supstanci nije bila prisutna iznad limita detekcije tokom svih mesečnih merenja, dok su policiklični aromatični ugljovodonici benzo (p) i (f) fluoranten tokom januara 2017. (TUch= 3×10^{-3}), industrijska hemikalija para tert oktilfenol tokom juna (TUch= 2.04×10^{-3}) i metabolit herbicida atrazina desetilatrazin tokom decembra (TUch= 1.33×10^{-3}) imali najveći doprinos ukupnom hroničnom pritisku. Na istom lokalitetu tokom 2018. godine (SEPA, 2019) najveći doprinos ukupnom hroničnom pritisku imaju metali bakar (TUch= 6.92×10^{-1}), aluminijum (TUch= 9.64×10^{-2}), gvožđe (TUch = 7.27×10^{-2}), cink (TUch= 4.71×10^{-2}), nikl (TUch= 3.06×10^{-2}) i kobalt (TUch= 2.73×10^{-2}) i organske supstance kao što su policiklični aromatični ugljovodonici ideno (1,2,3-c,d) pien (TUch= 5×10^{-3}), benzo (b) i (k) fluoranten (TUch= 4×10^{-3}), metabolit herbicida desetilatrazin (TUch= 2.67×10^{-3}), pesticid metoksihlor (TUch= 2.50×10^{-3}) i amonijak (TUch= 1.01×10^{-2}) (Tabela P10 u prilogu). U zavisnosti od izmerenih koncentracija supstanci, pojedinačni hronični toksični pritisak bakra i kobalta je bio najviši tokom januara, aluminijuma tokom februara, gvožđa tokom jula, cinka i nikla tokom novembra. Toksični pritisak poreklom od policikličnih aromatičnih ugljovodonika ideno (1,2,3-c, d) pien, benzo (b) i (k) fluorantena i desetilatrazina je bio prisutan samo tokom aprila i maja, a metoksihlora tokom januara i februara.

Na osnovu srednjih vrednosti TUch pojedinačnih supstanci kvantifikovanih na lokalitetu Bogojevo tokom 2017. godine (SEPA, 2018) u ukupnom hroničnom toksičnom pritisku, najveći doprinos imaju metali bakar (TUch = 3.01×10^{-1}), hrom (TUch = 1.89×10^{-1}), aluminijum (TUch = 9.88×10^{-2}), gvožđe (TUch = 7.93×10^{-2}), nikl (3.66×10^{-2}), cink (2.33×10^{-2}) i kobalt (1.92×10^{-2}), a od organskih supstanci bisfenol a (TUch = 2.26×10^{-3}) (Tabela P11 u prilogu). U skladu sa izmerenim koncentracijama supstanci, toksični pritisak bakra, aluminijuma i gvožđa je bio najviši u septembru, hroma u novembru, nikla u julu, cinka u decembru, kobalta u februaru i bisfenola a u novembru. Tokom 2018. godine (SEPA, 2019) na ovom lokalitetu najveći doprinos ukupnom hroničnom toksičnom pritisku su imali metali bakar, aluminijum, cink, gvožđe, nikl i kobalt, sa srednjim vrednostima TUch 5.44×10^{-1} , 1.05×10^{-1} , 8.17×10^{-2} , 7.23×10^{-2} , 2.83×10^{-2} i 1.27×10^{-2} , navedenim redosledom, dok su policiklični aromatični ugljovodonici benzo (b) fluoranten (TUch= 8.5×10^{-3}), ideno (1,2,3-c, d) pien (TUch= 7×10^{-3}) i benzo (k) fluoranten (TUch= 5.5×10^{-3}) supstance sa najvišim izračunatim prosečnim vrednostima TUch među organskim supstancama. Na osnovu koncentracija kvantifikovanih na datom lokalitetu, najviše izračunate vrednosti TUch za bakar, gvožđe i aluminijum su bile za jul, nikl avgust, cink septembar i kobalt januar (Tabela P12 u prilogu).

U gradskoj zoni Novog Sada tokom 2017. godine (SEPA, 2018) najveći doprinos ukupnom toksičnom pritisku, kao i na lokalitetima u zaštićenoj zoni su imali metali kao što su bakar, aluminijum, gvožđe, kobalt i nikl sa srednjim vrednostima TUch 1.61×10^{-1} , 8.43×10^{-2} , 6.49×10^{-2} , 1.82×10^{-2} , 1.57×10^{-2} navedenim redosledom, dok je među organskim supstancama to industrijska supstanca para tert octylphenol (TUch= 1.64×10^{-3}) (Tabela P13 u prilogu). Na osnovu detektovanih koncentracija toksični pritisak bakra i cinka je bio tokom jula, aluminijuma tokom novembra, gvožđa tokom aprila, nikla tokom decembra i kobalta tokom februara. Para tert oktilfenol je imao najveću vrednost TUch tokom juna. Naredne, 2018. (SEPA, 2019) godine od detektovanih supstanci najveći doprinos ukupnom hroničnom toksičnom pritisku su imali metali bakar, aluminijum, gvožđe i cink sa srednjim vrednostima toksičnih jedinica 1.87×10^{-1} , 1.01×10^{-1} , 6.41×10^{-2} , 1.14×10^{-2} navedenim redosledom. Pored metala, najviša izračunata vrednost TUch je za amonijak (1.40×10^{-2}), a od organskih supstanci za supstance benzo (b) i (k) fluoranten (TUch = 3.50×10^{-3}). Vrednosti hroničnih toksičnih

jedinica su bile najviše za bakar u martu, gvožđe i aluminijum u julu, a cink u junu. Vrednost TUch za amonijak je bila najviša u junu, benzo (b) fluoranten u martu, a benzo (k) fluoranten u avgustu (Tabela P14 u prilogu). Podaci detaljnih hemijskih analiza (König i sar., 2017) ukazuju da su najveći doprinosi ukupnom hroničnom toksičnom pritisku na tri analizirana lokaliteta imali lekovi kafein, fenazon i genistein, kao i metaboliti analgetika aminopirina, N-Acetil-4-aminoantipirin i N-Formil-4-aminoantipirin (Tabela 5.3.). Na lokalitetima uzorkovanja uzvodno od Novog Sada (RL) i nizvodno (SU) najveće vrednosti TUch su imale supstance N-Acetil-4-aminoantipirin (TUch (RL)= 6.57×10^{-2} , TUch (SU)= 7.29×10^{-2}) i N-Formil-4-aminoantipirin (TUch (RL)= 5.51×10^{-2} , TUch(SU)= 5.76×10^{-2}), dok su na lokalitetu GC pored supstanci N-Acetil-4-aminoantipirin (TUch= 2.79×10^{-1}) i N-Formil-4-aminoantipirin (TUch= 1.20×10^{-1}), najveće vrednosti izračunatih TUch su imali kafein (TUch= 2.11×10^{-1}), fenazon (TUch= 1.09×10^{-1}) i genistein (TUch= 6.17×10^{-2}).

Tabela 5.3. Akutni i hronični toksični pritisak supstanci detektovanih na odabranim lokalitetima izračunat na osnovu podataka iz König i sar., 2017

Supstanca	NOEC µg/L	RL	GC	SU
		TUch		
Enalapril	3020	6.43×10^{-5}	8.70×10^{-5}	5.67×10^{-5}
1H-Benzotriazol	6989	1.91×10^{-5}	3.62×10^{-5}	1.69×10^{-5}
Metformin	23464	4.21×10^{-6}	8.52×10^{-5}	7.39×10^{-6}
4- i 5-Metil-1H-benzotriazol	4833	1.68×10^{-5}	3.01×10^{-5}	1.63×10^{-5}
Karbamazepine	241	3.07×10^{-4}	8.27×10^{-4}	3.15×10^{-4}
p-Toluenesulfonamid	13490	4.31×10^{-6}	2.91×10^{-6}	3.30×10^{-6}
N-Acetil-4-aminoantipirin	0.63	6.57×10^{-2}	2.79×10^{-1}	7.29×10^{-2}
N-Formil-4-aminoantipirin	0.63	5.51×10^{-2}	1.20×10^{-1}	5.76×10^{-2}
Trifenilfosfin oksid	5278	4.72×10^{-6}	5.53×10^{-6}	3.68×10^{-6}
Benzofenon-4	407000	4.55×10^{-8}	2.60×10^{-7}	4.67×10^{-8}
2-Naftalenesulfonska kiselina	19000	8.11×10^{-7}	6.79×10^{-7}	7.05×10^{-7}
Simazin	176	8.30×10^{-5}	6.14×10^{-5}	7.33×10^{-5}
Metoprolol	4859	2.68×10^{-6}	1.37×10^{-5}	2.63×10^{-6}
Kotinin	100	1.30×10^{-4}	4.96×10^{-3}	2.54×10^{-4}
2-Fenilfenol	389	3.03×10^{-5}	1.30×10^{-3}	1.23×10^{-5}
2,4-Dinitrofenol	444	2.64×10^{-5}	2.43×10^{-5}	2.75×10^{-5}
Tetraglim	1000000	1.10×10^{-8}	1.60×10^{-8}	1.45×10^{-8}
Fenilbenzimidazol sulfonska kiselina	617	1.59×10^{-5}	5.75×10^{-5}	1.94×10^{-5}
Tramadol	417	2.16×10^{-5}	2.88×10^{-5}	2.30×10^{-5}
4-Aminoantipirin	148	5.27×10^{-5}	9.86×10^{-4}	8.24×10^{-5}
Gabapentin	3715	1.88×10^{-6}	1.17×10^{-5}	1.13×10^{-6}
2-Hidroksikarbamazepin	347	1.96×10^{-5}	3.98×10^{-5}	1.99×10^{-5}
Sulfametoksazol	228	2.85×10^{-5}	1.77×10^{-4}	2.76×10^{-5}
Tris(2-hloroetil)fosfat	16278	3.62×10^{-7}	2.37×10^{-6}	
Diklofenak	85	6.47×10^{-5}	1.99×10^{-4}	7.29×10^{-5}
10,11-Dihidro-10-hidroksikarbamazepin	1148	4.70×10^{-6}	2.23×10^{-5}	3.92×10^{-6}
Metazahlor	637	8.48×10^{-6}	4.55×10^{-6}	6.59×10^{-6}
Izoproturon	11	4.82×10^{-4}	2.45×10^{-4}	4.27×10^{-4}
Trietilcitrata	23300	2.27×10^{-7}	1.04×10^{-5}	3.91×10^{-7}
Cetirizin	275	1.85×10^{-5}	3.71×10^{-5}	1.64×10^{-5}
Acetil-Sulfametoksazol	1820	2.75×10^{-6}	6.83×10^{-5}	3.30×10^{-6}
Terbutilazin	207	2.42×10^{-5}	1.84×10^{-5}	2.46×10^{-5}
Sulfapiridin	2066	2.37×10^{-6}	1.71×10^{-5}	2.27×10^{-6}
Etil-azinfos	2	2.30×10^{-3}		
Boskalid	362	1.27×10^{-5}	1.33×10^{-5}	1.35×10^{-5}
Karbendazim	337	1.34×10^{-5}	3.68×10^{-5}	1.19×10^{-5}
Bisfenol A	170	2.59×10^{-5}	1.71×10^{-4}	2.65×10^{-5}
Diazinon	6	7.33×10^{-4}	1.03×10^{-3}	7.33×10^{-4}
Pindolol	331	1.30×10^{-5}	1.08×10^{-4}	2.15×10^{-5}
Desetilatrazin	3	1.40×10^{-3}	1.13×10^{-3}	1.40×10^{-3}
Carbaril	51	8.04×10^{-5}	5.88×10^{-5}	7.06×10^{-5}
Bentazon	286	1.26×10^{-5}	1.57×10^{-5}	1.12×10^{-5}
Lidokain	355	9.30×10^{-6}	1.27×10^{-5}	9.30×10^{-6}
Oksazepam	355	8.73×10^{-6}	2.20×10^{-5}	8.73×10^{-6}
Hlorotoluron	1014	2.96×10^{-6}	1.97×10^{-6}	3.06×10^{-6}
Atrazin	90	3.22×10^{-5}	2.33×10^{-5}	3.11×10^{-5}
Tri(butoksietil)fosfat	4341	6.45×10^{-7}	1.01×10^{-5}	5.07×10^{-7}
Desetilterbutilazin	9	2.67×10^{-4}		2.11×10^{-4}
Metolahlor	140	1.71×10^{-5}	1.64×10^{-5}	1.64×10^{-5}
Propifenazon	7	3.29×10^{-4}	3.59×10^{-3}	3.14×10^{-4}

Genistein	5	4.60x10 ⁻⁴	6.17x10 ⁻²	1.62x10 ⁻³
Hloridazon	350	6.29x10 ⁻⁶	5.71x10 ⁻⁶	6.00E-06
Bezafibrat	4327	4.85x10 ⁻⁷	5.08x10 ⁻⁷	
Mecoprop	4683	4.48x10 ⁻⁷	4.23x10 ⁻⁶	4.06x10 ⁻⁷
Diuron	19	1.11x10 ⁻⁴	1.11x10 ⁻⁴	1.21x10 ⁻⁴
p-Nitrofenol	2146	9.32x10 ⁻⁷	3.17x10 ⁻⁶	1.91x10 ⁻⁶
Fenazon	0.25	8.00x10 ⁻³	1.09x10 ⁻¹	8.00x10 ⁻³
Butilparaben	59	3.22x10 ⁻⁵	1.89x10 ⁻³	1.86x10 ⁻⁵
Bromoxinil	297	5.72x10 ⁻⁶	5.72x10 ⁻⁶	5.72x10 ⁻⁶
Claritromicin	284	5.99x10 ⁻⁶	2.10x10 ⁻⁴	7.75x10 ⁻⁶
Prosulfokarb	74	2.16x10 ⁻⁵	2.03x10 ⁻⁵	2.30x10 ⁻⁵
DEET	10705	1.49x10 ⁻⁷	5.32x10 ⁻⁷	1.68x10 ⁻⁷
MCPA	7561	1.98x10 ⁻⁷	1.85x10 ⁻⁷	1.98x10 ⁻⁷
Fipronil	2	7.50x10 ⁻⁴	2.25x10 ⁻³	2.00x10 ⁻⁴
Acetamidiprid	1466	8.19x10 ⁻⁷	1.16x10 ⁻⁶	
Bicalutamid	490	2.04x10 ⁻⁶	4.08x10 ⁻⁶	2.24x10 ⁻⁶
Propilparaben	1064	8.46x10 ⁻⁷	5.28x10 ⁻⁵	1.50x10 ⁻⁶
Bisfenol S	2700	1.11x10 ⁻⁷	1.89x10 ⁻⁶	1.85x10 ⁻⁷
1,2-Benzisotiazolinon	104		3.39x10 ⁻⁴	2.60x10 ⁻⁵
10,11-Dihidro-10,11-dihidroksi-karbamazepin	3311		4.55x10 ⁻⁵	8.82x10 ⁻⁶
17β-estradiol	2		2.00x10 ⁻⁴	
3,5,6-Trihloro-2-piridinol	316		9.18x10 ⁻⁶	
4-Androsten-3,17-dion	1382		3.69x10 ⁻⁶	
Androsteron	912		1.24x10 ⁻⁴	2.19x10 ⁻⁶
Atenolol	570		1.86x10 ⁻⁴	3.86x10 ⁻⁶
Benzofenon-3	451		5.50x10 ⁻⁵	
Benzotiazol	7296		5.04x10 ⁻⁶	2.11x10 ⁻⁶
Kafein	19		2.11x10 ⁻¹	8.68x10 ⁻³
Hloramfenikol	1072		3.45x10 ⁻⁶	
Holna kiselina	23361		4.28x10 ⁻⁵	2.36x10 ⁻⁶
Klofibrinska kiselina	3090		4.21x10 ⁻⁷	3.88x10 ⁻⁷
Klopidogrel	95		2.11x10 ⁻⁵	
Epi-Androsteron	912		1.08x10 ⁻⁴	
Estriol	490		2.49x10 ⁻⁵	
Estron	1		3.10x10 ⁻³	2.00x10 ⁻⁴
Etilparaben	2399		2.36x10 ⁻⁵	5.00x10 ⁻⁷
Furosemid	28		9.82x10 ⁻⁴	
Heksadeciltrimetilamonium	33		4.12x10 ⁻³	
Ikaridin	4387		7.75x10 ⁻⁷	
Ketokonazol	113		3.46x10 ⁻⁴	
Ketoprofen	851		3.68x10 ⁻⁵	
Lauril dietanolamid	389		5.14x10 ⁻³	1.24x10 ⁻⁴
Lorazepam	162		3.09x10 ⁻⁵	
Medroksiprogesteron	5000		1.32x10 ⁻⁶	
Progesteron	602		1.03x10 ⁻⁵	
Propranolol	116		3.02x10 ⁻⁵	
Salicilna kiselina	14158		1.27x10 ⁻⁷	8.48x10 ⁻⁸
Sotalol	32764		1.64x10 ⁻⁶	
Terbutrin (+Prometrin)	108			9.26x10 ⁻⁶
Testosteron	125		1.04x10 ⁻⁵	
Tiaklopid	188		1.91x10 ⁻⁵	
Triklosan	26		1.12x10 ⁻⁴	
Trimetoprim	12957		1.00x10 ⁻⁶	

RL-lokalitet uzvodno od Novog Sada, GC-grad Novi Sad, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada

5.1.2. *In vitro* bioeseji u proceni efekata LVSPE uzoraka vode Dunava

Lokaliteti uzorkovanja su podrazumevali referentni lokalitet (RL), koji se nalazi 2 km uzvodno od ispusta otpadnih voda i nije pod njegovim uticajem, lokalitet pod direktnim uticajem ispusta, 265 m nizvodno od ispusta otpadnih voda (GC) i lokalitet 7 km nizvodno od ispusta (SU), koji se nalazi van gradske zone i pod uticajem industrijskih otpadnih voda. U okviru iste studije slučaja LVSPE uzorci su testirani u bateriji *in vitro* eseja, uključujući pERK1/2 esej, čiji rezultati predstavljaju deo ove disertacije.

5.1.2.1. Indukcija pERK1/2 odgovora LVSPE uzorcima vode Dunava

Uzorci vode Dunava, dobijeni LVSPE metodom uzorkovanja i frakcionacijom koja je omogućila ekstrakciju neutralnih, kiselih i baznih supstanci, u tri frakcije, su testirani ELISA pERK1/2 *in vitro* esejom (tabela 5.4.).

Generalno posmatrano, mali broj frakcija je doveo do promene u pERK1/2 odgovoru. Neutralna i kisela frakcija RL uzorka su indukovale pERK1/2 odgovor sa $EC_{IR1.5}$ vrednostima od 131 do 485, u zavisnosti od frakcije i vremena inkubacije, pri čemu je neutralna frakcija uzorka bila efektivna samo pri kraćem vremenu inkubacije. Pri tumačenju rezultata dobijenih pri tretmanu uzorkom GC, mora se uzeti u obzir činjenica da je ovaj uzorak zbog tehničkih ograničenja analiziran u nižem rasponu koncentracija u odnosu na uzorke RL i SU. Tako, kisela i bazna frakcija nisu dovele do značajne promene u pERK1/2 odgovoru pri testiranom rasponu koncentracija. S druge strane, tretman neutralnom frakcijom rezultirao je ne-monotonim dozno-zavisnim odgovorom, koji se karakteriše i stimulacijom (do 2.7 puta, 20 REF, 15 min) i inhibicijom (do 1.3 puta, 100 REF, 120 min) pERK1/2 odgovora. Ovakav tip dozno-zavisnog odgovora nije kompatibilan sa metodom izračunavanja $EC_{IR1.5}$ i $EC_{IR0.5}$ pa ove vrednosti nije bilo moguće utvrditi. Ipak, visok stepen stimulacije pERK1/2 odgovora pri relativno niskoj koncentraciji i kratkom vremenu izlaganja može se smatrati značajnim efektom. U slučaju uzorka SU, jedino neutralna frakcija je dovela do promene pERK1/2 odgovora i to do njegove indukcije pri tretmanu od 15 min ($EC_{IR1.5}=97$) i inhibicije pri tretmanu od 120 min ($EC_{IR0.5}=393$).

Posmatrano u celini, neutralna i kisela frakcija uzoraka vode ističu se kao potentnije u izazivanju promena u pERK1/2 odgovoru. Pored specifičnog odgovora neutralne frakcije GC uzorka, po potentnosti se naročito ističu neutralna frakcija uzorka SU i kisela frakcija uzorka RL koje su za oba inkubaciona vremena dovele do promena u pERK1/2 odgovoru.

Uz uzorke vode sa navedena tri lokaliteta testirani su i uzorci slepe probe procesa frakcionacije i rastvarača. Izostankom efekta slepih proba na pERK1/2 odgovor, isključena je mogućnost njihovog uticaja na odgovor indukovani uzorcima vode.

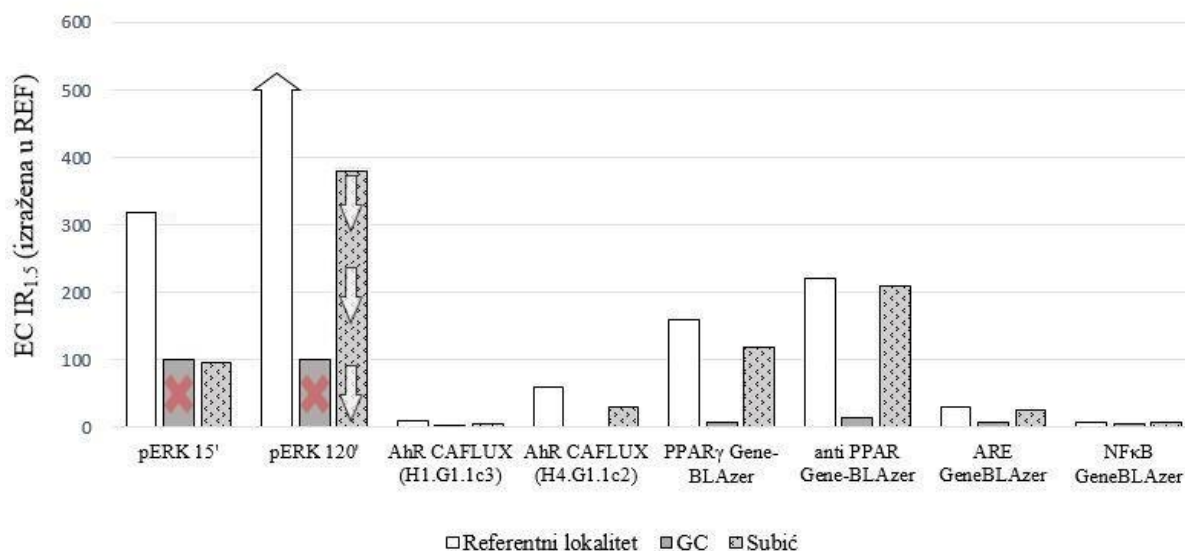
Tabela 5.4. Efektivne koncentracije LVSPE uzoraka vode Dunava izračunate na osnovu rezultata pERK1/2 *in vitro* enzimske imunoeseje

Uzorak	EC _{IR1.5}			EC _{IR0.5}
	Frakcija	15 min	120 min	120 min
Referentni lokalitet, RL (uzvodno)	Neutralna	319	>500	-
	Kisela	485	131	-
	Bazna	>500	>500	-
GC (kanalizacioni ispust)	Neutralna	Ne-monotoni dozno-zavisan odgovor; Predloženi metod za računanje EC _{IR1.5} /EC _{IR0.5} nije primenjiv		
	Kisela	>100	>100	>100
	Bazna	>100	>100	>100
Subić, SU (nizvodno)	Neutralna	97	-	393
	Kisela	>500	>500	-
	Bazna	>500	>500	-

EC_{IR1.5} – efektivna koncentracija testiranih uzoraka koja indukuje IR od 1.5, u slučaju stimulatornog efekta; EC_{IR0.5} – efektivna koncentracija testiranih uzoraka koja indukuje IR od 0.5, u slučaju inhibitornog efekta; EC vrednosti su izražene kroz REF - ekvivalent koncentracije uzorka; IR- odnos izmerenog pERK signala indukovanoog tretmanom u odnosu na bazalni pERK odgovor (u kontroli)

5.1.2.3. Osetljivost pERK1/2 *in vitro* enzimskog imunoeseja

Osetljivost primenjenog ELISA pERK1/2 eseja procenjena je poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima analize neutralne frakcije istih LVSPE uzoraka vode setom *in vitro* eseja za koje su uzorci pripremljeni prema istoj proceduri, testirani u istim koncentracijama, a $EC_{IR1.5}$ vrednosti izračunate na isti način kao u pERK1/2 eseju (König i sar., 2017). Oni uključuju eseje koji se baziraju na merenju indukcije elemenata uključenih u metabolizam ksenobiotika (AhR CAFLUX, PPAR γ GeneBLAzer, anti-PPAR γ GeneBLAzer) i elemenata adaptivnog odgovora na stres i to oksidativnog stresa (ARE GENEBlazer) i inflamacije (NFkB GeneBLAzer). Prikaz ovog poređenja predstavljen je na Slici 5.1.



Slika 5.1. Osetljivost pERK 1/2 *in vitro* enzimskog imunoeseja u odnosu na *in vitro* eseje iz König i sar., 2017.

Stubići na grafiku označavaju $EC_{IR1.5}$ za eseje pERK 1/2 (inkubaciona vremena 15 i 120 min), ARE gene blazer, NFkB Blazer, a za eseje Ahr CAFLUX, p BLAZER i antiP blazer predstavljaju EC_{10} vrednosti izračunate za neutralnu frakciju uzoraka koja je aktivnija u većini eseja u odnosu na kiselu i baznu. Kod eseja pERK1/2 stubić za referentni lokalitet sa trajanjem inkubacije od 120' je prikazan u obliku strelice jer je $EC_{IR1.5}$ viša od maksimalne testirane koncentracije koja je iznosila 500 REF. Stubići koji predstavljaju lokalitet GC u eseju pERK 1/2 za neutralnu frakciju su precrtani crvenim znakom X jer primenjenim načinom izračunavanja nije bilo moguće odrediti $EC_{IR1.5}$. Stubić koji predstavlja lokalitet Subić u eseju pERK 1/2 sa trajanjem inkubacije od 120' je prikazan sa obrnutim strelicama koje označavaju inhibiciju pERK1/2 odgovora.

Vrednosti efektivnih koncentracija koje indukuju odgovor od 1.5 u odnosu na bazalni, za oba inkubaciona vremena (15 i 120 minuta), su više u poređenju sa drugim bioesejima vezanim za metabolizam ksenobiotika i adaptivni odgovor na stres, sto ukazuje na manju osetljivost pERK1/2 eseja. Najveća razlika u osetljivosti na testirane uzorke se može uočiti između eseja pERK1/2 u trajanju od 15 minuta u poređenju sa NFkB blazer esejom iz grupe testova adaptivnih odgovora na stres, pri čemu je kod pERK1/2 eseja $EC_{IR1.5}$ 43.7 puta viša za uzorak sa RL i 11.5 puta za uzorak sa lokaliteta SU u odnosu na NFkB esej. Najmanja razlika u osetljivosti se može uočiti između pERK1/2 eseja i PPAR γ eseja i anti-PPAR blazer eseja, pri čemu je $EC_{IR1.5}$ na lokalitetu SU bila 1.3 puta viša za PPAR γ esej i 2.2 puta viša za anti-PPAR esej u odnosu na pERK1/2. U svim esejima čiji rezultati su publikovani od strane König i sar., 2017 GC uzorak je očekivano ispoljio najjači efekat. Značajan efekat neutralne frakcije ovog uzorka je potvrđen i u pERK1/2 eseju, međutim zbog prirode odgovora nije moguće poređenje dobijenih rezultata.

5.1.2.2. Povezanost detektovanih supstanci u testiranim LVSPÉ uzorcima vode sa odgovorima bioeseja

Radi identifikacije supstanci ili grupa supstanci koje doprinose indukciji pERK1/2 odgovora, efektivne koncentracije IR1.5 su korelirane, pomoću PCA analize, sa koncentracijama supstanci detektovanih detaljnim LC-HRMS hemijskim analizama uzoraka vode od strane König i sar, 2017 (Tabela 5.5.). U analizu su uključeni i rezultati *in vitro* testova kojima su uzorci takođe analizirani (König i sar., 2021). Tabelarni prikaz supstanci detektovanih u uzorcima vode sa lokaliteta RL, GC i SU i njihovih koncentracija je dat u prilogu (Tabela P5).

Tabela 5.5. Lista supstanci sa najvišim koeficijentom korelacije u odnosu na pERK1/2 odgovor

Supstance	Vrednosti koeficijenata korelacije								Način delovanja	Upotreba
	ELISA pERK1/2		König i sar, 2017							
	15'	120'	AhR CAFLUX (H1.G1.1c3)	AhR CAFLUX (H4.G1.1c2)	PPAR γ Gene-BLAzer	anti PPAR Gene-BLAzer	ARE Gene-BLAzer	NF κ B Gene-BLAzer		
p-Toluenesulfonamid	0.960	0.961	0.990	0.699	0.870	0.745	0.839	0.457	nepoznat	Industrijska
2-Naphthalensulfonska kiselina	0.980	0.981	0.975	0.756	0.826	0.687	0.790	0.381	nepoznat	Industrijska
2-Benzotiazolsulfonska kiselina	0.735	0.739	0.950	0.309	0.998	0.964	0.993	0.804	nepoznat	Industrijska
Simazin	0.828	0.831	0.986	0.447	0.979	0.913	0.965	0.707	inhibicija fotosinteze	Pesticid
Metazahlor	0.848	0.851	0.991	0.480	0.971	0.897	0.955	0.680	inhibicija biosinteze sterola	Pesticid
Izoproturon	0.670	0.674	0.917	0.220	0.999	0.984	1.000	0.855	inhibicija fotosinteze	Pesticid
Etil-azinfos *	1.000	1.000	0.915	0.866	0.704	0.537	0.660	0.200	neuroaktivna	Pesticid
Karbaril	0.832	0.835	0.987	0.454	0.977	0.910	0.963	0.701	neuroaktivna	Pesticid
Hlorotoluron	0.416	0.421	0.755	-0.082	0.943	0.992	0.961	0.971	inhibicija fotosinteze	Pesticid
Atrazin	0.587	0.591	0.869	0.115	0.990	0.997	0.997	0.906	inhibicija fotosinteze	Pesticid
Metolahlor *	1.000	1.000	0.915	0.866	0.704	0.537	0.660	0.200	mitoza, ćelijski ciklus	Pesticid
Hloridazon	0.860	0.863	0.994	0.500	0.965	0.887	0.947	0.663	inhibicija fotosinteze	Pesticid
Terbutilazin-2-hidroksi	0.567	0.571	0.857	0.091	0.986	0.999	0.994	0.916	inhibicija fotosinteze	Metabolit pesticida
Desetilterbutilazin	0.652	0.656	0.907	0.197	0.998	0.988	1.000	0.867	inhibicija fotosinteze	Metabolit pesticida

PCA analiza je urađena u XLSTAT (Microsoft Office paket, Excel dodatak) radi provere postojanja korelacije između odgovora biotestova i 125 hemikalija detektovanih u uzorcima vode na lokalitetima RL, GC, SU (podaci hemijskih analiza i odgovora biotestova su preuzeti iz König i sar., 2017 ($R > 0.6$). Pearsonovi korelacioni koeficijenti su između svih izmerenih vrednosti i varijabli (rezultata biotestova) sa nivoom značajnosti $p \leq 0.05$, $*-p \leq 0.05$. Boldovane vrednosti označavaju najviše stepene korelacije.

Uopšteno, nizak nivo korelacije je uočen između pERK1/2 odgovora i detektovanih supstanci. Od 125 supstanci uključenih u analizu, korelacije koje su imale Pearsonov korelacioni koeficijent $R > 0.6$ su dobijene sa manje od 15 supstanci. Najviši nivo korelacije je utvrđen sa pesticidima različitih načina delovanja dok je iznenađujuće veliki broj supstanci pokazao negativnu korelaciju sa odgovorom eseja.

U okviru projekta „Solutions” pomenuti uzorci su testirani i u bateriji *in vitro* biotestova za procenu specifičnih načina delovanja uzoraka poput endokrinih ometača od strane König i sar., 2017; Hashmi i sar., 2018, 2020 i Serra i sar., 2020.

Rezultati ELISA pERK1/2 testa će biti prodiskutovani u širem kontekstu svih dobijenih rezultata u okviru Solutions projekta poglavlju 6. Diskusija.

5.1.3. Kavezni sistem izlaganja - *C. carpio*

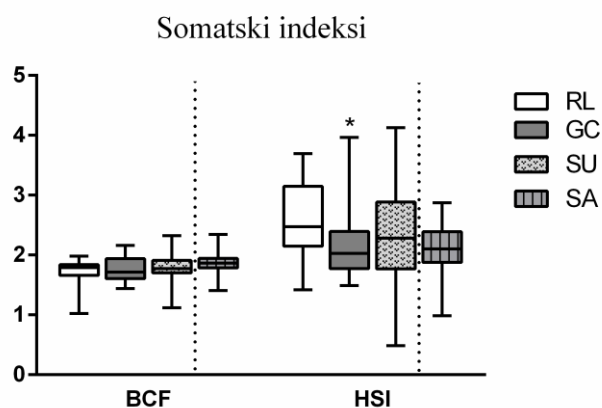
U okviru studije slučaja Novi Sad, jedinke vrste *C. carpio*, slične starosti, među kojima su bila zastupljena oba pola, su izložene u kavezima na tri lokaliteta u reci Dunav (referentni lokalitet-RL, ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada-GC i nizvodno od ispusta-SU). Pored navedena tri lokaliteta, jedinke *C. carpio* su kavezno izložene dodatno na jednom lokalitetu u reci Sava, nizvodno od grada Šapca-SA (prethodno opisano u poglavlju 3.).

5.1.3.1. Biometrijski parametri jedinki *C. carpio*

Vrednosti kondicionog faktora jedinki *C. carpio*, nakon kaveznog izlaganja na odabranim lokalitetima su prikazane na slici 5.2. Srednje vrednosti kondicionog faktora se nisu značajno razlikovale između posmatranih lokaliteta, pri čemu su i varijacije u okviru grupa bile ujednačene. Srednja vrednost BCF grupe jedinki koje su žrtvovane pre početka devetodnevno izlaganja se takođe nije značajno razlikovala u odnosu na ostale grupe (srednje vrednosti BCF svih grupa sa standardnim devijacijama su prikazane u tabeli P18 u prilogu).

Razlike između srednjih vrednosti hepatosomatskog indeksa jedinki izloženih na odabranim lokalitetima su bile veće, pri čemu je najviša vrednost uočena kod jedinki sa referentnog lokaliteta. Vrednost HSI jedinki sa lokaliteta GC je značajno niža (19%) u odnosu na grupu jedinki sa referentnog lokaliteta.

Vrednosti kondicionog faktora i hepatosomatskog indeksa grupe jedinki izloženih na lokalitetu SA se ne razlikuju značajno u odnosu na grupe jedinki koje su bile izložene na odabranim lokalitetima u Dunavu.



Slika 5.2. Somatski indeksi kod četiri grupe *C. carpio* nakon izlaganja na odabranim lokalitetima.

BCF-telesni kondicioni faktor, HIS-hepatosomatski indeks, RL-referentni lokalitet, GC-lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU-lokalitet nizvodno od kanalizacionog ispusta (Subić), SA-lokalitet u Savi, nizvodno od Šapca. Na stubićima grafika su prikazane medijane, interkvartilni opsezi, minimalne i maksimalne vrednosti N=20 jedinki (sve grupe). Zvezdica označava statistički značajnu razliku između grupe jedinki sa lokaliteta GC u odnosu na RL, na osnovu Kruskal-Wallis testa. Nivoi značajnosti je * $p \leq 0.05$.

5.1.3.2. Aktivnost enzima u jetri i mozgu *C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja

Rezultati eseja enzimskih aktivnosti u uzorcima tkiva jetre i mozga *C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja su prikazani na Slici 5.3.

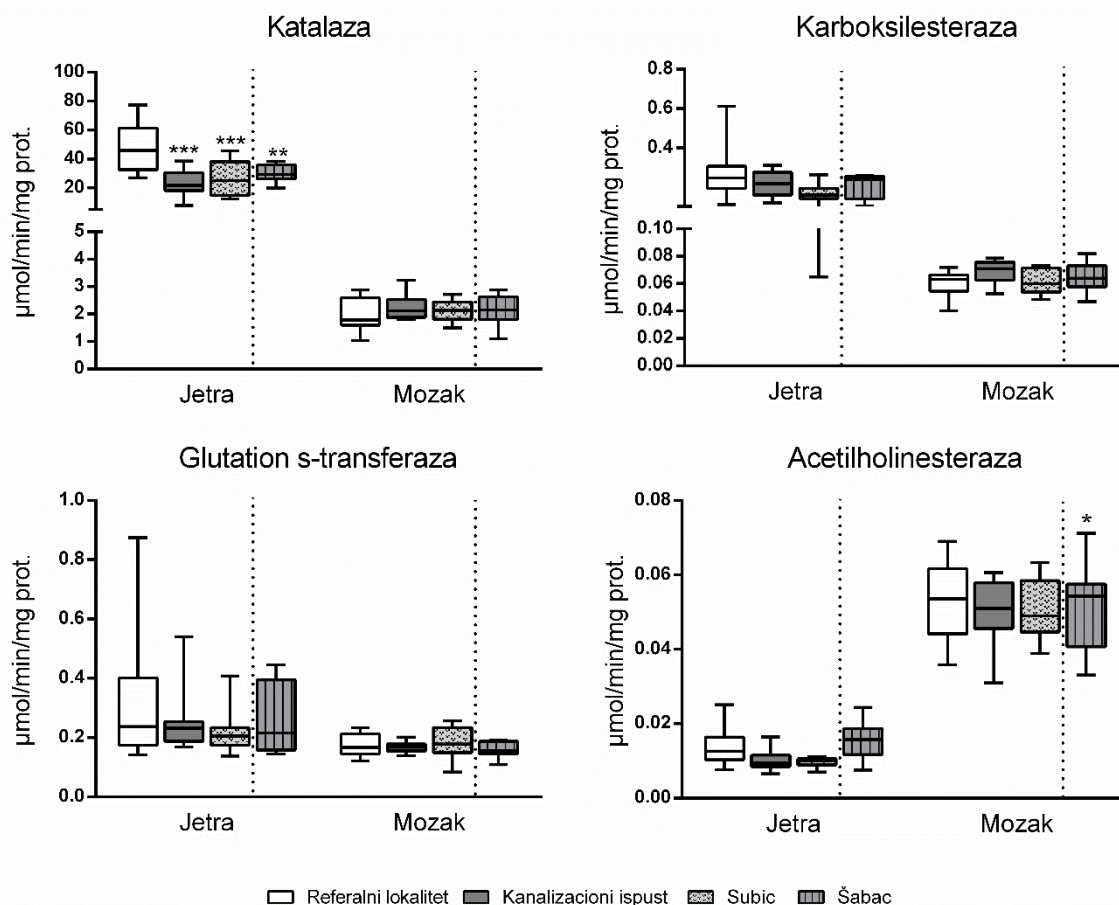
Najviša konstitutivna aktivnost među analiziranim enzimima u oba tkiva je izmerena za enzim antioksidativne zaštite, katalazu (CAT). Među svim rezultatima, naročito se ističe smanjena aktivnost enzima CAT u jetri *C. carpio* sa GC, SU i SA lokaliteta u poređenju sa RL, sa izuzetno izraženim nivoom značajnosti. Najniža aktivnost, 52.6% niža u odnosu na RL, detektovana je u jetri riba sa lokaliteta GC. Aktivnost katalaze u jetri riba sa lokaliteta SA je statistički značajno niža (za 37.7%) u odnosu na lokalitet RL, dok razlike u odnosu na druga dva lokaliteta u Dunavu nisu značajne. Razlike u aktivnosti katalaze u mozgu jedinki sa upoređenih lokaliteteta su bile manje, bez statistički značajnih razlika.

Konstitutivna aktivnost enzima metabolizma ksenobiotika je bila viša u uzorcima tkiva jetre u odnosu na uzorke tkiva mozga. Srednja vrednost aktivnosti enzima karboksilesteraze (CES) je bila najviša u uzorcima jetre jedinki sa referentnog lokaliteta, 37% viša u odnosu na lokalitet SU, na kom je srednja vrednost aktivnosti enzima CES bila najniža. U uzorcima tkiva mozga sa različitih lokaliteta aktivnost CES je ujednačenija, pri čemu su se najviše razlikovali uzorci sa lokaliteta RL, sa najnižom srednjom vrednosti aktivnosti, i GC, na kom je aktivnost CES bila najviša (za 12.9 % viša u odnosu na RL).

Aktivnost enzima GST u uzorcima tkiva jetre je imala najvišu srednju vrednost na referentnom lokalitetu, dok je najniža vrednost, na lokalitetu SU bila 32.3 % niža u odnosu na RL, iako bez statističke značajnosti. Na lokalitetu SA je aktivnost GST bila ujednačena sa lokalitetom GC, pri čemu je srednja vrednost na ova dva lokaliteta bila 19.2% niža u odnosu na RL. U tkivu mozga aktivnost je bila ujednačenija između poređenih lokaliteta u odnosu na tkivo jetre. Razlika između uzorka koji je imao najvišu srednju vrednost aktivnosti GST (SU) i uzorka sa najnižom vrednosti (GC) je bila 8%. Na lokalitetu SA je srednja vrednost aktivnosti GST bila niža u odnosu na lokalitete u Dunavu, ali bez statistički značajnih razlika, pri čemu je najveća razlika detektovana u odnosu na lokalitet SU iznosila je 12.7%.

Enzim AChE je imao najnižu konstitutivnu aktivnost u odnosu na ostale analizirane enzime, pri čemu su vrednosti bile više u mozgu. U uzorcima tkiva jetre najviša srednja vrednost aktivnosti je zabeležena na referentnom lokalitetu, dok je najniža vrednost bila na lokalitetu SU. Razlike u aktivnosti AChE u uzorcima tkiva jetre riba koje su bile kavezno izložene na lokalitetima u Dunavu nisu bile statistički značajne, pri čemu je razlika između lokaliteta sa najvišom vrednosti (RL) i lokaliteta sa najnižom vrednosti (SU) bila 29.6%. U poređenju sa lokalitetima u Dunavu, aktivnost AChE u uzorcima tkiva jetre riba sa lokaliteta SA je bila viša, pri čemu su je razlika bila statistički značajna u odnosu na lokalitete GC i SU. Aktivnost AChE u uzorcima tkiva mozga je bila ujednačena između poređenih lokaliteta i razlikovala se manje od 5.5%.

Sveobuhvatno posmatrano, aktivnost merenih enzima pokazuje tendenciju smanjenja u tkivima jedinki koje su u kaveznom eksperimentu bile postavljene na lokalitetima sa izraženim antropogenim uticajem i u uslovima većeg hemijskog stresa (GC, SU, SA) u odnosu na referentni lokalitet. Ove razlike su u većoj meri detektovane u uzorcima jetre, dok su u uzorcima mozga manje izražene.



Slika 5.3. Aktivnosti enzima izmerene u tkivu jetre i mozga četiri grupe *C. carpio* koje su bile izložene na odabranim lokalitetima.

RL-referentni lokalitet, GC-lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU-lokalitet nizvodno od kanalizacionog ispusta (Subić), SA-lokalitet u reci Sava, nizvodno od Šapca. Na stubićima grafika su prikazane medijane, interkvartilni opsezi, minimalne i maksimalne vrednosti N=10 jediniki (sve grupe). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između grupe u odnosu na lokalitet RL na osnovu Kruskal-Wallis testa sa Dunn's post hoc testom (aktivnosti AChE, CES i GST u jetri) ili jednosmerne Anova sa Holm Sidak's post hoc testom (aktivnosti AChE, CAT, CES, GST u mozgu i CAT u jetri) u zavisnosti od normalnosti distribucije podataka. Nivoi značajnosti su * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ i *** $p \leq 0.001$

5.1.3.3. Genska ekspresija u jetri i mozgu *C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja

Ekspresija 19 gena je analizirana u uzorcima tkiva jetre ili mozga jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na odabranim lokalitetima u Dunavu i Savi pomoću RQ-PCR analize. Prikaz rezultata ekspresije gena je grupisan na osnovu fizioloških odgovora u kojima dati geni učestvuju (slike 5.4.-5.7.), a rezultati će biti komentarisani na osnovu poređenih srednjih vrednosti genske ekspresije izračunatih za svaki lokalitet. Nivo ekspresije gena analiziranih u tkivu jetre predstavlja srednju vrednost izračunatu za 20 jedinki *C. carpio* po lokalitetu, a nivo ekspresije gena analiziranih u tkivu mozga srednju vrednost za 10 jedinki *C. carpio* po lokalitetu.

Nivo konstitutivne ekspresije analiziranih gena je bila različit. Najviše vrednosti ekspresije su uočene kod gena *cox1*, dok je gen *vtg* imao najnižu konstitutivnu ekspresiju.

5.1.3.3.1 Ekspresija gena biomarkera opšteg stresa

Ekspresija gena, koji predstavljaju biomarkere opšteg stresa, analizirana u uzorcima tkiva jetre jedinki *C. carpio* je prikazana na slici 5.4.

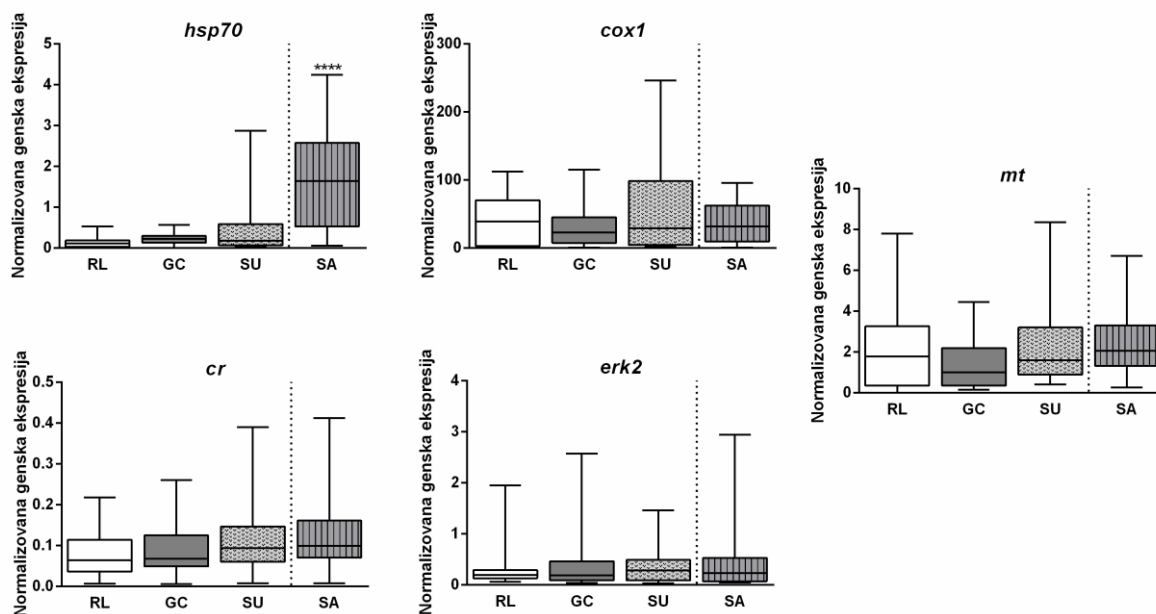
Ekspresija gena *hsp70* je bila najniža na RL, dok je na lokalitetima GC i SU bila viša 1.4 i 3.87 puta (navedenim redom), ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Lokalitet SA je imao statistički značajno višu vrednost ekspresije u odnosu na sva tri lokaliteta u Dunavu, a najveća razlika se može uočiti u odnosu na referentni lokalitet, od kog je viša 11.3 puta.

Ekspresija gena *cox1* je bila najviša na lokalitetu SU, 1.6 puta viša u odnosu na RL i 1.87 puta u odnosu na GC, ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Ekspresija istog gena na lokalitetu SA je ujednačena sa lokalitetom RL i 1.6 puta niža u odnosu na lokalitet SU.

Gen *cr* je imao najnižu vrednost ekspresije na lokalitetu RL, koja je bila 1.4 puta niža u odnosu na lokalitet SU, sa najvišom vrednošću ekspresije od tri poređena lokaliteta u Dunavu. Na lokalitetu SA je ekspresija *cr* bila viša u odnosu na lokalitete u Dunavu, pri čemu se se razlikovala najviše, 1.6 puta u odnosu na lokalitet RL ali bez statističke značajnosti. Najviša i statistički značajna razlika je bila 1.6 puta u odnosu na lokalitet RL. Odvojenom analizom ekspresije *cr* kod mužjaka i ženki u uzorcima tkiva mužjaka sa lokaliteta SA je ekspresija bila statistički značajno viša u odnosu na referentni lokalitet, dok se uzorci sa ostalih lokaliteta nisu značajno razlikovali. Mere centralne tendencije i varijabilnosti za gene opšteg odgovora na stres, analizirane odvojeno po polovima su date u prilogu, tabela P20.

Ekspresija gena *erk2* je bila najniža na lokalitetu RL. Ova vrednost je bila 1.3 puta niža u odnosu na lokalitet GC, koji je bio lokalitet sa najvišom zabeleženom ekspresijom od tri upoređena lokaliteta u Dunavu. Ekspresija istog gena na lokalitetu SA je bila viša u odnosu na tri lokaliteta u Dunavu, ali bez statistički značajne razlike, pri čemu je najviša razlika zabeležena u odnosu na lokalitet RL, 1.4 puta.

Kod gena *mt* najniža vrednost ekspresije se može uočiti na lokalitetu GC, dok je na ostalim lokalitetima zabeležena ekspresija približnog nivoa. Ekspresija na lokalitetu GC je 1.6 puta niža u odnosu na lokalitet RL i 1.8 puta u odnosu na lokalitet SU. Ekspresija istog gena na lokalitetu SA je bila slična ekspresiji na referentnom lokalitetu u Dunavu, pri čemu ni jedna od navedenih razlika nije bila statistički značajna.



Slika 5.4. Ekspresija gena koji predstavljaju biomarkere opšteg stresa, u tkivu jetri jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na odabranim lokalitetima.

Genska ekspresija je određena pomoću RQ-PCR analize. RL-referentni lokalitet, GC-lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU-lokalitet nizvodno od kanalizacionog ispusta (Subić), SA-lokalitet u Savi, nizvodno od Šapca. *hsp 70*- protein toplotnog šoka 70, *cox1*- citohrom oksidaza subjedinica 1, *cr*- receptor za kortizol, *erk2*- ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 2, *mt*- metalotioneini. Na stubičima grafika su prikazane medijane, interkvartilni opsezi, minimalne i maksimalne vrednosti N=20 jedinki (sve grupe). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između grupe u odnosu na lokalitet RL na osnovu Kruskal-Wallis testa sa Dunn's post hoc testom. Nivo značajnosti je**** $p \leq 0.001$

5.1.3.3.2. Ekspresija gena hormonske regulacije

Ekspresija gena uključenih u hormonsku regulaciju, koji se koriste kao biomarkeri efekta ksenobiotika sa hormonskom aktivnošću je analizirana odvojeno kod mužjaka i ženki, a uočene razlike između grupa jedinki koje su bile kavezno izložene na odabranim lokalitetima nisu bile statistički značajne (Slika 5.5.).

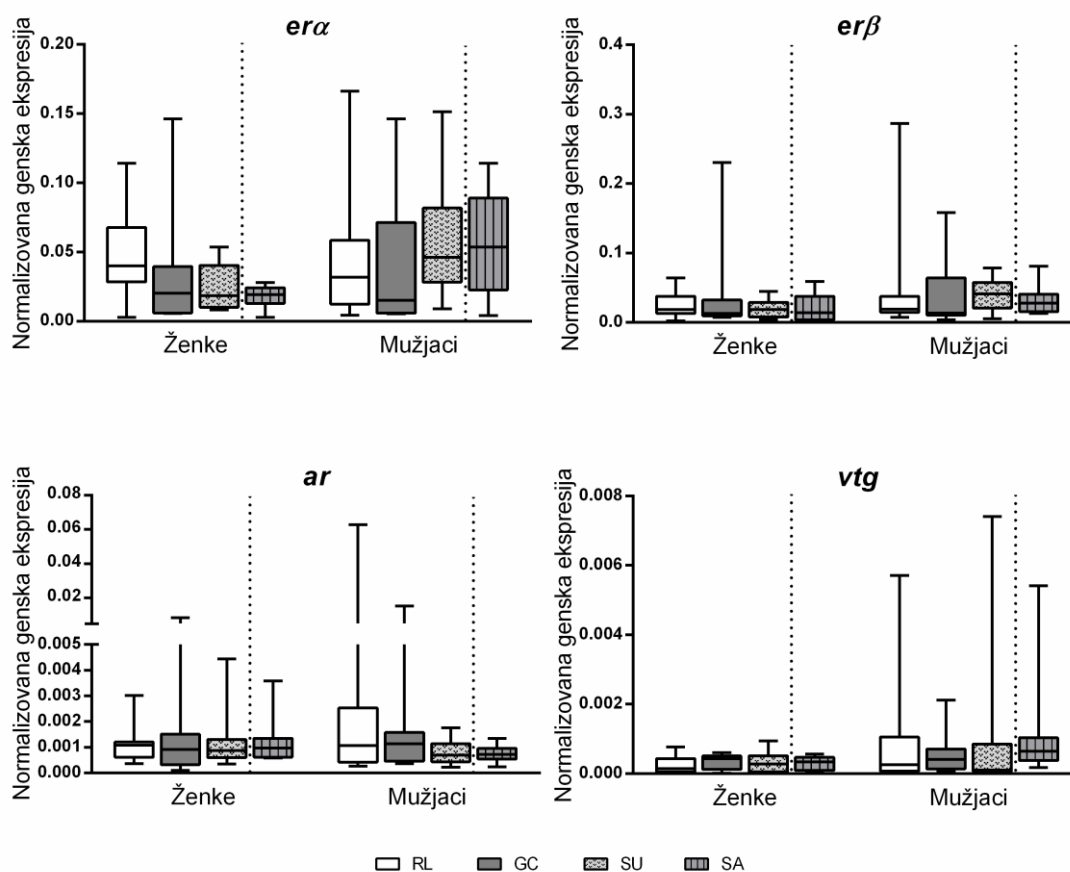
Ekspresija gena *era* kod ženki *C. carpio* je bila najviša na referentnom lokalitetu, a 1.9 puta niža na lokalitetu SU, gde je bila najniža ekspresija od poređenih lokaliteta u Dunavu. Lokalitet SA je imao nižu ekspresiju u odnosu na sva tri lokaliteta u Dunavu, pri čemu je razlika u odnosu na referentni lokalitet bila 2.7 puta. Kod mužjaka je ekspresija *era* gena bila ujednačena na lokalitetima RL i GC, dok je na lokalitetu SU bila viša 1.2 puta. Ekspresija istog gena kod mužjaka na lokalitetu SA je bila viša u odnosu na lokalitete u Dunavu, pri čemu je u odnosu na lokalitete RL i GC bila viša 1.3 puta.

Ekspresija gena *erβ* kod ženki *C. carpio* kavezno izloženih na lokalitetima u Dunavu je bila najniža u uzorcima sa lokaliteta SU, u kojima je ekspresija bila 1.3 puta niža u odnosu na RL i 1.9 puta u odnosu na GC. Ekspresija *erβ* kod ženki na lokalitetu SA je bila približna ekspresiji na lokalitetu SU, a duplo niža u odnosu na lokalitet GC. Kod mužjaka *C. carpio* najviša ekspresija je uočena na referentnom lokalitetu, dok je na lokalitetima GC i SU ekspresija bila 1.2 puta niža. Na lokalitetu SA genska ekspresija istog gena kod mužjaka je bila niža u odnosu na lokalitete u Dunavu, pri čemu je bila 1.4 puta niža u odnosu na RL i 1.2 puta u odnosu na GC i SU.

Ekspresija gena koji kodira androgeni receptor, *ar* kod ženki kavezno izloženih jedinki *C. carpio* je bila najviša u uzorcima sa lokaliteta GC. Ova vrednost je bila 1.4 puta viša u odnosu

na lokalitete RL i SU koji su bili ujednačeni. Visina vrednosti ekspresije *ar* na lokalitetu SA kod ženki je bila ujednačena sa lokalitetima RL i SU u Dunavu. Kod mužjaka je ekspresija *ar* bila najviša na referentnom lokalitetu, dok je na lokalitetima GC i SU bila niža 4.3 i 14 puta (redom kojim su navedeni). Na lokalitetu SA kod mužjaka *C. carpio* ekspresija *ar* je bila niža u odnosu na lokalitete u Dunavu, pri čemu je najveća razlika bila u odnosu na lokalitet RL, 14.6 puta.

Ekspresija gena *vtg* kod ženki *C. carpio* je bila relativno ujednačena u uzorcima sa svih poređenih lokaliteta. Najveća razlika je uočena između lokaliteta SU koji je imao najvišu vrednost ekspresije i 1.3 puta niže vrednosti koja je zabeležena u grupi jedinki sa referentnog lokaliteta na kom je vrednost ekspresije bila najniža od svih poređenih lokaliteta. Ekspresija istog gena na lokalitetu SA je bila 1.2 puta viša u odnosu na lokalitet RL u Dunavu. Kod mužjaka *C. carpio* je uočena ujednačena vrednost ekspresije *vtg* na lokalitetima RL i SU, dok je na lokalitetu GC vrednost ekspresije bila 1.7 puta niža u odnosu na prethodno navedena dva. Kod mužjaka na lokalitetu SA, ekspresija istog gena je bila viša nego na lokalitetima u Dunavu, 1.2 puta u odnosu na lokalitet RL i SU, dok je u odnosu na lokalitet GC bila 1.9 puta viša.



Slika 5.5. Ekspresija gena endokrine regulacije u jetri jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na odabranim lokalitetima.

Genska ekspresija je određena pomoću RQ – PCR analize. RL – referentni lokalitet, GC – lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU – lokalitet nizvodno od kanalizacionog ispusta (Subić), SA – lokalitet u Savi, nizvodno od Šapca. *era*- estrogini receptor α , *erb*- estrogini receptor β , *ar*-androgeni receptor, *vtg*- vitelogenin. Na stubićima grafika su prikazane medijane, interkvartilni opsezi, minimalne i maksimalne vrednosti Nženki=9 jedinki (RL), Nženki=11 (GC), Nženki=9 (SU), Nženki=8 (SA), Nmužjaka=11(RL), Nmužjaka=9 (GC), Nmužjaka=11(SU), Nmužjaka=12 (SA). Statistička značajnost razlika između grupe u odnosu na lokalitet RL je određena na osnovu Kruskal-Wallis testa sa Dunn's post hoc testom.

5.1.3.3.3. Ekspresija gena koji učestvuju u autofagiji i imunom odgovoru

Ekspresija gena koji učestvuju u autofagiji i imunom odgovoru, analizirana u uzorcima mozga jedinki *C. carpio* kavezno izloženim na odabranim lokalitetima je prikazana na slici 5.6.

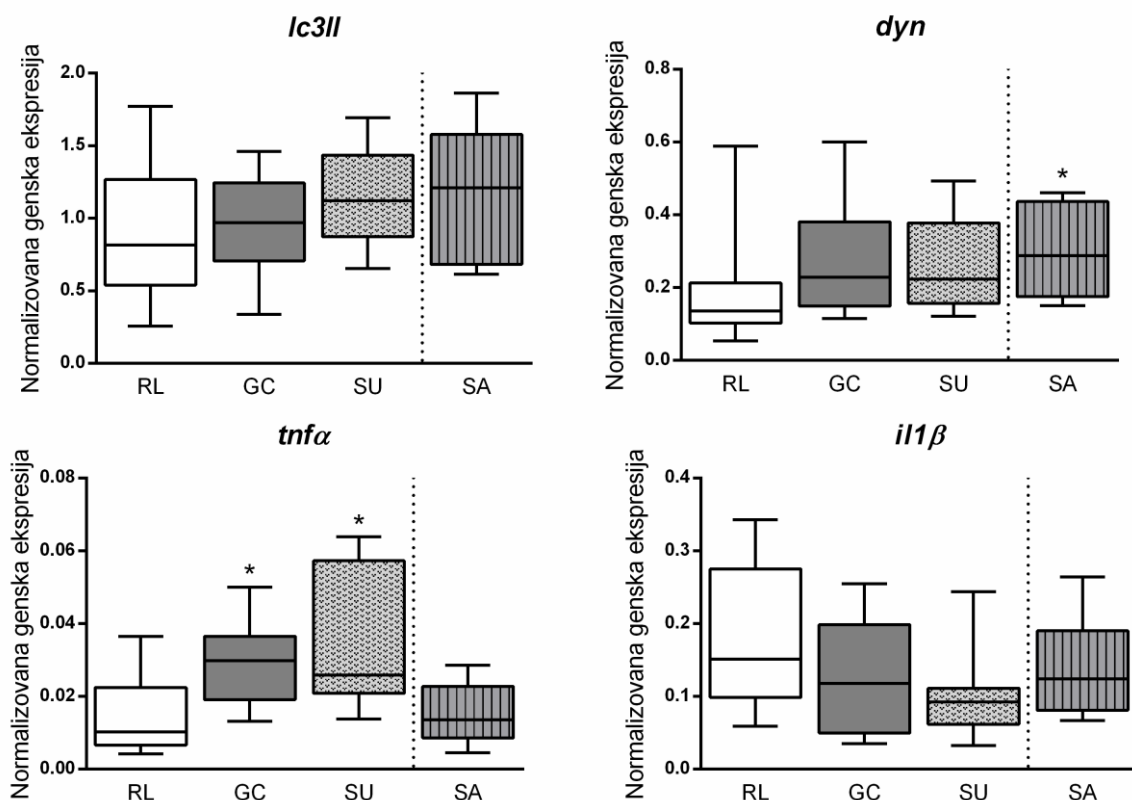
Ekspresija gena *lc3II* na poređenim lokalitetima u Dunavu je bila najviša u uzorcima sa lokaliteta SU, pri čemu je bila 1.5 puta viša u odnosu na referentni lokalitet i 1.2 u odnosu na lokalitet GC. Ekspresija *lc3II* gena na lokalitetu SA je bila viša u odnosu na lokalitete RL i GC u Dunavu, a ujednačena sa lokalitetom SU. Navedene razlike nisu bile statistički značajne.

Ekspresija gena *dyn* je takođe bila najniža na referentnom lokalitetu u Dunavu, dok su lokaliteti GC i SU bili ujednačeni, sa 1.4 puta višom vrednošću ekspresije u odnosu na RL. Ekspresija istog gena kod jedinki na lokalitetu SA je bila viša u odnosu na lokalitete u Dunavu, i statistički značajno viša (1.6 puta) u odnosu na referentni lokalitet.

Među poređenim lokalitetima u Dunavu ekspresija gena *tnfa* je bila najniža na referentnom lokalitetu, dok je na lokalitetima GC i SU bila statistički značajno viša 2 i 2.3 puta (navedenim redom). Ekspresija istog gena na lokalitetu SA je bila ujednačena sa lokalitetom RL, a takođe statistički značajno niža 2 i 2.3 puta u odnosu na lokalitete GC i SU (navedenim redom).

Ekspresija gena *illβ* je bila najviša na referentnom lokalitetu, ali se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na ostale lokalitete, pri čemu je razlika u odnosu na lokalitet SU, na kom je ekspresija *illβ* bila najniža, iznosila 1.8 puta. Ekspresija istog gena na lokalitetu SA je 1.3 puta niža u odnosu na lokalitet RL, ujednačenog nivoa ekspresije sa lokalitetom GC i viša 1.4 puta u odnosu na lokalitet SU.

Sveobuhvatno posmatrano, prisutna je tendencija povećanja nivoa ekspresije gena iz ove grupe (*lc3II*, *dyn*, *tnfa*) u mozgu jedinki koje su u kaveznom eksperimentu bile postavljene na lokalitetima sa izraženim antropogenim uticajem i u uslovima većeg hemijskog stresa (GC, SU, SA) u odnosu na referentni lokalitet. Izuzetak je ekspresija gena *illβ*, gde rezultati ukazuju na tendenciju smanjenja nivoa ekspresije na lokalitetima GC, SU i SA u odnosu na RL.



Slika 5.6. Ekspresija gena autofagije i imunog odgovora u tkivu mozga jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na odabranim lokalitetima.

Genska ekspresija je određena pomoću RQ-PCR analize. RL – referentni lokalitet, GC – lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU – lokalitet nizvodno od kanalizacionog ispusta (Subić), SA – lokalitet u Savi, nizvodno od Šapca. *lc3II*- laki lanac 3 proteina mikrotubula, *dyn*- dinein, *tnfa*- faktor nekroze tumora α , *il1b*- interleukin β Na stubićima grafika su prikazane medijane, interkvartilni opsezi, minimalne i maksimalne vrednosti N=10 jedinki (sve grupe). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između grupe u odnosu na lokalitet RL na osnovu Kruskal-Wallis testa sa Dunn's post hoc testom (*dyn*, *tnfa*, *il1b*) ili jednosmerne Anova sa Holm Sidak's post hoc testom (*lc3II*) u zavisnosti od normalnosti distribucije podataka. Nivo značajnosti je* $p \leq 0.05$

5.1.3.3.4. Ekspresija gena biomarkera neurotoksičnosti

Ekspresija gena biomarkera neurotoksičnosti u mozgu jedinki *C. carpio* je prikazana na slici 5.7. Analizom ekspresije odabranih gena, izuzev *mbp*, uočen je trend povećanja nivoa ekspresije na lokalitetima sa izraženim antropogenim uticajem u odnosu na referentni lokalitet.

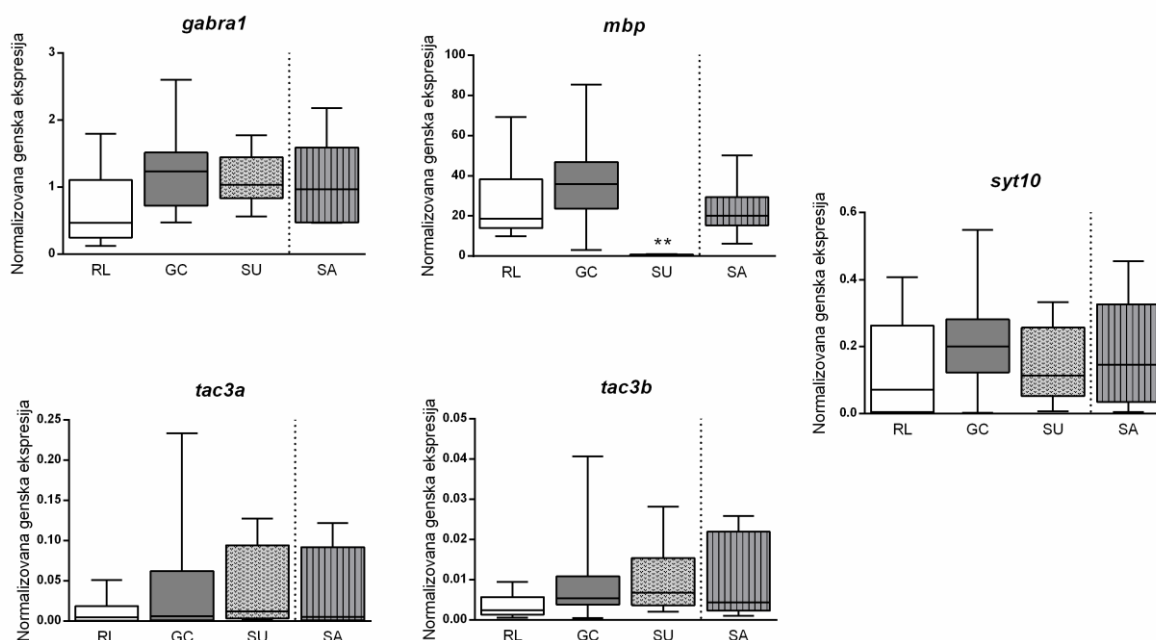
Ekspresija gena *gabral* je na lokalitetu RL bila niža u odnosu na lokalitete GC i SU 1.9 i 1.7 puta (navedenim redom). Na lokalitetu SA ekspresija istog gena je bila viša 1.6 puta u odnosu na lokalitet RL, dok je u odnosu na lokalitet GC bila niža 1.2 puta i približne vrednosti ekspresije u odnosu na lokalitet SU. Navedene razlike nisu bile statistički značajne.

Kod gena *mbp* najviši nivo ekspresije je uočen na lokalitetu GC, dok je na lokalitetu SU bio iznenađujuće nizak. Ekspresija navedenog gena na lokalitetu SU je bila statistički značajno niža, 56.3 i 77.2 puta, u odnosu na referentni lokalitet i lokalitet GC (navedenim redom). Na lokalitetu SA ekspresija gena *mbp* je bila niža 1.5 i 1.6 puta u odnosu na lokalitete RL i GC (navedenim redom), dok je u odnosu na lokalitet SU bila statistički značajno viša, 49.1 puta.

Geni koji kodiraju tahikinine 3a i 3b su imali sličan obrazac ekspresije na poređenim lokalitetima. Ekspresija gena *tac3a* je bila najniža u uzorcima sa lokaliteta RL i 3.2 puta viša na lokalitetima GC i SU, gde je vrednost ekspresije bila ujednačena. Na lokalitetu SA je

ekspresija bila 2.8 puta viša u odnosu na lokalitet RL i 1.2 puta niža u odnosu na lokalitete GC i SU. Gen *tac3b* je bio takođe najniže eksprimiran na lokalitetu RL i 2.6 i 2.8 puta više na lokalitetima GC i SU (navedenim redom). Na lokalitetu SA, ekspresija navedenog gena je bila 2.7 puta viša u odnosu na referentni lokalitet i ujednačena sa lokalitetima GC i SU. Navedene razlike nisu bile statistički značajne.

Ekspresija gena *syt10* je bila najviša na lokalitetu GC, dok je na lokalitetima RL i SU ekspresija bila niža 1.7 i 1.5 puta (navedenim redom). Na lokalitetu SA ekspresija istog gena je bila viša 1.4 u odnosu na referentni lokalitet u Dunavu i 1.2 puta u odnosu na lokalitet SU, dok je u odnosu na lokalitet GC ekspresija bila niža 1.2 puta. Navedene razlike nisu bile statistički značajne.



Slika 5.7. Ekspresija gena, biomarkera neurotoksičnosti, u tkivu mozga jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na odabranim lokalitetima.

Genska ekspresija je određena pomoću RQ-PCR analize. RL – referentni lokalitet, GC – lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU – lokalitet nizvodno od kanalizacionog ispusta (Subić), SA – lokalitet u Savi, nizvodno od Šapca. *gabra1*- receptor gama amino buterne kiseline α *mbp*-bazični protein mijelina, *tac3a*-tahikinin 3a, *tac3b*-tahikinin 3b, *syt10*-sinaptotagmin 10. Na stubićima grafika su prikazane medijane, interkvartilni opsezi, minimalne i maksimalne vrednosti. N=10 jedinki (sve grupe). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između grupe u odnosu na lokalitet RL na osnovu Kruskal-Wallis testa sa Dunn's post hoc testom ili jednosmernom Anova sa Holm Sidak's post hoc testom (u slučaju *gabra1*).

5.1.3.4. Tkivni sadržaj supstanci kod jedinki *C. carpio* nakon kaveznog izlaganja na odabranim lokalitetima

U okviru projekta Solutions u uzorcima seruma i mišićnog tkiva jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na odabranim lokalitetima i grupe jedinki žrtvovanih pre kaveznog izlaganja analizirane su koncentracije 136 supstanci pomoću LC-HRMS metode, od kojih su pojedine detektovane nakon izlaganja na odabranim lokalitetima u Dunavu. U tabelama 5.6. i 5.7. su prikazane supstance koje su izmerene iznad limita detekcije makar na jednom od lokaliteta

nakon kaveznog izlaganja, a nisu bile prisutne u merljivim koncentracijama u jedinkama žrtvovanim pre izlaganja na lokalitetima u Dunavu.

U tabelama P6 i P7 u prilogu su prikazane koncentracije svih detektovanih supstanci, u serumu i mišićnom tkivu jedinki sa tri lokaliteta izlaganja u Dunavu i jedinki koje su žrtvovane nultog dana, pre kaveznog izlaganja.

Tabela 5.6. Lista supstanci detektovanih u serumu *C. carpio* nakon kaveznog izlaganja na lokalitetima RL, GC i SU

Koncentracija u serumu ng/mL			RL		GC		SU	
Supstanca	Primena	LD	sr. vr. konc. ± sd	br. jed.	sr. vr. konc. ± sd	br. jed.	sr. vr. konc. ± sd	br. jed.
10,11-Dihidro-10,11-dihidroksikarbamazepin	Metabolit leka	0.03	0.69±0.12	3				
6:2-Fluortelomersulfonska kiselina	Industrijska	0.05	0.05	1			0.06	1
2-Oktil-4-izotiazolin-3-jedan	Pesticid	0.05	0.06	1			0.05	1
Aciklovir	Lek	1.25	4.00	1	9.05±10.08	2		
Ametrin	Herbicid	0.03			0.07±0.03	10	0.27±0.13	9
Benzofenon-3	Kozmetička	0.05			0.15±0.01	7	0.52±0.03	9
Benzildimetilheksadecilamonijum	Industrijska	0.13			0.18±0.05	2	0.57±0.26	3
3,4,5-Trihlorofenol	Pesticid	0.05			0.12±0.002	10		
Cetirizin	Lek	0.28			27.78±23.78	2		
Klozapin	Lek	0.03			0.20	1		
Diklofenak	Lek	0.40			1.77	1		
Hlormekvat	Pesticid	0.40			1.25±0.06	5		
Diazinon	Insekticid	0.38			0.58±0.004	6		
Atrazin	Herbicid	0.03					0.23±0.08	9
4+5-Metil-1H-benzotriazol	Industrijska	0.10					0.18±0.04	9
4-Hidroksitamoksifen	Metabolit leka	0.05					0.19	1
Klopidogrel	Lek	0.03					0.07±0.002	9

Prikazane vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti koncentracija supstanci detektovanih u serumu navedenog broja jedinki po lokalitetu. Skraćenica sr.vr. konc označava srednju vrednost koncentracije, sd – standardnu devijaciju, RL – referentni lokalitet, GC – lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU – lokalitet nizvodno od ispusta komunalnih otpadnih voda, LD- limit detekcije.

