

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

43. konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda

VODA 2014

The 43th Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society

"WATER 2014"

Conference Proceedings



Tara, 3. – 5. jun 2014.



SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY



INŽENJERSKA KOMORA SRBIJE

IZDAVAČ (PUBLISHER):

Srpsko društvo za zaštitu voda, Kneza Miloša 9/1, Beograd, Srbija, Tel/Faks: (011) 32 41 656

PROGRAMSKI ODBOR (PROGRAMME COMMITTEE):

Prof. dr Branislav ĐORĐEVIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Prof. dr Božo DALMACIJA, dipl.hem., Novi Sad
Prof. dr Milan DIMKIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Prof. dr Violeta CIBULIĆ, dipl.hem., Beograd
Doc. dr Zorana NAUNOVIĆ, dipl.inž.tehnol., Beograd
Dr Dubravka REGNER, Naučni savetnik, dipl.biol., Kotor
Dr Momir PAUNOVIĆ, dipl.biol., Beograd

UREDNIK (EDITOR):

Mr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl.inž.građ.

Svi radovi u ovom zborniku radova su recenzirani. Stavovi izneti u ovoj publikaciji ne odražavaju nužno i stavove izdavača, urednika ili programskog odbora.

TIRAŽ (CIRCULATION):

250 primeraka

ŠTAMPA:

"Akademska izdanja", Zemun

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

502.51(082)
556.11(082)
628.3(082)
628.1(497.11)(082)
574.5(082)

КОНФЕРЕНЦИЈА о актуелним проблемима коришћења и заштите вода "Вода"
(43 ; 2014 ; Тара)

Voda 2014 : zbornik radova 43. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda, Tara, 3.-5. jun 2014. = Water 2014 : Conference Proceedings 43rd Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society / [organizatori] Srpsko društvo za zaštitu voda u saradnji sa Institutom za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd ; [urednik, editor Aleksandar Đukić]. - Beograd : Srpsko društvo za zaštitu voda, 2014 (Zemun : Akademska izdanja). - X, 474 str. : ilustr. ; 30 cm

Tekst lat. i ćir. - Tiraž 250. - Str. X: Predgovor / Aleksandar Đukić. – Bibliografija uz svaki rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-916753-1-8

1. Српско друштво за заштиту вода (Београд)
а) Воде - Зборници б) Отпадне воде -
Зборници с) Снабдевање водом - Србија -
Зборници д) Хидробиологија - Зборници

COBISS.SR-ID 207401996

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

u saradnji sa

Institutom za vodoprivredu "JAROSLAV ČERNI", Beograd

ZBORNİK RADOVA

**43. GODIŠNJE KONFERENCIJE O AKTUELNIM PROBLEMIMA
KORIŠĆENJA I ZAŠTITE VODA**

VODA 2014

*43rd ANNUAL CONFERENCE OF THE
SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY
"WATER 2014"
CONFERENCE PROCEEDINGS*

Tara, 3. - 5. jun 2014.

ORGANIZATORI KONFERENCIJE (CONFERENCE ORGANISERS):

Srpsko društvo za zaštitu voda, u saradnji sa
Institutom za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd

ORGANIZACIONI ODBOR KONFERENCIJE (ORGANIZING COMMITTEE):

PREDSEDNIK: Prof. dr Milan DIMKIĆ, dipl.inž.građ.,
Predsednik SDZV, Institut "Jaroslav Černi", Beograd

SEKRETAR: Milena MILORADOV, SDZV, Beograd

ČLANOVI:

Miodrag PJEŠČIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Goran PUZOVIĆ, dipl.inž., Beograd
Miodrag MILOVANOVIĆ, dipl.inž.građ. Beograd
Mr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Milutin IGNJATOVIĆ, dipl.inž., Beograd
Dr Momir PAUNOVIĆ, dipl.biol., Beograd
Goran KNEŽEVIĆ, dipl.ecc., Kladovo
Svetislav VESELINOVIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Mr Bratislav STIŠOVIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Ivan NEŠOVIĆ, Tara
Goran TOPALOVIĆ, dipl.inž.maš., Bor
Milica RADOVANOVIĆ, dipl.inž.građ., Pančevo
Zdravko MRKONJA, dipl.hem., Trebinje, R.Srpska-BiH
Vladan VUČELIĆ, dipl.ecc, Podgorica - Crna Gora
Dr Zoran KLJAJIĆ, dipl.hem., Kotor - Crna Gora
Dr Milenko SAVIĆ, dipl.inž.teh., Bijeljina, R.Srpska-BiH
Jelena VUČIĆEVIĆ, dipl.inž.teh., Beograd

ODRŽAVANJE KONFERENCIJE SU POMOGLI (SPONSORED BY):

- Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Republička direkcija za vode, Beograd
- JVP "Srbijavode", Novi Beograd
- Inženjerska komora Srbije, Beograd
- Institut za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd

UDK: 502.51 (282.243.7) : 504.5 : 502.175
 594.1 - 111.3 (282.243.7)
 597.4/.5 - 111.1 (282.243.7)
 Izvorni naučni članak

JDS3 - PROCENA KVALITETA VODE REKE DUNAV PRIMENOM KOMET TESTA NA ERITROCITIMA RIBA I HEMOLIMFI ŠKOLJKI

Kolarević Stoimir*, Kračun-Kolarević Margareta**, Kostić Jovana***,
 Paunović Momir**, Gačić Zoran***, Knežević-Vukčević Jelena*,
 Vuković-Gačić Branka *

* *Katedra za mikrobiologiju, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu*

** *Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu*

*** *Institut za multidisciplinarnе studije, Univerzitet u Beogradu*

REZIME

JDS3 (The Joint Danube Survey 3) je bila najveća ekspedicija na rekama u toku 2013. godine. Zbog obima uzoraka i analiza koje se primenjuju na prikupljenim uzorcima, JDS je predstavljao idealnu priliku da se ispita prisustvo genotoksičnog zagađenja u reci Dunav. Za detekciju oštećenja na molekulu DNK kao mere genotoksičnosti korišćen je komet test na hemocitima školjki *Unio* sp. i *Sinanodanta woodiana* i na eritrocitima riba *Alburnus alburnus* i *Neogobius* sp. Dobijeni rezultati su pokazali najviši nivo oštećenja DNK u jedinkama prikupljenim u gornjem i srednjem toku reke Dunav.

KLJUČNE REČI: Reka Dunav, komet test, genotoksičnost

JDS3 - ASSESMENT OF WATER QUALITY OF THE DANUBE RIVER BY COMET ASSAY ON HAEMOLYMPH OF FRESHWATER MUSSELS AND BLOOD OF FRESHWATER FISH

ABSTRACT

The Joint Danube Survey 3 (JDS3) is the world's biggest river research expedition of its kind in 2013. It was perfect opportunity to investigate presence of genotoxic pollution in the Danube River. Comet assay was performed on haemocytes of mussels *Unio* sp. and *Sinanodanta woodiana* and erythrocytes of fish *Alburnus alburnus* and *Neogobius* sp. The results indicated presence of genotoxic pollution at some parts of the river. The highest levels of DNA damage were detected in animals collected in upper and middle course, while the lowest level was detected in animals from lower course of the Danube River.

KEYWORDS: the Danube River, comet assay, genotoxicity

UVOD

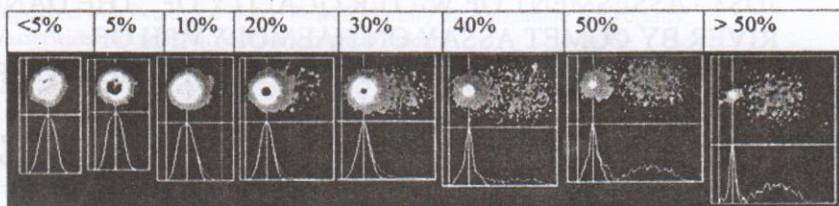
JDS3 (The Joint Danube Survey 3), najveća ekspedicija na rekama u toku 2013. godine, je rezultat međunarodne saradnje 14 država Dunavskog sliva i Evropske komisije. JDS se organizuje svakih 6 godina, JDS1 je organizovan 2001. a JDS2 2007. Sama ekspedicije je trajala 6 sedmica pri čemu je

