



MD



9. MEMORIJALNI NAUČNI SKUP IZ ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE  
„**DOCENT DR MILENA DALMACIJA**“  
31.03. - 01.04.2022.

# KNJIGA RADOVA



# Organizatori



Univerzitet u Novom Sadu

Prirodno-matematički fakultet



Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu  
životne sredine

Fondacija "Docent dr Milena Dalmacija"



WasteWaterForce, PROMIS projekat

## KNJIGA RADOVA

IZDAVAČ  
GLAVNI UREDNIK

9. Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine  
„Docent dr Milena Dalmacija“  
Prirodno-matematički fakultet, UNS  
dr Anita Leovac Maćerak, dr Đurđa Kerkez,  
dr Dragana Tomašević Pilipović

CIP - Katalogizacija u publikaciji  
Biblioteke Matice srpske, Novi Sad

502.17(082)

**MEMORIЈАЛНИ научни skup iz zaštite životne sredine "Доцент др Милена Далмација" (9 ; 2022 ; Нови Сад)**

Knjiga radova [Elektronski izvor] / 9. memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine "Docent dr Milena Dalmacija", 31.03. - 01.04.2022, Novi Sad ; [glavni urednik Anita Leovac Maćerak, Đurđa Kerkez, Dragana Tomašević Pilipović]. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, 2022. - 1 elektronski optički disk (CD ROM) ; 12 cm

Nasl. sa naslovnog ekrana. - Tiraž 100. - Bibliografija uz svaki rad.

ISBN 978-86-7031-604-1

a) Животна средина - Заштита - Зборници

COBISS.SR-ID 62984969



## **Naučni odbor:**

- dr Miladin Gligorić, redovni profesor u penziji, Tehnološki fakultet Zvornik, Univerzitet u Istočnom Sarajevu
- dr Olga Petrović, redovni profesor PMF u penziji, Univerziteta u Novom Sadu
- dr Jasmina Agbaba, redovni profesor, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Srđan Rončević, redovni profesor, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Dragan Radnović, redovni profesor PMF, Univerziteta u Novom Sadu
- dr Dušan Mrđa, redovni profesor PMF, Univerziteta u Novom Sadu
- dr Milena Bečelić-Tomin, redovni profesor PMF, Univerziteta u Novom Sadu
- dr Miljana Prica, redovni profesor FTN, Univerziteta u Novom Sadu
- dr Snežana Maletić, redovni profesor PMF, Univerziteta u Novom Sadu
- dr Dejan Krčmar, redovni profesor PMF, Univerziteta u Novom Sadu

## **Organizacioni odbor:**

- dr Đurđa Kerkez, vanredni profesor, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Dragana Tomašević Pilipović, vanredni profesor, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Anita Leovac Mačerak, docent, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Jelena Beljin, docent, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Aleksandra Tubić, vanredni profesor, PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Marijana Kragulj Isakovski, vanredni profesor PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- dr Vesna Pešić, docent PMF, Univerzitet u Novom Sadu
- Nada Popsavin, stručni saradnik za odnose sa javnošću, PMF, Univerzitet u Novom Sadu

# Sadržaj



## Sekcija: Voda (V)

**V-01.** Nadiia Khakimova, Nikola Maravić, Petar Davidović, Dajana Blagojević, Milena Bečelić-Tomin, Jelica Simeunović, Vesna Pešić, Zita Šereš, Anamarija Mandić, Milica Pojić, Aleksandra Mišan: *Potencijal mikroalgi u prečišćavanju otpadnih voda prehrambene industrije (plenarno predavanje)*

**V-02.** Jovana Jovanović Marić, Margareta Kračun-Kolarević, Stoimir Kolarević, Jelena Đorđević, Karolina Sunjog, Jovana Kostić-Vuković, Momir Paunović, Branka Vuković-Gačić: *Ispitivanje osjetljivosti testova i pristupa u ekogenotoksikološkim istraživanjima na velikim ravničarskim rekama – studije slučaja Velika Morava i Sava (pozivno predavanje)*

**V-03.** Minja Bogunović: *Ponašanje benzofenona i kofeina u tretmanima voda (pozivno predavanje)*

**V-04.** Filip Arnaut, Branislav Sretenović, Vesna Damjanović, Vesna Cvetkov: *Elektrometrijska ispitivanja vodoizvorišta Makiš*

**V-05.** Olga Jakovljević, Marija Pečić, Slađana Popović, Ivana Trbojević, Gordana Subakov-Simić, Jelena Krizmanić, Dragana Predojević: *Zajednice algi u proceni stanja i zaštiti površinskih voda na primeru jedinstvenog ekosistema Zasavice*