Nakon devetodnevno kaveznog izlaganja, u serumu jedinki *C. carpio* na referentnom lokalitetu su detektovane 4 supstance koje nisu bile prisutne u serumu jedinki žrtvovanih pre kaveznog izlaganja. Pomenute supstance su bile različitog porekla, i na osnovu primene su pripadale grupi industrijskih hemikalija, pesticida i lekova. Tri supstance su detektovane u po jednoj jedinki, dok je metabolit leka karbamazepin detektovan u 3 jedinke. Supstanca sa najvišom koncentracijom u serumu jedinki sa lokaliteta RL je lek aciklovir.

U serumu jedinki sa lokaliteta GC je detektovano 10 supstanci koje nisu bile prisutne u jedinkama žrtvovanim pre izlaganja u Dunavu. Četiri supstance pripadaju grupi pesticida, različitih primena i načina delovanja, od čega su 3,4,5 trihlorofenol i ametrin detektovani u svih 10 analiziranih jedinki, a hlormekvat i diazinon u 5 odnosno 6 jedinki. Pored pesticida, u serumu *C. carpio* sa lokaliteta GC detektovane su merljive koncentracije 4 leka od kojih su diklofenak i klozapin detektovani u serumu jedne jedinke, a ceterizin i aciklovir u dve jedinke i u višim koncentracijama u odnosu na ostale supstance. Osim lekova, u serumu 7 jedinki sa lokaliteta GC je bila prisutna i supstanca benzofenon-3 koja se primenjuje u kozmetici kao UV filter, a u dve jedinke supstanca benzildimetilheksadecilamonijum industrijskog porekla. Od detektovanih supstanci, 6 je bilo prisutno samo u serumu jedinki sa lokaliteta GC.

U serumu jedinki *C. carpio* kavezno izloženih na lokalitetu SU je detektovano 9 supstanci, od čega su 4 bile prisutne samo na ovom lokalitetu. Iz grupe pesticida, supstanca 2-Oktil-4-izotiazolin-3-jedan detektovana u serumu jedne jedinke, a herbicidi ametrin i atrazin u

serumu 9 jedinki. U serumu 9 jedinki sa ovog lokaliteta je bio prisutan lek klopidogrel, a kod jedne jedinice metabolit leka amoksifen. Na lokalitetu SU, kao i na lokalitetu GC je takođe bila prisutna kozmetička supstanca benzofenon-3 u serumu 9 jedinki. U serumu jedinki sa ovog lokaliteta su bile prisutne tri hemikalije industrijskog porekla, od kojih su 4+5-Metil-1H-benzotriazol i 6:2-fluortelomersulfonska kiselina bile detektovane samo na lokalitetu SU, a benzildimetilheksadecilamonijum je bila prisutna i na lokalitetu GC.

Od supstanci koje su detektovane na dva lokaliteta, lek aciklovir je kvantifikovan u većim koncentracijama na lokalitetu GC u odnosu na RL. Supstance koje su bile prisutne u serumu jedinki sa lokaliteta GC i SU su herbicid ametrin, UV filter benzofenon-3 i surfaktant benzildimetilheksadecilamonijum industrijskog porekla, čije su koncentracije bile više na lokalitetu SU.

Tabela 5.7. Lista supstanci u mišićnom tkivu *C. carpio* detektovanih nakon izlaganja na lokalitetima RL, GC i SU

Koncentracija u mišićnom tkivu (ng/g)	Primena	LD	RL		GC		SU	
			sr. vr. konc. ± sd	br. jed.	sr. vr. konc. ± sd	br. jed.	sr. vr. konc. ± sd	br. jed.
Karbamazepin	Lek	0.04	0.04±0.002	2				
Gestoden	Lek	0.08	0.21	1				
Oksazepam	Lek	0.12	0.22	1				
Didcildimetilamonijum	Dezinficijens	0.04	2.42±1.69	10			2.18±1.07	10
Flufenacet	Herbicid	0.09	0.31±0.16	10			0.13±0.03	6
Spiroksamin	Fungicid	0.04	0.08±0.009	2			0.11±0.02	9
2(4-morfolinil)benzotiazol	Industrijska	0.04	0.11±0.03	2	0.04	1		
Amitriptilin	Lek	0.03	0.03	1	0.04±0.01	9		
Benzildimetilheksadecilamonijum	Industrijska	0.06	22.65±32.1	10	1.96±1.18	10	4.46±1.89	10
1H-benzotriazol	Industrijska	0.05	0.8±0.17	10	1.31±0.36	10	1.20±0.15	10
4+5-Metil-1H-benzotriazol	Industrijska	0.05	0.59±0.16	5	0.71±0.15	10	0.39±0.06	10
Citalopram	Lek	0.03	0.06±0.01	8	0.08±0.03	10	0.05±0.008	9
Klopidogrel	Lek	0.01	0.03±0.01	9	0.17±0.07	6	0.03±0.011	4
Terbutrin	Herbicid	0.03	0.08±0.02	10	0.22±0.15	10	0.05±0.02	10
Klozapin	Lek	0.01			0.65±0.52	10	0.09±0.002	4
Sertralin	Lek	0.12			0.84±0.3	10	0.13±0.01	2
7-Dietilamino-4-metilokumarin	Boja	0.03			0.05±0.04	8		
N-cikloheksil-2-benzotiazol-amin	Nepoznata	0.03			0.04±0.01	10		
Oktokrilen	Kozmetička	0.10			3.76±4.15	4		
Amiodaron	Lek	0.04			0.07±0.02	4		
Bisoprolol	Lek	0.04			0.12±0.06	3		
Mikonazol	Lek	0.10			0.58±0.47	10		
Ondansetron	Lek	0.03			0.03	1		
Terbinafin	Lek	0.03			0.04±0.01	2		
Tramadol	Lek	0.05			0.35±0.14	10		
N-Acetil-4-aminoantipirin	Metabolit leka	0.09			0.15±0.05	7		
Boskalid	Fungicid	0.22			0.32	1		
Piraklostrobin	Fungicid	0.05			0.10	1		
Diazinon	Insekticid	0.19			0.34±0.17	2		
Metribuzin	Herbicid	0.04			0.07	1		
Irgarol	Biocid	0.01			0.09	1		
Ebastin	Lek	0.03					0.05±0.003	3
Melperon	Lek	0.01					0.04±0.002	2
Fenpropimorf	Fungicid	0.13					0.13±0.002	2
Oktimetoksicinamat	Kozmetička	0.64					0.72±0.01	3

Prikazane vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti koncentracija supstanci detektovanih u mišićnom tkivu navedenog broja jedinki po lokalitetu. Skraćenica sr.vr. konc označava srednju vrednost koncentracije, sd – standardnu devijaciju, RL – referentni lokalitet, GC – lokalitet ispusta komunalnih otpadnih voda, SU – lokalitet nizvodno od ispusta komunalnih otpadnih voda, LD-limit detekcije.

Nakon kaveznog izlaganja na odabranim lokalitetima u Dunavu, u mišićnom tkivu *C. carpio* je detektovan veći broj supstanci nego u serumu.

U uzorcima mišićnog tkiva sa sva tri lokaliteta su bile detektovane supstance industrijskog porekla 1H-benzotriazol, 4+5-Metil-1H-benzotriazol, benzildimetilheksadecilamonijum, lekovi citalopram i klopidogrel i herbicid terbutrin, dok su ostale supstance bile prisutne u uzorcima sa jednog ili dva lokaliteta. Sve supstance, koje su bile detektovane na sva tri lokaliteta, su imale najveću koncentraciju na lokalitetu GC, osim supstance benzildimetilheksadecilamonijum čija je koncentracija bila najviša na referentnom lokalitetu.

U mišićnom tkivu jedinki sa referentnog lokaliteta je detektovano 14 supstanci. Četiri supstance su bile industrijskog porekla, od kojih je 4+5-Metil-1H-benzotriazol bila prisutna u tkivu 5 jedinki, a supstance benzildimetilheksadecilamonijum i 1H-benzotriazol u svih 10 jedinki. Najveći broj detektovanih supstanci u mišićnom tkivu jedinki sa referentnog lokaliteta (6 supstanci) su bili lekovi. Četiri leka su bili neuroaktivni lekovi od kojih je lek citalopram bio prisutan u 8 jedinki. U mišićnom tkivu 9 jedinki je detektovan antitrombotski lek klopidogrel, a antiepileptik karbamazepin u 2, dok su ostali lekovi bili prisutni u po jednoj jedinki. Tri supstance koje su bile prisutne u uzorcima sa ovog lokaliteta su bili pesticidi i jedan dezinficijens, od kojih su herbicidi flufenacet, terbutrin i dezinficijens didecildimetilamonijum bili prisutni u tkivu svih 10 jedinki, a fungicid spiroksamin u tkivu dve jedinke. Lekovi karbamazepin, gestoden i oksazepam su bili prisutni u uzorcima samo sa referentnog lokaliteta, dok na druga dva lokaliteta nisu detektovane.

U uzorcima mišićnog tkiva jedinki sa lokaliteta GC je detektovan veći broj supstanci u odnosu na druga dva posmatrana lokaliteta. Od 25 supstanci, najveću grupu su činili lekovi (11 osnovnih supstanci i 1 metabolit), pesticidi (6 supstanci), 4 supstance industrijskog porekla, UV filter korićen u kozmetici, boja i supstanca nepoznate primene. Od detektovanih lekova četiri pripadaju neuroaktivnim supstancama, dok su tri lekovi za kardiovaskularne bolesti. Lekovi koji su bili prisutni u mišićnom tkivu svih jedinki *C. carpio* sa ovog lokaliteta (10 jedinki) su bili neuroaktivni lekovi citalopram, klozapin, sertralin, antimikotik mikonazol i analgetik tramadol. Antidepresiv amitriptilin je bio detektovan u mišićnom tkivu 9 jedinki, dok su ostali pomenuti lekovi bili prisutni u tkivu manjeg broja jedinki. Supstance industrijskog porekla 1H-Benzotriazol, 4+5-Metil-1H-benzotriazol i benzildimetilheksadecilamonijum, herbicid terbutrin i supstanca N-cikloheksil-2-benzotiazol-amin nepoznate primene su bile prisutne u svih 10 jedinki, dok su ostale supstance detektovane u manjem broju jedinki. Od ukupno 25 supstanci detektovanih kod kavezno izloženih jedinki, 15 je bilo prisutno samo u uzorcima sa lokaliteta GC, pri čemu najveći broj čine pesticidi i lekovi.

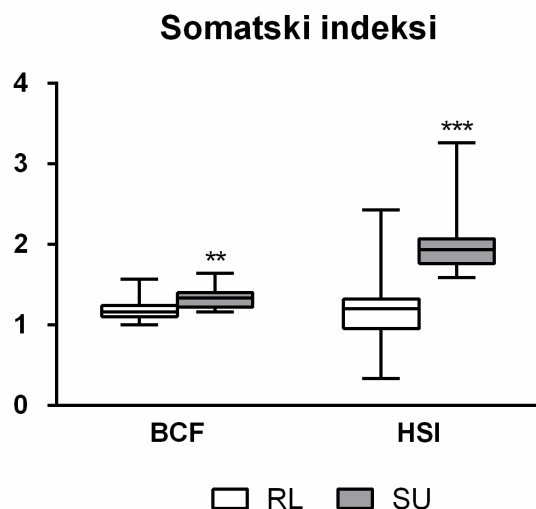
Na lokalitetu SU je detektovano 15 supstanci od kojih su lekovi ebastin i melperon, fungicid fenpropimorf i UV filter oktiletoksinamat iz kozmetičkih proizvoda bili prisutni samo na ovom lokalitetu. Na lokalitetu SU kao i na druga dva lokaliteta najveći broj detektovanih supstanci su lekovi (6 supstanci), četiri supstance su industrijskog porekla, četiri pesticidi, dok su preostale dve kozmetička supstanca i dezinficijens. Supstance industrijskog porekla 1H-benzotriazol, 4+5-Metil-1H-benzotriazol, benzildimetilheksadecilamonijum, didecildimetilamonijum i herbicid terbutrin su detektovane u 10 jedinki, lek citalopram i fungicid spiroksamin u 9, dok su ostale supstance bile prisutne u mišićnom tkivu manjeg broja jedinki.

5.1.4. Analizirani biomarkeri kod jedinki *A. brama* iz prirodnih populacija

U okviru studije slučaja Novi Sad, pored kavezno izloženih jedinki *C. carpio* odabrani biomarkeri su analizirani i jedinkama iz prirodnih populacija vrste *A. brama* sa dva lokaliteta u reci Dunav, duž toka kroz Republiku Srbiju, a na kojima su se nalaze kvalitativno i kvantitativno različiti antropogeni pritisci (prethodno opisano u poglavlju 3.)

5.1.4.1. Biometrijski parametri jedinki *A. brama*

Vrednosti kondicionog faktora (BCF) i hepatosomatskog indeksa (HSI) su predstavljene na slici 5.9.



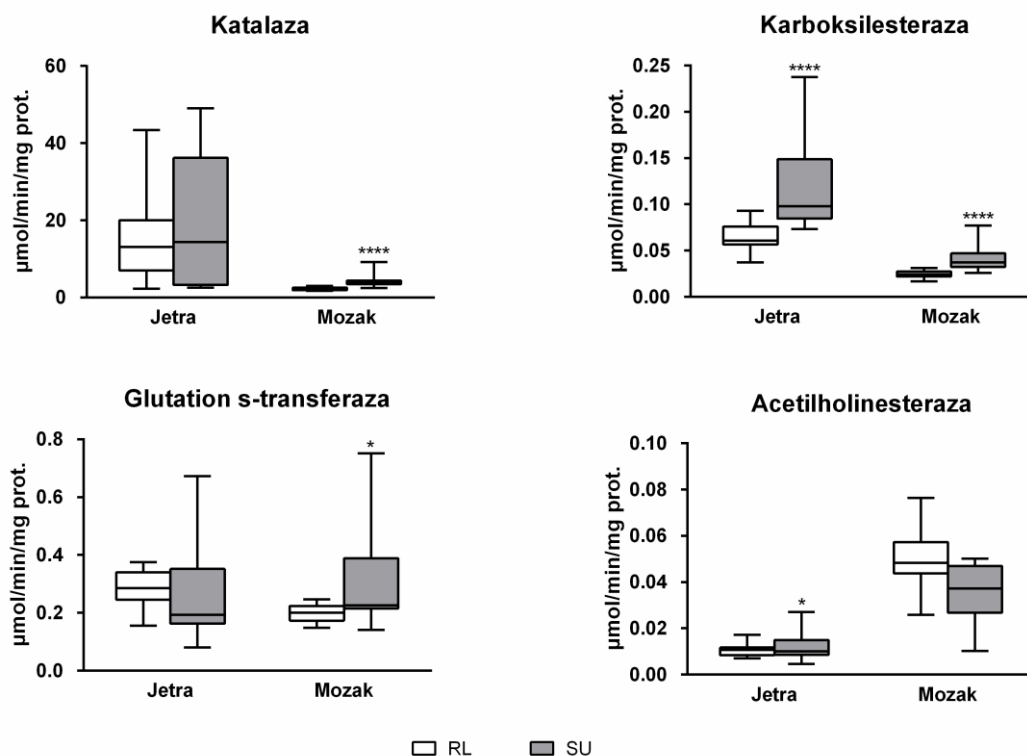
Slika 5.8. Biometrijski parametri izračunati za dve populacije *A. brama*.

BCF – telesni kondicioni faktor, HSI – hepatosomatski indeks. RL – referentni lokalitet, SU – lokalitet Subić, nizvodno od Novog Sada. Stubići na grafiku predstavljaju medijane, sa interkvartilnim opsezima i minimalnim i maksimalnim vrednostima N=14 (RL) i N=11 (SU). Zvezdice pokazuju statistički značajne razlike između poređenih lokaliteta, određeno na osnovu Mann–Whitney U testa, uz nivoe značajnosti ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

Dužina i masa jedinki *A. brama* je bila proporcionalna u obe populacije što je uslovalo uniformne vrednosti kondicionog faktora sa malim standardnim devijacijama. Stoga, iako je srednja vrednost BCF jedinki iz populacije sa lokaliteta Subić (SU), nizvodno od Novog Sada, viša samo 13% u poređenju sa vrednostima izračunatim za jedinke sa referentnog lokaliteta (RL) uočljiva je statistički značajna razlika. Razlika u srednjim vrednostima hepatosomatskog indeksa (HSI) je bila značajno viša između jedinki sa poređenih lokaliteta, pri čemu je prosečna vrednost sa lokaliteta Subić 1.7 puta viša u odnosu na referentni lokalitet.

5.1.4.2. Aktivnost enzima u jetri i mozgu *A. brama* iz prirodnih populacija

Rezultati analiza aktivnosti odabranih enzima u jetri i mozgu *A. brama* iz prirodnih populacija su predstavljene na slici 5.9.



Slika 5.9. Aktivnosti enzima određene u uzorcima tkiva jetre i mozga iz dve populacije *A. brama*.

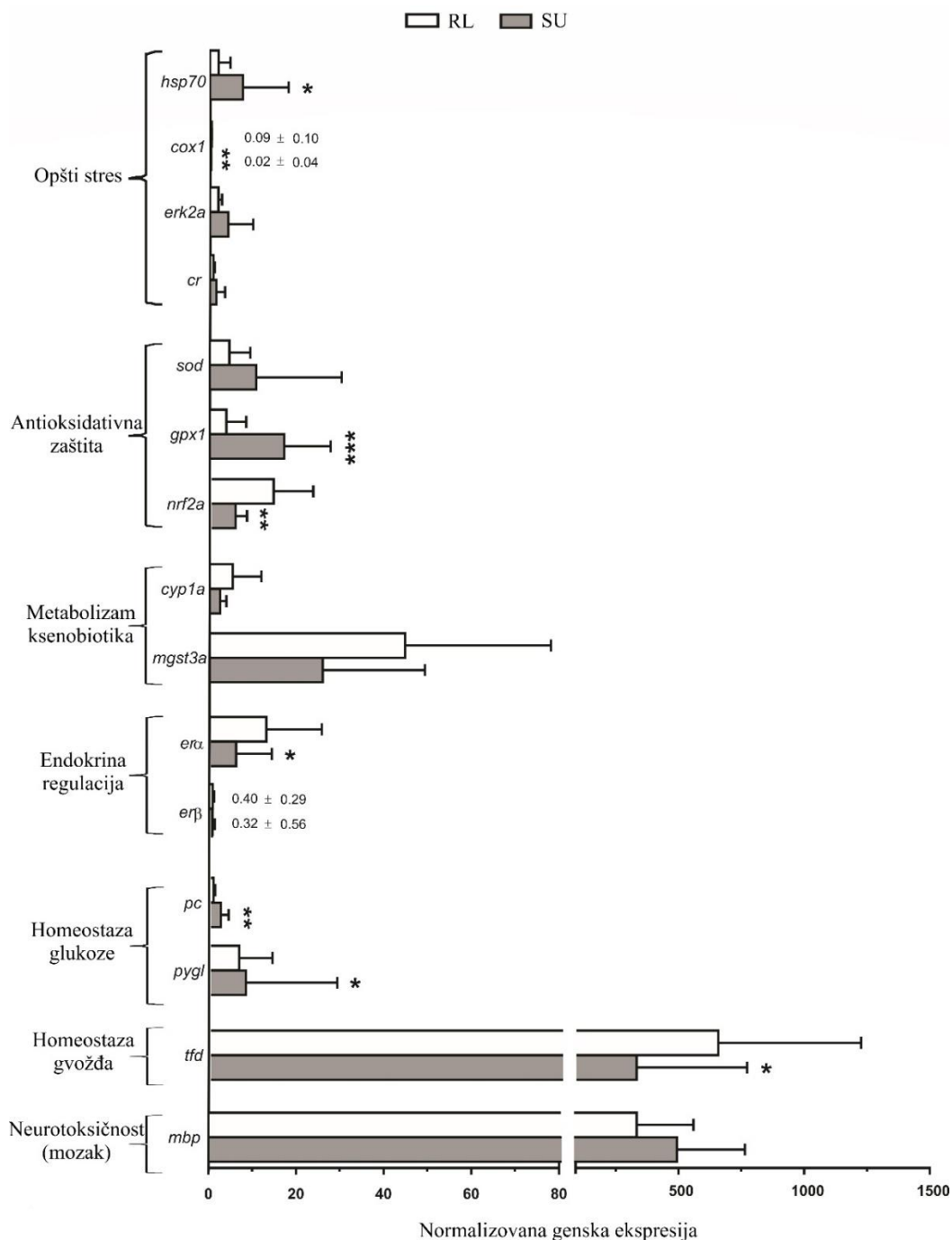
Stubići na grafiku predstavljaju medijane, minimalne i maksimalne vrednosti i interkvartilne opsege. RL – referentni lokalitet, SU – lokalitet Subić, nizvodno od Novog Sada. N=14 (RL) i N=11 (SU). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između poređenih lokaliteta, određeno Mann-Whitney U testom, sa nivoima značajnosti * $p < 0.05$ i **** $p < 0.0001$

Među analiziranim enzimima, antioksidativni enzim katalaza (CAT) je imao najvišu konstitutivnu aktivnost u uzorcima oba analizirana tkiva. Poređenje srednjih vrednosti aktivnosti CAT u tkivima jetre i mozga jedinki sa dva lokaliteta uzorkovanja pokazuje da je aktivnost u mozgu jedinki sa lokaliteta Subić dvostruko viša u odnosu na referentni lokalitet. U uzorcima tkiva jetre jedinki sa lokaliteta SU, iako bez statističke značajnosti aktivnost CAT je 31% viša u odnosu na referentni lokalitet. Aktivnost enzima metabolizma ksenobiotika se takođe razlikuje između jedinki sa dva poređena lokaliteta. Srednja vrednost aktivnosti karboksilesteraze (CES) je značajno viša u uzorcima oba tkiva kod jedinki sa lokaliteta Subić, pri čemu je u tkivu jetre viša 85%, a u tkivu mozga 61% u odnosu na referentni lokalitet. Aktivnost glutation s-transferaze (GST) u tkivu mozga jedinki sa lokaliteta Subić je viša 58% u odnosu na referentni lokalitet, pri čemu je ova razlika statistički značajna. Enzim acetilholinesteraza ima najnižu konstitutivnu aktivnost među analiziranim enzimima, sa očekivano višim vrednostima u tkivu mozga. Srednja vrednost aktivnosti AChE u tkivu jetre jedinki sa lokaliteta Subić je 19% viša u odnosu na referentni lokalitet, pri čemu je ova razlika statistički značajna, dok je u tkivu mozga 36% niža kod jedinki sa lokaliteta Subić u odnosu na referentni lokalitet.

Sveobuhvatno posmatrano, populacija sa koja nastanjuje područje sa izraženijim antropogenim uticajem i izložena je hemijskom stresu odlikuje se većom aktivnošću analiziranih enzima u jetri i mozgu, sa izuzetkom AChE čija aktivnost u mozgu je kod ovih jedinki snižena.

5.1.4.3. Analiza genske ekspresije (RQ-PCR)

Ekspresija 15 gena u tkivu jetre i mozga *A. brama* iz prirodnih populacija određena RQ-PCR analizom je predstavljena na slici 5.10.



Slika 5.10. Ekspresija gena u jetri i mozgu (samo gen *mbp*) dve populacije *A. brama*, sa dva lokaliteta uzorkovanja.

Genska ekspresija je određena RQ-PCR analizom. RL – referentni lokalitet, SU – lokalitet Subić, nizvodno od Novog Sada. Stubići predstavljaju srednje vrednosti±SD, sa N=14 (RL) i N=11 (SU). Zvezdice prikazuju statistički značajne razlike između upoređenih lokaliteta koje su određene parametarskim t-testom (za *nrf2a*, *cyp1a*, *pc*, *mbp*) ili Mann–Whitney U testom (za *hsp70*, *cr*, *erk2a*, *cox1*, *sod*, *gpx1*, *mgst3a*, *era*, *erβ*, *pygl*, *tfd*), u zavisnosti od normalnosti distribucije podataka uz nivoe značajnosti * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Vrednosti mediana, interkvartilnih opsega, minimuma i maksimuma su dati u prilogu u tabeli P27.

Kod gena koji predstavljaju biomarkere opšteg stresa su uočene značajne razlike u nivou ekspresije gena jedinki sa dva upoređena lokaliteta. Ekspresija gena *hsp70* je bila 4.2 puta viša, a gena *cox1* 4.6 puta niža na lokalitetu Subić u odnosu na referentni lokalitet, izdvajajući ove gene kao najosetljivije na razliku u pritisku hemijskog zagađenja koja je postojala između upoređenih lokaliteta. Ekspresija gena *cr* i *erk2* u jedinkama sa lokaliteta Subić je duplo viša u odnosu na referentni lokalitet, iako uočene razlike nisu statistički značajne.

Analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu proteina koji učestvuju u sistemu antioksidativne zaštite pokazala je da je kod jedinki sa lokaliteta Subić viša ekspresija uočena za gene *gpx1* (4.7 puta) i *sod* (2.4 puta), dok je ekspresija *nrf2* bila 2.7 puta niža u odnosu na referentni lokalitet.

Kod gena koji kodiraju enzime metabolizma ksenobiotika je uočen trend niže ekspresije kod jedinki sa lokaliteta Subić, dok je sličan odgovor (značajno niža ekspresija, 2.2 puta) uočena u ekspresiji gena *era*, koji učestvuje u endokrinoj regulaciji, i gena *tfd* (2.2 puta niža) koji učestvuje u održavanju homeostaze gvožđa.

Ekspresija gena koji učestvuju u održavanju homeostaze glukoze, *pc* i *pygl* je značajno viša (do 3.6 puta) kod jedinki koje su uzorkovane iz populacije na lokalitetu Subić.

Analizom ekspresije gena *mbp* u mozgu, kao biomarkera neurotoksičnosti, nije uočena značajna razlika između upoređenih lokaliteta.

Analizirani geni su imali različite nivoe konstitutivne ekspresije. Najviša ekspresija je uočena za gene *mgst3a*, *tfd* i *mbp*, dok su geni *cr*, *cox1*, *erβ* i *pc* imali niži nivo konstitutivne ekspresije.

5.2. Studija slučaja Dunav

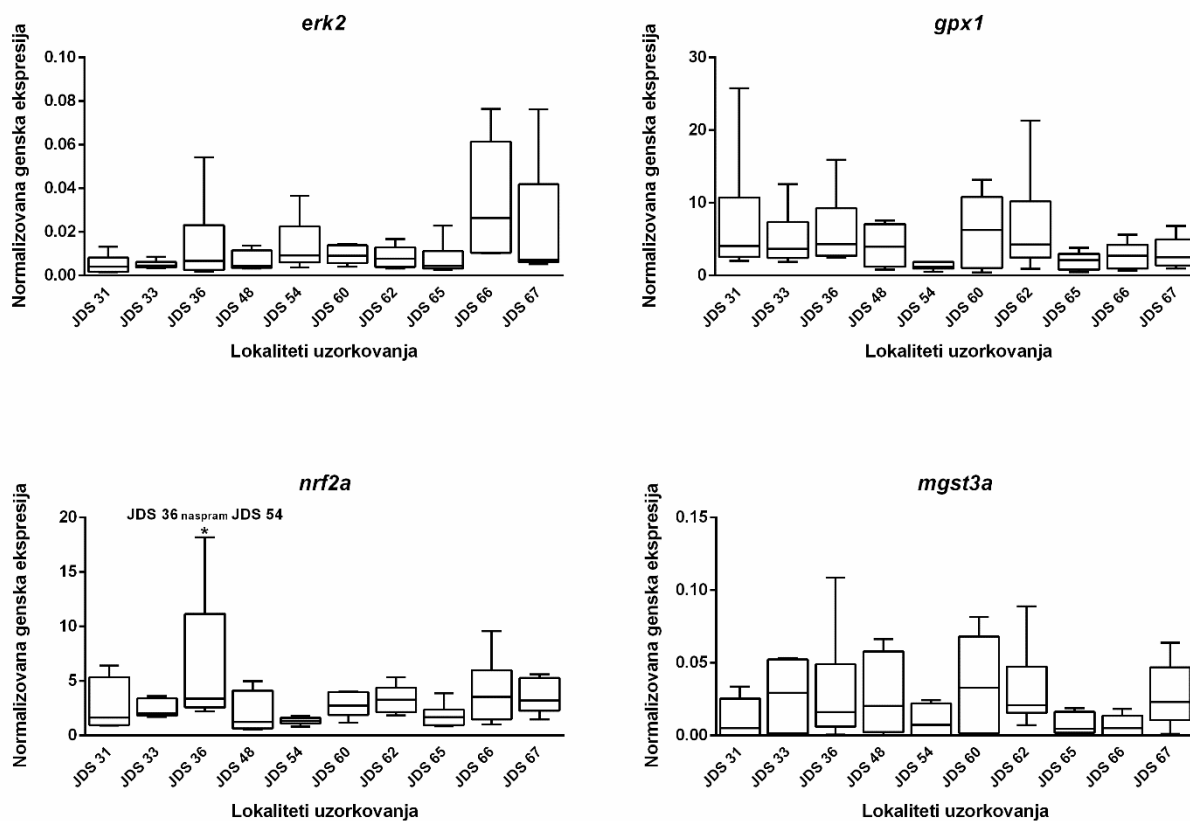
Potpoglavlje, koje se odnosi na studiju slučaja Dunav, obuhvata prikaz i opis rezultata analize genske ekspresije nespecifičnih biomarkera kod jedinki vrste *A. alburnus* uzorkovanih na odabranim lokalitetima duž toka Dunava, korelacije genske ekspresije i koncentracija supstanci detektovanih u uzorcima vode sa istih lokaliteta i analize genske ekspresije nespecifičnih i specifičnijih biomarkera kod jedinki vrste *A. alburnus* na užoj prostornoj skali.

5.2.1. Analiza genske ekspresije (RQ-PCR) kod jedinki vrste *A. alburnus*

Rezultati ekspresije gena u jetri jedinki *A. alburnus*, uzorkovanih duž toka Dunava, na deset lokaliteta, a koji predstavljaju nespecifične biomarkere i učestvuju u opštem odgovoru na stres i metabolizmu ksenobiotika, su opisani u potpoglavlju 5.2.1.1. Rezultati analize ekspresije gena koji predstavljaju nespecifične i specifičnije biomarkere, na tri lokaliteta u Dunavu su prikazani u potpoglavlju 5.2.1.2.

5.2.1.1. Ekspresija gena, nespecifičnih biomarkera efekta, kod jedinki *A. alburnus* duž toka Dunava

Ekspresija 4 gena koji predstavljaju biomarkere opšteg odgovora na stres i metabolizma ksenobiotika u jedinkama *A. alburnus* uzorkovanim na odabranim lokalitetima, duž toka Dunava je prikazana na slici 5.11.



Slika 5.11. Ekspresija gena opšteg odgovora na stres i metabolizma ksenobiotika u uzorcima tkiva jetre jedinki *A. alburnus* na odabranim lokalitetima duž toka Dunava određena pomoću RQ-PCR analize.

Stubići na grafiku predstavljaju medijane sa interkvartilnim opsezima i minimalnim i maksimalnim vrednostima. Broj jedinki na lokalitetu JDS 48 (N=4) na JDS 67 (N=5), a na ostalim (N=6). Oznake lokaliteta su objašnjene u tabeli 4.1. Zvezdica prikazuje statistički značajnu razliku između upoređenih lokaliteta, određenu pomoću testa jednosmerna ANOVA i post hoc Neuman-Keuls multiple comparisons testom uz nivo značajnosti * $p < 0.05$

Ekspresija gena *erk2*, koji je odabran za analizu kao biomarker opšteg stresa, se nije značajno razlikovala između 10 upoređenih lokaliteta. Najviša ekspresija ovog gena je uočena u tkivu jetre jedinki uzorkovanih sa lokaliteta JDS66 koji se nalazi u Rumuniji, u kraku Kilija, nizvodno od grada koji tretira komunalne otpadne vode biološkim tretmanom. Ekspresija *erk2* gena je u uzorcima sa ostalih lokaliteta bila niža 1.7 do 6.8 puta. Najveća razlika u ekspresiji se može uočiti između lokaliteta JDS66 i lokaliteta JDS 33, JDS 31 i JDS 48 na kojima je zabeležena niža ekspresija 6.8, 6.5 i 5.3 puta (navedenim redom).

Kod gena *gpx1* koji predstavlja biomarker aktiviranja sistema antioksidativne zaštite, u jetrama *A. alburnus* najviša ekspresija je zabeležena u uzorcima sa lokaliteta JDS31, koji se nalazi oko 1303. rečnog kilometra Dunava, u blizini Iloka i Bačke Palanke, manjih gradova koji ne prerađuju otpadne vode, između Hrvatske i Srbije. Na ostalim lokalitetima ekspresija gena *gpx1* je bila niža 1.1 do 5.7 puta. Najveća razlika (5.7 puta) se može uočiti između lokaliteta JDS31 i lokaliteta JDS54, koji se nalazi u blizini mesta Zimniča i Svištov između Bugarske i Rumunije, oko 1132. rečnog kilometra.

Ekspresija gena *nrf2a*, koji učestvuje u antioksidativnoj zaštiti je bila najviša u tkivu jetre jedinki koje su uzorkovane na lokalitetu JDS36 u Srbiji, koji se nalazi u blizini mesta Belegiš, nizvodno od ušća reke Tisa u Dunav, oko 1200 rečnog kilometra. U blizini ovog lokaliteta se ne nalaze značajni tačkasti izvori zagađenja. U uzorcima sa ostalih lokaliteta ekspresiju *nrf2a* gena je bila 1.6-4.7 puta niža, pri čemu je jedina značajna razlika između lokaliteta JDS36 i JDS54. Ekspresija gena *nrf2a* je na lokalitetu JDS36 bila viša 4.7 puta u odnosu na lokalitet JDS54.

Kod gena *mgst3a* koji učestvuje u metabolizmu ksenobiotika najviša vrednost ekspresije je uočena na lokalitetu JDS 60 koji se nalazi između 383. i 373. rečnog kilometra u blizini gradova Čiciju i Silistra između Rumunije i Bugarske koji ne prerađuju otpadne vode. U uzorcima sa ostalih lokaliteta je bila niža ekspresija 1.1-5.2 puta. Najveća razlika je bila u odnosu na lokalitet JDS 66 (5.2 puta) koji se nalazi nizvodno od grada srednje veličine koji sprovodi biološki tretman otpadnih voda.

Rezultati pokazuju da je jedina statistički značajna razlika uočena između nivoa genske ekspresije gena *nrf2a* kod jedinki sa lokaliteta JDS 36 i lokaliteta JDS 54 (u blizini mesta Zimniča i Svištov između Bugarske i Rumunije). Između ostalih grupa za sva četiri analizirana gena nisu uočene statistički značajne razlike.

5.2.1.2. Analiza korelacija ekspresije odabranih gena u jetri *A. alburnus* duž toka Dunava i supstanci detektovanih u vodi

U okviru JDS 3 istraživanja LC-HRMS analizom je kvantifikovano preko 250 supstanci u uzorcima vode uzorkovanim na velikom broju lokaliteta duž toka Dunava, uključujući i lokalitete na kojima su uzorkovane jedinke *A. alburnus*. Koncentracije detektovanih supstanci na analiziranim lokalitetima su date u prilogu, u tabeli P8. Između gena *erk2*, *gpx1*, *nrf2a* i *mgst3a* je uočena korelacija sa ukupno 41 supstancom (tabela 5.8.).

Uopšteno, između gena *erk2*, *gpx1*, *nrf2a* i *mgst3a* i detektovanih supstanci je utvrđen nizak nivo korelacije. Među analiziranim genima, *erk2* se izdvojio kao najosetljiviji na različite supstance. Analiza korelacionih koeficijenata sugeriše da na ekspresiju gena *erk2* utiče 20 različitih supstanci koje pripadaju različitim grupama na osnovu primene. Najveći nivo korelacije je uočen sa lekovima kao što su opipramol, bromazepam, sulpirid, kandesartan i tramadol, sa pesticidom 2,4 D i industrijskim supstancama trifenil fosfat i bisfenol S. Nakon Bonferronijeve korekcije, jedina korelacija koja je utvrđena kao statistički značajna je između genske ekspresije gena *erk2* i koncentracije opipramola u uzorcima vode i obležena je tamnijim poljem u tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Rezultati korelacionih analiza genske ekspresije i detektovanih supstanci u vodi.

Supstance koje su pokazale korelaciju sa ekspresijom analiziranih gena (izmerene u koncentracijama 1 ng/L - 1 µg/L)	<i>erk2</i>		<i>gpx1</i>		<i>nrf2a</i>		<i>mgst3a</i>	
	R	p	R	p	R	p	R	p
LEKOVI								
Opipramol	0.5	8.86E-05						
Bromazepam	0.45	0.0004						
Sulpirid	0.45	0.0004						
Candesartan	0.45	0.0004						
Tramadol	0.45	0.0004						
Valsartanska acid	-0.31	0.0183						
Gabapentin-lactam	-0.31	0.0189	0.31	0.019				
N-Formil-4-aminoantipirin	-0.29	0.0275						
Lamotrigin	-0.29	0.0307						
Metazin	-0.26	0.0466						
n-Acetil-4-aminoantipirin			0.35	0.008			0,36	0,007
Sulfapiridin			-0,30	0,022	-0,28	0,032		
Lamotrigin			0,3	0,022				
Gabapentin			0,28	0,033				
Venlafaksin			0,27	0,046				
Ritalinska kiselina					0,42	0,001		
Dimetilaminofenazon					0,42	0,001		
Propoksifen (Dekstropropoksifen)					0,42	0,001		
Dekstrometorfan (Metorfan)					0,42	0,001		
Klozapin					0,4	0,002		
1-Adamantilamin					0,29	0,03		
Doksepin					-0,28	0,034		
4-Formil-antipirin					-0,27	0,041		
10,11-dihidro-10,11-dihidroksikarbamazepin							0,30	0,025
NEDOZVOLJENE SUPSTANCE								
Metilendioksimetamfetamin (MDMA)			0,28	0,035	0,38	0,004		
Metamfetamin			0,27	0,043				
Normeperidin (Norpetidin)					0,26	0,047	0,27	0,04
PESTICIDI								
2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D)	0,44	0,0006						
Atrazin-desetil-2-hidroksi	0,38	0,0032						
2-metil-4-hlorofenoksisirćetna kiselina (MCPA)					0,29	0,031		
Dinoterb					-0,27	0,044	-0,27	0,039
Atrazin							0,34	0,01
BIOCIDI								
Carbendazim	0,26	0,0489						
INDUSTRIJSKE SUPSTANCE								
Trifenil fosfat (TPT)	0,5	0,0003						
Bisfenol S	0,45	0,0004						
Tris (n-butil) fosfat (TnBP)	0,3	0,0237	-0,27	0,042			-0,27	0,042
Tri-izobutilfosfat	0,29	0,0266						
Perfluoronanonanska kiselina (PFNA)	0,29	0,0278						
5,6-Dimetilbenzotriazol					0,33	0,012		
SUPSTANCE POREKLOM IZ HRANE								
Kafein	-0,27	0,0405						
Sukraloza	-0,26	0,0498					0,29	0,029

Za analizu korelacije između genske ekspresije i supstanci detektovanih u uzorcima vode su korišćeni podaci iz zvaničnog ICPDR izveštaja, 2013 i klasifikovani na osnovu Busch i sar, 2015. Izmerene koncentracije supstanci su korišćene za ordinaciju lokaliteta analizom osnovnih komponenti (PCA). Pearsonovi korelacioni koeficijenti su izračunati između svih izmerenih vrednosti i prilagođenih Bonferronijevom korekcijom sa n=241. Sva izračunavanja su izvedena u programu R uz opsege p vrednosti: <0.001, 0.05-0.01 i 0.01-0.001.

5.2.1.3. Ekspresija gena, nespecifičnih i specifičnijih biomarkera, kod jedinki vrste *A. alburnus* na užoj prostornoj skali

Nakon analize gena, nespecifičnih biomarkera, kod jedinki *A. alburnus* na široj skali duž toka Dunava, za dodatne analize odabrani su geni, za koje je prethodno uočena diferencijalna ekspresija u populacijama slobodnoživećih jedinki *A. brama* sa dva lokaliteta koji se nalaze pod različitim tipom i intenzitetom antropogenog pritiska. Radi potvrde osjetljivosti ovih gena kao biomarkera hemijskog pritiska i kod vrste *A. alburnus*, odabrane su jedinke sa lokaliteta koji se prostorno delom preklapaju sa deonicom iz studije slučaja Novi Sad.

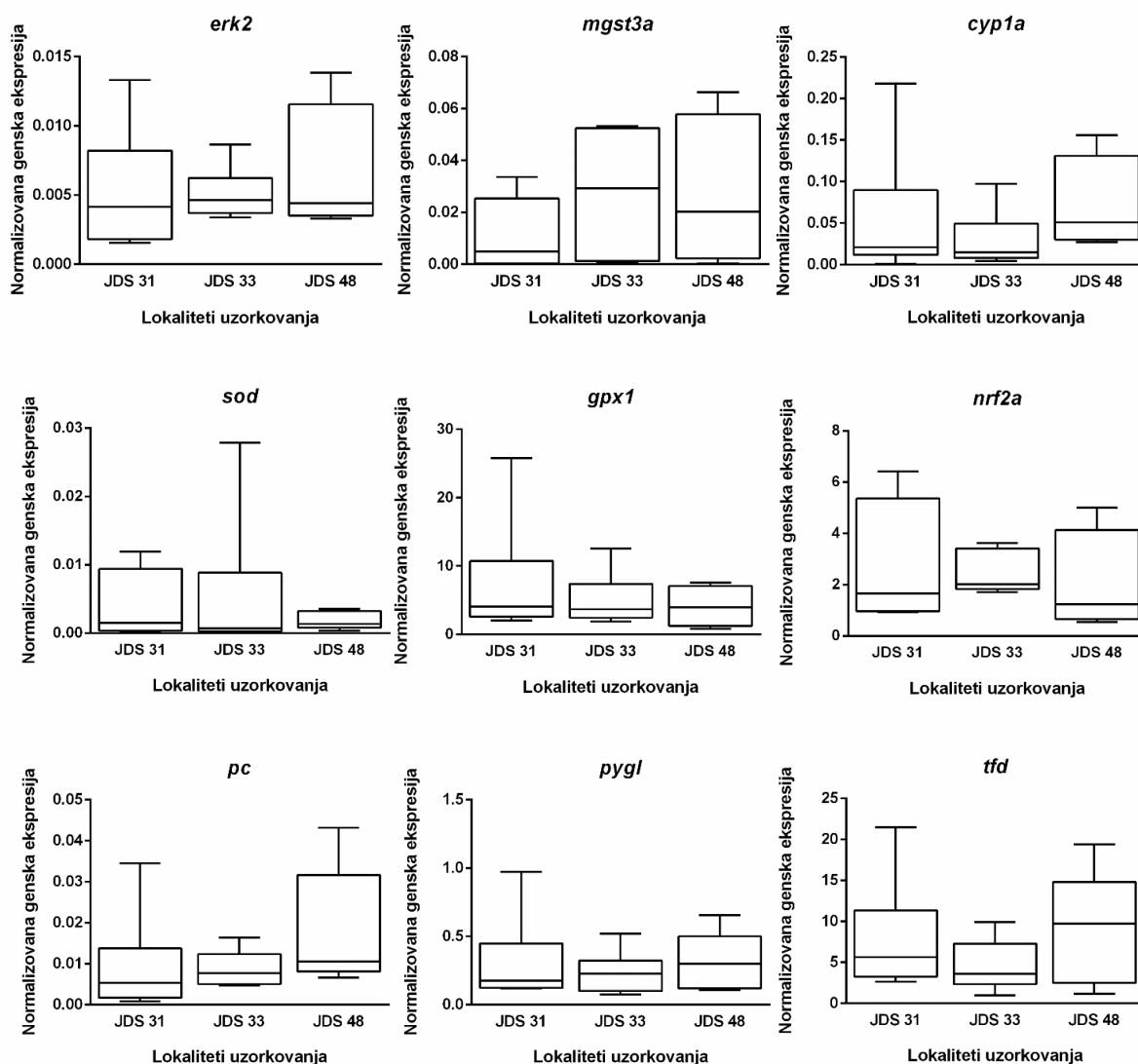
Ekspresija 9 gena koji učestvuju u različitim fiziološkim odgovorima na tri lokaliteta na delu toka Dunava kroz Srbiju je prikazana na slici 5.12.

Ekspresija gena *erk2* koji je uključen u opšti odgovor na stres je bila najviša na lokalitetu JDS31 (Ilok-Bačka Palanka), dok je na lokalitetima JDS33 (nizvodno od Novog Sada) i JDS48 (nizvodno od ušća Timoka u Dunav) ekspresija bila niža 1.2 i 1.3 puta.

Kod gena uključenih u sistem antioksidativne zaštite se može uočiti sličan trend u ekspresiji pri čemu je ekspresija sva tri analizirana gena bila najniža na lokalitetu JDS48, a kod gena *nrf2a* i *gpx1* najviša na lokalitetu JDS31. Ekspresija gena *nrf2a* je bila najviša na lokalitetu JDS31, a 1.1 i 1.4 puta niža na lokalitetima JDS33 i JDS48. Gen *gpx1* je bio najviše eksprimiran kod jedinki *A. alburnus* sa lokaliteta JDS31, a sa lokaliteta JDS31 i JDS48 1.5 i 1.8 puta niža. Ekspresija gena *sod* je bila najviša kod jedinki sa lokaliteta JDS33, a sa lokaliteta JDS31 i JDS48 1.3 i 2.8 puta niža.

Geni koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika su imali različite trendove ekspresije u odnosu na lokalitet uzorkovanja. Gen *mgst3a* je imao ujednačen nivo ekspresije kod jedinki *A. alburnus* sa lokaliteta JDS33 i JDS48, a 2.5 puta niži na lokalitetu JDS31. Gen *cyp1a* je bio najviše eksprimiran kod jedinki sa lokaliteta JDS48 a 1.4 i 2.6 puta niže na lokalitetima JDS31 i JDS33.

Kod gena koji učestvuju u metabolizmu glukoze *pc* i *pygl* i gena *tfd* koji učestvuje u održavanju homeostaze gvožđa se može uočiti sličan trend ekspresije pri čemu je ekspresija oba gena najviša na lokalitetu JDS48, a najniža na JDS33. Gen *pc* je u odnosu na lokalitet sa najvišom ekspresijom 2 puta niže eksprimiran na lokalitetu JDS31 i 2.1 put na lokalitetu JDS48. Kod gena *pygl* ekspresija je na lokalitetu JDS31 je bila skoro ujednačena sa lokalitetom sa najvišom ekspresijom, dok je na lokalitetu JDS33 bila 1.3 puta niža. Gen *tfd* je na lokalitetima JDS31 i JDS33 1.1 i 2 puta niža u odnosu na lokalitet sa najvišom ekspresijom JDS 48.



Slika 5.12. Ekspresija gena u uzorcima jetre *A. alburnus* uzorkovanih sa lokaliteta JDS 31 (u blizini mesta Ilok i Bačka Palanka), JDS33 (nizvodno od Novog Sada) i JDS48 (nizvodno od ušća Timoka u Dunav).

Stubići na graficima predstavljaju medijane sa interkvartilnim opsezima i minimalnim i maksimalnim vrednostima. N=4 (JDS48), N=6 (JDS31, JDS33). Dodatne informacije o lokalitetima se nalaze u tabeli 4.1. Značajnost razlika između upoređenih lokaliteta je analizirana pomoću testa jednosmerne ANOVA i post hoc Neuman-Keuls multiple comparisons testom uz nivo značajnosti $p < 0.05$.

Rezultati ekspresije gena u uzorcima jetri *A. alburnus* uzorkovanim na 3 upoređena lokaliteta nisu pokazali statistički značajnu razliku između analiziranih lokaliteta ni za jedan od 9 analiziranih gena uz visoke vrednosti standardne devijacije.

5.3. Biomarkeri u multiparametarskom pristupu proceni efekta i uticaja hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima

Rezultati prikazani u prethodnim poglavljima pokazali su da biološki odgovori koji se koriste kao biomarkeri hemijskog stresa na prvi pogled nemaju jedinstven obrazac ponašanja. Iz ovako dispergovanih rezultata nije jednostavno zaključiti o potencijalnim efektima hemijskog stresa, što se od biomarkera očekuje. Multiparametarski pristup proceni uticaja zagađenja (Backhaus i sar., 2017; Backhaus i sar., 2019) se oslanja na četiri seta parametara u gradijentu specifičnosti i obrnutom gradijentu ekološke relevantnosti. Bioanalitičke tehnike (LoE 2) i biomarkeri (LoE 3) se nalaze između dva ekstrema – specifičnog, ali ekološki najmanje relevantnog predviđanja ukupne toksičnosti na osnovu koncentracija i individualne laboratorijski utvrđene toksičnosti kvantifikovanih hemijskih jedinjenja u uzorku (LoE 1) i sastava i strukture životnih zajednica procenjene direktnim biomonitoringom (LoE 4) kao ekološki najrelevantnijeg, ali i najmanje specifičnog seta parametara. Oba ekstremna seta parametara se veoma jednostavno i jednoznačno kvantifikuju, preko SUM TU, odnosno biotičkih indeksa (Backhaus i sar., 2017). Kako bi rezultati analize baterije biomarkera bili informativni i primenljivi u multiparametarskom pristupu kao intermedijarni set podataka koji treba da poveže hemijski i ekološki status, rezultati se moraju predstaviti u formi jedinstvene prosečne integrisane numeričke vrednosti (ABR – average biomarker response). U zavisnosti od cilja analize, tipa eksperimentalne postavke i raspoloživih rezultata, procedura može da se u manjoj ili većoj meri razlikuje, što je pokazano na rezultatima dve studije slučaja obuhvaćene ovom disertacijom.

5.3.1. Studija slučaja Novi Sad

Jedan od ciljeva studije slučaja Novi Sad / Šabac je procena uticaja zagađenja poreklom iz otpadnih voda gradova i kvantifikacija hemijskog stresa u sektoru Dunava / Save u zoni uticaja. U praksi to znači da se vrednosti odgovora većeg broja biomarkera (na različitim nivoima biološke organizacije) kod jedinki u zoni uticaja gradova (u slučaju Novog Sada u dve različite eksperimentalne postavke) porede sa odgovorima jedinki sa jasno definisanih referalnih lokaliteta (kontrolne). Tabela 5.9 prikazuje primenu postupka izračunavanja prosečnog odgovora analiziranih biomarkera (ABR) kod *C. carpio* iz kavezne postavke u regionima Novi Sad i Šabac. Tabela 5.10 pokazuje isti postupak primenjen na odgovore jedinki iz prirodnih populacija dunavskih *A. brama*.

Integracija svih raspoloživih podataka podrazumeva nekoliko neophodnih koraka:

1. Određivanje srednje vrednosti odgovora pojedinačnih biomarkera

Bez obzira na tip postavke (kavezni sistem izlaganja ili analiza biomarkera kod jedinki iz prirodnih populacija), rezultate karakteriše visoka varijabilnost merenih parametara i ograničeni broj jedinki po eksperimentalnoj grupi. U ovakvim okolnostima, medijana je optimalan tip srednje vrednosti, jer je najmanje podložna uticaju ekstremnih vrednosti, a istovremeno žrtvuje najmanje korisnih informacija.

2. Normalizacija

Da bi se mogao izraziti smislen numerički indeks (ABR) neophodno je odgovore svih analiziranih biomarkera svesti na jedinstvenu skalu. U ovom konkretnom slučaju, postojanje jasno definisanog referalnog (kontrolnog) lokaliteta omogućava jednostavnu normalizaciju svakog od odgovora na kontrolnu (referalnu) vrednost.

3. Razmatranje smeru odgovora

Normalizacija na kontrolne vrednosti ima smisla samo u slučaju da se očekuje da je odgovor biomarkera na hemijski stres uvek jednosmeran, odnosno da uvek očekujemo povećanje enzimske aktivnosti, genske ekspresije itd. kod jedinki (populacija) pod direktnim uticajem antropogenih aktivnosti (otpadnih voda) u odnosu na kontrolne uslove. Međutim, za određeni broj biomarkera je upravo karakteristično smanjenje odgovora u odnosu na kontrolu pod uticajem specifičnih zagađujućih materija (na pr. inhibicija aktivnosti određenih enzima), dok je u nekim slučajevima moguća kako stimulacija, tako i inhibicija, pod određenim okolnostima, odnosno, smer promene ne mora uvek biti isti. Zbog toga, izračunavanje prosečnog odgovora biomarkera iz normalizovanih vrednosti ne bi imalo nikakvog smisla, jer bi se stimulacije i inhibicije međusobno iznivelisale. Da bi sve promene (bez obzira na smer) jednako uticale na vrednost ABR, neophodno je transformisati podatke tako da povećanje vrednosti odgovora biomarkera u odnosu na kontrolu uvek ukazuju na veći efekat (uticaj) stresa. Najjednostavniji postupak za postizanje ovog cilja je korišćenje recipročne vrednosti normalizovanih odgovora kod kojih se beleži inhibicija (sniženje vrednosti) u odnosu na kontrolu.

4. Izračunavanje prosečnog odgovora analiziranih biomarkera (ABR)

Uprkos normalizaciji i transformaciji podataka, raspon odgovora pojedinih biomarkera i dalje može da ostane širok, zbog ekstremnih odgovora pojedinih biomarkera. Kako ekstremne pojedinačne vrednosti ne bi dominirale rezultatom, ABR je izračunat kao geometrijska sredina normalizovanih transformisanih medijana, sa vrednostima koje se, teorijski, kreću od 1 do ∞ , tipično od 1 do 3.

5. Klasifikacija na osnovu ABR vrednosti

Ako ABR interpretiramo kao procenat razlike odgovora u odnosu na kontrolu (bilo da je u pitanju povećanje ili smanjenje srednjih vrednosti odgovora), vrednost ABR od 1.1 bi značila 10% razlike, vrednost od 1.5 bi ukazivala na 50%, a vrednost 2 bi se interpretirala kao 100% razlika u odnosu na kontrolu. Zbog velikih individualnih variranja bioloških odgovora u *in situ* uslovima (inače nekarakterističnim za laboratorijske testove), ABR vrednost ispod 1.5 se ne mogu kvalifikovati kao značajna razlika, odnosno, ABR vrednosti ispod 1.5 ne predstavljaju signal da je populacija izložena stresu. Zbog toga se predlaže sledeća klasifikacija

Klasa 0 – izostanak signala stresa: $ABR < 1.5$

Klasa 1 – umeren signal - naznaka stresa: $1.5 < ABR < 2$

Klasa 2 – jasan signal stresa: $ABR > 2$

Klasifikacija vrednosti ABR u tri klase (0, 1, 2) korespondira klasifikacionoj šemi ostalih LoE u multiparametarskom prisupu (Backhaus i sar., 2017; Backhaus i sar., 2019), radi pojednostavljenja prezentacije i interpretacije rezultata.

Tabela 5.9. Postupak izračunavanja prosečnog odgovora biomarkera (ABR) kod *C. carpio* iz kavezne postavke

Biomarkeri	GC			SU			SA			
Kondicioni faktori	med	med	norm	1/norm	med	norm	1/norm	med	norm	1/norm
BCF	1.788	1.714	0.959	1.043	1.773	0.992	1.008	1.864	1.043	-
HSI	2.473	2.028	0.820	1.219	2.28	0.922	1.085	2.101	0.849	1.177
ABR _{kondicioni faktori}			1.13			1.04			1.11	
Enzimski aktivnost	med	med	Norm	1/norm	med	norm	1/norm	med	norm	1/norm
CATj	46.02	21.75	0.473	2.116	24.87	0.540	1.850	29.18	0.634	1.577
CESj	0.25	0.22	0.88	1.136	0.16	0.64	1.563	0.24	0.96	1.042
GSTj	0.24	0.23	0.958	1.043	0.21	0.875	1.143	0.22	0.917	1.091
AchEj	0.01	0.01	1	-	0.01	1	-	0.02	2	-
ABR _{enzimska aktivnost jetra}			1.26			1.35			1.38	
CATm	1.78	2.11	1.185	-	2.13	1.197	-	2.15	1.208	-
CESm	0.06	0.07	1.167	-	0.06	1	-	0.06	1	-
GSTm	0.17	0.17	1	-	0.18	1.059	-	0.16	0.941	1.063
AChEm	0.05	0.05	1	-	0.05	1	-	0.05	1	-
ABR _{enzimska aktivnost mozak}			1.08			1.06			1.06	
ABR _{enzimska aktivnost}			1.16			1.18			1.21	
Genska ekspresija	med	med	norm	1/norm	med	norm	1/norm	med	norm	1/norm
Opšti stres - ženke										
<i>hsp70</i> (ž)	0.05883	0.236	4.005	-	0.069	1.181	-	0.6002	10.20	-
<i>cox1</i> (ž)	56.68	29.98	0.529	1.890	8.792	0.155	6.447	8.666	0.153	6.541
<i>cr</i> (ž)	0.074	0.060	0.815	1.227	0.087	1.175	-	0.0995	1.345	-
<i>erk2a</i> (ž)	0.256	0.16	0.652	1.531	0.113	0.440	2.274	0.094	0.368	2.715
<i>mt</i> (ž)	1.217	0.762	0.626	1.597	1.372	1.800	-	1.038	0.756	1.322
ABR _{opšti stres ženke}			1.87			2.05			3.17	
Opšti stres - mužjaci										
<i>hsp70</i> (m)	0.144	0.175	1.211	-	0.331	2.292	-	1.833	12.70	-
<i>cox1</i> (m)	5.656	14.64	2.588	.	69.18	12.23	.	53.28	9.420	-
<i>cr</i> (m)	0.0592	0.1026	1.731	-	0.106	1.782	-	0.117	1.974	-
<i>erk2a</i> (m)	0.1443	0.3122	2.164	.	0.3452	2.392	.	0.3553	2.462	.
<i>mt</i> (m)	2.435	1.129	0.464	2.157	1.642	0.674	1.483	2.17	0.891	1.122
ABR _{opšti stres mužjaci}			1.91			2.82			3.66	
ABR _{genska ekspresija opšti stres oba pola}			1.89			2.41			3.41	
Endokrini parametri ženke										
<i>era</i> (ž)	0.0400	0.020	0.505	1.979	0.019	0.466	2.148	0.019	0.485	2.063
<i>erβ</i> (ž)	0.019	0.013	0.709	1.410	0.019	1.003	-	0.014	0.768	1.302
<i>ar</i> (ž)	0.0012	0.0011	0.968	1.033	0.0008	0.747	1.339	0.0009	0.830	1.205
<i>vtg</i> (ž)	0.0002	0.0005	2.220	-	0.0003	1.466	-	0.0004	1.946	-
ABR _{endokrini parametri ženke}			1.59			1.43			1.58	
Endokrini parametri mužjaci										
<i>era</i> (m)	0.032	0.015	0.480	2.084	0.046	1.449	-	0.054	1.680	-
<i>erβ</i> (m)	0.019	0.014	0.693	1.444	0.041	2.119	-	0.028	1.430	-
<i>ar</i> (m)	0.001	0.0011	1.061	-	0.0007	0.648	1.544	0.0007	0.671	1.490
<i>vtg</i> (m)	0.0003	0.0004	1.606	-	0.0001	0.401	2.490	0.0006	2.535	-
ABR _{endokrini parametri mužjaci}			1.50			1.85			1.74	
ABR _{endokrini parametri oba pola}			1.55			1.63			1.66	
Autofagija – Imunski odgovor										
<i>lc3ll</i>	0.815	0.971	1.191	-	1.120	1.374	-	1.209	1.482	-
<i>dyn</i>	0.136	0.228	1.672	-	0.223	1.637	-	0.289	2.116	-
<i>tnfa</i>	0.010	0.030	2.922	-	0.026	2.539	-	0.014	1.329	-
<i>il1β</i>	0.152	0.118	0.779	1.284	0.093	0.611	1.637	0.124	0.821	1.219
ABR _{autofagija/imunski odgovor}			1.65			1.75			1.50	
Parametri neurotoksičnosti										
<i>gabra1</i>	0.466	1.233	2.644	-	1.036	2.221	-	0.969	2.077	-
<i>mbp</i>	18.66	35.91	1.925	-	0.381	0.020	48.93	20.13	1.079	-
<i>syt10</i>	0.072	0.201	2.797	-	0.113	1.578	-	0.146	2.029	-
<i>tac3a</i>	0.005	0.006	1.33	-	0.012	2.624	-	0.005	1.155	-
<i>tac3b</i>	0.002	0.005	2.255	-	0.007	2.801	-	0.004	1.830	-
ABR _{parametri neurotoksičnosti}			2.09			4.61			1.51	
ABR _{svi geni zajedno}			1.73			2.02			2.47	
Ukupni ABR (svi biomarkeri)			1.59			1.90			1.82	

Masnim brojevima obeležene vrednosti koje se koriste za izračunavanje ABR, RL-referentni lokalitet, GC-ispust komunalnih otpadnih voda grada Novog Sada, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić, SA-lokalitet u reci Sava, nizvodno od grada Šabac, j-jetra, m-mozak

Ukupne vrednosti ABR kod *C. carpio* iz kaveznog načina izlaganja za sva tri lokaliteta se nalaze u rasponu od 1.5 do 2, što predstavlja umeren signal stresa na odabranim lokalitetima. Pored ukupne ABR vrednosti, izračunate na osnovu odgovora svih analiziranih biomarkera, tabela 5.16 prikazuje i intermedijarne vrednosti za pojedine grupe parametara koje mogu da pruže uvid u dodatne detalje. Evidentno je da vrednosti intermedijarnih ABR padaju sa povećanjem nivoa biološke organizacije, odnosno, ABR vrednosti izračunate na osnovu genske ekspresije su više (od 1.8 do preko 2) od ABR izračunatih na osnovu kondicionih indeksa i enzimske aktivnosti. Interesantno je primetiti razlike u vrednostima ABR izračunatih na osnovu enzimske aktivnosti u različitim tkivima (jetra i mozak), kao i razlike u ABR vrednostima izračunatih na osnovu ekspresije gena koji učestvuju u endokrinoj regulaciji kod mužjaka i ženki. Posebno su zanimljive visoke vrednosti ABR izračunate na osnovu ekspresije gena biomarkera neurotoksičnosti kod jedinki izloženih uticaju komunalnih otpadnih voda grada Novog Sada.

Vrednost ABR kod jedinki *A. brama* iz prirodnih populacija iz urbane zone Novog Sada prelazi 2, što predstavlja jasan signal prisustva stresa, odnosno mobilizacije adaptivnih mehanizama na zagađenje (nepovoljne uslove) kod jedinki odabrane vrste. Kao i kod kavezno eksponiranih jedinki, primetne su velike razlike u intenzitetu odgovora u zavisnosti od nivoa biološke organizacije.

Tabela 5.10. Postupak izračunavanja prosečnog odgovora biomarkera (ABR) kod *A. brama* iz prirodnih populacija

Biomarkeri	RL		SU	
	medijana	medijana	Normalizovano na referalnu vrednost	Recipročna vrednost
Kondicioni faktori				
BCF	1.16	1.34	1.15	-
HSI	1.20	1.93	1.61	-
ABR kondicioni faktori			1.36	
Enzimska aktivnost				
CAT _j	13.15	14.37	1.092	-
CES _j	0.061	0.098	1.606	-
GST _j	0.285	0.194	0.681	1.469
AchE _j	0.011	0.01	0.909	1.1
ABR _j			1.30	
CAT _m	2.217	3.937	1.776	-
CES _m	0.024	0.037	1.542	-
GST _m	0.201	0.226	1.124	-
AChE _m	0.048	0.037	0.771	1.297
ABR _m			1.41	
ABR enzimska aktivnost			1.35	
Genska ekspresija				
<i>hsp70</i>	0.60	1.68	2.80	-
<i>cox1</i>	0.06	0.003	0.05	20
<i>erk2a</i>	1.61	2.00	1.24	-
<i>cr</i>	0.53	0.67	1.26	-
<i>sod</i>	1.86	0.67	0.36	2.78
<i>gpx1</i>	2.59	19.23	7.42	-
<i>nrf2a</i>	42.33	21.06	0.50	2.01
<i>cyp1a</i>	12.26	5.17	0.42	2.37
<i>mgst3a</i>	1.80	2.08	1.16	-
<i>era</i>	7.59	1.51	0.20	5.03
<i>erβ</i>	0.35	0.03	0.09	11.7
<i>pc</i>	0.54	1.93	3.57	-
<i>pygl</i>	4.82	0.38	0.08	12.7
<i>tfd</i>	712	209	0.29	3.41
<i>mbp</i>	326	540	1.66	-
ABR genska ekspresija			3.5	
ABR svi biomarkeri			2.40	

RL – referentni lokalitet, SU – lokalitet nizvodno od ispusta komunalnih otpadnih voda, grada Novog Sada

U tabeli 5.11. je predstavljena integracija rezultata analize svih biomarkera *in situ* kao LoE 3a (*C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja) i LoE3b (biomarkeri kod *A. brama* iz prirodnih populacija) u multiparametarsku matricu. Na lokalitetu GC raspolaže se podacima iz kaveznog sistema izlaganja, a ABR vrednost od 1.59 ukazuje na umeren signal. Na lokalitetu Subić, pored ABR izračunatog na osnovu rezultata iz kaveznog eksperimenta (ABR 1.90) imamo i ABR od 2.40 na osnovu analize biomarkera kod *A. brama*. Srednja vrednost ABR na lokalitetu Subić stoga iznosi 2.13 i daje jasan signal uticaja zagađenja. U urbanoj zoni Novog Sada (GC), jasan signal (SUM TU > 1) LoE1 se dobija iz rezultata procene ukupnog hroničnog toksičnog pritiska (SUM TUch 1.36) prikazanih u tabeli P14 u prilogu. Vrednost na lokalitetu Subić je nešto niža od 1 (Sum TUch 0.85) što predstavlja umeren signal. Na osnovu rezultata bioanaliza König i sar., 2017 (Tabela 5.3 u poglavlju rezultati) konstatuje se jasan signal na GC i umeren signal na Subiću (LoE2). Na osnovu rezultata analize sastava i strukture ihtiofaune na lokalitetu JDS 33 (nizvodno od grada Novog Sada, JDS 3 report, Focks i sar., 2016; Backhaus i sar., 2017) konstatuje se umeren signal, odnosno, blage promene ihtiofaune (LoE 4).

Tabela 5.11. Multiparametarski pristup proceni uticaja zagađenja na odabranim “crnim tačkama”

	LoE 1	LoE 2	LoE 3 ^{a,b}	LoE 4 ^c
Dunav Novi Sad – GC	2 (Jasan signal)	2	1 ^a	1 ^c
Dunav Novi Sad - Subić	1 (Umeren signal)	1	2 ^{a,b}	
Sava Šabac	Nema podataka	Nema podataka	1	Nema podataka

a *C. carpio* iz kavezne postavke, b *A. brama* iz prirodnih populacija, c – JDS 3 report

Na osnovu dostupnih podataka i mogućih scenarija (Backhaus i sar., 2017, tabela P31 u prilogu), može se konstatovati da zagađenje koje potiče od otpadnih voda grada Novog Sada (komunalno i industrijsko) predstavlja značajan pritisak i da negativno utiče na ekosistemski integritet Dunava nizvodno od Novog Sada. Analize biomarkera *in situ*, a u odsustvu ostalih setova podataka u regionu Šapca, daje indikaciju da zagađenje može predstavljati jedan od potencijalnih pritisaka na ekološki integritet reke Save nizvodno od Šapca.

5.3.2. Studija slučaja Dunav (JDS3)

Multiparametarski pristup proceni uticaja zagađenja primenjen je na većoj prostornoj skali, na nivou velikog dela toka reke Dunav. U okviru JDS 3 kampanje, procena sastava i strukture svih životnih zajednica, uključujući i ihtiofaunu, je urađena u skladu sa principima Okvirne Direktive o vodama, čime su u najvećoj meri obezbeđeni setovi podataka za LoE 4. Kako je tokom JDS 3 analiziran neuporedivo veći broj supstanci u vodi / sedimentu / bioti u odnosu na zahteve monitoringa hemijskog statusa prema WFD, obezbeđeni su podaci za LoE 1. U okviru projekta Solutions, na određenom broju lokaliteta obuhvaćenih JDS 3 kampanjom urađene su brojne bioanalize (čime je obezbeđen ograničen set podataka LoE 2) i biomarkeri kod jedinki riba iz prirodnih populacija *Neogobius melanostomus* i *Alburnus alburnus* (LoE 3), čiji je deo (ekspresija gena kod *A. alburnus*) bio i predmet rada ove disertacije. Studija slučaja Dunav je poslužila da se proceni relevantnost uključivanja genske ekspresije u bateriju biomarkera u okviru LoE 3 parametarskog seta, na širokoj prostornoj skali.

Za razliku od prethodne studije slučaja sa jasno definisanim referalnim lokalitetom, JDS 3 karakteriše odsustvo lokaliteta koji možemo identifikovati kao referalni. Poseban problem čini nepostojanje referalnih vrednosti za biomarkere (svih nivoa biološke organizacije) za lokalno relevantne vrste riba. Zbog toga se proces određivanja ABR razlikuje od procedure primenjene u studiji slučaja Dunav.

Osnovna razlika je u normalizaciji vrednosti odgovora biomarkera. U odsustvu referalnih vrednosti, primenjen je drugi od uobičajenih načina normalizacije u ekotoksikologiji, a to je normalizacija na maksimalnu vrednost medijane svakog od analiziranih odgovora biomarkera. Ovaj princip naravno podrazumeva da se maksimalni odgovor biomarkera očekuje na mestu najvećeg uticaja. Zbog načina normalizacije, smer promene moramo razmotriti i uračunati u odgovor pre same normalizacije. To u praksi znači da se na osnovu ekspertskog mišljenja mora *a priori* definisati smer promene koju očekujemo za svaki od biomarkera. Ukoliko je odabran neki od biomarkera kod koga se porastom uticaja (zagađenja) očekuje smanjenje odgovora, medijane odgovora takvih biomarkera se moraju transformisati, što je primenjeno u JDS 3 setu biomarkera samo kod aktivnosti enzima AChE (Backhaus i sar., 2017). Za gensku ekspresiju (koja je predmet ove disertacije) dodatna obrada podataka nije potrebna, jer se za sve odabrane gene *a priori* podrazumevalo povećanje ekspresije sa porastom pritiska (zagađenja). Obzirom da se medijane odgovora biomarkera normalizuju na maksimum, mogući odgovor biomarkera se kreće u rasponu od 0 do 1. Vrednost ABR od 0.1 znači 10% maksimalnog odgovora, 0.5 znači 50% od maksimalnog odgovora a ABR 1 znači 100% od maksimalnog odgovora. Klasifikaciona šema u ovakvim slučajevima izgleda na sledeći način:

Klasa 0 – izostanak signala stresa: $ABR < 0.1$

Klasa 1 – slab signal – naznaka stresa: $0.1 < ABR < 0.5$

Klasa 2 - jasan signal stresa: $ABR > 0.5$

U tabeli 5.12. je prikazana transformacija rezultata genske ekspresije u cilju izračunavanja srednjeg odgovora ekspresije odabranih gena koji se sa rezultatima ostalih dostupnih analiziranih biomarkera (Backhaus i sar., 2017) mogu uključiti u jedinstven ABR i iskoristiti kao LoE 3.

Rezultati prikazani u tabeli 5.12. čak i na izolovanom primeru genske ekspresije ukazuju na problem identifikacije potencijalnog referalnog lokaliteta. Evidentno je da ne postoji lokalitet na kome je zabeležena minimalna vrednost ekspresije sva četiri odabrana gena. Sa druge strane, maksimalne vrednosti odgovora četiri odabrana gena registrovane su na četiri različita lokaliteta. Normalizacijom na maksimalni odgovor za svaki od gena, prosečne vrednosti ABR za gensku ekspresiju kreću se od 0.2 do 0.7, ali odgovor na samo tri lokaliteta daje jasan signal stresa (klasa 2), dok svi ostali odgovori svrstavaju lokalitete u klasu 1.

