

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

ZBORNIK 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):

PREDSEDNİK: 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) (497.11) : 504.5 : 502.175
597.551.2 - 1 (282.243) (497.11)
Izvorni naučni članak

PROCENA GENOTOKSIČNOSTI REKE SAVE PRIMENOM KOMET TESTA NA RIBI KRUPATICA (*Abramis bjoerkna* L. 1758)

Jovana Kostić*, Stoimir Kolarević**, Margareta Kračun-Kolarević***,
Mustafa Aborgiba**, Samia Elbahi**, Jelena Knežević-Vukčević**,
Mirjana Lenhardt*, Zoran Gačić*, Branka Vuković-Gačić**

* Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

** Biološki Fakultet, Katedra za mikrobiologiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

*** Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

REZIME

Cilj ovog istraživanja je procena kvaliteta vode reke Save u regionu Beograda, analizom nivoa oštećenja DNK u ćelijama jetre, škrge i krvi kod krupatice. Uzorci su prikupljeni na lokalitetu Duboko, tokom januara, februara i marta 2014. godine. Za procenu genotoksičnog potencijala primenjen je komet test, a Olive tail moment (OTM) izabran je kao parametar za procenu oštećenja DNK. Za krv i jetru najviši nivo oštećenja zabeležen je u januaru, a za škrge u februaru. Smanjen nivo oštećenja za sva tri tkiva zabeležen je u martu. Preliminarni rezultati ukazuju da je krupatica pogodan test organizam za praćenje genotoksičnog potencijala.

KLJUČNE REČI: krupatica, komet test, ekogenotoksikologija, reka Sava

GENOTOXICITY ASSESSMENT OF RIVER SAVA USING COMET ASSAY ON SILVER BREAM (*Abramis bjoerkna* L. 1758)

ABSTRACT

In this study we assessed water quality of the Sava River in Belgrade region, analyzing the level of DNA damage in cells of liver, gills and blood of silver bream. Samples were collected on the locality Duboko, during January, February and March 2014. For assessment of genotoxic potential we applied Comet assay and the OTM was chosen as parameter for the DNA damage assessment. For blood and liver the highest level of damage was detected in January, and for gills in February. For all tissues decrease in DNA damage was observed in March. Preliminary results show that Silver bream is a useful test organism for monitoring genotoxic potential.

KEYWORDS: silver bream, Comet assay, ekogenotoxicology, Sava River

UVOD

Urbanizacija i razvoj industrije praćeni su porastom zagađenja vodenih sredina. Otpadne vode, iz industrijskih pogona, mogu značajno uticati na kvalitet podzemnih voda i vodenih tokova. Ispuštene,

toksične i neprečišćene, otpadne vode često sadrže karcinogene i mutagene supstance koje mogu dovesti do nastanka DNK lezija i oštećenja hromozoma. Nastale DNK lezije mogu uzrokovati posledice na različitim biološkim nivoima, sve do nivoa populacije i mogu imati uticaja na stabilnost ekosistema (Seitz i sar., 2008). Ribe su postale jedan od pogodnih model organizama za procenu mogućih rizika u vodenim sredinama, usled njihove sposobnosti da efikasno metabolišu i akumuliraju različite zagađivače (Cavas T., 2011). U akvatičnom biomonitoringu, ribe su široko korišćene u ispitivanjima genotoksičnosti, kao model organizmi među kičmenjacima.

Krupatica (*Abramis bjoerkna*) je eurifagna vrsta, sa brojnim populacijama koje naseljavaju eutrofične vode (Lamens E H R R, 1989). Naseljava donje tokove velikih reka u zoni deverike. Iako je široko rasprostranjena vrsta, od malog je značaja za ishranu ljudi, jer joj je meso slabijeg kvaliteta, sa velikim brojem intermuskularnih kostiju. Ipak, krupatica je značajna karika u ishrani predatorskih riba (Okgerman i sar., 2011).