**V-06.** Aleksandar Jovanović, Mladen Bugarčić, Marija Stevanović, Maja Đolić, Anđelka Tomašević, Aleksandar Marinković: *Primena procesa fotokatalize za razgradnju pesticida u industrijskim otpadnim vodama*

**V-07.** Aleksandra Kulić Mandić, Milena Bečelić-Tomin, Gordana Pucar Milidrag, Anita Leovac Maćerak, Vesna Pešić, Đurđa Kerkez: *Kaskadiranje otpadnih industrijskih ostataka i potencijalna primena u tretmanu obojenih otpadnih voda*

**V-08.** Milena Lakićević, Mia Vicković: *Kartiranje specijalnih rezervata prirode hidrološkog karaktera*

**V-09.** Anita Leovac Maćerak, Vesna Pešić, Milena Bečelić-Tomin, Aleksandra Kulić Mandić, Dragana Tomašević Pilipović, Đurđa Kerkez: *Primena „zelenih“ materijala u Fenton procesu obezvodnjavanja muljeva sa PTOV*

**V-10.** Milomirka Obrenović, Jelena Vuković, Aleksandar Došić, Ivan Savić, Zoran Obrenović: *Upotreba industrijskog i poljoprivrednog otpada za adsorpciju nitrata iz otpadnih voda – pregledni rad*

**V-11.** Đorđe Pejin, Dejan Krčmar, Slaven Tenodi, Radivoje Tomić, Vesna Pešić: *Upravljanje otpadnim tokovima u industriji proizvodnje piva*

**V-12.** Mirjana Petronijević, Sanja Panić, Igor Antić, Nenad Grba, Maja Buljovčić, Nataša Đurišić-Mladenović: *Adsorpcija fenola iz vode primenom biougla sintetisanog iz otpadne drvne biomase*

**V-13.** Milica Stojković: *Fotokatalično obezbojavanje arilazo piridonskih boja dipolarne strukture sa elektron-donorskim supstituentima*

**V-14.** Vesna Vasić, Dragana Kukić, Marina Šćiban, Ivana Čabarkapa, Jelena Prodanović: *Preliminarna ispitivanja algi roda Chlorella i Spirulina kao potencijalnih biosorbenata za uklanjanje jona hroma iz vode*

## **Sekcija: Upravljanje otpadom (UO)**

**UO-01.** Ivana Pajčin, Vanja Vlajkov, Jovana Grahovac: *Održiva proizvodnja biokontrolnih agenasa za poljoprivredu – sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela kao sirovina (pozivno predavanje)*

**UO-02.** Dario Balaban: *Mogućnosti povećanja energetske efikasnosti i ekonomske isplativosti procesa gasifikacije otpada kroz koncept poligeneracije*

**UO-03.** Jelena Krneta Nikolić, Ivana Vukanac, Milica Rajačić, Nataša Sarap, Dragana Todorović i Marija Janković: *Radiološka karakterizacija otpadnih materijala crvenog mulja, fosfogipsa i pepela*

**UO-04.** Vanja Vlajkov, Ivana Pajčin, Marta Loc, Mila Grahovac, Jovana Grahovac: *Proizvodnja mikrobioloških biopesticida kao ekološko rešenje za valorizaciju efluenta industrije*

**UO-05.** Ida Zahović, Jelena Dodić, Zorana Trivunović: *Valorizacija sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela: stanje i perspektive*

## **Sekcija: Održivi razvoj (OR)**

**OR-01.** Milica Velimirović Fanfani: *Nanočestice: kako pronaći iglu u plastu sena? (plenarno predavanje)*

**OR-02.** Angelina Pavlović, Marko Đapan, Goran Bošković, Nebojša Jovičić: *Bezbednost i zdravlje na radu u kontekstu održivog razvoja i cirkularne ekonomije u automobilske industriji*

## **Sekcija: Zemljište(Z)**

**Z-01.** Olja Šovljanski, Ana Tomić, Siniša Markov: *Biokalifikujući potencijal ureolitičke bakterije Sporosarcina pasteurii*

## **Sekcija: Sediment (S)**

**S-01.** Milica Rajačić, Dragana Todorović, Ivana Vukanac, Jelena Krneta Nikolić, Marija Janković, Nataša Sarap: *Prirodna radioaktivnost u sedimentu reke Dunav*

## Ispitivanje osetljivosti testova i pristupa u ekogenotoksikološkim istraživanjima na velikim ravničarskim rekama – studije slučaja Velika Morava i Sava