Tabela 5.12: Transformacija rezultata ekspresije odabranih gena kod jedinki vrste *Alburnus alburnus* sa deset reprezentativnih JDS 3 lokaliteta

JDS	<i>erk2</i>		<i>mgst3a</i>		<i>gpx1</i>		<i>nrf2a</i>		ABR
	medijana	Normalizovana medijana	medijana	Normalizovana medijana	medijana	Normalizovana medijana	medijana	Normalizovana medijana	
31	0.004**	0.157	0.005**	0.154	4.054	0.645	1.655	0.467	0.249
33	0.005	0.175	0.029	0.895	3.651	0.581	2.017	0.569	0.450
36	0.007	0.255	0.016	0.494	4.312	0.686	3.372	0.952	0.442
48	0.004**	0.167	0.020	0.621	3.977	0.633	1.236**	0.349	0.403
54	0.009	0.348	0.007	0.227	1.213**	0.193	1.349	0.381	0.248
60	0.009	0.343	0.033*	1	6.285*	1	2.762	0.780	0.7
62	0.008	0.292	0.021	0.637	4.274	0.680	3.299	0.931	0.502
65	0.004**	0.164	0.005**	0.141	2.101	0.334	1.674	0.472	0.198
66/92	0.026*	1	0.005**	0.159	2.741	0.436	3.542*	1	0.411
67	0.021	0.783	0.028	0.843	2.502	0.398	3.225	0.910	0.640

ABR – geometrijska sredina, *Max medijana od 10 lokaliteta na koju su normalizovani odgovori sa ostalih lokaliteta, **Min medijana od 10 lokaliteta

Ekspresija dodatnih gena (Tabela 5.13) analizirana je kod uzoraka *A. alburnus* sakupljenih sa lokaliteta JDS 31 (Bačka Palanka), 33 (Novi Sad) i 48 (ušće reke Timok u Dinav) jer su to lokaliteti sektora Dunava na toku kroz Srbiju na kom izostaje prekogranični uticaj, radi provere postojanja gradijenta uticaja, što je potvrđeno evidentnim pojačanjem signala niz tok.

Tabela 5.13 Odgovor proširenog seta gena na lokalitetima na toku Dunava kroz Srbiju

	JDS 31		JDS 33		JDS 48	
	medijana	Normalizovana medijana na max medijanu	medijana	Normalizovana medijana na max medijanu	medijana	Normalizovana medijana na max medijanu
<i>erk2</i>	0.004	0.9	0.005*	1	0.004	0.95
<i>mgst3a</i>	0.005	0.16	0.029*	1	0.020	0.69
<i>gpx1</i>	5.03*	1	3.65	0.73	3.98	0.79
<i>nrf2a</i>	1.10	0.55	2.02*	1	1.24	0.61
<i>Cyp1a</i>	0.02	0.404	0.014	0.276	0.051*	1
<i>sod</i>	0.0015*	1	0.0007	0.479	0.0013	0.91
<i>pc</i>	0.005	0.505	0.008	0.733	0.011*	1
<i>pygl</i>	0.175	0.586	0.227	0.757	0.299*	1
<i>tfd</i>	5.936	0.612	0.317	3.55	9.706*	1
<i>ABR svi geni</i>	0.56		0.63		0.87	

ABR – geometrijska sredina, *Max medijana od 3 lokaliteta

Tabela 5.14. prikazuje integraciju genske ekspresije u bateriju svih raspoloživih biomarkera na 10 odabranih lokaliteta na reci Dunav. Vrednosti ABR na četiri lokaliteta prelaze 0,5, što predstavlja jasan signal stresa. Na preostalih šest lokaliteta signal je umeren.

Tabela 5.14. Integracija svih raspoloživih biomarkera u studiji slučaja Dunav

<i>Neogobius melanostomus</i>						<i>Alburnus alburnus</i>								ABR			
Aktivnost enzima ^a						Aktivnost enzima ^a					Genotox ^a		Genska ekspresija				
JDS3	GST	EROD	CAT	CES	AChE	GST	EROD	CAT	CES	AChE	MN [§]	Comet [§]	<i>erk2</i>		<i>gpx1</i>	<i>mf2a</i>	<i>mgst3a</i>
31	1.0	0.2	0.8	0.9	0.4	0.5	0.3	0.6	0.7	0.8	0.5		0.2	0.6	0.5	0.2	0.46
33	0.1	0.0	0.4	0.4	0.1	0.2	0.5	0.4	0.5	0.8	0.4	0.3	0.2	0.6	0.6	0.9	0.30
36	0.8	0.3	0.8	0.8	0.2	0.2	0.1	0.4	0.4	1.0	0.4		0.3	0.7	1.0	0.5	0.45
48	0.7	0.7	0.7	0.7	0.4	0.4	1.0	0.8	0.7	0.9	0.1		0.2	0.6	0.3	0.6	0.52
54	0.7	0.3	0.7	0.9	0.4	0.8	0.7	0.6	0.5	0.8			0.3	0.2	0.4	0.2	0.49
60	0.3	0.2	0.7	0.3	1.0		0.1				1.0		0.3	1.0	0.8	1.0	0.49
62	0.6	0.4	0.7	0.7	0.4	0.7	0.4	0.5	0.6	0.7	0.2	0.2	0.3	0.7	0.9	0.6	0.51
65	0.4	0.2	0.5	0.7	0.5	0.6	0.7	0.6	0.6	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.5	0.1	0.39
66	0.6	1.0	0.5	0.7	0.2	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.2		1.0	0.4	1.0	0.2	0.58
67	0.4	0.2	0.7	0.4	0.5	1.0	0.3	0.9	0.8	0.6	0.4	0.1	0.8	0.4	0.9	0.8	0.51

^aPodaci preuzeti iz Backhaus i sar., 2017., § Deutshman i sar, 2016

U tabeli 5.15 je prikazana integracija svih raspoloživih setova parametara za odabrane lokalitete. Podaci korišćeni za LoE 1 i 4 potiču iz zvaničnog izveštaja JDS 3 kampanje (JDS 3 report) Vrednosti LoE 1 dobijene su veoma konzervativnim pristupom, izračunavanjem ukupnih akutnih toksičnih jedinica (Backhaus i sar., 2017). Na ovaj način su svi odabrani lokaliteti svrstani u klasu 2 – jasan signal zagađenja. Što se tiče sastava i strukture ihtiofaune, biotički indeksi samo na dva lokaliteta (JDS 48 i 60) ukazuju na značajne negativne promene na nivou životne zajednice, dok na ostalim lokalitetima ukazuju na blage promene. Nažalost, samo za polovinu odabranih lokaliteta postoje podaci za LoE 2 dobijeni bioanalitičkim tehnikama (Schulze i sar., 2015; Neale i sar., 2015). Jasan signal efekta hemijskog stresa (prema Backhaus i sar., 2017) je identifikovan na dva od pet lokaliteta (JDS 36 i 65), dok je na ostala tri lokaliteta signal blag.

Uključivanje LoE 2 i 3 u integralni mutiparametarski pristup pruža mogućnost identifikacije uzroka značajnih ekoloških efekata, odnosno negativnih promena na nivou ihtiofaune na dva lokaliteta, JDS 48 i 60. Kod JDS 48 rezultati ukazuju da zagađenje predstavlja značajan pritisak i da su promene na nivou ihtiofaune najverovatnije uzrokovane zagađenjem. Kod JDS 60 sa druge strane, iako je zagađenje nesumnjivo prisutno, čini se da aktivirani adaptivni mehanizmi mogu da se izbore sa hemijskim stresom, a da se uzroci negativnih promena na nivou ihtiofaune moraju tražiti i u drugim tipovima pritiska na akvatične ekosisteme, kao što su promene načina upotrebe priobalja, hidromorfološke promene, prekomerni selektivni izlov i sl.

Tabela 5.15. Integracija svih raspoloživih setova parametara u studiji slučaja Dunav

JDS 3	LoE 1	LoE 2	LoE 3	LoE 4	Komentar
31	2	n.p.	1	1	Zagađenje prisutno, adaptivni mehanizmi aktivirani, blage promene na nivou ihtiofaune uzrokovane ukupnim antropogenim pritiskom, uključujući i zagađenje
33	2	1	1	1	
36	2	2	1	1	
48	2	n.p.	2	2	Zagađenje predstavlja značajan pritisak, promene na nivou ihtiofaune uzrokovane zagađenjem
54	2	n.p.	2	1	Zagađenje predstavlja značajan pritisak, blage promene na nivou ihtiofaune najverovatnije direktna posledica zagađenja
60	2	1	1	2	Zagađenje prisutno, adaptivni mehanizmi aktivirani, uzroke negativnih promena na nivou ihtiofaune treba tražiti i u drugim tipovima pritisaka (verovatno hidromorfološke promene)
62	2	n.p.	2	1	Zagađenje predstavlja značajan pritisak, blage promene na nivou ihtiofaune najverovatnije direktna posledica zagađenja
65	2	2	1	1	Zagađenje predstavlja značajan pritisak, adaptivni mehanizmi aktivirani, blage promene na nivou ihtiofaune uzrokovane ukupnim antropogenim pritiskom, ne isključivo zagađenjem
66	2	n.p.	2	1	Zagađenje predstavlja značajan pritisak, blage promene na nivou ihtiofaune najverovatnije direktna posledica zagađenja
67	2	1	2	1	

n.p. Nema podataka

6. DISKUSIJA

6.1. Studija slučaja Novi Sad

6.1.1. Potvrda hemijskog pritiska u urbanoj zoni Novog Sada

Zvanični podaci monitoringa ukazuju da je hemijski status (na osnovu koncentracija prioritetnih polutanata u vodi) umeren do dobar na ispitivanoj deonici i da se nije suštinski razlikovao između tri lokaliteta uzorkovanja (SEPA 2017, 2018). Hemijski status reke Dunav na lokalitetima uzorkovanja Novi Sad, u urbanoj zoni je bio dobar, dok su u istom periodu koncentracije pojedinih polutanata povremeno prelazile standarde kvaliteta životne sredine (EQS) na Bezdanu i Bogojevu. Koncentracije pojedinih polutanata u sedimentu na lokalitetu Novi Sad su bile više u odnosu na Bezdan, ali nisu prelazile granične vrednosti za sediment koje su definisane nacionalnim propisima (Sl. glasnik RS. 50/2012). Na osnovu zvaničnih podataka, ukupni hronični toksični pritisak u Dunavu se najviše može pripisati metalima. Zbog veoma ograničenog broja potencijalno toksičnih organskih supstanci koje se zvanično prate i mere iznad graničnih vrednosti detekcije, ukupni hronični toksični pritisak poreklom od organskih supstanci izgleda zavaravajuće nisko. Na ovaj način se potcenjuje potencijalni uticaj nereguliranih supstanci i supstanci koje se ne prate u okviru regulatorno propisanog monitoringa, kao i njihovih smeša (König i sar., 2017; Altenburger i sar., 2019; Brack i sar., 2019a).

Ipak, detaljne hemijske analize uzoraka vode koje su uzete na lokalitetima Bogojevo i Novi Sad u okviru JDS3 (Liška i sar., 2015), su pokazale značajne razlike u hroničnom toksičnom pritisku koji potiče od organskih supstanci, između ova dva lokaliteta. Iako je broj supstanci koje su bile iznad limita kvantitacije bio približan, ukupan hronični pritisak (izražen kao suma toksičnih jedinica - SUM TUch) na dva lokaliteta uzorkovanja u okviru urbane zone Novog Sada je značajno viši u poređenju sa lokalitetom koji se nalazi u zaštićenom području. Ova razlika ukazuje na značajan pritisak neprečišćenih otpadnih voda Novog Sada. Potvrda o tome je dobijena i analizom LVSPE uzoraka koji su sakupljeni na lokalitetima nizvodno, direktno na ispustu i uzvodno od ispusta komunalnih efluenata u kojima je detektovan veliki broj supstanci iz različitih grupa kao što su lekovi, industrijske hemikalije i pesticidi (König i sar., 2017). Hemijska karakterizacija uzoraka vode Dunava u regionu Novog Sada je ranije sprovedena u okviru drugih istraživanja, pri čemu je ova zona prepoznata kao “crna tačka”, odnosno lokalitet pod visokim pritiskom zagađenja (Milić i sar., 2018; Savic i sar., 2018).

Pored čisto hemijskih pristupa, sproveden je određen broj istraživanja u kojima su kombinovane hemijske analize i bioeseji uzoraka vode Dunava iz ove oblasti, na različitim eksperimentalnim modelima, među kojima je i pERK1/2 imunoesej koji je primenjen u okviru ove teze.

6.1.2. pERK imunoesej kao dijagnostički alat za procenu efekata kompleksnih smeša iz životne sredine

Signalni put mitogenim faktorima aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK)/ekstracelularnim signalom regulisane kinaze (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK1/2) učestvuje u regulaciji različitih važnih procesa u ćeliji, kao što su adhezija i migracija ćelija, progresija ćelijskog ciklusa, preživljavanje, diferencijacija, metabolizam, proliferacija i transkripcija (Rubinfeld i Seger, 2005), omogućavajući koordinisanje i integraciju odgovora na različite stimulse kao što su hormoni, faktori rasta, citokini i različiti stresori iz okoline (Plotnikov i sar., 2011). ERK1/2 signalni put je evolutivno konzervisan i jedna je od najvažnijih komponenti u odgovoru ćelija na nefiziološke stimulse, kao što su hemikalije prisutne u životnoj sredini (Stanic i sar., 2021). Njegova aktivacija u

različitim tipovima sisarskih ćelija se pokazala kao osetljiv indikator izlaganja pojedinačnim supstancama kao što su polibromovani usporivači gorenja (Fa i sar., 2014) i različiti ksenoestrogeni (Jeng i Watson, 2011; Viñas i Watson, 2013). Pored toga, aktivacija istog signalnog puta je uočena kod akvatičnih organizama kao npr. kod jedne vrste morskog sunđera usled izlaganja tributilkalaju (Chatel i sar., 2011) i kod riba usled izlaganja insekticidu endosulfanu (Tellez–Banuelos i sar., 2011), kao i prilikom *in vitro* izlaganja hepatoma ćelija riba teškim metalima i prooksidansima (Burlando i sar., 2003).

Iz navedenih razloga ovaj signalni put je odabran kao potencijalno osetljiv parametar koji bi se mogao upotrebiti za detekciju ranih efekata kompleksnih smeša iz životne sredine poput efluenta komunalnih otpadnih voda u našem istraživanju, pri čemu na veliki potencijal visokog hemijskog opterećenja u urbanoj zoni Novog Sada, da izazove različite specifične i nespecifične efekte ukazuju rezultati drugih istraživanja koja su koristila različite *in vitro* metode za ispitivanje efekata uzoraka sa ovih lokaliteta. Tako su Hrubik i sar., 2016 istakli efekat uzoraka vode komunalnih otpadnih voda Novog Sada na odgovore kao što su indukcija CYP1A enzima, citotoksičnost na humanim ćelijskim linijama i pojava razvojnih abnormalnosti kod embriona zebrića. Pored toga Shultze i sar., 2015; Neale i sar., 2015 su uočili efekte u bateriji bioeseja (inhibicija algalnog rasta, mutagenost, oksidativni stres i metabolizam ksenobiotika) koji su primenjeni na JDS3 uzorku iz urbane zone Novog Sada (tabela 6.1).

Pomoću primenjenog pERK1/2 imunoeseja u našem istraživanju samo u pojedinim slučajevima uočena je aktivacija ERK1/2 signalnog puta primenom uzoraka vode Dunava Potencijal uzoraka sa GC lokaliteta da indukuju ERK1/2 odgovor je teško proceniti, imajući u vidu raspon koncentracija koji je analiziran, a koji je niži u odnosu na ostale uzorke, kao i specifičan nemonoton dozni odgovor koji se javio pri tretmanu neutralnom frakcijom GC uzorka. pERK1/2 esej je pokazao najveću osetljivost pri tretmanu neutralnom i kiselom frakcijom, što ukazuje da jedinjenja koja u većoj meri indukuju odgovor pripadaju grupi polarnih i umereno polarnih supstanci. Pored toga, kao odgovor na pojedine tretmane javila se i inhibicija, što dodatno usložnjava tumačenje rezultata u kontekstu osetljivosti i prirode ERK1/2 odgovora na prisustvo ksenobiotika. Baterija eseja kojima je analizirana potentnost neutralne frakcije uzoraka vode (König i sar., 2017) sa sva tri lokaliteta u zoni Novog Sada, ukazala je na visoku potentnost ove frakcije i organskih polutanata koje sadrži, a naročito uzorka sa GC lokaliteta, pri čemu su uočeni stimulatorni efekti na aktivaciju metabolizma ksenobiotika, adaptivne odgovore na stres (oksidativni stres i inflamaciju), aktivaciju signalnih puteva estrogena, progesterona i androgena, aktivnost posredovanu arilhidrokarbonskim receptorom (AhR), aktivnost sličnu glukokortikoidima (tabela P17 je data u prilogu). Ipak, pitanja o tome da li se biološki efekti koji su uočeni *in vitro* mogu smatrati indikatorima verovatnih ekoloških efekata i da li uticaj može biti potvrđen negativnim efektima u bioti, individualnom i populacionom nivou ili nivou zajednice, ostaju otvorena.

Uopšteno, nivo korelacije koji je utvrđen između pERK1/2 odgovora i supstanci koje su detektovane u testiranim uzorcima je nizak, pri čemu se kao grupa supstanci ističu samo pesticidi različitih načina delovanja. Ovakav rezultat nije neočekivan s obzirom na to da aktivacija ovog signalnog puta nije specifičan odgovor za određenu grupu supstanci već na njega mogu uticati brojne supstance (Plotnikov i sar., 2011). Efekti specifičnih eseja poput onih koji pokrivaju korake u hormonskoj regulaciji u velikoj meri mogu da se objasne prisustvom hormonski aktivnih supstanci, dok odgovori uočeni u esejima kao što su adaptivni odgovori na stres, metabolizam ksenobiotika i oksidativni stres često ostaju neobjašnjeni ili u malom procentu povezani sa pojedinačnim supstancama (Neale i sar., 2015; König i sar., 2017). Jedan od primera, na istim uzorcima koji su primenjeni u našem istraživanju, sa sličnim zaključkom je istraživanje Hashmi i sar., 2018. Kao nosioci efekata uočeni u esejima koji se tiču hormonskih receptora prepoznati su reproduktivni hormoni, dok odgovori eseja koji se baziraju na merenju parametara oksidativnog stresa, nakon frakcionacije više nisu bili uočljivi, što

dovodi do zaključka da su nespecifični odgovori poput oksidativnog stresa, rezultat kumulativnog efekta smeša koji čini veliki broj supstanci u uzorku, pre nego efekta pojedinačnih supstanci.

Pored stimulatornog efekta koji je uočen primenom uzoraka vode Dunava, u okviru našeg istraživanja, za kiselu i baznu frakciju sa lokaliteta GC, kao i neutralnu sa nizvodnog lokaliteta Subić, je uočen i inhibitorni efekat pri dužem vremenu tretmana. Ovakav odgovor se potencijalno može objasniti pristupom supstanci koje deluju kao inhibitori multikinaza (ERK–kinaznu aktivnost), kao što su pojedini lekovi i njihove smeše koji se koriste pri hemioterapiji određenih vrsta karcinoma poput hepatocelularnog karcinoma (Wang i sar., 2018). Ovi autori su ukazali na inhibiciju pERK odgovora, kao sinergističkog efekta više lekova za tretman različitih vrsta karcinoma jetre, između ostalih modela, *in vitro* na Hep G2 ćelijskoj liniji koja je korišćena u našem istraživanju.

Osetljivosti pERK1/2 eseja, kao novouspostavljenog eseja osetljivog na pojedinačne supstance različitog mehanizma delovanja (Stanić i sar., 2021), a čiji značaj u proceni toksičnog potencijala kompleksnih smeša uzoraka iz okoline tek treba da se utvrdi, procenjena je i poređenjem EC_{IR1.5} odgovora sa odgovorima izmerenim u već standardno primenjivanim *in vitro* esejima (König i sar., 2017). Osetljivost pERK imunoeseja se pokazala kao manja u poređenju sa većinom bioeseja koji pokrivaju nespecifične odgovore poput aktivacije metabolizma ksenobiotika i adaptivne odgovore na stres, a čiji rezultati su publikovani u König i sar., 2017 i dati u tabeli P17 u prilogu. Izuzetak je odgovor PPAR γ i anti PPAR eseja, koji je indukovano većim REF vrednostim uzoraka sa lokaliteta Subić u odnosu na pERK esej, što je možda uslovljeno prisustvom određenih supstanci na lokalitetu SU koje utiču na aktivaciju ERK1/2 više u odnosu na peroksizom proliferator– aktivirani receptor γ . ERK1/2 put osetljiv je na različite tipove ksenobiotika i aktivira se ubrzo po izlaganju. Stanić i sar. (2021) su pokazali da je pERK1/2 esej na HepG2 ćelijskoj liniji naročito osetljiv na benzo(a)piren, bisfenol A, atrazin i ibuprofen, dok je neosetljiv na perfluorooktansulfonsku kiselinu (PFOS) i fungicid karbendazim. Već na osnovu podataka o različitoj osetljivosti eseja i različitih obrazaca odgovora koji su do sada definisani za veoma mali broj supstanci, može se pretpostaviti da pri tretmanu kompleksnim smešama uzoraka iz životne sredine ukupan odgovor može da zavisi od niza složenih sinergističkih i/ili antagonističkih interakcija, čime pojedinačni stimulatorni ili inhibitorni efekti mogu biti zamaskirani. Fiziološki značaj promene aktivnosti ERK1/2 signalnog puta je teško predvideti imajući u vidu veliki broj fizioloških procesa u čijoj kontroli učestvuje, kao i interakcije sa drugim signalnim kaskadama. Pokazano je da postepena i kratkotrajna stimulacija ERK1/2 rezultira stimulacijom ćelijske proliferacije, kao i to da promene u aktivnosti ERK1/2 signalnog puta mogu biti povezane sa promenama u vijabilnosti ćelija (Vrana i sar., 2014). Iako je uopšteno veća osetljivost pERK eseja bila očekivana na osnovu prethodne validacije metode sa pojedinačnim supstancama, kao što su bisfenol a i tributalkalaj (Jovičić, 2015; Stanić i sar., 2021), većina bioeseja sa kojima je pERK imunoesej poređen su standardizovane metode, za koje se kitovi komercijalno proizvode. S obzirom na tu činjenicu i na indukciju odgovora pERK eseja u svim uzorcima, pERK bioesej bi, uz potencijalne dodatne optimizacije za kompleksne uzorke iz životne sredine, mogao biti koristan dodatni alat u sklopu baterije drugih *in vitro* eseja u svrhu detekcije efekata zagađenja.

6.1.3. Biomarkeri kod riba u studiji slučaja Novi Sad

6.1.3.1. Opšte stanje jedinki

Biometrijski parametri kao što kondicioni faktor (BCF) i hepatosomatski indeks (HSI) su pouzdani indikatori za procenu opšteg stanja i uhranjenosti jedinki, a mogu ukazivati na dugoročne promene zdravlja riba uslovljene nepovoljnim faktorima iz životne sredine. Kondicioni faktor je parametar koji se često koristi za procenu zdravstvenog statusa riba i

predstavlja dobar indikator kvaliteta vode ili opšteg zdravlja populacija riba koje nastanjuju određeno stanište ili ekosistem (Tsoumani i sar., 2006), kao i hepatosomatski indeks na čiju vrednost primarno utiču izloženost polutantima i ishrana jedinki (Teubner i sar., 2015).

6.1.3.1.1. Opšte stanje kavezno izloženih jedinki

Ujednačenost kondicionog faktora između grupa jedinki *C. carpio*, koje su bile izložene na različitim lokalitetima ukazuje na uopšteno dobar nutritivni status jedinki što je potvrđeno izostankom značajnih razlika u odnosu na grupu jedinki koja je žrtvovana pre početka kaveznog izlaganja (Tabela P10, u prilogu). S obzirom na potvrđenu i prethodno diskutovanu razliku u hemijskom pritisku na poređenim lokalitetima, izostanak razlike u vrednostima kondicionog faktora između analiziranih grupa jedinki može sugerisati da je za promene ovog parametra, kao biomarkera zagađenja, neophodan duži period kaveznog izlaganja.

Analizom kondicionog faktora, razdvojenoj po polovima, kod kavezno izloženih jedinki mužjaka se može uočiti da je vrednost BCF bila viša kod jedinki mužjaka koje su žrtvovane pre početka izlaganja u odnosu na jedinke nakon devetodnevnog izlaganja (vrednosti su prikazane u prilogu, tabela P12). Uočena razlika u BCF kod mužjaka je verovatno posledica više stope metabolizma kod mužjaka u odnosu na ženke (Madenjian i sar., 2016), što se odrazilo na brže smanjenje mase tela mužjaka usled gladovanja tokom devetodnevnog kaveznog izlaganja, a uslovljeno različitim energetske potrebama u reproduktivnoj strategiji riba različitog pola, pri čemu je potrošnja energetskih rezervi kod ženki konzervativnija, radi omogućavanja reprodukcije i u vodotocima sa oskudnom hranom, dok je viša stopa metabolizma kod mužjaka favorizovana zbog veće pokretljivosti jedinki odnosno bržeg plivanja (Li i sar., 2017).

Jetra je važno skladište energetskih rezervi kod riba, pa niske HSI vrednosti mogu biti uočene kod jedinki koje su u stanju gladovanja ili na slaboj ishrani, usled mobilizacije glikogenskih rezervi iz jetre za bazalni metabolizam, ranije u odnosu na proteine iz mišića, što je verovatno razlog smanjenog HSI kod jedinki nakon kaveznog izlaganja u odnosu na jedinke žrtvovane pre početka kaveznog izlaganja (Tocher i sar., 2003; Teubner i sar., 2015). Sa druge strane Yarmohammadi i sar. 2012 i Hernández i sar., 2019 su uočili značajno smanjenje oba indeksa kod jedinki riba tek nakon dve nedelje gladovanja. Uzevši u obzir detaljne hemijske analize tkivnog i serumskog sadržaja jedinki koje su žrtvovane pre početka izlaganja, ne treba isključiti ni mogućnost postojanja hipertrofije jetre pre početka perioda kaveznog izlaganja, koja je smanjena tokom perioda kaveznog izlaganja u Dunavu i Savi. Hipertrofija jetre, osim trajnih oštećenja, može podrazumevati adaptivni odgovor na izloženost ksenobiotcima zbog potrebe za intenzivnijom funkcijom (Williams i Iatropoulos, 2002; Hall i sar., 2012), te stoga može biti reverzibilna nakon prestanka izlaganja ksenobiotcima. Reverzibilnost promena su uočili Böhm i Moser 1976. 10 dana od prestanka izlaganja pacova fenobarbitalu, s tim da i gubitak glikogena usled gladovanja i posledično smanjenje mase jetre može maskirati postojanje hipertrofije (Li i sar., 2003).

Smanjene vrednosti HSI, pored nedostatka hrane mogu biti rezultat i promene ponašanja riba vezanog za ishranu, usled prisustva zagađenja, ali i usled subletalne hepatotoksičnosti ksenobiotika, što može biti uzrok smanjene vrednosti HSI na lokalitetu GC koji je pod većim hemijskim opterećenjem u odnosu na referentni lokalitet, iako histopatološke analize uzoraka jetri nisu istakle patološke promene ni razlike u glikogenskim rezervama među poređenim lokalitetima izlaganja (neobjavljeni rezultati, Solutions). Iako u većini slučajeva hemijski pritisak rezultira u povišenom HSI kod jedinki riba koje su izložene zagađenju, pojedina istraživanja su prikazala smanjene vrednosti HSI kod jedinki riba na lokalitetima u blizini komunalnih efluenata (Ma i sar., 2005; Sadekarpawar i Parikh, 2013; Araújo i sar., 2018).

Kao dodatni parametar reproduktivnog zdravlja riba i potencijalnih efekata zagađenja preporučljive su i histopatološke analize gonada radi detekcije tkivnih abnormalnosti i patoloških promena (Pieterse, 2004). Međutim, na gonadama jedinki *C. carpio* histopatološkom

analizom nisu uočene promene ni na jednom od lokaliteta. Pored promena, analiziran je i stepen gonadalne zrelosti koji je bio viši kod ženki u odnosu na mužjake, što je bilo u skladu sa vrednostima gonadosomatskog indeksa (tabela u prilogu, P18).

6.1.3.1.2. Opšte stanje jedinki *A. brama* iz prirodnih populacija

Vrednosti kondicionog faktora *A. brama* sugerišu dobro nutritivno stanje jedinki iz obe populacije, pri čemu su vrednosti BCF populacije nizvodno od Novog Sada bile značajno više. Vrednosti koeficijenta korelacije, manje od 0.05 između vrednosti BCF i starosti jedinki su isključile uticaj starosti jedinki, kao jednog od faktora koji je mogao uticati na razliku u vrednosti BCF (Morgan, 2004). Više vrednosti BCF na lokalitetu koji je pod višim hemijskim pritiskom mogu biti posledica vremenske razlike u uzorkovanju. Jedinke na referentnom lokalitetu su uzorkovane u aprilu, a na nizvodnom lokalitetu u junu. Do smanjenja mase somatskog tkiva i posledično nižeg BCF dolazi u proleće usled diferencijacije i rasta reproduktivnog tkiva, koje zahteva preraspodelu energetske rezervi tokom perioda pre mresta, a takođe može zavisiti i od dostupnosti hrane i stope metabolizma riba, koji su uslovljeni sezonskim promenama temperature vode (Kortet i sar., 2003; De Giosa i sar., 2014; Yurchenko i Morozov, 2019). U prilog ovoj pretpostavci idu i podaci o vrednostima BCF iz istraživanja Treer i sar., 2003 koje su tokom februara u delu Dunava koji protiče kroz Hrvatsku bile 2.44, a srednje vrednosti kod jedinki iz našeg istraživanja koje su uzorkovane u period april–jun 2018. su niže nego u pomenutom istraživanju (1.34).

Kao što je u prethodnom tekstu pomenuto jetra je organ koji je pretežno zadužen za biotransformaciju i detoksikaciju ksenobiotika, a izloženost polutantima može dovesti do hipertrofije ćelija i povećanja veličine jetre radi akomodacije na povećano funkcionalno opterećenje, kao adaptivni odgovor na izlaganje ksenobiotcima (Williams i Iatropoulos 2002). Značajno viši HSI kod riba izloženih nizvodno od Novog Sada (ekspozirane populacije) verovatno predstavlja indikator hipertrofije jetre uzrokovane hemijskim zagađenjem, s obzirom na to da ni jedan od lokaliteta uzorkovanja ne oskudeva u izvorima hrane za *A. brama*.

Sudeći po rezultatima našeg istraživanja pri analizi biometrijskih parametara riba, u kaveznom sistemu izlaganja, gde su ribe onemogućene da samostalno pronalaze hranu treba obratiti pažnju na dužinu kaveznog izlaganja i na ujednačenost dužine gladovanja između analiziranih grupa. Takođe, kako bi biometrijski parametri mogli da se tumače kao efekat zagađenja, jedna od mogućnosti bi mogla biti duža ekspozicija uz eliminaciju faktora gladovanja, dohranom, što bi u slučaju brzotekuće reke bilo tehnički izazovno. Pored dužine izlaganja, u kontekstu gonadosomatskog indeksa, važno je i odabrati odgovarajući i ujednačen uzrast jedinki i stadijum reproduktivnog ciklusa koji podrazumeva i adekvatnu sezonu postavke, pre početka rasta reproduktivnog tkiva, a ne neposredno pred mrest ili posle.

U analizi biometrijskih parametara kod slobodnoživećih riba je neophodno ujednačiti vreme uzorkovanja na svim lokalitetima kako bi se eliminisala mogućnost da razlika među grupama u biometrijskim parametrima bude posledica sezonske varijabilnosti i stadijuma reproduktivnog ciklusa.

6.1.3.2. Biomarkeri oksidativnog stresa i metabolizma ksenobiotika

Indukcija sistema antioksidativne zaštite i enzima metabolizma ksenobiotika kod riba (posebno CYP1A1/2), se koriste već decenijama u istraživanjima koja koriste biomarkere u proceni efekata polutanata (Van der Oost i sar., 2003).

Ovi parametri predstavljaju mrežu međusobno povezanih biohemijskih i fizioloških odgovora, pri čemu promena u svakom parametru utiče na nekoliko drugih događaja, dok opšti obrazac odgovora određuje sudbinu organizma pod uticajem različitih faktora, u zavisnosti od toga da li je adaptiran na postojeće uslove životne sredine ili je njegova homeostaza ugrožena.

U ovoj složenoj mreži, antioksidativni sistem odbrane ima glavnu ulogu u blokiranju štetnih efekata reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), čija je produkcija često povezana sa biotransformacijom ksenobiotika kroz mnoštvo reakcija u kojima se ROS oslobađaju direktno ili indirektno (Klotz i Steinbrenner, 2017).

Katalaza (CAT) je jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima koji je prisutan kod svih aerobnih organizama, a osnovna uloga mu se ogleda u razgradnji dva molekula vodonik peroksida od kojih nastaje jedan molekul kiseonika i dva molekula vode (Von Ossowski i sar., 1993), dok je zaštitna uloga glutation s–transferaze (GST) kod riba značajna zbog važne uloge u II fazi biotransformacije ksenobiotika gde ovaj enzim katališe konjugaciju glutationa sa brojnim elektrofilnim supstancama koje nastaju najčešće u fazi I biotransformacije ksenobiotika, a ujedno i uloge antioksidanta za uklanjanje reaktivnih kiseoničnih čestica (Tsuchida, 2002).

Smanjena aktivnost katalaze u jetri jedinki *C. carpio* koje su bile izložene kavezno, na svim lokalitetima u odnosu na referentni je potencijalni rezultat visoke produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta koje mogu inhibirati katalazu u slučaju prevelike produkcije (Kono i Fridovich, 1982; Falfushynska i Stoliar, 2009).

Pored navedenih enzima, inhibicija aktivnosti karboksilesteraze (CES), kao enzima koji učestvuje u metabolizmu ksenobiotika kao što su brojni pesticidi, droge i lekovi je jedan od najčešće korišćenih biomarkera efekta (Satoh i sar., 1994; Cashman i sar., 1996). Pored indukcije aktivnosti CES, pojedine supstance kao što su lekovi koji se koriste za smanjenje neželjenih efekata hemioterapeutika mogu inhibirati aktivnost CES (Hatfield i Potter, 2011; Hatfield i sar., 2017). S obzirom na dokazano prisustvo velikog broja lekova u komunalnim otpadnim vodama Novog Sada, smanjena aktivnost CES u jetri jedinki *C. carpio* koji su bili izloženi na lokalitetima GC i SU može biti uslovljena prisustvom supstanci sa inhibitornim delovanjem.

Skorija istraživanja su otkrila da karboksilesteraze, pored uloge u metabolizmu ksenobiotika kod sisara imaju važnu fiziološku ulogu u metabolizmu lipida i energetske homeostazi i da evolucija ovih enzima nije tekla isključivo u svrhu metabolizma ksenobiotika (Ross i sar., 2018; Lian i sar., 2018). Iako ne postoje dokazi o takvoj ulozi CES kod riba, uloga ovog enzima u biohemiji lipida je vrlo verovatna, tako da se visoka aktivnost CES može smatrati adaptivnim mehanizmom za održanje energetske homeostaze kod *A. brama* koje su izložene hemijskom stresu. Aktivnost CES je species – specifična i nivo konstitutivne aktivnosti ovog enzima može igrati ulogu u manjoj osetljivosti na određene klase ksenobiotika (pregledni rad Wheelock i sar., 2008). Stoga je značajno viša aktivnost CES u jetri i mozgu jedinki *A. brama* iz eksponirane populacije iz našeg istraživanja još jedan primer adaptivne strategije *A. brama*, koja je razvijena sa ciljem razvijanja manje osetljivosti na ksenobiotike zahvaljujući povećanom potencijalu njihove biotransformacije i održanju lipidne i energetske homeostaze. Procesi antioksidativne zaštite i biotransformacije se odvijaju u svim organima različitim intenzitetom, pri čemu su u jetri najintenzivniji (Danilenko i Lukyanova, 2014). Pored jetre, mozak se pokazao kao organ sa jakim antioksidativnim i biotransformacionim kapacitetom kod *A. brama*, pošto je aktivnost CAT, CES i GST bila značajno viša u populaciji koja je izložena hemijskom stresu. Ovaj odgovor se može smatrati neuroprotektivnim i verovatno doprinosi održanju funkcionalnosti mozga sprečavanjem oksidativnog stresa i štetnih efekata hemikalija na neurone.

Aktivacija komponenata sistema antioksidativne zaštite na nivou genske ekspresije (*sod* i *gpx1*) kao i na nivou enzimske aktivnosti (indukcije CAT) je dokaz efikasnosti sistema za eliminaciju ROS kod *A. brama* i verovatno jedna od najvažnijih adaptacija za izbegavanje oksidativnog stresa u uslovima hemijskog opterećenja. Aktivnost antioksidativnih enzima u jetri pokazuje sezonske varijacije koje mogu biti povezane sa temperaturom vode, dostupnosti kiseonika, mrestom, ishranom i metaboličkim aktivnostima uopšteno (Morozov i sar., 2017).

Indukcija ekspresije nuklearnog eritroidnog faktora 2 (*nrf2*) se smatra zaštitnim mehanizmom koji ima važnu ulogu u adaptivnom odgovoru na oksidativni stres, zbog čega se ovaj parametar često koristi kao biomarker u ekotoksikološkim i toksikološkim istraživanjima. Iako je ekspresija *nrf2a* kod *A. brama* iz našeg istraživanja bila niža u eksponiranoj populaciji u odnosu na referentnu, izgleda da su konstitutivni nivoi *nrf2a* ipak dovoljno visoki da indukuju odgovarajući stepen antioksidativne zaštite. Međutim, ovaj rezultat bi trebalo razmatrati i sa aspekta kontroverzne uloge *nrf2* u razvoju tumora kod sisara. S jedne strane, *nrf2* ima protektivnu ulogu i sprečava razvoj kancera, dok istovremeno stimulacija ekspresije ovog gena u tumorima podstiče rast tumora dajući prednost preživljavanju i rastu ćelija kancera (Ma, 2013; Robledinos–Antón i sar., 2019). Naša istraživanja ukazuju na izbalansiranu ekspresiju *nrf2a*, koja je dovoljno visoka da omogući indukciju mehanizama antioksidativne zaštite, a ipak dovoljno niska za prevenciju rasta tumora usled izloženosti brojnim supstancama koje su dokazani karcinogeni u urbanoj zoni (Tabele u prilogu P1–P4), pa se zato može smatrati adaptivnim mehanizmom protiv karcinogeneze kod riba.

Biotransformacioni enzimi iz CYP1A subfamilije su među najviše proučavanim biomarkerima efekta ksenobiotika koji deluju preko aktivacije arilhidrokarbonskog receptora (AhR), kao ligand zavisnog transkripcionog faktora za *cyp1a*. U AhR CAFLUX *in vitro* analizi koja je izvedena sa koncentrovanim uzorcima vode Dunava u gradskoj zoni i blizini komunalnog ispusta Novog Sada, uzorci su indukovali značajne efekte, što ukazuje na prisustvo supstanci koje se ponašaju kao AhR–agonisti u uzorcima vode (Neale i sar., 2015; König i sar., 2017). Međutim, CYP1A enzimi izgleda ne igraju važnu ulogu u adaptaciji *A. brama* iz našeg istraživanja, pošto je ekspresija ovog gena bila niža kod jedinki iz eksponirane populacije. Naši rezultati ukazuju da uloga ovog enzima kod *A. brama* u ukupnoj adaptaciji na hemijski stres nije posebno značajna. Nepromenjena ili smanjena aktivnost enzima biotransformacije (kao što je CYP1A i GST) nije iznenađujuća pošto brojni dokazi pokazuju da oni takođe mogu biti suprimirani ili čak inhibisani u jetri riba koje su izložene hroničnom zagađenju (Danilenko i Lukyanova, 2014; Schlenk i sar., 2008). Dodatno, pri tumačenju rezultata moraju se uzeti u obzir i sezonske varijacije u aktivnosti ovih enzima, pošto je pokazano da je aktivnost GST i CAT kod različitih vrsta riba najviša nakon perioda mresta, što odražava reorganizaciju metaboličke aktivnosti riba tokom reproduktivnog ciklusa (Danilenko i Lukyanova, 2014). Sezonska varijabilnost aktivnosti CYP1A u jetri (merena kao EROD aktivnost) je takođe uočena kod *A. brama* jedinki u istraživanju Yurchenko i Morozov, 2019 sa nižim vrednostima tokom proleća, u poređenju sa drugim godišnjim dobima. Izostanak indukcije *mgst3a* u našem istraživanju može se povezati sa niskom ekspresijom *nrf2a*, pošto su glutation s–transferaze među ciljnim genima *Nrf2* (Klotz i Steinbrenner, 2017).

6.1.3.3. Biomarkeri opšteg odgovora na stres

Ekspresija gena za protein toplotnog šoka 70 (*hsp70*) i citohrom oksidaza subjedinica 1 (*cox1*) su parametri koji se analiziraju radi identifikacije stresa i praćenja izloženosti polutantima (Sinha i sar., 2012). Gen *hsp70* je konstitutivno ekspimiran u većini ćelija, a povišena ekspresija se uočava usled termalnog stresa, prisustva teških metala i oksidativnog stresa. Ima značajnu ulogu u tolerantnosti organizma na stres, održavanju konformacije proteina, regulaciji signalnih puteva koji kontrolišu rast i preživljavanje ćelija, kao i u sprečavanju apoptoze (Yamashita i sar., 2010; Padmini i Tharani, 2014). Takođe, uočeno je da ribe u uslovima stresa mogu efikasno koristiti HSP70/heat–shock kognat (HSC)70 kao izvor energije koja se dobija degradacijom proteina (Yamashita i sar., 2010), dok citohrom oksidaza subjedinica 1 reguliše oksidativnu fosforilaciju, rad protonske pumpe i proizvodnju ATPa u mitohondrijama. Ekspresija *cox1* gena se može koristiti za procenu uticaja ekoloških faktora na aerobni metabolizam kod riba (Hu i sar., 2018), a povećanje ekspresije *cox1* se može tumačiti

kao adaptivni odgovor kod riba u svrhu neutralizacije oksidativnih efekata toksičnih supstanci (Sinha i sar., 2012).

Ekspresija *hsp70* gena je kod kavezno eksponiranih jedinki *C. carpio* bila značajno povišena samo na lokalitetu SA, što zajedno sa povišenom ekspresijom gena za kortizol i metalotioneine, koji se mogu indukovati različitim stresogenim stimulusima, ukazuje na povišen ukupni stres na ovom lokalitetu.

Povišena ekspresija *hsp70* u populaciji *A. brama* sa eksponiranog lokaliteta u odnosu na referentnu populaciju ističe važnost funkcije ovog proteina u adaptivnim mehanizmima, dok iznenađujuće niža ekspresija *cox1* u eksponiranoj populaciji, može predstavljati potencijalnu slabu tačku adaptivnih mehanizama *A. brama*, koja se verovatno efikasno nadoknađuje drugim mehanizmima antioksidativne zaštite koji smanjuju oksidativna oštećenja. Značajne razlike u ekspresiji izdvajaju ove gene kao najosetljivije na izmenjene uslove sredine kod *A. brama* iz prirodnih populacija koje žive pod različitim hemijskim pritiskom.

Kortizol ima centralnu ulogu u odgovoru na stres, fiziologiji i ponašanju riba i prepoznat je kao važan odgovor u suočavanju sa brzim, antropogeno uslovljenim promenama u životnoj sredini, uključujući zagađenje. Nivo kortizola u plazmi je dobro prihvaćen indikator akutnog stresa i uspešno se koristi za procenu nivoa stresa u kontrolisanim uslovima, ali i u divljini (pregledni rad Sadoul i Geffroy, 2019), dok je ERK2, koji pripada porodici mitogen-aktiviranih kinaza (MAPK) protein uključen u regulaciju velikog broja procesa koji uključuju adheziju ćelija, odvijanje ćelijskog ciklusa, migraciju ćelija, njihovo preživljavanje, diferencijaciju, metabolizam, proliferaciju i transkripciju (Rubinfeld i Seger, 2005), a može reagovati na nefiziološke stimuluse kao što su različite supstance u životnoj sredini. Izostanak značajne razlike u ekspresiji *cr* kod *A. brama* iz eksponirane populacije u odnosu na referentnu, ukazuje na nizak nivo akutnog stresa, koji je potvrđen na lokalitetu nizvodno od Novog Sada i akutnim testom toksičnosti na embrionima *Danio rerio* (FET) (Neale i sar., 2015). Razlike bez statističke značajnosti između nivoa ekspresije *cr* u dve populacije iz našeg istraživanja mogu da ukazuju na adaptivni odgovor na hronični stres zbog desenzibilizacije hipotalamo-hipofizne osovine kao posledice alostatskog opterećenja (Aerts i sar., 2015). Pokazano je da kod riba postoji korelacija između bihevioralnih fenotipova i nivoa kortizola, pri čemu se "hrabre" proaktivne jedinke karakterišu slabije izraženim odgovorom na kortizol, čime se maskiraju uobičajeni odgovori na stres izazvani ovim hormonom (Balasch i Tort, 2019). Stoga, moguće je da kod *A. brama* iz populacije pod stresom, strategija preživljavanja favorizuje proaktivno ponašanje i nizak nivo kortizola (i vezanu *cr* ekspresiju).

Primarna funkcija metalotioneina kod kičmenjaka, uključujući ribe, je održavanje unutarćelijske homeostaze jona esencijalnih metala Cu i Zn, a imaju ulogu u detoksikaciji od toksičnih metala (Cd, Hg, Ni, Ag, Au, Pb, As i Bi) (Amiard i sar., 2006). Oni su takođe uključeni u zaštitu od reaktivnih kiseoničnih vrsta koje nastaju usled oksidativnog stresa, ćelijsku proliferaciju, apoptozu, procese inflamacije i zaštitu od jonizujućeg zračenja, a njihova izmenjena ekspresija je uočena i u patološkim stanjima poput različitih kancera i neurodegenerativnih poremećaja (Takahashi, 2015; Hemmadi, 2016; Juárez-Rebollar i sar., 2017). Pored metala, na ekspresiju metalotioneina može uticati više faktora kao što su uzrast, pol, tip tkiva, sezonske varijacije, promene u životnoj sredini poput temperaturnih varijacija, nedostatka nutrijenata, prisustva određenih herbicida, hormona i drugih ksenobiotika sa hormonskim delovanjem (Hemmadi, 2016). Metalotioneini već dugo koriste u biomonitoring programima za karakterizaciju zagađenja akvatične sredine metalima (Roesijadi, 1995; Viarengo i sar., 1999; Linde i sar., 2001; Tom i sar., 2004; Hauser-Davis, 2012). Razlika u ekspresiji *mt* između grupa *C. carpio* sa različitih lokaliteta kaveznog izlaganja, pri čemu je najniža ekspresija zabeležena na lokalitetu GC, se verovatno može pripisati niskim koncentracijama metala u komunalnim otpadnim vodama, dok su koncentracije pojedinih metala prirodno visoke u Dunavu (Liška i sar., 2015).

6.1.3.4. Geni hormonske regulacije

Prisustvo ksenoestrogena, koji se često detektuju u akvatičnim ekosistemima najviše zbog njihovog visokog sadržaja u efluentima komunalnih otpadnih voda, je potvrđeno na lokalitetu koji je pod uticajem komunalnih efluenta grada Novog Sada hemijskim analizama i *in vitro* skrining bioesejima koji su zasnovani na indukciji odgovora koji je povezan sa vezivanjem ksenobiotika za estrogenski receptor (Hashmi i sar., 2018; Neale i sar., 2015; König i sar., 2017).

Razlike u rezultatima *in vitro* skrining esejima i indukciji ekspresije gena za različite subjedinice estrogenskog receptora (*er α* i *er β*) kod jedinki *C. carpio* iz kavezne postavke i *A. brama* prirodnih populacija mogu se objasniti specifičnim učešćem različitih podtipova estrogenskog receptora u odgovoru na prisustvo estrogena kod riba (Yost i sar., 2014). Pored toga, moguće je da su potencijalni ksenoestrogeni sa lokaliteta Novi Sad deaktivirani kroz biotransformacione procese kod riba (proces koji ne mogu biti uočeni *in vitro* esejima), smanjujući njihove efekte koji zajedno sa specifičnim efektima "koktela" *in vivo* mogu pružiti objašnjenje za smanjenu ekspresiju gena za određene subjedinice receptora. Slično objašnjenje je takođe predloženo od strane Nikoleris i Hansson, 2015 usled izostanka korelacija između koncentracija PCB u tkivima lososa i ekspresije gena *er*. Pored toga, niža ekspresija *er* takođe može biti rezultat preusmeravanja energetske resursa sa procesa vezanih za reprodukciju ka adaptacionim mehanizmima, kao što je istaknuto u istraživanju Xie i Klerks, 2004 koji su istraživali potrošnju energije radi održanja homeostaze organizma pri izlaganju kadmijumu vrste *Heteriria formosa*. Još jedan od važnih faktora koji utiče na nivo ekspresije *er* je stadijum reproduktivnog ciklusa jedinke (Nikoleris i Hansson, 2015; Yost i sar., 2014), pa razlike u ekspresiji između dve populacije *A. brama* u našem istraživanju mogu poticati od njihovih nesinhronizovanih reproduktivnih ciklusa. Dodatno, smanjenje ekspresije gena koji kodiraju različite ER podtipove u jetri riba nakon izlaganja sintetičkim ligandima je takođe zabeleženo od strane drugih autora (Chandrasekar i sar., 2010).

Androgenski receptor je inducibilan transkripcioni faktor koji modulira ekspresiju ciljnih gena androgena (testosterona i dihidrotosterona), čime učestvuje u reproduktivnom razvoju, uključujući spermatogenezu. Uočeno je da ometana ekspresija *ar* kod riba (zebrica) izaziva porast broja ženske mladi i njihove mase, neplodnost mužjaka kroz poremećaje u spermatogenezi i razvoj disfunkcionalnih ovarijuma kod ženki tokom razvoja, dok je uočeno i da se kod muških zebrića sa narušenom funkcijom *ar* razvijaju ženske sekundarne polne karakteristike (Yu i sar., 2018).

Pored androgena, na ekspresiju *ar* mogu uticati i antiandrogeni. Brojne hemikalije, kao što su estrogeni i lekovi za različite hormonski povezane kliničke slike mogu delovati kao AR antagonisti (antiandrogeni), što može dovesti do feminizacije muškog reproduktivnog sistema (Filby i sar., 2007), tako što mogu blokirati mesto vezivanja androgena za androgenski receptor stvarajući estrogenu sredinu i simptome koji ukazuju na izlaganje estrogenima, iako drugačijim mehanizmima delovanja od estrogena (Sohoni i Sumpter, 1998; Larkin i sar., 2002; Moens i sar., 2006). Kao što je već pomenuto hemijske analize su detektovale prisustvo hormonski delujućih supstanci, a frakcije uzoraka vode sa lokaliteta GC, dovele do aktivacije AR u *in vitro* testovima (König i sar., 2017; Hashmi i sar., 2018). Imajući u vidu ove podatke, bilo je očekivano da razlike u ekspresiji *ar* kod kavezno eksponiranih jedinki budu veće, pa je moguće objašnjenje izostanka indukcije *ar* gena posledica prisustva antiandrogena, ali verovatnije se izostanak indukcije se može pripisati kompleksnoj regulaciji AR-posredovane genske ekspresije kod riba ili deaktivaciji androgenih supstanci kroz metaboličke procese (Brockmeier i sar., 2013; Bahamonde i sar., 2014).

Pored nuklearnih receptora, vitelogenin je često korišćen biomarker izlaganja ksenobioticima sa hormonskom aktivnošću. Vitelogenin je protein koji se sintetiše u jetri i

transportuje krvotokom do rastućih oocita, specifičan je za ženke i predstavlja energetske rezerve za embrione i rane larvalne stadijume riba. Pored nutritivne uloge, vitelogenin može učestvovati i u urođenom imunom odgovoru, na više načina – kao multivalentni receptor za prepoznavanje mikroba, imunski efektor za ubijanje bakterija i virusa, preko aktivnosti podsticanja fagocitoze, kao opsonini i preko antioksidativne aktivnosti, štiteći domaćina od oksidativnog stresa (Sun i Zhang, 2015). Vitelogenin je pogodan biomarker jer je gen za *vtg* prisutan kod oba pola, pri čemu je usled nedostatka estrogena kod mužjaka, u normalnim uslovima, prevenirana proteinska ekspresija, zbog čega normalno *vtg* nisu eksprimirani kod mužjaka i juvenilnih jedinki u merljivim nivoima. Ipak pošto i kod njih postoji estrogenski receptor, *vtg* može biti sintetisan usled izlaganja prirodnom estradiolu ili supstancama koje se ponašaju kao estrogeni (Gunnarsson i sar., 2007; Sundararaj i sar., 1982; Virk i sar., 2014; Gröner i sar., 2015). Takođe, za pojedine metale poput Cd je uočeno da mogu imati slične efekte kao estrogeni preko različitih mehanizama delovanja i uticati na promenu ekspresije *vtg* (Safe i sar., 2003; Henson i Chedrese, 2004; Canapa i sar., 2006). Veća ekspresija *vtg* gena kod kavezno izloženih jedinki mužjaka *C. carpio* na lokalitetima GC i SA sugerise prisustvo viših nivoa ksenoestrogena što je pokazano i hemijskim i *in vitro* analizama za lokalitet GC, dok je nižu ekspresiju na lokalitetu SU potencijalno uslovalo prisustvo androgena koji mogu dovesti do supresije *vtg* (Miracle i sar., 2006; Dorts i sar., 2009; Hemmer i sar., 2011).

6.1.3.5. Geni homeostaze glukoze i gvožđa

Homeostaza glukoze, koja je neophodna za ispunjavanje energetske potrebe vitalnih organa, je kontrolisana enzimima jetre uključujući, između ostalih, piruvat karboksilazu (*pc*) koja je uključena u glukoneogenezu i glikogen fosforilazu (*pygl*) koja je ključni enzim u glukoneogenezi u jetri (Han i sar., 2016). Ekspresija gena koji kodiraju ove enzime (*pc* i *pygl*) je bila veća kod riba iz eksponirane populacije *A. brama* u našem istraživanju, čime su se ovi geni izdvojili kao osetljivi na hemijski stres. Njihova indukcija ukazuje na mobilizaciju energetske resursa, radi obezbeđivanja dovoljnog nivoa glukoze u krvi kako bi se kompenzovao metabolički trošak koji je usmeren ka aktivaciji adaptacionih mehanizama na hemijski stres (Petitjean i sar., 2019).

Transferin (TF) je protein ključan za metabolizam gvožđa i učestvuje u zadovoljavanju potreba ćelija za gvoždem kroz njegovo vezivanje i transport (Gomme i sar., 2005). Kroz transport gvožđa, TF je uključen u različite procese kao što je sinteza DNK, transport kiseonika i elektrona, ćelijska proliferacija i regulacija funkcije imunog sistema (Sun i sar., 2012; Koglin i sar., 2016). Imajući u vidu činjenicu da je sinteza transferina stimulisana u uslovima smanjenog nivoa gvožđa u organizmu (Huth i sar., 2015), smanjena ekspresija *tfd* u jetri eksponirane populacije *A. brama* sugerise da su nivoi gvožđa i bazalni nivo ekspresije *tfd* dovoljno visoki za održavanje pomenutih procesa kod ovih riba.

6.1.3.6. Geni imunog odgovora i autofagije

Parametri koji takođe mogu biti izmenjeni u uslovima hemijskog stresa su elementi uključeni u imuni odgovor i autofagiju.

Citokini su sekretorni proteini sa ulogom u rastu, diferencijaciji i aktivaciji funkcija imunog odgovora. Uključeni su u različite faze imunog odgovora, od indukcije urođenog odgovora do generisanja T ćelija i proizvodnje antitela. Imuni odgovor indukuju različiti patogeni kao što su paraziti, bakterije i virusi (Reyes–Cerpa i sar., 2012). Širok spektar stresora iz životne sredine može imati imunomodulatorno dejstvo kao što su promena temperature i koncentracije kiseonika, ali i različiti polutanti poput pesticida, metala i smeša kao što su komunalne i industrijske otpadne vode (Zelikoff i sar., 1993; Danabas i sar., 2016; Bowden, 2008; Magnadottir i sar., 2010).

Faktor nekroze tumora α (eng. *tumor necrosis factor alfa*, TNF α) je proinflamatorni citokin sa važnom ulogom u sistemskoj inflamaciji kao i u različitim procesima kao što su ćelijska proliferacija, diferencijacija, nekroza, apoptoza i indukcija drugih citokina. Posreduje u antimikrobnim odgovorima kroz indukciju apoptoze, ubijanje inficiranih ćelija, inhibiciju unutarćelijske replikacije patogena, i povećanje ekspresije većeg broja gena kod domaćina. Interleukin 1 β (IL-1 β) jedan od najranije eksprimiranih proinflamatornih citokina tokom imunog odgovora, za omogućavanje brzog odgovora na infekciju i indukciju kaskade reakcija koje vode do inflamacije. Njegova uloga kod riba uključuje regulaciju drugih gena imunog odgovora, aktivaciju limfocita, migraciju leukocita, fagocitozu i baktericidnu aktivnost (Dinarello 1997; Lu i sar., 2008; Reyes-Cerpa i sar., 2012; Hong i sar., 2013.). Naši rezultati ukazuju na aktiviranje imunog odgovora jedinki *C. carpio* koje su bile izložene uticaju zagađenja poreklom od komunalnih otpadnih voda Novog Sada. Komunalne otpadne vode pored širokog spektra supstanci sadrže i veći broj potencijalno patogenih mikroorganizama, što je potvrđeno mikrobiološkim analizama uzoraka vode Dunava koje su izdvojile lokalitet GC kao lokalitet sa visokim nivoom fekalnog zagađenja (Kirschner i sar., 2017).

Geni za *il1 β* i *tnfa* imaju obrnute obrasce ekspresije u jetri kavezno izloženih jedinki *C. carpio* pri čemu se lokaliteti GC i SU razlikuju od referentnog lokaliteta. Smanjena ekspresija gena *il1 β* na lokalitetima GC, SU i SA u suprotnosti sa povećanom ekspresijom *tnfa* na ovim lokalitetima se možda može objasniti time da je *il1 β* jedan od prvih odgovora koji se aktiviraju, pre aktiviranja narednih koraka odbrane organizma. Pored toga, rezultat hroničnog stresa može biti imunosupresija i veća podložnost bolestima (Magnadottir i sar., 2010). Reakcija organizma na stresne uslove uključuje i neuroendokrine odgovore koji uključuju povećanje koncentracije adrenokortikotropnog hormona, kortikosteroida (kortizola) i kateholamina u serumu, koji su potentni imunosupresanti. Castillo i sar., 2009 su *in vitro* u ćelijama prednjeg (glavenog) bubrega *Sparus aurata* izazvali supresiju ekspresije gena citokina *il1 β* i *tnfa* hormonima stresa kortizolom, adrenokortikotropnim hormonom i adrenalinom (Castillo i sar., 2009). Danabas i sar., 2016 su detektovali snižene vrednosti *il1 β* i *tnfa* imunitestom, kod riba sa lokaliteta koji su zagađeni komunalnim otpadom.

Pored odgovora imunog sistema, autofagija predstavlja odbrambenu strategiju organizama da se suoče sa stresom iz životne sredine. Ona je jedan od najvažnijih unutarćelijskih puteva odgovornih za degradaciju i recikliranje proteina i organela, sa važnom ulogom u prezentaciji antigena, bakterijskim i virusnim infekcijama i ćelijskoj smrti. Takođe, autofagija može delovati kao mehanizam za ćelijski opstanak ako ćelijsko oštećenje nije preveliko ili kao mehanizam ćelijske smrti pri nepovratnom oštećenju ili prevelikom stresu, odvojeno ili zajedno sa apoptozom, dok su poremećaji u njenoj regulaciji jedan od potencijalnih mehanizama nastanka različitih bolesti (Tanida i sar., 2008; Chiarelli i sar., 2016). Dinein je motorni protein koji služi za transport u ćeliji, duž citoskeletnih mikrotubula i pozicioniranje ćelijskih organela. Citoplazmatski dinein učestvuje u formiranju autofagozoma (vezikula formiranih nakon zahvatanja organela i proteina koji treba da budu uništeni). Oni su obeleženi ubikvitin povezanim proteinom lakog lanca 3 (LC3) (Kimura i sar., 2008; Reck-Peterson i sar., 2018). Mutacije u genu za dinein i njegov izostanak onemogućavaju uklanjanje proteina sklonih agregaciji autofagijom i nakupljanje autofagozomalnog markera LC3II (Ravikumar i sar., 2005). 1A/1B laki lanac 3 (LC3) je tkivno ubikvitaran protein vezan za mikrotubule. Tokom autofagije, autofagozomi zahvataju citoplazmatske komponente uključujući proteine i organele. Istovremeno, citoplazmatska forma LC3 (LC3-I) se konjuguje sa fosfatidiletanolaminom i formira LC3II, koji se vezuje u autofagozomalnu membranu. Autofagozomi se spajaju sa lizozomima i unutar ovih autolizozoma se enzimski degradiraju unutrašnje komponente. Istovremeno, LC3II u autolizozomalnom lumenu se degradira. Stoga LC3II predstavlja autofagozomalni marker (Tanida i sar., 2008). Lizozomalni sistem autofagije može biti poremećen različitim polutantima koji se nalaze u životnoj sredini, pošto lizozomi nakupljaju brojne toksične supstance, metale i organske ksenobiotike koji narušavaju normalnu funkciju i

oštećuju lizozomalnu membranu. Uočeno je da je integritet lizozomalne membrane povezan sa brojnim toksikološkim odgovorima i patološkim reakcijama, zbog čega parametri koji učestvuju u procesu autofagije mogu biti indikatori izloženosti eukariota hemijskim stresorima (Moore i sar., 2006a, 2006c; Chiarelli i sar., 2016). Autofagija takođe može biti indukovana i gladovanjem i hipoksijom, hipertermijom i povećanjem saliniteta, dok autofagno uklanjanje oksidativno oštećenih organela i proteina obezbeđuje drugi nivo odbrane od oksidativnog stresa (Moore i sar., 2004; Moore i sar., 2006b). Pored indukcije, autofagija može biti i onemogućena usled izlaganja polutantima što je uočeno kod mekušaca, riba i sisara (Allen i Moore, 2004; Moore i sar., 2004, 2006b). Ekspresija oba analizirana gena za autofagiju, *lc3II* i *dyn* je očekivano bila povišena u moždanom tkivu *C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja na svim analiziranim lokalitetima što ukazuje na aktivaciju ovog mehanizma odbrane organizma.

Kao dodatna potvrda efekata hemijskog opterećenja vode, sa pratećim povećanim mikrobiološkim zagađenjem na jedinke *C. carpio* koje su bile eksponirane na lokalitetu GC, može se uočiti i prisustvo lezija kože i erozije peraja na jednoj jedinki, čiji je imuni odgovor verovatno bio kompromitovan usled hemijskog stresa. Veći broj istraživanja je pokazao vezu između infekcija koje uzorkuju promene na koži i perajima različitih vrsta riba i zagađenja različitog porekla kao što su komunalne otpadne vode i industrijski efluenti (Mahoney i sar., 1973; Ziskowski i sar., 1987; Leonardi i Tarifeno, 1996; Moles i Norcos, 1998).

6.1.3.7. Biomarkeri neurotoksičnosti

Uopšteno, svi analizirani geni, koji su odabrani kao biomarkeri neurotoksičnosti su se pokazali osetljivim na zagađenje na lokalitetima kaveznog izlaganja jedinki i potvrđuju prisustvo neuroaktivnih i neurotoksičnih supstanci.

Inhibicija acetilholinesteraze je najpoznatiji biomarker neurotoksičnosti, koji se koristi već decenijama. Aktivnost AChE kod kavezno eksponiranih jedinki *C. carpio* se nije znatno razlikovala između analiziranih lokaliteta, ali se može uočiti trend blage inhibicije aktivnosti na lokalitetima GC i SU u oba analizirana tkiva, što je očekivano s obzirom na značajan doprinos neuroaktivnih supstanci u ukupnom zagađenju reka širom sveta, uključujući i Dunav (Busch i sar., 2016), kao i potvrđeno prisustvo neuroaktivnih i potencijalno neuroaktivnih supstanci u vodi Dunava sa analiziranih lokaliteta, kao i serumu i mišićnom tkivu jedinki koje su bile kavezno izložene na ovim lokalitetima (Tabele u prilogu P4, P7–9). Rezultati analize aktivnosti AChE u prirodnim populacijama *A. brama* pokazuju da aktivnost ovog enzima nije ugrožena u mozgu i jetri eksponirane populacije, pošto nije uočena značajna inhibicija enzima ni u jednom organu.

Bazični protein mijelina (*mbp*) je odgovoran za mijelinizaciju nervnih vlakana (Boggs, 2006). Kod kavezno izloženih jedinki *C. carpio*, iznenađujuće niska ekspresija gena *mbp* na lokalitetu SU, može ukazivati na sinergističko delovanje određenih supstanci koje su bile prisutne na tom lokalitetu ili na prolazno zagađenje u kom su se nalazile neurotoksične supstance koje nisu mogle biti detektovane redovnim monitoringom niti LVSPE uzorkovanjem. Ekspresija gena *mbp*, koja je bila sličnog nivoa u obe populacije *A. brama* iz našeg istraživanja, zajedno sa ujednačenom aktivnošću AChE u obe populacije i prisustvom neuroaktivnih supstanci u vodi Dunava u urbanoj zoni Novog Sada, ukazuje na efektivnost zaštitnih mehanizama u mozgu *A. brama* sa ciljem očuvanja prenosa nervnih impulsa.

Gama aminobuterna kiselina (GABA) je jedan od najznačajnijih inhibitornih neurotransmitera u mozgu. Različiti polutanti poput velikog broja pesticida, antiparazitika i lekova kao i smeša poreklom iz otpadnih industrijskih i komunalnih voda mogu uticati na različite aspekte GABA signalinga i oštećenja nervnog sistema preko različitih mehanizama (Basu i sar., 2009, 2012; Villeneuve i sar., 2010; Bencic i sar., 2013; Zhao i sar., 2016) što može dovesti do premećaja u ishrani (Snigirov i Sylantjev, 2018) i poremećaja ponašanja u

subletalnim koncentracijama. Sinaptotagmini su proteini koji regulišu Ca^{2+} -zavisnu egzocitozu neurotransmitera iz sekretornih vezikula (Sugita i sar., 2004; Hui i sar., 2005). Sinaptotagmin 10 (*syt10*), vezikularni Ca^{2+} senzor je prvi neuroprotektivni efektorni protein za zaštitu neurona od ćelijske smrti uzrokovane egzocitotskom stimulacijom, a primeri na kojima se pokazala neuroprotektivna uloga ovog proteina je momentalno povećanje njegove ekspresije nakon izlaganja kainskoj kiselini (Woitecki i sar., 2016), kao i veća podložnost egzocitotskih oštećenja mišjih hipokampusnih *syt10* knock-out neurona u odnosu na normalne (Babity i sar., 1997). Trend povećane ekspresije gena za receptor tipa A gama-amino buterne kiseline *gabral* i gena *syt10* na sva tri lokaliteta izlaganja jedinki u odnosu na referentni ukazuje na izloženost neuroaktivim i neurotoksičnim supstancama koje mogu pripadati supstancama različitog porekla uključujući i lekove. Tako je povećana ekspresija *syt10* gena uočena u mozgovima zebrića nakon tretmana smešom β diketonskih antibiotika (Wang i sar., 2016).

Tahikinini (*tac*) imaju ključnu ulogu u neuroendokrinoj regulaciji reprodukcije kod sisara i riba, pri čemu *tac3a* i *tac3b* kodiraju nekoliko neurokinina koji se nalaze u delovima mozga uključenim u regulaciju reprodukcije i metabolizma kao i u hipofizi. Ekspresija zavisi od polne zrelosti jedinki, pa je tako uočeno da je ekspresija *tac3a* značajno povećana nakon tretmana juvenilnih jedinki zebrića estradiolom (Biran i sar., 2012; Qi i sar., 2015). Ekspresija oba gena, *tac3a* i *tac3b* prati trend povećane ekspresije na svim lokalitetima kavezne ekspozicije, u odnosu na referentni lokalitet, kao što je slučaj sa genima *gabral* i *syt10*, i u skladu je sa povećanim hemijskim opterećenjem na ovim lokalitetima.

6.1.4. Hemijski stres na lokalitetima u okviru studije slučaja Dunav

Hemijski profili lokaliteta duž toka Dunava koji su analizirani u okviru JDS3, se nisu razlikovali u velikoj meri, pri čemu se ne može jasno uočiti gradijent koncentracija ni za jednu određenu supstancu ili grupu supstanci. Od 654 identifikovane supstance, 377 je prisutno na svim lokalitetima uzorkovanja (Liška i sar., 2015). Ipak, pojedini lokaliteti se izdvajaju u odnosu na ostale na osnovu viših vrednosti modelovane ukupne toksičnosti (izračunat kao suma toksičnih jedinica). Takvi su lokaliteti koji se nalaze u blizini ispusta otpadnih voda velikih gradova kao što su Beograd i Bukurešt. Uopšteno, u visokim koncentracijama su detektovane supstance koje su vezane za antropogene aktivnosti, kao što su lekovi, veštački zaslađivači i prisustvo stimulansa, kafeina, koji se smatra indikatorom zagađenja neprerađenim komunalnim otpadnim vodama (Liška i sar., 2015). Ukupni toksični pritisak izračunat na osnovu sume toksičnih jedinica za ribe, na analiziranim lokalitetima, se za akutnu toksičnost kretao od 0.05 do 0.18, i za hroničnu 0.09 do 1.05 sa izuzetkom lokaliteta JDS 48 na kom su ove vrednosti bile znato više (TUa-1.82, TUch-15.9), a uslovljene su visokom koncentracijom bakra. Kada se izuzmu metali, vrednosti suma toksičnih jedinica su manje za sve lokalitete, ipak lokalitet JDS 48 se i u tom slučaju izdvaja kao lokalitet sa višim vrednostima u odnosu na ostale. Iako su pojedine organske supstance u pritokama detektovane u visokim koncentracijama, njihov uticaj na Dunav nije velik zbog velike moći razblaženja u velikoj reci (Liška i sar., 2015).

6.1.5. Biomarkeri kod *A. alburnus* iz studije slučaja Dunav

6.1.5.1. Opšte stanje jedinki

Kondicioni faktori kod jedinki *A. alburnus* su bili relativno ujednačeni, na lokalitetima koji su obuhvaćeni ovom tezom, pri čemu se ni jedan lokalitet nije izdvojio kao značajno različit u odnosu na ostale (tabela u prilogu, P28).

Takođe, kao i kod *A. brama* koje su uzorkovane iz prirodnih populacija može se uočiti razlika u visini BCF u zavisnosti od vremena uzorkovanja. Vrednosti BCF *A. alburnus*

izlovljenih u periodu avgust–septembar (oko 0.7) su bile nešto niže u odnosu na vrednosti koje su zabeležili Riđanović i sar., 2015. uzorkovanjem tokom leta i jeseni, iste godine, u delu Save koji protiče kroz Bosnu (0.8–1), dok su Stavrescu–Bedivan i sar., 2017 publikovali prosečnu vrednost 1.22 (0.64–1.90) kod *A. alburnus* uzorkovanih u Tamišu u Rumuniji u blizini granice sa Srbijom (uzorkovane od oktobra do maja).

Histopatološkom analizom tkiva jetre jedinki vrste *Neogobius sp.* sakupljenih na istim lokalitetima kao *A. alburnus* u okviru JDS3, nisu detektovane patološke promene (Focks i sar., 2016, interni izvrštaj).

6.1.5.2. Biomarkeri opšteg odgovora na stres, metabolizma ksenobiotika i homeostaze glukoze i gvožđa

Odabir vrste *A. alburnus* i broj uzorkovanih jedinki je bio uslovljen prisustvom ove vrste na svim lokalitetima koji su odabrani za analizu, duž celog toka Dunava. Analizom ekspresije odabranih gena u tkivu jetri *A. alburnus* nisu uočene značajne razlike između analiziranih lokaliteta, izuzev ekspresije gena za *nrf2a* između lokaliteta JDS 36 i 54, iako se između njih mogu uočiti različiti nivoi hemijskog pritiska (Liška i sar., 2015). Izostanak značajnih razlika između lokaliteta je zajedno sa visokim standardnim greškama posledica velike heterogenosti uzoraka iz prirodnih populacija i malog broja jedinki po analiziranoj grupi (4-6). Iz tog razloga je teško na osnovu seta gena koji su odabrani kao biomarkeri u ovoj studiji slučaja, kao samostalnim alatom, izdvojiti određene lokalitete kao manje ili više zagađene u odnosu na ostale.

Kvantitacija genske ekspresije može predstavljati osetljive indikatore izloženosti riba polutantima i drugim stresorima, uključujući i različite bolesti, i predstavljati pokazatelj adaptacija organizama na promene u multistres uslovima *in situ* (Calzolari i sar., 2007). Ipak, iako se veliki broj analiziranih biomarkera kod *A. brama* iz prirodnih populacija pokazao kao osetljiv alat u potvrdi hemijskog stresa koji deluje kao pokretač aktivacije adaptivnih mehanizama (Tenji i sar., 2020), eksperimentalnom postavkom koja je primenjena u studiji slučaja Dunav, a koja je podrazumevala analizu ekspresije gena *erk2*, *gpx1*, *nrf2a* i *mgst3a* kod jedinki *A. alburnus* iz prirodnih populacija na velikom broju lokaliteta duž toka Dunava nije bila moguća potvrda hemijskog stresa koji je bio procenjen na osnovu suma toksičnih jedinica za ove lokalitete (tabela 5.1). Ipak, kod gena *nrf2a* se može uočiti značajno niža ekspresija kod jedinki sa lokaliteta JDS54 u odnosu na lokalitet JDS36, kao i trend niže ekspresije na ostalim lokalitetima u odnosu na lokalitet JDS36. Na osnovu suma toksičnih jedinica lokalitet JDS36 se može izdvojiti kao lokalitet sa najnižim hemijskim opterećenjem, pri čemu se niža ekspresija na ostalim lokalitetima možda može objasniti blagom inhibicijom sistema antioksidativne zaštite na lokalitetima sa većim hemijskim pritiskom. Niža ekspresija gena *nrf2a* na lokalitetima koji su pod većim hemijskim opterećenjem je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde je ekspresija ovog gena u tkivu jetre *A. brama* iz eksponirane populacije bila niža u odnosu na referentnu populaciju (Tenji i sar., 2020).