kroz 10 država pokriveno 2,375 rečnih km. Obrađeno je 68 lokaliteta. Prilikom uzorkovanja, korišćen brod Argus na kom se nalazila i glavna laboratorija za obradu uzoraka na terenu (ICPDR, 2013).

Tokom prethodnih studija pokazali smo da se slatkovodne školjke i slatkovodne ribe mogu koristiti kao pouzdani bionidikator (Kolarević i sar., 2011, Sunjog i sar., 2012a-c, Kolarević i sar., 2013, Sunjog i sar., 2013ab, Vuković-Gačić i sar., 2013, Sunjog i sar., 2014). Takođe detektovali smo genotoksični potencijal na istraživanim lokalitetima na reci Dunav kao i u pritokama Dunava, reci Savi i reci Velika Morava. JDS3 je bila idealna prilika da se uporedi odgovor različitih bioindikatorskih organizama uzimajući u obzir broj lokaliteta na kojim se sprovodilo istraživanje. Odabrali smo *Unio* sp. kao autohtonu vrstu slatkovodne školjke, invazivnu vrstu slatkovodne školjke *Sinanodonta woodiana*, autohtonu vrstu ribe *Alburnus alburnus* i *Neogobius* sp. kao invazivnu vrstu ribe.

U prethodnim studijama pokazano je da se u hemocitama školjki i eritrocitima riba mogu detektovati efekti genotoksičnih polutanata. Najveća prednost u odnosu na ostala tkiva (kao što su škrge, jetra digestivna žlezda) jeste jednostavna manipulacija prilikom pripreme uzoraka za analizu kao i brzo uzorkovanje na osnovu čega su ova tkiva (hemolimfa i krv) bila idealna za uslove ekspedicije.

U cilju detekcije prisustva genotoksičnih supstanci u reci Dunav, tokom meseca avgusta i septembra 2013. vršeno je uzorkovanje jedinki *Unio* sp. na 31 lokalitetu. Jedinke vrste *S. woodiana* su prikupljene sa 15 lokaliteta. Jedinke *A. alburnus* na 12 a *Neogobius* sp. na 13 lokaliteta. Uzorci sa odabranih lokaliteta ispitivani su primenom komet testa koji se u prethodnim istraživanjima pokazao kao veoma pouzdana metoda za procenu genotoksičnosti (Sunjog i sar., 2013b). Komet test (elektroforeza pojedinačnih ćelija (SCGE)) ima široku primenu kao relativno jednostavna i osetljiva metoda za procenu oštećenja DNK molekula u organizmima izloženim raznim mutagenima u životnoj sredini (Jha, 2004, Dhawan i sar. 2009). Test se bazira na elektroforetskom razdvajanju molekula DNK različite veličine. U prisustvu genotoksičnih agenasa dolazi do nastajanja jedno i dvolančanih prekida molekula DNK a samim tim i do nastanka fragmenata DNK različite dužine. Ukoliko se jedno sa nastalim prekidima u DNK molekulima nađe u električnom polju, nastali fragmenti će se odvajati od jedra i formirati karakterističnu strukturu u obliku repa komete po čemu je i sam test dobio ime (Slika 1).