Jovana Jovanović Marić<sup>1\*</sup>, Margareta Kračun-Kolarević<sup>1</sup>, Stoimir Kolarević<sup>1</sup>, Jelena Đorđević<sup>2,3</sup>, Karolina Sunjog<sup>2</sup>, Jovana Kostić-Vuković<sup>2</sup>, Momir Paunović<sup>1</sup>, Branka Vuković-Gačić<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Odeljenje za hidroekologiju i zaštitu voda, Bulevar despota Stefana 142, Beograd; \*jovana.maric@ibiss.bg.ac.rs

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Odsek za biologiju i zaštitu kopnenih voda, Kneza Višeslava 1, Beograd

<sup>3</sup>Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Katedra za mikrobiologiju, Centar za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Studentski trg 16, Beograd

### Izvod

Velika, Zapadna, Južna Morava, kao i Sava, Kolubara i Barička reka su pod značajnim uticajem komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Ciljevi studije su procena genotoksičnog potencijala analiziranih lokaliteta i ispitivanje osetljivosti primenjenih biotestova i pristupa istraživanja. Studija slučaja Velika Morava obuhvatila je veliko ispitivano područje na osam lokaliteta na Velikoj, Zapadnoj i Južnoj Moravi, a u studiji Sava ispitivano je tri prostorno bliska lokaliteta koji su pod različitim pritiscima zagađenja. U *in silico* pristupu na osnovu literaturnih podataka analiziran je toksični/genotoksični potencijal jedinjenja detektovanih u vodi. *Ex situ/in vitro* pristup obuhvatio je ispitivanje genotoksičnog potencijala pomoću SOS/*umuC* testa, kao i primenom alkalnog komet testa na HepG2 ćelijskoj liniji. U *in situ/in vivo* istraživanju analizirano je DNK oštećenje ćelija krvi vrste *Alburnus alburnus* (uklija) pomoću alkalnog, Fpg-modifikovanog komet testa i mikronukleus testa. Rezultati su pokazali različitu osetljivost zavisno od upotrebljenih testova i pristupa, ali i različit odgovor kod uklija u zavisnosti od tipa zagađenja na lokalitetima. *In silico* i *ex situ/in vitro* pristupi su pokazali niži stepen osetljivosti u odnosu na *in situ/in vivo* testove, a alkalni komet test je pokazao najveći potencijal u diskriminaciji lokaliteta. Utvrđeno je da uklija može biti pouzdan bioindikator u ekogenotoksikološkim istraživanjima velikih ravničarskih reka.

**Ključne reči:** velike ravničarske reke, ekogenotoksikološka istraživanja, *in silico* pristup, *ex situ* pristup, *in situ* pristup, *Alburnus alburnus*.

### Uvod

Velika, Zapadna i Južna Morava, kao i Sava, Kolubara i Barička reka su pod jakim antropogenim pritiscima s obzirom da se pojedini delovi njihovih tokova odlikuju gustom naseljenosti i/ili intenzivnim poljoprivrednim i industrijskim aktivnostima. Iz tog razloga, komunalne i industrijske otpadne vode, kao i agensi koji se koriste u poljoprivredi predstavljaju glavne izvore zagađenja ovih reka. Međutim, ravničarske reke se često karakterišu velikim dilucionim kapacitetima, što dovodi do razblaženja zagađujućih agenasa, te standardnim hemijskim analizama često ne mogu biti detektovana jedinjenja koja su u vodi prisutna u niskim koncentracijama (ng/l, µg/l). Sa druge strane, pojedini ksenobiotici mogu i u niskim koncentracijama indukovati promene u organizmima, a neki od njih se mogu akumulirati i biomagnifikovati u lancu ishrane, što predstavlja dodatni rizik po zdravlje kako organizama koji naseljavaju akvatičnu sredinu, tako i onih koji se njima hrane [1].

Imajući u vidu finansijska ograničenja, kao i dostupnost savremene analitičke opreme, u okviru nadzornog monitoringa nije moguće identifikovati sve agense koji su prisutni u vodi. Pored toga, hemijske analize ne mogu pružiti informacije o mogućim kumulativnim ili antagonističkim efektima hemijskih agenasa na organizme. Sa druge strane, analiza biomarkera na nižim nivoima biološke organizacije (molekuli, ćelije) može ukazati na uticaj ksenobiotika na biološke sisteme i pre nego što se taj uticaj odrazi na nivou populacije ili čak na nivou datog



ekosistema. Oštećenje DNK molekula je važan biomarker, s obzirom da se ova oštećenja mogu negativno odraziti ne samo na nivou ćelije i/ili organizma, već mogu uticati i na strukturu populacije.