Pored toga, iako bez značajne razlike, može se uočiti niža ekspresija gena *gpx1* na lokalitetu JDS54, koji je na osnovu sume akutnih toksičnih jedinica lokalitet sa najvećim hemijskim opterećenjem što zajedno sa smanjenom ekspresijom *nrf2a* može sugerisati inhibiciju sistema antioksidativne zaštite usled prisustva većeg oksidativnog stresa uslovljenog višim hemijskim pritiskom, kao što se može desiti sa antioksidativnim enzimima (Falfushynska i Stoliar, 2009).

Pošto se veći broj gena kod *A. brama* pokazao kao osetljiv na hemijski pritisak koji je bio različit na analiziranim lokalitetima, isti geni su analizirani u uzorcima jetri *A. alburnus* na lokalitetima koji se poklapaju sa lokalitetima iz studije slučaja Novi Sad (JDS 31 i 33), na kojima su uzorkovane *A. brama*, kao i lokalitet sa potvrđenim visokim nivoom hemijskog

pritiska, koji se izdvojio kao lokalitet sa najvišim vrednostima sume toksičnih jedinica (JDS 48). Iako bez značajnih razlika, povećana ekspresija gena *cyp1a* na lokalitetu sa najvišim toksičnim pritiskom ukazuje na povećanu stopu metabolizma ksenobiotika (Jönsson i sar., 2010), dok se kao i u slučaju *A. brama* iz studije slučaja Novi Sad može uočiti blaga inhibicija *cyp1a* na lokalitetu nizvodno od Novog Sada u odnosu na lokalitet koji odgovara referentnom lokalitetu. Analizom ekspresije gena koji učestvuju u homeostazi glukoze (*pylg* i *pc*) se može uočiti trend više ekspresije na lokalitetima koji se nalaze pod višim hemijskim pritiskom, kao i kod *A. brama*, ukazujući na aktivaciju mehanizama za mobilizaciju energetske rezervi radi obezbeđivanja dovoljnih nivoa glukoze u krvi za potrebe mehanizama odbrane organizma u uslovima povećanog stresa (Petitjean i sar., 2019). Pored gena koji učestvuju u homeostazi glukoze, kod gena koji učestvuje u održavanju homeostaze gvožđa, *tfd*, se može uočiti viša ekspresija na lokalitetu koji je pod najvišim hemijskim pritiskom, što može biti posledica povećane potrebe za održavanjem optimalnih nivoa gvožđa u stresnim uslovima (Huth i sar., 2015), dok se kao i u slučaju *A. brama*, može uočiti nešto niži nivo ekspresije *tfd* kod jedinki iz populacije nizvodno od Novog Sada u odnosu na lokalitet koji odgovara referentnom lokalitetu.

Korelacione analize ekspresije gena i detektovanih supstanci u uzorcima vode su izdvojile gen *erk2* kao najosetljiviji parametar na prisustvo različitih lekova, pesticida i industrijskih supstanci, pri čemu je najveći stepen korelacije uočen za lek opipramol koji ima antidepresivno i anksiolitičko delovanje. Kao što je prethodno pomenuto u diskusiji *in vitro* metode MAPK/ERK signalni put učestvuje u regulaciji brojnih procesa u ćeliji, pa visoka povezanost ekspresije ovog gena sa prisustvom različitih supstanci, posebno lekova nije neočekivana. Između ostalih procesa, ovaj signalni put učestvuje u regulaciji različitih elemenata i faktora neurotransmisije i neuroplastičnosti (Duda i sar., 2020). MAPK/ERK signalni put je uključen i u regulaciju ekspresije ciljnih molekula BDNF faktora (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), uključujući glikogen sintetazu kinazu (engl. *glycogen synthase kinase 3 β* , GSK3 β) (Thornton i sar., 2008; Mai i sar., 2002) za koju se smatra da učestvuje u patogenezi depresivnih poremećaja i da predstavlja ciljni molekul i/ili modifikator dejstva različitih antidepresiva (Warner-Schmidt i sar., 2010; Réus i sar., 2014). Iako ne postoje istraživanja koja dokazuju delovanje opipramola na ERK/AKT/GSK3 β signalni put, veliki broj lekova kao što su inhibitori receptora melatonina i ketamin utiču na njega (Dubovsky i sar., 2009; Réus i sar., 2014), pa se slično može pretpostaviti za opipramol. Izostanak jasnog obrasca ekspresije gena *erk2* na lokalitetima koji se nalaze nizvodno od gradova se možda može objasniti potencijalom pojedinih lekova, pored stimulacije, da inhibiraju ovaj signalni put (Wang i sar., 2018).

Promene u ekspresiji gena se mogu brzo detektovati nakon izlaganja određenim stresorima, međutim, u prirodnim populacijama riba, nivoi ekspresije gena mogu ukazivati na bazalne vrednosti gena na određenim lokalitetima kao posledice aklimatizacije ili evolutivnih adaptacija na uslove koji se nalaze na datom lokalitetu (Whitehead i sar., 2017). Stoga, u slučaju stabilnih populacija kakve su populacije *A. brama* i *A. alburnus*, se osim alatom za predviđanje stanja biote usled izloženosti različitim stresorima u životnoj sredini, mogu posmatrati iz ugla potvrde postojanja hemijskog stresa na koji se jedinke adaptiraju (Tenji i sar., 2020). Pored toga bi mogle predstavljati koristan alat za identifikaciju hemijskog stresa u multistres uslovima ukoliko se koriste zajedno sa drugim linijama dokaza, i pod uslovom odabira optimalnog seta gena, kao i dovoljno velikog uzorka koji je neophodan zbog heterogenosti ovakvih uzoraka.

Analizom enzima u uzorcima jetre *A. alburnus* i *Neogobius sp.* koje su sprovedene u okviru iste studije slučaja, od strane Deutschman i sar (Focks i sar., 2016) su uočene razlike između analiziranih lokaliteta (Tabele u prilogu P28 i P30). Uopšteno, kao i u slučaju analiza genske ekspresije, heterogenost uzorka i mali broj jedinki u okviru uzorka su umanjili statističku moć, dok se obrasci aktivnosti relativno malo razlikuju između lokaliteta i ne može se uočiti opšti trend aktivnosti za više posmatranih parametara u kontekstu izdvajanja određenih

lokaliteta. Heterogenost uzorka i stoga visoka varijabilnost merenih parametara je uočena i u drugim istraživanjima u kojima su korišćene jedinke iz prirodnih populacija (Brinkmann i sar., 2015; Deutschman i sar., 2016). U slučaju analize EROD aktivnosti u jetri *A. alburnus* i *Neogobius sp.* se može uočiti značajno viša aktivnost na lokalitetima JDS 48 i JDS 66 u odnosu na ostale lokalitete što je za lokalitet JDS 48 bilo očekivano, s obzirom na viši toksični pritisak, dok se lokalitet JDS 66 ne izdvaja od ostalih lokaliteta na osnovu suma toksičnih jedinica. Ipak, viša EROD aktivnost na lokalitetu JDS 66 može biti posledica taloženja supstanci u sedimentu usled manjeg protoka vode zbog blizine lokaliteta delti Dunava, a time i veće izloženosti jedinki preko sedimenta.

Na lokalitetu JDS 33, koji se nalazi u urbanoj zoni Novog Sada, je potvrđen hemijski pritisak na osnovu sume toksičnih jedinica, kao i prisustvom kafeina, indikatora zagađenja komunalnim otpadnim vodama. Pored toga, značajan doprinos ukupnom toksičnom pritisku daju metali, koji su se pokazali kao najvažniji stresor za makroinvertebrate (Liška i sar., 2015; Rico i sar., 2016). Ipak, na ovom lokalitetu su uočene neočekivano niske vrednosti EROD i GST aktivnosti u odnosu na ostale lokalitete. Ovi rezultati su u skladu sa niskom ekspresijom gena koji učestvuju u odbrani od oksidativnog stresa i metabolizmu ksenobiotika kod *A. alburnus* i mogu ukazivati na inhibiciju mehanizama antioksidativne zaštite i metabolizma ksenobiotika, što je zabeleženo i u drugim istraživanjima na lokalitetima pod visokim hemijskim pritiskom (van der Oost i sar., 2003; Traven i sar., 2013).

Analizom aktivnosti AChE kod vrste *Neogobius sp* su uočene razlike između lokaliteta pri čemu je aktivnost na lokalitetu JDS 65 bila niža u odnosu na ostale lokalitete, što je u skladu sa inhibicijom AChE *in vitro* uzorcima vode sa lokaliteta koji se nalazio u blizini lokaliteta JDS65 (Schulze i sar., 2015).

Pored pomenutih biomarkera kod jedinki *A. alburnus* Deutschman i sar., 2017 su analizirali i genotoksični potencijal zagađenja na odabranim lokalitetima, pri čemu su se komet i mikronukleus esej pokazali kao koristan alat za monitoring i procenu genotoksičnog potencijala u rekama. Rezultati ukazuju da oštećenja DNK u eritrocitima riba u najvećoj meri nastaju pod uticajem netretiranih komunalnih i industrijskih otpadnih voda u visoko naseljenim regionima. Lokalitet JDS 60 koji se nalazi nizvodno od velikog grada, Bukurešta, se istakao kao lokalitet sa najvišim genotoksičnim potencijalom, dok je na lokalitetu JDS48 koji se na osnovu sume toksičnih jedinica ističe kao lokalitet pod visokim hemijskim pritiskom, zabeležen iznenađujuće nizak odgovor parametara genotoksičnosti.

Usled prisustva različitih tipova antropogenih pritisaka duž celog toka Dunava, jedan od izazova je bio odabir referentnog lokaliteta jer je skoro nemoguće identifikovati lokalitet koji se ne nalazi pod dejstvom nekih stresora. Problem nemogućnosti odabira adekvatnog lokaliteta koji predstavlja referentne uslove u odnosu na koje bi se poredili rezultati sa drugih lokaliteta ograničava upotrebu biomarkera u proceni efekata hemijskog stresa (Traven i sar., 2013). Dodatni ograničavajući faktor upotrebe biomarkera u *in situ* istraživanjima za procenu ugroženosti određenih lokaliteta jeste varijabilnost parametara kao što su enzimski eseji kao i geni koji predstavljaju nespecifične biomarkere jer pored stimulacije, mogu biti inhibirani pod uticajem hemijskih stresora. Ipak, njihova upotreba može biti korisna, zajedno sa drugim alatima u proceni efekata tačkastih izvora zagađenja.

6.1.6. Veza između rezultata *in vitro* analiza sa LVSPE uzorcima vode i biomarkera kod riba iz prirodnih populacija

Hemijskim analizama LVSPE uzoraka vode sa 22 lokaliteta je identifikovano 264 relevantnih organskih supstanci u ekstraktima uzorka koji su kasnije testirani u bateriji *in vitro* bioeseja (Schulze i sar., 2015; Neale i sar., 2015). U kontekstu hemijskih analiza, hemijsko opterećenje reke Dunav u poređenju sa drugim evropskim rekama, je generalno nisko (Liška i sar., 2015). Ipak, efektom usmerene skrining analize su pokazale toksični potencijal uzoraka vode na nekoliko testiranih parametara (Tabela 6.1). Uopšteno, svih 22 ekstrakta su indukovali efekat u barem jednom ili više bioeseja koji pokrivaju parametre mutagenosti, AhR i PXR posredovane aktivnosti, odgovore na oksidativni stres, aktivaciju ER i test algalnog rasta (inhibicija fotosistema II) (Schulze i sar., 2017, Tabela 6.1). Ipak, na osnovu rezultata Neale i sar., 2015, nivoi uočenih efekata su niski (Neale i sar., 2015, Tabela 6.1).

S obzirom na to da se lokaliteti uzorkovanja za *in vitro* analize i analize biomarkera kod riba nisu u potpunosti poklapali, poređenje je bilo moguće za lokalitete JDS 27, 33, 36, 39, 53, 60, 65 i 67). Ekstrakti uzoraka vode sa ovih lokaliteta su bili aktivni u barem jednom *in vitro* eseju (Schulze i sar., 2017). Rezultati *in vitro* ARE eseja, koji je pokazatelj oksidativnog stresa, nisu pokazali značajnu indukciju primenom ovih uzoraka. Slično, i rezultati parametara oksidativnog stresa kao što je aktivnost enzima katalaze i ekspresija gena *gpx1* i *nrf 2* u uzorcima jetri riba iz studije slučaja Dunav, uglavnom nisu pokazali značajne razlike između lokaliteta sa izuzetkom lokaliteta JDS 54 sa nižim nivoom ekspresije ovih gena, što je pomenuto u prethodnom tekstu (podnaslov 6.1.5). Odgovori *in vitro* eseja reporterskih gena adaptivnih odgovora na oksidativni stres, koji su posredovani *nrf2* su bili indukovani uzorcima vode Dunava (Neale i sar., 2015). Slično, indukcija metabolizma ksenobiotika nije bila izražena na osnovu odgovora biotransformacionih enzima CES i GST kod riba, kao ni gena *mgst3a* na većini analiziranih lokaliteta, dok su odgovori *in vitro* eseja AhR i PXR indukovani uzorcima vode sa ovih lokaliteta. Odgovor *In vitro* AChE eseja bio je indukovano uzorcima vode sa istraživanih lokaliteta, što je u skladu sa rezultatima enzimske aktivnosti kod riba. Inhibicija enzima AChE na lokalitetu JDS 64 kao i inhibicija odgovora AChE *in vitro* eseja sa uzorcima vode sa lokaliteta JDS 65 koji se nalazi 5 km uzvodno ukazuju na prisustvo supstanci koje deluju kao inhibitori AChE u ovoj oblasti.

Među analiziranim lokalitetima kao jedini lokalitet sa povećanim nivoom mikronukleusa u eritrocitima jedinki *A. alburnus* je bio lokalitet JDS 60, koji je pod uticajem velikog grada, Bukurešta, dok su na osnovu AMES *in vitro* testa koji se koristi za detekciju genotoksičnog potencijala uzorci vode sa većine lokaliteta izazvali efekat. Razlika u osetljivosti *in vitro* metoda i odgovora biomarkera u živim jedinkama može biti uzrokovana postojanjem različitih mehanizama odbrane organizma, koji u *in vitro* sistemima nisu prisutni. Kao i u slučaju odgovora biomarkera, za *in vitro* rezultate nije ustanovljena značajna povezanost sa sumama detektovanih supstanci, pri čemu je aktivacija AhR signalnog puta objašnjena do 71% detektovanim supstancama, a ER aktivacija do 80%. Znatno manje procenata odgovora je bilo moguće objasniti za adaptivne odgovore na stres, PXR esej i FET test (manje od 0.2%) (Neale i sar., 2015).

Iako su svi uzorci vode bili aktivni makar u jednom *in vitro* eseju, odgovori su bili u većini slučajeva niskog nivoa i pored visokih faktora obogaćenja što ukazuje na nizak toksični potencijal primarnih uzoraka i na veliki potencijal razblaženja Dunava. Tome svedoče i hemijske analize koje ukazuju na značajno poboljšanje hemijskog statusa nekoliko kilometara od ispusta neprerađenih otpadnih voda grada Novog Sada (König et al, 2017).

Tabela 6.1. Pregled rezultata *in vitro* eseja sa LVSPE ekstraktima na odabranim lokalitetima duž toka Dunava

Lokaliteti	Algae GI *	Algae SII *	FET #	Ames -S9 *	Ames +S9 *	p53 #	ARE #	NFKB #	ER #	PXR #	AhR #	GR *	AChE *
27	↑	ir	ir	ir	↑↑	ir	↑	↑	↑↑	↑↑	↑	ir	ir
33	ir	ir	↑	↑	↑↑	ir	↑	1	↑	↑↑	↑↑	↑	ir
36	↑↑	↑	ir	↑	↑↑	ir	↑	ir	↑↑	↑↑	↑	↑↑	ir
39	↑↑	↑	ir	↑	↑↑	ir	ir	↑	1	↑↑	↑	↑	ir
53	↑↑	↑	ir	ir	↑↑	ir	↑	↑	↑	↑↑	↑	ir	ir
60	↑↑	↑	ir	ir	↑↑	ir	ir	ir	↑↑	ir	ir	ir	ir
65	↑↑	↑	ir	↑	↑↑	↑	↑↑	ir	↑↑	↑↑	↑	ir	ir
67	↑	↑	↑	ir	ir	↑	ir	↑	ir	↑↑	ir	ir	ir

≡ Bez efekta, ↑ – Slab efekat, ↑↑ – Značajan efekat * Na osnovu Schultze i sar., 2015; # Na osnovu Neale i sar., 2015; *In vitro* eseji: Algae GI – esej inhibicije algalnog rasta; Algae PSII – esej inhibicije fotosistema II kod algi; FET – test na embrionima riba; Ames -S9 / +S9 Ames test mutagenosti bez i sa aktivacijom metabolizma; p53 – esej genotoksičnosti p53RE–bla; ARE – esej oksidativnog stresa ARE–bla; NF– κB – esej inflamacije NF– κB–bla; ER – (anti–)estrogen–slične aktivnosti reporterski gen MELN esej; AhR – metabolizam ksenobiotika AhR posredovanom aktivnošću CAFLUX esej; PXR – metabolizam ksenobiotika PXR posredovana aktivnost HG5LN–hPXR esej; GR – aktivost slična glukokortikoidima GR CALUX; AChE – esej inhibicije acetilholinesteraze; JDS 3 kodovi lokaliteta uzorkovanja: JDS 3 ID: 27 – Herzegsanto (HU); 33 nizvodno od Novog Sada (RS); 36 – Nizvodno od ušća Tise (RS); 39 – Grocka / nizvodno od Beograda (RS); 53 – Nizvodno od Zimnice/Svishtova (RO/BG); 60 – Čiciu/Silistra (RO); 65 – Reni (RO), 67 – Sulina kanal (delta Dunava)

6.2. Prednosti i mane različitih eksperimentalnih postavki u *in situ* istraživanjima

Različiti tipovi postavke nude određene prednosti ali imaju i ograničenja, pa odabir zavisi od ciljeva istraživanja, a idealno, kao u slučaju našeg istraživanja, kombinacija različitih pristupa daje optimalne rezultate.

Prednosti koje nudi analiza parametara kod jedinki iz prirodnih populacija uključuju mogućnost praćenja dugoročnih efekata zagađenja kao što su promene opšteg stanja organizma, reproduktivni parametri i bioakumulacija, dok se nedostaci ogledaju u potencijalnoj nemogućnosti sakupljanja dovoljno velikog broja jedinki iste vrste, adekvatnog pola i uzrasta za uzorak kao i nepoznavanje istorije jedinki i njihovog kretanja.

U okviru obe studije slučaja korišćene su relativno tolerantne vrste koje su prilagodljive na različit kvalitet vode i staništa (Maceda-Veiga i de Sostoa, 2011), pri čemu samo njihovo prisustvo na određenom lokalitetu, ne predstavlja pouzdan indikator o kvalitetu životne sredine. Vrste *A. brama* i *A. alburnus* u prirodnim populacijama mogu da hibridizuju sa više vrsta riba iz porodice Cyprinidae kao i međusobno, što potencijalno može povećati njihovu otpornost na izmenjene uslove životne sredine (Blachuta i sar., 1984; Witkowski i sar., 2015).

Obe vrste iz prirodnih populacija koje su korišćene, *A. brama* i *A. alburnus* su među 5 najabundantnijih vrsta duž toka Dunava kroz Srbiju, pri čemu najveći procenat jedinki pri neselektivnom lovu na svim analiziranim sektorima čine *A. alburnus* (Bammer i sar., 2015; Miljanović i sar., 2016). *A. brama* čine 4% ukupnog ulova, a *A. alburnus* čak 59% u sekciji Dunava duž rezervata Gornje Podunavlje. U sekciji nizvodno od rezervata do Novog Sada *A.*

brama čine 1.8%, a *A. alburnus* 48%, dok su nizvodno od Novog Sada činile 1% i 70% istim redom. Njihova dostupnost na lokalitetima od interesa ih čini pogodnim za *in situ* istraživanja koja podrazumevaju poređenje parametara kod jedinki iz prirodnih populacija sa različitim lokalitetima. Uopšteno, rezultati istraživanja ihtiofaune na lokalitetima iz našeg istraživanja ukazuju na to da su sve populacije iz kojih su uzorkovane jedinke *A. brama* i *A. alburnus* stabilne, i da se nalaze u adekvatnim hidromorfološkim uslovima sa dovoljno resursa za život i mrest. Takođe da dostupnost hrane ne predstavlja ograničavajući faktor za njih (Bammer i sar., 2015; Kovac, 2015; Miljanovic i sar., 2016), čineći hemijsko zagađenje Dunava na odabranim lokalitetima najznačajniji, a za ribe poput abudantnih vrsta *A. brama* i *A. alburnus* možda i jedini stresor koji može predstavljati izazov za održanje homeostaze na više nivoa i eventualno ugroziti opstanak populacija. Time je pri analizi opštih biomarkera isključen uticaj drugih faktora.

Razlike u odgovorima biomarkera kod populacija *A. brama* iz našeg istraživanja koje žive u kontrastno različitim uslovima u kontekstu zagađenja, gde je ono jedini prepoznati pritisak na populaciju koja je pod uticajem zagađenja grada Novog Sada, prateće industrije i poljoprivrede, jesu bile uočljive iz razloga adekvatnog odabira lokaliteta. Ipak, obrasci odgovora biomarkera nisu bili jednoznačni i ukazuju najviše na postojanje adekvatnih adaptivnih mehanizama kod izložene populacije koja se uspešno bori sa hemijskim stresom, jer su obe analizirane populacije stabilne.

Kod vrste *A. alburnus*, uopšteno, odgovori biomarkera nisu pokazali značajne razlike, što je pored male veličine uzorka posledica odabira lokaliteta uzorkovanja na velikoj skali (duž toka Dunava). Rezultati hemijskih analiza pokazuju da reku Dunav ne karakteriše jasan uzvodno-nizvodni gradijent, pa je logično i što trend promena odgovora nije uočljiv u funkciji toka. Takođe, često se lokaliteti sakupljanja riba nisu u potpunosti poklapali sa lokalitetima uzorkovanja vode za hemijske analize, uz izostanak adekvatnog referentnog lokaliteta. Pored toga, razlozi se možda mogu naći i u ekologiji vrste koja ima veći indeks otpornosti od *A. brama* i *C. carpio*, uz moguće lakše izbegavanje nepovoljnih uslova kao euritopna vrsta (Aarts i sar., 2003; Bammer i sar., 2015 u Liška i sar., 2015). Takođe, *A. alburnus* su vrsta koja živi u gornjim slojevima vode, pri čemu se hrani uglavnom sitnim beskičmenjacima iz vodenog stuba i sa površine, dok se *A. brama* nalaze bliže sedimentu iz kog se najčešće hrane bentoskim beskičmenjacima, mešajući sediment, preko kog dodatno mogu biti izložene brojnim supstancama kojima nisu izložene preko vodenog stuba (Freyhof i Kottelat 2008; Girdler i sar., 2010). Iz ovog razloga, pri odabiru vrste, osim distribucije i abudantnosti treba uzeti u obzir i aspekte ekologije vrste kao i ekološke niše koju zauzima.

Pri interpretaciji rezultata, ne treba potceniti mogućnost efekata hemijskog stresa na osetljivije vrste koje čine manji procenat ribljih zajednica, na osnovu izostanka odgovora biomarkera ili odgovora koji predstavljaju adaptivne mehanizame kod tolerantnih vrsta kao što su *A. brama* i *A. alburnus*, a koje su prilagođene na lošiji kvalitet životne sredine i povećan hemijski stres, sa adekvatnim adaptivnim mehanizmima odbrane od hemijskog stresa.

In situ kavezno izlaganje organizama nudi brojne prednosti u odnosu na laboratorijske testove ili analizu parametara u prirodnim populacijama, ali ima i određene nedostatke.

Prednosti koje nudi ovakav tip postavke su realistični uslovi izlaganja koji omogućavaju razlikovanje izvora stresora i predznanje o tipu zagađenja, uz minimizaciju posledica nastalih uzorkovanjem i manipulacijom u laboratoriji i smanjenje nepouzdanosti ekstrapolacije rezultata dobijenih u laboratoriji na terenske uslove. Ipak, kavezi mogu menjati uslove kao što su svetlost, prolaz čestica, ponašanje i ishrana jedinki, što može uticati na tumačenje rezultata. Dodatni izazovi se ogledaju u poteškoćama postavke kaveza u duboke, brzotekuće vodotoke i potencijalnim problemima vezanim za vremenske neprilike (oluje, ekstremne zime, vodostaj). Takođe, važan činilac adekvatne postavke je i odabir vrste.

Vrsta *C. carpio* koja je korišćena za kavezno izlaganje u Dunavu i Savi takođe čini deo nativnih ribljih zajednica za odabrane vodotoke, čineći je pogodnom za ovakav tip eksperimenta, bez rizika introdukcije alohtonih vrsta (Piria i sar., 2016). Kavezne postavke nisu standardizovane i prihvaćene kao rutinska praksa, stoga propisi koji se tiču introdukcije alohtonih vrsta mogu biti neusklađeni

U eksperimentalnoj postavci koja je podrazumevala kavezno izlaganje jedinki *C. carpio*, odabir vrste se pokazao kao adekvatan s obzirom na to da mortalitet nije zabeležen tokom devetodnevnog kaveznog izlaganja čak ni na lokalitetu GC koji je pod najvećim hemijskim pritiskom, što je važno pri analizi subletalnih parametara kao što su biomarkeri.

S druge strane, odabrana vrsta je bila dovoljno osetljiva, pa je bilo moguće utvrđivanje razlika u odgovoru većeg broja biomarkera između analiziranih lokaliteta kao što je HSI, aktivnost enzima CAT, ekspresija gena opšteg odgovora na stres, gena koji učestvuju u inflamatornom odgovoru i autofagiji i gena biomarkera neurotoksičnosti. Dodatno, vrsta *C. carpio* se pokazala kao najosetljiviji model za procenu genotoksičnog potencijala vode na odabranim lokalitetima u istraživanju, gde je detektovana najviša stopa DNK oštećenja na lokalitetu GC (Jovanovic–Marić i sar., 2020). Ove razlike takođe ukazuju i na adekvatan izbor lokaliteta postavke kaveza, pri čemu je razlika u hemijskom pritisku na ovim lokalitetima prethodno opisana u König i sar., 2017. Biomarkeri koji su analizirani u okviru ove eksperimentalne postavke, a kod kojih je izostala razlika u odgovoru između različitih lokaliteta može biti posledica dužine izlaganja. Za promene morfometrijskih parametara kao što su BCF, HSI i GSI je potrebno više vremena, a nisu nezavisni od drugih faktora poput gladovanja zbog čega bi bilo potrebno produžiti vreme izlaganja uz dohranu riba. S druge strane parametri koji predstavljaju raniji odgovor organizama na hemijski stres, poput aktivnosti enzima, a posebno genske ekspresije su možda mogli biti izmereni sa značajnim razlikama i usaglašenim obrascima, u ranijoj fazi izlaganja tj nakon kraćeg vremena ekspozicije. Naime, poznato je da većina odgovora genske ekspresije inducibilnih gena pri izlaganju stresoru može nastati brzo, pri čemu se promenjena ekspresija nekih gena može uočiti nakon nekoliko minuta, čak i sekundi, ali je isto tako i prolazna i čak pri perzistentnom stresu se može vratiti na nivoe bliske konstitutivnim nakon nekog vremena (López–Maury i sar., 2009). Stoga, u kontekstu isključivanja te opcije u tumačenju odgovora možda bi adekvatan bio drugačiji plan izlaganja koji bi podrazumevalo veći broj jedinki i sukcesivno uzorkovanje u određenim vremenskim intervalima. Ipak, ovakva postavka bi zahtevala znatno veće resurse, kao i veći broj ljudi angažovanih u fazama postavke, obilaženja lokaliteta i uzorkovanja u terminima žrtvovanja.

Pri dizajnu postavke je važan režim protoka vode jer brz tok vode može indukovati stres, a poslednično i mortalitet. Tako Brammel i sar., 2010 navode da je preživljavanje dugine pastrmke direkto povezano sa protokom vode na različitim lokalitetima, uz veći mortalitet u kavezima gde su ribe bile izložene direktno brzom vodenoj struji, nego u kavezima koji su bili postavljeni na lokalitetima sa sporijim protokom. Pored preživljavanja, razlika u protoku vode značajno utiče na biohemijske biomarkere. Hackenberger i sar., 2015 su izmerili povećanu aktivnost katalaze, koncentraciju proteina karbonila i smanjenu EROD aktivnost kod *C. carpio* u kavezima na lokalitetima sa većom brzinom protoka vode kao rezultat povećane fizičke aktivnosti, sugerišući da protok vode treba uzeti u obzir pri odabiru mesta za postavku kaveza pri biomonitoringu reka koji podrazumeva analize biomarkera, kako brzina rečnog toka koja može značajno varirati između lokaliteta ne bi uticala na tumačenje rezultata. U našem istraživanju ni na jednom od lokaliteta nisu uočeni problemi vezani za brzinu protoka vode, pri čemu je protok na svim lokalitetima bio približnog intenziteta, sa sličnom dubinom postavke kaveza.

Takođe, problemi koji se mogu javiti pri ovakvom pristupu su efekti kaveznog izlaganja na životinje, gubitak kaveza tokom izlaganja zbog krađe ili otkidanja kao i beg životinja iz slomljenih konstrukcija ili kroz prevelike otvore, ukoliko su korišćene sitnije vrste. (Dewitt i

sar., 1996–cit. Burton i sar., 2005; Burton i sar., 2005; Castro i sar., 2004; Oikari, 2006). Dizajn kaveza u našem istraživanju je bio odgovarajući, pri čemu je bila omogućena adekvatna fleksibilnost vezivanja koja je bila neophodna kako se kavezi ne bi otkinuli i bili odnešeni usled velikog protoka vode u Dunavu i Savi. Takođe, sami kavezi su sprečili gubitak jedinki usled oštećenja ili otvaranja. kao što je bio slučaj u pojedinim istraživanjima gde su kavezi bili otkinuti ili su se jedinke oslobodile (Miller i sar., 2014).

Dodatne prepreke koje se mogu sresti pri kaveznom izlaganju mogu biti vezane za gustinu jedinki u kavezu, jer prevelika gustina može izazivati dodatni stres (Brammel i sar., 2010). Iako ne postoje opšte prihvaćene smernice o optimalnom broju jedinki, odnosno o optimalnoj biomasi po zapremini kaveza, ovaj broj je species specifičan, zbog specifičnosti određenih vrsta riba (solitarno življenje, kanibalizam), osetljivost na rukovanje njima (gubitak krljušti) ili afinitet ka stresu iz nepoznatih razloga, čineći ih nepogodnim za kavezno izlaganje kao što su smuđevi i štuke (Oikari, 2006), pri čemu su pojedina istraživanja zabeležila mortalitet usled prevelike gustine jedinki (Guernic i sar., 2016). Iz navedenih razloga *C. carpio* je bila optimalna vrsta za ovakav pristup, jer jedinke mogu da žive u grupama i ne zahtevaju veliki prostor.

Izazov koji je prisutan kod pristupa koji podrazumeva kavezni sistem izlaganja kao i pri uzorkovanju jedinki iz prirodnih populacija, odnosno uopšteno kod *in situ* pristupa je izbor adekvatnih referentnih lokaliteta usled nedostatka delova vodotokova bez antropogenog uticaja, što je posebno bilo izraženo u rezultatima analiza biomarkera kod riba iz studije slučaja Dunav gde je nedostatak podataka iz referentnih uslova, između ostalog uslovio ravan obrazac odgovora.

Dodatno, kavezni sistem izlaganja uključuje pitanje troškova i vremenske efikasnosti, kao i praktične poteškoće (prehranu, logistiku, uzorkovanje, transport), u pogledu produženih izlaganja za procenu subletalnih–hroničnih efekata (npr. rast i reprodukciju), zbog čega je najveći broj istraživanja primenjivao kraće izlaganje *in situ* uz kvantitaciju biomarkera koji brže odgovaraju na promene ili subletalnih parametara kao što je ponašanje izloženih jedinki, bez dodatne ishrane tokom perioda izlaganja kako bi se pored logističkih izazova izbeglo narušavanje kvaliteta vode (Castro i sar., 2004). Ograničena ishrana, izuzev hranljivih čestica koje prolaze kroz rupe kaveza sa vodom, tokom perioda izlaganja može uticati na odgovore biomarkera kao što je oksidativni stres, EROD aktivnost i opšte stanje jedinki, pa je većina istraživanja radi smanjenja uticaja gladovanja na tumačenje rezultata uključivala izlaganje kontrolne grupe istim uslovima, kao što je bio slučaj sa našim istraživanjem ili konstrukcijom takvih kaveza koji omogućavaju hranjenje riba bentosnim beskičmenjacima (Ahmad i sar., 2006; Lemaire i sar., 1990–cit. Jung i sar., 2008; Bervoets i sar., 2009).

Pitanje ishrane može napraviti dodatnu razliku u poređenju sa rezultatima analiza biomarkera kod riba iz prirodnih populacija kako se u slučaju kaveznog izlaganja unos hemikalija alimentarnim putem razlikuje, izuzev ako su kao model upotrebljene vrste koje se hrane filtraciono, planktonskom hranom (Oikari, 2006). U okviru našeg istraživanja je uočen potencijalni problem koji bi se mogao javiti u interpretaciji rezultata usled dohrane jedinki, na osnovu analize sadržaja tkiva i seruma (tabele P6, P7), kod jedinki koje su žrtvovane pre početka kaveznog izlaganja, direktno po dopremanju iz ribnjaka u kom su bile hranjene.

6.3. Perspektive primene biomarkera u monitoringu akvatičnih ekosistema

Biomarkeri kod riba se koriste od 1970-ih godina za procenu stanja lokaliteta ili delova vodotoka, koji su pod uticajem industrijskih postrojenja, postrojenja za tretman otpadnih voda, kanalizacionih ispusta, rudnika, urbanih i poljoprivrednih zemljišta (za pregled videti van der Oost i sar., 2003). U ranijim istraživanjima biomarkeri su najčešće korišćeni za istraživanje uticaja zagađenja izazvanog tačkastim izvorima, u funkciji gradijenta zagađenja pri čemu su kao referentni lokaliteti korišćeni lokaliteti udaljeni od izvora zagađenja (tipično uzvodno). Većina istraživanja zasnovana na biomarkerima je praktično samo potvrđivala prisustvo zagađenja, kao što je u slučaju Cazenave i sar., 2014, dok u drugim istraživanjima biomarkeri nisu uspeali da odgovore ni na ovaj zahtev (Traven i sar., 2013). Međutim, dijagnostička moć većine „starih biomarkera” je niska zbog njihove niske specifičnosti (Cazenave i sar., 2014; Backhaus i sar., 2017). Od biomarkera se (predugo) očekivalo da nadomeste nedostatke tada dostupnih hemijskih analitičkih tehnika. Gasna hromatografija / masena spektrometrija kao osnovne analitičke tehnike nisu uspevale da detektuju ni kvantifikuju najveći deo polarnih zagađujućih supstanci. Procena stanja akvatičnih ekosistema se ograničavala uglavnom na osnovne parametre kvaliteta voda, sadržaj metala i perzistentnih organskih polutanata sa jedne i promene sastava i strukture životnih zajednica sa druge strane. Biomonitoring je dominantno bio baziran na upotrebi saprobnih indeksa, koji su u najvećoj meri ukazivali na stepen trofije, eutrofikacije i organskog opterećenja akvatičnih ekosistema (Backhaus i sar., 2017). Ovakvim pristupom, uzročno-posledične veze između zagađenja potencijalno toksičnim supstancama i njihovim smešama i promena sastava i strukture životnih zajednica nisu mogle biti ustanovljene. Smatralo se da biomarkeri mogu da pruže jasniju sliku o karakteru i intenzitetu hemijskog stresa, ali se (pogrešno) očekivalo i da ukažu na konkretne grupe supstanci koje predstavljaju ključne polutante. Zbog suviše opšteg karaktera, odnosno nedovoljne specifičnosti većine biomarkera, posebno enzima koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti i metabolizmu ksenobiotika koji i dalje dominiraju u istraživanjima, biomarkeri veoma retko uspevaju da odgovore na ove zahteve (van der Oost i sar., 2003; Di Giulio i Hinton, 2008; Traven i sar., 2013). Jedan od problema u tumačenju odgovora manje specifičnih biomarkera kao što su enzimi oksidativnog stresa i metabolizma ksenobiotika je što njihov odgovor može predstavljati kumulativni efekat više faktora koji mogu uticati na njihovu aktivnost. Pored ostalih, na određene biomarkere mogu uticati interni faktori kao što su nutritivni status jedinki, životni stadijum, uzrast, pol, polna zrelost, ali i eksterni kao što su pH vrednost, koncentracija kiseonika u vodi i temperaturne promene. Tako na primer EROD aktivost kod jedinki riba ženskog pola može biti inhibirana u odnosu na mužjake tokom perioda mresta, dok na pojedine biomarkere koji su zaduženi za homeostazu glukoze i druge metaboličke puteve takođe može uticati reproduktivna faza i različite energetske potrebe kod polova (Azimi i Rocher, 2016). Pored toga, odgovor velikog broja biomarkera je vremenski zavisna, pri čemu se organizmi mogu adaptirati na toksični pritisak vremenom, pa prilikom tumačenja rezultata biomarkera kod jedinki iz prirodnih populacija treba obratiti pažnju i na ovaj aspekt. Ipak, ovaj problem se ne odnosi na biomarkere koji prikazuju kumulativne efekte, kao što su opšte stanje jedinki mereno na osnovu somatskih indeksa, stanje reproduktivnog sistema na osnovu GSI ili oštećenje DNK.

Zbog navedenih problema, pojedini autori dovode u pitanje primenjivost enzimskih biomarkera, posebno EROD aktivnost, GST i CAT (van der Oost i sar., 2003; Traven i sar., 2013), a od 2000-tih godina istraživači se sve više okreću tzv. bioanalitičkim alatima (Escher i sar., 2021), uključujući i efektom usmerene analize (Brack i sar., 2017), koji obuhvataju specifične, mahom *in vitro* eseje. Razvoj veoma specifičnih eseja traje do današnjih dana, sa

osnovnim ciljem da usko specifično reaguju na polutante (i njihove smeše) istog ili veoma sličnog MoA, čime omogućavaju identifikaciju prisustva specifičnih i ključnih polutanata ili klasa. Poslednjih desetak godina se intenzivno radi na kvantitaciji efekta bioeseja (Escher i sar., 2021; Kaišarević i sar., 2021).

Zahvaljujući razvoju analitičkih tehnika, posebno gasne i tečne hromatografije i masene spektrometrije visoke rezolucije (GC-HRMC / LC-HRMC) ali i bioinformatike i automatizovanih procedura za analizu analitičkih rezultata (Brack i sar., 2019b) veoma detaljne analize uzoraka iz životne sredine postaju sve dostupnije. Međutim, regulatorno propisani monitoring programi u cilju procene hemijskog statusa se u najvećoj meri određuju prema važećim listama prioritetnih polutanata i pružaju informacije o prisustvu i koncentracijama zaista ograničenog broja individualnih polutanata, uprkos činjenici da smeše hazardnih materija (a ne individualni polutanti) predstavljaju faktor rizika za akvatične ekosisteme (Kortenkamp i sar., 2019). Zbog toga bioanalitičke tehnike ne gube značaj, a monitoring efekta bioanalitičkim tehnikama se predlaže kao dodatni segment monitoringa koji bi upravo obuhvatio pritisak smeša ili koktela regulisanih i neregulisanih supstanci na akvatične ekosisteme (Brack i sar., 2019b; Altenburger i sar., 2019).

Međutim, osnovni problem bioanalitičkih tehnika je nedostatak ekološkog realizma. Efekat uočen korišćenjem *in vitro* eseja donekle zanemaruje problem biodostupnosti polutanata ali važnije, i dalje ne predstavlja potvrdu ekoloških posledica *in situ*. Bioanalitičke metode ostaju odličan kompatibilni alat hemijskim analitičkim tehnikama, ali nedovoljan za procenu uticaja hemijskog stresa na ekološki integritet (Tenji i sar., 2020; Kaišarević i sar., 2021). U kontekstu WFD, bioanalitičke tehnike i monitoring efekta predložen kao dodatni monitoring pristup (Brack i sar., 2019a; Altenburger i sar., 2019) pružiće dragocene informacije o hemijskom statusu voda, ali nedostatak njihovog ekosistemskog realiteta ih sprečava da predstavljaju jasnu vezu između hemijskog i ekološkog statusa. Iako se godinama činilo da bioanalitičke tehnike sasvim zamenjuju biomarkere, upravo biomarkeri predstavljaju most koji bi mogao da poveže hemijski i ekološki status. Biomarkeri i bioanalitičke tehnike čine kompatibilne alate u multiparametarskom pristupu proceni uticaja zagađenja na akvatične ekosisteme (Backhaus i sar., 2019).

6.4. Biomarkeri i multiparametarski pristup identifikaciji hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima

Ciljevi istraživanja akvatičnih ekosistema nisu ograničeni isključivo na regulatorne zahteve, kao što su procena hemijskog i ekološkog statusa koju zahteva WFD. U kontekstu integrisanog upravljanja životnom sredinom, posebno slivnim područjima, ciljevi kompleksnih istraživanja mogu biti (prema Backhaus i sar., 2019) identifikacija crnih tačaka na vodnom telu ili slivnom području, sagledavanje svih tipova pritisaka na konkretno vodno telo, kvantitacija udela zagađenja u kontekstu ukupnih pritisaka na vodna tela na specifičnim lokacijama, identifikacija bioloških elemenata kvaliteta (receptora) najviše pogođenih zagađenjem, preporuke pri odabiru mera zaštite ili mera za umanjenje rizika / uticaja, prioritizacija, odabir i praćenje uspešnosti remedijacionih projekata, procena uticaja konkretnih zagađivača na vodna tela, revizija lista prioritetnih supstanci, validacija pouzdanosti prediktivnog modelovanja i dr. Preduslov je naravno, pažljiva formulacija ciljeva i usklađivanje multiparametarskog pristupa konkretnom cilju / problemu.

Primenljivost multiparametarskog sistema baziranog na četiri seta parametara koji obuhvataju predviđanje ukupnog toksičnog pritiska (SUM TU), rezultate bioanaliza, rezultate

analiza biomarkera i rezultate biomonitoringa, ispitana je u okviru ove disertacije na dve studije slučaja, a najviše pažnje je posvećeno agregaciji rezultata kompleksne baterije biomarkera u jedinstven indeks (ABR) pogodan za integraciju u multiparametarski sistem.

6.4.1 Agregacija signala baterije biomarkera

Baterije biomarkera za procenu efekata zagađenja i identifikaciju hemijskog stresa kod akvatičnih organizama su primenjivane i ranije (Beliaeff i Porcher, 2002; Sanchez i sar., 2013), ali tumačenje ovih rezultata je često predstavljalo izazov usled nekonzistentnih obrazaca odgovora i velike varijabilnosti uzoraka u okviru grupe, koja smanjuje moć statističkih metoda da detektuju značajne razlike. Razvijeno je i nekoliko metoda za integraciju odgovora primenjenih biomarkera (Beliaeff i Burgeot, 2002; Broeg i sar., 2005; Hagger i sar., 2008; Sanchez i sar., 2013), ali ni jedan od ovih pristupa nije idealan (Backhaus i sar., 2017). U okviru ove disertacije, u dve studije slučaja ispitano je koncept agregacije odgovora biomarkera, (ABR) predstavljen u Backhaus i sar., 2017.

Sušтина ovog koncepta je dokumentovano, transparentno i statistički utemeljeno određivanje ABR. Vrednost indeksa ne sme biti uslovljena brojem i tipom primenjenih biomarkera, što i dokazuju rezultati prikazani u ovoj disertaciji. Kod obe studije slučaja, srž baterije biomarkera predstavljaju aktivnost odabranih enzima i ekspresija odabranih gena, pri čemu ni jedan od navedena dva seta biomarkera nije identičan kod dve studije slučaja. Dodatni biomarkeri se takođe razlikuju u dve studije slučaja, i obuhvataju kondicione faktore, odnosno biomarkere genotoksičnosti. Rezultati su pokazali da ni odabir konkretnih primenjenih biomarkera, niti broj biomarkera korišćenih u analizi ne kompromituje dalju primenu indeksa ABR, odnosno, prikazani rezultati potvrđuju robusnost koncepta.

Najkritičniji korak kod izračunavanja ABR je normalizacija odgovora biomarkera, jer direktno zavisi od cilja, odnosno, eksperimentalne postavke. U studiji slučaja Novi Sad / Šabac shodno postavljenom cilju, a to je procena uticaja zagađenja koje direktno potiče od (neprečišćenih) otpadnih voda na tzv. crnim tačkama, primenjen je klasičan uzvodno – nizvodni pristup sa jasno definisanim referalnim (kontrolnim) grupama, kako u postavci kaveznog sistema izlaganja, tako i kod analize odgovora biomarkera kod jedinki iz prirodnih populacija. Ovakav koncept je omogućio direktnu normalizaciju biomarkera kod jedinki iz eksponiranih grupa (medijane) referalnim vrednostima. Kako promene nisu bile jednosmerne (pojavljuje se i inhibicija i stimulacija u odgovorima biomarkera), a da bi sve promene, bez obzira na smer, jednako uticale na vrednost ABR (geometrijska sredina svih odgovora primenjenih biomarkera), normalizovane medijane su transformisane tako da povećanje vrednosti odgovora biomarkera u odnosu na kontrolu / referalnu vrednost ukazuju na veći efekat (uticaj) stresa. To je postignuto korišćenjem recipročne vrednosti normalizovanih odgovora inhibiranih biomarkera. Ovakvom obradom rezultata, vrednosti ABR se teorijski kreću od 1 do ∞ . Ako ABR interpretiramo kao procenat razlike odgovora u odnosu na kontrolu, vrednost ABR od 1.1 bi značila 10% razlike, vrednost od 1.5 bi ukazivala na 50%, a vrednost 2 bi se interpretirala kao 100% razlika u odnosu na kontrolu. U konkretnoj studiji slučaja Novi Sad / Šabac, na osnovu rezultata kavezne postavke (*C. carpio*), vrednosti ABR na sva tri ispitivana lokaliteta veće su od kontrolnih za 59 do 90%, dok vrednost ABR za lokalitet Novi Sad na osnovu rezultata analize biomarkera kod jedinki *A. brama* iz prirodnih populacija iznosi čak 2.40, odnosno, razlika u odnosu na kontrolu iznosi preko 100%.

Normalizacija odgovora biomarkera u studiji slučaja Dunav nije tako jednostavna, Usled široke prostorne skale i brojnih antropogenih pritisaka kojim je ovo slivno područje izloženo tokom više stotina godina, ne postoji lokalitet koji bi mogao predstavljati referalni za ceo tok Dunava. A kako za dve vrste odabrane za monitoring biomarkera (*A. alburnus* i *N.*

melanostomus) ne postoje podaci o bazalnim nivoima ekspresije odabranih gena ni aktivnosti odabranih enzima, ne postoje referalne vrednosti ni za jedan od analiziranih biomarkera. Zbog toga, jedino logično rešenje je bilo da se odgovori biomarkera u studiji slučaja Dunav normalizuju na maksimalne vrednosti medijane svakog od analiziranih biomarkera. Podrazumevalo se da se maksimalni odgovor biomarkera očekuje na mestu najvećeg uticaja. Zbog načina normalizacije, smer promene je razmotren i uračunat u odgovor pre same normalizacije, za biomarkere kod kojih se porastom uticaja (zagađenja) očekuje smanjenje odgovora, odnosno samo kod aktivnosti enzima AChE. Za ostale enzime kao i gensku ekspresiju dodatna transformacija podataka nije rađena, jer se *a priori* podrazumevalo povećanje ekspresije / aktivnosti sa porastom pritiska (zagađenja). Obzirom da se medijane odgovora biomarkera normalizuju na maksimum, mogući odgovor biomarkera se kreće u rasponu od 0 do 1. Na 10 lokaliteta na reci Dunav kod kojih je količina dostupnih podataka bila dovoljna za izračunavanje ABR, vrednosti su se kretale od 0.3 do 0.58.

Napred prikazan postupak predstavlja osnovnu obradu podataka monitoringa. Kako su u obe studije slučaja primenjeni biomarkeri različite specifičnosti, a pripadali su i različitim nivoima biološke organizacije, pojedinim grupama biomarkera se mogu dodati težinski faktori koji bi ponderali ABR indeks prema specifičnosti odgovora na hemijski stress (Indeks kauzalnosti) sa jedne i ekološke relevantnosti (Indeks ekološke relevantnosti) sa druge strane. ABR vrednost se ne bi izražavala kao geometrijska sredina normalizovanih odgovora biomarkera, već bi svaki normalizovani odgovor trebalo dodatno ponderirati. Konkretno, svakom od korišćenih biomarkera bi se dodelio težinski faktor. Integrativniji biomarkeri, kao što su kondicioni indeksi bi imali više težinske faktore ekološke relevantnosti (od 60 – 70%) a niske težinske faktore specifičnosti (na pr. 20-30%). Genotoksični parametri (mikronukleus i komet esej) bi mogli nositi relativno visoke vrednosti oba težinska faktora, 50-70%. Po analogiji, smatramo da bi kod ekspresije specifičnih gena, odnosno gena koji ukazuju na aktivaciju specifičnih odgovora (npr. neurotoksični parametri) i aktivnosti specifičnih enzima (npr. AChE) odnosi težinskih faktora bili obrnuti u odnosu na npr. kondicione indekse, odnosno, viša specifičnost (60-70%) u odnosu na relevantnost (20-30%). Parametri opšteg stresa, bilo da su u pitanju geni ili enzimi, imali bi slične vrednosti oba težinska faktora, 30-40%.

Drugi kritični korak kod primene ABR je klasifikacija, odnosno interpretacija rezultata. Integracija ABR u multiparametarski sistem zahteva rangiranje vrednosti ABR u tri klase (0 – izostanak signala, 1 – umeren signal, 2 – jasan signal). Backhaus i sar. (2017, 2019) predlažu da se razlike od 10 do 50% u odnosu na kontrolu smatraju umerenim, a sve razlike u vrednostima ABR veće od 50% u odnosu na kontrolu smatraju jasnim signalom hemijskog stresa (klasa 2). Tako su svi lokaliteti iz studije slučaja Dunav sa vrednostima ABR između 0.1 i 0.5 svrstani u klasu 1, a svi sa ABR vrednostima preko 0.5 u klasu 2. Nijedan od odabranih lokaliteta nije svrstan u klasu 0. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su potvrdili izuzetno velika individualna variranja svih bioloških odgovora u *in situ* uslovima, bilo da je u pitanju analiza biomarkera kod jedinki iz prirodnih populacija ili kaveznog sistema izlaganja. Zbog toga, kao i zbog drugačijeg načina normalizacije odgovora biomarkera u slučaju postojanja kontrolnih ili referalnih vrednosti, smatramo da se razlika ABR od 50% do 100% u odnosu na kontrolu može smatrati umerenim signalom, a tek razlika od 100% (i više) jasnim signalom hemijskog stresa.

6.4.2 Integracija ABR u multiparametarski sistem

Integracija ABR vrednosti sa ostalim setovima podataka u multiparametarski sistem ponovo ukazuje na izuzetnu važnost jasno postavljenih ciljeva istraživanja, kao i adekvatne eksperimentalne postavke. Cilj studije slučaja Novi Sad je procena uticaja hemijskog stresa poreklom iz neprečišćenih otpadnih voda grada Novog Sad. Modelovana ukupna hronična toksičnost, rezultati bioeseja i ABR vrednost pokazuju da zagađenje, odnosno hemijski stres predstavljaju značajan pritisak i ukazuju da je uticaj zagađenja na sastav i strukturu zajednica riba vrlo verovatno najjači individualni stresor. Umeren signal poremećaja na nivou ihtiofaune (LoE4) potiče ipak od jednokratnog maršutnog ispitivanja u okviru JDS 3. Redovnim biomonitoringom bi rezultati verovatno bili precizniji i drugačiji, i potencijalno pokazali veće promene u sastavu i strukturi zajednica riba u odnosu na one primećene jednokratnim skriningom. Očekivano, zagađenje koje dospeva putem neprečišćenih otpadnih voda grada Novog Sada, uprkos ogromnom razblaženju (Floehr i sar., 2013) i velikom potencijalu samoprečišćavanja ove moćne reke, predstavlja značajan pritisak na Dunav, što je i potvrđeno rezultatima multiparametarske analize rezultata studije slučaja Novi Sad.

Multiparametarski sistem je zamišljen tako da u zavisnosti od ciljeva i raspoloživih podataka, može da obuhvati sve biološke elemente kvaliteta, odnosno i druge grupe organizama. Paralelno sa kaveznom postavkom riba, postavljeni su i pasivni nosači (kavezi) za ispitivanje biomarkera genotoksičnosti kod školjki i hironomida i konstatovan povišen nivo DNK oštećenja kod kavezno izloženih jedinki sa lokaliteta GC (Jovanović–Marić i sar., 2020). Rezultati ovih ispitivanja nisu korišćeni u demonstracionoj studiji slučaja Novi Sad / Šabac, ali su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim analizom biomarkera kod riba.

Posebne pogodnosti primene multiparametarskog pristupa se ogledaju i u dobijanju niza dodatnih informacija u odnosu na unapred planirane ciljeve. Na primer, na osnovu rezultata hemijskih analiza i bioeseja, očekivalo se da endokrini ometači poreklom iz komunalnih otpadnih voda uzrokuju intenzivnije odgovore kod eksponiranih jedinki. Sa druge strane, neočekivano intenzivni odgovori specifičnih biomarkera toksičnosti su naprotiv ukazali na neanticipiran problem prisustva i potencijalnih negativnih efekata neuroaktivnih supstanci. Izostanak značajnih promena na nivou ekspresije gena biomarkera neurotoksičnosti na lokalitetu Sava / Šabac u odnosu na lokalitet Novi Sad (u odsustvu detaljne hemijske karakterizacije uzoraka vode) ukazuje na razlike u sastavu otpadnih voda na dva lokaliteta, ali i na visoku osetljivost i specifičnost genske ekspresije kao alata u bateriji biomarkera. Neki od primera koji su se istakli kao osetljivi parametri u kaveznoj postavci su geni koji učestvuju u inflamaciji i autofagiji, kao i biomarkeri neurotoksičnosti. Biomarkeri neurotoksičnosti su zajedno sa hemijskim analizama vode kao i sadržaja seruma i mišićnog tkiva kavezno izloženih jedinki ukazali na neočekivan potencijalni rizik koji predstavljaju neuroaktivne supstance. U okviru novijih istraživanja, neuroaktivne supstance su identifikovane kao često prisutan i procentualno značajan činilac zagađenja u evropskim rekama (Busch i sar., 2016; Zhou i sar., 2019), što je zajedno sa našim rezultatima otvorilo nova pitanja za dalja istraživanja (Kaišarević i sar., 2021).

Demonstraciona studija slučaja Novi Sad, pokazala je da je multiparametarski pristup proceni uticaja hemijskog stresa na akvatične ekosisteme veoma efikasan sistem za agregaciju rezultata dobijenih analizom velikog broja parametara. Jasno postavljen cilj, adekvatna eksperimentalna postavka, jednostavan uzvodno / nizvodni pristup uz postojanje dobro definisanih referalnih lokaliteta, kao i transparentna procedura obrade podataka, jasan i jednoznačan numerički iskaz na izgled disperznih, nekonzistentnih rezultata velikog broja analiza obezbeđuju pouzdanost i poverenje u rezultate. Studija slučaja pokazala je da multiparametarski sistem omogućava veoma pogodan, jednostavan i informativan način

komunikacije dobijenih informacija sa vodoprivrednim organizacijama, nadležnim organima i širom javnosti.

Pošto su reke pod pritiskom velikog broja različitih stresora, uspostavljanje uzročno-posledičnih veza između stresora i efekata koji se mogu uočiti na nivou životnih zajednica na širokoj prostornoj skali predstavlja veliki izazov usled mogućeg istovremenog delovanja većeg broja faktora (Segner i sar., 2014). Ipak, informacije o uzrocima pogoršanja ekološkog statusa su neophodne kako bi se preduzele adekvatne upravljačke mere (Chapman i Hollert, 2006).

Dijagnostički set alata za detekciju uticaja zagađenja, dizajniran tako da integriše četiri pojedinačne linije dokaza kroz transparentan i statistički podržan pristup, je primenjen na studiju slučaja Dunav kako bi se omogućila sistematska evaluacija opsežnog seta podataka koji su dobijeni u okviru JDS3 kampanje. Osnovni cilj je bio da se proceni kolika je verovatnoća da zagađenje ima efekte na ekološki status lokaliteta uzorkovanja. Ovim sistematičnim postupkom velika količina podataka je transformisana na transparentan način u razumljive matrice za deo lokaliteta na kojima je uzorkovanje sprovedeno.

Primenom dijagnostičkog seta alata je identifikovan određeni broj lokaliteta duž toka Dunava gde sve linije dokaza, od procene toksičnosti pomoću modelovanja, preko odgovora bioeseja i biomarkera, do indikatora na nivou zajednica ukazuju na pogoršanje hemijskog i ekološkog statusa i daju indicaciju da je zagađenje dominantan pritisak koji kompromituje ekološki integritet reke Dunav. Uopšteno, rezultati ukazuju da je veliki broj lokaliteta u Dunavu pod jasnim antropogenim uticajem i u svim slučajevima se hemijski pritisak izdvojio kao potencijalni uzrok.

Od deset lokaliteta sa kojih su obrađeni rezultati genske ekspresije kod *A. alburnus*, dva lokaliteta (JDS 48 i 60) se karakterišu jasnim signalom negativnih promena na nivou ihtiofaune (LoE 4). Kod oba lokaliteta, modelovana ukupna toksičnost (LoE 1) pokazuje jasan signal hemijskog stresa. Uključivanje LoE 3 u integralni mutiparametarski pristup pruža mogućnost identifikacije uzroka značajnih ekoloških efekata, odnosno negativnih promena na nivou ihtiofaune na ova dva lokaliteta. Kod JDS 48, analiza biomarkera (LoE 3) ukazuje da zagađenje predstavlja značajan pritisak i da su promene na nivou ihtiofaune najverovatnije uzrokovane zagađenjem. Kod JDS 60 sa druge strane, iako je zagađenje nesumljivo prisutno, umeren signal LoE 2 i 3 ukazuju da aktivirani adaptivni mehanizmi mogu da se izbore sa hemijskim stresom, a da se uzroci negativnih promena na nivou ihtiofaune moraju tražiti i u drugim tipovima pritisaka na akvatične ekosisteme, kao što su promene načina upotrebe priobalja, hidromorfološke promene, prekomerni selektivni izlov i sl. Na ostalih osam lokaliteta, prema JDS 3 podacima, signal promena na nivou ihtiofaune je blag (umeren), uz jasan signal zagađenja (LoE1). Uključivanjem LoE 3 u analizu, na četiri od ovih osam lokaliteta (JDS 54, 62, 66 i 67) možemo konstatovati da zagađenje predstavlja značajan pritisak i da su blage promene na nivou ihtiofaune najverovatnije direktna posledica zagađenja. Kao što je već diskutovano u studiji slučaja Novi Sad, jednokratni skrining sastava i strukture ihtiofaune ne može dati jasnu i potpunu sliku o stanju životnih zajednica, a LoE 3 upravo ukazuje na potrebu redovnog biomonitoringa koji bi identifikovao možda i značajnije promene na nivou životnih zajednica.

Primena multiparametarskog prisupa u studiji slučaja Dunav je ukazala i na brojne faktore koji otežavaju i primenu i interpretaciju rezultata kod istraživanja na ovako velikoj prostornoj skali. Zagađujuće supstance u Dunavu su prisutne u veoma niskim koncentracijama (Liška i sar., 2015) i toksični pritisak je relativno nizak. Biološki odgovori koji su izmereni u većini *in vitro* bioeseja u okviru JDS3 su bili niskog nivoa čak i sa visokokoncetrovanim uzorcima (Schultze i sar., 2015; Neale i sar., 2017). Zbog toga je nizak odgovor biomarkera

kod jedinki obe vrste riba očekivan, iako su Deutschman i sar., 2017 i Boetcher i sar., 2010 registrovali povišen nivo oštećenja DNK u eritrocitima riba sa nekih lokaliteta blizu ušća pritoka u Dunav kao i nizvodno od velikih gradova kao što su Bukurešt i Beograd.

Uprkos obimu istraživanja, studija slučaja Dunav se susrela sa nekoliko tehničkih izazova koji su bili posebno u vezi sa nedostatkom ekotoksikoloških podataka posebno podacima o hroničnoj toksičnosti za većinu detektovanih supstanci, što je bilo problematično za konzistentnu evaluaciju LOE1 (Rico i sar., 2016). Takođe, kao jedna od prepreka pri evaluaciji podataka se pokazao nedostatak referentnih vrednosti za odgovore biomarkera (LOE3) kod riba iz prirodnih populacija i indekse zajednica (LOE4) usled nemogućnosti pronalazjenja adekvatnog referentnog lokaliteta. Iz tog razloga drugi aspekt značaja naših rezultata se ogleda u tome što su, koliko znamo, ovo prve analize genske ekspresije većeg broja stres indukovanih gena koji učestvuju u različitim grupama fizioloških odgovora kod *Alburnus alburnus* i *Abramis brama*, pa čak i kod *Cyprinus carpio* koji je češće korišćen model u ekotoksikološkim istraživanjima, što daje informacije o nivoima njihove bazalne ekspresije, kao osnove za njihovu potencijalnu upotrebu i interpretaciju u odsustvu informacija o toksičnom pritisku i referentnim uslovima. U tom kontekstu bi koristan pristup bio uspostavljanje pragovnih vrednosti za supstance koje pripadaju grupama sa različitim načinima delovanja (Keiter i sar., 2006; Karami i sar., 2013). Tako je definišaje pragovnih vrednosti odnosno kvantitacija rezultata bioeseja uslov za integraciju monitoringa efekta u WFD (Brack i sar., 2017; Escher i sar., 2018; Altenburger i sar., 2019).

Pored toga, aspekt koji je ograničio procenu efekata uticaja zagađenja duž toka Dunava na široj skali je bila heterogenost podataka koji su dobijeni za različite lokalitete. Tako, od 68 lokaliteta uzorkovanja, na samo 19 su sakupljeni podaci za barem 3 LOE. Za najveći broj lokaliteta su nedostajali podaci za LOE2. Pri tome, rezultati za određeni broj lokaliteta gde je signal za LOE3 i 4 bio umeren, ukazuju na potrebu analize proširene baterije biomarkera iz LOE2 koji uključuju eseje za endokrinu regulaciju i mutagenost, u budućim istraživanjima.

LOE1 signal ukazuje na jasan efekat na svim lokalitetima, što je rezultat korišćenja akutnih toksičnih vrednosti, visokog ekstrapolacionog faktora (AF 100) i odabira pragovnih vrednosti za klasifikaciju i evaluaciju LOE 1 signala na osnovu sume toksičnih jedinica. Činjenica da su svi lokaliteti slično rangirani u evaluaciji LOE1 uslovljen je sličnim sumama toksičnih jedinica, što odražava ujednačen hemijski pritisak duž toka Dunava i odsustvo gradijenta zagađenja (Backhaus i sar., 2017). Pažljivim planiranjem lokacija za uzorkovanje, integracijom velikog broja biomarkera u ABR (LoE 3) i modelovanjem ukupne toksičnosti (LoE1), Schmitz i sar. (2022) su na studiji slučaja manjih razmera uspešno demonstrirali primenljivost agregiranog odgovora biomarkera (ABR) za identifikaciju i prioritizaciju crnih tačaka zagađenja na vodotoku sa jasno izraženim gradijentom zagađenja. Pokazali su prednosti uključivanja transkriptomike u kompleksnu bateriju biomarkera i uspehi da identifikuju difuzne i tačkaste zagađivače i konkretne polutante koji uzrokuju pogoršanje ekotoksikološkog statusa istraživanog vodotoka.

Rezultati multiparametarskog pristupa koji je primenjen na studiji slučaja Dunav, naglašava važnost formulacije problema kao ključnog elementa. Čak i u slučaju monitoring programa širokog obima koji su naizgled sveobuhvatni, kao što je JDS3, neophodna je sistematičnija definicija ciljeva istraživanja. Tako, osnovni cilj može biti određivanje kombinacije svih mogućih tipova uticaja koja je odgovorna za pogoršanje ekološkog statusa. U tom slučaju, bi primena kompletnijeg seta podataka koji sistematično pokriva sve LOE, na manjem broju lokaliteta bi verovatno povećala mogućnost izvođenja jasnijih zaključaka. Ipak, s druge strane, ako primarni cilj predstavlja identifikaciju i procenu uticaja konkretnih izvora zagađenja, monitoring lokaliteti bi trebali biti odabrani na osnovu uvodno–nizvodnog pristupa

(slično studiji slučaja Novi Sad / Šabac), čime bi se možda uočile jasnije razlike nego u slučaju udaljenih lokaliteta kao u JDS3.

7. ZAKLJUČCI

U skladu sa temom, postavljenim ciljevima i programom istraživanja, rad na doktorskoj disertaciji je obuhvatio istraživanja primene biomarkera kod riba u monitoring programima i identifikaciji hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima. Istraživanja su sprovedena u dve, prema prostornoj skali, drugačije studije slučaja – lokalnoj studiji slučaja Novi Sad i studiji slučaja Dunav na široj prostornoj skali. Biomarkeri različite specifičnosti i ekološke relevantnosti, odabrani su tako da pripadaju različitim nivoima biološke organizacije, – od *in vitro* bioeseja, preko ekspresije odabranih gena i aktivnosti enzima koji učestvuju u ključnim procesima detoksifikacije, do integrativnih fizioloških odgovora u vidu kondicionih faktora. Doktorska disertacija je urađena u okviru FP 7 projekta Solutions, što je omogućilo da rezultati sopstvenih istraživanja budu dopunjeni značajnom količinom podataka drugih istraživača na istim studijama slučaja. Ovakav pristup omogućio je optimizaciju baterije biomarkera, agregaciju dobijenih odgovora odabranih biomarkera u jedinstven indeks (ABR indeks), integraciju ABR indeksa u multiparametarski sistem za procenu uticaja hemijskog stresa u akvatičnim sistemima, kao i proveru robusnosti sistema na konkretnim israživanim lokalitetima, u različitim eksperimentalnim postavkama.

Rezultati do kojih se došlo radom na obe studije slučaja, u obe eksperimentalne postavke *in situ*, pokazuju da se odgovori svih odabranih biomarkera kod riba, od ekspresije gena, preko aktivnosti enzima do kondicionih faktora, karakterišu visokom varijabilnošću unutar eksperimentalne grupe, što nepovoljno utiče na statističku snagu hipoteznih testova i onemogućava tumačenja rezultata samo na osnovu statističke razlike u odgovorima kod jedinki sa različitih lokaliteta. Na osnovu naših, ali i brojnih prethodno publikovanih rezultata, pokazalo se da još veći problem predstavlja činjenica da odgovori biomarkera nemaju jedinstven obrazac ponašanja, odnosno, smer promene pojedinačnih biomarkera ne mora uvek biti isti. Iz ovako dispergovanih rezultata nije jednostavno zaključiti o potencijalnim efektima hemijskog stresa *in situ*, što se od biomarkera očekuje. Kako bi rezultati analize baterije biomarkera bili informativni i primenljivi kao intermedijarni set podataka koji treba da poveže hemijski i ekološki status, doprinese rasvetljavanju uzročno-posledičnih veza između zagađenja i statusa životnih zajednica i proceni ekosistemskog uticaja hemijskog stresa, razvijen je i primenjen transparentan, jednostavan i statistički utemeljen postupak integracije svih odgovora biomarkera u jedinstvenu numeričku vrednost – prosečni odgovor biomarkera (indeks ABR). Robusnost i univerzalnost ABR indeksa je pokazana na primeru dve eksperimentalne postavke u studiji slučaja Novi Sad. Baterije biomarkera nisu bile identične, što nije uticalo značajno na vrednost ABR, ni na njegovu interpretaciju. Uz predloženu klasifikacionu šemu, ABR indeks predstavlja jedan od četiri ključna elementa multiparametarskog sistema za procenu uticaja hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima, koji uključuju i procenu ukupnog toksičnog pritiska na osnovu koncentracija kvantifikovanih supstanci i njihove individualne toksičnosti, rezultate bioanaliza i rezultate biomonitoringa sastava i strukture životnih zajednica odabranog receptora.

Multiparametarski sistem za procenu uticaja hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima se pokazao kao veoma efikasan sistem za integraciju rezultata dobijenih analizom velikog broja parametara. Rezultat multiparametarske analize pokazuje da zagađenje koje dospeva putem neprečišćenih otpadnih voda grada Novog Sada, uprkos ogromnom razblaženju i velikom potencijalu samoprečišćavanja, predstavlja značajan pritisak na Dunav. Na široj prostornoj skali, multiparametarska analiza je, na prvom mestu zahvaljujući bioanalizama i biomarkerima, jasno razdvojila lokalitete na Dunavu na kojima zagađenje predstavlja značajan pritisak i uzrok evidentiranih negativnih promena na nivou sastava i strukture ihtiofaune sa jedne i sa druge strane, lokalitete na kojima se uzroci promena moraju tražiti u drugim tipovima pritisaka. Jasno postavljeni ciljevi, adekvatna eksperimentalna postavka i transparentna procedura obrade podataka, jasan i jednoznačan numerički iskaz na izgled disperznih, nekonzistentnih rezultata velikog broja analiza obezbeđuju pouzdanost i poverenje u rezultate. Studije slučaja su pokazale su da multiparametarski sistem

omogućava veoma pogodan, jednostavan i informativan način komunikacije dobijenih informacija sa upravljačkim strukturama, nadležnim organima i širom javnosti.

Studija slučaja Dunav ukazala je na neka ograničenja i nedostatke multiparametarskog pristupa na široj prostornoj skali. Nedostatak podataka o hroničnoj toksičnosti velikog broja detektovanih supstanci uslovljava predviđanje toksičnosti uzorka na osnovu dostupnih podataka o akutnoj toksičnosti ili modelovanih vrednosti hronične toksičnosti, čime se po pravilu precenjuje ukupna toksičnost uzorka, odnosno intenzitet hemijskog stresa. Kod maršutnih i monitoring programa velikih reka (i slivnih područja) poseban problem predstavlja identifikacija referalnog lokaliteta odnosno referalnih uslova, što je ključno kod analiza odgovora biomarkera. Studija slučaja Novi Sad pokazala je da strogo zaštićene zone, bez direktnog antropogenog uticaja, pružaju mogućnost za dobijanje referalnih vrednosti, odnosno, pouzdanih podataka o bazalnoj ekspresiji gena i uobičajenim nivoima aktivnosti ključnih enzima koji čine standardne baterije biomarkera. Nameće se zaključak da bi pri planiranju monitoring programa na široj prostornoj skali, mrežu lokaliteta trebalo proširiti barem jednim lokalitetom u strogo zaštićenim područjima koje naseljavaju vrste odabrane za analizu biomarkera. Alternativno, u nedostatku adekvatnog referalnog lokaliteta, bilo bi korisno definisanje opsega odgovora za biomarkere za najčešće korišćene vrste. Istraživanja u okviru ove disertacije su obezbedila preliminarne podatke o bazalnoj ekspresiji velikog broja gena i opsezima variranja aktivnosti enzima koji učestvuju u detoksifikaciji kod vrsta *A. brama*, *A. alburnus* i *C. carpio*, koji mogu biti značajni u biomonitoring istraživanjima gde nedostaje jasan gradijent zagađenja i/ili referalni uslovi, odnosno referalni lokalitet.

Pored doprinosa razvoju i validacije ABR indeksa i multiparametarskog sistema za procenu uticaja hemijskog stresa u akvatičnim ekosistemima, rad na ovoj doktorskoj disertaciji, posebno na lokalnoj studiji slučaja, upućuje i na druge specifične zaključke.

Rezultati analize biomarkera kod jedinki riba iz prirodnih populacija ističu značaj novoidentifikovanih uloga različitih gena i proteina koji su uobičajeno smatrani biomarkerima efekta, pokazujući da promene u ovim parametrima ne moraju nužno ukazivati na pogoršanje zdravlja jedinki riba. Ove promene, koje se detektuju u stabilnim populacijama riba bi se trebale tumačiti kao adaptivni odgovor na hemijski stres, pre nego direktan dokaz ekološkog uticaja zagađenja *in situ*. Adaptivna strategija *A. brama* u borbi protiv hemijskog stresa se dominantno zasniva na visoko efikasnim antioksidativnim sistemima zaštite u jetri i mozgu, visokom biotransformacionom kapacitetu jetre i aktivaciji mehanizama koji obezbeđuju energetske potrebe i kompenzuju metabolički utrošak pri odgovoru organizma na zagađenje.

