

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

50. konferencija o aktuelnim temama korišćenja i zaštite voda

VODA 2021

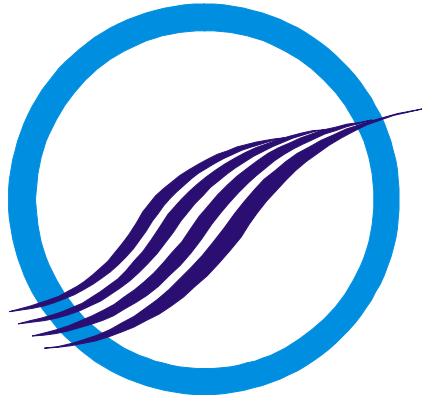
The 50th Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society

WATER 2021

Conference Proceedings



Zlatibor, 22. – 24. septembar 2021.



www.sdzv.org.rs

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY

II

IZDAVAČ (PUBLISHER):

Srpsko društvo za zaštitu voda, Kneza Miloša 9/1, Beograd, Srbija,
Tel/Faks: (011) 32 31 630

PROGRAMSKI ODBOR (PROGRAMME COMMITTEE):

Prof. dr Branislav ĐORĐEVIĆ, dipl.inž.građ., Beograd
Prof. dr Božo DALMACIJA, dipl.hem., Novi Sad
Dr Momir PAUNOVIĆ, naučni savetnik, dipl.biol., Beograd
Dr. Bela CSÁNYI, dipl.biol., Budimšešta-Mađarska
Prof. dr Peter KALINKOV, dipl.inž.građ., Sofija-Bugarska
Prof. dr Valentina SLAVEVSKA STAMENKOVIĆ, dipl.biol., Skoplje-R.Makedonija
Prof. Dr. Goran SEKULIĆ, dipl.inž.građ, Podgorica-Crna Gora
Prof. dr Violeta CIBULIĆ, dipl.hem., Beograd
Prof. dr Slavka STANKOVIĆ, dipl.inž.tehnol., Beograd
Prof. dr Zorana NAUNOVIĆ, dipl.inž.tehnol., Beograd
Dr Aleksandar JOKSIMOVIĆ, dipl.biol., Kotor-Crna Gora
Dr Božica VASILJEVIĆ, dipl.biol., Beograd

UREDNIK (EDITOR):

Dr 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):

200 primeraka

ŠTAMPA:

"Akademska izdanja", Zemun, 2021

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

502.51(082)
556.11(082)
628.3(082)
628.1(082)

ГОДИШЊА конференција о актуелним проблемима коришћења и заштите вода (50 ; 2021 ; Златибор)
Voda 2021 : zbornik radova 50. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda = Water 2021 : conference proceedings 50th Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society, Zlatibor, 22. - 24. septembar 2021. / [organizatori] Srpsko društvo za zaštitu voda [u saradnji sa JKP "Vodovod Zlatibor", Čajetina]; [urednik, editor Aleksandar Đukić]. - Beograd : Srpsko društvo za zaštitu voda, 2021 (Zemun : Akademska izdanja). - X, [378] str. : ilustr. ; 24 cm

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tekst ćir. i lat. - Tiraž 200. - Str. X: Predgovor / Aleksandar Đukić. - Bibliografija uz svaki rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-916753-8-7

a) Воде -- Зборници б) Отпадне воде -- Зборници в) Снабдевање водом -- Зборници
COBISS.SR-ID 45673481

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

ZBORNİK RADOVA

**50. GODIŠNJE KONFERENCIJE O AKTUELNIM TEMAMA
KORIŠĆENJA I ZAŠTITE VODA**

VODA 2021

*50TH ANNUAL CONFERENCE OF THE
SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY
"WATER 2021"
CONFERENCE PROCEEDINGS*

Zlatibor, 22. - 24. septembar 2021.

IV

ORGANIZATORI KONFERENCIJE (*CONFERENCE ORGANISERS*):

Srpsko društvo za zaštitu voda (Beograd),
u saradnji sa
JKP "Vodovod Zlatibor", Čajetina

ORGANIZACIONI ODBOR KONFERENCIJE (*ORGANIZING COMMITTEE*):

PRESEDNIK: Marija VILOTIJEVIĆ, dipl.inž.tehnol, Čajetina

SEKRETAR: Milena MILORADOV, SDZV, Beograd

ČLANOVI:

Miodrag PIJEŠČIĆ, dipl.inž.gradj., Beograd
Goran PUZOVIĆ, dipl.inž., Beograd
Ivan IRKIĆ, dipl.inž.grad., Čajetina
Dr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl.inž.grad. Beograd
Milutin IGNJATOVIĆ, dipl.inž., Beograd
Strahinja DANILOVIĆ, dipl.prav, Beograd
Srđan KRUŽEVIĆ, dipl.ecc, Novi Sad
Dragan MAKSIMOVIĆ, dipl.inž.grad., Kladovo
Mr Bratislav STIŠOVIĆ, dipl.ind.grad, Beograd
Mr Olivera DOKLESTIĆ, dipl.inž.grad., H. Novi, Crna Gora
Duško VUJOVIĆ, dipl.inž.grad., Trebinje, R.Srpska-BiH
Dr Aleksandar JOKSIMOVIĆ, dipl.biol, Kotor, Crna Gora
Dr Milenko SAVIĆ, dipl.inž.tehn. Bijeljina, R.Srpska-BiH
Dr Milenko SAVIĆ, dipl.inž.tehn. Bijeljina, R.Srpska-BiH

ODRŽAVANJE KONFERENCIJE SU POMOGLI (*SPONSORED BY*):

- Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije
- Inženjerska komora Srbije

Slika na koricama: motiv sa Zlatibora

PRIMENA RAPD METODE U EKOGENOTOKSIKOLOŠKIM ISTRAŽIVANJIMA – STUDIJE SLUČAJA SAVA I DUNAV

Jovana Jovanović Marić^{*/**}, Margareta Kračun-Kolarević^{*},
Stoimir Kolarević^{*/**}, Ivan Nikolić^{***}, Karolina Sunjog^{****},
Momir Paunović^{*}, Branka Vuković-Gačić^{**/**}

* *Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Bulevar despota Stefana, 142, Beograd; jovana.marić@ibiss.bg.ac.rs*

** *Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Centar za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Studentski trg 16, Beograd*

*** *Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Katedra za mikrobiologiju, Studentski trg 16, Beograd*

**** *Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Kneza Višeslava 1a, Beograd*

REZIME

Metoda nasumično umnožene polimorfne DNK (RAPD) je poslednjih godina našla primenu u ekogenotoksikologiji. U okviru dve studije slučaja na Savi i Dunavu, za RAPD analizu korišćeno je mišićno tkivo jedinki *Alburnus alburnus* (uklija) uzorkovanih sa ukupno devet lokaliteta. RAPD rezultati istraživanja na Savi ukazuju na grupisanje jedinki sa zagađenih lokaliteta (UB i UK), u odnosu na jedinke sa manje zagađenog lokaliteta, SZ. RAPD rezultati studije slučaja na Dunavu ne pokazuju jasno grupisanje uklija u odnosu na jačinu pritiska što ukazuje na neophodnost dodatnih analiza.

KLJUČNE REČI: ekogenotoksikologija, RAPD analiza, *Alburnus alburnus*, zagađenje površinskih voda

APPLICATION OF RAPD METHOD IN ECOGENOTOXICOLOGICAL RESEARCH –THE SAVA -RIVER AND THE DANUBE RIVER CASE STUDIES

ABSTRACT

In recent years the randomly amplified polymorphic DNA method (RAPD) is frequently used in ecogenotoxicology. Within two case studies on the Sava River and the Danube River, muscle tissue of *Alburnus alburnus* (bleak) specimens sampled from nine sites was used for RAPD analysis. The RAPD results on the Sava River study indicate the grouping of specimens from polluted sites (UB and UK) as opposed to specimens from the less polluted site, SZ. The RAPD results of the Danube River case study do not show a clear bleak grouping in relation to pollution pressures, indicating that additional analyses are needed.

KEY WORDS: ecogenotoxicology, RAPD analysis, *Alburnus alburnus*, pollution of surface water

UVOD

Velike ravničarske reke koje teku kroz Srbiju su pod intenzivnim antropogenim pritiscima s obzirom da protiču kroz naseljene oblasti, usled čega se u ove vodotokove ispuštaju neprerađene komunalne i industrijske otpadne vode, a sa njima i hemijski agensi koji su prisutni u otpadnim vodama. Takođe, obale ovih reka karakteristične su po obradivim površinama i intenzivnoj poljoprivrednoj aktivnosti koja podrazumeva korišćenje agrotehničkih mera (đubriva, pesticidi, herbicidi, itd.). U slučaju visokog vodostaja ili nakon jakih kiša može doći do spiranja okolnog zemljišta i upliva hemijskih agenasa koji se koriste u poljoprivredi.