Slika 1. Prikaz nukleoida hemocite *Unio* sp. sa različitim stopom oštećenja
Fig. 1. Damaged nucleoid of haemocyte of *Unio* sp. with different level of DNA damage

MATERIJAL I METODE

Tokom istraživanja analizirani su uzorci ukupno 217 jedinki školjki i 98 jedinki riba. Jedinke *Unio* sp. su nađene na 31 lokalitetu, *S. woodiana* na 15 lokaliteta, *A. alburnus* na 12 a *Neogobius* sp. na 13 lokaliteta. Školjke su prikupljane pomoću bentološke dredže i ronjenjem dok su ribe hvatane elektroribolovom. Sa lokaliteta je prikupljano po 4 jedinke odabranih vrsta. Eksperimentalna procedura komet testa rađena je u laboratoriji broda Argus na samom lokalitetu. Analize hemolimfe su

rađene u roku 2h od trenutka uzorkovanja. Uzorak hemolimfe vađen je direktnom punkcijom u mišić aduktor prikupljenih jedinki. Analize krvi riba su rađene 24h od trenutka uzorkovanja. Krv je vađena heparizovanim špricom iz kaudalne vene i razblaživana 20x u fiziološkom medijumu pri čemu je suspenzija čuvana na 4°C do trenutka analize. Suspenzije ćelija odabranih tkiva korišćene su za komet test po proceduri koju je opisao Singh i sar. (1988). Pločice sa ćelijama fiksiranim u agarozu potapane su 3h u rastvor za lizu da bi se uklonila ćelijska membrana. Pločice su potom potapane na 20 minuta u rastvor za denaturaciju kako bi se rasplela dvolančana DNK i omogućio dalji rad sa jednolančanim molekulima. Elektroforeza se odvijala 20 minuta pri voltaži 0.75 V/cm i jačini struje od 300 mA. Po završetku procedure, preparati su fiksirani u metanolu i transportovani do laboratorije Katedre za mikrobiologiju. Preparati su analizirani na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria, excitation filter 510-560 nm, barrier filter 590 nm). Analizirano je 50 ćelija po preparatu pomoću softvera Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). Procenat intenziteta fluorescencije u repu komete TI% (eng. - Tail intensity) je odabran kao najrelevantniji pokazatelj oštećenja.

STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati su analizirani primenom analize varijanse (one-way ANOVA) sa nivoom značajnosti $p < 0.05$.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati su analizirani po sektorima na osnovu podele predložene od strane Robert i sar. (2003). Na slici 2., predstavljene su srednje vrednosti TI% za svaku jedinku pojedinačno. Na slici su naznačene i granice između sektora.

U sektoru II, na lokalitetu JDS4 primećen je povišen nivo oštećenja (najverovatnije uticaj Degenndorfa) međutim razlika u nivou oštećenja na ovom i na lokalitetu JDS5 nije signifikantna.

U sektoru III, primećeno je sniženje DNK oštećenja na lokalitetu bližem sektoru IV.

U sektoru IV, znatno niže oštećenje je detektovano u jedinkama iz pritoke Vah (JDS18) u poređenju sa jedinkama sa lokaliteta na Dunavu. Kod jedinki *S. woodiana* na lokalitetu JDS15 detektovano je najviše oštećenje u ovom sektoru.

U sektoru V, primećeno je neznatno variranje u oštećenju DNK na različitim lokalitetima. Uticaj Budimpešte nije detektovan (JDS22).