Primenom kavezne postavke izlaganja jedinki *C. carpio*, kao najosetljiviji enzimski parametar koji ukazuje na aktivaciju odbrane organizma od oksidativnog stresa se pokazala aktivnost enzima katalaza u jetri jedinki, dok su među analiziranim genima najosetljiviji bili parametri imunog odgovora i autofagije kao i biomarkeri neurotoksičnosti, među kojima se posebno istakao gen za bazni protein mijelina, što navodi na zaključak da bi baterije biomarkera i bioeseja koje se koriste u biomonitoringu trebale da uključuju parametre koji pokrivaju najvažnije načine delovanja supstanci koje su ekološki relevante. Posebno mesto u bateriji biomarkera pripada analizi ekspresije specifičnih gena koji predstavljaju najranije indikatore aktiviranja specifičnih signalnih puteva odnosno odgovora na prisustvo zagađujućih materija veoma specifičnog mehanizma toksičnog delovanja. Značajne razlike u broju identifikovanih neuroaktivnih supstanci i njihovim koncentracijama u mišićnom tkivu i serumu jedinki *C. carpio* iz kaveznog sistema izlaganja na lokalitetima pod neposrednim uticajem otpadnih voda grada Novog Sada u odnosu na jedinke sa referalnog lokaliteta su ukazale na njihovu zastupljenost među polutantima poreklom iz komunalnih otpadnih voda, a zajedno sa odgovorima biomarkera neurotoksičnosti otvorile nova pitanja koja su usmerila dalji tok našeg istraživanja na biomarkere neurotoksičnih efekata. Potencijal primene biomarkera u narednim istraživanjima se ogleda i u njihovoj integraciji u puteve negativnih ishoda (AOP), čime bi se odgovori biomarkera mogli povezivati sa

mogućim negativnim ishodima na individualnom i populacionom nivou čime bi se povećala njihova dijagnostička moć za ekološku procenu rizika.

Na kraju, *in vitro* bioesej ELISA za kvantitaciju fosfo-ERK1/2 u HepG2 ćelijama se pokazao kao potencijalno koristan alat za monitoring efekta zagađenja u akvatičnim ekosistemima. Predstavlja metodu srednje do visoke efikasnosti i ima zadovoljavajuću osetljivost, pa je njime moguće detektovati odgovor pri tretmanu kompleksnim uzorcima iz životne sredine koji sadrže jedinjenja koja utiču na ERK1/2 signalni put. Pojedine frakcije LVSPE uzoraka vode sa odabranih lokaliteta u Dunavu su indukovale odgovor fosfo-ERK1/2 eseja, dok je pri dugotrajnijem tretmanu uočena i inhibicija odgovora za pojedine uzorke. Ograničenje ove metode, kao samostalnog alata predstavlja niska specifičnost ERK1/2 signalnog puta na koji može uticati veliki broj supstanci sa različitim načinima delovanja, pa se njegov potencijal ogleda u primeni sa komplementarnim metodama u okviru kompleksnih baterija *in vitro* bioeseja.

8. LITERATURA

- Aaltonen TM, Valtonen ET, Jokinen EI (1997). Immunoreactivity of Roach, *Rutilus rutilus*, following laboratory exposure to bleached pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 38: 266–271.
- Aaltonen TM, Jokinen EI, Lappivaara J, Markkula SE, Salo HM, Leppanen H, Lammi R (2000a). Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach. *Aquatic Toxicology*, 51: 55–67.
- Aaltonen TM, Jokinen EI, Salo HM, Markkula SE, Lammi R (2000b). Modulation of immune parameters of roach, *Rutilus rutilus*, exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents. *Aquatic Toxicology*, 47: 277–289.
- Aarts BG, Nienhuis PH (2003). Fish zonations and guilds as the basis for assessment of ecological integrity of large rivers. *Hydrobiologia*, 500: 157–178.
- Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B, Andersen OK (2000). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, 51(2): 241–258.
- 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.
- Abrahamson A, Andersson C, Jonsson ME, Fogelberg O, Orberg J, Brunstrom B, Brandt I (2007). Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish—A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquatic Toxicology*, 85: 1–8.
- Academic Chemical Society CAS, CAS REGISTRY, <https://www.cas.org>, Pristupljeno maj 2020.
- Adams SM (2003). Establishing causality between environmental stressors and effects on aquatic ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9: 17–35.
- Aerts J, Metz JR, Ampe B, Decostere A, Flik G, Saeger SD (2015). Scales tell a story on the stress history of fish. *PLoS ONE*, 10: e0123411.
- Ågerstrand M, Beronius A (2016). Weight of evidence evaluation and systematic review in EU chemical risk assessment: Foundation is laid but guidance is needed. *Environment International*, 92-93: 590-596.
- Ahmad I, Pacheco M, Santos MA (2004). Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 57: 290–302.
- Ahmad I, Pacheco M, Santos MA (2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*, 65: 952–962.
- Ali FK, El-Shehawi AM, Seehy MA (2008). Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal Of Biotechnology*, 7 (5): 606-612.
- Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, Gonzalez C (2006). A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta*, 69: 302–322.

- Allen IJ, Moore M (2004). Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation?. *Marine Environmental Research*, 58 (2-5): 227-232.
- Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000) Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 19: 2341–2347.
- Altenburger R, Nendza M, Schüürmann G (2003). Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 22 (8): 1900–1915.
- Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M (2013). Simplifying complexity: Mixture toxicity assessment in the last 20 years, *Environmental Toxicology And Chemistry / SETAC*, 32: 1685-1687.
- Altenburger R, Ait-Aissa S, Antczak P, Backhaus T, Barceló D, Seiler T-B, Brion F, Busch W, Chipman K, de Alda ML, de Aragão Umbuzeiro G, Escher BI, Falciani F, Faust M, Focks A, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Jäger F, Jahnke A, Kortenkamp A, Krauss M, Lemkine GF, Munthe J, Neumann S, Schymanski EL, Scrimshaw M, Segner H, Slobodnik J, Smedes F, Kughathas S, Teodorovic I, Tindall AJ, Tollefse KE, Walz K-H, Williams TD, Van den Brink PJ, van Gils J, Vrana B, Zhang X and Brack W (2015). Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Science Of The Total Environment*, 512–513: 540–551.
- Altenburger R, Brack W, Burgess RM, Busch W, Escher B, Focks A, Hewitt M, Jacobsen BN, López de Alda M, Ait Aissac S, Backhaus T, Ginebreda A, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Neale P, Schulze T, Schymanski E, Teodorović I, Tindall AJ, de Aragão Umbuzeiro G, Vrana B, Zonja B, Krauss M (2019). Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. *Environmental Sciences Europe*, 31:12
- Alygizakis NA, Besselink H, Paulus GK, Oswald P, Hornstra LM, Oswaldova M, Medema G, Thomaidis NS, Behnisch PA, Slobodnik J (2019). Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. *Environment International*, 127: 420–429.
- Amberg A, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cross KP, Custer L, Dobo K, Dowdy E, Ford KA, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Nicolette J, Plaper A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Myatt GJ (2016). Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 77: 13-24.
- American Society for Testing and Materials (2002). Standard guide for conducting acute toxicity testing on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Designation: E729-96. ATSM, West Conshocken, PA
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis And Related Subjects*, 31(6): 347-363.

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76: 160–202.
- Andres S, Ribeyre F, Tourencq JN, Boudou A (2000). Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Science Of Total Environment*, 248(1):11–25.
- Angel BM, Simpson SL, Jolleyz DF (2010). Toxicity to *Melita plumulosa* from intermittent and continuous exposures to dissolved copper. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 29 (12): 2823–2830.
- Ansari H, De Zan F, Parizzi A (2021). Study of systematic bias in measuring surface deformation with SAR interferometry. *Ieee Transactions On Geoscience And Remote Sensing*, 59 (2): 1285- 1301.
- Araújo FG, Morado CN, Parente TTE, Paumgarten FJR, Gomes ID (2018). Biomarkers and bioindicators of the environmental condition using a fish species (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803) in a tropical reservoir in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 78(2): 351-359.
- Ashauer R, Boxall ABA, Brown C (2006). Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 25: 1899–1912.
- Attene-Ramos MS, Miller N, Huang R, Michael S, Itkin M, Kavlock RJ, Austin CP, Shinn P, Simeonov A, Tice RR, Xia M (2013). The Tox21 robotic platform for the assessment of environmental chemicals--from vision to reality. *Drug Discovery Today*, 18 (15-16): 716–723.
- Azimi S, Rocher V (2016). Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990–2013 period. *Science Of The Total Environment*, 542: 955–964.
- Babity JM, Armstrong JN, Plumier JC, Currie RW, Robertson HA (1997). A novel seizure induced synaptotagmin gene identified by differential display. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 94 (6): 2638–2641.
- Bacchetta C, Cazenave J, Parma MJ (2011). Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water, Air And Soil Pollution*, 216(1–4): 39–49.
- Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000). Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 19: 2348–2356.
- Backhaus T, Faust M (2012). Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environmental Science And Technology*, 46 (5): 2564–2573.
- Backhaus T, Karlsson M (2014) Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water Research*, 49: 157–165.
- Backhaus T, Segner H, Hollert H, Deutschmann B, van den Brink PJ, Seiler TB, Teodorovic I, Focks A (2017). Diagnostic toolbox for ecological effects of pollutant mixtures, including bio-tests, trait-based database and detection tool and WoE studies at hot spot sites. External Deliverable of the SOLUTIONS project 603437. https://www.solutionsproject.eu/results_products/

- Backhaus T, Brack W, Van den Brink PJ, Deutschman B, Hollert H, Posthuma L, Segner H, Seiler T-B, Teodorovic I, Focks A (2019). Assessing the ecological impact of chemical pollution on aquatic ecosystems requires the systematic exploration and evaluation of four lines of evidence. *Environmental Sciences Europe*, 31: 98.
- Bahamonde PA, Tetreault GR, McMaster ME, Servos MR, Martyniuk CJ, Munkittrick KR (2014). Molecular signatures in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) inhabiting an urbanized river reach receiving wastewater effluents. *Aquatic Toxicology*, 148: 211–220.
- Baker BH, Martinovic-Weigelt D, Ferrey M, Barber LB, Writer JH, Rosenberry DO, Kiesling RL, Lundy JR, Schoenfuss HL (2014). Identifying non-point sources of endocrine active compounds and their biological impacts in freshwater lakes. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 67: 374–388.
- Balash JC, Tort L (2019). Netting the stress responses in fish. *Frontiers In Endocrinology*, 10: 62.
- Bammer V, György A, Pehlivanov L, Schabuss M, Szaloky Z, Zornig H (2015). Fish. In: The Joint Danube Survey 3. Comprehensive analysis of Danube water quality. ICPDR—International Commission for the Protection of the Danube River
- Barak NAE, Mason CF (1990). Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from eastern England. *Science Of The Total Environment*, 92(C): 257–263.
- Barbarroja-Escudero J, Sánchez-González MJ, Rodríguez-Rodríguez M, Antolín-Amérigo D, Bartolomé B, Alvarez-Mon M (2016). Bleak allergy: First case report. *Allergology International*, 65 (4): 472 - 473.
- Basu N, Ta CA, Wayne A, Mao J, Hewitt M, Arnason JT, Trudeau VL (2009). Pulp and paper mill effluents contain neuroactive substances that potentially disrupt neuroendocrine control of fish reproduction. *Environmental Science And Technology*, 43: 1635-1641.
- Basu N, Wayne A, Trudeau VL, Arnason JT (2012). Extracts from hardwood trees used in commercial paper mills contain biologically active neurochemical disruptors. *Science Of The Total Environment*, 414: 205-209.
- Beketov MA, Liess M (2012). Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. *Environmental Pollution*, 162: 247–254.
- Beketov MA, Kefford BJ, Schafer RB, Liess M (2013). Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 11039–11043.
- Belden JB, Gilliom RÀ, Lydy MJ (2007). How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life?. *Integrated Environmental Assessment And Management*, 3: 364-72.
- Beliaeff B, Burgeot T (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 21(6): 1316-1322.
- Bencic DC, Villeneuve DL, Biales AD, Blake L, Durhan EJ, Jensen KM, Kahl MD, Makynen EA, Martinović-Weigelt D, Ankley GT (2013). Effects of the insecticide fipronil on reproductive endocrinology in the fathead minnow. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 32(8): 1828–1834.

- Benejam L, Benito J, García-Berthou E (2010). Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. *Water, Air, And Soil Pollution* 210: 231–242.
- Bergqvist P-A, Strandberg B, Ekelund R, Rappe C, Granmo A (1998). Temporal monitoring of organochlorine compounds in seawater semipermeable membranes following a flooding episode in Western Europe. *Environmental Science And Technology*, 32: 3887.
- Bernhardt ES, Rosi EJ, Gessner MO (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers In Ecology And The Environment*, 15 (2): 84-90.
- Berninger JP, Martinović-Weigelt D, Garcia-Reyero N, Escalon L, Perkins EJ, Ankley GT, Villeneuve DL (2014). Using transcriptomic tools to evaluate biological effects across effluent gradients at a diverse set of study sites in Minnesota, USA. *Environmental Science And Technology* 48: 2404–2412.
- Bervoets L, Van Campenhout K, Reynders H, Knapen D, Covaci A, Blust R (2009). Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 72:720–728.
- Bexfield LM, Toccalino PL, Belitz K, Foreman WT, Furlong ET (2019). Hormones and pharmaceuticals in groundwater used as a source of drinking water across the United States. *Environmental Science and Technology*, 53: 2950–2960.
- Bhutia D, Rai BK, Pal J (2015). Hepatic cytochrome P450 as biomarkers of cypermethrin toxicity in freshwater teleost, *Channa punctatus* (Bloch). *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 58(1), 131–136.
- Bickley LK, Lange A, Winter MJ, Tyler CR (2009). Evaluation of a carp primary hepatocyte culture system for screening chemicals for oestrogenic activity. *Aquatic Toxicology*, 94(3): 195–203.
- Bielsa J, Cazcarro I (2015). Implementing Integrated Water Resources Management in the Ebro River Basin: From Theory to Facts. *Sustainability* (7): 441-464.
- Biran J, Palevitch O, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B (2012). Neurokinin Bs and neurokinin B receptors in zebrafish-potential role in controlling fish reproduction. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 109: 10269–10274.
- Blauboer BJ (2002). The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 11(3–4): 213–225.
- Blachuta J, Witkowski A (1984). Natural hybrids *Alburnus alburnus* (L.) X *Rutilus rutilus* (L.), *Alburnus alburnus* (L.) X *Blicca bjoerkna* (L.) and *Alburnus alburnus* (L.) X *Abramis brama* (L.) from the Oder river. *Acta Hydrobiologica* 25/26:189-203.
- Boettcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheid G, Seitz N, Rocha PS, Hollert H, Braunbeck T (2010). Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 700 (1-2): 11-17.
- Boggs JM (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 63 (17):1945-61.
- Böhm N, Moser B (1976). Reversible hyperplasia and hypertrophy of the mouse liver induced by a functional charge with phenobarbital. *Beitrage Zur Pathologischen Anatomie Und Zur Allgemeinen Pathologie*, 157 (3): 283-300.

- Bolognesi C, Cirillo S (2014). Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60 (2): 273–284.
- Bone J, Head M, Jones DT, Barraclough D, Archer M, Scheib C, Flight D, Eggleton P, Voulvoulis N (2011). From chemical risk assessment to environmental quality management: the challenge for soil protection. *Environmental Science And Technology*, 45:104–110.
- Booij K, van Drooge BL (2001). Polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene in atmosphere, sea-surface microlayer, and water measured with semi-permeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere*, 44 (2): 91-98.
- Bopp S, Berggren E, Kienzler A, van der Linden S, Worth A (2015). Scientific methodologies for the combined effects of chemicals – a survey and literature review. EUR 27471, JRC Science Hub. <https://ec.europa.eu/jrc>
- Boscheck R (2006). The EU Water Framework Directive: meeting the global call for regulatory guidance? *Intereconomics Review Of European Economic Policy*, 41:268–271.
- Bowden TJ (2008). Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish And Shellfish Immunology*, 25: 373–83.
- Brack W (2003). Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 377(3): 397-407.
- Brack W, Altenburger R, Schüürmann G, Krauss M, López Herráez D, van Gils J, Slobodnik J, Munthe J, Gawlik BM, van Wezel A, Schriks M, Hollender J, Tollefsen KE, Mekenyan O, Dimitrov S, Bunke D, Cousins I, Posthuma L, van den Brink PJ, López de Alda M, Barceló D, Faust M, Kortenkamp A, Scrimshaw M, Ignatova S, Engelen G, Massmann G, Lemkine G, Teodorovic I, Walz KH, Dulio V, Jonker MT, Jäger F, Chipman K, Falciani F, Liska I, Rooke D, Zhang X, Hollert H, Vrana B, Hilscherova K, Kramer K, Neumann S, Hammerbacher R, Backhaus T, Mack J, Segner H, Escher B, de Aragão Umbuzeiro G (2015). The SOLUTIONS project: challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Science of The Total Environment*, 503–504: 22–31.
- Brack W, Aissa SA, Burgess RM, Busch W, Creusot N, Di Paolo C, Escher BI, Hewitt ML, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Jonker W, Kool J, Lamoree M, Muschket M, Neumann S, Rostkowski P, Ruttkies C, Schollee J, Schymanski EL, Schulze T, Seiler TB, Tindall AJ, De Aragão Umbuzeiro G, Vrana B, Krauss (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Science Of The Total Environment*, 544: 1073-1118.
- Brack W, Dulio V, Ågerstrand M, Allan I, Altenburger R, Brinkmann M, Bunke D, Burgess RM, Cousins I, Escher BI, Hernandez FJ (2017). Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment*, 576:720-737.
- Brack W, Aissa SA, Backhaus T, Dulio V, Escher BI, Faust M, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Müller C, Munthe J, Posthuma L, Seiler T-B, Slobodnik J, Teodorovic I, Tindall AJ, de Aragão Umbuzeiro G, Zhang X, Altenburger R (2019a). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, 31:10.

- Brack W, Hollender J, López de Alda M, Müller C, Schulze T, Schymanski E, Slobodnik J, Krauss M (2019b). High-resolution mass spectrometry to complement monitoring and track emerging chemicals and pollution trends in European water resources. *Environmental Sciences Europe*, 31: 62.
- Brammell BF, McClain JS, Oris JT, Price DJ, Birge WJ, Elskus AA (2010). CYP1A expression in caged rainbow trout discriminates among sites with various degrees of polychlorinated biphenyl contamination. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 58: 772–782.
- Brammell BF, Price DJ, Birge WJ, Elskus AA (2005). Apparent lack of CYP1A response to high PCB body burdens in fish from a chronically contaminated PCB site. *Marine Environmental Research*, 58: 251–255.
- Brand W, de Jongh CM, van der Linden SC, Mennes W, Puijker LM, van Leeuwen CJ, van Wezel AP, Schriks M, Heringa MB (2013). Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environment International*, 55: 109–118.
- Brinkmann M, Koglin S, Eisner B, Wiseman S, Hecker M, Eichbaum K, Thalmann B, Buchinger S, Reifferscheid G, Hollert H (2016). Characterisation of transcriptional responses to dioxins and dioxin-like contaminants in roach (*Rutilus rutilus*) using whole transcriptome analysis. *Science of The Total Environment*, 541: 412–423.
- Brockmeier, EK, Yu F, Amador DM, Bargar TA & Denslow ND (2013). Custom microarray construction and analysis for determining potential biomarkers of subchronic androgen exposure in the Eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *BMC Genomics*, 14: 660–670.
- Broeg K, Westernhagen HV, Zander S, Körting W, Koehler (2005) The "bioeffect assessment index" (BAI). A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 50(5): 495-503.
- Brooks S, Harman C, Zaldibar B, Izagirre U, Glette T, Marigómez I (2011). Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 62(2): 327–339.
- Bucheli TD, Fent K (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, 25(3): 201-268.
- Bundschun M, Goedkoop W, Kreuger J (2014). Evaluation of pesticide monitoring strategies in agricultural streams based on the toxic-unit concept - Experiences from long-term measurements. *Science Of The Total Environment*, 484 (1): 84–91.
- Burlando B, Magnelli V, Panfoli I, Berti E, Viarengo A (2003). Ligand-independent tyrosine kinase signalling in RTH 149 trout hepatoma cells: comparison among heavy metals and prooxidants. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal Of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, And Pharmacology*, 13 (3):147-154.
- Burton GAJ, Greenberg MS, Rowland CD, Irvine CA, Lavoie DR, Brooker JA, Moore L, Raymer DF, McWilliam RA (2005). In situ exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 134 (1): 133–144.

- Busch W, Schmidt S, Kühne R, Schulze T, Krauss M, Altenburger R (2016). Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 35(8): 1887-1899.
- Calatayud Arroyo M, García Barrera T, Callejón Leblic B, Arias Borrego A, Collado MC (2021). A review of the impact of xenobiotics from dietary sources on infant health: Early life exposures and the role of the microbiota. *Environmental Pollution*, 269, 115994.
- Calzolari L, Ansorge W, Calabrese E, Denslow N, Part P, Lettieri T (2007). Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. *Comparative Biochemistry And Physiology*, 2: 245–249.
- Canapa A, Barucca M, Gorbi S, Benedetti M, Zucchi S, Biscotti MA, Olmo E, Nigro M, Regoli F (2007). Vitellogenin gene expression in males of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* from Terra Nova Bay (Ross Sea): a role for environmental cadmium?. *Chemosphere*, 66(7): 1270–1277.
- Carpenter SR, Stanley EH, Vander Zanden MJ (2011). State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. *Annual Review Of Environment And Resources*, 36: 75–99.
- Carvalho RN, Arukwe A, Ait-Aissa S, Bado-Nilles A, Balzamo S, Baun A, Belkin S, Blaha L, Brion F, Conti D, Creusot N, Essig Y, Ferrero VEV, Flander-Putrlle V, Fürhacker M, Grillari-Voglauer R, Hogstrand C, Jonáš A, Kharlyngdoh JB, Loos R, Lundebye A-K, Modig C, Olsson P-E, Pillai S, Polak N, Potalivo M, Sanchez W, Schifferli A, Schirmer K, Sforzini S, Stürzenbaum SR, Søfteland L, Turk V, Viarengo A, Werner I, Yagur-Kroll S, Zouneková R, Lettieri T (2014). Mixtures of Chemical Pollutants at European Legislation Safety Concentrations: How Safe Are They?. *Toxicological Sciences*, 141(1): 218–233.
- Cashman JR, Perroti BYT, Berkman CE, Lin J (1996). Pharmacokinetics and molecular detoxification. *Environmental Health Perspectives*, 104: 23–40.
- Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Sciences And Technology*, 40 (1): 357-363.
- Castillo J, Teles M, Mackenzie, S, Tort L (2009). Stress-related hormones modulate cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish And Shellfish Immunology*, 27: 493–499.
- Castro BB, Sobral O, Guilhermino L, Riberiro R (2004). An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology*, 13: 667–681.
- Cazenave J, Bacchetta C, Rossia A, Aleb A, Campana M, Parma MJ (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators*, 38: 104– 112.
- Chandrasekar G, Archer A, Gustafsson J-A, Andersson Lendahl M (2010). Levels of 17 β -estradiol receptors expressed in embryonic and adult zebrafish following in vivo treatment of natural or synthetic ligands. *PLoS One*, 5(3): e9678.
- Chang JC, Taylor PB, Leach FR (1981). Use of the Microtox™ assay system for environmental samples. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*, 26, 150-156.
- Chapman PM (1990). The sediment quality triad approach to determining pollution induced degradation. *Science Of The Total Environment*, 97/98: 815-825.

- Chapman PM, Hollert H (2006). Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *Journal Of Soils And Sediments*, 6 (1): 4–8.
- Chatel A, Talarmin H, Hamer B, Schroder HC, Muller WE, Dorange G (2011). MAP kinase cell signaling pathway as biomarker of environmental pollution in the sponge *Suberites domuncula*. *Ecotoxicology*, 20(8):1727-1740.
- Chave P (2007). The EU Water Framework Directive, Water Framework Directive Series. The international water association (IWA) publishing, London, eISBN: 9781780402239.
- Chiarelli R, Martino C, Agnello M, Bosco L, Roccheri MC (2016). Autophagy as a defense strategy against stress: focus on *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos exposed to cadmium. *Cell Stress And Chaperones*, 21: 19–27.
- Chon HS, Ohandja DG, Voulvoulis N (2010). Implementation of E.U. Water Framework Directive: source assessment of metallic substances at catchment levels. *Journal Of Environmental Monitoring*, 12: 36–47.
- Claiborne A (1985). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. Ed., CRC Handbook of methods in oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 283–284.
- Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C (2015) 1756)
- Conley JM, Evans N, Mash H, Rosenblum L, Schenck K, Glassmeyer S, Furlong ET, Kolpin D W, Wilson VS (2017). Comparison of in vitro estrogenic activity and estrogen concentrations in source and treated waters from 25 U.S. drinking water treatment plants. *Science Of The Total Environment*, 579: 1610–1617.
- Cormier SM, Suter GW II (2013). A method for assessing causation of field exposure-response relationships. *Environmental Toxicology And Chemistry* 32: 272-276.
- Crane M, Kwok K, WH, Wells C, Whitehouse P, Lui GCS (2007). Use of field data to support European Water Framework Directive quality standards for dissolved metals. *Environmental Science And Technology*, 41(14): 5014–5021.
- Dahm V, Hering D, Nemitz D, Graf W, Schmidt-Kloiber A, Leitner P Melcher A, Feld CK (2013). Effects of physico-chemistry, land use and hydromorphology on three riverine organism groups: a comparative analysis with monitoring data from Germany and Austria. *Hydrobiologia*, 704: 389–415.
- Danabas D, Yildirim NC, Yildirim N, Onal AO, Uslu G, Unlu E, Danabas S, Ergin C, Tayhan N (2016). Cytokine responses in gills of *Capoeta umbla* as biomarkers of environmental pollution. *Water Environment Research*, 88: 217-222.
- Danilenko SA, Lukyanova ON (2014). Biochemical markers of commercial fish adaptation in estuaries of peter the great bay (the Sea of Japan). *Journal Of Ichthyology*, 54(1): 85–94.
- De Giosa M, Czerniejewski P, Rybczyk A (2014). Seasonal Changes in Condition Factor and Weight-Length Relationship of Invasive *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) from Leszczynskie Lakeland, Poland. *Advances in Zoology*, 678763, 1-7.
- De la Torre FR, Ferrari L, Salibian A (2000). Long-term in situ toxicity bioassays of the Reconquista River (Argentina) water with *Cyprinus carpio* as sentinelorganism. *Water, Air, And Soil Pollution*, 121: 205–215.

- De la Torre FR, Salibian A, Ferrari L (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*, 68: 1582–1590.
- De Souza Azevedo J, de Santis Braga E, Oliveira Ribeiro CA (2012). Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathrops spixii* (Ariidae) from different sites on southeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal Of Oceanography*, 60 (3): 323-330.
- de Zwart D, Dyer SD, Posthuma L, Hawkins CP (2006). Predictive models attribute effects on fish assemblages to toxicity and habitat alteration. *Ecological Applications*, 16: 1295-1310.
- Denslow ND, Kochera J, Sepulveda MS, Gross T, Holm SE (2004). Gene expression fingerprints of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to pulp and paper mill effluents. *Mutation Research*, 552: 19–34.
- Deutschmann B, Kolarevic S, Brack W, Kaisarevic S, Kostic J, Kracun Kolarevic M, Liska I, Paunovic M, Seiler TB, Shao Y, Sipos S, Slobodnik J, Teodorovic I, Vukovic Gacic B, Hollert H (2016). Longitudinal profiles of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild fish assessed using the comet and micronucleus assay. *Science Of The Total Environment*, 573: 1441–1449.
- Di Giulio RT, Hinton DE (2008). *The toxicology of fishes*: Crc Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, eBook ISBN9780429188961
- Diamond JM, Klaine SJ, Butcher JB (2006). Implications of pulsed chemical exposures for aquatic life criteria and wastewater permit limits. *Environmental Science And Technology*, 40: 5132–5138.
- Diaz de Cerio O, Bilbao E, Izagirre U, Etxebarria N, Moreno G, Díez G, Cajaraville MP, Cancio I (2018). Toxicology tailored low density oligonucleotide microarray for the thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*): Biomarker gene transcription profile after caging in a polluted harbour. *Marine Environmental Research*, 140: 265–277.
- Dinarello CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor* 8(4): 253-65.
- Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 20 March 2008 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy (notified under document C 1756). Official Journal of the European Union 2008.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union 2013.
- Dorts J, Richter CA, Wright-Osment MK, Ellersieck MR, Carter BJ, Tillitt DE (2009). The genomic transcriptional response of female fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an acute exposure to the androgen, 17 β -trenbolone. *Aquatic Toxicology*, 91(1): 44-53.
- Dos Santos RN, Machado BR, Hefler SM, Zanette J (2021). Glutathione S-transferase activity in aquatic macrophytes and halophytes and biotransformation potential for biocides. *Journal Of Plant Research*, 134: 577–584.
- Dubovsky SL, Warren C (2009). Agomelatine, a melatonin agonist with antidepressant properties. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 18: 1533–1540.
- Duda P, Hajka D, Wójcicka O, Rakus D, Gizak A (2020). GSK3 β : A master player in depressive disorder pathogenesis and treatment responsiveness. *Cells*, 9 (3): 727.

- EEC (1992). Acute toxicity to fish. Seventh amendment of directive 67/548/EEC, Annex V – Part C: Methods for the determination of ecotoxicity, Directive 92/32/EEC. EEC.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88–95.
- Ergene S, Cavas T, Celik A, Koleli N, Aymak C (2007). Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 48: 421-429.
- Escher BI, Pronk W, Suter MJF, Maurer M (2006). Monitoring the removal efficiency of pharmaceuticals and hormones in different treatment processes of source-separated urine with bioassays. *Environmental Science And Technology*, 40: 5095-5101.
- Escher BI, Bramaz N, Ort C (2009) JEM Spotlight: Monitoring the treatment efficiency of a full scale ozonation on a sewage treatment plant with a mode-of-action based test battery. *Journal Of Environmental Monitoring*, 11(10): 1836–1846.
- Escher BI, Dutt M, Maylin E, Tang JYM, Toze S, Wolf CR, Lang M (2012). Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *Journal Of Environmental Monitoring*, 14 (11): 2877–2885.
- Escher B, Leusch F (2012). Bioanalytical tools in water quality assessment. IWA Publishing, London, UK, 272.
- Escher BI, Allinson M, Altenburger R, Bain PA, Balaguer P, Busch W, Crago J, Denslow ND, Dopp E, Hilscherova K, Humpage AR, Kumar A, Grimaldi M, Jayasinghe BS, Jarosova B, Jia A, Makarov S, Maruya KA, Medvedev A, Mehinto AC, Mendez JE, Poulsen A, Prochazka E, Richard J, Schifferli A, Schlenk D, Scholz S, Shiraishi F, Snyder S, Su G, Tang JYM, Burg BVD, Linden SCVD, Werner I, Westerheide SD, Wong CKC Yang M, Yeung BHY, Zhang X, Leusch FDL (2014) Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environmental Science And Technology*, 48:1940-1956.
- Escher BI, Aït-Aïssa S, Behnisch PA, Brack W, Brion F, Brouwer A, Buchinger S, Crawford SE, du Pasquier D, Hamers T, Hettwer K, Hilscherová K, Hollert H, Kase R, Kienle C, Tindall AJ, Tuerk J, van der Oost R, Vermeirssen E, Neale PA (2018). Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. *Science Of The Total Environment*, 628–629: 748–765.
- Escher BI, Stapleton HM, Schymanski EL (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367(6476): 388–392.
- Escher B, Neale P, Leusch F (2021). Bioanalytical tools in water quality assessment, Second edition, with contributions by Chapman H and Poulsen A, IWA Publishing, London, UK. ISBN: 9781789061987
- Estévez J, Vilanova E, Sogorb MA (2019). Chapter 66 - Biomarkers for Testing Toxicity and Monitoring Exposure to Xenobiotics, Editor(s): Ramesh C. Gupta, Biomarkers in Toxicology (Second Edition), Academic Press, Pages 1165-1174, ISBN 9780128146552.
- European Commission (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. Office for Official Publications of the European Communities, Brussels.

- European Commission (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union: 2010.
- European Commission (2012) Communication From the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: A Blueprint to Safeguard Europe's Water Resources. COM (2012) 673 final. Office for Official Publications of the European Communities, Brussels.
- European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Consumer Safety, Scientific Committee on Health and Environmental Risks, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures (European Commission, 2011); 2. O. V.
- European Environment Agency (2012) European waters - assessment of status and pressures. EEA Report No 8/ 2012, ISBN 978-92-9213-339-9. EEA, Copenhagen, Denmark, 96.
- European Environment Agency (EEA) (2018) European waters—Assessment of status and pressures, EEA Report No 7/2018
- European Parliament and Council (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off J Eur Communities L 327:1–72
- European Union (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12. August 2013 Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of water policy. OJ L226, 24.8.2013. p. 1
- Fa S, Samardzija D, Odzic LJ, Pogrmic-Majkic K, Kaisarevic S, Kovacevic R, Andric N (2014). Hexabromocyclododecane facilitates FSH activation of ERK1/2 and AKT through epidermal growth factor receptor in rat granulosa cells. *Archives of Toxicology*, 88(2):345-354.
- Falfushynska HI and Stoliar OB (2009). Function of Metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 72: 1425–1432.
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56 (1): 13–32.
- Feder ME, Hofmann GE (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review Of Physiology*, 61: 243-282.
- Fenet H, Casellas C, Bontoux J (1998). Laboratory and Field-Caging Studies on Hepatic Enzymatic Activities in European Eel and Rainbow Trout. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 40(1–2): 137–143.
- Ferguson-Cradler G (2018). Fisheries' collapse and the making of a global event, 1950s–1970s. *Journal Of Global History*, 13 (3): 399-424.
- Filby A, Thorpe K, Maack G, Tyler C (2007). Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* 81(2): 219-231.

- Floehr T, Xiao H, Scholz-Starke B, Wu L, Hou J, Yin D, Zhang X, Ji R, Yuan X, Ottermanns R (2013). Solution by dilution? —A review on the pollution status of the Yangtze River. *Environmental Science And Pollution Research*, 20(10), 6934-6971.
- Focks A, Rico A, van den Brink P, Velki M, Deutschmann B, Seiler TB, Hollert H, Segner H, Rehberger K, Sipos S, Jovanovic V, Novkovic M, Cvijanovic D, Radulovic S, Tenji D, Kaiserevic S, Teodorovic I (2016). ID T5.1 Report on WoE and trait-based results for JDS3 samples. Internal Deliverable, Solutions for present and future emerging pollutants in land and water resources management (SOLUTIONS), FP 7 No no. 603437
- Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ, Bhagyam R, Feist M, Mallory B, Mueller K, Orr D (1996). Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives*, 104 (10): 1096- 1101.
- Franz ED, Wiramanaden CIE, Gallego-Gallegos M, Tse JJ, Phibbs J, Janz DM, Pickering IJ, Liber K (2013). An in situ assessment of selenium bioaccumulation from water-, sediment-, and dietary-exposure pathways using caged chironomus dilutus larvae. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 32 (12): 2836–2848.
- Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10: 360–375.
- Freyhof J, Kottelat M (2008). *Cyprinus carpio*. The IUCN Red List of Threatened Species e.T6181A12559362. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T6181A12559362.en>. Preuzeto 26 Maj 2020.
- Gagnaire B, Bado-Nilles A, Betoulle S, Amara R, Camilleri V, Cavalie I, Chadili E, Delahaut L, Kerambrun E, Orjollet D, Palluel O, Sanchez W (2015). Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of in situ metal toxicity. *Ecotoxicology*, 24: 215–231.
- Gauthier C, Couture P, Pyle GG (2006). Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 63: 353–64.
- Girdler A, Wellby I, Welcomme RL (2010). Fisheries management: A manual for still-water coarse fisheries. *General Aquaculture Fisheries & Fish Science*. ISBN: 978-1-405-13332-6
- Glisic B, Mihaljevic I, Popovic M, Zaja R, Loncar J, Fent K, Kovacevic R, Smital T (2015). Characterization of glutathione -S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 158: 50–62.
- Goksøyr A, Beyer J, Egaas E, Grøsvik BE, Hylland K, Sandvik M, Skaare JU (1996). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 33(1-6): 36-45.
- Goksøyr A, Förlin L (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22 (4): 287-311.
- Gomme PT, McCann KB, Bertolini J (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, 10: 267–273.

- Good IJ (1991). “Weight of evidence and the Bayesian likelihood ratio” in *The Use of Statistics in Forensic Science*, eds Aitken CGG and Stoney DA (Chichester: Ellis Horwood), 85–106.
- Gorecki T, Namiesnik J (2002). Passive sampling. *Trends In Analytical Chemistry* 21 (4): 276–291.
- Grimeaud D (2004). The EC Water Framework Directive, an introductory guide. *Review Of European Community And International Environmental Law*, 13:1–35.
- Grizzetti B, Pistocchi A, Liquele C, Udias A, Bouraoui F, van de Bund W (2017). Human pressures and ecological status of European rivers. *Scientific Reports*, 7 (1): 205.
- Guengerich FP (2008). „Cytochrome p450 and chemical toxicology”. *Chemical Research In Toxicology*, 21 (1): 70-83.
- Guernic AL, Sanchez W, Palluel O, Bado-Nilles A, Turies C, Chadili E, Cavalie I, Adam-Guillermin C, Porcher J-M, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B (2016). In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiology And Biochemistry*, 42: 643–657.
- Gunnarsson L, Kristiansson E, Förlin L, Nerman O, Larsson DGJ (2007). Sensitive and robust gene expression changes in fish exposed to estrogen – a microarray approach. *BMC Genomics*, 8: 149.
- Gupta R (2019). Biomarkers in Toxicology. Second edition. *Academic Press*, ISBN: 9780128146552
- Habig WH, Jakoby WB (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods In Enzymology*, 77: 398-405.
- Hackenberger BK, Velki M, Lončarić Ž, Hackenberger DK, Ečimović S (2015). Effect of different river flow rates on biomarker responses in common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 112: 153–160.
- Hagger JA, Jones MB, Lowe D, Leonard DP, Owen R, Galloway TS (2008). Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Marine Pollution Bulletin*, 56(6): 1111-1118.
- Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, Küttler K, Malarkey DE, Maronpot RR, Nishikawa A, Nolte T, Schulte A, Strauss V, York MJ (2012). Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes—Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*, 40 (7): 971–994.
- Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3): e218.
- Hartung T (2010). Lessons learned from alternative methods and their validation for a new toxicology in the 21st century. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Partb: Critical Reviews*, 13(2): 277–290.
- Hashmi MAK, Escher BI, Krauss M, Teodorovic I, Brack W (2018). Effect-directed analysis (EDA) of Danube River water sample receiving untreated municipal wastewater from Novi Sad, Serbia. *Science Of The Total Environment*, 624: 1072–1081.

- Hashmi MAK, Krauss M, Escher BI, Teodorovic I, Brack W (2020). Effect-directed analysis of progestogens and glucocorticoids at trace concentrations in river water. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 39 (1): 189–199.
- Hatfield MJ, Potter PM (2011). Carboxylesterase inhibitors. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*, 21(8): 1159–1171.
- Hatfield MJ, Chen J, Fratt EM, Chi L, Bollinger JC, Binder RJ, Bowling J, Hyatt JL, Scarborough J, Jeffries C, Potter PM (2017). Selective inhibitors of human liver carboxylesterase based on a β -lapachone scaffold: novel reagents for reaction profiling. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 60 (4): 1568-1579.
- Hauser-Davis RA, de Campos RC, Zioli RL (2012). Fish metalloproteins as biomarkers of environmental contamination. *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology*, 218: 101–123.
- Havelkova M, Blahova J, Kroupova H, Randak T, Slatinska I, Leontovycova D, Grabic R, Pospisil R, Svobodova Z (2008). Biomarkers of contaminant exposure in chub (*Leuciscus cephalus* L.)-Biomonitoring of major rivers in the Czech Republic. *Sensors*, 8: 2589–2603.
- He X, Nie Xa, Wang Z, Cheng Z, Li K, Li G, Wong MH, Liang Xa, T.K. Tsui MTK (2011). Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. *Chemosphere*, 84: 1422–1431.
- Hebert A, Feliers C, Lecarpentier C, Neale PA, Schlichting R, Thibert S, Escher BI (2018). Bioanalytical assessment of adaptive stress responses in drinking water: A predictive tool to differentiate between micropollutants and disinfection byproducts. *Water Research*, 132: 340-349.
- Heeb F, Singer H, Pernet-Coudrier B, Qi W, Liu H, Longrée P, Müller B, Berg M (2012). Organic micropollutants in rivers downstream of the mega city Beijing: Sources and mass fluxes in a large-scale wastewater irrigation system. *Environmental Science And Technology*, 46(16): 8680–8688.
- Hemmadi V (2016). Metallothionein - A potential biomarker to assess the metal contamination in marine fishes - A review. *International Journal Of Bioassays*, 5: 4961-4973.
- Hemmer MJ, Salinas KA, Harris PS (2011). Application of protein expression profiling to screen chemicals for androgenic activity. *Aquatic Toxicology*, 103(1-2): 71-8.
- Henson MC, Chedrese PJ (2004). Minireview. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Experimental Biology And Medicine*, 229: 383–392.
- Hernández C, Hurtado-Oliva MA, Peña E (2019). Effect of short-term starvation on hematological and blood biochemical parameters in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Latin American Journal Of Aquatic Research*, 47(1): 9-17.
- Herve S, Prest HF, Heinonen P, Hyotylainen T, Koistinen J, Paasivirta J (1995). Lipid-Filled semipermeable membrane devices and mussels as samplers of organochlorine compounds in lake water. *Environmental Science And Pollution Research*, 2: 24.
- Hinton DE, Segner H, Au DWT, Kullman SW, Hardman RC (2008). Liver toxicity. In: Di Giulio, RT, Hinton DE (Eds.), *The Toxicology of Fish*. *Crc Press-Taylor & Francis Group*, 327–400.

- Hollender J, Zimmermann SG, Koepke S, Krauss M, McArdell CS, Ort C, Singer H, von Gunten U, Siegrist H (2009) Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. *Environmental science & technology*, 43(20), 7862–7869.
- Hollender J, Schymanski EL, Singer HP, Ferguson PL (2017). Nontarget screening with high resolution mass spectrometry in the environment: Ready to go?. *Environmental Science And Technology*. 51: 11505–11512.
- Hollender J, van Bavel B, Dulio V, Farmen E, Furtmann K, Koschorreck J, Kunkel U, Krauss M, Munthe J, Schlabach M, Slobodnik J, Stroomberg G, Ternes T, Thomaidis NS, Togola A, Tornero V (2019). High resolution mass spectrometry-based non-target screening can support regulatory environmental monitoring and chemicals management. *Environmental Sciences Europe*, 31(1): 42.
- Holm G, Norrgren L, Lindén O (2006). Reproductive and histopathological effects of long-term experimental exposure to bis(tributyltin)oxide (TBTO) on the three spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus. *Journal Of Fish Biology*, 38 (3): 373–386.
- Hong Li R, Xu Q, Secombes CJ, Wang T (2013). Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Of Immunology*, 191(12): 5959-5972.
- Hook SE, Gallagher EP, Batley GE (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment And Management*. 10 (3): 327-341.
- Hope BK, Clarkson JR (2014). A strategy for using weight-of-evidence methods in ecological risk assessments. *Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 20 (2): 290-315.
- Hosokawa M, Satoh T (2002). Measurement of carboxylesterase (CES) activities. *Current Protocols In Toxicology*, 10 (4): 4.7.1–4.7.14.
- Hrubik J, Glisic B, Tubic A, Ivancev-Tumbas I, Kovacevic R, Samardzija D, Andric N, Kaisarevic S (2016). Toxicological and chemical investigation of untreated municipal wastewater: fraction- and species-specific toxicity. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 127: 153-162.
- Hug C, Ulrich N, Schulze T, Brack W, Krauss M (2014). Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environmental Pollution*, 184: 25–32.
- Hui E, Bai J, Wang P, Sugimori M, Llinas RR, Chapman ER (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: Candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 102 (14): 5210–5214.
- Hull RN, Swanson S (2006). Sequential analysis of lines of evidence—an advanced weight-of-evidence approach for ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment And Management: An International Journal*, 2(4): 302-311.
- Huth C, Beuerle S, Zierer A, Heier M, Herder C, Kaiser T, Koenig W, Kronenberg F, Oexle K, Rathmann W, Roden M, Schwab S, Seissler J, Stöckl D, Meisinger C, Peters A, Thorand B (2015). Biomarkers of iron metabolism are independently associated with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the KORA F4 study. *European Journal Of Endocrinology*, 173: 643–653.

- Ings JS, Servos MR, Vijayan MM (2011). Hepatic Transcriptomics and Protein Expression in Rainbow Trout Exposed to Municipal Wastewater Effluent. *Environmental Science and Technology*, 45: 2368–2376.
- Jahnke A, Mayer P, Schäfer S, Witt G, Haase N, Escher BI (2016). Strategies for transferring mixtures of organic contaminants from aquatic environments into bioassays. *Environmental Science and Technology*, 50: 5424–5431.
- Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J (2007). A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microbial Cell Factories*, 6: 4.
- Jarrard HE, Delaney KR, Kennedy CJ (2004). Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 69: 133–148.
- Jebali J, Banni M, Guerbej H, Almeida E, Bannaoui A, Boussetta H (2006). Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiology And Biochemistry*, 32: 93–98.
- Jeng YJ, Watson CS (2011). Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter ERK phosphorylation profiles in rat pituitary cells. *Environmental Health Perspectives*, 119(1):104-112.
- Jobling S, Coey S, Whitmore JG, Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Beresford N, Henshaw AC, Brighty G, Tyler CR, Sumpter JP (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology Of Reproduction*, 67 (2): 515–524.
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP (1998). Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science And Technology*, 32: 2498-2506.
- Jokinen EI, Aaltonen TM, Valtonen ET (1995). Subchronic Effects of Pulp and Paper Mill Effluents on the Immunoglobulin Synthesis of Roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32 (3): 219-225.
- Jones PA, Sloan RJ (1989). An in situ river exposure vessel for bioaccumulation studies with juvenile fish. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 8: 151-155.
- Jönsson ME, Gao K, Olsson JA, Goldstone JV, Brandt I (2010). Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 98 (4) 311–321.
- Josefsson H (2012). Achieving ecological objectives. *Laws*, 1:39–63.
- Jovičić J (2015) Validacija pERK enzimskog imunotesta (ELISA) na Hep G2 ćelijama u cilju procene toksičnosti ksenobiotika, Master rad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Juárez-Rebollar D, Rios C, Nava-Ruíz C, Méndez-Arment M (2017). Metallothionein in brain disorders. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 5828056.
- Judson R, Houck K, Martin M, Richard AM, Knudsen TB, Shah I, Little S, Wambaugh J, Woodrow Setzer R, Kothya P, Phuong J, Filer D, Smith D, Reif D, Rotroff D, Kleinstreuer N, Sipes N, Xia M, Huang R, Crofton K, Thomas RS (2016). Editor's Highlight: Analysis of the effects of cell stress and cytotoxicity on in vitro assay activity across a diverse chemical and assay space. *Toxicological Sciences*, 152: 323–339.
- Jung J-H, Kim S-J, Lee T-K, Shim WJ, Wooa S, Kim D-J, Han C-H (2008). Biomarker responses in caged rockfish (*Sebastes schlegeli*) from Masan Bay and Haegeumgang, South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 57: 599–606.

- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2003). Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Management Science*, 59: 1101-1110.
- Junghans M (2004). Studies on combination effects of environmentally relevant toxicants, Validation of prognostic concepts for assessing the algal toxicity of realistic aquatic pesticide mixtures. http://elib.suub.uni-bremen.de/diss/docs/E-Diss1016_Junghans.pdf.
- Kaišarević S, Vulin I, Tenji, D, Tomić T, Teodorović I (2021). Approaches, limitations and challenges in development of biomarker-based strategy for impact assessment of neuroactive compounds in the aquatic environment. *Environmental Sciences Europe*, 33, 115.
- Karami A, Keiter S, Hollert H, Courtenay SC (2013). Fuzzy logic and adaptive neuro –fuzzy inference system for characterization of contaminant exposure through selected biomarkers in African catfish. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (3): 1586-1595.
- Keiter S, Rastall A, Kosmehl T, Erdinger L, Braunbeck T, Hollert H (2006). Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the Upper Danube River. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environmental Science And Pollution Research*, 13 (5): 308-319.
- Kellar CR, Hassell KL, Long SM, Myers JH, Golding L, Rose G, Kumar A, Hoffmann AA, Pettigrove V (2014). Ecological evidence links adverse biological effects to pesticide and metal contamination in an urban Australian watershed. *Journal Of Applied Ecology*, 51(2): 426–439.
- Kerambrun E, Sanchez W, Henry F, Amara R (2011). Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry And Physiology, Part C*, 154: 187–195.
- Kidd KJ, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RV (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 104: 8897–901.
- Kim Y, Choi K, Jung J, Park S, Kim PG, Park J (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33 (3): 370–375.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Structure And Function*, 33: 109–22.
- Kirschner AKT, Reischer GH, Jakwerth S, Savio D, Ixenmaier S, Toth ES, Sommer R, Mach RL, Linke R, Eiler A, Kolarevic S, Farnleitner AM (2017). Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. *Water Research*, 124: 543–555.
- Klobučar GIV, Pavlica M, Erben R, Papeš D (2003). Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64 (1): 15–23.
- Klobučar GIV, Štambuk A, Hylland K, Pavlica M (2008). Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. *Science Of The Total Environment*, 405 (1–3): 330–337.

- Klotz L-O, Steinbrenner H (2017). Cellular adaptation to xenobiotics: interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biology*, 13: 646–654
- Knutsson J (2013). Passive sampling for monitoring of inorganic pollutants in water. Doctoral thesis. Department of Civil and Environmental Engineering. Chalmers university of technology. Gothenburg, Sweden. ISBN 978-91-7385-854-0
- Koglin S, Kammann U, Eichbaum K, Reininghaus M, Eisner B, Wiseman S, Hecker M, Buchinger S, Reifferscheid G, Hollert H, Brinkmann M (2016). Toward understanding the impacts of sediment contamination on a native fish species: transcriptional effects, EROD activity, and biliary PAH metabolites. *Environmental Sciences Europe*, 28 (1): 28.
- Kohler HR, Triebkorn R (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341: 759–765.
- König M, Escher B, Neale P, Krauss M, Hilscherová K, Novák J, Teodorović I, Schulze T, Seidensticker S, Hashmi MAK, Ahlheim J, Brack W (2017). Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environmental Pollution*, 220: 1220-1230.
- Kono Y, Fridovich I (1982). Superoxide Radical Inhibits Catalase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 257: 57–51.
- Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M (2009). State of the art report on mixture toxicity. Final report. 070307/2007/485103/ETU/D.1. (391 pp.)
- Kortenkamp A (2014). Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Current Opinion In Pharmacology*, 19: 105-111.
- Kortenkamp A, Faust M (2018). Regulate to reduce chemical mixture risk. *Science*, 361: 224–226.
- Kortenkamp A, Faust M, Backhaus T, Altenburger R, Scholze M, Müller C, Ermler S, Posthuma L, Brack W (2019). Mixture risks threaten water quality: the European Collaborative Project SOLUTIONS recommends changes to the WFD and better coordination across all pieces of European chemicals legislation to improve protection from exposure of the aquatic environment to multiple pollutants. *Environmental Sciences Europe*, 31: 69.
- Kortet R, Taskinen J, Sinisalo T, Jokinen I (2003). Breeding-related seasonal changes in immunocompetence, health state and condition of the cyprinid fish, *Rutilus rutilus*, L. *Biological Journal Of The Linnean Society* 78 (1): 117–127.
- Kottelat M, Freyhof J (2007). Handbook of European Freshwater Fishes. *Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin*. ISBN 978-2-8399-0298-4. Ref. No. 59043
- Kovac V (2015). Current status of fish communities in the Danube. In: Liska I (ed) *The Danube River Basin. The handbook of environmental chemistry*. Springer, Berlin, 39: 359–389.
- Kumar SP (2012). Micronucleus assay: a sensitive indicator for aquatic pollution. *International Journal Of Research In Biosciences*, 1 (2): 32-37.
- Laetz CA, Baldwin DA, Collier TK, Herbert V, Stark JD, Schol NL (2009). The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environmental Health Perspectives*, 117: 348–353.

- Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, Baldé AB, Bertollini R, Bose-O'Reilly S, Boufford JI, Breyse PN, Chiles T, Mahidol C, Coll-Seck AM, Cropper ML, Fobil J, Fuster V, Greenstone M, Haines A, Hanrahan D, Hunter D, Khare M, Krupnick A, Lanphear B, Lohani B, Martin K, Mathiasen KV, McTeer MA, Murray CJL, Ndahimananjara JD, Perera F, Potočnik J, Preker AS, Ramesh J, Rockström J, Salinas C, Samson LD, Sandilya K, Sly PD, Smith KR, Steiner A, Stewart RB, Suk WA, van Schayck OCP, Yadama GN, Yumkella K, Zhong M (2018). *The Lancet Commission On Pollution And Health. Lancet (London, England)*, 391(10119): 462–512.
- Larkin P, Sabo-Attwood T, Denslow ND (2002). Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p, pDDE. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 133(4): 543–557.
- Lavado R, Ureña R, Martin-Skilton R, Torreblanca A, del Ramo J, Raldúa D, Porte C (2006). The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environmental Pollution*, 139 (2): 330–339.
- Lazarus RS, Rattner BA, Brooks BW, Du B, McGowan PC, Blazer VS, Ottinger MA (2015). Exposure and food web transfer of pharmaceuticals in ospreys (*Pandion haliaetus*): predictive model and empirical data. *Integrated Environmental Assessment And Management*, 11: 118–129.
- Le Guernic A, Sanchez W, Palluel O, Bado-Nilles A, Turies C, Chadili E, Cavalie I, Adam-Guillermín C, Porcher J-M, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B (2016). In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiology And Biochemistry* (2): 643-657.
- Leonardi M, Tarifeno E (1996). The effect of sewage discharges by a submarine pipe on flatfish, *Paralichthys microps* (Gunther, 1881) and *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) at Concepcion Bay, Chile: Experimental evidence. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 31: 23- 44.
- Leusch FDL, Khan SJ, Laingam S, Prochazka E, Froscio S, Trinh T, Chapman HF, Humpage A (2014a). Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research*, 49: 300–315.
- Leusch FDL, Khan SJ, Gagnon MM, Quayle P, Trinh T, Coleman H, Rawson C, Chapman HF, Blair P, Nice H, Reitsema T (2014b). Assessment of wastewater and recycled water quality: A comparison of lines of evidence from in vitro, in vivo and chemical analyses. *Water Research*, 50: 420–431.
- Leusch FDL, Snyder SA (2015). Bioanalytical tools: half a century of application for potable reuse. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 1: 606.
- Leusch FDL, Neale PA, Hebert A, Scheurer M, Schriks M (2017). Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environment International*, 99: 120-130.
- Li J, Lin X, Xu Z, Sun J (2017). Differences in swimming ability and its response to starvation among male and female *Gambusia affinis*. *Biology Open*, 6 (5): 625–632.
- Li X, Elwell MR, Ryan AM, Ochoa R (2003). Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in sprague-dawley rats. *Toxicologic Pathology*, 31: 682–688.

- Lian J, Nelson R, Lehner R (2018). Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein And Cell*, 9 (2): 178–195
- Liang Y, Fang Z (2012). Molecular cloning and mRNA expression of the vitellogenin and nuclear receptor gene induced by 17 β -estradiol in the mud carp, *Cirrhinus molitorella*. *Ecotoxicology*, 21(3): 719–729.
- Linde AR, Sanchez-Galan S, Valles-Mota P, Garcia-Vazquez E (2001). Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 49: 60–63.
- Linkov I, Loney D, Cormier S, Satterstrom FK, Bridges T (2009). Weight-of-evidence evaluation in environmental assessment: Review of qualitative and quantitative approaches. *Science Of The Total Environment*, 407(19): 5199–5205.
- Liška I, Wagner F, Sengl M, Deutsch, Slobodník J (2015). Joint Danube Survey 3 - A comprehensive analysis of Danube water quality, Final scientific report. *International Commission for the Protection of the Danube River*, Vienna, Austria; ISBN: 978-3-200-03795-3.
- Litten S, Fowler B, Luszniak D (2002). Identification of a novel PCB source through analysis of 209 PCB congeners. *Chemosphere*, 46: 1457-1459.
- Liu L, Zhu B, Gong YX, Liu GL, Wang GX (2015). Neurotoxic effect of triazophos on goldfish (*Carassius auratus*) and tissue specific antioxidant responses. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 116: 68–75.
- Løkke H (2010). Novel methods for integrated risk assessment of cumulative stressors — Results from the NoMiracle project. *Science Of The Total Environment*, 408(18): 3719–3724.
- Long ER, Chapman PM (1985). A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and in faunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 405– 415.
- Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157(2): 561–568.
- López-Maury L, Marguerat S, Bähler J (2009). Erratum: Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics* 10: 68.
- Lu DQ, Bei JX, Feng LN, Zhang Y, Liu XC, Wang L, Chen JL, Lin HR (2008). Interleukin-1 β gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning, expression, bio-logical activities and signal transduction. *Molecular Immunology*, 45 (4): 857-67.
- Luís de Sá Salomão AL, Hauser-Davis RA, Marques M (2020). Critical knowledge gaps and relevant variables requiring consideration when performing aquatic ecotoxicity assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 203: 110941.
- Ma T, Wan X, Huang Q, Wang Z, Liu J (2005). Biomarker responses and reproductive toxicity of effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 59 (2): 281-288.

- Maceda-Veiga A, Sostoa A (2011). Observational evidence of the sensitivity of some fish species to environmental stressors in Mediterranean rivers. *Ecological Indicators*, 11(2): 311-317.
- Macova M, Escher BI, Reungoat J, Carswell S, Chue KL, Keller J, Mueller JF (2010). Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Research*, 44: 477–492.
- Madenjian CP, Rediske RR, Krabbenhoft DP, Stapanian MA, Chernyak SM, O'Keefe JP (2016). Sex differences in contaminant concentrations of fish: a synthesis. *Biology Of Sex Differences*, 7: 42
- Magnadottir B (2010). Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*, 12: 361–379.
- Mahoney JB, Miglige FH, Deuel DG (1973). A fin rot disease of marine and estuarine fishes in the New York Bight. *Transactions Of The American Fisheries Society*, 102: 596-605.
- Mai L, Jope RS, Li X (2002). BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. *Journal Of Neurochemistry*, 82: 75–83.
- Malaj E, von der Ohe PC, Grote M, Kühne R, Mondy CP, Usseglio-Polatera P, Brack W, Schäfer RB (2014). Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 111 (26): 9549–9554.
- Manfra L, Maggi C, d'Errico G, Rotini A, Catalano B, Maltese S, Moltedo G, Romanelli G, Sesta G, Granato G, Lanera P, Amici M, Martuccio G, Onorati F, Di Mento R, Berducci MT, Chiaretti G, Faraponova O, Regoli F, Tornambè A (2021). A Weight of Evidence (WOE) Approach to Assess Environmental Hazard of Marine Sediments from Adriatic Offshore Platform Area. *Water*, 13 (12): 1691.
- Marić-Jovanović J, Kračun-Kolarević M, Kolarević S, Sunjog K, Kostić-Vuković J, Deutshcman B, Hollert H, Tenji D, Paunović M, Vuković-Gačić B (2020). Selection of assay, organism, and approach in biomonitoring significantly affects the evaluation of genotoxic potential in aquatic environments. *Environmental Science And Pollution Research*, 27: 33903–33915.
- Martin OV, Martin S, Kortenkamp A (2013). Dispelling urban myths about default uncertainty factors in chemical risk assessment – sufficient protection against mixture effects?. *Environmental Health*, 12: 53.
- Martinović-Weigelt D, Mehinto AC, Ankley GT, Denslow ND, Barbe LB, Lee KE, King RJ, Schoenfuss HL, Schroeder AL, Villeneuve DL (2014). Transcriptomic effects-based monitoring for endocrine active chemicals: Assessing relative contribution of treated wastewater to downstream pollution. *Environmental Science And Technology*, 48: 2385–2394.
- McCahon CP, Pascoe D (1990). Episodic pollution: causes, toxicological effects and ecological significance. *Functional Ecology*, 4 (3): 375-383.
- McCarthy JF, Shugart LR (1990). Biological markers of environmental contamination (Eds.), Biomarkers of environmental contamination. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL. eBook ISBN9781351070263. 3–16.
- McCarthy JF, Southworth GR, Ham KD, Palmer JA (2000). Time-integrated flux-based monitoring using semipermeable membrane devices to estimate contribution of

- industrial facilities to regional polychlorinated biphenyl budgets. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 19: 352.
- McCarthy KA, Gale RW (2001). Gale Evaluation of persistent hydrophobic organic compounds in the Columbia River Basin using semipermeable-membrane devices. *Hydrological Processes*, 15: 1271.
- McCurley AT, Callard GV (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *MBC Molecular Biology*, 9: 102.
- Meek ME, Boobis AR, Crofton KM, Heinemeyer G, Raaij MV, Vickers C (2011). Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 60 (2): S1-S14.
- Mellanen P, Soimasuo M, Holmbom B, Oikari A, Santti R (1999). Expression of the Vitellogenin Gene in the Liver of Juvenile Whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) Exposed to Effluents from Pulp and Paper Mills. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 43: 133-137.
- Metcalf CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology And Chemistry*, 20: 297–308.
- Milić N, Milanović M, Radonić J, Turk Sekulić M, Mandić A, Orčić D, Mišan A, Milovanović I, Grujić Letić N, Vojinović Miloradov M (2018). The occurrence of selected xenobiotics in the Danube river via LC-MS/MS. *Environmental Science And Pollution Research*, 25: 11074–11083.
- Miljanovic B (ed) (2016). Program upravljanja delovima ribarskih područja “Srem”, “Banat” i “Bačka”. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno/matematički Fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad i JP Vojvodinasume, Petrovaradin.
- Miller JL, Sherry J, Parrott J, Quinn JS (2014). A Subchronic in Situ Exposure Method for Evaluating Effects in Small-Bodied Fish at Contaminated Sites. *Environmental Toxicology*, 29: 54–63.
- Minarik TA, Vick JA, Schultz MM, Bartell SE, Martinovic-Weigelt D, Rearick DC, Schoenfuss HL (2014). On-site exposure to treated wastewater effluent has subtle effects on male fathead minnows and pronounced effects on carp. *Journal of the American Water Resources Association (JAWRA)*, 50 (2): 358-375.
- Miracle A, Ankley G, Lattier D (2006). Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 63(3): 337-342.
- Moens LN, van der Ven K, Van Remortel P, Del-Favero J, De Coen, WM (2006). Expression profiling of endocrine disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicological Sciences*, 93: 298–310.
- Moles A, Norcross BL (1998). Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfishes. *Canadian Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences*, 55: 605-610.
- Moore MN (2004). Diet restriction induced autophagy: A protective system against oxidative- and pollutant-stress and cell injury. *Marine Environmental Research*, 58: 603-607.

- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard P (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, 552: 247–268.
- Moore MN, Allen JI, McVeigh A (2006a). Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61: 278–304.
- Moore MN, Allen JI, Somerfield PJ (2006b). Autophagy: Role in surviving environmental stress *Marine Environmental Research*, 62: 420–425.
- Moore MN, Allen JL, McVeigh A, Shaw J (2006c) Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autophagy*, 2: 217–220.
- Moreno-González R, Rodríguez-Mozaz S, Huerta B, Barceló D, León VM (2016). Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environmental Research*, 146: 282–298.
- Morgan MJ (2004). The relationship between fish condition and the probability of being mature in American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *ICES Journal of Marine Science*, 61 (1): 64-70.
- Morozov AA, Chuiko GM, Yurchenko VV (2017). Annual variations in hepatic antioxidant defenses and lipid peroxidation in a temperate fish, common bream *Abramis brama* (L.). *International Aquatic Research*, 9:249–257.
- Moss B (2008). The Water Framework Directive: total environment or political compromise? *Science Of The Total Environment*, 400:32–41.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32 (6): 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Myers MS, Landahl JT, Krahn MM, McCain BB (1991). Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environmental Health Perspectives*, 90: 7-15.
- Myers MS, Stehr CM, Olson OP, Johnson LL, McCain BB, Chan S-L, Varanasi U (1994). Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, U.S.A. *Environmental Health Perspectives*, 102: 200–215.
- Myers MS, Johnson LL, Collier TK (2003). Establishing the causal relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and hepatic neoplasms and neoplasia-related liver lesions in English sole (*Pleuronectes vetulus*). *Human And Ecological Risk Assessment*, 9 (1): 67–94.
- Naidu R, Biswas B, Willett IR, Cribb J, Kumar Singh B, Paul Nathanail C, Coulon F, Semple KT, Jones KC, Barclay A, John Aitken R (2021). Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environment International*, 156: 106616.
- Neale PA, Ait-Aissa S, Brack W, Creusot N, Denison MS, Deutschmann B, Hilscherova K, Hollert H, Krauss M, Novaak J, Schulze T, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Escher BI (2015). Linking in vitro Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling. *Environmental Science & Technology*, 49: 14614–14624.

- Neale PA, Altenburger R, Aït-Aïssa S, Brion F, Busch W, de Aragão Umbuzeiro G, Denison MS, Du Pasquier D, Hilscherová K, Hollert H, Morales DA, Novák J, Schlichting R, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Tindall AJ, Tollefsen KE, Williams TD, Escher BI (2017). Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Research*, 123: 734–750.
- Neale PA, Braun G, Brack W, Carmona E, Gunold R, König M, Krauss M, Liebmann L, Liess M, Link M, Schafer RB, Schlichting R, Schreiner VC, Schulze T, Vormeier P, Weisner O, Escher BI (2020). Assessing the mixture effects in in vitro bioassays of chemicals occurring in small agricultural streams during rain events. *Environmental Science And Technology*, 54: 8280–8290.
- Nikoleris L, Hansson MC (2015). Unraveling the estrogen receptor (er) genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals expression differences between the two adult life stages but little impact from polychlorinated biphenyl (PCB) load. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 400: 10–20.
- Noaksson E, Tjarnlund U, Albertus TC, Bosveld ATC, Balk L (2001). Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 174: 160–176.
- OECD (1982). Fish, acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 203. Paris: OECD, pp. 1–15.
- Oikari A (2006). Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology*, 78 (4): 370–381.
- Oikari A, Lahti M, Merilainen P, Afanasyev S, Krasnov A (2010). Do historical sediments of pulp and paper industry contribute to the exposure of fish caged in receiving waters? *Journal Of Environmental Monitoring*, 12: 1045–1054.
- Ormerod SJ, Dobson M, Hildrew AG, Townsend CR (2010). Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 55 (SUPPL. 1): 1–4.
- Ort C, Lawrence MG, Rieckermann, Joss JA (2010). Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. *Environmental Science And Technology*, 44: 6024–6035.
- Orton F, Tyler CR (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? *Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society*, 90 (4): 1100–1117.
- Pacheco M, Santos MA (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 53 (3): 331–347.
- Padmini E, Tharani J (2014). Heat-shock protein 70 modulates apoptosis signal-regulating kinase 1 in stressed hepatocytes of *Mugil cephalus*. *Fish Physiology And Biochemistry*, 40: 1573–1585.
- Panizzi S, Suciú NA, Trevisan M (2017). Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Science Of The Total Environment*, 580: 136–146.
- Panther GH, Thompson RS, Sumpter JP (2000). Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environmental Science And Technology*, 34: 2756–2760.

- Parvez S, Sayeed I, Raisuddin S (2006). Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 65 (1): 62–66.
- Pavlaki MD, Araújo MJ, Cardoso DN, Silva ARR, Cruz A, Mendo S, Soares AMVM, Calado R, Loureiro S (2016). Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental Pollution*, 215: 203–212.
- Peakall DB (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*. (London, England), 3(3):157-160.
- Pereira CDS, Martin-Díaz ML, Zanette J, Cesar A, Choueri RB, Abessa DM de S, Catharino MGM, Vasconcellos MBA, Bainy ACD, de Sousa ECPM, del Valls TA (2011). Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 74 (5): 1257–1264.
- Petersen J, Grant R, Larsen SE, Blicher-Mathiesen G (2012). Sampling of herbicides in streams during flood events. *Journal Of Environmental Monitoring*, 14: 3284-3294.
- Petitjean Q, Jean S, Gandar A, Côte J, Laffaille P, Jacquin L (2019). Stress responses in fish: from molecular to evolutionary processes. *Science Of The Total Environment*, 684: 371–380.
- Pickford KA, Thomas-Jones RE, Wheals B, Tyler CR, Sumpter JP (2003). Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-tert-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 65: 267–279.
- Pieterse GM (2004). Histopathological changes in the testis of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) as a biomarker of heavy metal pollution. PhD Thesis. The Rand Afrikaans University.
- Piria M, Tomljanović T, Treer T, Safner R, Aničić I, Matulić D, Vilizzi L (2016). The common carp *Cyprinus carpio* in Croatia (Danube and Adriatic basins): a historical review. *Aquaculture International*, 24: 1527–1541.
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813 (9):1619-1633.
- Poiger T, Buser HR, Balmer ME, Bergqvist PA, Muller MD (2004). Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*, 55: 951.
- Posthuma L, van Gils J, Zijp MC, van de Meent D, de Zwart D (2019). Species sensitivity distributions for use in environmental protection, assessment, and management of aquatic ecosystems for 12 386 chemicals. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 38 (4): 905-917.
- Prasse C, Stalter D, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Ternes TA (2015). Spoilt for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies, *Water Research*, 87: 237-270.
- Prieto MM (2009). Facing the challenges of implementing the European Water Directive in Spain. In: Garrido A, Llamas MR (eds). *Water policy in Spain*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VVJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry And Ecology*, 8 (4): 275–285.

- Qi X, Zhou W, Li S, Liu Y, Ye G, Liu X, Peng C, Zhang Y, Lin H (2015). Goldfish neurokinin B: Cloning, tissue distribution, and potential role in regulating reproduction. *General And Comparative Endocrinology*, 221: 267–277.
- Rabiet M, Margoum C, Gouy V, Carluer N, Coquery M (2010). Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment – Effect of sampling frequency. *Environmental Pollution*, 158(3): 737–748.
- Radulović S, Teodorović I (2010). Ekologija i monitoring kopnenih voda. Metodološki priručnik. Prirodno-matematički fakultet. Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad. ISBN 978-86-7031-143-5.1-200
- Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, Imarisio S, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Brown SD, Rubinsztein DC (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nature Genetics*, 37: 771–776.
- Reck-Peterson SL, Redwine WB, Vale RD, Carter AP (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19 (6): 382–398.
- Réus GZ, Vieira FG, Abelaira HM, Michels M, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, Neotti MV, Matias BI, Luz JR, Dal-Pizzol F, Quevedo J (2014). MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. *Journal Of Psychiatric Research*, 55:15–21.
- Reyes-Cerpa S, Maisey K, Reyes-López F, Toro-Ascuy D, Sandino AM, Imarai M (2012). Fish Cytokines and Immune Response. New Advances and Contributions to Fish Biology ISBN: 978-953-51-0909-9.
- Reynders H, Bervoets L, Gelders M, De Coen WM, Blust R (2008). Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. *Science Of The Total Environment*, 391: 82-95.
- Richter S, Völker J, Borchardt D, Mohaupt V (2013). The Water Framework Directive as an approach for integrated water resources management: results from the experiences in Germany on implementation, and future perspectives. *Environmental Earth Sciences*, 69: 719–728.
- Rico A, van den Brink PJ, Leitner P, Graf W, Focks A (2016). Relative influence of chemical and non-chemical stressors on invertebrate communities: a case study in the Danube River. *Science Of The Total Environment*, 571: 1370–1382.
- Riđanović S, Nedić Z, Riđanović L (2015). First observation of fish condition from Sava river in Bosnia and Herzegovina. *Journal Of Survey In Fisheries Sciences*, 1(2): 27-32.
- Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A (2019). Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 9372182.
- Roesijadi G (1980). Influence of copper on the clam *Protothaca staminea*: Effects on gills and occurrence of copper-binding proteins. *Biological Bulletin*, 158.
- Roesijadi G (1995). Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives*, 102: 91–95.
- Ross MK, Streit TM, Herring KL (2018). Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Journal Of Pesticide Science*, 35(3): 257–264.
- Rubinfeld H, Seger R (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*, 31(2):151-174.

- Sadekarpawar S, Parikh P (2013). Gonadosomatic and hepatosomatic indices of freshwater fish *oreochromis mossambicus* in response to a plant nutrient. *World Journal Of Zoology*, 8 (1): 110-118.
- Sadoul B, Geffroy B (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal Of Fish Biology*, 94: 540–555.
- Safe S (2003). Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nature Medicine*, 9, 1000–1001.
- Sanchez PS, Sato MIZ, Paschoal CMRB, Alves MN, Furlan EV, Martins MT (1988). Toxicity assessment of industrial effluents from S. Paulo State, Brazil, using short-term microbial assays. *Journal Of Toxicology And Risk Assessment*, 3: 55–80.
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM (2008). Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International*, 34 (4): 490–498.
- Sanchez W, Porcher JM (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trac - Trends In Analytical Chemistry*, 28(2): 150–158.
- Sanchez W, Burgeot T, Porcher JM (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science And Pollution Research*, 20 (5): 2721–2725.
- Sanders BM, Martin SL, Nelson W, Phelps D, Welch W (1991). Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Environmental Research*, 31: 81-97.
- Santos MA, Pacheco M, Ahmad I (2004). *Anguilla anguilla* L. antioxidants responses to in situ bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure. *Environment International*, 30: 301–308.
- Sarasquete C, Segner H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Science of the Total Environment*, 247(2-3): 313-32.
- Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hokusui H, Hagai E (1994). Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-piperidino-1-piperidino-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 17: 662–4.
- Savic R, Ondrasek G, Blagojevic B, Bubalo Kovacic M, Zemunac R (2018). Spatial distribution and temporal variation of chemical properties of drainage watercourses in rural and peri-urban areas of Novi Sad (Serbia)—a case study. *Environmental Monitoring And Assessment* 190:53.
- Scarcia P, Calamante G, De la Torre F (2014). Biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*) and native collected fish (*Leporinus obtusidens*) in the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Toxicology*, 29: 950–960.
- Schäfer RB, von der Ohe PC, Rasmussen J, Kefford BJ, Beketov MA, Schulz R, Liess M (2012). Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environmental Science And Technology*, 46 (9): 5134-5142.