Danas postoji veliki broj biotestova i pristupa koji se koriste u ekogenotoksikološkim istraživanjima akvatičnih ekosistema. Jedan od najčešće korišćenih testova za detekciju toksičnog i genotoksičnog efekta kod prokariota je SOS/*umuC* test na bakterijskom soju *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 [2]. Za detekciju genotoksičnog efekta na eukariotskim ćelijama, često se koristi alkalni komet test jer omogućava detekciju biomarkera izlaganja [3]. Takođe, razvijen je i tzv. Fpg-modifikovani komet test koji podrazumeva tretman ćelija enzimom foramidopirimidin glikozilazom (Fpg), što omogućava detekciju i DNK oštećenja koja su posledica oksidativnog stresa [4]. Sa druge strane, mikronukleus test omogućava detekciju biomarkera efekta [5]. Dodatno, istraživanja se mogu sprovoditi u *in vitro* uslovima, često na različitim tipovima ćelijskih linija, odnosno u *in vivo* uslovima, na različitim grupama organizama. Pored toga, istraživanja se mogu sprovoditi u *in situ* uslovima, odnosno u životnoj sredini, ali i *ex situ*, u laboratorijskim uslovima. Poslednjih godina često se primenjuje *in silico* pristup, koji se zasniva na predikciji biološke aktivnosti hemijskih agenasa na osnovu njihove strukture [6]. Uprkos velikom broju biotestova i pristupa, za sada ne međulaboratorijska kalibracija pojedinih metoda, niti postoji usaglašenost naučne zajednice o preporukama koje testove i pristupe bi trebalo primeniti u ekogenotoksikološkim istraživanjima akvatičnih ekosistema.

Imajući u vidu da su analizirane reke pod uticajem različitih tipova tačkastih i difuznih izvora zagađenja, jedan od osnovnih ciljeva istraživanja je procena genotoksičnog potencijala ispitivanih lokaliteta. Pored toga, ispitivana je osetljivost *in vitro* i *in vivo* biotestova koji se koriste u ekogenotoksikološkim istraživanjima velikih ravničarskih reka. Studija u slivu Velike Morave obuhvatila je prostorno veliko područje istraživanja sa ukupno osam lokaliteta, dok je studija u slivu Save rađena na tri prostorno bliska lokaliteta. U okviru *in vitro* pristupa ispitivan je toksični i genotoksični potencijal nativnih uzoraka vode SOS/*umuC* testom i alkalnim komet testom na HepG2 ćelijskoj liniji. *In situ* istraživanje rađeno je na vrsti *Alburnus alburnus* (uklija), a za analizu genotoksičnog efekta korišćena je krv u alkalnom komet, Fpg-modifikovanom komet i mikronukleus testu. Na osnovu podataka godišnjeg monitoringa (podaci preuzeti od Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije - SEPA i Gradskog zavoda za javno zdravlje Beograd - GZZJZ Beograd) i analizom literaturnih podataka vršena je procena zagađenja ispitivanih lokaliteta i njihov toksični potencijal.

## Eksperimentalni deo

### Opis područja istraživanja

Studija slučaja Velika Morava sprovedeno je tokom avgusta i septembra 2016. godine. Na Velikoj Moravi su odabrana dva lokaliteta (nizvodno od Svilajнца, VM1, i nizvodno od Požarevca, VM2) i po tri lokaliteta na Zapadnoj Moravi (lokalitet u ataru sela Obrve, ZM1, zatim nizvodno od Kraljeva, ZM2, i u ataru sela Ugljarevo, ZN3) i Južnoj Moravi (nizvodno od Leskovca, JM1, u ataru sela Batušinac, JM2, i kod Stalaća, JM3). Kao bazalne ("referentne") vrednosti genotoksičnog odgovora kod uklija korišćeni su podaci iz studije Kolarević i sar. [7] koji su dobijeni za lokalitet uzvodno od Šapca na Savi (RS), s obzirom da je u datom slučaju utvrđen najniži nivo genotoksičnog odgovora kod ove vrste.

Studija slučaja Sava sprovedena je u aprilu 2019. godine na prostorno bliskim lokalitetima: lokalitet Sava Zabran (nalazi se na obali obrenovačkog izletišta Zabran, SZ), ušće Kolubare (UK, nalazi se nizvodno od lokaliteta SZ i nizvodno od ispusta otpadnih voda iz Obrenovca) i ušće Baričke reke (UB, nalazi se nizvodno od lokaliteta UK, u Baričku reku ispuštaju se komunalne i industrijske otpadne vode naselja Barič).