Analiza promena DNK molekula u akvatičnim organizmima široko je prihvaćena kao pogodan metod za procenu genotoksičnog zagađenja sredine i može se koristiti za detekciju izlaganja širokog spektra vrsta (Kolarević i sar., 2011, 2013; Rocco i sar., 2012; Sunjog i sar., 2012a-c, 2013ab; Vuković-Gačić i sar., 2013). Za procenu nivoa oštećenja DNK molekula koristili smo alkalni komet test, koji predstavlja brzu, osetljivu i efikasnu metodu za merenje genotoksičnog efekta na pojedinačnim ćelijama. Zasniva se na detekciji prekida lanaca DNK i alkalno labilnih mesta, merenjem migracije fragmenata DNK molekula iz jedarne DNK (Singh i sar., 1988).

Jedinke su uzorkovane na reci Savi, lokalitetu Duboko, u oblasti intezivne poljoprivredne aktivnosti, okružen naseljima Barič, Mala Moštanica, Umka. Uzvodno od mesta uzorkovanja nalazi se Obrenovac u kome je smeštena termoelektrana „Nikola Tesla“ i pripadajuće pepliste. Jedna od najvećih pritoka reke Save, Kolubara, uliva se u Savu 3km uzvodno od mesta uzorkovanja a sam basen reke Kolubare je pod velikim uticajem okolnih rudnika uglja.

MATERIJAL I METODE

Jedinke krupatice uzorkovane su na lokalitetu Duboko, na reci Savi, u blizini grada Beograda (Slika 1). Jednom mesečno, tokom januara, februara i marta 2014. godine, disekovano je po pet jedinki krupatice, na samom lokalitetu. Ukupna težina uzorkovanih jedinki kretala se od 60 do 139 g, dok je dužina jedinki varirala u rasponu od 18 do 21,5 cm. Paralelno sa uzorkovanjem tkiva ribe vršeno je merenje fizičko-hemijskih parametara i procena mikrobiološkog kvaliteta vode (rezultati nisu prikazani).

Jedinke su pre disekovanja bile anestetizirane etarskim uljem karanfilića. Krv je uzorkovana prethodno heparinizovanim špricom i iglom, direktno iz srca jedinki i razblaživana 20 puta u ohlađenom 1xPBS rastvoru. Uzorci jetre i škrge smešteni su u epruvete sa po 6 ml ohlađenog 1xPBS rastvora. Odmah po uzorkovanju, ependorfice i epruvete sa uzorcima stavljane su na led i tako transportovane do laboratorije Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Priprema ćelija jetre, škrge i krvi rađena je u roku od 1h od trenutka uzorkovanja. Jetra i škrge su usitnjene u 0,2 ml HBSS rastvora, a zatim prebačene u 2,8 ml ohlađenog HBSS rastvora. Nakon dodatka 30 μ l tripsina (finalna koncentracija 0,05 %) vršena je inkubacija na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje, 10 min. Da bi se zaustavilo dejstvo tripsina u epruvete sa suspenzijom ćelija dodaje se po 7 ml hladnog HBSS rastvora. Oko 9 ml suspenzije ćelija prebačeno je u epruvete i centrifugirano, 10 min., 2000 rpm i 4°C. Talog ćelija sa oko 2 ml supernatanta se razbija, kako bi se dobile pojedinačne ćelije. Od dobijenih suspenzija ćelija (jetra, škrge i krv) prave se odgovarajuća

razblaženja u HBSS-u, kako bi se dobilo približno 50 000 ćelija/ml. Nakon centrifugiranja (10 min., 2000 rpm i 4°C) ostavlja se talog i oko 60 µl supernatanta. Vijabilnost ćelija određivana je diferencijalnim bojenjem - akridin-oranž/etidijum-bromid (Squier and Cohen, 2001). Test se zasniva na integritetu ćelijske membrane; ćelije sa intaktnom membranom smatraju se vijabilnim i njihovo jedro se boji zeleno, dok se ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane smatraju mrtvim i njihovo jedro je obojeno crveno. Premisa za primenu Komet testa (najmanje 70% vijabilnih ćelija) zadovoljena je u našim analizama.