- Schäfer RB, Kühn B, Malaj E, König A, Gergs R (2016). Contribution of organic toxicants to multiple stress in river ecosystems. *Freshwater Biology*, 61: 2116-2128.
- Schilter B, Burnett K, Eskes C, Geurts L, Jacquet M, Kirchnawy C, Oldring P, Pieper G, Pinter E, Tacker M, Traussnig H, Van Herwijnen P, Boobis A (2019). Value and limitation of in vitro bioassays to support the application of the threshold of toxicological concern to prioritise unidentified chemicals in food contact materials. *Food Additives And Contaminants*, 36 (12): 1903-1936.
- Schinegger R, Trautwein C, Melcher A, Schmutz S (2012). Multiple human pressures and their spatial patterns in European running waters. *Water And Environment Journal*, 26: 261–273.
- Schlenk D, Celander M, Gallagher EP, George S, James M, Kullman SW, van den Hurk P, Willett K (2008). Biotransformation in fishes. *The Toxicology Of Fishes*, 153-234.
- Schmitt CJ, Hinck JE, Blazer VS, Denslow ND, Dethloff GM, Bartish TM, Coyle JJ, Tillitt DE (2005). Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: Spatial and temporal trends. *Science Of The Total Environment*, 350 (1–3): 161–193.
- Schmitt CJ, Whyte JJ, Roberts AP, Annis ML, May TW, Tillitt DE (2007). Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 67 (1): 31–47.
- Schmitz M, Deutschmann B, Markert N, Backhaus T, Brack W, Brauns M, Brinkmann M, Seiler TB, Fink P, Tang S, Beitel S, Doering JA, Hecker M, Shao Y, Schulze T, Weitere M, Wild R, Velki M, Hollert H (2022). Demonstration of an aggregated biomarker response approach to assess the impact of point and diffuse contaminant sources in feral fish in a small river case study. *Science Of The Total Environment*, 804:150020.
- Schriks M, Heringa MB, van der Kooi MME, de Voogt P, van Wezel AP (2010). Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research*, 44 (2): 461–476.
- Schultz MM, Minarik TA, Martinovic-Weigelt D, Curranc EM, Bartell SE, Schoenfuss HL (2013). Environmental estrogens in an urban aquatic ecosystem: II. Biological effects. *Environment International*, 61: 138–149.
- Schulz R (2004). Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A Review. *Journal Of Environmental Quality*, 33: 419-448.
- Schulze T, Krauss M, Novak J, Hilscherova K, Ait-Aïssa S, Creusot N, Macova M, Neale P, Escher BI, Gomes T, Tollefsen KE, Tarcai Z, Shao Y, Deutschmann B, Seiler TB, Hollert H, Tarabek P, Tousova Z, Slobodnik J, Walz KH and Brack W (2015). Large volume sampling and effect-based screening In: Liška I, Wagner F, Sengl M, Deutsch K, Slobodník J. (2015). Joint Danube Survey 3, Final Scientific Report. International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, Austria, 284-295.
- Schulze T, Ahel M, Ahlheim J, Ait-Aïssa S, Brion F, Di Paolo C, Froment J, O. Hidasi A, Hollender J, Hollert H, Hu M, Kloß A, Koprivica S, Krauss M, Muz M, Oswald P, Petre M, Schollée JE, Seiler TB, Shao Y, Slobodnik J, Sonavane M, Suter MJF, Tollefsen KE, Tousova Z, Walz KH, Brack W (2017). Assessment of a novel device for onsite integrative large-volume solid phase extraction of water samples to enable a comprehensive chemical and effect-based analysis. *Science Of The Total Environment*, 581–582: 350-358.

- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, von Gunten U, Wehrli B (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313: 1072–1077.
- Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J (2014a). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence *Environmental Science And Technology*, 48: 2097–2098.
- Schymanski EL, Singer HP, Longrée P, Loos M, Ruff M, Stravs MA, Ripollés Vidal C, Hollender J (2014b). Strategies to characterize polar organic contamination in wastewater: exploring the capability of high resolution mass spectrometry. *Environmental Science And Technology*, 48(3): 1811–1818.
- Schymanski EL, Singer HP, Slobodnik J, Ipolyi IM, Oswald P, Krauss M, Schulze T, Haglund P, Letzel T, Grosse S, Thomaidis NS, Bletsou A, Zwiener C, Ibáñez M, Portolés T, de Boer R, Reid MJ, Onghena M, Kunkel U, Schulz W, Guillon A, Noyon N, Leroy G, Bados P, Bogialli S, Stipaničev D, Rostkowski P, Hollender J (2015). Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 407: 6237–6255.
- Segner H, Schmitt-Jansen M, Sabater S (2014). Assessing the impact of multiple stressors on aquatic biota: the receptor's side matters. *Environmental Science And Technology*, 48 (14): 7690–7696.
- Sellin Jeffries MK, Mehinto AC, Carter BJ, Denslow ND, Kolok AS (2012). Taking microarrays to the field: differential hepatic gene expression of caged fathead minnows from Nebraska watersheds. *Environmental Science And Technology*, 46 (3): 1877-1885.
- SEPA (Serbian Environmental Protection Agency) (2018). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda—2017, Ministarstvo zaštite životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine, Beograd 2018. [Results of operational monitoring of surface and groundwaters 2017]
- SEPA (Serbian Environmental Protection Agency) (2019). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda—2018, Ministarstvo zaštite životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine, Beograd 2019. [Results of operational monitoring of surface and groundwaters 2018]
- Serra H, Brion F, Chardon C, Budzinski H, Schulze T, Brack W, Aït-Aïssa S (2020). Estrogenic activity of surface waters using zebrafish- and human-based in vitro assays: The Danube as a case-study. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 78.
- Shaw M., Tibbetts IR, Muller JF (2004). Monitoring PAHs in the Brisbane River and Moreton Bay, Australia, using semipermeable membrane devices and EROD activity in yellowfin bream, *Acanthopagrus australis*, *Chemosphere*, 56: 237.
- Shi X, Zhou B (2010). The Role of Nrf2 and MAPK Pathways in PFOS-Induced Oxidative Stress in Zebrafish Embryos. *Toxicological Sciences*, 115: 391–400.
- Sinha AK, Diricx M, Chan LP, Liew HJ, Kumar V, Blust R, De Boeck G (2012). Expression pattern of potential biomarker genes related to growth, ion regulation and stress in response to ammonia exposure, food deprivation and exercise in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 122: 93–105.
- Skelton DM, Ekman DR, Martinović-Weigelt D, Ankley GT, Villeneuve DL, Teng Q, Collette T W (2014). Metabolomics for in situ environmental monitoring of surface waters impacted by contaminants from both point and nonpoint sources. *Environmental Science And Technology*, 48(4): 2395–2403.

- Službeni glasnik Republike Srbije (2012). Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje ("Sl. glasnik RS. 50/2012). [Regulation on environmental quality standards (EQS) in surface waters, groundwater and sediment]
- Smith R, Winfield J, Nelson I (1991). *Cyprinid Fishes Cyprinid Fishes Systematics, biology and exploitation*. Chapman and Hall. London ISBN 978-94-011-3092-9 (eBook): 509-529.
- Sohoni P, Sumpter JP (1998). Several environmental oestrogens are also antiandrogens. *Journal Of Endocrinology*, 158: 327–339.
- Soimasuo R, Jokinen I, Kukkonenb J, Petanen T, Ristola T, Oikari R (1995). Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. *Aquatic Toxicology*, 31: 329-345.
- Song SB, Xu Y, Zhou BS (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65: 699–706.
- Southam AD, Lange A, Hines A, Hill EM, Katsu Y, Iguchi T, Tyler CR, Viant MR (2011). Metabolomics reveals target and off-target toxicities of a model organophosphate pesticide to roach (*Rutilus rutilus*): Implications for biomonitoring. *Environmental Science And Technology*, 45: 3759–3767.
- Šrut M, Štambuk A, Pavlica M, Klobučar GIV (2010). Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) for in situ assessment of pollution-related genotoxicity. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 61(1): 29–36.
- Stalter D, Magdeburg A, Wagner M, Oehlmann J (2011). Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Research*, 45: 1015–1024.
- Stanić B, Andrić N, Zorić S, Grubor-Lajšić G, Kovačević R (2006). Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 65: 395–402.
- Stanić B, Petrović J, Bašica B, Kaišarević S, Schirmer K, Andrić N (2021). Characterization of the ERK1/2 phosphorylation profile in human and fish liver cells upon exposure to chemicals of environmental concern. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 88: 103749.
- Stavrescu-Bedivan MM, Aioanei FT, Scăețeanu GV (2017). Length-weight relationships and condition factor of 11 fish species from the Timiș River, Western Romania, *Agriculture And Forestry*, 63 (4): 281-285.
- Stegeman JJ, Hahn M (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malin D and Ostrander G. Eds., *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, Boca Raton: 87-204.
- Stegeman JJ, Lech JJ (1991). Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*, 90: 101-109.
- Stehle S, Knäbel A, Schulz R (2013). Probabilistic risk assessment of insecticide concentrations in agricultural surface waters: a critical appraisal. *Environmental Monitoring And Assessment*, 185: 6295-6310.

- Stien X, Percic P, Gnassia-Barelli M, Romeo M, Lafaurie M (1998). Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*, 99: 339-345.
- Stolte E H, Nabuurs S B, Bury N R, Sturm A, Flik G, Savelkoul H F J, Lidy, Verburg-van Kemenade B M (2008). Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. *Molecular Immunology*, 46 (1): 70–79.
- Sugita S, Shin OH, Han W, Lao Y, Südhof TC (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *EMBO Journal*, 21(3): 270–280.
- Sumpter JP (1998) Xenoendocrine disrupters — environmental impacts. *Toxicology Letters*, 102–103, 337–342.
- Sun C, Zhang S (2015). Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients*. 7(10): 8818-8829.
- Sun Y, Zhu Z, Wang R, Sun Y, Xu T (2012). Miiuy croaker transferrin gene and evidence for positive selection events reveal different evolutionary patterns. *Plos One* 7(9): e43936
- Sundararaj BI, Goswami SV and Lamba VJ (1982). Role of testosterone, estradiol-17 β , and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General And Comparative Endocrinology*, 48: 390-397.
- Supowit S, Roll I, Dang V, Kroll KJ, Denslow ND, Halden RU (2016). Active sampling device for determining pollutants in surface and pore water – the in situ sampler for biphasic water monitoring. *Scientific Reports*, 6: 21886.
- Suter G, Cormier S, Barron M (2017). A weight of evidence framework for environmental assessments: Inferring qualities. *Integrated Environmental Assessment And Management*, 13 (6): 1038–1044.
- Szwejszer E, Maciuszek M, Casanova-Nakayama A, Segner H, Verburg-van Kemenade BML, Chadzinska M (2017). A role for multiple estrogen receptors in immune regulation of common carp. *Developmental And Comparative Immunology*, 66: 61-72.
- Takahashi S (2015). Positive and negative regulators of the metallothionein gene (Review). *Molecular Medicine Reports*, 12: 795-799.
- Tang JYM, McCarty S, Glenn E, Neale PA, Warne MSJ, Escher BI (2013). Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Research*, 47: 3300–3314.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008). LC3 and Autophagy. *Methods In Molecular Biology*, 77–88.
- Tanna RN, Tetreault GR, Bennett CJ, Smith BM, Bragg LM, Oakes KD, McMaster ME, Servos MR (2013). Occurrence and degree of intersex (testis–ova) in darters (*Etheostoma* spp.) across an urban gradient in the Grand River, Ontario, Canada. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 32: 1981-1991.
- Tellez-Banuelos MC, Ortiz-Lazareno PC, Santerre A, Casas-Solis J, Bravo-Cuellar A, Zaitseva G (2011). Effects of low concentration of endosulfan on proliferation, ERK1/2 pathway, apoptosis and senescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) splenocytes. *Fish And Shellfish Immunology*, 31(6): 1291-1296.
- Tenji D, Micic B, Sipos S, Miljanović B, Teodorović I, Kaišarević S (2020). Fish biomarkers from a different perspective: evidence of adaptive strategy of *Abramis brama* (L.) to chemical stress. *Environmental Sciences Europe*, 32: 47

- Teodorović I (2001). Indeks metalozagađenja - prilog monitoringu površinskih voda. Beograd: Zadužbina Andrejević.
- Teodorović I, Kaišarević S (2015). Ekotoksikologija. Univerzitet U Novom Sadu, Prirodnomatematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju. Štamparija Stojkov, Novi Sad. 401 str. ISBN 978-86-7031-145-9
- Teubner D, Paulus M, Veith M, Klein R (2015). Biometric parameters of the bream (*Abramis brama*) as indicators for long-term changes in fish health and environmental quality—data from the German ESB. *Environmental Science And Pollution Research*, 22: 1620–1627.
- Thompson MSA, Bankier C, Bell T, Dumbrell AJ, Gray C, Ledger ME, Lehmann K, McKew BA, Sayer CD, Shelley F, Trimmer M, Warren SL, Woodward G (2016). Gene-to-ecosystem impacts of a catastrophic pesticide spill: testing a multilevel bioassessment approach in a river ecosystem. *Freshwater Biology*, 61: 2037–2050.
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science*, 320: 667–670.
- Tillitt DE, Ankley GT, Verbrugge DA, Giesy JP, Ludwig JP, Kubiak TJ (1991). H4IIE rat hepatoma cell bioassay-derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents in colonial fish-eating waterbird eggs from the Great Lakes. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 21: 91–101.
- Timbrell JA (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129: 1–12.
- Timme-Laragy AR, Karchner SI, Franks DG, Jenny MJ, Harbeitner RC, Goldstone JV, McArthur AG, Hahn ME (2012). Nrf2b, novel zebrafish paralog of oxidant-responsive transcription factor nf-e2-related factor 2 (nrf2). *The Journal Of Biological Chemistry*, 287: 4609-4627.
- Tocher DR (2003). Metabolism and function of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews In Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Tom M, Chen N, Segev M, Herut B, Rinkevich B (2004). Quantifying fish metallothionein transcript by realtime PCR for its utilization as an environmental biomarker. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 705–710.
- Tousova Z, Oswald P, Slobodnik J, Blaha L, Muz M, Hu M, Brack W, Krauss M, Di Paolo C, Tarcai Z, Seiler TB, Hollert H, Koprivica S, Ahel M, Schollée JE, Hollender J, Suter MJ, Hidasi AO, Schirmer K, Sonavane M, Ait-Aissa S, Creusot N, Brion F, Froment J, Almeida AC, Thomas K, Tollefsen KE, Tufi S, Ouyang X, Leonards P, Lamoree M, Torrens VO, Kolkman A, Schriks M, Spirhanzlova P, Tindall A, Schulze T (2017). European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Science Of The Total Environment*, 601–602: 1849–1868.
- Traven L, Mićović V, Vukić Lušić D, Smital T (2013). The responses of the hepatosomatic index (HSI), 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and glutathione – S - transferase (GST) activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) caged at a polluted site: implications for their use in environmental risk assessment. *Environmental Monitoring And Assessment*, 185: 9009–9018.

- Treer T, Opačak T, Aničić I, Safner R, Piria M, Odak T (2003). Growth of bream, *Abramis brama*, in the Croatian section of the Danube. *Czech Journal Of Animal Science*, 48 (6): 251–256.
- Troncoso IC, Cazenave J, Bacchetta C, Bistoni D (2012). Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiology And Biochemistry*, 38: 693–702.
- Tsangaris C, Kormas K, Strogyloudi E, Hatzianestis I, Neofitou C, Andral B, Galgani F (2010). Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry And Physiology - C Toxicology And Pharmacology*, 151(3): 369–378.
- Tsoumani M, Liasko R, Moutsaki P, Kagalou I and Leonardos I (2006). Length–weight relationships of an invasive cyprinid fish (*Carassius gibelio*) from 12 Greek lake sin relation to their trophic states. *Journal Of Applied Ichthyology*, 22: 281–284.
- Tsuchida S, Glutathione Transferases (2002) in: Bertino JR, Encyclopedia of Cancer (Second Edition), *Academic Press*, 297-307. ISBN 9780122275555.
- Tsuno H, Arakawa K, Kato Y, Nagare H (2008). Advanced sewage treatment with ozone under excess sludge reduction, disinfection and removal of EDCs. *Ozone-Science & Engineering*, 30 (3): 238–245.
- Vajda AM, Barber LB, Gray JL, Lopez EM, Bolden AM, Schoenfuss HL, Norris DO (2011). Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquatic Toxicology*, 103 (3–4): 213–221.
- Vajda AM, Barber LB, Gray JL, Lopez EM, Woodling JD, Norris DO (2008). Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environmental Science And Technology*, 42: 3407-3414.
- Valenzuela G E, Perez A, Navarro M, Romero A, Figueroa J, Kausel G (2015). Differential response of two somatolactin genes to zinc or estrogen in pituitary of *Cyprinus carpio*. *General And Comparative Endocrinology*, 215: 98–105.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 13 (2): 57–149.
- Van der Oost R, Goksøyr A, Celander M, Heida H, Vermeulen NPE (1996). Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*, 36: 189-222.
- Van Gils J, Posthuma L, Cousins IT, Lindim C, de Zwart D, Bunke D, Kutsarova S, Müller C, Munthe J, Slobodnik J, Brack W (2019). The European Collaborative Project SOLUTIONS developed models to provide diagnostic and prognostic capacity and fill data gaps for chemicals of emerging concern. *Environmental Sciences Europe*, 31: 72.
- Velki M, Meyer-Alert H, Seiler TB, Hollert H (2017). Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. *Aquatic Toxicology*, 193: 187-200.
- Versteeg HH, Nijhuis E, van den Brink GR, Evertzen M, Pynaert GN, van Deventer SJ, Coffey PJ, Peppelenbosch MP (2000). A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogenactivated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-elementbinding protein. *Biochemical Journal*, 350: 717-722.

- Vethaak AD, Belfroid AC (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands: Occurrence, Potency and Biological Effects. *Dutch National Institute Of Inland Water Management And Waste Water Management (RIZA)*. Report no. 2002.001
- Vethaak AD, Lahr J, Schrap SM, Belfroid AC, Rijs GBJ, Gerritsen A, de Boer J, Bulder AS, Grinwis GCM, Kuiper R, Legler J, Murk TAJ, Peijnenburg W, Verhaar HJM, de Voogt P (2005). An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 59 (4): 511–524.
- Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbr, R (1999). Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4: 455–466.
- Villeneuve DL, Garcia-Reyero N, Martinović D, Mueller ND, Cavallin JE, Durhan EJ, Makynen EA, Jensen KM, Kahl MD, Blake LS, Perkins EJ, Ankley GT (2010). I. Effects of a dopamine receptor antagonist on fathead minnow. *Pimephales promelas* reproduction. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 73: 472–477.
- Villeneuve DL, Coady K, Escher BI, Mihaich E, Murphy CA, Schlekat T, Garcia-Reyero N (2019). High-throughput screening and environmental risk assessment: State of the science and emerging applications. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 38(1): 12–26.
- Viñas R, Watson CS (2013). Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environmental Health Perspectives*, 121(3): 352–358.
- Virk P, Al-Sakran AAM, Elobeid MA (2014). Effect of Bisphenol A on the Levels of Vitellogenin and Metallothionein in Adult Male Carp, *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, 13: 1107–1112.
- Visnjic-Jeftic Z, Jaric I, Jovanovic L, Skoric S, Smederevac-Lalic M, Nikcevic M, Lenhardt M (2010). Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). *Microchemical Journal*, 95 (2): 341–344.
- Volker J, Stapf M, Mieke U, Wagner M (2019). Systematic review of toxicity removal by advanced wastewater treatment technologies via ozonation and activated carbon. *Environmental Science And Technology*, 53 (13): 7215–7233.
- Von Ossowski I, Hausner G, and Loewen PC (1993). Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *Journal Of Molecular Evolution*, 37 (1): 71–76.
- Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, Dudgeon D, Prusevich A, Green P, Glidden S, Bunn SE, Sullivan CA, Liermann CR, Davies PM (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467: 555–561
- Voulvoulis N, Arpon KD, Giakoumis T (2017). The EU Water Framework Directive: From great expectations to problems with implementation. *Science Of The Total Environment*, 575: 358–366.
- Vrana B, Allan IJ, Greenwood R, Mills G A, Dominiak E, Svensson K, Knutsson J, Morrison G (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(10): 845–868.

- Vrana JA, Currie HN, Han AA, Boyd J (2014). Forecasting cell death dose-response from early signal transduction responses in vitro. *Toxicological Sciences: An Official Journal Of The Society Of Toxicology*, 140(2): 338–351.
- Vugteveen P, Leuven RSEW, Huijbregts MAJ (2006). Redefinition and elaboration of river ecosystem health: perspective for river management. *Hydrobiologia*, 565: 289–308.
- Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Barsiene J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A, Parkkonen J, Pempkowiak J, Schiedek D (2006). Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53 (8-9): 479-487.
- Wagner M, Vermeirssen ELM, Buchinger S, Behr M, Magdeburg A, Oehlmann J (2013). Deriving bio-equivalents from in vitro bioassays: Assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 32: 1906–1917.
- Wall KL, Jessen-Eller K, Crivello JF (1998). Assessment of various biomarkers in winter flounder from coastal Massachusetts, USA. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 17 (12): 2504- 2511.
- Wang C, Jin H, Gao D, Lieftink C, Evers B, Jin G, Xue Z, Wang L, Beijersbergen RL, Qin W, Bernards R (2018). Phospho-ERK is a biomarker of response to a synthetic lethal drug combination of sorafenib and MEK inhibition in liver cancer. *Journal Of Hepatology*, 69 (5): 1057-1065.
- Wang X, Zheng Y, Zhang Y, Li J, Zhang H, Wang H (2016). Effects of β -diketone antibiotic mixtures on behavior of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 144: 2195–2205.
- Wang Z, Walker GW, Muir DCG, Nagatani-Yoshida K (2020). Toward a global understanding of chemical pollution: A first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories. *Environmental Science And Technology*, 54 (5): 2575-2584.
- Warner-Schmidt JL, Chen EY, Zhang X, Marshall JJ, Morozov A, Svenningsson P, Greengard P (2010). A role for p11 in the antidepressant action of brain-derived neurotrophic factor. *Biological Psychiatry*, 68: 528–535.
- Watson K, Shaw G, Leusch FDL, Knight NL (2012). Chlorine disinfection by-products in wastewater effluent: Bioassay-based assessment of toxicological impact. *Water Research*, 46: 6069–6083.
- Wernersson A, Carere M, Maggi C, Tusil P, Soldan P, James A, Sanchez W, Dulio V, Broeg K, Reifferscheid G, Buchinger S, Maas H, Van Der Grinten E, O’Toole S, Ausili A, Manfra L, Marziali L, Polesello S, Lacchetti I, Mancini L, Lilja K, Linderoth M, Lundeberg T, Fjällborg B, Porsbring T, Larsson D, Bengtsson-Palme J, Förlin L, Kienle C, Kunz P, Vermeirssen E, Werner I, Robinson C, Lyons B, Katsiadaki I, Whalley C, den Haan K, Messiaen M, Clayton H, Lettieri T, Carvalho R, Gawlik B, Hollert H, Di Paolo C, Brack W, Kammann U, Kase R (2015). The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, 27(1): 7.
- Wheelock CE, Phillips BM, Anderson BS, Miller JL, Miller MJ, Hammock BD (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). In: Whitacre DM (ed) *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology*. Springer, Berlin, 117–178.

- Whitehead A, Clark BW, Reid NM, Hahn ME, Nacci D (2017). When evolution is the solution to pollution: key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evolutionary Applications*, 10: 762–783.
- Wild CP (2005). Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers And Prevention*, 14: 1847–1850.
- Wilde EW, Parrot AB (1984). A simple, inexpensive in situ method for assessing acute toxicity of effluents to fish. *Water Research*, 18: 783-785.
- Williams GM, Iatropoulos MJ (2002). Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30 (1): 41–53.
- Wiseman CD, LeMoine M, Cormier S (2010). Assessment of probable causes of reduced aquatic life in the Touchet River, Washington, USA. *Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 16: 87–115.
- Witkowski A, Jan Katusz, Wawer K, Stefaniak J, Popiołek M, Błachuta J (2015). A Natural Hybrid of *Leuciscus leuciscus* (L.) and *Alburnus alburnus* (L.) (Osteichthyes: Cyprinidae) from the Bystrzyca River (Poland). *Annales Zoologici*, 65 (2): 287-293.
- Woitecki AM, Müller JA, van Loo KM, Sowade RF, Becker AJ, Schoch S (2016). Identification of Synaptotagmin 10 as Effector of NPAS4-Mediated Protection from Excitotoxic Neurodegeneration. *Journal Of Neuroscience*, 36 (9): 2561-2570.
- Wolfram G, Höss S, Orendt C, Schmitt C, Adámek Z, Bandow N, Großschartner M, Kukkonen JVK, Leloup V, López Doval JC, Muñoz I, Traunspurger W, Tuikka A, Van Liefferinge C, von der Ohe PC, de Deckere E (2012). Assessing the impact of chemical pollution on benthic invertebrates from three different European rivers using a weight-of-evidence approach, *Science Of The Total Environment*, 438: 498-509.
- Wong ML, Medrano JF (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39: 75–85.
- Woodling JD, Lopez EM, Maldonado TA, Norris DO, Vajda AM (2006). Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. *Comparative Biochemistry And Physiology - C Toxicology And Pharmacology*, 144 (1): 10–15.
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety (1993). Biomarkers and risk assessment : concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. World Health Organization.
- Wu LT, Hui, JH, Chu KH (2013). Origin and evolution of yolk proteins: Expansion and functional diversification of large lipid transfer protein superfamily. *Biology Of Reproduction*, 102: 1-10.
- Wu Q, Yan W, Liu C, Li L, Yu L, Zhao S, Li G (2016). Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. *Environmental Pollution*, 213:793-800.
- Xie L, Klerks PL (2004). Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). *Environmental Toxicology And Chemistry*, 23 (6): 1499–1503.

- Xing H, Wang Z, Gao X, Chen D, Wang L, Li S, Xu S (2015). Atrazine and chlorpyrifos exposure induces liver autophagic response in common carp. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 113: 52–58.
- Xing Z, Chow L, Rees H, Meng F, Li S, Bill E, Benoy G, Zha T, Hewitt LM (2013). Influences of Sampling Methodologies on Pesticide-Residue Detection in Stream Water. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 64: 208–218.
- Yamashita M, Yabu T, Ojima N (2010). Stress protein HSP70 in fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 3(4):111–141.
- Yarmohammadi M (2012). Effect of starvation and re-feeding on growth performance and content of plasma lipids, glucose and insulin in cultured juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). *Journal Of Applied Ichthyology*, 28: 692-696.
- Yost EE, Pow CL, Hawkins MB, Kullman SW (2014). Bridging the gap from screening assays to estrogenic effects in fish: potential roles of multiple estrogen receptor subtypes. *Environmental Science And Technology*, 48: 5211–5219.
- Yu G, Zhang D, Liu W, Wang J, Liu X, Zhou C, Gui J, Xiao W (2018). Zebrafish androgen receptor is required for spermatogenesis and maintenance of ovarian function. *Oncotarget*, 9: 24320-24334.
- Yurchenko VV, Morozov AA (2019). Intra-annual variability of hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase activity in freshwater bream *Abramis brama*. *Biological Rhythm Research* 50 (5): 679–688.
- Zabiegała B, Kot-Wasik A, Urbanowicz M, Namieśnik J (2010). Passive sampling as a tool for obtaining reliable analytical information in environmental quality monitoring. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 396: 273–296.
- Zaibel I, Appelbaum Y, Arnon S, Britzi M, Schwartsburd F, Snyder S, Zilberg D (2019). The effect of tertiary treated wastewater on fish growth and health: Laboratory-scale experiment with *Poecilia reticulata* (guppy). *PLoS One* 14 (6), e0217927.
- Zelikoff, JT (1993). Metal Pollution-Induced Immunomodulation in Fish. *Annual Review Of Fish Diseases*, 3: 305-325.
- Zhao Y, Sun Q, Hu K, Ruan J, Yang X (2016). Isolation, characterization, and tissue-specific expression of GABA A receptor $\alpha 1$ subunit gene of *Carassius auratus gibelio* after avermectin treatment. *Fish Physiology And Biochemistry*, 42: 83–92.
- Zhou J, Cai ZH, Zhu XS (2010). Are endocrine disruptors among the causes of the deterioration of aquatic biodiversity?. *Integrated Environmental Assessment And Management*, 6 (3) 492–498.
- Zhou S, Di Paolo C, Wu X, Shao Y, Seiler TB, Hollert H (2019). Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants – The case of pharmaceuticals in European surface waters. *Environment International*, 128: 1-10.
- Ziskowski JJ, Despres-Patanjo L, Murchelano RA, Howe AB, Ralph D, Atran S (1987). Disease in commercially valuable fish stocks in the Northwest Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 18: 496-504.

PRILOG DOKTORSKE DISERTACIJE

Biomarkeri kod riba u monitoringu statusa akvatičnih ekosistema i identifikaciji efekata hemijskog stresa *in situ*

I Hemijske analize

P1. Metali i PAHs u reci Dunav na lokalitetima od interesa za studiju slučaja Dunav: Zaštićena zona – lokaliteti uzorkovanja Bezdani i Bogojevo i gradske zone – lokalitet uzorkovanja Novi Sad

CAS	Supstance	NOEC (µg/L)	JDS 3, 2013 (Liska i sar. 2015)			Zvanični monitoring podaci 2017 (SEPA 2018)			Zvanični monitoring podaci 2018 (SEPA 2019)		
			Zaštićena zona	Gradska zona		Zaštićena zona		Gradska zona	Zaštićena zona		Gradska zona
			Bogoevo	Novi Sad 1	Novi Sad 2	Bezdani	Bogoevo	Novi Sad	Bezdani	Bogoevo	Novi Sad
Koncentracije (µg/L)											
7439-89-6	Iron (Fe) dissolved	1100				52.83 (15-146)	87.27 (19-516)	71.36 (13-218)	79.917 (17-191)	79.50 (27-271)	70.50 (11-353)
7439-96-5	Manganese (Mn)	3170				22.62 (11-38)	12.36 (<LOQ-35)	8.091 (<LOQ-21)	10.083 (<LOQ-33)	14.90 (<LOQ-25)	13.18 (<LOQ-36)
7440-38-2	Arsenic (As).	247.9	2.2	2.3	2.3	1.48 (0.9-2.5)	1.264 (0.8-1.8)	1.418 (1.1-2)	1.6167 (<LOQ-2.3)	1.764 (1-3.4)	1.675 (1.2-2.3)
7440-43-9	Cadmium (Cd)	48.55	0.026	0.028	0.03	0.033 (<LOQ-0.05)	0.015 (<LOQ-0.06)	0.013 (<LOQ-0.04)	0.0192 (<LOQ-0.04)	0.009 (<LOQ-0.04)	0.015 (<LOQ-0.05)
7440-47-3	Chromium (Cr).	772.7	0.52	0.67	0.68	0.80 (<LOQ-1.4)	0.146 (<LOQ-0.9)	0.318 (<LOQ-1.3)	0.4250 (<LOQ-2.2)	0.50 (<LOQ-2.2)	0.70 (<LOQ-4.7)
7440-50-8	Copper (Cu)	21.99	1.1	1.2	1.2	7.118 (4.1-13.6)	8.318 (4-16.9)	4.336 (2.2-5.6)	18.675 (4.7-61.4)	14.70 (3.3-44.5)	5.058 (1.7-15.3)
7439-92-1	Lead (Pb)	252.7	0.24	0.35	0.52	0.580 (<LOQ-0.7)	0.209 (<LOQ-1.4)	0.291 (<LOQ-0.8)	0.0833 (<LOQ-1)	<LOQ-	<LOQ
7439-97-6	Mercury (Hg)	18.03	0.0046	0.0057	0.0025	<LOQ	<LOQ-	<LOQ	<LOQ	<LOQ-	<LOQ
7440-02-0	Nickel (Ni)	239.8	0.93	1.3	1.4	7.725 (2.1-35.8)	6.782 (1.8-24.4)	2.982 (1.6- 11)	4.8417 (<LOQ-14)	5.370 (1-16)	1.858 (1-3.2)
7440-66-6	Zinc (Zn)	82.55	5.7	7.1	7.4	38.75 (26.3-54.4)	52.21 (29.9-108.6)	21.90 (3.3-43.7)	87.725 (14.4-212.6)	152.12 (9.7-375.6)	21.14 (8.3-44.1)
7429-90-5	Aluminium (Al).	634				49.70 (20-111)	62.82 (13-328)	53.46 (11-142)	61.125 (13-220)	59.90 (<LOQ-208)	58.0 (<LOQ-283)
7440-42-8	Boron (B)	14009				25.67 (18-54)	17.75 (12-23)	19.75 (<LOQ-29)	24.500 (19-38)	16.556 (<LOQ-31)	10.78 (<LOQ-20)
7440-48-4	Cobalt (Co)	54.56				0.96 (<LOQ-1.2)	0.291 (<LOQ-1.2)	0.273 (<LOQ-1.3)	0.3750 (<LOQ-2.2)	0.0700 (<LOQ-0.7)	0.091 (<LOQ-0.5)
1002-53-5	Dibutyltin-cation	2	0.00038	0.00034	0.00044						
120-12-7	Anthracene	1.87	0.000002 ₃	0.003	0.0029						
50-32-8	Benzo(a)pyrene	3.30	< LOQ	0.0023	< LOQ	0.002 (<LOQ-0.002)			0.0008 (<LOQ-0.005)	0.0004 (<LOQ-0.004)	< LOQ
205-99-2	Benzo(b)fluoranthene	0.74	< LOQ	0.0024	0.0024	0.0025 (<LOQ-0.003)			0.0007 (<LOQ-0.004)	0.0015 (<LOQ-0.014)	0.0006 (<LOQ-0.004)
191-24-2	Benzo(g,h,i)perylene	0.05	0.000002 ₂	0.029	0.0031	0.002 (<LOQ-0.002)			0.0007 (<LOQ-0.004)	0.0003 (<LOQ-0.002)	0.0003 (<LOQ-0.005)
207-08-9	Benzo(k)fluoranthene	0.74	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.003 (<LOQ-0.003)			0.0007 (<LOQ-0.004)	0.0010 (<LOQ-0.009)	0.0006 (<LOQ-0.003)
206-44-0	Fluoranthene	29.98	0.000004 ₁	0.0055	0.0057	0.003 (<LOQ-0.052)			0.0001 (<LOQ-0.001)	0.0037 (<LOQ-0.041)	0.0003 (<LOQ-0.002)
193-39-5	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	1.19	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.002 (<LOQ-0.002)			0.0008 (<LOQ-0.005)	0.0013 (<LOQ-0.011)	< LOQ
91-20-3	Naphthalene	1489	0.000015	0.019	0.02						

NOEC - Najviša koncentracija test supstance koja ne izaziva statistički značajan efekat- iz Posthuma i sar, 2019; Zvanični podaci: Vrednosti predstavljaju prosečnu vrednost od 12 mesečnih merenja i opsege u zgradama (min, max)

P2. Pesticidi u reci Dunav na lokalitetima od interesa za studiju slučaja Novi Sad: Zaštićena zona-lokalitet Bogojevo i gradska zona- lokalitet Novi Sad

CAS	Supstance (µg/L)	NOEC (µg/L)	JDS 3, 2013 (Liska i sar, 2015)			Konig i sar, 2017			Zvanični podaci 2017 (SEPA 2018)		Zvanični podaci 2018 (SEPA 2019)	
			Zaštićena zona	Gradska zona		Gradska zona			Zaštićena zona	Gradska zona	Zaštićena zona	Gradska zona
			Bogojevo	Novi Sad 1	Novi Sad 2	NS1	NS2	NS3	Bogojevo	Novi Sad	Bogojevo	Novi Sad
94-75-7	2,4-D	4456.6	0.001	0.0016	0.0011							
94-74-6	2-Methyl-4-chlorphenoxy acetic acid (MCPA)	7561.4	0.0022	0.002	0.0013	0.0015	0.0014	0.0015				
135410-20-7	Acetamiprid	1465.9	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0012	0.0017	< LOQ				
34256-82-1	Acetochlor	165							< LOQ-0.002	< LOQ-0.019	< LOQ	< LOQ-0.005
1066-51-9	Aminomethylphosphonic acid (AMPA)	19756	0.23	0.27	0.27							
1912-24-9	Atrazine	89.74	0.005	0.007	0.006	0.0029	0.0021	0.0028	< LOQ-0.004	< LOQ-0.004	< LOQ-0.008	< LOQ-0.01
2163-68-0	Atrazine-2-hydroxy	10000	0.008	0.009	0.007							
6190-65-4	Atrazine-desethyl	0.33	0.008	0.011	0.01	0.0042	0.0034	0.0042	< LOQ-0.003	< LOQ-0.003	< LOQ-0.005	< LOQ-0.003
25057-89-0	Bentazone	286.15	0.005	0.005	0.005	0.0036	0.0045	0.0032				
188425-85-6	Boscalid	362				0.0046	0.0048	0.0049				
1689-84-5	Bromoxynil	297				0.0017	0.0017	0.0017				
63-25-2	Carbaryl	50.68	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0041	0.003	0.0036				
10605-21-7	Carbendazim	336.51	0.01	0.01	0.01	0.0045	0.0124	0.004				
16118-49-3	Carbetamide	17955	0.0026	0.003	< LOQ							
1698-60-8	Chloridazon	350.83	0.0026	0.0026	0.0026	0.0022	0.002	0.0021				
1982-47-4	Chloroxuron	313.69	0.0062	0.0086	0.0076							
15545-48-9	Chlorotoluron	1013.7	0.0032	0.004	0.0021	0.003	0.002	0.0031				
882-09-7	Clofibric acid	3095.3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0013	0.0012				
333-41-5	Diazinon	6.32	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0044	0.0062	0.0044				
34205-21-5	Dimefuron	30.20	0.025	0.009	0.018							
1420-07-1	Dinoterb	10.34	0.004	0.004	0.003							
330-54-1	Diuron	18.57	0.0024	0.0022	0.0021	0.0021	0.0021	0.0023				
26225-79-6	Ethofumesate	3982.9	0.021	0.02	0.011							
2642-71-9	Ethyl-azinphos	2.00	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0046	< LOQ	< LOQ				
120068-37-3	Fipronil	1.81	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0015	0.0045	0.0004				
34123-59-6	Isoproturon	10.98	0.0007	0.0006	0.0005	0.0053	0.0027	0.0047	< LOQ-0.002	< LOQ-0.002	< LOQ-0.003	< LOQ-0.003
65277-42-1	Ketoconazole	113.00				< LOQ	0.0391	< LOQ				
96639	Lenacil	36.68	< LOQ	0.0039	< LOQ							
330-55-2	Linuron	24.68	0.0088	< LOQ	< LOQ							
93-65-2	Mecoprop (MCP)	4677	0.0013	0.0015	0.0014	0.0021	0.0198	0.0019				
41394-05-2	Metamitron	21379	0.0019	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ				
67129-08-2	Metazachlor	630.96	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0054	0.0029	0.0042				
3060-89-7	Metobromuron	4365.16	0.0071	0.0055	0.006							
51218-45-2	Metolachlor	140.09	0.0078	0.0087	0.011	0.0024	0.0023	0.0023	< LOQ-0.024	< LOQ-0.08	< LOQ-0.11	< LOQ-0.108
171118-09-5	Metolachlor ESA	n/a				0.0268	0.0301	0.0257				

72-43-5	Methoxychlor	2.23							< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ-0.006
19937-59-8	Metoxuron	11606	0.00093	0.019	0.0032							
7287-19-6	Prometryn	108.29	< LOQ	0.0017	< LOQ				< LOQ-0.003	< LOQ-0.007	< LOQ	< LOQ
139-40-2	Propazine	65.80	0.0024	< LOQ	0.0017							
60207-90-1	Propiconazole	259.54	0.003	0.003	< LOQ							
52888-80-9	Prosulfocarb	74.00				0.0016	0.0015	0.0017				
122-34-9	Simazine	175.59	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0146	0.0108	0.0129				
107534-96-3	Tebuconazol	188.23	0.002	0.002	0.002							
886-50-0	Terbutryn	15.59	0.0035	0.0026	0.0041	< LOQ	< LOQ	0.001	< LOQ-0.001	< LOQ-0.004	0.006	< LOQ-0.002
5915-41-3	Terbutylazine	207.40	0.0031	< LOQ	0.0024	0.005	0.0038	0.0051	< LOQ-0.018	< LOQ	0.052	< LOQ-0.037
30125-63-4	Terbutylazine-desethyl	8.66	< LOQ	0.007	0.009	0.0024	< LOQ	0.0019	< LOQ-0.007	< LOQ-0.004	0.023	< LOQ-0.009
66753-07-9	Terbutylazine-2-hydroxy	n/a				0.0189	0.0119	0.0182				
111988-49-9	Thiacloprid	188				< LOQ	0.0036	< LOQ				

NS 1 Uzvodno od Novog Sada, NS 2 - Novi Sad, NS 3 Nizvodno od Novog Sada

P3. Proizvodi za ličnu higijenu, industrijski i drugi (različiti) organski polutanti: Zaštićena zona - lokalitet Bogojevo i gradska zona – lokalitet Novi Sad

CAS	Supstance (µg/L)	NOEC	JDS 3, 2013 (Liska i sar. 2015)			Konig i sar. 2017		
			Zaštićena zona	Gradska zona		Gradska zona		
			Bogojevo	Novi Sad 1	Novi Sad 2	NS1	NS2	NS3
51-28-5	2,4-Dinitrophenol (DNP)	443.92	0.03	0.04	0.04	0.0117	0.0108	0.0122
615-22-5	2-(Methylthio)benzothiazole	n.a.				0.0186	0.0177	0.0214
2634-33-5	1,2-Benzisothiazolinone	104				< LOQ	0.0353	0.0027
941-57-1	2-Benzothiazolesulfonic acid	n.a.				0.1642	0.1189	0.1499
120-18-3	2-Naphthalenesulfonic acid	19208	< LOQ	0.0026	0.0025	0.0154	0.0129	0.0134
136-85-6	5-Methyl-1H-benzotriazole	4832	0.087	0.043	0.071	0.0813	0.1457	0.0786
90-43-7	2-Phenylphenol	389				0.0118	0.5065	0.0048
95-14-7	1H-Benzotriazole	6988.76	0.3	0.35	0.3	0.1337	0.2528	0.1184
95-16-9	Benzothiazole	7296.25	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0368	0.0154
131-57-7	Benzophenone-3	451.44	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0248	< LOQ
4065-45-6	Benzophenone-4	409826	0.011	0.024	0.015	0.0185	0.1058	0.019
1340-95-0	Benzyltrimethylammonium	n.a.				< LOQ	0.4532	< LOQ
10328-34-4	Benzyltrimethylhexadecylammonium	n.a.				< LOQ	0.01	< LOQ
80-05-7	Bisphenol A	169.82	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0044	0.029	0.0045
80-09-1	Bisphenol S	2700.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0003	0.0051	0.0005
620-92-8	Bisphenol F	n.a.				< LOQ	0.0028	< LOQ
94-26-8	Butylparaben	59				0.0019	0.1113	0.0011
58-08-2	Caffeine	19.39	0.11	0.08	0.076	< LOQ	4	0.1649
486-56-6	Cotinine	100.00	0.016	0.012	0.024	0.013	0.4964	0.0254
486-66-8	Daidzein	n.a.				0.0022	0.4702	0.0146
117-81-7	Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	257.87	< LOQ	0.84	< LOQ			
2390-68-3	Didecyltrimethylammonium	n.a.				< LOQ	0.0094	< LOQ
838-85-7	Diphenylphosphate	n.a.				< LOQ	0.0032	0.0013
80-39-7	Ethyl tosylamide	n.a.				< LOQ	0.0038	< LOQ
120-47-8	Ethylparaben	2399				< LOQ	0.0566	0.0012
112-02-7	Hexadecyltrimethylammonium	33.00				< LOQ	0.1361	< LOQ
446-72-0	Genistein	4.63	0.0084	0.045	0.018	0.0023	0.0251	0.0022
119515-38-7	Icaridin	4387				< LOQ	0.0034	< LOQ
134-62-3	N,N-Diethyl-m-toluamid (DEET)	10705	0.0028	0.012	0.002	0.0016	0.0057	0.0018
54-11-5	Nicotine	229.25	0.14	0.15	0.14			
375-95-1	Perfluorononanoate (PFNA)	102.52	< LOQ	0.0014	0.00073			
1763-23-1	Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)	145.41	0.0075	0.0076	0.013			
335-67-1	Perfluorooctanoic acid (PFOA)	4596.2	0.019	0.0061	0.012			
27503-81-7	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	616.60	0.0093	0.017	0.015	0.0098	0.0355	0.012
94-13-3	Propylparaben	1064				0.0009	0.0562	0.0016
70-55-3	p-Toluenesulfonamide	13490				0.0582	0.0392	0.0445
100-02-7	p-Nitrophenol	2145.8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.002	0.0068	0.0041

81-07-2	Saccharin	23323	0.06	0.09	0.08			
56038-13-2	Sucralose	n.a.				0.1339	0.2866	0.1251
143-24-8	Tetraglyme	1000000	0.011	0.021	0.037	0.011	0.016	0.0145
29385-43-1	Tolyltriazol (mix of isomers)	3903	0.3	0.3	0.3			
3380-34-5	Triclosan	26.07	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0029	< LOQ
112-49-2	Triglyme	1576521	< LOQ	< LOQ	0.011			
77-93-0	Triethyl citrate	23302	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0053	0.0027	0.0047
126-71-6	Triisobutyl phosphate (TIBP)	5477.7	0.017	0.0095	0.03			
126-73-8	Tri-n-butyl phosphate (TnBP)	3657.6	0.0031	0.0033	0.00042			
115-86-6	Triphenyl phosphate (TPT)	872.77	0.00093	< LOQ	0.00074			
791-28-6	Triphenylphosphine oxide	5278.37	0.088	0.067	0.1	0.0249	0.0292	0.0194
13674-87-8	TDCPP	462.49	0.011	< LOQ	0.012			
78-51-3	Tris(2-butoxyethyl)phosphate	4341	0.0077	< LOQ	0.0076	0.0028	0.0439	0.0022
115-96-8	Tris(2-chloroethyl)phosphate	16278	0.0077	0.012	0.0081	0.0059	0.0385	< LOQ

NS 1 Uzvodno od Novog Sada, NS 2 - Novi Sad, NS 3 Nizvodno od Novog Sada

P4. Lekovi (i njihovi metaboliti) i hormoni u reci Dunav na lokalitetima od interesa za studiju slučaja Novi Sad: Zaštićena zona - lokalitet Bogojevo i Gradska zona - lokalitet Novi Sad

CAS	Substance (µg/L)	NOEC (µg/L)	JDS 3, 2013 (From Liska i sar. 2015)			Konig i sar. 2017		
			Zaštićena zona	Gradska zona		Gradska zona		
			Bogojevo	Novi Sad 1	Novi Sad 2	NS1	NS2	NS3
29331-92-8	10,11-Dihydro-10-hydroxycarbamazepine	1148.2	0.0029	< LOQ	< LOQ	0.0054	0.0256	0.0045
58955-93-4	10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine	3311.3	0.052	0.05	0.051	< LOQ	0.1506	0.0292
50-28-2	17-beta Estradiol	0.55	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0004	< LOQ
768-94-5	1-Adamantylamin	3119.6	< LOQ	0.01	< LOQ			
68011-66-5	2-Hydroxycarbamazepine	346.74	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0068	0.0138	0.0069
83-07-8	4-Aminoantipyrine	148				0.0078	0.1459	0.0122
63-05-8	4-Androstene-3,17-dione	1382				< LOQ	0.0051	< LOQ
950-81-2	4-Formyl-antipyrine	n.a.				< LOQ	0.0097	< LOQ
607-71-6	4-Methylcoumarin	n.a.				< LOQ	0.0423	< LOQ
6515-38-4	3,5,6-Trichloro-2-pyridinol	316				< LOQ	0.0029	< LOQ
21312-10-7	Acetyl-sulfamethoxazole	1819.7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.005	0.1243	0.006
71195-58-9	Alfentanil	812.83	0.00045	0.0018	< LOQ			
28981-97-7	Alprazolam	169.82	0.0012	0.0031	0.0021			
71675-85-9	Amisulpride	1148.2	0.008	0.007	0.007			
50-48-6	Amitriptyline	36.31	0.0038	0.0033	0.002			
26787-78-0	Amoxicillin	7387.5	0.009	0.0015	< LOQ			
300-62-9	Amphetamine	776.25	< LOQ	0.00096	0.0018			
53-41-8	Androsterone	912				< LOQ	0.1131	0.002
29122-68-7	Atenolol	570.43	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.1058	0.0022
51-55-8	Atropine	2138	0.013	0.028	0.012			
519-09-5	Benzoylcegonine	2691.5	0.0051	0.0079	0.0024			
41859-67-0	Bezafibrate	4327	0.0039	< LOQ	< LOQ	0.0021	0.0022	< LOQ
90357-06-5	Bicalutamide	490				0.001	0.002	0.0011
314-40-9	Bromacil	4994.6	0.067	0.039	< LOQ			
52485-79-7	Buprenorphine	72.44	0.013	0.012	0.015			
139481-59-7	Candesartan	8759.9	0.01	0.02	0.02			
298-46-4	Carbamazepine	241.16	0.029	0.033	0.036	0.0741	0.1994	0.076
78-44-4	Carisoprodol	1023.29	0.034	0.22	0.0036			
83881-51-0	Cetirizine	275.42	< LOQ	2.2	2.3	0.0051	0.0102	0.0045
56-75-7	Chloramphenicol	1072				< LOQ	0.0037	< LOQ
113-59-7	Chlorprothixene	13.49	< LOQ	0.0012	< LOQ			
81-25-4	Cholic acid	23361	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1	0.0552
59729-33-8	Citalopram	81.28	< LOQ	0.0057	< LOQ			
81103-11-9	Clarithromycin	283.79	0.0012	0.0012	0.0012	0.0017	0.0597	0.0022

1622-61-3	Clonazepam	245.47	0.0068	< LOQ	< LOQ			
113665-84-2	Clopidogrel	95				< LOQ	0.002	< LOQ
5786-21-0	Clozapine	162.18	0.028	0.0095	0.013			
76-57-3	Codeine	363.08	0.02	0.022	0.017			
3734-33-6	Denatonium	n.a.				0.0026	0.0057	0.0027
50-47-5	Desipramine	87.10	0.013	0.012	0.0055			
125-71-3	Dextromethorphan (Methorphan)	125.89	< LOQ	0.0031	< LOQ			
439-14-5	Diazepam	553.22	< LOQ	0.0081	0.0049			
15307-79-6	Diclofenac	3397	0.0033	0.0036	0.0041	0.0055	0.0169	0.0062
125-28-0	Dihydrocodeine	776.25	0.21	0.19	0.47			
58-73-1	Diphenhydramine	144.54	0.0029	0.0024	0.0043			
113-53-1	Dothiepin	33.11	0.002	0.0023	0.0023			
75847-73-3	Enalapril	3715.3	0.069	0.066	0.047	0.1942	0.2626	0.1712
481-29-8	Epi-Androsterone	912				< LOQ	0.0984	< LOQ
50-27-1	Estriol	490.00				< LOQ	0.0122	< LOQ
53-16-7	Estrone	1.00				< LOQ	0.0031	0.0002
25451-15-4	Felbamate	12589	< LOQ	0.0058	< LOQ			
437-38-7	Fentanyl	107.15	0.0051	0.0021	< LOQ			
2709-56-0	Flupentixol	32.36	0.17	0.16	0.14			
54-31-9	Furosemide	28.00				< LOQ	0.0275	< LOQ
60142-96-3	Gabapentin	3715.4	0.1	0.1	0.1	0.007	0.0434	0.0042
64744-50-9	Gabapentin-lactam	1202.3	0.04	0.04	0.04			
68002-20-0	Hexa(methoxymethyl)melamine	n.a.				0.0394	0.3655	0.4182
125-29-1	Hydrocodone	302	0.015	0.017	0.013			
466-99-9	Hydromorphone	213.8	0.00089	< LOQ	0.00095			
50-49-7	Imipramine	56.23	0.0069	0.019	0.0014			
78649-41-9	Iomeprol	26915	0.2	0.2	0.1			
138402-11-6	Irbesartan	6279	0.008	0.01	0.007			
22071-15-4	Ketoprofen	851.14	0.0057	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0313	< LOQ
84057-84-1	Lamotrigine	5738.5	0.06	0.06	0.07			
137-58-6	Lidocaine	354.81	0.0038	0.0041	0.0039	0.0033	0.0045	0.0033
846-49-1	Lorazepam	162.18	0.0044	0.0033	0.0048	< LOQ	0.005	< LOQ
114798-26-4	Losartan	157253	0.008	0.007	0.007			
10262-69-8	Maprotiline	46.77	0.0018	0.0012	< LOQ			
2898-12-6	Medazepam	234.42	< LOQ	< LOQ	0.00021			
520-85-4	Medroxyprogesterone	5000				< LOQ	0.0066	< LOQ
61-68-7	Mefenamic acid	662.37	0.0011	0.0011	0.001			
657-24-9	Metformin	23464	0.13	0.25	0.13	0.0988	2	0.1735
113-45-1	Methylphenidate	794.33	0.0015	0.0015	0.0012			
37350-58-6	Metoprolol	4859				0.013	0.0667	0.0128
56392-14-4	Metoprolol acid	1949.8	0.03	0.03	0.03			

59467-64-0	Midazolam	214.04	0.0018	< LOQ	< LOQ			
57-27-2	Morphine	1000	0.002	< LOQ	0.0021			
83-15-8	n-Acetyl-4-aminoantipyrine	0.63	0.1	0.1	0.1	0.0414	0.1755	0.0459
16590-41-3	Naltrexone	630.96	0.00053	0.00062	0.00058			
1672-58-8	N-Formyl-4-aminoantipyrine	0.63	0.1	0.2	0.2	0.0347	0.0754	0.0363
146-22-5	Nitrazepam	630.96	0.014	< LOQ	0.01			
78715-23-8	Norbuprenorphine	169.82	0.0059	0.0022	0.0025			
1088-11-5	Nordiazepam	186.21	0.025	0.018	0.0085			
1609-66-1	Norfentanyl	977.24	0.0019	0.0017	< LOQ			
72-69-5	Nortriptyline	60.26	0.0055	0.0048	0.0036			
73986-53-5	O-Desmethyltramadol	338.84	0.0071	0.0063	0.006			
93413-62-8	O-Desmethylvenlafaxine	1354.3	0.0042	0.0038	0.0039			
132539-06-1	Olanzapine	346.74	0.0042	0.0093	0.0029			
604-75-1	Oxazepam	354.81	0.0067	0.008	0.0052	0.0031	0.0078	0.0031
76-42-6	Oxycodone	758.58	0.007	0.005	0.0029			
76-41-5	Oxymorphone	457.09	< LOQ	< LOQ	0.0032			
144598-75-4	Paliperidone (9-Hydroxyrisperidone)	19.50	0.00078	0.0008	0.0008			
61869-08-7	Paroxetine	338.92	0.0049	0.0028	0.0028			
60-80-0	Phenazone	0.25	0.01	0.01	0.01	0.002	0.0273	0.002
13523-86-9	Pindolol	501.19				0.0043	0.0356	0.0071
1893-33-0	Pipamperone	331	0.0015	0.0018	< LOQ			
2955-38-6	Prazepam	831.76	0.013	< LOQ	0.016			
148553-50-8	Pregabalin	79.43	0.007	< LOQ	0.008			
125-33-7	Primidone	3715.4	0.46	0.62	0.61			
57-83-0	Progesterone	1548.8				< LOQ	0.0062	< LOQ
60-87-7	Promethazine	602	< LOQ	< LOQ	0.0073			
54063-53-5	Propafenone	57.54	< LOQ	< LOQ	0.0019			
525-66-6	Propranolol	213.80	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0035	< LOQ
479-92-5	Propyphenazone	116.04	0.002	0.003	0.002	0.0023	0.0251	0.0022
70-55-3	p-Toluenesulfonamide	7.08	0.02	0.035	0.032			
106266-06-2	Risperidone	13489	0.0021	< LOQ	< LOQ			
19395-41-6	Ritalinic acid	602.56	< LOQ	0.0016	0.0014			
69-72-7	Salicylic acid	436.52	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0018	0.0012
3930-20-9	Sotalol	14158	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0538	< LOQ
723-46-6	Sulfamethoxazole	32764	0.016	0.016	0.013	0.0065	0.0404	0.0063
144-83-2	Sulfapyridine	227.98	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.0049	0.0353	0.0047
15676-16-1	Sulpirid	2065.9	0.01	0.02	0.02			
144701-48-4	Telmisartan	4677.35	0.05	0.04	0.04			
846-50-4	Temazepam	38.90	0.0034	< LOQ	< LOQ			
58-22-0	Testosterone	338.84				< LOQ	0.0013	< LOQ
27203-92-5	Tramadol	125.00	0.021	0.027	0.022	0.009	0.012	0.0096

19794-93-5	Trazodone	416.87	0.0016	0.0017	0.0016			
28911-01-5	Triazolam	131.83	0.0013	0.0016	0.0012			
738-70-5	Trimethoprim	83.18	0.004	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.013	0.1712
739-71-9	Trimipramine	12956	0.24	0.022	0.33			
137862-53-4	Valsartan	38.02	0.02	0.02	0.02			
164265-78-5	Valsartan acid	14037	0.1	0.1	0.1			
93413-69-5	Venlafaxine	1202.3	0.0017	0.0014	0.0016			
82626-48-0	Zolpidem	209.07	< LOQ	0.0018	0.0019			
43200-80-2	Zopiclone	338.84	< LOQ	0.0072	0.0063			

NS 1 Uzvodno od Novog Sada, NS 2 - Novi Sad, NS 3 Nizvodno od Novog Sada

Literatura:

König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherova, K., Novak, J., Teodorovic, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Hashmi, M.A.K., Ahlheim, J., Brack, W. 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environ. Pollut.* 220: 1220-1230.

Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K. and Slobodník, J. 2015. Joint Danube Survey 3 - A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality, Final Scientific Report. International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, Austria; ISBN: 978-3-200-03795-3

Posthuma, L., van Gils, J., Zijp, M.C., van de Meent, D., de Zwart, D. 2019. Species sensitivity distributions for use in environmental protection, assessment, and management of aquatic ecosystems for 12 386 chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 38 (4): 905-917.

SEPA (Serbian Environmental Protection Agency) (2018) Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda - 2017, Ministarstvo zaštite životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine, Beograd 2018.

SEPA (Serbian Environmental Protection Agency) (2019) Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda - 2018, Ministarstvo zaštite životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine, Beograd 2019.

**P5: Detektovane supstance na lokalitetima od interesa za studiju slučaja Novi Sad, detekcioni limit i njihova upotreba/poreklo
(preuzeto iz König i sar, 2017)**

Br	Supstanca	CAS	MW	MDL	NS1	NS2	NS3	Upotreba/poreklo
			[g/mol]	[ng/L]	[ng/L]	[ng/L]	[ng/L]	
1	Enalapril	76420-72-9	376.46	9.7	194.2	262.6	171.2	Lek
2	2-Benzothiazolesulfonic acid	941-57-1	215.24	1	164.2	118.9	149.9	Industrijska supstanca (TP of mercaptobenzothiazole)
3	Sucralose	56038-13-2	397.64	10	133.9	286.6	125.1	Hrana/ stimulans
4	1H-Benzotriazole	95-14-7	119.13	3	133.7	252.8	118.4	Industrijska supstanca
5	Metformin	657-24-9	129.17	15	98.8	2000	173.5	Lek
6	4- and 5-Methyl-1H-benzotriazole	136-85-6	133.15	3.7	81.3	145.7	78.6	Industrijska supstanca
7	Carbamazepine	298-46-4	236.28	1.8	74.1	199.4	76	Lek
8	p-Toluenesulfonamide	70-55-3	171.22	1.5	58.2	39.2	44.5	Industrijska supstanca
9	N-Acetyl-4-aminoantipyrine	83-15-8	245.28	1.3	41.4	175.5	45.9	Lek (TP of metamizole)
10	Hexa(methoxymethyl)melamine	68002-20-0	390.44	1.6	39.4	365.5	418.2	Industrijska supstanca
11	N-Formyl-4-aminoantipyrine	1672-58-8	231.26	1.1	34.7	75.4	36.3	Lek (TP of metamizole)
12	Metolachlor ESA	171118-09-5	283.8	2	26.8	30.1	25.7	Pesticid (TP of metolachlor)
13	Triphenylphosphine oxide	791-28-6	278.29	1.3	24.9	29.2	19.4	Industrijska supstanca
14	Terbuthylazine-2-hydroxy	66753-07-9	211.26	1.7	18.9	11.9	18.2	Pesticid (TP of terbuthylazine)
15	2-(Methylthio)benzothiazole	615-22-5	181.27	1.4	18.6	17.7	21.4	Industrijska supstanca
16	Benzophenone-4	4065-45-6	308.31	5	18.5	105.8	19	Proizvod za ličnu higijenu
17	2-Naphthalenesulfonic acid	120-18-3	208.23	2	15.4	12.9	13.4	Industrijska supstanca
18	Simazine	122-34-9	201.66	1.9	14.6	10.8	12.9	Pesticid
19	Metoprolol	37350-58-6	267.37	0.8	13	66.7	12.8	Lek
20	Cotinine	486-56-6	176.22	3.3	13	496.4	25.4	Hrana/ stimulans
21	2-Phenylphenol	90-43-7	170.21	1	11.8	506.5	4.8	Fungicid
22	2,4-Dinitrophenol	51-28-5	184.11	2	11.7	10.8	12.2	Industrijska supstanca
23	Tetraglyme	143-24-8	222.28	5	11	16	14.5	Industrijska supstanca
24	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	27503-81-7	274.3	1	9.8	35.5	12	Proizvod za ličnu higijenu
25	Tramadol	27203-92-5	263.38	1.5	9	12	9.6	Lek
26	4-Aminoantipyrine	83-07-8	203.24	1	7.8	145.9	12.2	Lek
27	Gabapentin	60142-96-3	171.24	1	7	43.4	4.2	Lek
28	2-Hydroxycarbamazepine	68011-66-5	252.27	0.8	6.8	13.8	6.9	Lek (TP of carbamazepine)
29	Sulfamethoxazole	723-46-6	253.28	0.9	6.5	40.4	6.3	Lek
30	Tris(2-chloroethyl)phosphate	115-96-8	285.49	3.3	5.9	38.5		Industrijska supstanca
31	Diclofenac	15307-86-5	296.15	1	5.5	16.9	6.2	Lek
32	10,11-Dihydro-10-hydroxycarbamazepine	29331-92-8	254.28	1.6	5.4	25.6	4.5	Lek (TP of carbamazepine)
33	Metazachlor	67129-08-2	277.76	0.9	5.4	2.9	4.2	Pesticid
34	Isoproturon	34123-59-6	206.29	0.3	5.3	2.7	4.7	Pesticid
35	Triethylcitrate	77-93-0	276.29	4.4	5.3	242.9	9.1	Industrijska supstanca

36	Cetirizine	83881-51-0	388.9	2	5.1	10.2	4.5	Lek
37	Acetyl-Sulfamethoxazole	21312-10-7	295.31	1.7	5	124.3	6	Lek (TP sulfamethoxazole)
38	Terbuthylazine	5915-41-3	229.71	1.6	5	3.8	5.1	Pesticid
39	Sulfapyridine	144-83-2	249.29	1.4	4.9	35.3	4.7	Lek
40	Ethyl-azinphos	2642-71-9	345.37	3.4	4.6	<MD L	< MDL	Pesticid
41	Boscalid	188425-85-6	343.21	4.5	4.6	4.8	4.9	Pesticid
42	Carbendazim	10605-21-7	191.19	2.1	4.5	12.4	4	Pesticid/ Biocid
43	Bisphenol A	80-05-7	228.28	1	4.4	29	4.5	Industrijska supstanca
44	Diazinon	333-41-5	304.35	1	4.4	6.2	4.4	Pesticid
45	Pindolol	13523-86-9	248.33	3.5	4.3	35.6	7.1	Lek
46	Desethylatrazine	6190-65-4	187.63	2.1	4.2	3.4	4.2	Pesticid (TP of atrazine)
47	Carbaryl	63-25-2	201.23	2.9	4.1	3	3.6	Pesticid
48	Bentazone	25057-89-0	240.28	1	3.6	4.5	3.2	Pesticid
49	Lidocaine	137-58-6	234.34	0.6	3.3	4.5	3.3	Lek
50	Oxazepam	604-75-1	286.72	2.2	3.1	7.8	3.1	Lek
51	Chlorotoluron	15545-48-9	212.68	0.6	3	2	3.1	Pesticid
52	Atrazine	1912-24-9	215.69	0.7	2.9	2.1	2.8	Pesticid
53	Tri(butoxyethyl)phosphate	78-51-3	398.48	1.4	2.8	43.9	2.2	Industrijska supstanca
54	Denatonium	3734-33-6	325.48	2.1	2.6	5.7	2.7	Lek
55	Desethylterbuthylazine	30125-63-4	201.66	1.8	2.4	<MD L	1.9	Pesticid (TP of terbuthylazine)
56	Metolachlor	51218-45-2	283.8	0.7	2.4	2.3	2.3	Pesticid
57	Propyphenazone	479-92-5	230.31	2	2.3	25.1	2.2	Lek
58	Genistein	446-72-0	270.24	2	2.3	308.6	8.1	Hrana/ stimulans
59	Chloridazon	1698-60-8	221.65	1.1	2.2	2	2.1	Pesticid
60	Daidzein	486-66-8	254.24	2	2.2	470.2	14.6	Hrana/ stimulans
61	Bezafibrate	41859-67-0	361.83	2.1	2.1	2.2	<MDL	Lek
62	Mecoprop	93-65-2	214.65	1	2.1	19.8	1.9	Pesticid/ Biocid
63	Diuron	330-54-1	233.1	1.4	2.1	2.1	2.3	Pesticid/ Biocid
64	p-Nitrophenol	100-02-7	139.11	1	2	6.8	4.1	Industrijska supstanca
65	Phenazone	60-80-0	188.23	0.8	2	27.3	2	Lek
66	Butylparaben	94-26-8	194.23	0.3	1.9	111.3	1.1	Proizvod za ličnu higijenu
67	Bromoxynil	1689-84-5	276.92	1	1.7	1.7	1.7	Pesticid
68	Clarithromycin	81103-11-9	747.97	0.7	1.7	59.7	2.2	Lek
69	Prosulfocarb	52888-80-9	251.39	0.5	1.6	1.5	1.7	Pesticid
70	DEET	134-62-3	191.28	1.1	1.6	5.7	1.8	Proizvod za ličnu higijenu
71	MCPA	94-74-6	200.62	1	1.5	1.4	1.5	Pesticid
72	Fipronil	120068-37-3	437.15	0.1	1.5	4.5	0.4	Insecticide
73	Acetamiprid	135410-20-7	222.68	0.5	1.2	1.7	<MDL	Pesticid
74	Bicalutamide	90357-06-5	430.373	0.1	1	2	1.1	Lek/hormon
75	Propylparaben	94-13-3	180.21	0.5	0.9	56.2	1.6	Proizvod za ličnu higijenu

76	Bisphenol S	80-09-1	250.27	0.2	0.3	5.1	0.5	Industrijska supstanca
77	1,2-Benzisothiazolinone	2634-33-5	153.2	1.3	< MDL	35.3	2.7	Biocid
78	10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine	58955-93-4	270.29	1.9	< MDL	150.6	29.2	Lek (TP of carbamazepine)
79	17 β -estradiol	50-28-2	272.38	0.3	< MDL	0.4	< MDL	Prirodni proizvod/ hormon
80	3,5,6-Trichloro-2-pyridinol	6515-38-4	198.44	1	< MDL	2.9	< MDL	Pesticid (TP of chlorpyrifos)
81	4-Androstene-3,17-dione	63-05-8	286.42	1.5	< MDL	5.1	< MDL	Prirodni proizvod/ hormon
82	4-Formyl-antipyrine	950-81-2	216.24	1.9	< MDL	9.7	< MDL	Lek
83	4-Methylcoumarin	607-71-6	160.17	1	< MDL	42.3	< MDL	Industrijska supstanca
84	Androsterone	53-41-8	290.44	2	< MDL	113.1	2	Prirodni proizvod/ hormon
85	Atenolol	29122-68-7	266.34	1	< MDL	105.8	2.2	Lek
86	Benzophenone-3	131-57-7	228.25	1.2	< MDL	24.8	< MDL	Proizvod za ličnu higijenu
87	Benzothiazole	95-16-9	135.18	10.7	< MDL	36.8	15.4	Industrijska supstanca
88	Benzyltrimethylhexadecylammonium	1340-95-0	305.55	1.7	< MDL	453.2	< MDL	Biocid
89	Benzyltrimethylhexadecylammonium	10328-34-4	361.66	1.7	< MDL	10	< MDL	Biocid
90	Bisphenol F	620-92-8	200.23	1	< MDL	2.8	< MDL	Industrijska supstanca
91	Caffeine	58-08-2	194.19	25	< MDL	4000	164.9	Hrana/ stimulans
92	Chloramphenicol	56-75-7	323.13	2	< MDL	3.7	< MDL	Lek
93	Cholic acid	81-25-4	408.58	5	< MDL	1000	55.2	Prirodni proizvod/ hormon
94	Clofibric acid	882-09-7	214.65	1	< MDL	1.3	1.2	Lek (TP of clofibrate)
95	Clopidogrel	113665-84-2	321.82	1.9	< MDL	2	< MDL	Lek
96	Didecyldimethylammonium	2390-68-3	327.64	1.9	< MDL	9.4	< MDL	Biocid
97	Diphenylphosphate	838-85-7	250.19	1	< MDL	3.2	1.3	Industrijska supstanca
98	Epi-Androsterone	481-29-8	290.44	2	< MDL	98.4	< MDL	Prirodni proizvod/ hormon
99	Estriol	50-27-1	288.37	1	< MDL	12.2	< MDL	Prirodni proizvod/ hormon
100	Estrone	53-16-7	270.366	0.1	< MDL	3.1	0.2	Prirodni proizvod/ hormon
101	Ethyl tosylamide	80-39-7	199.27	2.3	< MDL	3.8	< MDL	Proizvod za ličnu higijenu
102	Ethylparaben	120-47-8	166.18	0.5	< MDL	56.6	1.2	Proizvod za ličnu higijenu
103	Furosemide	54-31-9	330.74	5.1	< MDL	27.5	< MDL	Lek
104	Hexadecyltrimethylammonium	112-02-7	285.56	0.9	< MDL	136.1	< MDL	Biocid
105	Icaridin	119515-38-7	229.32	1.4	< MDL	3.4	< MDL	Proizvod za ličnu higijenu
106	ISO E Super	54464-57-2	234.38	21.4	< MDL	511.9	< MDL	Proizvod za ličnu higijenu
107	Ketoconazole	65277-42-1	531.44	3	< MDL	39.1	< MDL	Lek
108	Ketoprofen	22071-15-4	254.29	2.6	< MDL	31.3	< MDL	Lek
109	Lauric isopropanolamide	8028-85-1	243.39	1.3	< MDL	10.5	< MDL	Proizvod za ličnu higijenu
110	Lauryl diethanolamide	120-40-1	287.45	9.4	< MDL	2000	48.4	Proizvod za ličnu higijenu
111	Lorazepam	846-49-1	321.16	4.5	< MDL	5	< MDL	Lek
112	Medroxyprogesterone	520-85-4	344.5	0.4	< MDL	6.6	< MDL	Lek
113	Monobenzylphthalate	2528-16-7	256.26	1.2	< MDL	3.2	< MDL	Industrijska supstanca (TP of dibenzylphthalate)
114	Monoethylphthalate	2306-33-4	194.19	10	< MDL	34	< MDL	Industrijska supstanca (TP of diethylphthalate)
115	N,N-Dimethyldodecylamine-N-oxide	1643-20-5	229.41	1.6	< MDL	1500	23.9	Industrijska supstanca

116	Perfluorobutanoic acid	375-22-4	214.04	1	< MDL	<MD L	10	Industrijska supstanca
117	Progesterone	57-83-0	314.47	1	< MDL	6.2	< MDL	Prirodni proizvod/ hormon
118	Propranolol	525-66-6	259.35	1.7	< MDL	3.5	< MDL	Lek
119	Salicylic acid	69-72-7	138.12	1	< MDL	1.8	1.2	Lek
120	Sotalol	3930-20-9	272.36	20	< MDL	53.8	< MDL	Lek
121	Terbutryn (+Prometryn)	7287-19-6	241.36	1	< MDL	<MD L	1	Pesticid/ Biocid
122	Testosterone	58-22-0	288.43	0.4	< MDL	1.3	< MDL	Prirodni proizvod/ hormon
123	Thiacloprid	111988-49-9	252.72	1.5	< MDL	3.6	< MDL	Pesticid
124	Triclosan	3380-34-5	289.55	0.5	< MDL	2.9	< MDL	Biocid/dezinficijens
125	Trimethoprim	738-70-5	290.32	0.5	< MDL	13	171.2	Lek