### *In silico* pristup

Iz SEPA i GZZJZ Beograd baze podataka preuzeti su podaci fizičko-hemijskih i hemijskih parametara merenih tokom godišnjeg nadzornog monitoringa na mernim stanicama

koje su najbliže ispitivanim lokalitetima. Pregledom literature je utvrđeno koji analizirani hemijski parametri poseduju toksični/genotoksični potencijal. Detektovane koncentracije kao i najniže koncentracije za koje je pretpostavljeno da ne indukuju efekat (engl. *predicted non-effect concentration*, PNEC; podaci preuzeti iz ECHA i NORMAN baze podataka) korišćene su za računanje sume jedinica toksičnosti (engl. *sum of toxic units*, SumTU) [8] i procenu toksičnog/genotoksičnog potencijala vode sa ispitivanih lokaliteta.

### **Ex situ pristup**

U okviru studije slučaja Velika Morava ispitivan je cito/genotoksični potencijal nativnih uzoraka vode u *ex situ/in vitro* istraživanju. Primenom SOS/*umuC* testa testirani su uzorci sa (S9+) i bez metaboličke aktivacije (S9-) prema proceduri koji su opisali Žegura i sar. [9]. Vijabilnost HepG2 ćelija nakon tretmana uzorcima vode utvrđena je diferencijalnim bojenjem akrudin oranž/etidijum bromid [10]. U slučaju kada je vijabilnost manja od 70 %, smatra se da su uzorci citotoksični i isključuju se iz dalje analize. Tretman HepG2 ćelija i alkalni komet test izvedeni su na način koji je detaljno opisan u studiji Kračun-Kolarević i sar. [11]. Primenom fluorescentnog mikroskopa i programa Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK) analizirana su DNK oštećenja, a parametar intenzitet repa komete (engl. *Tail Intensity*, TI (%)) je korišćen za kvantifikaciju DNK oštećenja.

### **In situ pristup**

U obe studije sa svakog lokaliteta uzorkovano je po 10 jedinki uklija, a krv jedinki je korišćena u genotoksikološkim analizama. U slučaju studije Velika Morava, uzorci krvi su krioprezervirani kao što je prethodno opisano u radu Kračun-Kolarević i sar. [11], dok su u studiji Sava uzorci krvi obrađeni istog dana. Diferencijalnim bojenjem je određena vijabilnost ćelija, nakon čega je urađen alkalni komet test prema ranije opisanoj proceduri [10]. U slučaju studije Velika Morava, pored alkalnog komet testa, urađen je i Fpg-modifikovani komet kao što je detaljno opisano u studiji Kračun-Kolarević i sar. [11]. Dodatno, u obe studije rađen je mikronukleus test, u okviru koga je analizirana učestalost mikronukleusa u ćelijama krvi (MN ‰), po proceduri objašnjenom u doktorskoj disertaciji Jovanović Marić [10].

## **Rezultati i diskusija**

### **In silico analiza**

U studiji Velika Morava od ukupno 68 hemijskih parametara koji su praćeni i detektovani redovnim monitoringom, za 28 parametara je utvrđeno da poseduju toksični potencijal (pesticidi, metali, metaloidi, policiklični aromatični ugljovodonici, 4-nonilfenol). Uzimajući u obzir prosečne godišnje koncentracije i PNEC vrednosti, najveća SumTU vrednost je dobijena za lokalitet JM3, što ukazuje na najveći toksični potencijal vode na datom lokalitetu. Najniža SumTU vrednost je dobijena na lokalitetu ZM1 (Slika 1A).

U studiji Sava, na osnovu podataka hemijskih parametara koji su detektovani tokom monitoringa, toksični potencijal je utvrđen za osam parametara (pesticidi, metali i metaloidi). Na osnovu ovih parametara, najveća SumTU vrednost dobijena je za lokalitet UK, dok je najniža zabeležena za SZ (Slika 1A).

*In silico* analizom utvrđeno je da hemijski agensi koji poseduju toksičan, poseduju i genotoksičan potencijal, a mehanizam dejstva većine analiziranih parametara je indukcija oksidativnog stresa.

### **Ex situ pristup**

U SOS/*umuC* testu nije detektovan ni citotoksičan i genotoksičan efekat ispitivanih uzoraka sa i bez metaboličke aktivacije u slivu Velike Morave. Rezultati ovog i prethodnih istraživanja [7, 9], kao i preporučena koncentracija pozitivne kontrole benzo(a)pirena koja je 300 puta veća u odnosu dozvoljenu u vodi [12] ukazuju na upitnu osetljivost testa u analizi nativnih uzorka vode.