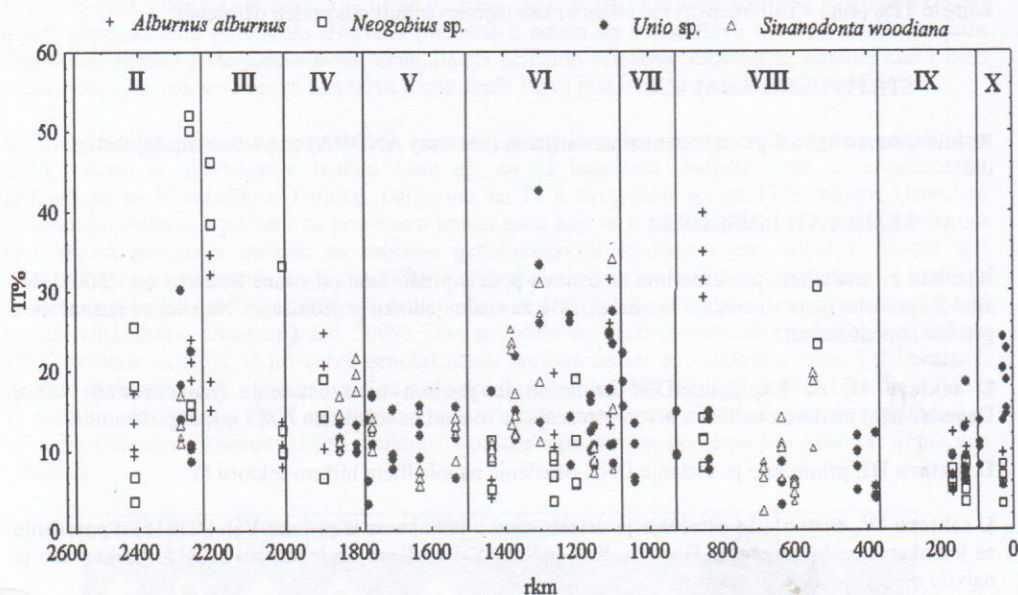
U sektoru VI, nivo oštećenja počinje naglo da raste u jedinkama iz Drave kao i nizvodno od ušća ove pritoke (JDS29). Najviši nivo oštećenja je detektovan u jedinkama sa lokaliteta JDS31 (Ilok, Bačka Palanka) nakon čega oštećenje počinje da opada. Uticaj Beograd i Pančeva nije detektovan, čak je na ova dva lokaliteta (JDS38 i 39) u potezu od ušća Drave do ušća Velike Morave detektovan najniži nivo oštećenja. Neophodno je naglasiti da na ovim tačkama veliki uticaj ima reka Sava. U sektoru su detektovane povišene vrednosti na lokalitetu nadomak Smedereva (JDS40) kao i na lokalitetu JDS42 (nizvodno od Velike Morave). Poredeći sa drugim sektorima reke, ovaj sektor se može okarakterisati kao najzagađeniji. Uzrok se može naći i u velikim količinama neprerađene ili nepropisno prerađene otpadne vode koja se u ovom sektoru ispušta u reku Dunav.

U sektoru VII, je evidentno postepeno snižavanje nivoa oštećenja DNK. Najniže vrednosti zabeležene su na lokalitetu JDS44 (Golubac).

U sektoru VIII, najniže oštećenje DNK je detektovano u jedinkama sa lokaliteta JDS52 (Nizvodno od reke Olt). Najviši nivo oštećenja detektovan je u jedinka *A. alburnus* na lokalitetu JDS47 (uzvodno od Timoka). Nagli skok u oštećenju detektovan je u jedinkama sa lokaliteta nizvodno od luka Zimnicea/Svišov (JDS53).

U sektoru IX, nije primećena razlika u nivou oštećenja u jedinkama iz Dunava i jedinkama iz pritoke Prut (JDS64), blag porast oštećenja detektovan je nizvodno od grada Reni (JDS65).

U sektoru X, je primećeno povišenje nivoa oštećenja DNK u odnosu na prethodni sektor. U rukavcu Sf. George (JDS68) je zabeleženo znatno niže oštećenje nego u Kilia i Sulina rukavcu (JDS66 i 67).



Slika 2. Oštećenje molekula DNK prikazano putem parametra TI% u hemolimfi školjki i krvi riba sakupljenim tokom ekspedicije JDS3

Fig. 2 Level of DNA damage assessed by TI% in haemolymph of mussels and fish blood, specimens collected during JDS3

Lokaliteti na kojima je zabeležen porast oštećenja su pod uticajem zagađenja poreklom iz različitih izvora. Detektovan je uticaj otpadnih voda različitih naselja, industrije, luka i poljoprivrede. Detektovan je i uticaj pritoka Dunava na nivo zagađenja. Takođe, primećena je i signifikantna korelacija u odgovoru između različitih vrsta školjki, kao i u odgovoru riba i školjki.