Suspenzije ćelija odabranih tkiva korišćene su za komet test po proceduri koju je opisao Singh i sar. (1988). Pločice sa ćelijama fiksiranim u agarozu ostavljene su u rastvoru za lizu 18h da bi se uklonila ćelijska membrana, a procedura se nastavlja sledećeg dana. Iz pufera za lizu pločice se prebacuju u sveže pripremljen rastvor za denaturaciju i elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Denaturacija omogućava prevođenje dvolančane DNK u jednolančane strukture, kako bi komet testom mogli da pratimo i jednolančane prekide DNK molekula. Nakon denaturacije od 20 min., puštena je elektroforeza na 0,75 V/cm. Po završetku elektroforeze pločice se prebacuju u sveže pripremljen pufer za neutralizaciju, a potom fiksiraju u hladnom metanolu.

Komete se boje sa akridin-oranžom (stok 2 µg/ml) i posmatraju pod fluorescentnim mikroskopom (Leica, DMLS, Austrija, 400 x uvećanje, 510-560 nm ekscitacionim filterom i 590 nm barijera filterom). Za merenje kometa koristili smo paket Comet IV softver (Perceptive Instruments, UK). Po pločici se skoruje ukupno 50 kometa.

Dobijeni podaci obrađeni su korišćenjem neparametrijskog Mann-Whitney U-testa, softverskog paketa StatSoft Statistica. Elektroforeza se odvijala 20 min., pri voltaži 0.75 V/cm i jačini struje od 300 mA.



Slika 1. Lokalitet uzorkovanja Duboko: 1. Mesto uzorkovanja, 2. Ušće Kolubare u Savu, 3. Rudnik uglja, 4. TE „Nikola Tesla A“, 5. Pepelište

Figure 1. Sampling site Duboko: 1. Precise sampling site, 2. Mouth of the Kolubara River, 3. Coal mine, 4. PP „Nikola Tesla A“, 5. Ash disposal field

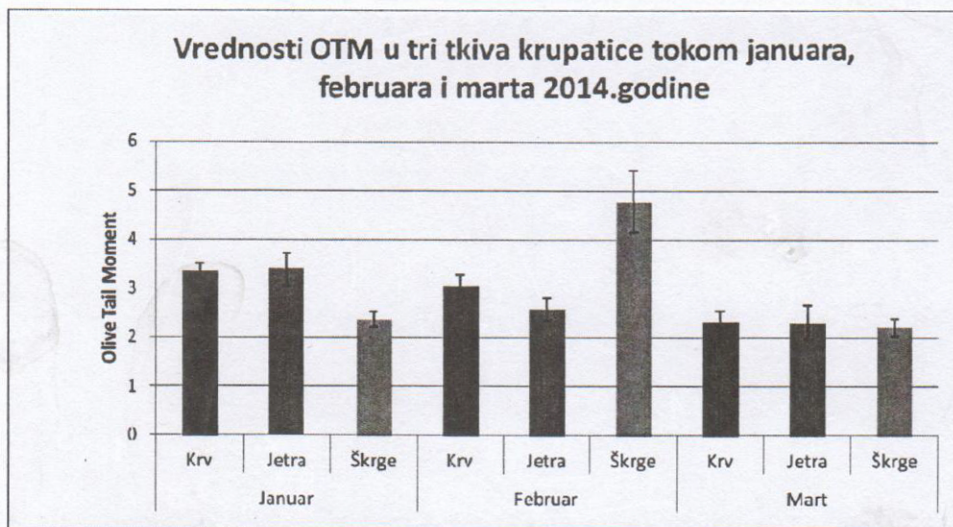
REZULTATI I DISKUSIJA

Nivo oštećenja DNK molekula krvi, jetre i škrge krupatice, tokom tri meseca uzorkovanja, izražen je preko OTM (Slika 2). Za krv i jetru najviši nivo oštećenja zabeležen je u januaru i postepeno opada tokom februara i marta. Za škrge, najviši nivo oštećenja zabeležen je u februaru. Najniži nivo oštećenja DNK molekula, za sva tri tkiva, zabeležen je u martu.