Nakon tretmana HepG2 ćelija nativnim uzorcima rečne vode nisu zabeleženi toksični i genotoksični efekti. Jedan od razloga za to može biti sama metodologija. Odnosno, po protokolu finalna koncentracija nativnih uzoraka u samom tretmanu je 30 % od ukupne

zapremine medijuma u kojem se ćelije tretiraju (engl. *relative enrichment factor* – REF=0.3). U prilog pretpostavci da je za analizu uzoraka rečne vode neophodno vršiti njihovo koncentrisanje do većih REF-ova govori i studija Feretti i sar. [13] gde je detektovan genotoksični efekat, ali pri REF 200, 400 i 600.

### **In situ pristup**

U studiji Velika Morava, vijabilnost ćelija krvi uklija iznosila je iznad 70 %. Kao i u prethodnim istraživanjima, i u ovom istraživanju rezultati ukazuju da krioprezervacija ne smanjuje vijabilnost ćelija krvi [7, 11]. Sa druge strane, u slivu Save, vijabilnost uzoraka krvi dve jedinice sa SZ i četiri sa UK bila je niža od 70 %, zbog čega su ovi uzorci isključeni iz genotoksikoloških analiza.

U alkalnom komet testu najveći nivo DNK oštećenja u studiji Velika Morava detektovan je na lokalitetu ZM1, a najniži na JM2 (Slika 1B). Utvrđena je statistički značajna razlika između TI (%) vrednosti kontrolnog, RS, i ostalih lokaliteta, izuzev JM2. Zanimljivo je da je najveća TI (%) vrednost zabeležena na lokalitetima za koje je utvrđeno da nisu pod uticajem toksičnih i genotoksičnih agensa prema *in silico* analizi i SumTU vrednostima. To se posebno uočava u slučaju ZM1 i ZM3 koji se ne nalaze neposredno nizvodno od gradskih naselja, zbog čega se može pretpostaviti da su u indukciji DNK oštećenja učestvovali i agensi čije prisustvo nije praćeno tokom redovnog monitoringa. Slično je pokazano i u studiji u kojoj je zabeleženo značajno povećanje DNK oštećenja u ćelijama krvi šarana (*Cyprinus carpio*) na lokalitetu uzvodno od ispusta otpadnih voda Novog Sada u odnosu na kontrolnu grupu [14], pri čemu je na ispitivanom lokalitetu prema dostupnim podacima hemijskih analiza koncentrisanog uzorka vode utvrđeno da nije pod značajnim uticajem zagađenja.

Najveći udeo 8-okso guanina (8-oxoG) u Fpg-modifikovanom komet testu utvrđen je na lokalitetu JM1, a najniži na JM2 (Slika 1B). S obzirom da se neto 8-oxoG smatra indikatorom uticaja oksidativnog stresa na indukciju DNK oštećenja [11], možemo zaključiti da je jedino na lokalitetu JM2 oksidativni stres imao značajnu ulogu u indukciji DNK oštećenja. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između TI (%) vrednosti dobijenih alkalnim i Fpg-modifikovanim komet testom, a slični rezultati su dobijeni studiji Kolarević i sar. [7]. Iako su u vodi na lokalitetima detektovani agenasi koji mogu indukovati oksidativni stres (metali, metaloidi, pesticidi, itd.), odsustvo korelacije između TI (%) vrednosti dobijenih u alkalnom i Fpg-modifikovanom komet testu ukazuje da su na nastanak DNK oštećenja uticali i agensi čiji mehanizam dejstva nije indukcija oksidativnog stresa.