Supstance su navedene od najviše do najniže koncentracije detektovane u uzorku vode sa lokaliteta NS1. TP- transformacioni proizvod. MDL-detekcioni limit

P6 Koncentracije supstanci izmerene u serumu jedinki *C. carpio* kavezno izlaganih na odabranim lokalitetima u okviru studije slučaja Novi Sad

Koncentracija u serumu ng/mL		OC			RL			GC			SU		
Supstanca	MDL	sr. vr.	SD	br riba iznad MDL	sr. vr.	SD	br riba iznad MDL	sr. vr.	SD	br riba iznad MDL	sr.vr.	SD	br riba iznad MDL
10,11-Dihidro-10,11-dihidroksikarbamazepin	0.03			0	0.69	0.12	3			0			0
2(4-morfolinil)benzotiazol	0.08	0.09	0.02	3	0.09		1	0.09	0.01	4	0.12	0.03	8
2,4-Dinitrofenol	0.23	0.48	0.25	3	0.33	0.12	7	0.45	0.26	4	0.61	0.34	3
2-Naftalinsulfonska kiselina	0.25	0.35		1			0			0			0
2-Oktil-4-izotiazolin-3-jedan	0.05			0	0.06		1			0	0.05		1
3,4,5-Trihlorofenol	0.05			0			0	0.12	0.00	10			0
3,5,6-Trihloro-2-piridinol	0.08	0.16	0.05	8	0.12	0.03	6	0.32	0.20	10	0.23	0.04	9
4-Androsten-3.17-dion	0.05	1.63	1.67	9	1.71	2.01	9	1.09	0.65	4	0.72	0.42	7
4-Hidroksitamoksifen	0.05			0			0			0	0.19		1
4-Nitrofenol	0.25	0.82	0.64	7	0.77	0.37	9	0.79	0.40	7	1.63	0.96	9
4+5-Metil-1H-benzotriazol	0.10			0			0			0	0.18	0.04	9
6:2-Fluortelomersulfonska kiselina	0.05			0	0.05		1			0	0.06		1
7-Amino-4-metilumarin	0.20	2.66	1.50	9	0.28	0.06	3	0.58	0.18	4	0.33	0.07	3
Aciklovir	1.25			0	4.00		1	9.05	10.08	2			0
Ametrin	0.03			0			0	0.07	0.03	10	0.27	0.13	9
Atrazin	0.03			0			0			0	0.23	0.08	9
Benalaksil	0.10	0.17	0.09	3	0.22	0.00	2			0	0.15	0.05	2
Benzofenon-3	0.05			0			0	0.15	0.01	7	0.52	0.03	9
Benzildimetildodecilamonijum	0.13	0.43	0.28	5	0.29	0.17	2	0.20	0.08	3	1.85	2.09	9
Benzildimetilheksadecilamonijum	0.13			0			0	0.18	0.05	2	0.57	0.26	3
Cetirizin	0.28			0			0	27.78	23.78	2			0
Hlormekvat	0.40			0			0	1.25	0.06	5			0
Klopidogrel	0.03			0			0			0	0.07	0.00	9
Klozapin	0.03			0			0	0.20		1			0
Kortizon	0.08	9.09	2.23	9	11.91	2.94	9	9.39	5.34	10	21.81	4.69	9
Ciromazin	1.58	1.97	0.28	5			0			0	2.12	0.38	6
Daidzein	0.08	1.63	1.45	2			0			0			0
Diazinon	0.38			0			0	0.58	0.00	6			0
Diklofenak	0.40			0			0	1.77		1			0
Didecildimetilamonijum	0.08	0.24	0.15	4	0.16	0.08	2	0.52	0.59	5			0
Dimetahlor OA	1.63			0	9.79	7.51	9	4.61	3.34	8	12.29	7.46	7
Domperidon	0.08			0			0	0.95		1			0
Enrofloksacin	0.46	1.72	0.72	7	3.34	0.92	9	2.91	0.90	10			0

Epoksikonazol	0.03	0.11	0.01	6			0			0			0
Flurtamon	0.05			0	0.12	0.02	2			0			0
Genistein	0.08	0.96	1.18	5			0			0			0
Gestoden	0.15			0			0			0			0
Perfluorobutanojska kiselina	0.18	0.27		1			0	1.10	0.47	3			0
Heksa(metoksimetil)melamin	0.10			0	0.14	0.03	4	0.31		1	0.16	0.05	2
Heksadeciltrimetilamonium	0.08			0			0	1.26	0.62	10	0.15	0.08	9
Hidrokortizon	0.93	265.92	104.96	9	178.91	70.00	9	217.15	102.79	10	442.53	205.82	9
Imidaklopid guanidin	0.40	0.75	0.13	3			0			0			0
Irgarol	0.03	0.07	0.05	7	0.15	0.03	9			0	0.09	0.03	9
Laurin izopropanolamid	0.30			0	0.39	0.12	3			0			0
Laurin dietanolamid	0.18			0			0	2.15	1.24	10	2.80	1.15	9
Losartan	0.20			0			0	1.47		1			0
L-tiroksin	0.75	4.47	1.61	9	1.58	0.75	7	2.08	1.84	5	1.91	0.81	9
Metalaksil	0.08	0.34	0.07	8	0.17		1			0	0.10	0.01	2
Metolahlor	0.08	0.10		1	0.15	0.07	7			0	0.08		1
Metolahlor ESA	0.05			0			0	4.73		1	0.54	0.51	2
Metolahlor OA	0.08	0.23	0.08	8	0.29		1			0			0
Monensin	0.68			0			0			0	1.97	1.13	7
N,N-Dimetildodecilamin N-oksid	0.25	1.64	1.53	7	1.67	0.65	8	6.18	4.35	9	0.61	0.37	6
Dodecilsulfat	0.05	11.83	10.02	9			0			0			0
N-Butilbenzensulfonamid	0.30	0.75	0.20	8	0.55	0.21	7	0.44	0.13	6	1.18	0.14	9
N-Etil-o-toluensulfonamid	0.20	0.25	0.05	2			0			0	0.31	0.09	9
Norgestimat	0.05			0			0			0	0.15	0.02	4
Paroksetin	0.08			0			0			0	0.33	0.04	8
Perfluordekanojska kiselina	0.08	0.48	0.08	9	0.50	0.22	9	0.53	0.29	8	0.74	0.15	9
Perfluoroktansulfonamid	0.25			0			0	0.27		1			0
Perfluoroktansulfonska kiselina	0.05	0.96	0.15	9	1.44	0.38	9	1.29	0.81	9	2.42	0.45	9
Perfluortetradekanojska kiselina	0.10			0			0			0	0.43	0.05	9
Piperonil butoksid	0.25			0			0			0	0.73	0.39	8
Pirimifos-metil	0.05	0.88	0.17	9			0	0.58	0.01	7	0.57	0.01	9
Propamokarb	0.25	27.87	10.68	9	11.82	4.00	9	15.76	8.98	10	13.46	3.39	9
Propikonazol	0.08	0.11	0.05	6			0			0			0
Propranolol	0.05			0			0			0	0.14	0.00	3
Raloksifen	0.25			0			0	0.40	0.17	2			0
Risperidon	0.08	0.10	0.01	2			0			0			0
Saharin	0.18	0.39	0.36	5			0			0			0
Sulfapiridin	0.98	11.96	4.36	9	9.28	6.44	9	9.91	3.26	10	9.75	4.00	9
Tebukonazol	0.05	1.20	0.30	9			0			0			0
Terbutilazin	0.05			0	0.13	0.04	9			0	0.21	0.03	9
Terbutrin	0.05			0			0			0	0.17	0.03	9
Testosteron	0.13	0.59	0.65	8	0.88	0.54	4	0.55		1	0.33	0.16	7

Tetraglime	0.25			0	0.26		1			0			0
TMDD	1.00	3.84	0.84	4	2.11	0.90	4			0	2.47	0.80	5
Trenbolon	0.63	0.95		1			0			0			0
Tris(2-hloroetil)fosfat	0.30	0.97		1	0.41		1			0			0
Valsartan	3.65			0	14.51	7.76	2			0			0

MDL-detekcioni limit. 0C-jedinke *C. carpio* žrtvovane nakon donošenja iz ribnjaka, pre kaveznog izlaganja. RL-referentni lokalitet, GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić, sr.vr. - srednja vrednost, SD-standardna devijacija

P7 Koncentracije supstanci izmerene u mišićnom tkivu jedinki *C. carpio* kavezno izlaganih na odabranim lokalitetima u okviru studije slučaja Novi Sad

Koncentracija u mišićnom tkivu ng/g		OC			RL			GC			SU		
Supstanca	MDL	sr. vr.	SD	br jedinki iznad MDL	sr. vr.	SD	br jedinki iznad MDL	sr. vr.	SD	br jedinki MDL	sr.vr.	SD	br jedinki iznad MDL
1H-Benzotriazol	0.05			0	0.80	0.17	10	1.31	0.36	10	1.20	0.15	10
2(4-morfolinil)benzotriazol	0.04			0	0.11	0.03	0	0.04		1			0
4-(Dimetilamino)piridin	0.05	0.32	0.23	4	0.11	0.03	4	0.19	0.08	9	0.10	0.03	7
4+5-Metil-1H-benzotriazol	0.05			0	0.59	0.16	5	0.71	0.15	10	0.39	0.06	10
7-Amino-4-metilkumarin	0.10	0.25	0.14	3			0			0			0
7-Dietilamino-4-metilkumarin	0.03			0			0	0.05	0.04	8			0
Amiodaron	0.04			0			0	0.07	0.02	4			0
Amitriptilin	0.03			0	0.03		0	0.04	0.01	9			0
Benzofenon-3	0.03	0.28	0.15	5	0.17	0.11	4	2.62	1.75	10	0.14	0.08	10
Benzildimetilodecilamonijum	0.06	41.08	58.53	5	79.03	83.61	5	3.51	2.48	10	16.48	7.16	10
Benzildimetilheksadecilamonijum	0.06			0	22.65	32.10	5	1.96	1.18	10	4.46	1.89	10
Bisoprolol	0.04			0			0	0.12	0.06	3			0
Boskalid	0.22			0			0	0.32		1			0
Karbamazepin	0.04			0	0.04	0.00	1			0			0
Karbaril	0.04	0.10	0.03	5			0			0			0
Citalopram	0.03			0	0.06	0.01	5	0.08	0.03	10	0.05	0.01	9
Klopidogrel	0.01			0	0.03	0.01	4	0.17	0.07	6	0.03	0.01	4
Klozapin	0.01			0			0	0.65	0.52	10	0.09	0.00	4
Ciromazin	0.81	1.72	0.43	2			0	2.34	0.75	8			0
Dajidzein	0.04	5.63	6.54	5			0			0	1.05	1.35	2
Desetilterbutilazin	0.03	0.10	0.03	5			0	0.03		1			0
Desloratadin	0.13	0.13		1			0	0.19	0.04	4			0
Diazinon	0.19			0			0	0.34	0.17	2			0
Didecildimetilamonijum	0.04			0	2.42	1.69	5			0	2.18	1.07	10
Difenokonazol	0.04	0.04		1			0			0			0
Ebastin	0.03			0			0			0	0.05	0.00	3
Epoksikonazol	0.01	0.14	0.05	5	0.04	0.02	0	0.03	0.01	3	0.04	0.00	2
Fenpropimorf	0.13			0			0			0	0.13	0.00	2
Flufenacet	0.09			0	0.31	0.16	5			0	0.13	0.03	6
Genistein	0.04	5.56	7.40	4			0			0			0
Gestoden	0.08			0	0.21		1			0			0
Heksa(metoksimetil)melamin	0.05			0			0			0			0
Heksadeciltrimetilamonium	0.04	1.92	0.05	2	0.34	0.06	5	7.47	1.99	10	0.56	0.27	10
Hidrokortizon	0.48	298.40	96.81	5	284.75	84.14	5	361.89	89.70	10	502.46	273.38	10
Imatinib	0.51	3.46		1			0			0			0
Imidakloprid	0.24	0.39	0.13	5			0			0			0
Irgarol	0.01			0			0	0.09		1			0
Ketoprofen	0.21	2.34	1.22	4	0.38	0.11	2	3.37	2.43	4			0
Laurin dietanolamid	0.09	11.43	3.63	3	1.75	1.50	2	2.25	0.56	4			0

Melperon	0.01			0			0			0	0.04	0.00	2
Metolahlor	0.04	0.08	0.02	5	0.10	0.03	5	0.07	0.03	6			0
Metribuzin	0.04			0			0	0.07		1			0
Mikonazol	0.10			0			0	0.58	0.47	10			0
N,N-Dimetildodecilamin N-oksidi	0.13	3.52	5.01	4	0.43		1	5.07	4.50	10	1.31		1
N-Acetil-4-aminoantipurin	0.09			0			0	0.15	0.05	7			0
N-Butilbenzensulfonamid	0.15	0.26	0.17	3	0.67	0.44	1	5.64	8.71	3			0
N-cikloheksil-2-benzotiazol-amin	0.03			0			0	0.04	0.01	10			0
N-Etil-o-toluensulfonamid	0.10	0.59	0.78	5	0.40	0.31	5	0.34	0.15	10	0.41	0.18	10
Oktokrilin	0.10			0			0	3.76	4.15	4			0
Oktimetoksicinamat	0.64			0			0			0	0.72	0.01	3
Ondansetron	0.03			0			0	0.03		1			0
Oksazepam	0.12			0	0.22		1			0			0
Pirimifos-methyl	0.03	1.43	0.49	5	0.06	0.01	4	0.28	0.12	10	0.08	0.03	4
Protiokonazol-desthio	0.04	0.08	0.02	4	0.05	0.00	1			0			0
Piraklostrobin	0.05			0			0	0.10		1			0
Risperidon	0.04	0.08	0.07	3	0.12	0.07	3			0			0
Sertralin	0.12			0			0	0.84	0.30	10	0.13	0.01	2
Spiroksamin	0.04			0	0.08	0.01	1			0	0.11	0.02	9
Tebukonazol	0.03	2.87	0.52	5	0.03	0.01	3	0.04	0.01	7	0.04	0.01	7
Terbinafin	0.03			0			0	0.04	0.01	2			0
Terbutilazin	0.03	0.74	0.30	5	0.11	0.03	5	0.21	0.11	10	0.07	0.02	10
Terbutrin	0.03			0	0.08	0.02	5	0.22	0.15	10	0.05	0.02	10
Tetraglim	0.13	2.28		1	4.39	4.80	2	7.38	8.12	4	6.26	3.57	8
Tiaklopid	0.84	1.16	0.10	4			0			0			0
Tramadol	0.05			0			0	0.35	0.14	10			0
Tri(butoksietil)fosfat	0.13	0.85	0.64	5	0.70	0.51	2	0.50	0.29	8	0.26	0.16	2
Trifenilfosfat	0.13	4.68	6.43	5	0.13		0	0.71	0.57	3			0
Tris(2-hloroetil)fosfat	0.15	0.49		1			0			0			0

MDL-detekcioni limit. OC-jedinke *C. carpio* žrtvovane nakon donošenja iz ribnjaka, pre kaveznog izlaganja. RL-referentni lokalitet, GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić, sr.vr.- srednja vrednost, SD-standardna devijacija

P8. Koncentracije detektovanih supstanci na lokalitetima od interesa za studiju slučaja Dunav (Preuzeto iz Liška i sar., 2015)

CAS broj	Naziv supstance	Jedinica	Detektovane koncentracije na lokalitetima									
			JDS31	JDS33	JDS36	JDS48	JDS54	JDS60	JDS62	JDS65	JDS66	JDS67
14798-03-9	Ammonium (NH ₄ - N)	mg/L	0	0	0	0.14	0.14	0	0.084	0.075	0	0.1
7440-38-2	Arsenic (As) - dissolved	µg/l	2.3	2.3	2.4	1.5	2	2.4	2.3	2.4	2.3	2.4
7440-43-9	Cadmium (Cd) - dissolved	µg/l	0.028	0.03	0.033	1.1	0.041	0.038	0.04	0.042	0.038	0.039
7440-47-3	Chromium (Cr) - dissolved	µg/l	2.6	0.68	0.86	0.63	0.61	2.2	0.67	0.33	0.39	0.7
7440-50-8	Copper (Cu) - dissolved	µg/l	1.1	1.2	1.3	283	2.9	2.5	2.7	2.8	3.1	2.6
7439-92-1	Lead (Pb) - dissolved	µg/l	0.49	0.52	0.87	0.45	0.23	0.32	0.33	0.71	0.41	0.38
7439-97-6	Mercury (Hg) - dissolved	µg/l	0.0028	0.0025	0	0.0023	0.0051	0.0052	0.0026	0.0041	0.0064	0.0046
7440-02-0	Nickel (Ni) - dissolved	µg/l	9	1.4	2.3	36	1.5	8	1.4	1.7	1.4	1.3
7440-66-6	Zinc (Zn) - dissolved	µg/l	6.3	7.4	8.7	61	1	2.4	1.5	2.9	3.6	2.5
120-12-7	Anthracene	µg/l	0.002	0.0029	0	0	0	0	0	0	0	0
50-32-8	Benzo(a)pyrene	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
205-99-2	Benzo(b)fluoranthene	µg/l	0	0.0024	0	0	0	0	0	0	0	0
191-24-2	Benzo(g,h,i)perylene	µg/l	0.002	0.0031	0.0018	0.0012	0.0015	0.0011	0.0012	0.0018	0.0029	0.0025
207-08-9	Benzo(k)fluoranthene	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
206-44-0	Fluoranthene	µg/l	0.0039	0.0057	0.003	0.0023	0.0022	0	0	0	0.0025	0.002
193-39-5	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	µg/l	0.0031	0	0	0	0.0027	0	0.0021	0	0.0025	0.0024
91-20-3	Naphthalene	µg/l	0.000011	0.02	0.0071	0.0059	0.011	0.016	0.015	0.014	0.012	0.0097
94-75-7	2,4-D	µg/l	0.0013	0.0011	0.0013	0.016	0.004	0.0027	0	0.0023	0.004	0
94-74-6	2-Methyl-4-chlorphenoxy acetic acid (MCPA)	µg/l	0.002	0.0013	0.002	0	0.00019	0.0015	0.0013	0.0015	0.0022	0.0021
834-12-8	Ametryn	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1066-51-9	Aminomethylphosphonic acid (AMPA)	µg/l	0.24	0.27	0.25	0	0.24	0.25	0.23	0.24	0.24	0.26
1912-24-9	Atrazine	µg/l	0.006	0.006	0.007	0.007	0	0.009	0.009	0.006	0.005	0.007
2163-68-0	Atrazine-2-hydroxy	µg/l	0.008	0.007	0.007	0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
6190-65-4	Atrazine-desethyl	µg/l	0.007	0.01	0.009	0.008	0	0.01	0.019	0.008	0.008	0.009
1007-28-9	Atrazine-desisopropyl	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25057-89-0	Bentazone	µg/l	0.005	0.005	0.004	0.02	0.02	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
16118-49-3	Carbetamide	µg/kg	0.0027	0	0.0057	0	0.0014	0.0087	0	0.0018	0.0018	0.0019
1698-60-8	Chloridazon	µg/l	0.0024	0.0026	0.0031	0	0	0	0	0	0	0
1982-47-4	Chloroxuron	µg/kg	0.0071	0.0076	0.0094	0.004	0.0099	0.0069	0.0069	0.0066	0.0057	0.0062
101-21-3	Chlorpropham	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0055
15545-48-9	Chlorotoluron	µg/l	0.0045	0.0021	0.0048	0.0015	0.0047	0.0014	0	0	0.0042	0.019
882-09-7	Clofibric acid	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21725-46-2	Cyanazine (Fortrol)	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

28159-98-0	Cybutryne (Irgarol)	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34205-21-5	Dimefuron	µg/kg	0.021	0.018	0.022	0.011	0.012	0.0055	0.0038	0.0078	0.0076	0.01
87674-68-8	Dimethenamid	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88-85-7	Dinoseb	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1420-07-1	Dinoterb	µg/l	0.004	0.003	0.02	0.01	0.005	0.004	0.003	0.004	0.006	0.003
330-54-1	Diuron	µg/l	0.0017	0.0021	0.0034	0.001	0	0.002	0.0018	0.0018	0.0019	0.0017
30043-49-3	Ethidimuron (Sulfadiazole)	µg/kg	0	0	0.00032	0	0.0013	0	0.00092	0.00031	0	0
26225-79-6	Ethofumesate	µg/kg	0	0.011	0.0098	0	0.026	0	0	0	0	0.0091
1071-83-6	Glyphosate	µg/l	0	0	0	0	0.062	0	0	0	0	0
51235-04-2	Hexazinon	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34123-59-6	Isoproturon	µg/l	0.0006	0.0005	0.0009	0	0	0.0005	0.0005	0.00055	0	0.0004
96639	Lenacil	µg/l	0	0	0.0038	0	0	0	0	0	0	0
330-55-2	Linuron	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0.022	0
93-65-2	Mecoprop (MCP)	µg/l	0	0.0014	0.0012	0	0	0.0012	0	0.0011	0	0.0012
41394-05-2	Metamitron	µg/kg	0	0	0	0	0	0.0017	0.0017	0.0018	0.0017	0.0019
67129-08-2	Metazachlor	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18691-97-9	Methabenzthiazuron	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3060-89-7	Metobromuron	µg/kg	0.01	0.006	0.0077	0.0049	0.0058	0.0052	0	0.0029	0.0046	0.0069
51218-45-2	Metolachlor	µg/l	0.0058	0.011	0.0065	0.004	0.025	0.0049	0.0048	0.0068	0.0056	0.0063
1746-81-2	Monolinuron	µg/kg	0	0	0	0	0.0028	0	0.0034	0.0027	0.0026	0.0027
19937-59-8	Metoxuron	µg/kg	0	0.0032	0.0048	0.0018	0.0017	0.00045	0	0.0019	0	0.0044
7287-19-6	Prometryn	µg/kg	0	0	0	0.0051	0	0	0	0	0	0.0015
139-40-2	Propazine	µg/kg	0.0015	0.0017	0	0.0018	0.0014	0	0	0.0022	0	0
122-34-9	Simazine	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
886-50-0	Terbutryn	µg/l	0.0028	0.0041	0.0032	0	0	0.0025	0	0.0025	0.0016	0.0017
5915-41-3	Terbuthylazine	µg/l	0.0023	0.0024	0	0.0026	0.0022	0	0	0.003	0	0
30125-63-4	Terbuthylazine-desethyl	µg/l	0.007	0.009	0.005	0.007	0.0034	0.007	0.007	0	0	0
135410-20-7	Acetamiprid	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63-25-2	Carbaryl	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0037
333-41-5	Diazinon	µg/l	0	0	0.001	0.005	0	0	0.001	0.001	0.001	0.001
120068-37-3	Fipronil	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106-48-9	4-Chlorophenol	µg/l	0	0		0	0	0	0	0	0	0
131860-33-8	Azoxystrobin	µg/l	0	0		0	0	0	0	0	0	0
10605-21-7	Carbendazim	µg/l	0	0.01	0.01	0	0.02	0	0.007	0	0.007	0.01
85509-19-9	Flusilazole	µg/l	0	0		0	0	0	0	0	0	0
117428-22-5	Picoxystrobin	µg/l	0	0		0	0	0	0	0	0	0
60207-90-1	Propiconazole	µg/l	0	0		0	0	0	0	0	0	0

107534-96-3	Tebuconazol	µg/l	0.002	0.002	0.002	0	0	0.002	0	0	0	0.003
29331-92-8	10,11-Dihydro-10-hydroxycarbamazepine	µg/kg	0	0	0	0.0056	0.001	0	0	0	0	0.0018
58955-93-4	10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine	µg/l	0.036	0.051	0.039	0.075	0.032	0.041	0.043	0.037	0.036	0.046
50-28-2	17-beta Estradiol	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
768-94-5	1-Adamantylamin	µg/l	0	0	0.008	0.09	0.01	0	0	0	0	0
71758-44-6	2-(2-(Chlorophenyl)amino)benzaldehyde	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68011-66-5	2-Hydroxycarbamazepine	µg/l	0	0	0	0.014	0	0	0	0	0	0
2784-73-8	6-Acetylmorphine	µg/kg	0	0	0	0.22	0	0	0	0	0	0
21312-10-7	Acetyl-sulfamethoxazole	µg/l	0	0	0	0.04	0	0	0	0	0	0
71195-58-9	Alfentanil	µg/kg	0.001	0	0	0	0	0	0.00029	0	0	0
28981-97-7	Alprazolam	µg/kg	0.0022	0.0021	0.0042	0.0068	0.0053	0.0021	0.0033	0.0025	0.002	0.0031
117-96-4	Amidotrizoic acid	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71675-85-9	Amisulpride	µg/l	0.007	0.007	0.005	0	0	0	0	0	0	0
50-48-6	Amitriptyline	µg/kg	0.0029	0.002	0.0036	0.0069	0	0.0022	0	0	0.0023	0
26787-78-0	Amoxicillin	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300-62-9	Amphetamine	µg/kg	0.0005	0.0018	0.00057	0	0	0.011	0.00045	0	0	0
29122-68-7	Atenolol	µg/l	0	0	0	0.02	0	0.02	0	0	0	0
51-55-8	Atropine	µg/kg	0.015	0.012	0.0096	0.002	0.013	0.0093	0.011	0.0084	0.0079	0.0083
519-09-5	Benzoyllecgonine	µg/l	0.0051	0.0024	0.0042	0.0048	0.0036	0.0017	0.0036	0.0026	0.0025	0.0025
63659-18-7	Betaxolol	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41859-67-0	Bezafibrate	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66722-44-9	Bisoprolol	µg/l	0	0	0	0	0.007	0	0	0	0	0
314-40-9	Bromacil	µg/kg	0	0	0.077	0.066	0	0	0	0	0.03	0
1812-30-2	Bromazepam	µg/kg	0	0	0.01	0	0.011	0	0	0	0.012	0
52485-79-7	Buprenorphine	µg/kg	0.011	0.015	0.011	0.0094	0.005	0.0045	0.0043	0.006	0.0032	0.0037
139481-59-7	Candesartan	µg/l	0.02	0.02	0.01	0	0	0.02	0.01	0.01	0.009	0.01
298-46-4	Carbamazepine	µg/l	0.021	0.036	0.022	0.039	0.0062	0.023	0.02	0.023	0.023	0.028
78-44-4	Carisoprodol	µg/kg	0.0023	0.0036	0.0032	0.076	0.012	0	0	0	0	0.0068
83881-51-0	Cetirizine	µg/l	0	2.3	0	0	0	0	0	0	0	0
113-59-7	Chlorprothixene	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81-25-4	Cholic acid	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59729-33-8	Citalopram	µg/kg	0	0	0	0	0.0063	0	0	0	0	0
81103-11-9	Clarithromycin	µg/l	0	0.0012	0.0012	0	0	0.0014	0	0.0013	0	0.0011
1622-61-3	Clonazepam	µg/kg	0	0	0.0032	0	0	0	0	0	0	0
4205-90-7	Clonidine	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5786-21-0	Clozapine	µg/kg	0.06	0.013	0.052	0.0054	0	0	0	0	0	0.0034
76-57-3	Codeine	µg/kg	0.019	0.017	0.015	0.1	0.074	0.057	0.068	0.057	0.057	0.056

483-63-6	Crotamiton	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50-47-5	Desipramine	µg/kg	0.096	0.0055	0.0047	0.004	0.07	0.011	0.016	0.04	0.0095	0.0044
125-71-3	Dextromethorphan (Methorphan)	µg/kg	0.0029	0	0.003	0.0061	0.0031	0	0	0	0	0.0028
439-14-5	Diazepam	µg/kg	0	0.0049	0	0.0043	0	0	0	0	0	0
15307-79-6	Diclofenac	µg/l	0.001	0.0041	0.0038	0.0021	0.0017	0.0049	0.00089	0	0	0.003
71-63-6	Digitoxin	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20830-75-5	Digoxin	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125-28-0	Dihydrocodeine	µg/kg	0.2	0.47	0.35	0.6	0.66	0.25	0.49	0.47	0.33	0.26
58-15-1	Dimethylaminophenazone	µg/l	0	0	0.047	0	0	0	0	0	0	0
58-73-1	Diphenhydramine	µg/kg	0.004	0.0043	0.00074	0.002	0.0017	0.00046	0	0.00085	0.0011	0.00092
113-53-1	Dothiepin	µg/kg	0.0021	0.0023	0.0007	0.01	0.0014	0.0022	0.0022	0.002	0.0016	0.0021
1668-19-5	Doxepin	µg/kg	0	0	0	0	0.0011	0.00095	0	0.0012	0	0
75847-73-3	Enalapril	µg/l	0	0.047	0.0097	0	0	0.012	0	0.066	0	0.09
114-07-8	Erythromycin	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25451-15-4	Felbamate	µg/kg	0.0068	0	0	0.12	0.0006	0.00078	0	0.00052	0	0
49562-28-9	Fenofibrate	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
437-38-7	Fentanyl	µg/kg	0	0	0	0	0.00057	0	0	0.00035	0	0
1622-62-4	Flunitrazepam	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2709-56-0	Flupentixol	µg/kg	0.16	0.14	0.15	0.15	0.12	0.053	0.051	0.053	0.048	0.047
60142-96-3	Gabapentin	µg/l	0.2	0.1	0.1	0	0.07	0.09	0.09	0.06	0.07	0.08
64744-50-9	Gabapentin-lactam	µg/l	0.04	0.04	0.03	0	0	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
52-86-8	Haloperidol	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58-93-5	Hydrochlorothiazide	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125-29-1	Hydrocodone	µg/kg	0.015	0.013	0.011	0.065	0.054	0.042	0.049	0.042	0.041	0.041
466-99-9	Hydromorphone	µg/kg	0.0009	0.00095	0	0	0	0.001	0.0008	0.00093	0	0.00069
50-49-7	Imipramine	µg/kg	0.003	0.0014	0	0	0.0014	0.0014	0.0063	0.0019	0.0013	0.0016
53-86-1	Indometacin	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66108-95-0	Iohexol	µg/l	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0
78649-41-9	Iomeprol	µg/l	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
138402-11-6	Irbesartan	µg/l	0.007	0.007	0.007	0	0	0.009	0.007	0	0.009	0.008
6740-88-1	Ketamine	µg/kg	0	0	0.0012	0.0014	0	0.0012	0.0014	0.0012	0	0.0013
22071-15-4	Ketoprofen	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84057-84-1	Lamotrigine	µg/l	0.06	0.07	0.06	0.06	0.006	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04
58-25-3	Librium (Chlordiazepoxide)	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0027
137-58-6	Lidocaine	µg/kg	0.0038	0.0039	0.0043	0.0039	0.0035	0.0034	0.0034	0.0036	0.0034	0.0034
846-49-1	Lorazepam	µg/kg	0.0068	0.0048	0.0054	0.0021	0	0	0	0	0	0
114798-26-4	Losartan	µg/l	0.008	0.007	0.007	0	0.02	0	0	0	0	0

10262-69-8	Maprotiline	µg/kg	0.00086	0	0.0016	0.0048	0	0.00016	0.000059	0	0.00027	0
2898-12-6	Medazepam	µg/kg	0	0.00021	0	0.0014	0	0	0	0	0.00039	0
61-68-7	Mefenamic acid	µg/l	0	0.001	0.001	0	0	0	0	0	0	0
657-24-9	Metformin	µg/l	0	0.13	0.16	0	0	0.42	0	0.94	0	0.88
113-45-1	Methylphenidate	µg/kg	0.001	0.0012	0.0019	0.0015	0.0011	0.0021	0.0013	0	0.0013	0
56392-14-4	Metroprolol acid	µg/l	0.03	0.03	0.02	0.4	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03
59467-64-0	Midazolam	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0.002	0	0
57-27-2	Morphine	µg/kg	0.0021	0.0021	0	0	0.0021	0.0021	0.002	0.0021	0	0.0019
83-15-8	n-Acetyl-4-aminoantipyrine	µg/l	0.1	0.1	0.11	0.73	0.14	0.16	0.17	0.1	0.09	0.12
42200-33-9	Nadolol	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16590-41-3	Naltrexone	µg/kg	0	0.00058	0	0.0042	0	0	0	0	0	0
22204-53-1	Naproxen	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1672-58-8	N-Formyl-4-aminoantipyrine	µg/l	0.2	0.2	0.1	0.4	0.8	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
146-22-5	Nitrazepam	µg/kg	0	0.01	0.012	0	0	0	0	0	0	0
78715-23-8	Norbuprenorphine	µg/kg	0.0025	0.0025	0.0023	0.014	0.0048	0.0028	0.0094	0.0021	0.0087	0.0092
1088-11-5	Nordiazepam	µg/kg	0.022	0.0085	0.018	0.025	0.039	0.025	0.03	0.024	0.029	0.036
1609-66-1	Norfentanyl	µg/kg	0	0	0	0	0.00082	0.00066	0.0007	0.00077	0.00069	0.00068
72-69-5	Nortriptyline	µg/kg	0.026	0.0036	0.02	0	0.0014	0.0019	0	0.003	0.0016	0.0017
73986-53-5	O-Desmethyltramadol	µg/kg	0.0061	0.006	0.0057	0.0053	0.0045	0.0042	0.0048	0.0044	0.004	0.0045
93413-62-8	O-Desmethylvenlafaxine (Desvenlafaxine)	µg/kg	0.0039	0.0039	0.0026	0.0012	0.00049	0.0028	0.0025	0.0025	0.0024	0.0025
132539-06-1	Olanzapine	µg/kg	0	0.0029	0	0	0.0076	0.0023	0.0015	0.0014	0.0022	0.0026
315-72-0	Opipramol	µg/kg	0	0	0.0035	0.11	0	0.0029	0.0066	0	0.059	0.032
604-75-1	Oxazepam	µg/l	0.0079	0.0052	0.0066	0.0048	0	0.0043	0.0025	0.0041	0.0035	0.0028
28721-07-5	Oxcarbazequine	µg/kg	0	0	0	0.0059	0.0016	0	0	0	0	0
76-42-6	Oxycodone	µg/kg	0.0057	0.0029	0.005	0.0061	0.0042	0	0	0.0023	0	0
76-41-5	Oxymorphone	µg/kg	0	0.0032	0	0	0.0032	0	0.0034	0.0031	0.004	0
144598-75-4	Paliperidone (9-Hydroxyrisperidone)	µg/kg	0	0.0008	0.00098	0	0	0	0	0	0	0
61869-08-7	Paroxetine	µg/kg	0	0.0028	0.0035	0.0094	0.0011	0.001	0.0017	0.0007	0.001	0
76-74-4	Pentobarbital	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6493-05-6	Pentoxifylline	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62-44-2	Phenacetin	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60-80-0	Phenazone	µg/l	0.01	0.01	0.007	0.05	0.02	0.009	0.009	0.008	0.007	0.007
122-09-8	Phentermine	µg/kg	0.0033	0	0	0	0	0	0.0012	0	0	0
1893-33-0	Pipamperone	µg/kg	0.008	0	0.0019	0	0.0096	0.0042	0.0073	0.0036	0.0089	0.0052
2955-38-6	Prazepam	µg/kg	0.011	0.016	0.011	0.034	0.011	0.014	0.012	0.006	0.01	0.008
148553-50-8	Pregabalin	µg/l	0	0.008	0.006	0	0	0	0	0	0	0
125-33-7	Primidone	µg/kg	0.69	0.61	0.56	0.11	0.0025	0.0018	0.28	0.25	0.47	0.16

60-87-7	Promethazine	µg/kg	0	0.0073	0.0068	0.0071	0	0.0098	0	0	0.0072	0.0071
54063-53-5	Propafenone	µg/kg	0.0023	0.0019	0.0018	0	0	0	0	0	0	0.0033
469-62-5	Propoxyphene (Dextropropoxyphene)	µg/kg	0	0	0.000059	0	0	0	0	0	0	0
525-66-6	Propranolol	µg/l	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0
479-92-5	Propyphenazone	µg/l	0.003	0.002	0	0.006	0	0.001	0	0.001	0	0.002
70-55-3	p-Toluenesulfonamide	µg/l	0	0.032	0.024	0	0	0.056	0	0.046	0	0.046
111974-69-7	Quetiapine	µg/kg	0	0	0	0	0.0002	0.0002	0	0.00021	0.00016	0.00017
124495-18-7	Quinoxifen	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106266-06-2	Risperidone	µg/kg	0	0	0	0.0017	0.002	0	0.0016	0	0	0
19395-41-6	Ritalinic acid	µg/kg	0.00067	0.0014	0.002	0.00022	0.00016	0.0038	0	0.0017	0.0025	0.0022
80214-83-1	Roxithromycin	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69-72-7	Salicylic acid	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0022
76-73-3	Secobarbital	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79617-96-2	Sertraline	µg/kg	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0
3930-20-9	Sotalol	µg/l	0	0	0	0.04	0	0	0	0	0	0
57-68-1	Sulfadimidin / Sulfamethazin	µg/l	0	0	0	0	0	1.8	0	0	0	0
723-46-6	Sulfamethoxazole	µg/l	0.012	0.013	0.011	0.04	0.017	0.02	0.015	0.015	0.016	0.021
144-83-2	Sulfapyridine	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0.0032	0	0
15676-16-1	Sulpirid	µg/l	0.01	0.02	0.01	0.08	0	0.01	0	0	0.009	0
144701-48-4	Telmisartan	µg/l	0.02	0.04	0.04	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
846-50-4	Temazepam	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97240-79-4	Topiramate	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27203-92-5	Tramadol	µg/l	0.02	0.022	0.021	0	0	0.018	0.024	0.014	0.012	0.015
19794-93-5	Trazodone	µg/kg	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0	0	0	0	0
28911-01-5	Triazolam	µg/kg	0.0015	0.0012	0.00094	0	0	0	0	0	0	0
738-70-5	Trimethoprim	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
739-71-9	Trimipramine	µg/kg	0.24	0.33	0.033	0.15	0.27	0.18	0.27	0.38	0.3	0.28
137862-53-4	Valsartan	µg/l	0.02	0.02	0.01	0	0.04	0.01	0.01	0	0	0.01
164265-78-5	Valsartan acid	µg/l	0.1	0.1	0.09	0	0.2	0.07	0.08	0.06	0.06	0.07
93413-69-5	Venlafaxine	µg/kg	0.0015	0.0016	0.0014	0.0004	0	0.0006	0.0006	0.0006	0.0005	0.0006
52-53-9	Verapamil	µg/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82626-48-0	Zolpidem	µg/kg	0	0.0019	0	0.0017	0.0017	0.0017	0	0.0017	0.0017	0
43200-80-2	Zopiclone	µg/kg	0.0065	0.0063	0.0071	0.0045	0	0	0.0019	0.002	0	0.0024
95-14-7	1H-Benzotriazole	µg/l	0.3	0.3	0.28	0.0015	0.024	0.27	0.24	0.25	0.24	0.26
1241-94-7	2-Ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDP)	µg/l	0	0	0	0	0	0.0012	0	0	0	0
120-18-3	2-Naphthalenesulfonic acid	µg/l	0	0.0025	0	0	0	0.003	0	0.0062	0	0.0052
136-85-6	5-Methyl-1H-benzotriazole	µg/l	0.036	0.071	0.037	0.0095	0.021	0.08	0.071	0.057	0.052	0.077

95-16-9	Benzothiazole	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104-40-5	Nonylphenol (4-Nonylphenol)	µg/l	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0
100-02-7	p-Nitrophenol	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
143-24-8	Tetraglyme	µg/l	0	0.037	0.038	0	0	0.021	0	0.034	0	0.03
29385-43-1	Tolyltriazol (mix of isomers)	µg/l	0.3	0.3	0.3	0	0	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
112-49-2	Triglyme	µg/l	0	0.011	0	0	0	0.0081	0	0.0076	0	0.0093
126-71-6	Triisobutyl phosphate (TIBP)	µg/l	0.019	0.03	0.023	0.0025	0.015	0.025	0.022	0.0068	0.027	0.027
126-73-8	Tri-n-butyl phosphate (TnBP)	µg/l	0.0046	0.00042	0.0024	0.0029	0.0024	0.0014	0.0042	0.0059	0.0068	0.0082
115-86-6	Triphenyl phosphate (TPT)	µg/l	0.00074	0.00074	0	0	0.0058	0.00074	0.00064	0	0.0038	0.0017
791-28-6	Triphenylphosphine oxide	µg/l	0	0.1	0.057	0	0	0.039	0	0.075	0	0.14
13674-87-8	Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate (TDCPP)	µg/l	0.011	0.012	0.0092	0.0075	0.0039	0.011	0.0098	0.0098	0.0088	0.015
78-51-3	Tris(2-butoxyethyl)phosphate (TBEP)	µg/l	0	0.0076	0	0	0	0.0052	0	0.006	0.0053	0.01
115-96-8	Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP)	µg/l	0.0096	0.0081	0.0069	0.01	0.015	0.0081	0.0048	0.0094	0.0081	0.021
1330-78-5	Tris(methylphenyl)phosphate (TMPP)	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1002-53-5	Dibutyltin-cation	µg/l	0	0.00044	0.00023	0	0	0	0	0	0	0
1135-99-5	Diphenyltin-cation	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36643-28-4	Tributyltin-cation	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
668-34-8	Triphenyltin-cation	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1461-25-2	Tetrabutyltin	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51-28-5	2,4-Dinitrophenol (DNP)	µg/l	0.03	0.04	0.03	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
131-57-7	Benzophenone-3	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4065-45-6	Benzophenone-4	µg/l	0	0.015	0.012	0	0	0.014	0	0.013	0	0.014
80-05-7	Bisphenol A	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80-09-1	Bisphenol S	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0.14	0
58-08-2	Caffeine	µg/l	0.076	0.076	0.17	0.24	0.14	0.25	0.1	0.1	0.14	0.094
120-32-1	Chlorophene	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.4
486-56-6	Cotinine	µg/l	0.017	0.024	0.031	0.03	0.03	17	0.037	6.1	0.038	15
117-81-7	Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	µg/l	0	0	0	0	0.35	0.26	0	0	0	0.23
446-72-0	Genistein	µg/l	0	0.018	0.0051	0	0	0	0	0	0	0
134-62-3	N,N-Diethyl-m-toluamid (DEET)	µg/l	0.0095	0.002	0.0088	0.014	0.0066	0.0093	0.0082	0.0093	0.0095	0.017
54-11-5	Nicotine	µg/kg	0.13	0.14	0.1	0	0.021	0.038	0.065	0.063	0.11	0.073
375-95-1	Perfluoronanoate (PFNA)	µg/l	0.0013	0.00073	0.00095	0	0.00093	0.003	0.0029	0.0031	0.003	0.0033
1763-23-1	Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)	µg/l	0.0063	0.013	0.0052	0.0037	0.008	0.0054	0.005	0.0057	0.0069	0.0069
335-67-1	Perfluorooctanoic acid (PFOA)	µg/l	0.0052	0.012	0.012	0.0018	0.0029	0.0044	0.0051	0.005	0.0043	0.0064
27503-81-7	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	µg/l	0	0.015	0.013	0	0	0.012	0	0.015	0	0.016

81-07-2	Saccharin	µg/l	0.08	0.08	0.06	0	0.3	0.09	0.06	0.06	0.08	0.07
3380-34-5	Triclosan	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77-93-0	Triethyl citrate	µg/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

II Toksični pritisak

P9. Hronični toksični pritisak na lokalitetu Bezdán (zaštićena zona) tokom 2017. godine na osnovu podataka preuzetih iz SEPA, 2018

Supstanca $\mu\text{g/L}$	NOEC $\mu\text{g/L}$	Jan.	Feb.	Mart	Apr.	Maj	Jun	Jul	Avg.	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	Sr. vr. TUch
		TUch												
NH ₄ N	5248	1.91x10 ⁻²	1.52x10 ⁻²	1.91x10 ⁻²	3.81x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³					9.53x10 ⁻³	9.77x10 ⁻³
Fe diss	1100	6.82x10 ⁻²	1.64x10 ⁻²	3.73x10 ⁻²	1.33x10 ⁻¹	4.00x10 ⁻²	2.73x10 ⁻²	3.09x10 ⁻²	9.00x10 ⁻²	1.36x10 ⁻²	1.64x10 ⁻²	7.00x10 ⁻²	3.36x10 ⁻²	4.80x10 ⁻²
Mn diss	3170		5.68x10 ⁻³		1.20x10 ⁻²		4.73x10 ⁻³	6.31x10 ⁻³	7.26x10 ⁻³	1.17x10 ⁻²	5.99x10 ⁻³	3.47x10 ⁻³		7.14x10 ⁻³
Zn diss	1862	2.92x10 ⁻²	2.74x10 ⁻²	1.63x10 ⁻²	1.70x10 ⁻²		2.21x10 ⁻²	2.57x10 ⁻²	2.17x10 ⁻²	1.90x10 ⁻²	1.53x10 ⁻²	1.41x10 ⁻²	2.12x10 ⁻²	2.08x10 ⁻²
Cu diss	27		3.44x10 ⁻¹	1.70x10 ⁻¹	3.89x10 ⁻¹	2.78x10 ⁻¹	1.78x10 ⁻¹	5.04x10 ⁻¹	1.52x10 ⁻¹	1.89x10 ⁻¹	1.70x10 ⁻¹	1.96x10 ⁻¹	3.30x10 ⁻¹	2.64x10 ⁻¹
Cr Total diss	773		6.47x10 ⁻⁴	9.06x10 ⁻⁴	9.06x10 ⁻⁴		7.76x10 ⁻⁴		1.03x10 ⁻³	1.81x10 ⁻³	1.16x10 ⁻³			1.03x10 ⁻³
Pb diss	353				1.70x10 ⁻³		1.42x10 ⁻³		1.98x10 ⁻³		1.42x10 ⁻³	1.70x10 ⁻³		1.64x10 ⁻³
Cd diss	49			4.08x10 ⁻⁴	6.12x10 ⁻⁴		6.12x10 ⁻⁴		8.16x10 ⁻⁴		1.02x10 ⁻³	6.12x10 ⁻⁴	6.12x10 ⁻⁴	6.71x10 ⁻⁴
Ni Diss	190	1.88x10 ⁻¹	2.47x10 ⁻²	1.16x10 ⁻²	1.11x10 ⁻²	1.32x10 ⁻²	1.84x10 ⁻²	1.08x10 ⁻¹	4.16x10 ⁻²	3.00x10 ⁻²	1.37x10 ⁻²	1.58x10 ⁻²	1.16x10 ⁻²	4.07x10 ⁻²
Al diss	634	8.68x10 ⁻²	3.63x10 ⁻²		1.75x10 ⁻¹	8.04x10 ⁻²	5.99x10 ⁻²	3.15x10 ⁻²	1.04x10 ⁻¹	5.99x10 ⁻²		1.04x10 ⁻¹	4.57x10 ⁻²	7.84x10 ⁻²
B diss	14009	1.86x10 ⁻³	1.93x10 ⁻³		1.36x10 ⁻³			1.57x10 ⁻³	1.43x10 ⁻³	3.85x10 ⁻³	1.86x10 ⁻³	1.28x10 ⁻³	1.36x10 ⁻³	1.83x10 ⁻³
Co diss	55	2.00x10 ⁻²	2.18x10 ⁻²	2.18x10 ⁻²	1.45x10 ⁻²	9.09x10 ⁻³								1.75x10 ⁻²
As diss	248	3.63x10 ⁻³	4.44x10 ⁻³	4.03x10 ⁻³	5.65x10 ⁻³	6.45x10 ⁻³	7.26x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	6.85x10 ⁻³		1.01x10 ⁻²	5.65x10 ⁻³	5.65x10 ⁻³	5.98x10 ⁻³
Benzo (a) piren	3	6.67x10 ⁻⁴												6.67x10 ⁻⁴
Benzo (g,h,i) perilen	21	9.52x10 ⁻⁵												9.52x10 ⁻⁵
Benzo (b) fluoranten	1	3.00x10 ⁻³	2.00x10 ⁻³											2.50x10 ⁻³
Benzo (k) fluoranten	1	3.00x10 ⁻³												3.00x10 ⁻³
Fluoranten	30	1.67x10 ⁻⁴	3.33x10 ⁻⁵											1.00x10 ⁻⁴
Ideno (1,2,3-c,d) pien	1	2.00x10 ⁻³												2.00x10 ⁻³
Para tert oktilfenol	55		7.27x10 ⁻⁵			1.82x10 ⁻⁵	2.04x10 ⁻³		2.73x10 ⁻⁴				7.27x10 ⁻⁵	4.95x10 ⁻⁴
Atrazin	90		1.11x10 ⁻⁵	2.22x10 ⁻⁵	2.22x10 ⁻⁵				7.78x10 ⁻⁵				4.44x10 ⁻⁵	3.56x10 ⁻⁵
Desetilatratin	3		3.33x10 ⁻⁴		3.33x10 ⁻⁴								1.33x10 ⁻³	6.67x10 ⁻⁴
Desetiltributilazin	9			1.11x10 ⁻⁴	1.11x10 ⁻⁴		1.11x10 ⁻⁴	2.22x10 ⁻⁴	4.44x10 ⁻⁴				2.22x10 ⁻⁴	2.04x10 ⁻⁴
Terbutilazin	207				9.66x10 ⁻⁶	9.66x10 ⁻⁶	4.35x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁵	3.38x10 ⁻⁵	4.83x10 ⁻⁶			9.66x10 ⁻⁶	1.79x10 ⁻⁵
Metolahlor	140			5.71x10 ⁻⁵	5.71x10 ⁻⁵	1.43x10 ⁻⁵	7.86x10 ⁻⁵	1.43x10 ⁻⁵					7.86x10 ⁻⁵	5.00x10 ⁻⁵
Izoproturon	11			6.36x10 ⁻⁴	9.0x10 ⁻⁵									3.64x10 ⁻⁴

P10. Hronični toksični pritisak na lokalitetu Bezdan (zaštićena zona) tokom 2018. godine na osnovu podataka preuzetih iz SEPA, 2019

Supstanca µg/L	NOEC µg/L	Jan.	Feb.	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avg.	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	Sr. vr. TUCH
		TUCH												
NH4N	5248	1.33x10 ⁻²	1.14x10 ⁻²	9.53x10 ⁻³					9.53x10 ⁻³		3.81x10 ⁻³	5.72x10 ⁻³	1.71x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²
Fe diss	1100	8.18x10 ⁻²	2.73x10 ⁻²	5.27x10 ⁻²	1.03x10 ⁻¹	1.43x10 ⁻¹	9.91x10 ⁻²	1.74x10 ⁻¹	7.91x10 ⁻²	3.18x10 ⁻²	3.36x10 ⁻²	1.55x10 ⁻²	3.18x10 ⁻²	7.27x10 ⁻²
Mn diss	3170	5.36x10 ⁻³		3.15x10 ⁻³		4.42x10 ⁻³	1.04x10 ⁻²	5.36x10 ⁻³	3.47x10 ⁻³		5.99x10 ⁻³			5.45x10 ⁻³
Zn diss	1862	8.70x10 ⁻²	1.18x10 ⁻²	3.01x10 ⁻²	1.66x10 ⁻²	2.04x10 ⁻²	4.83x10 ⁻²	5.94x10 ⁻²	1.07x10 ⁻¹	2.57x10 ⁻²	3.67x10 ⁻²	1.14x10 ⁻¹	7.73x10 ⁻³	4.71x10 ⁻²
Cu diss	27	2.27	5.19x10 ⁻¹	1.50	4.26x10 ⁻¹	4.70x10 ⁻¹	4.78x10 ⁻¹	2.78x10 ⁻¹	1.18	3.63x10 ⁻¹	2.37x10 ⁻¹	4.00x10 ⁻¹	1.74x10 ⁻¹	6.92x10 ⁻¹
Cr Total diss	773			1.16x10 ⁻³				2.85x10 ⁻³	7.76x10 ⁻⁴	1.03x10 ⁻³		7.76x10 ⁻⁴		1.32x10 ⁻³
Pb diss	353							2.83x10 ⁻³						2.83x10 ⁻³
Cd diss	49	8.16x10 ⁻⁴	6.12x10 ⁻⁴	6.12x10 ⁻⁴	8.16x10 ⁻⁴			6.12x10 ⁻⁴	4.08x10 ⁻⁴	4.08x10 ⁻⁴		4.08x10 ⁻⁴		5.87x10 ⁻⁴
Ni Diss	190	5.79x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²	1.58x10 ⁻²			1.95x10 ⁻²	2.32x10 ⁻²	6.32x10 ⁻²	1.11x10 ⁻²	2.63x10 ⁻²	7.37x10 ⁻²	5.26x10 ⁻³	3.06x10 ⁻²
Al diss	634	8.52x10 ⁻²	3.47x10 ⁻¹					1.48x10 ⁻¹	8.83x10 ⁻²	3.00x10 ⁻²	2.84x10 ⁻²	2.05x10 ⁻²	2.37x10 ⁻²	9.64x10 ⁻²
B diss	14009	1.57x10 ⁻³	1.71x10 ⁻³					1.36x10 ⁻³	2.71x10 ⁻³	2.14x10 ⁻³	1.50x10 ⁻³	1.50x10 ⁻³	1.50x10 ⁻³	1.75x10 ⁻³
Co diss	55	4.00x10 ⁻²	1.45x10 ⁻²											2.73x10 ⁻²
As diss	248	7.26x10 ⁻³	5.65x10 ⁻³		4.44x10 ⁻³	9.27x10 ⁻³	8.87x10 ⁻³	8.06x10 ⁻³	7.26x10 ⁻³	8.06x10 ⁻³	7.66x10 ⁻³	5.65x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	7.11x10 ⁻³
Benzo (a) piren	3				1.67x10 ⁻³	1.67x10 ⁻³								1.67x10 ⁻³
Benzo (g,h,i) perilen	21				1.90x10 ⁻⁴	1.90x10 ⁻⁴								1.90x10 ⁻⁴
Benzo (b) fluoranten	1				4.00x10 ⁻³	4.00x10 ⁻³								4.00x10 ⁻³
Benzo (k) fluoranten	1				4.00x10 ⁻³	4.00x10 ⁻³								4.00x10 ⁻³
Fluoranten	30					3.33x10 ⁻⁵								3.33x10 ⁻⁵
Ideno (1,2,3-c,d) pien	1				5.00x10 ⁻³	5.00x10 ⁻³								5.00x10 ⁻³
Bisfenol A	170			5.00x10 ⁻⁴			4.71x10 ⁻⁵	2.00x10 ⁻⁴	1.18x10 ⁻⁴	9.41x10 ⁻⁵				1.92x10 ⁻⁴
Para tert oktilfenol	55		1.82x10 ⁻⁵		3.64x10 ⁻⁵	1.64x10 ⁻⁴	4.00x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁵		2.91x10 ⁻⁴	3.64x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁴	5.45x10 ⁻⁵	1.29x10 ⁻⁴
4 nonilfenol	20					4.00x10 ⁻⁴								4.00x10 ⁻⁴
Atrazin	90			4.44x10 ⁻⁵	1.00x10 ⁻⁴	2.22x10 ⁻⁵	3.33x10 ⁻⁵	4.44x10 ⁻⁵	4.44x10 ⁻⁵	4.44x10 ⁻⁵		3.33x10 ⁻⁵		4.58x10 ⁻⁵
Desetilatrazin	3				4.33x10 ⁻³	1.00x10 ⁻³								2.67x10 ⁻³
Desetilterbutilazin	9			2.22x10 ⁻⁴	4.44x10 ⁻⁴	3.33x10 ⁻⁴	5.56x10 ⁻⁴	6.67x10 ⁻⁴	7.78x10 ⁻⁴	4.44x10 ⁻⁴		3.33x10 ⁻⁴		4.72x10 ⁻⁴
Terbutilazin	207			9.66x10 ⁻⁶	1.93x10 ⁻⁵	1.93x10 ⁻⁵	5.80x10 ⁻⁵	4.83x10 ⁻⁵	3.38x10 ⁻⁵	1.93x10 ⁻⁵		1.93x10 ⁻⁵		2.84x10 ⁻⁵
Metolahlor	140	2.86x10 ⁻⁵		1.07x10 ⁻⁴	2.71x10 ⁻⁴	8.57x10 ⁻⁵	1.93x10 ⁻⁴	1.21x10 ⁻⁴	5.00x10 ⁻⁵	5.00x10 ⁻⁵	2.14x10 ⁻⁴	2.86x10 ⁻⁵		1.15x10 ⁻⁴
Izoproturon	11	1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴				1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴	2.73x10 ⁻⁴	9.09x10 ⁻⁵		1.82x10 ⁻⁴
Metoksihlor	2	1.00x10 ⁻³	4.00x10 ⁻³											2.50x10 ⁻³

P11. Hronični toksični pritisak na lokalitetu Bogojevo (zaštićena zona) tokom 2017. godine na osnovu podataka preuzetih iz SEPA, 2018

Supstanca µg/L	NOEC µg/L	Februar	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Septembar	Oktobar	Novembar	Decembar	Srednja vrednost TUch
		TUch											
NH4N	5248	1.14x10 ⁻²		5.72x10 ⁻³		3.81x10 ⁻³			7.62x10 ⁻³	1.14x10 ⁻²		9.53x10 ⁻³	8.26x10 ⁻³
Fe diss	1100	5.55x10 ⁻²	3.36x10 ⁻²	3.09x10 ⁻²	2.91x10 ⁻²	1.73x10 ⁻²	2.09x10 ⁻²	5.00x10 ⁻²	4.69x10 ⁻¹	1.23x10 ⁻¹	2.64x10 ⁻²	1.73x10 ⁻²	7.93x10 ⁻²
Mn diss	3170	4.10x10 ⁻³	6.31x10 ⁻³	3.79x10 ⁻³				5.36x10 ⁻³	1.10x10 ⁻²	7.57x10 ⁻³	2.64x10 ⁻²		9.22x10 ⁻³
Zn diss	1862	1.61x10 ⁻²			1.91x10 ⁻²	1.66x10 ⁻²	2.91x10 ⁻²	1.90x10 ⁻²			4.73x10 ⁻³	5.83x10 ⁻²	2.33x10 ⁻²
Cu diss	27	1.96x10 ⁻¹	1.48x10 ⁻¹	2.26x10 ⁻¹	2.70x10 ⁻¹	1.93x10 ⁻¹	2.11x10 ⁻¹	3.04x10 ⁻¹	6.26x10 ⁻¹	2.70x10 ⁻¹		5.67x10 ⁻¹	3.01x10 ⁻¹
Cr Total diss	773								1.16x10 ⁻³		3.78x10 ⁻¹		1.89x10 ⁻¹
Pb diss	353					2.55x10 ⁻³			3.97x10 ⁻³		9.06x10 ⁻⁴		2.47x10 ⁻³
Cd diss	49	6.12x10 ⁻⁴					4.08x10 ⁻⁴	4.08x10 ⁻⁴		6.12x10 ⁻⁴		1.22x10 ⁻³	6.53x10 ⁻⁴
Ni Diss	190	1.21x10 ⁻²	9.47x10 ⁻³	1.00x10 ⁻²	1.37x10 ⁻²	2.74x10 ⁻²	1.28x10 ⁻¹	8.00x10 ⁻²	2.53x10 ⁻²	3.63x10 ⁻²		2.37x10 ⁻²	3.66x10 ⁻²
Al diss	634	8.99x10 ⁻²	7.89x10 ⁻²	4.42x10 ⁻²	5.84x10 ⁻²	2.05x10 ⁻²	2.68x10 ⁻²	6.62x10 ⁻²	5.17x10 ⁻¹	1.36x10 ⁻¹	2.63x10 ⁻²	2.21x10 ⁻²	9.88x10 ⁻²
B diss	14009	1.57x10 ⁻³				1.07x10 ⁻³	1.64x10 ⁻³	1.14x10 ⁻³	8.57x10 ⁻⁴	1.36x10 ⁻³	3.00x10 ⁻²	1.36x10 ⁻³	4.87x10 ⁻³
Co diss	55	2.18x10 ⁻²	1.82x10 ⁻²	9.09x10 ⁻³					9.09x10 ⁻³		1.14x10 ⁻³		1.19x10 ⁻²
As diss	248	4.44x10 ⁻³	4.03x10 ⁻³	4.03x10 ⁻³	3.23x10 ⁻³	4.44x10 ⁻³	7.26x10 ⁻³	6.45x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	6.45x10 ⁻³		5.24x10 ⁻³	5.16x10 ⁻³
Bisfenol A	170								7.65x10 ⁻⁵		4.44x10 ⁻³		2.26x10 ⁻³
Para tert oktilfenol	55				3.64x10 ⁻⁵	3.64x10 ⁻⁵				5.45x10 ⁻⁵	3.53x10 ⁻⁵		4.06x10 ⁻⁵
Atrazin	90					4.44x10 ⁻⁵			1.11x10 ⁻⁵	4.44x10 ⁻⁵			3.33x10 ⁻⁵
Terbutrin	16								6.25x10 ⁻⁵		3.33x10 ⁻⁵		4.79x10 ⁻⁵
Prometrin	108								1.85x10 ⁻⁵				1.85x10 ⁻⁵
Desetilatrazin	3					6.67x10 ⁻⁴			6.67x10 ⁻⁴		2.78x10 ⁻⁵		4.54x10 ⁻⁴
Desetilterbutilazine	9				2.22x10 ⁻⁴	7.78x10 ⁻⁴			2.22x10 ⁻⁴		1.00x10 ⁻³		5.56x10 ⁻⁴
Terbutilazin	207				2.42x10 ⁻⁵	8.70x10 ⁻⁵			4.83x10 ⁻⁶		2.22x10 ⁻⁴		8.45x10 ⁻⁵
Acetohlor	165								1.21x10 ⁻⁵		9.66x10 ⁻⁶		1.09x10 ⁻⁵
Metolahlor	140			5.00x10 ⁻⁵	1.14x10 ⁻⁴	1.71x10 ⁻⁴							1.12x10 ⁻⁴
Izoproturon	11			9.09x10 ⁻⁵	1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴			9.09x10 ⁻⁵	1.82x10 ⁻⁴	3.57x10 ⁻⁵		1.27x10 ⁻⁴

P12. Hronični toksični pritisak na lokalitetu Bogojevo (zaštićena zona) tokom 2018. godine na osnovu podataka preuzetih iz SEPA, 2019

Supstanca $\mu\text{g/L}$	NOEC $\mu\text{g/L}$	Jan.	Feb.	3. apr.	12. apr.	Maj	Jun	Jul	Avg.	Sept.	Okt.	Nov.	Dec.	Sr. vr. T _{Uch}
		T _{Uch}												
NH₄N	5248	1.33x10 ⁻²	1.33x10 ⁻²	3.81x10 ⁻³	5.72x10 ⁻³		3.81x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³	1.71x10 ⁻²	1.14x10 ⁻²	1.33x10 ⁻²	8.49x10 ⁻³
Fe diss	1100	3.00x10 ⁻²			5.18x10 ⁻²	1.04x10 ⁻¹	1.45x10 ⁻¹	2.46x10 ⁻¹	2.45x10 ⁻²	3.36x10 ⁻²	3.55x10 ⁻²	2.55x10 ⁻²	2.64x10 ⁻²	7.23x10 ⁻²
Mn diss	3170	3.47x10 ⁻³				5.68x10 ⁻³	5.05x10 ⁻³	7.89x10 ⁻³	4.42x10 ⁻³	7.57x10 ⁻³	5.36x10 ⁻³	3.15x10 ⁻³	4.42x10 ⁻³	5.22x10 ⁻³
Zn diss	1862				1.22x10 ⁻²	5.21x10 ⁻³	1.44x10 ⁻¹	1.10x10 ⁻¹	6.50x10 ⁻²	2.02x10 ⁻¹	7.04x10 ⁻²	4.62x10 ⁻²	8.11x10 ⁻²	8.17x10 ⁻²
Cu diss	27	6.63x10 ⁻¹		1.67x10 ⁻¹	1.70x10 ⁻¹	1.22x10 ⁻¹	4.96x10 ⁻¹	1.65	4.67x10 ⁻¹	6.85x10 ⁻¹	2.81x10 ⁻¹	3.78x10 ⁻¹	9.11x10 ⁻¹	5.44x10 ⁻¹
Cr Total diss	773			2.85x10 ⁻³	9.06x10 ⁻⁴	7.76x10 ⁻⁴	6.47x10 ⁻⁴	1.03x10 ⁻³				9.06x10 ⁻⁴		1.19x10 ⁻³
Cd diss	49	8.16x10 ⁻⁴			4.08x10 ⁻⁴					8.16x10 ⁻⁴				6.80x10 ⁻⁴
Ni diss	190	1.11x10 ⁻²	1.47x10 ⁻²	1.11x10 ⁻²	5.26x10 ⁻³	4.26x10 ⁻²	3.95x10 ⁻²	8.42x10 ⁻²			3.68x10 ⁻²	2.26x10 ⁻²	1.47x10 ⁻²	2.83x10 ⁻²
Al diss	634	4.73x10 ⁻²			8.83x10 ⁻²	1.55x10 ⁻¹	2.11x10 ⁻¹	3.28x10 ⁻¹	2.52x10 ⁻²	3.47x10 ⁻²	3.15x10 ⁻²	2.37x10 ⁻²		1.05x10 ⁻¹
B diss	14009				1.14x10 ⁻³	1.28x10 ⁻³	8.57x10 ⁻⁴	9.28x10 ⁻⁴	1.07x10 ⁻³	2.14x10 ⁻³		2.21x10 ⁻³	9.99x10 ⁻⁴	1.33x10 ⁻³
Co diss	55	1.27x10 ⁻²												1.27x10 ⁻²
As diss	248	4.84x10 ⁻³		4.03x10 ⁻³	6.45x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	8.87x10 ⁻³	7.66x10 ⁻³	8.06x10 ⁻³	1.37x10 ⁻²	6.85x10 ⁻³	6.85x10 ⁻³	4.84x10 ⁻³	7.11x10 ⁻³
Benzo (a) piren	3						1.33x10 ⁻³							1.33x10 ⁻³
Benzo (g,h,i) perilen	21						9.52x10 ⁻⁵		4.76x10 ⁻⁵					7.14x10 ⁻⁵
Benzo (b) fluoranten	1						3.00x10 ⁻³		1.40x10 ⁻²					8.50x10 ⁻³
Benzo (k) fluoranten	1						2.00x10 ⁻³		9.00x10 ⁻³					5.50x10 ⁻³
Fluoranten	30								1.37x10 ⁻³					1.37x10 ⁻³
Ideno (1,2,3-c,d) piren	1						3.00x10 ⁻³		1.10x10 ⁻²					7.00x10 ⁻³
Bisfenol A	170												4.12x10 ⁻⁵	4.12x10 ⁻⁵
Para tert octilfenol	55									1.73x10 ⁻³				1.73x10 ⁻³
4 nonilfenol	20				1.65x10 ⁻³									1.65x10 ⁻³
Atrazin	90		5.56x10 ⁻⁵	6.67x10 ⁻⁵	4.44x10 ⁻⁵	8.89x10 ⁻⁵	3.33x10 ⁻⁵	2.22x10 ⁻⁵	3.33x10 ⁻⁵					4.92x10 ⁻⁵
Terbutrin	16								3.13x10 ⁻⁴	3.75x10 ⁻⁴				3.44x10 ⁻⁴
Desetiltrazin	3		1.67x10 ⁻³	6.67x10 ⁻⁴	1.00x10 ⁻³									1.11x10 ⁻³
Desetiltributilazin	9		5.56x10 ⁻⁴	3.33x10 ⁻⁴	4.44x10 ⁻⁴	2.56x10 ⁻³	4.44x10 ⁻⁴	2.22x10 ⁻⁴	4.44x10 ⁻⁴	5.56x10 ⁻⁴		4.44x10 ⁻⁴	3.33x10 ⁻⁴	6.33x10 ⁻⁴
Terbutilazin	207		2.42x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁵	1.93x10 ⁻⁵	2.51x10 ⁻⁴	3.38x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁵	3.38x10 ⁻⁵	2.90x10 ⁻⁵	4.83x10 ⁻⁶	1.93x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁵	4.17x10 ⁻⁵
Metolahlor	140		7.14x10 ⁻⁵	1.43x10 ⁻⁴	5.00x10 ⁻⁵	7.86x10 ⁻⁴	7.86x10 ⁻⁵	2.14x10 ⁻⁵	7.14x10 ⁻⁶	8.57x10 ⁻⁵	7.14x10 ⁻⁶	4.29x10 ⁻⁵	2.14x10 ⁻⁵	1.19x10 ⁻⁴
Izoproturon	11		1.82x10 ⁻⁴		9.09x10 ⁻⁵	9.09x10 ⁻⁵		1.82x10 ⁻⁴	9.09x10 ⁻⁵	2.73x10 ⁻⁴		1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴	1.59x10 ⁻⁴

P13. Hronični toksični pritisak na lokalitetu Novi Sad (gradska zona) tokom 2017. godine na osnovu podataka preuzetih iz SEPA, 2018

Supstanca µg/L	NOEC µg/L	Februar	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Septembar	Oktobar	Novembar	Decembar	Srednja vrednost TUch
		TUch											
NH4N	5248	1.33x10 ⁻²	5.72x10 ⁻³	5.72x10 ⁻³	7.62x10 ⁻³	1.14x10 ⁻²	1.14x10 ⁻²	1.14x10 ⁻²	1.33x10 ⁻²	5.72x10 ⁻³	7.62x10 ⁻³	1.33x10 ⁻²	9.70x10 ⁻³
Fe diss	1100	2.00x10 ⁻²	2.73x10 ⁻²	1.98x10 ⁻¹	3.73x10 ⁻²	1.18x10 ⁻²	2.82x10 ⁻²	4.64x10 ⁻²	9.55x10 ⁻²	3.36x10 ⁻²	1.82x10 ⁻¹	3.36x10 ⁻²	6.49x10 ⁻²
Mn diss	3170	4.10x10 ⁻³		5.36x10 ⁻³		6.62x10 ⁻³			3.47x10 ⁻³	3.15x10 ⁻³	5.36x10 ⁻³		4.68x10 ⁻³
Zn diss	1862	1.77x10 ⁻³	1.39x10 ⁻²	1.07x10 ⁻²			2.35x10 ⁻²	1.50x10 ⁻²		8.70x10 ⁻³	8.81x10 ⁻³		1.18x10 ⁻²
Cu diss	27	1.37x10 ⁻¹	1.78x10 ⁻¹	1.41x10 ⁻¹	1.59x10 ⁻¹	1.56x10 ⁻¹	2.07x10 ⁻¹	1.85x10 ⁻¹	1.85x10 ⁻¹	1.85x10 ⁻¹	8.15x10 ⁻²	1.52x10 ⁻¹	1.61x10 ⁻¹
Cr Total diss	773	6.47x10 ⁻⁴	6.47x10 ⁻⁴	7.76x10 ⁻⁴			1.68x10 ⁻³				7.76x10 ⁻⁴		9.06x10 ⁻⁴
Pb diss	353		1.98x10 ⁻³	1.70x10 ⁻³					1.42x10 ⁻³	1.70x10 ⁻³	2.27x10 ⁻³		1.81x10 ⁻³
Cd diss	49	4.08x10 ⁻⁴			4.08x10 ⁻⁴		6.12x10 ⁻⁴			6.12x10 ⁻⁴	8.16x10 ⁻⁴		5.71x10 ⁻⁴
Ni Diss	190	1.32x10 ⁻²	1.05x10 ⁻²	8.42x10 ⁻³	9.47x10 ⁻³	1.63x10 ⁻²	1.79x10 ⁻²	8.42x10 ⁻³	1.05x10 ⁻²	8.95x10 ⁻³	1.11x10 ⁻²	5.79x10 ⁻²	1.57x10 ⁻²
Al diss	634	4.26x10 ⁻²	6.78x10 ⁻²	2.10x10 ⁻¹	6.47x10 ⁻²	1.74x10 ⁻²	4.10x10 ⁻²	5.99x10 ⁻²	1.12x10 ⁻¹	4.73x10 ⁻²	2.24x10 ⁻¹	4.10x10 ⁻²	8.43x10 ⁻²
B diss	14009	2.07x10 ⁻³		2.07x10 ⁻³			1.57x10 ⁻³	1.50x10 ⁻³		1.43x10 ⁻³	1.43x10 ⁻³	1.21x10 ⁻³	1.61x10 ⁻³
Co diss	55	2.36x10 ⁻²	2.00x10 ⁻²	1.09x10 ⁻²									1.82x10 ⁻²
As diss	248	5.24x10 ⁻³	4.84x10 ⁻³	4.84x10 ⁻³	4.44x10 ⁻³	4.44x10 ⁻³	7.26x10 ⁻³	8.06x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	6.85x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	4.84x10 ⁻³	5.72x10 ⁻³
Bisphenol A	170							1.59x10 ⁻⁴	1.06x10 ⁻⁴		3.53x10 ⁻⁵		1.00x10 ⁻⁴
Para tert octylphenol	55			3.27x10 ⁻⁴		2.95x10 ⁻³							1.64x10 ⁻³
Atrazine	90					3.33x10 ⁻⁵		3.33x10 ⁻⁵	4.44x10 ⁻⁵		3.33x10 ⁻⁵		3.61x10 ⁻⁵
Terbutryn	16							2.50x10 ⁻⁴	2.50x10 ⁻⁴				2.50x10 ⁻⁴
Prometryn	108					2.78x10 ⁻⁵		6.48x10 ⁻⁵	2.78x10 ⁻⁵				4.01x10 ⁻⁵
Desethylatrazine	3					6.67x10 ⁻⁴		6.67x10 ⁻⁴	6.67x10 ⁻⁴		1.00x10 ⁻³		7.50x10 ⁻⁴
Desethylterbutylazine	9			3.33x10 ⁻⁴		4.44x10 ⁻⁴		3.33x10 ⁻⁴	3.33x10 ⁻⁴		2.22x10 ⁻⁴		3.33x10 ⁻⁴
Terbutylazine	207			3.38x10 ⁻⁵		6.76x10 ⁻⁵		2.42x10 ⁻⁵	1.93x10 ⁻⁵		9.66x10 ⁻⁶		3.09x10 ⁻⁵
Acetochlor	165							1.15x10 ⁻⁴	3.64x10 ⁻⁵				7.58x10 ⁻⁵
Metolachlor	140			5.71x10 ⁻⁴		1.50x10 ⁻⁴		1.00x10 ⁻⁴	3.57x10 ⁻⁵		4.29x10 ⁻⁵		1.80x10 ⁻⁴
Isoproturon	11			1.82x10 ⁻⁴		1.82x10 ⁻⁴		1.82x10 ⁻⁴	1.82x10 ⁻⁴		1.82x10 ⁻⁴		1.82x10 ⁻⁴