U poređenju sa bazalnim nivoom oštećenja kod jedinki iz familije *Cyprinidae* uzetih sa nezagađenog lokaliteta (Sunjog i sar., 2014), nivo oštećenja kod jedinki krupatice imao je signifikantno više vrednosti u sva tri tkiva, tokom svih meseci uzorkovanja. Mikrobiološke i fizičko-hemijske analize ukazale su na prisustvo fekalnog zagađenja tokom uzorkovanja.

Povišen nivo oštećenja ukazuje na prisustvo genotoksičnog zagađenja koje se može pripisati neprerađenim otpadnim vodama manjih naselja u okolini kao i gradskim i industrijskim otpadnim vodama grada Obrenovca. U prethodnim istraživanjima pokazali smo da otpadne vode mogu imati značajan genotoksični potencijal (Vuković-Gačić i sar., 2013). Takođe genotoksično zagađenje može imati poreklo i iz reke Kolubare. Rezultati naše prethodne studije (Sunjog i sar., 2014) ukazuju da je veliki deo sliva reke Kolubare pod snažnim uticajem zagađenja, usled priliva otpadnih voda elektroprivrede (elektrana „Nikola Tesla“, rudnik uglja „Kolubara“).

Na osnovu postepenog pada oštećenja DNK u tkivima krupatice, koje pokazuje korelaciju sa temperaturom vode, možemo zaključiti da su promene nivoa oštećenja DNK molekula tokom perioda uzorkovanja verovatno povezane i sa sezonskim ili endogenim efektima (starost, razvoj i reprodukcija jedinki) slično kao i kod jedinki klena (Sunjog i sar., 2014).



Slika 2. Oštećenja DNK molekula krvi, jetre i škrge krupatice, izraženo pomoću Olive tail moment-a (OTM) na reci Savi sa vrednostima standardne greške

Figure 2. DNA damage level in blood, liver and gills of the silver bream expressed using the Olive tail moment (OTM) on the river Sava with the values of standard error

ZAKLJUČAK

Na osnovu preliminarnih rezultata, dobijenih u ovom istraživanju, pokazana je slična osetljivost sva tri tkiva na prisustvo genotoksičnih agenasa. Dalja istraživanja su neophodna da bi se utvrdio potencijal krupatice za detekciju genotoksičnosti.

ZAHVALNICA

Istraživanje je rađeno u okviru projekta Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (OI 173045).

REFERENCE

1. Cavas T. (2011) In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay, *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431-1435.
2. Lammens E H R R (1989) Causes and consequences of the success of bream in Dutch eutrophic lakes, *Hydrobiol. Bull* 23: 11-18.
3. 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.
4. 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.
5. Okgerman H. C., Elp M., Atasagun S. (2012) The growth and reproduction of white bream (*Blicca bjoerkna* L.1758) in an oligo-mesotrophic lake in northwest Anatolia (Sapanca, Turkey), *Turk J Biol* 36(2012) 125-134.
6. Rocco L., Frenzilli G., Zito G., Archimandritis A., Peluso C., Stingo V. (2012a) Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants, *Environ. Toxicol.* 27, 18-25.
7. Rocco L., Peluso C., Stingo V. (2012b) Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebra fish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin, *Environ. Toxicol.* 27, 598-604.
8. Seitz N., Bottcher M., Keiter S., Kosmehl T., Manz W., Hollert H., Braunbeck T. (2007) A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data, *Mutat. Res.* 652:38-45.
9. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988) A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
10. Sunjog K., Gačić Z., Kolarević S., Višnjic-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.
11. Sunjog, K., Kolarević, S., Gačić, Z., Mićković, 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Gačić, Z., Skorić, S., Dikanović, 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.
16. Squier M. K., Cohen J. J. (2001) Standard quantitative assays for apoptosis, *Mol. Biotechnol.* 19, 305-312.
17. 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* 1-11