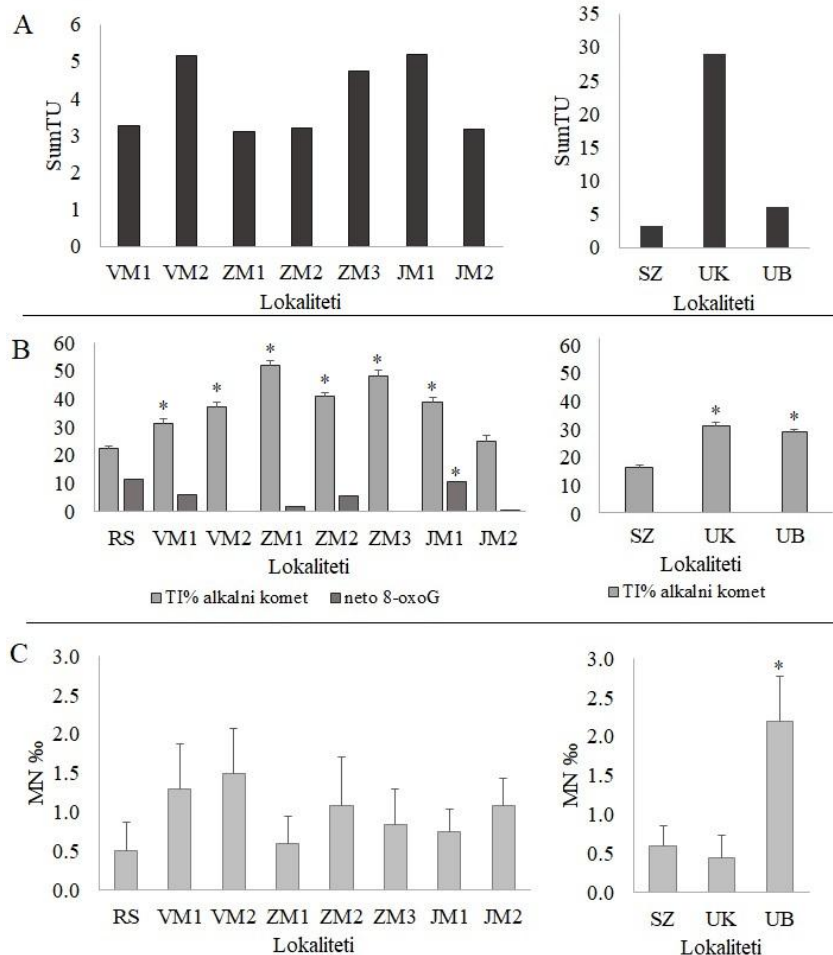
U studiji Sava, alkalnim komet testom detektovan je visok nivo DNK oštećenja na lokalitetima UK i UB, dok je najniži nivo zabeležen na SZ (Slika 1B). Utvrđena je statistički značajna razlika poređenjem TI (%) vrednosti sa SZ i ostala dva lokaliteta. Na lokalitetima UK i UB zabeležene su i visoke SumTU vrednosti u odnosu na SZ, što ukazuje da su hemijski agensi koji su detektovani tokom monitoringa i za koje je utvrđen toksični potencijal, verovatno uticali i na indukciju DNK oštećenja. Takođe, na UK i UB uočene su i visoke koncentracije organskog zagađenja koje ukazuju na uticaj komunalnih otpadnih voda na ovim lokalitetima. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima [14], u kojoj je takođe zabeležen visok nivo DNK oštećenja u ćelijama krvi šarana na lokalitetu koji se nalazi nizvodno od kolektora otpadnih voda u odnosu na lokalitet koji su se nalazi uzvodno.

U studiji Velika Morava nije zabeležena statistički značajna razlika u učestalosti MN u ćelijama krvi uklija između RS i ostalih lokaliteta (Slika 1C). U studiji Deutschmann i sar. [15] takođe je analizirana učestalost MN u ćelijama krvi uklija na 18 lokaliteta na Dunavu, a statistički značajna razlika u odnosu na referentne vrednosti dobijena je samo za jedan lokalitet.

U studiji Sava, najveći broj MN detektovan je u ćelijama krvi sa lokaliteta UB (Slika 1C), a statistički značajna razlika je utvrđena jedino poređenjem ovog lokaliteta sa SZ i UK. Na UB učestalost MN bila je veća u odnosu na rezultate studije na Savi [7], Dunavu [15] i studiji slučaja Velika Morava, gde je ukupno ispitivano 38 lokaliteta, pri čemu je stopa učestalosti MN na UB bila viša u odnosu na 35 lokaliteta. Dobijeni rezultati mogu biti posledica uticaja

hemijskih agenasa na lokalitetu UB koji mogu biti poreklom iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda naselja Barič, ali i malog protoka Baričke reke.

U obe studije nije utvrđena statistički značajna korelacija TI % vrednosti dobijenih u alkalnom komet testu i učestalosti MN, a rezultati su u skladu sa studijom Kračun-Kolarević i sar. [11] u kojoj takođe nije dobijena korelacija između ova dva parametra. Jedan od razloga odsustva korelacije može biti tip oštećenja koje se detektuje mikronukleus testom, odnosno trajnim oštećenjima (klastogene i/ili aneugene promene). U skladu sa tim, može se pretpostaviti da je nastanak MN u ćelijama krvi uklija sa ispitivanih lokaliteta redak događaj jer su, u većini slučajeva, oštećenja nastala na genetičkom materijalu bila uspešno ispravljena.