P14. Hronični toksični pritisak na lokalitetu Novi Sad (gradska zona) tokom 2018. godine na osnovu podataka preuzetih iz SEPA, 2019

SUPSTANCA $\mu\text{g/L}$	NOEC $\mu\text{g/L}$	Januar	Februar	Mart	April	Maj	Jun	Jul	Av gust	Septembar	Oktobar	Novembar	Decembar	Sr. vr. TUch
		TUch												
NH ₄ N	5248	1.14×10^{-2}	1.33×10^{-2}	1.14×10^{-2}	9.53×10^{-3}	1.33×10^{-2}	1.71×10^{-2}	1.71×10^{-2}	2.10×10^{-2}	9.53×10^{-3}	9.53×10^{-3}	1.52×10^{-2}	1.91×10^{-2}	1.40×10^{-2}
Fe diss	1100	4.55×10^{-2}	2.55×10^{-2}	1.00×10^{-1}	2.18×10^{-2}	8.09×10^{-2}	2.45×10^{-2}	3.21×10^{-1}	9.36×10^{-2}	1.82×10^{-2}	1.55×10^{-2}	1.00×10^{-2}	1.27×10^{-2}	6.41×10^{-2}
Mn diss	3170	4.42×10^{-3}				9.46×10^{-3}		1.14×10^{-2}	9.15×10^{-3}	4.73×10^{-3}	3.47×10^{-3}	3.15×10^{-3}		6.53×10^{-3}
Zn diss	1862			5.37×10^{-3}	1.33×10^{-2}	9.61×10^{-3}	2.37×10^{-2}	1.13×10^{-2}	1.86×10^{-2}	1.10×10^{-2}	4.46×10^{-3}	6.28×10^{-3}	9.99×10^{-3}	1.14×10^{-2}
Cu diss	27	1.85×10^{-1}	1.63×10^{-1}	5.67×10^{-1}	8.15×10^{-2}	1.74×10^{-1}	2.70×10^{-1}	2.19×10^{-1}	1.93×10^{-1}	9.63×10^{-2}	1.22×10^{-1}	1.15×10^{-1}	6.30×10^{-2}	1.87×10^{-1}
Cr Total diss	773			6.08×10^{-3}		1.03×10^{-3}		1.94×10^{-3}		9.06×10^{-4}		9.06×10^{-4}		2.17×10^{-3}
Pb diss	353													
Cd diss	49	1.02×10^{-3}	6.12×10^{-4}	6.12×10^{-4}	4.08×10^{-4}		4.08×10^{-4}	6.12×10^{-4}						6.12×10^{-4}
Ni Diss	190	1.32×10^{-2}	8.95×10^{-3}	1.68×10^{-2}	8.95×10^{-3}	1.05×10^{-2}	1.47×10^{-2}	8.42×10^{-3}	1.26×10^{-2}	6.84×10^{-3}	5.26×10^{-3}	5.79×10^{-3}	5.26×10^{-3}	9.78×10^{-3}
Al diss	634	5.84×10^{-2}	4.26×10^{-2}		4.26×10^{-2}	1.37×10^{-1}	3.94×10^{-2}	4.46×10^{-1}	1.32×10^{-1}	2.37×10^{-2}	2.68×10^{-2}	5.68×10^{-2}		1.01×10^{-1}
B diss	14009							1.21×10^{-3}	1.43×10^{-3}	1.43×10^{-3}	1.07×10^{-3}	9.28×10^{-4}	8.57×10^{-4}	1.15×10^{-3}
Co diss	55	9.09×10^{-3}	9.09×10^{-3}											9.09×10^{-3}
As diss	248	5.24×10^{-3}	5.24×10^{-3}	6.05×10^{-3}	6.45×10^{-3}	6.05×10^{-3}	8.87×10^{-3}	8.47×10^{-3}	8.06×10^{-3}	9.27×10^{-3}	5.65×10^{-3}	6.85×10^{-3}	4.84×10^{-3}	6.75×10^{-3}
Benzo (g,h,i) perylene	21			1.43×10^{-4}										1.43×10^{-4}
Benzo (b) fluoranthene	1			4.00×10^{-3}					3.00×10^{-3}					3.50×10^{-3}
Benzo (k) fluoranthene	1			2.00×10^{-3}					5.00×10^{-3}					3.50×10^{-3}
Fluoranthene	30			6.67×10^{-5}						2.67×10^{-5}				4.67×10^{-5}
Para tert octylphenol	55				1.09×10^{-4}				5.45×10^{-5}	1.09×10^{-4}	2.18×10^{-4}			1.23×10^{-4}
Atrazine	90				1.11×10^{-4}	4.44×10^{-5}	3.33×10^{-5}	4.44×10^{-5}	2.22×10^{-5}				3.33×10^{-5}	4.81×10^{-5}
Terbutryn	16											1.25×10^{-4}		1.25×10^{-4}
Desethylatrazine	3				1.00×10^{-3}			1.00×10^{-3}						1.00×10^{-3}
Desethylterbutylazine	9				4.44×10^{-4}	1.00×10^{-3}	4.44×10^{-4}	5.56×10^{-4}	2.22×10^{-4}	3.33×10^{-4}	4.44×10^{-4}		3.33×10^{-4}	4.72×10^{-4}
Terbutylazine	207			1.93×10^{-5}	1.79×10^{-4}	1.30×10^{-4}	4.35×10^{-5}	2.90×10^{-5}	1.93×10^{-5}	2.90×10^{-5}	1.93×10^{-5}	1.93×10^{-5}	1.45×10^{-5}	5.02×10^{-5}
Acetochlor	165					3.03×10^{-5}								3.03×10^{-5}
Metolachlor	140		2.14×10^{-5}		2.07×10^{-4}	7.71×10^{-4}	1.79×10^{-4}	8.57×10^{-5}	4.29×10^{-5}	1.00×10^{-4}	1.43×10^{-5}	2.86×10^{-5}	2.86×10^{-5}	1.48×10^{-4}
Isoproturon	11					1.82×10^{-4}			1.82×10^{-4}	2.73×10^{-4}	1.82×10^{-4}		1.82×10^{-4}	2.00×10^{-4}
Methoxychlor	2			3.00×10^{-3}										3.00×10^{-3}

P15. Ukupni toksični pritisak na odabranim lokalitetima u Dunavu

Lokalitet	SUM TUa	SUM TUch	Br supstanci iznad LOQ korišćenih za računanje TU po lokalitetu
JDS 31	0.074	0.785	122
JDS 33	0.075	0.816	141
JDS 36	0.057	0.640	135
JDS 48	1.821	15.889	107
JDS 54	0.183	1.817	112
JDS 60	0.102	1.046	124
JDS 62	0.071	0.085	102
JDS 65	0.068	0.691	119
JDS 66	0.062	0.642	108
JDS 67	0.082	0.831	129

SUM TUa predstavlja ukupni toksični pritisak koji je izračunat kao suma akutnih toksičnih jedinica TU, SUM TUch ukupni toksični pritisak koji je izračunat kao suma hroničnih toksičnih jedinica, LOQ limit kvantitacije

P16. Toksični pritisak na odabranim lokalitetima na Dunavu poreklom od organskih supstanci (kada se izuzmu metali)

Lokalitet	SUM TUa	SUM TUch	Br supstanci iznad LOQ korišćenih za računanje TU po lokalitetu
JDS 31	0.058524	0.606171	114
JDS 33	0.062483	0.653516	133
JDS 36	0.041988	0.451965	128
JDS 48	0.206604	2.098737	99
JDS 54	0.164878	1.656357	104
JDS 60	0.081756	0.855554	116
JDS 62	0.053197	0.067602	94
JDS 65	0.04833	0.508189	111
JDS 66	0.041293	0.439943	100
JDS 67	0.064697	0.664369	121

SUM TUa predstavlja ukupni toksični pritisak koji je izračunat kao suma akutnih toksičnih jedinica TU, SUM TUch ukupni toksični pritisak koji je izračunat kao suma hroničnih toksičnih jedinica, LOQ limit kvantitacije

III *In vitro* eseji

P17. Rezultati *in vitro* eseja sa uzorcima vode iz studije slučaja Novi Sad (prerađena tabela König i sar, 2017)

Esej	RL-N	RL-A	RL-B	GC-N	GC-A	GC-B	SU-N	SU-A	SU-B	
Metabolizam ksenobiotika										
AhR CAFLUX (H1.G1.1c3)	EC ₁₀ [REF]	(9.9±0.8)	(5.4±0.6)x10 ¹	(5.3±0.4)x10 ¹	(2.5±0.2)	(7.6±0.8)x10 ¹	> 2.0x10 ²	(5.5±0.4)	(4.8±0.4)x10 ¹	(5.9±0.5)x10 ¹
	TCCDEQ [ng/L]	(4.0± 0.6)x10 ⁻²	(7.4±1.2)x10 ⁻³	(7.6±1.1)x10 ⁻³	(1.6±0.2)x10 ⁻¹	(5.2±0.8)x10 ⁻³	< 2.0x10 ⁻³	(7.3±1.0)x10 ⁻²	(8.4±1.2)x10 ⁻³	(6.7±1.0)x10 ⁻³
AhR CAFLUX (H4.G1.1c2)	EC ₁₀ [REF]	(5.9±0.4)x10 ¹	(1.9± 0.1)x10 ²	(1.9± 0.1)x10 ²	citotoksično	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	(3.0± 0.3)x10 ¹	(1.5±0.2)x10 ²	(7.0±0.7)x10 ¹
	TCCDEQ [ng/L]	(8.4±0.7) x10 ⁻³	(2.7±0.2) x10 ⁻³	(2.7±0.2) x10 ⁻³	citotoksično	< 9.9x10 ⁻⁴	< 9.9x10 ⁻⁴	(1.6±0.2) x10 ⁻²	(3.3±0.4) x10 ⁻³	(7.1±0.8) x10 ⁻³
PPARγ Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	(1.6±0.2) x10 ²	(3.8±0.4) x10 ²	> 5.0x10 ²	(8.6±0.9)	(1.3±0.1) x10 ²	(15.5±0.8)	(1.2±0.2) x10 ²	> 5.0x10 ²	> 5.0 x10 ²
	RosiEQ [ng/L]	(4.3±0.8)x10 ⁻¹	(1.8±0.3)x10 ⁻¹	< 1.4x10 ⁻¹	(7.9±1.5)	(5.4±1.0) x10 ⁻¹	(4.4±0.7) x10 ⁻¹	(5.9±1.1)x10 ⁻¹	< 1.4 x10 ⁻¹	< 1.4 x10 ⁻¹
anti PPAR Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	(2.2±0.5)x10 ²	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	(1.4±0.2)x10 ¹	(1.8±0.2)x10 ²	> 5.0x10 ²	(2.1±0.5)x10 ²	> 5.0x10 ²	> 5.0 x10 ²
	T007907EQ [ng/L]	(5.9±2.5)x10 ²	< 2.6x10 ²	< 2.6x10 ²	(9.4±3.8)x10 ³	(7.1±2.8)x10 ²	< 2.6x10 ²	(6.0±2.6)x10 ²	< 2.6x10 ²	< 2.6 x10 ²
Specifični načini delovanja										
AR Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	(14.1±0.1)x10 ¹	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(12.6±0.9)	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(11.4±0.1) x10 ¹	(29.0±0.5)x10 ¹	> 3.0x10 ²
	R1881EQ [ng/L]	(5.2±1.8)x10 ⁻¹	< 2.5x10 ⁻¹	< 2.5x10 ⁻¹	(5.8±1.9)	< 2.5x10 ⁻¹	< 2.5x10 ⁻¹	(6.4±2.2) x10 ⁻¹	(2.5±0.9) x10 ⁻¹	< 2.5x10 ⁻¹
anti AR Gene-BLAzer	EC _{SRO.2} [REF]	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(1.7±0.2) x10 ¹	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(2.0± 0.7)x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	CyproEQ [ng/L]	< 7.1x10 ⁻¹	< 7.1x10 ⁻¹	< 7.1x10 ⁻¹	(12.4±8.8)	< 7.1x10 ⁻¹	< 7.1x10 ⁻¹	(1.0±0.8)	< 7.1x10 ⁻¹	< 7.1x10 ⁻¹
AR MDA-KB2	EC ₁₀ [REF]	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	(4.6±0.2)	(4.8±0.3) x10 ²	> 5.0x10 ²	(10.2±1.0)x10 ¹	citotoksično	> 5.0x10 ²
	DHTEQ [ng/L]	< 2.1x10 ⁻²	< 2.1x10 ⁻²	< 2.1x10 ⁻²	(2.3±0.3)	(2.2±0.3) x10 ⁻²	< 2.1x10 ⁻²	(1.0±0.2)x10 ⁻¹	citotoksično	< 2.1x10 ⁻²
anti AR MDA-KB2	EC _{SRO.2} [REF]	(7.6 ±0.4)x10 ¹	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	Androgenic effect	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	(8.9±7.1)x10 ¹	citotoksično	citotoksično
	FltEQ [ng/L]	(2.2±1.9)	< 2.3x10 ⁻¹	< 2.3x10 ⁻¹	Androgenic effect	< 2.3x10 ⁻¹	< 2.3x10 ⁻¹	(1.1±0.2)	citotoksično	citotoksično
ERα Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	(8.6±0.3)x10 ¹	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	(1.8±0.1)	(1.8±0.2)x10 ²	(3.1±0.3)x10 ²	(3.7±0.3)x10 ¹	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²
	EEQ [ng/L]	(5.3±0.2)x10 ⁻³	< 9.1x10 ⁻⁴	< 9.1x10 ⁻⁴	(2.6±0.1) x10 ⁻¹	(2.5±0.3)x10 ⁻³	(1.5±0.1) x10 ⁻³	(1.2±0.1) x10 ⁻²	< 9.1x10 ⁻⁴	< 9.1x10 ⁻⁴
anti ERα Gene-BLAzer	EC _{SRO.2} [REF]	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	citotoksično	citotoksično	citotoksično	citotoksično	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²
	MifeEQ [ng/L]	< 4.8x10 ⁸	< 4.8x10 ⁸	< 4.8x10 ⁸	citotoksično	citotoksično	citotoksično	citotoksično	< 4.8x10 ⁸	< 4.8x10 ⁸
E-CALUX	EC ₁₀ [REF]	(8.4±0.6)	n.t.	n.t.	(1.8±0.2)x10 ⁻¹	n.t.	n.t.	(4.0±0.3)	n.t.	n.t.
	EEQ [ng/L]	(1.5±0.4)x10 ⁻²	n.t.	n.t.	(6.8±1.9)x10 ⁻¹	n.t.	n.t.	(3.2±0.9)x10 ⁻²	n.t.	n.t.
E-SCREEN	EC ₁₀ [REF]	(3.6±1.2)x10 ⁰	n.t.	n.t.	(2.9±0.4)x10 ⁻¹	n.t.	n.t.	(2.1±0.6)x10 ¹	n.t.	n.t.
	EEQ [ng/L]	(1.9±0.7)x10 ⁻¹	n.t.	n.t.	(2.4±0.6)	n.t.	n.t.	(3.4±1.2)x10 ⁻²	n.t.	n.t.
GR Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	citotoksično	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	citotoksično	>3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	DexEQ [ng/L]	< 1.1	< 1.1	< 1.1	citotoksično	< 1.1	< 1.1	citotoksično	<1.1x10 ⁰	< 1.1x10 ⁰
anti GR Gene-BLAzer	EC _{SRO.2} [REF]	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(2.2±0.5)x10 ¹	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	>3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	MifeEQ [ng/L]	< 1.8x10 ⁻⁴	< 1.8x10 ⁻⁴	< 1.8x10 ⁻⁴	(2.5±0.7)x10 ⁻³	< 1.8x10 ⁻⁴	< 1.8x10 ⁻⁴	< 1.8x10 ⁻⁴	<1.8x10 ⁻⁴	< 1.8x10 ⁻⁴
PR Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	citotoksično	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	citotoksično	citotoksično	> 3.0x10 ²	citotoksično	>3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	PromEQ [ng/L]	citotoksično	< 3.7x10 ⁻²	< 3.7x10 ⁻²	citotoksično	citotoksično	< 3.7x10 ⁻²	citotoksično	<3.7x10 ⁻²	< 3.7x10 ⁻²
anti PR Gene-BLAzer	EC _{SRO.2} [REF]	citotoksično	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	citotoksično	citotoksično	> 3.0x10 ²	citotoksično	>3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	MifeEQ [ng/L]	citotoksično	< 1.8x10 ⁻²	< 1.8x10 ⁻²	citotoksično	citotoksično	< 1.8x10 ⁻²	citotoksično	<1.8x10 ⁻²	< 1.8x10 ⁻²
RARα Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	(2.3±0.3)x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	citotoksično	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(2.4±0.2)x10 ²	>3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	ATRAEQ [ng/L]	(7.2±5.8)	< 5.5	< 5.5	citotoksično	< 5.5	< 5.5	(7.0±5.7)	< 5.5	< 5.5
RXR Gene-BLAzer	EC ₁₀ [REF]	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(4.1±1.3)x10 ¹	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²	(1.7±2.7)x10 ²	> 3.0x10 ²	> 3.0x10 ²
	RAEQ [ng/L]	< 2.0x10 ⁻²	< 2.0x10 ⁻²	< 2.0x10 ⁻²	(1.5±1.0)x10 ⁻¹	< 2.0x10 ⁻²	< 2.0x10 ⁻²	(3.5±6.1)x10 ⁻²	< 2.0x10 ⁻²	< 2.0x10 ⁻²
Adaptivni odgovori na stres										
ARE Gene-BLAzer	EC _{R1.5} [REF]	(3.1±0.2)x10 ¹	(2.2±0.1)x10 ²	> 5.0x10 ²	(6.9±0.2)x10 ⁰	> 1.0x10 ²	> 1.0x10 ²	(2.6±0.2)x10 ¹	(2.2±0.1)x10 ²	> 5.0x10 ²
	tBHQEQ [ng/L]	(1.3±0.1)x10 ⁴	(1.8±0.1)x10 ³	< 7.9x10 ²	(5.7±0.3)x10 ⁴	< 3.9x10 ³	< 3.9x10 ³	(1.5±0.1)x10 ⁴	(1.8±0.1) x10 ³	< 7.9x10 ²

Esej		RL-N	RL-A	RL-B	GC-N	GC-A	GC-B	SU-N	SU-A	SU-B
NFκB Gene-BLAzer	EC _{IR1.5} [REF]	(7.3±.4) x10 ⁰	(5.1±0.2)x10 ¹	(7.0±0.5)x10 ⁰	(5.0±0.2)x10 ⁰	(25.2±0.7)x10 ⁰	(3.1±0.1)x10 ¹	(8.4±0.4)x10 ⁰	(6.1±0.3) x10 ¹	(7.9±0.4) x10 ¹
	TNFα [ng/L]	(2.5±0.3)x10 ⁰	(3.6±0.4)x10 ⁻¹	(2.6±0.3)x10 ⁰	(3.7±0.4)x10 ⁰	(7.3±0.8)x10 ⁻¹	(5.9±0.6)x10 ⁻¹	(2.2±0.2)x10 ⁰	(3.0±0.3) x10 ⁻¹	(2.3±0.3) x10 ⁻¹
P53 Gene-BLAzer	EC _{IR1.5} [REF]	citotoksično	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	citotoksično	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²	citotoksično	> 5.0x10 ²	> 5.0x10 ²
	Mitomycin [ng/L]	citotoksično	< 6.2x10 ¹	< 6.2x10 ¹	citotoksično	< 6.2x10 ¹	< 6.2x10 ¹	citotoksično	< 6.2x10 ¹	< 6.2x10 ¹

EC₁₀, EC_{SR0.2} i EC_{IR1.5} izražene u REF jedinicama i BEQ u jedinicama ng referentne supstance po litri. Date su sumirane vrednosti za lokalitete uzorkovanja RL, GC i SU za neutralnu (N), kiselu (A) i baznu (B) frakciju. n.t. nije testirano

IV Biomarkeri

P18. Mere centralne tendencije i varijacije biometrijskih parametara jedinki *C. carpio* iz studije slučaja NS/ŠA

Biometrijski parametri	Lokalitet	Br jedinki	sr.vrednost±sd	Opseg(min-max)	SEM	Mediana	Percentili (25%, 75%)	Geo.sr.vr
Dužina tela	OK	20	318±28.16	216-345	6.297	322	311.5,337.8	316.5
	RL		286.6±22.89	220-315	5.119	295	272.8,300	285.6
	GC		270.3±23.31	229-310	5.348	271	262,287	269.3
	SU		281.4±16.36	247-309	3.658	280.5	270.3,296.5	280.9
	SA		284.6±28.65	235-335	6.405	287	267,303.80	283.2
Masa tela	OK		622.1±105.4	373-800	23.56	623	541.3,713.8	612.8
	RL		416.5±98.21	108.9-549.2	21.96	436.8	349.1,478	399.2
	GC		349.3±101.5	196.3-564.7	22.7	343.8	264.1,407.7	335.4
	SU		405.6±80.62	259.6-549.3	18.03	410.9	341.4,471.8	397.6
	SA		440.5±121.1	261.3-680.2	27.08	442.4	324.5,512.2	424.2
BCF	OK		1.965±0.44	1.57-3.7	0.09792	1.9	1.78,2.01	1.932
	RL		1.727±0.196	1.02-1.98	0.04383	1.788	1.66,1.84	1.713
	GC		1.752±0.2	1.44-2.16	0.04618	1.714	1.61,1.94	1.742
	SU		1.81±0.23	1.12-2.32	0.05218	1.773	1.70,1.91	1.794
	SA		1.883±0.25	1.41-2.35	0.05498	1.864	1.78, 1.95	1.867
HSI	OK		4.12±0.7	2.55-5.52	0.1598	4.163	3.76,4.64	4.06
	RL		2.559±0.6	1.42-3.69	0.1337	2.473	2.15-3.15	2.491
	GC		2.159±0.58	1.49-3.96	0.1303	2.028	1.77-2.39	2.096
	SU		2.286±0.8	0.49-4.13	0.1786	2.28	1.77-2.89	2.12
	SA		2.091±0.46	0.99-2.88	0.1025	2.101	1.88-2.39	2.036

0C-jedinke *C. carpio* žrtvovane nakon donošenja iz ribnjaka, pre kaveznog izlaganja. RL-referentni lokalitet, GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić, SA- lokalitet u reci Sava, nizvodno od Šapca, sr.vr-srednja vrednost, sd-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti, Geo.sr.vr.- geometrijska srednja vrednost

P19. Mere centralne tendencije i varijacije aktivnosti enzima u uzorcima tkiva jetre i mozga jedinki *C. carpio* iz studije slučaja NS/ŠA

Organ:			Jetra						Mozak					
Br jedinki	Enzim	Lokalitet	sr.vrednost±sd	Opseg (min – max)	SEM	Mediana	Percentili (25%, 75%)	Geo.sr.vr	sr.vrednost±sd	Opseg (min – max)	SEM	Mediana	Percentili (25%, 75%)	Geo.sr.vr
10	CAT	OK	31.41±15.79	6.37-63.56	4.99	33.05	19.02-38.09	26.95	2.04±0.62	1.39-3.3	0.2	1.79	1.66-2.46	1.97
		RL	48.1±17.48	27.03-77.4	5.83	46.02	32.49-61.42	45.27	1.98±0.59	1.04-2.88	0.19	1.78	1.60-2.59	1.9
		GC	22.82±9.17	7.76-38.48	2.9	21.75	18.05-30.4	20.81	2.22±0.45	1.79-3.23	0.14	2.11	1.88-2.53	2.18
		SU	26.35±12.46	12.22-45.52	3.94	24.87	14.72-38.08	23.65	2.11±0.39	1.50-2.71	0.12	2.13	1.80-2.43	2.08
		SA	29.95±5.79	19.80-38.33	1.83	29.18	26.14-35.89	29.43	2.13±0.56	1.10-2.88	0.18	2.15	1.80-2.62	2.05
	CES	OK	0.25±0.11	0.14-0.53	0.04	0.22	0.18-0.29	0.24	0.07±0.01	0.06-0.09	0.003	0.07	0.07-0.08	0.07
		RL	0.27±0.14	0.11-0.61	0.04	0.25	0.19-0.30	0.25	0.06±0.01	0.04-0.07	0.0029	0.06	0.05-0.07	0.06
		GC	0.22±0.06	0.12-0.31	0.02	0.22	0.16-0.27	0.21	0.07±0.01	0.05-0.08	0.0026	0.07	0.06-0.08	0.07
		SU	0.17±0.05	0.06-0.26	0.02	0.16	0.14-0.19	0.16	0.06±0.01	0.05-0.07	0.0029	0.06	0.05-0.07	0.06
		SA	0.2±0.06	0.10-0.26	0.02	0.24	0.14-0.22	0.19	0.06±0.01	0.05-0.08	0.0032	0.06	0.06-0.07	0.06
	GST	OK	0.16±0.09	0.06-0.35	0.03	0.15	0.09-0.22	0.15	0.2±0.04	0.15-0.29	0.01	0.19	0.17-0.24	0.2
		RL	0.32±0.23	0.14-0.87	0.07	0.24	0.17-0.40	0.27	0.17±0.04	0.12-0.23	0.01	0.17	0.15-0.21	0.17
		GC	0.25±0.11	0.17-0.54	0.03	0.23	0.19-0.25	0.24	0.17±0.02	0.14-0.20	0.01	0.17	0.15-0.18	0.17
		SU	0.22±0.08	0.14-0.41	0.02	0.21	0.17-0.23	0.21	0.18±0.05	0.08-0.26	0.02	0.18	0.15-0.24	0.17
		SA	0.26±0.11	0.14-0.45	0.04	0.22	0.16-0.39	0.24	0.16±0.03	0.11-0.19	0.01	0.16	0.15-0.19	0.16
	AChE	OK	0.01±0.0	0.01-0.01	0.0004	0.01	0.01-0.01	0.01	0.05±0.01	0.05-0.07	0.0018	0.05	0.05-0.06	0.05
		RL	0.01±0.01	0.01-0.03	0.0016	0.01	0.01-0.02	0.01	0.05±0.01	0.04-0.07	0.0034	0.05	0.04-0.06	0.05
		GC	0.01±0.0	0.01-0.02	0.0009	0.01	0.01-0.01	0.01	0.05±0.01	0.03-0.06	0.0029	0.05	0.05-0.06	0.05
		SU	0.01±0.0	0.01-0.01	0.0004	0.01	0.01-0.01	0.01	0.05±0.01	0.04-0.06	0.0026	0.05	0.04-0.06	0.05
		SA	0.02±0.0	0.01-0.02	0.0015	0.02	0.01-0.02	0.01	0.05±0.01	0.03-0.07	0.0037	0.05	0.04-0.06	0.05

0C-jedinke *C. carpio* žrtvovane nakon donošenja iz ribnjaka, pre kaveznog izlaganja. RL-referentni lokalitet, GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić, sr.vr.-srednja vrednost, sd-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti, Geo.sr.vr.- geometrijska srednja vrednost, CAT-katalaza, CES- karboksilesteraza, GST- glutation s-transferaza, AChE-acetilholinesteraza

P20 Mere centralne tendencije i varijacije normalizovane genske ekspresije biomarkera opšteg odgovora na stres, kod mužjaka i ženki *C. carpio*

Pol	ženke				mužjaci			
Lokaliteti:	RL	GC	SU	SA	RL	GC	SU	SA
<i>hsp70</i>								
Srednja vrednost±sd	0.117±0.15	0.239±0.14	0.396±0.91	1.266±1.44	0.181±0.17	0.184±0.11	0.749±0.89	1.98±1.35
SEM	0.05	0.044	0.3	0.51	0.051	0.038	0.27	0.39
Mediana	0.059	0.236	0.069	0.600	0.144	0.175	0.331	1.833
Geometrijska sredina	0.059	0.147	0.105	0.584	0.102	0.135	0.388	1.484
Min-max	0.006-0.487	0.001-0.563	0.033-2.807	0.057-4.154	0.006-0.527	0.022-0.327	0.049-2.877	0.348-4.248
25, 75% Percentile	0.021, 0.163	0.131, 0.301	0.037, 0.22	0.162, 2.223	0.033, 0.23	0.083, 0.31	0.126, 1.475	0.597, 3.311
<i>cr</i>								
Srednja vrednost±sd	0.099±0.072	0.082±0.07	0.093±0.057	0.090±0.051	0.066±0.043	0.102±0.062	0.136±0.11	0.163±0.115
SEM	0.024	0.021	0.019	0.018	0.013	0.021	0.034	0.033
Mediana	0.074	0.060	0.087	0.100	0.059	0.103	0.106	0.117
Geometrijska sredina	0.069	0.058	0.078	0.068	0.054	0.084	0.092	0.132
Min-max	0.006-0.218	0.006-0.261	0.028-0.221	0.008-0.153	0.014-0.157	0.02-0.231	0.008-0.39	0.054-0.413
25, 75% Percentile	0.045, 0.172	0.044, 0.125	0.05, 0.11	0.043, 0.14	0.033, 0.098	0.059, 0.134	0.058, 0.22	0.078, 0.24
<i>cox1</i>								
Srednja vrednost±sd	52.71±42.1	41.35±41.33	60.81±94.59	18.74±28.39	26.79±26.69	22.34±19.28	62.05±58.12	53.06±21.74
SEM	14.03	12.46	31.53	10.04	8.952	6.426	17.52	6.275
Mediana	56.68	29.98	8.792	8.666	5.656	14.64	69.18	53.28
Geometrijska sredina	18.81	24.1	18.01	9.481	9.81	12.46	27.77	48.89
Min-max	0.43-112.4	4.08-115.5	2.91-246.3	0.99-87.92	1.03-78.11	0.94-46.63	3.16-182.2	25.78-95.88
25, 75% Percentile	3.32, 87.9	7.99, 82.72	4.999, 127.2	6.95, 16.86	2.77, 56.02	4.9, 44.2	4.29, 105.6	31.18, 68.11
<i>erk2</i>								
Srednja vrednost±sd	0.43±0.58	0.44±0.75	0.3±0.39	0.29±0.45	0.24±0.28	0.38±0.32	0.43±0.4	0.57±0.79
SEM	0.19	0.23	0.13	0.16	0.09	0.11	0.12	0.23
Mediana	0.26	0.17	0.11	0.09	0.14	0.31	0.35	0.36
Geometrijska sredina	0.28	0.20	0.17	0.14	0.17	0.26	0.29	0.30
Min-max	0.1-1.95	0.04-2.58	0.03-1.27	0.05-1.37	0.06-1.07	0.08-0.99	0.05-1.46	0.05-2.94
25, 75% Percentile	0.19, 0.3	0.09, 0.29	0.08, 0.38	0.06, 0.37	0.12, 0.2	0.09, 0.6	0.13, 0.59	0.08, 0.59
<i>mt</i>								
Srednja vrednost±sd	1.73±1.65	1.3±1.24	2.38±2.18	1.5±1.41	2.68±2.62	1.51±1.31	2.5±2.25	2.73±1.53
SEM	0.55	0.37	0.73	0.50	0.79	0.44	0.68	0.44
Mediana	1.22	0.76	1.37	1.04	2.44	1.13	1.64	2.17
Geometrijska sredina	0.72	0.81	1.60	0.99	1.52	1.06	1.88	2.44
Min-max	0.01-4.77	0.15-3.98	0.42-5.95	0.27-3.7	0.24-7.81	0.16-4.45	0.56-8.36	1.32-6.71
25, 75% Percentile	0.29, 3.02	0.29, 2.36	0.65, 4.53	0.4, 3.1	0.48, 4.18	0.62, 2.12	1.15, 3.21	1.79, 3.3

RL-referentni lokalitet (br ženki: 9, mužjaka 11), GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada (br ženki 11, mužjaka 9), SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić (br ženki 9, mužjaka 11), SA-lokalitet u reci Sava, nizvodno od grada Šabac (br ženki 8, mužjaka 12), St.dev-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti,

P21. Mere centralne tendencije i varijacije normalizovane genske ekspresije gena hormonske regulacije, kod mužjaka i ženki *C. carpio*

Pol	ženke					mužjaci				
Lokaliteti:	OC	RL	GC	SU	SA	OC	RL	GC	SU	SA
<i>era</i>										
Srednja vrednost±sd	251.1±352	47.5±32.1	27.8±13.44	25.2±16.6	17.89±8.1	518.5±384.7	45.4±46.2	48.5±63.3	56.5±43.2	57.9±36.5
SEM	106.1	10.7	5.1	5.5	2.9	128.2	13.9	17.6	13.02	10.5
Mediana	79.8	40.03	30.73	18.64	19.41	607.1	31.89	15.3	46.2	53.6
Geometrijska sredina	118.3	34.8	23.7	20.6	15.3	257.3	27.9	22.7	41.7	41.97
Min-max	31.42-1087	2.99-114.2	5.7-43.05	8.3-53.8	2.99-27.9	5.3-983.2	4.5-166.3	5.43-208.8	9.01-151.5	4.19-114.3
25, 75% Percentile	48.24, 432.9	28.4, 67.8	18.98, 39.7	10.12, 40.5	12.85, 24.3	5.3, 983.2	4.5, 166.3	5.4, 208.8	9.01, 151.5	4.2-114.3
<i>erB</i>										
Srednja vrednost±sd	195.3±309.2	25.02±18.8	37.1±65.02	19.6±13.1	20.1±20.8	514±359.9	46.3±80.4	39.5±50.8	39.5±22.8	31.98±18.98
SEM	93.2	6.3	19.6	4.4	7.4	120	24.3	16.95	6.9	5.5
Mediana	57.7	18.6	13.2	18.7	14.3	571.1	19.5	13.5	41.3	27.9
Geometrijska sredina	75.7	18.5	19.2	15.6	11.8	332.4	25.1	21.01	31.6	27.8
Min-max	5.7-842.9	2.6-64.6	7.6-230.6	4.2-44.8	2.2-59.3	30.6-949.9	7.5-286.6	4.07-158.3	5.5-78.6	13.07-81.15
25, 75% Percentile	37.8, 148.9	13.2, 37.97	9.34, 32.5	7.7, 29.2	3.8, 37.8	146, 898.3	14.7, 37.4	10.6, 64.3	20.7, 57.7	15.98, 40.9
<i>vfg</i>										
Srednja vrednost±sd	2115±6181	2.6±2.6	3.3±2.2	3.4±3.1	3.09±1.99	122.7±122.5	9.5±17.5	5.7±6.4	9.6±21.7	10.9±14.9
SEM	19.6	0.93	0.72	1.1	0.8	40.9	5.5	2.13	6.53	4.5
Mediana	84.4	1.5	4.3	2.8	3.3	64.1	2.5	4.1	1.02	6.4
Geometrijska sredina	104.2	1.52	2.08	1.83	2.42	49.2	2.8	3.4	2.5	6.7
Min-max	7.2-19693	0.4-7.7	0.07-6.002	0.196-9.43	0.86-5.6	0.61-325.4	0.46-57.12	0.79-21.2	0.6-74.13	54.2-3.8
25, 75% Percentile	14.1, 407.4	0.48, 4.4	1.25, 5.1	0.5, 5.17	0.88, 4.75	20.3, 238.4	0.69, 10.6	1.35, 7.09	0.66, 8.54	3.8, 10.4
<i>ar</i>										
Srednja vrednost±sd	644.4±1422	117±81.3	161.1±250.4	123.2±124.6	125.4±99.15	1427±1297	1093±2231	253.8±482.2	78.2±46.4	75.02±32.23
SEM	428.9	28.76	79.18	41.54	35.05	423.5	672.7	160.7	14	9.3
Mediana	54.8	107.7	91.5	87.5	97.26	1406	107	113.5	69.3	71.8
Geometrijska sredina	99.3	98.04	78.01	92.96	104	709.8	172.9	110.8	65.82	67.79
Min-max	4.6-4782	36.23-302.6	9.33-852.5	35.45-443.6	58.48-359.2	36.3-4330	26.7-6285	36.66-1532	21.9-176.4	23.9-134.9
25, 75% Percentile	30.9, 953.5	61.7, 120.5	32.3, 150.6	59.9, 129.9	62.07, 134.8	354, 1921	42.3, 252.4	45.64, 158	43.4, 113.5	54.7, 95.6

RL-referentni lokalitet (br ženki: 9, mužjaka 11), GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada (br ženki 11, mužjaka 9), SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić (br ženki 9, mužjaka 11), SA-lokalitet u reci Sava, nizvodno od grada Šabac (br ženki 8, mužjaka 12), St.dev-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti

P22. Mere centralne tendencije i varijacije normalizovane genske ekspresije biomarkera autofagije i imunog odgovora kod jedinki *C. carpio*

Lokaliteti:	0C	RL	GC	SU	SA
<i>LC3II</i>					
Srednja vrednost±sd	13.73±4.8	9.04±4.86	9.7±3.3	11.35±3.2	11.75±4.6
SEM	1.602	1.538	1.044	1.024	1.453
Mediana	16.47	8.15	9.71	11.20	12.09
Geometrijska sredina	12.81	7.86	9.06	10.93	10.89
Min-max	5.8-18.3	2.6-17.7	3.4-14.6	6.6-16.9	6.14-18.6
25, 75% Percentile	9.11, 17.7	5.4, 12.7	7.08, 12.44	8.7, 14.4	6.83, 15.8
<i>tnfa</i>					
Srednja vrednost±sd	7.23±2.55	14.7±11.4	29.7±11.15	33.96±18.8	14.9±7.9
SEM	0.81	3.60	3.53	5.93	2.50
Mediana	7.66	10.21	29.83	25.93	13.57
Geometrijska sredina	6.82	11.51	27.66	29.68	12.95
Min-max	4.35-11.09	4.24-36.5	13.16-50.07	13.79-63.9	4.5-28.6
25, 75% Percentile	4.55, 9.22	6.66, 22.5	19.15, 36.6	20.9, 57.3	8.63, 22.8
<i>dyn</i>					
Srednja vrednost±sd	32.14±18.97	19.01±16.08	27.01±15.3	26.16±12.9	29.7±12.3
SEM	6.00	5.09	4.84	4.08	3.90
Mediana	30.14	13.64	22.80	22.32	28.85
Geometrijska sredina	27.23	15.00	23.74	23.49	27.27
Min-max	11.7-66.7	5.4-58.9	11.5-60.1	12.08-49.31	15.03-46.13
25, 75% Percentile	15.7, 47.7	10.3, 21.32	14.9, 38.1	15.7, 37.8	17.5, 43.6
<i>iIβ</i>					
Srednja vrednost±sd	22.47±11.5	18.08±10.2	12.32±7.7	10.1±5.97	14.1±6.7
SEM	3.65	3.24	2.43	1.89	2.13
Mediana	22.97	15.16	11.80	9.27	12.44
Geometrijska sredina	19.37	15.53	10.05	8.82	12.72
Min-max	7.78-37.8	5.9-34.3	3.54-25.5	3.29-24.4	6.7-26.4
25, 75% Percentile	11.06, 33.8	9.88, 27.5	4.97, 19.8	6.18, 11.16	8.12, 19.01

0C-jedinke *C. carpio* žrtvovane nakon donošenja iz ribnjaka, pre kaveznog izlaganja. RL-referentni lokalitet, GC-ispust komunalnih otpadnih voda Novog Sada, SU-lokalitet nizvodno od Novog Sada, Subić, SA- lokalitet u reci Sava, nizvodno od Šapca, sd-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti,

P23. Mere centralne tendencije i varijacije normalizovane genske ekspresije biomarkera neurotoksičnosti kod jedinki *C. carpio*

Lokaliteti:	OC	RL	GC	SU	SA	OC	RL	GC	SU	SA
<i>gabral</i>					<i>syt10</i>					
Srednja vrednost±sd	7.2±3.4	6.7±5.3	12.5±6.2	11.2±3.8	10.8±5.9	12.94±22.5	13.07±15.8	22.04±16.7	14.5±11.6	18.05±16.5
SEM	1.14	1.69	1.97	1.21	1.86	7.11	5.00	5.28	3.67	5.21
Mediana	7.33	4.66	12.33	10.36	9.69	0.90	7.18	20.09	11.33	14.56
Geometrijska sredina	6.26	4.92	11.19	10.62	9.40	2.09	3.47	12.41	8.41	8.69
Min-max	1.8-11.98	1.24-17.95	4.75-26.02	5.6-17.8	4.7-21.8	0.08-71.64	0.11-40.7	0.21-54.9	0.61-33.3	0.43-45.5
25, 75% Percentile	4.1, 10.2	2.5, 11.05	7.2, 26.02	8.4, 14.4	4.8, 15.92	0.4, 19.4	0.4, 26.3	12.3-28.1	5.2-25.7	3.5-32.7
<i>mbp</i>					<i>tac3a</i>					
Srednja vrednost±sd	21.5±10.2	37.07±37.5	36.78±21.9	0.48±0.37	23.36±13.6	21.85±48.4	12.42±17.05	40.76±72.6	39.48±51.2	34.52±51.3
SEM	3.22	11.87	6.93	0.12	4.31	15.30	5.39	22.97	16.18	16.23
Mediana	19.08	20.60	35.91	0.38	20.13	3.18	4.59	6.09	12.05	5.30
Geometrijska sredina	19.50	26.19	28.87	0.29	20.11	2.52	3.57	5.98	14.65	6.01
Min-max	9.2-39.1	9.9-129.4	3.2-85.3	0.03-1.054	6.3-50.2	0.02-155.1	0.21-51.2	0.04-233.7	1.7-127.4	0.18-121.8
25, 75% Percentile	12.8, 28.3	15.2, 55.6	23.6, 46.8	0.19, 0.8	15.4, 29.4	0.5, 15.6	0.35, 18.7	1.15, 61.9	3.5, 94.3	0.64, 91.95
<i>tac3b</i>										
Srednja vrednost±sd	3.82±2.9	3.62±3.3	9.53±11.7	10.2±8.3	9.88±9.8					
SEM	0.91	1.03	3.70	2.63	3.09					
Mediana	3.14	2.40	5.41	6.72	4.39					
Geometrijska sredina	2.92	2.49	5.64	7.43	5.77					
Min-max	1.08-8.9	0.54-9.5	0.5-40.7	2.08-28.2	1.06-25.9					
25, 75% Percentile	1.38, 6.3	1.32, 5.7	3.8, 10.9	3.65, 15.4	2.3, 21.9					

P24. Mere centralne tendencije i varijacije biometrijskih parametara kod *A. brama*

	Br jed.	sr.vrednost±sd	Opseg (min-max)	SEM	Mediana	Percentili (25%, 75%)	Geo.sr.vr
BCF	14	1.181±0.14	0.998-1.57	0.038	1.157	1.102,1.24	1.173
	11	1.337±0.13	1.161-1.64	0.040	1.336	1.222,1.4	1.331
HSI	14	1.206±0.52	0.3304-2.428	0.140	1.2	0.95,1.32	1.09
	11	2.025±0.44	1.586-3.258	0.130	1.93	1.76,2.07	1.99

Bele ćelije: referentna populacija, sive ćelije eksponirana populacija

P25. Mere centralne tendencije i varijacije aktivnosti enzima u tkivu jetre *A. brama*

Jetra							
Enzim	Br jedinki	sr.vrednost±sd	Opseg (min-max)	SEM	Mediana	Percentili (25%,75%)	Geo.sr.vr
CAT	14	14.91 ±11	2.23-43.44	3.052	13.15	7.035, 19.98	11.51
	11	19.55 ± 16.86	2.6-49.01	5.084	14.37	3.204, 36.17	12.17
CES	14	0.064 ±0.015	0.037-0.093	0.004	0.061	0.057, 0.076	0.062
	11	0.119 ± 0.049	0.073-0.24	0.015	0.098	0.085, 0.149	0.111
GST	14	0.29±0.065	0.156-0.375	0.017	0.285	0.246, 0.340	0.277
	11	0.27±0.178	0.080-0.673	0.054	0.194	0.163, 0.351	0.228
AChE	14	0.011±0.003	0.007-0.017	0.001	0.011	0.008, 0.012	0.01
	11	0.013±0.007	0.005-0.027	0.002	0.01	0.009, 0.015	0.011

Bele ćelije: referentna populacija, sive ćelije eksponirana populacija

P26. Mere centralne tendencije i varijacije aktivnosti enzima u tkivu mozga *A. brama*

Mozak							
Parametar	Br jedinki	sr.vrednost±sd	Opseg (min-max)	SEM	Mediana	Percentili (25%, 75%)	Geo.sr.vr
CAT	14	2.226±0.372	2.217-2.979	0.099	2.217	1.875, 2.542	2.197
	11	4.464±1.945	3.937-9.227	0.587	3.937	3.409, 4.355	4.168
CES	14	0.025±0.004	0.017-0.031	0.001	0.024	0.022, 0.027	0.025
	11	0.041±0.014	0.026-0.077	0.004	0.037	0.032, 0.047	0.039
GST	14	0.2±0.03	0.148-0.246	0.008	0.201	0.173, 0.224	0.198
	11	0.317±0.17	0.141-0.751	0.051	0.226	0.215, 0.388	0.285
AChE	14	0.049±0.012	0.026-0.076	0.003	0.048	0.044, 0.057	0.047
	11	0.036±0.012	0.010-0.050	0.004	0.037	0.027, 0.047	0.033

Bele ćelije: referentna populacija, sive ćelije eksponirana populacija

P27. Mere centralne tendencije i varijacije normalizovane genske ekspresije kod *A. brama*

Gen	Br. jedinki	Sr.vrednost \pm SD	Opseg (min – max)	SEM	Mediana	Percentili (25%, 75%)
<i>hsp70</i>	14	1.75 \pm 2.71	0.23-8.22	3.15	0.60	0.30, 1.56
	11	7.27 \pm 10.46	0.29-31.21	0.73	1.68	1.37, 18.07
<i>cox1</i>	14	0.09 \pm 0.10	0.01-0.34	0.01	0.06	0.02, 0.16
	11	0.02 \pm 0.036	0.0003-0.09	0.03	0.003	0.0009, 0.03
<i>erk2a</i>	14	1.69 \pm 0.80	0.43-3.42	1.71	1.61	1.13, 2.21
	11	3.95 \pm 5.69	0.69-20.46	0.21	2.00	1.46, 3.40
<i>cr</i>	14	0.55 \pm 0.32	0.09-1.21	0.60	0.53	0.26, 0.79
	11	1.20 \pm 2.00	0.02-7.17	0.09	0.67	0.45, 0.93
<i>sod</i>	14	4.26 \pm 4.80	0.05-15.97	5.88	1.86	0.51, 7.60
	11	10.36 \pm 19.51	0.16-61.12	1.28	0.67	0.32, 19.54
<i>gpx1</i>	14	3.60 \pm 4.53	0.12-18.16	3.20	2.59	0.52, 4.29
	11	16.79 \pm 10.61	1.31-31.11	1.21	19.23	7.21, 27.87
<i>nrf2a</i>	14	44.39 \pm 33.25	7.1-121.4	0.79	42.33	11.25, 63.88
	11	25.61 \pm 23.25	0.05-92.88	2.42	21.06	20.49, 22.66
<i>cyp1a</i>	14	14.22 \pm 9.06	0.81-30.89	0.44	12.26	7.19, 21.65
	11	5.54 \pm 2.60	1.27-10.62	1.74	5.17	3.85, 7.19
<i>mgst3a</i>	14	5.07 \pm 6.50	0.13-15.7	7.01	1.80	0.51, 13.78
	11	2.15 \pm 1.46	0.06-5.4	8.89	2.08	1.59, 2.86
<i>era</i>	14	12.70 \pm 12.68	1.69-46.21	2.47	7.59	3.77, 19.92
	11	5.78 \pm 8.21	0.81-25.84	3.39	1.51	1.29, 12.83
<i>erβ</i>	14	0.40 \pm 0.29	0.05-1.04	0.17	0.35	0.18, 0.55
	11	0.32 \pm 0.56	0.01-1.81	0.08	0.03	0.02, 0.43
<i>pc</i>	14	0.65 \pm 0.36	0.24-1.18	0.53	0.54	0.32, 1.08
	11	2.33 \pm 1.75	0.09-5.51	0.10	1.93	0.87, 3.74
<i>pygl</i>	14	6.46 \pm 7.65	0.26-30.73	6.28	4.82	1.00, 7.96
	11	8.05 \pm 20.82	0.11-69.82	2.04	0.38	0.21, 3.30
<i>tfd</i>	14	649.40 \pm 567.50	7.88-2055	132.40	712.10	140.20, 1042.00
	11	324.40 \pm 439.20	0.57-1556	151.70	209.10	58.07, 391.50
<i>mbp</i>	14	333.70 \pm 225.70	29.25-768.70	81.91	326.00	136.40, 501.30
	11	493.10 \pm 271.70	0.04-819.40	60.31	539.90	286.80, 763.50

Bele ćelije: referentna populacija, sive ćelije eksponirana populacija

P28 Mere centralne tendencije i varijacije enzimskih aktivnosti i kondicionog faktora kod *A. alburnus*

BCF										
	JDS 31	JDS 33	JDS 36	JDS 48	JDS 54	JDS 60	JDS 62	JDS 65	JDS 66	JDS 67
Sr.vr. ± sd	0.68±0.04	0.68±0.06	0.64±0.06	0.66±0.05	0.73±0.05	0.8±0.09	0.74±0.06	0.76±0.06	0.69±0.11	0.7±0.04
SEM	0.0154	0.0243	0.0273	0.0216	0.0195	0.0349	0.0229	0.0232	0.0459	0.0146
Mediana	0.6850	0.6700	0.6200	0.6500	0.7150	0.8000	0.7350	0.7700	0.6600	0.6950
Geo. Sr.vr.	0.6775	0.6763	0.6337	0.6546	0.7237	0.7928	0.7416	0.7531	0.6849	0.6942
Min-max	0.63-0.72	0.62-0.79	0.56-0.72	0.6-0.71	0.67-0.81	0.68-0.9	0.69-0.84	0.65- 0.81	0.6-0.91	0.65-0.73
25, 75% Percentile	0.64, 0.71	0.64, 0.71	0.59, 0.7	0.61, 0.71	0.69, 0.76	0.73, 0.87	0.7, 0.78	0.72, 0.8	0.62, 0.75	0.67, 0.73
CAT										
Sr.vr. ± sd	454.8±283.5	265.5±29.64	240.23±48.54	473.45±126.1	411.39±129.94	x	330.66±86.54	384.29±132.06	569.88±220.17	474.84±208.06
SEM	115.7	13.26	21.71	56.39	49.11	x	49.96	53.91	89.88	93.05
Mediana	373.7	272.9	227.8	487.5	407.3	x	306.5	392.7	629	556.9
Geo. Sr.vr.	399.2	264.1	236.3	459.2	389.3	x	323.5	363.1	506.3	432.8
Min-max	193-1007	218.1-290.9	185.9-292.6	317-598.1	180.6-568.1	x	258.8-426.7	191.6-565.4	143.7-726.6	229.4-698.4
25, 75% Percentile	297.1, 588.8	237.9, 289.4	195.8, 290.8	345.8, 594.1	340.2, 509.7	x	258.8, 426.7	265.3, 496.5	461.2, 724.5	253.6, 655.1
GST										
Sr.vr. ±sd	194.47±178.7	53.97±12.97	59.87±13.14	187.92±120.69	240.85±22.56	x	220.11±12.60	186.84±69.77	268±115.04	238.59±151.7
SEM	72.95	7.488	5.365	53.97	13.03	x	7.276	28.48	46.97	67.84
Mediana	157.9	51.24	62.47	142.3	247.3	x	225.4	189.9	320.4	307.7
Geo. Sr.vr.	137.2	52.96	58.54	166.6	240.1	x	219.9	173.5	223.4	187.5
Min-max	45.47-528.1	42.58-68.09	39.35-74.19	115.9-402.7	215.8-259.5	x	205.7-229.2	74.62-290.5	42.47-339.4	66.65-384.2
25, 75% Percentile	49.86, 301.6	42.58, 68.09	47.77, 71.16	123.1, 275.6	215.8, 259.5	x	205.7, 229.2	143.6, 229.8	199.4, 335.1	75.22, 367.4
CES										
Sr.vr. ±	393.04±172.43	289.8±189.72	216.13±52.61	328.37±97.22	310.01±83.47	x	292.82±107.05	386.52±135.22	372.36±132.08	420.63±145.89
SEM	70.4	84.85	23.53	43.48	31.55	x	61.81	55.2	53.92	65.24
Mediana	374.1	226.5	209.8	327.3	274.6	x	318.5	323.1	392.6	384.3
Geo. Sr.vr.	364.1	250.2	211.5	317.6	300	x	278	368.9	345.6	400.5
Min-max	220.2-690.5	131.6-609.3	161.5-302.1	238-478.5	191.3-412	x	175.3-384.7	275.6-596.1	142.6-513.7	281.6578.3
25, 75% Percentile	235.3, 516.9	154.4, 456.8	176, 259.4	242.6, 414.6	253.5, 403.1	x	175.3, 384.7	283.3, 535.6	287.5, 471.1	285.3, 574.1
ACHe										
Sr.vr. ±sd	29.08±21.48	22.99±7.3	16.44±9.3	18.01±7.77	24.68±7.84	x	21.79±8.46	34.12±8.20	25.26±7.91	28.63±9.27
SEM	8.768	3.265	4.16	3.476	2.964	x	4.884	3.347	3.227	4.145
Mediana	23.36	21.28	17.62	20.72	21.28	x	24.32	33.9	28.97	31.64
Geo. Sr.vr.	24.09	22.13	12.59	16.3	23.66	x	20.5	33.28	23.92	27.01
Min-max	9.24- 70.95	16.02- 34.07	2.25-26.04	6.789-27.31	15.12-37.57	x	12.35-28.7	24.43-43.24	11.77-32.83	13.21-36.79
25, 75% Percentile	17.03, 38.67	16.78, 30.06	7.82, 24.47	10.56, 24.1	19.54, 31.9	x	12.35, 28.7	25.59, 43.24	17.78, 30.12	20.36, 35.4
EROD										
Sr.vr. ±	8.79±16.19	1.97±1.11	0.59±0.31	6.74±7.42	3.99±3.13	2.66±3.35	2.27±1.66	2.96±1.66	6.50±7.29	1.73±1.27
SEM	6.118	0.4524	0.1257	3.029	1.401	1.499	0.7428	0.6792	2.976	0.5201
Mediana	1.753	1.746	0.511	3.877	2.752	0.432	1.704	2.716	3.56	1.324
Geo. Sr.vr.	2.647	1.722	0.5349	4.772	2.973	1.06	1.889	2.569	4.439	1.442
Min-max	0.61- 44.78	0.79-3.75	0.33-1.16	2.41-21.62	1.16-7.59	0.29-7.65	0.88-5.09	1.01-5.79	1.68-20.99	0.76-4.17
25, 75% Percentile	0.72, 9.64	1.09, 2.9	0.36, 0.78	2.57, 9.91	1.25, 7.36	0.3, 6.15	1.13, 3.7	1.64, 4.2	2.37, 10.19	0.9, 2.44

Sr.vr.-srednja vrednost, sd-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti, Geo.sr.vr.- geometrijska srednja vrednost, CAT-katalaza, CES-karboksilesteraza, GST- glutation s-transferaza, AChE-acetilholinesteraza, EROD- etoksirezorufin-O-deetilaza, x-nema podataka

P29. Mere centralne tendencije i varijacije normalizovane ekspresije gena kod jedinki vrste *A. alburnus* sa odabranih lokaliteta

Lokaliteti uzorkovanja	Normalizovana ekspresija gena				
	GST	<i>erk2</i>	<i>gpx1</i>	<i>nrf2a</i>	<i>mgst3a</i>
	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd
JDS 31	194.47±178.7	0.005±0.004	7.396±9.114	2.773±2.37	0.011±0.014
JDS 33	53.97±12.97	0.005±0.002	4.999±3.93	2.428±0.832	0.028±0.024
JDS 36	59.87±13.14	0.014±0.02	6.146±5.142	6.44±6.229	0.030±0.040
JDS 48	187.92±120.69	0.006±0.005	4.083±3.029	2.005±2.033	0.027±0.030
JDS 54	240.85±22.56	0.014±0.012	1.302±0.5	1.345±0.342	0.01±0.011
JDS 60	x	0.009±0.004	6.24±5.018	2.804±1.116	0.036±0.035
JDS 62	220.11±12.60	0.009±0.005	6.726±7.382	3.352±1.278	0.032±0.029
JDS 65	186.84±69.77	0.007±0.008	2.027±1.216	1.82±1.096	0.008±0.008
JDS 66	268±115.04	0.034±0.027	2.771±1.824	4.014±3.051	0.007±0.007
JDS 67	238.59±151.7	0.021±0.031	3.048±2.251	3.665±1.633	0.028±0.023

Sr.vr.-srednja vrednost, sd-standardna devijacija, SEM-standardna greška srednje vrednosti, Geo.sr.vr.- geometrijska srednja vrednost, CAT-katalaza, CES-karboksilesteraza, GST- glutation s-transferaza, AChE-acetilholinesteraza, EROD- etoksirezorufin-O-deetilaza, x-nema podataka, BCF-kondicioni faktor

P30. Mere centralne tendencije i varijacije aktivnosti enzima kod jedinki vrste *Neogobius sp.* sa odabranih lokaliteta

Aktivnost enzima					
Lokaliteti uzorkovanja	GST	CAT	CES	AChE	EROD
	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd	sr.vr.±sd
JDS 31	390.97±161	351.86±135.57	253.92±46.51	5.91±1.16	2.57±1.53
JDS 33	35.85±4.43	253.11±146.55	145.15±27.22	18.71±6.34	0.46±0.16
JDS 36	353.13±114.59	399.36±130.77	227.86±66.48	11.03±6.97	4.13±1.48
JDS 48	390.16±189.17	328.99±59.08	237.59±57.26	7.84±6.98	7.91±5.8
JDS 54	325.32±127.64	329.08±85.2	249.79±79.45	5.79±2.55	4.24±2.68
JDS 60	173.91±131.82	304.08±174.67	78.23±29.18	2.37±1.5	3.88±3.03
JDS 62	364.67±229.33	376.15±184.9	176.20±65.35	5.63±2.06	6.2±3.03
JDS 65	198.81±57.28	289.93±68	175.82±44	4.56±2.37	3.25±2.46
JDS 66	467.29±589.67	263.08±120.6	215.34±107.03	10.18±5.37	12.02±7.39
JDS 67	203.12±136.51	294.67±142.69	130.24±57.32	5.67±4.31	4.84±4.62

Sr.vr. –srednja vrednost, sd-standardna devijacija, CAT-katalaza, CES- karboksilesteraza, GST- glutation s-transferaza, AChE-acetilholinesteraza, EROD-etoksirezorufin-O-deetilaza

V Multiparametarski pristup

P31. Matrica za odlučivanje u WOE pristupu

Scenario	LOE1: Predviđeni koeficijent rizika za smešu	LOE2: Signal <i>in vitro</i> analiza koje su zasnovane na efektu?	LOE3: <i>In situ</i> efekti?	LOE4: Pogoršanje životnih zajednica?	Zaključak: Uticaj zagađenja na ekološki status?	Komentari
1	>1	da	da	da	<i>prisutan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje dokazano utiče na ekološki status na datim lokalitetima Mere za smanjenje rizika od hemikalija su potrebne
2	>1	da	da	ne	<i>verovatan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Prisutni su efekti na pojedinačne vrste, tj. ekološki uticaj zagađenja na datim lokalitetima je blizu ispoljavanja Hipoteza koja se treba ispitati: Uticaj na zajednice nije uočljiv zbog nedostatka podataka (npr. sezonske varijacije)
3	>1	da	ne	da	<i>verovatan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje verovatno uzrokuje ekološke uticaje na datim lokalitetima Hipoteza koja se treba ispitati: <i>in situ</i> testovi ne odražavaju sve relevantne načine delovanja
4	>1	da	ne	ne	<i>nejasno, potrebna su dodatna istraživanja</i>	<ul style="list-style-type: none"> Trenutno nema uticaja, ali postoje indikacije da su hemikalije potencijalni problem na datim lokalitetima dugoročno, u zavisnosti od veličine predviđenog koeficijenta rizika i rezultata specifičnih EDA. Potrebne su prateća <i>in situ</i> istraživanja i monitoring zajednica. Hipoteze koje se trebaju ispitati: (i) polutanti možda nisu biodostupni na terenu, (ii) proveriti validnost CA-zasnovane procene, (iii) proveriti konzistentnost ekotoksikoloških parametara EDA analiza i <i>in situ</i> testova i grupa organizama uključenih u uzorkovanje zajednica.
5	>1	ne	da	da	<i>prisutan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje najverovatnije uzrokuje ekološke uticaje na datim lokalitetima Hipoteza koja se treba ispitati: proveriti konzistentnost između nosilaca rizika identifikovanih CA procenom, parametara koji su korišćeni u <i>in situ</i> testovima i bioeseja i parametara korišćenih za EDA procene
6	>1	ne	da	ne	<i>nejasno, potrebna su dodatna istraživanja</i>	<ul style="list-style-type: none"> Efekti na pojedinačne vrste su prisutni npr. ekološki uticaj zagađenja na datim lokalitetima je blizu ispoljavanja. Nije jasno da li je uticaj izazvan hemikalijama Hipoteze koje se trebaju ispitati: (i) proveriti konzistentnost između nosilaca rizika identifikovanih CA procenom, parametre koji se koriste u <i>in situ</i> testovima i bioeseja korišćenih za EDA procenu i grupa organizama koje su uključene u uzorkovanje zajednica, (ii) proveriti da li uticaji na zajednice nisu vidljivi zbog nedostatka podataka (npr. sezonskih varijacija)
7	>1	ne	ne	da	<i>nejasno, potrebna su dodatna istraživanja</i>	<ul style="list-style-type: none"> Ekološki uticaji su prisutni na datim lokalitetima, ali uloga zagađenja nije jasna Hipoteze koje se trebaju evaluirati: (i) <i>in situ</i> testovi odgovaraju i parametri korišćeni u EDA analizama ne odražavaju sve relevantne načine delovanja, uporediti sa nosiocima rizika identifikovanim u CA analizama, (ii) proveriti validnost CA- zasnovane procene (posebno primenjene pragovne vrednosti za životnu sredinu), (iii) proveriti prisustvo nehemijskih stresora

Scenario	LOE1: Predvideni koeficijent rizika za smešu	LOE2: Signal <i>in vitro</i> analiza koje su zasnovane na efektu?	LOE3: <i>In situ</i> efekti?	LOE4: Pogoršanje životnih zajednica?	Zaključak: Uticaj zagađenja na ekološki status?	Komentari
8	>1	ne	ne	ne	<i>odsutan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje trenutno ne uzrokuje ekološke uticaje na datim lokalitetima. Ali u zavisnosti od veličine koeficijenta predviđenog rizika i njegovog specifičnog računanja, postoje indikacije da hemikalije mogu biti potencijalni problem dugoročno. Hipoteze koje se trebaju evaluirati: (i) polutanti uključeni u CA procenu mogu biti bionedostupni, (ii) validnost CA-zasnovane procene mora biti proverena (primenjene pragovne vrednosti)
9	<1	da	da	da	<i>prisutan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje uzrokuje ekološke uticaje na datim lokalitetima Hipoteze koje se trebaju evaluirati: (i) proveriti validnost CA-zasnovanih (pragovnih vrednosti za sredinske uslove koje su korišćene, uključujući hemikalije), (ii) proveriti prisustvo sinergističkih interakcija
10	<1	da	da	ne	<i>nejasno, potrebna su dodatna istraživanja</i>	<ul style="list-style-type: none"> Efekti na pojedinačne vrste su prisutni, npr. dati lokaliteti su blizu ispoljavanja ekološkog uticaja, potencijalno uzrokovanim zagađenjem Hipoteze koje se trebaju evaluirati: (i) proveriti validnost CA-zasnovane procene, u poređenju sa rezultatima iz EDA procene (uključujući hemikalije, korišćene pragovne vrednosti za životnu sredinu), (ii) uticaj na zajednice nije vidljiv zbog nedostatka podataka (npr. sezonskih varijacija)
11	<1	da	ne	da	<i>verovatan</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje verovatno uzrokuje ekološke uticaje na datim lokalitetima Hipoteze koje se trebaju evaluirati: (i) proveriti validnost CA-zasnovane procene (uključujući hemikalije, korišćene pragovne vrednosti za životnu sredinu) i uporediti da li su nosioci rizika koji su prepoznati u EDA analizama adekvatno uzeti u obzir, (ii) proveriti konzistentnost parametara koji su korišćeni u <i>in situ</i> testovima i EDA analizama
12	<1	da	ne	ne	<i>mala verovatnoća</i>	<ul style="list-style-type: none"> Zagađenje trenutno ne izaziva ekološke uticaje na datim lokalitetima Hipoteze koje se trebaju evaluirati: (i) EDA-identifikovani nosioci rizika nisu biodostupni na terenu, (ii) proveriti da li su EDA-identifikovani nosioci rizika uključeni u CA-zasnovane procene
13	<1	ne	da	da	<i>ne</i>	<ul style="list-style-type: none"> Ekološki uticaji su prisutni na datim lokalitetima, ali verovatno nisu izazvani zagađenjem Hipoteze koje se trebaju proceniti: (i) nehemijski stresori su prisutni, (ii) prisutni kontaminanti koji nisu uključeni u hemijski monitoring i EDA procenu, (iii) sinergističke interakcije, (iv) proveriti validnost CA-zasnovanih procena, (v) proveriti koliko je specifičan <i>set in situ</i> testova za zagađenje
14	<1	ne	da	ne	<i>ne</i>	<ul style="list-style-type: none"> Efekti na pojedinačne vrste su prisutni, npr. dati lokaliteti su blizu ispoljavanja ekoloških uticaja, najverovatnije nisu izazvani zagađenjem Hipoteze koje se trebaju ispitati: proveriti da li su u bateriji <i>in situ</i> testova dominantni parametri koji ukazuju na opšti stres / nehemijske stresore

Scenario	LOE1: Predvideni koeficijent rizika za smešu	LOE2: Signal <i>in vitro</i> analiza koje su zasnovane na efektu?	LOE3: <i>In situ</i> efekti?	LOE4: Pogoršanje životnih zajednica?	Zaključak: <i>Uticaj zagađenja na ekološki status?</i>	Komentari
15	<1	ne	ne	da	<i>ne</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ekološki uticaji su prisutni na datim lokalitetima, ali uticaji najverovatnije nisu izazvani zagađenjem</i> • <i>Hipoteze koje se trebaju ispitati: proveriti prisustvo uticaja nehemijskih stresora</i>
16	<1	ne	ne	ne	<i>ne</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bez uticaja, ni od zagađenja ni od drugih stresora ("netaknut" lokalitet)</i> • <i>Nisu potrebne dalje aktivnosti</i>

BIOGRAFIJA

Dina Tenji je rođena je 28. 03. 1989. godine u Novom Sadu. Završila je osnovnu školu



„Jovan Popović”, a potom gimnaziju „Svetozar Marković” u Novom Sadu. Studije Ekologije na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno - matematičkog fakulteta u Novom Sadu, upisuje školske 2008/2009 godine. Osnovne studije ekologije završava u roku sa prosečnom ocenom 9,24 i stiče zvanje Diplomirani ekolog. Nakon završenih osnovnih studija 2012. godine upisuje master studije na istom fakultetu, modul Ekološki inženjering. Master studije završava 2013. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i odbranom završnog rada sa istom ocenom pod

nazivom „Helmintofauna vodene voluharice *Arvicola amphibius* L. 1758 (Mammalia, Rodentia) Zapadne Bačke” Tokom osnovnih i master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Doktorske akademske studije, studijski program Doktor ekoloških nauka, upisuje školske 2013/2014 godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Sve ispite predviđene planom i programom položila je ocenom 10. Tokom doktorskih studija bila je dobitnik stipendije za doktorande Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. U rad Laboratorije za ekofiziologiju i ekotoksikologiju (LECOTOX) se uključila 2013. godine prilikom upisa doktorskih studija. Godine 2018. zapošljava se na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, kao istraživač- saradnik. Tokom doktorskih studija bila je angažovana za izvođenje vežbi iz predmeta Opšta zoologija i Ekotoksikologija. Autor je i koautor jednog naučnog rada u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti M21a kategorije, dva M21 kategorije, pet radova M22 kategorije, jednog rada u časopisu nacionalnog značaja (M52), i dvadeset saopštenja na međunarodnim i skupovima od nacionalnog značaja. Pored istraživačkog rada, član je društva za toksikologiju i hemiju životne sredine (SETAC), koordinator tima za naučno-istraživački rad Ekološkog udruženja Zeleni Sad i stručni saradnik u IS petnica Petnica. Učestvovala je na većem broju naučno-istraživačkih, edukativnih i društveno korisnih projekata.

Novi Sad, 14. 03. 2022.

Dina Tenji

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Biomarkeri kod riba u monitoringu statusa akvatičnih ekosistema i identifikaciji efekata hemijskog stresa in situ
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Истраживања су спроведена у оквиру међународног пројекта EU FP 7 SOLUTIONS (евиденциони број 603437) и националног пројекта „Ксенобиотици са хормонском активношћу: репродуктивни, метаболички, развојни одговори и механизам дејства код одабраних модел организама и ћелијских линија“ (евиденциони број ОИ 173037) Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије
1. Опис података
<i>1. Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Студија представља истраживање у оквиру докторске дисертације која је за циљ имала допринос развоју комплексног мултипараметарског дијагностичког приступа за идентификацију хемијског стреса као значајног притиска на акватичне екосистеме у реалним мултистрес условима. Циљеви истраживања су били усмерени на оптимизацију батерије биомаркера код риба, са посебним акцентом на интеграцију класичних физиолошких и ензиматских са молекуларним маркерима, дефинисање индивидуалних специфичних тежинских фактора, унапређење теренских протокола и експерименталне поставке (кавезни систем излагања) који ће омогућити примену биомаркера на различитим нивоима просторно временске организације, у зависности од циљева истражног мониторинг програма - од идентификације утицаја специфичног тачкастог извора загађења, кључних хазардних материја / смеша и критичних локација на водним телима до интеграције биомаркера у маршрутна испитивања у циљу процене еколошког статуса водног тела или екосистема као целине и оцене ефикасности предузетих управљачких мера, са посебним акцентом на велике реке. У националним оквирима, истраживање доприноси процени утицаја одабраних тачкастих загађивача и стања екосистема на критичним одабраним локацијама у нашој земљи.
<i>1.2 Врсте података</i> а) квантитативни б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

- a) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) **узорци ткива:** *Alburnus alburnus*, *Abramis brama*, *Cyprinus carpio*
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____
- е) **текст:** текстуални подаци за преглед литературе и тумачење резултата; опис истраживаних подручја/локалитета
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) **остало:** лабораторијски експерименти и мерења; узорковање на терену

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) **Excel фајл, датотека .xlsx**
- б) SPSS фајл, датотека _____
- в) **PDF фајл, датотека .pdf**
- д) **Текст фајл, датотека .doc**
- е) **JPG фајл, датотека .jpg**
- ф) **Остало, датотека .tiff; .pzf; .pzfx**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли: истраживање садржи велики број варијабли из две студије случаја, које су анализирани на укупно више од 10 локалитета (у две студије случаја), а подразумевају велики број гена, ензима и морфометријских параметара код три врсте риба, као и резултате *in vitro* анализе.
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): Мерење сваког параметра је изведено у триплекату, док је број јединки риба по локалитету износио, 10-20 јединки *C. carpio*, 10-14 јединки *A. brama* и 4-6 јединки *A. alburnus*.

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је _____

б) варијабле које се више пута мере односе се на _____

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: анализе биомаркера *in vitro* и у ткивима јединки три врсте риба

б) корелационо истраживање, навести тип: анализе варијанси, главних компоненти, Pearsonових корелационих коефицијената

ц) анализа текста, навести тип: прикупљање литературних података из доступних извора

д) остало, навести шта: теренско узорковање вршено ради прикупљања узорака јединки врсте *A. brama*

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

Спектрофотометар; RT-PCR

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

—

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичком анализом добијених података, као и поређењем добијених података са литературним подацима из релевантних извора, док су анализе вођене принципима добре лабораторијске праксе.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је извршена поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.1.2. URL адреса <https://www.cris.uns.ac.rs/index.jsf> и <https://nardus.mpn.gov.rs/>

3.1.3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00316-7>

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација са прилогом ће бити депонована у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских

дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање 20.06.2018. Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња, Универзитета у Новом Саду

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално-без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Дина Тењи; dinatenji@gmail.com; dina.tenji@dbe.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Дина Тењи; dinatenji@gmail.com; dina.tenji@dbe.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Дина Тењи; dinatenji@gmail.com; dina.tenji@dbe.uns.ac.rs