ZALJUČAK

Rezultati ukazuju na prisustvo genotoksičnog zagađenja u reci Dunav. Sličan odgovor između različitih vrsta organizama na kojim je rađen biomonitoring potvrđuje njihovu pouzdanost u smislu indikatorskih organizama. Na osnovu rezultata hemijskih analiza vode i sedimenta, koji se u ovom

trenutku još uvek procesuju, moći će se izvući zaključci o uzroku i poreklu detektovanog genotoksičnog potencijala na proučavanim lokalitetima.

ZAHVALNICA

Sprovedeno istraživanje rađeno je u okviru ekspedicije JDS3 organizovane od strane Međunarodne komisije za zaštitu reke Dunav. Rađene analize predstavljaju dodatni istraživački program organizovan od strane Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i Instituta za multidisciplinarne studije prilikom ekspedicije JDS3.

LITERATURA

1. Dhawan, M. Bajpayee and D. Parmar, (2009), Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol.Toxicol.* 25, 5-32.
2. International Commission for protection of the Danube River - ICPDR (2013), www.danubesurvey.org
3. Jha A. N., (2004), Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. *Mutat Res* 552: 1 – 17.
4. Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Tomović, J., Gačić Z., Vuković-Gačić, B., (2011), Antropogenic impact on water quality of the River Danube in Serbia: microbiological analysis and genotoxicity monitoring. *Arch. Biol. Sci.* 63, 1209-1217.
5. Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Kračun, M., Vasiljević, B., Tomović, J., Vuković-Gačić, B., Gačić, Z., (2013), Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay, *Chemosphere* 93, 243-251.
6. Robert, S., Birk, S. and M. Sommerhäuser, (2003), Definition of Reference Conditions for the Section Types of the Danube River. Final Report of UNDP/GEF DANUBE REGIONAL PROJECT.
7. 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 *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191
8. Sunjog K., Gačić Z., Kolarević S., Višnjić-Jeftić Z., Jarić I., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M., (2012a), Heavy Metal Accumulation and the Genotoxicity in Barbel (*Barbus barbus*) as Indicators of the Danube River Pollution. *The Scientific World Journal* doi:10.1100/2012/351074.
9. Sunjog, K., Kolarević, S., Gačić, Z., Mičković, B., Nikčević, M., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2012b), Ecogenotoxicity Analysis with Comet Assay in Different Tissues of Chub (*Squalius cephalus* L. 1758), Balwois 2012, Ohrid, Macedonia, Proceedings CD.
10. Sunjog, K., Kolarević, S., Gačić, Z., Hegediš, A., Pucar, M., Skorić, S., Kračun, M., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2012c), Genotoxicity assesment on River Gradac in fish (*Salmo trutta*, *Barbus meridionalis*) using comet assay, The 41st Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society "Water 2012", Divčibare, Serbia, Proceedings 81-86.
11. Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., Lenhardt, M. (2013a), Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences *Anal. Bioanal. Chem.* DOI 10.1007/s00216-013-6909-y.

12. Sunjog, K., Kolarević, S., Gačić, Z., Skorić, S., Kračun, M., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B. (2013b), Primena komet testa za detekciju genotoksičnog potencijala reka Peštan i Beljanica na tkivima klena (*Squalius cephalus* L. 1758). The 42nd Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society "Water 2013", Perućac, Serbia, Proceedings, 5-64.
13. Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Gačić, Z., Skorić, S., Đikanović, V., ... & Vuković-Gačić, B. (2014), Variability in DNA damage of chub *Squalius cephalus* blood, gill and liver cells during the annual cycle. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(3), 967-974.
14. Vuković-Gačić B., Kolarević S, Sunjog K., Tomović J., Knežević-Vukčević J., Paunović M., Gačić Z. (2013), Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress, *Hydrobiologia* DOI: 10.1007/s10750-013-1513-x