Slika 1. SumTU vrednosti (A), nivo DNK oštećenja detektovano u alkalnom komet testu (TI % vrednosti  $\pm$  standardna greška), Fpg-modifikovanom komet testu (neto 8-oxoG) (B) i mikronukleus testu (učestalost MN%  $\pm$  standardna greška) (C), \* označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni lokalitet.

### Zaključak

Studije slučaja Velika Morava i Sava pružile su sveobuhvatne podatke o genotoksičnom potencijalu ispitivanih lokaliteta na osnovu kojih je utvrđeno da su lokaliteti pod različitim stepenom zagađenja. Poređenjem SumTU vrednosti i rezultata biotestova uočeno je da se *in silico* analizom ne može u potpunosti predvideti nivo biološkog odgovora na dejstvo genotoksičnih agenasa koji su prisutni u vodi. Takođe, rezultati *ex situ/in vitro* istraživanja su pokazali da biotestovi nisu pokazali visok stepen osjetljivosti u detekciji cito/genotoksičnog efekta nativnih uzoraka vode, te da se u ovim biotestovima može očekivati odgovor u slučaju testiranja nativnih uzoraka jako zagađenih lokaliteta, kao što su npr. neprerađene otpadne vode, ili koncentrisanih uzoraka vode. Sa druge strane, *in situ/in vivo* testovi omogućili su kompletniji uvid u genotoksični potencijal lokaliteta, a alkalni komet test se pokazao kao osjetljiva metoda u detekciji genotoksičnog efekta u ćelijama krvi uklija. Prema našim saznanjima, studija Sava je prvo istraživanje u kome je utvrđeno da je uklija pouzdan

bioindikator u diskriminaciji prostorno bliskih lokaliteta koji su pod različitim uticajem zagađenja.

### Literatura

- [1] Yarsan, E., Yipel, M. (2013). The important terms of marine pollution “biomarkers and biomonitoring, bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification”. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, 1(2).
- [2] ISO/CD, 13829 (2000). Water Quality – Determination of the Genotoxicity of Water and Waste Water Using Umu-Test.
- [3] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- [4] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- [5] Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2-3), 121-135.
- [6] Palsson, B. (2000). The challenges of in silico biology. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1147-1150.
- [7] Kolarević, S., Aborgiba, M., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Simonović, P., Simić, V., Milošković, A., Reischer, G., Farnleitner, A., Gačić, Z., Milačić, R., Zuliani, T., Vidmar, J., Pergal, M., Piria, M., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2016). Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. *PloS one*, 11(9).
- [8] Sprague, J. B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research*, 4(1), 3-32.
- [9] Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipič, M. (2009). Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*, 75(11), 1453-1460.
- [10] Jovanović Marić, J. (2021) Procena osetljivosti *in vitro* i *in vivo* testova u ekogenotoksikologiji i formulisanje smernica za njihovu primenu u istraživanjima na velikim ravničarskim rekama. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- [11] Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Jovanović, J., Marković, V., Ilić, M., Simonović, P., Simić, V., Gačić, Z., Diamantini, E., Stella, E., Petrović, M., Majone, B., Bellin, A., Paunović M., Vuković-Gačić (2016). Evaluation of genotoxic potential throughout the upper and middle stretches of Adige river basin. *Science of the Total Environment*, 571, 1383-1391.
- [12] European Parliament & Council (2013). Commission Regulation 2013/39/EC amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*. L226:12-17.
- [13] Feretti, D., Acito, M., Dettori, M., Ceretti, E., Fatigoni, C., Posadino, S., Zerbini, I., Villarini, M., Moretti, M., Castiglia, P., Azara, A. (2020). Genotoxicity of source, treated and distributed water from four drinking water treatment plants supplied by surface water in Sardinia, Italy. *Environmental Research*, 185, 109385.
- [14] Jovanović Marić, J. J., Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Sunjog, K., Kostić-Vuković, J., Deutschmann, B, Hollert, H., Tenji, D., Paunović, M., Vuković-Gačić, B (2020). Selection of assay, organism, and approach in biomonitoring significantly affects the evaluation of genotoxic potential in aquatic environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(27), 33903-33915.
- [15] Deutschmann, B., Kolarevic, S., Brack, W., Kaisarevic, S., Kostic, J., Kracun-Kolarevic, M., Liska, I., Paunović, M., Seiler, B.-T., Shao, Y., Sipos, S., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Vukovic-Gacic, B., Hollert, H. (2016). Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. *Science of the Total Environment*, 573, 1441-1449.



**ISBN: 978-86-7031-604-1**