Prisustvo ksenobiotika iz otpadnih voda ili nekih drugih izvora zagađenja u akvatičnim ekosistemima može uzrokovati negativne efekte u organizmima, kao što su: nastanak mutacija, promene u imunom odgovoru, narušavanje hormonskog i reproduktivnog statusa, histopatološke promene, itd. Pored toga, hronično izlaganje akvatičnih organizama niskim koncentracijama ($\mu\text{g/L}$) zagađujućih agenasa može dovesti do narušavanja strukture populacije i čitavog ekosistema. Praćenje biološkog odgovora na nižim nivoima biološke organizacije (molekularni, ćelijski) omogućava detekciju efekta dejstva ksenobiotika pre nego što se taj efekat odrazi na nivou jedinke i/ili populacije. Jedan od ranih odgovora organizama na dejstvo hemijskih agenasa je oštećenje DNK molekula, zbog čega su razvijene različite metode za detekciju genotoksičnih efekata u *in vitro* i *in vivo* istaživanjima.

Metoda nasumično umnožene polimorfne DNK (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) često se koristi u taksonomiji i populacionoj genetici (Bardakci i Skibinski, 1994; Sandoval-Castellanos i sar., 2007), a poslednjih godina je našla primenu i u ekogenotoksikološkim istraživanjima (Atienzar i sar., 2002; Pandey i sar., 2018). Ova metoda se zasniva na nasumičnoj amplifikaciji genomske DNK pomoću kratkih prajmera dužine 10 bp. U slučaju da postoji razlika između sekvenci, prajmeri će se vezivati na različitim mestima, zbog čega će se nakon elektroforeze uočiti različiti RAPD profili, odnosno profili DNK fragmenata. Prisustvo/odsustvo DNK fragmenata predstavlja kriterijum za utvrđivanje sličnosti, odnosno razlika između ispitivanih sekvenci (Welsh i McClelland, 1990). RAPD metodom mogu se detektovati DNK prekidi, mutacije, adukti, kao i oštećenja nastala oksidativnim stresom. Međutim, trenutno postoji relativno mali broj studija u kojima su, pored RAPD analize, korišćeni i drugi ekogenotoksikološki testovi. U većini *in situ* studija RAPD analiza obuhvata komparaciju rezultata dobijenih na „čistom/referentnom“ i lokalitetu koji je pod velikim pritiskom zagađenja (Nadig i sar., 1998; Salem i sar., 2014).

U ovom radu prikazani su rezultati ispitivanja osetljivosti RAPD metode u odnosu na široko primenjen alkalni komet test za detekciju genotoksičnog efekta u okviru dve studije slučaja, na Savi i Dunavu. Vrsta *Alburnus alburnus* (uklija) pokazala se kao pouzdan bioindikator u prethodnim ekogenotoksikološkim studijama (Deutschmann i sar., 2016; Jovanović i sar., 2018), zbog čega je i u ovom istraživanju odabrana kao bioindikatorska vrsta.

METODE

Studija slučaja na Savi sprovedena je u aprilu 2019. godine na tri prostorno bliska lokaliteta koja se nalaze nizvodno od Obrenovca, a koji su pod različitim uticajem zagađenja. Lokalitet Sava Zabran (SZ) nalazi se na Savi, kod obrenovačkog izletišta Zabran, lokalitet ušće Kolubare (UK) nalazi se na ušću Kolubare i Save i lokalitet ušće Baričke reke (UB) se nalazi na ušću Baričke reke i Save. Studija slučaja na Dunavu i njegovim većim pritokama sprovedeno je u julu 2019. godine u okviru međunarodne ekspedicije Joint Danube Survey 4 (JDS4) na jednom lokalitetu na Tisi (kod Titela – JDS33), dva lokaliteta na Savi (kod Jamene - JDS35 i Makiš - JDS36) i tri lokaliteta na Dunavu (nizvodno od Pančeva - JDS37, Ram - JDS40, Radujevac - JDS41). Sa svakog lokaliteta uzorkovano je po deset jedinki uklija. Mišićno tkivo uklija korišćeno je za RAPD analizu, dok su uzorci krvi korišćeni za alkalni komet test.

RAPD metoda urađena je na isti način kao što je opisano u studiji Kolarević i sar. (2018). Genetička sličnost, odnosno razlika između jedinki sa istog i različitih lokaliteta određena je kao to je opisano u studiji Lynch (1990), dok je genetička distanca između jedinki sa različitih lokaliteta dobijena na osnovu formule koja je definisana u studiji Lynch (1991). Vrednosti genetičke distance korišćene su za konstrukciju filogenetskog stabla primenom UPGMA metode. Alkalni komet test izveden je na način kao što je opisano u studiji Kolarević i sar. (2016), sa malim modifikacijama. Kao parametar DNK oštećenja odabran je intenzitet repa komete (engl. *Tail Intensity*, TI %).

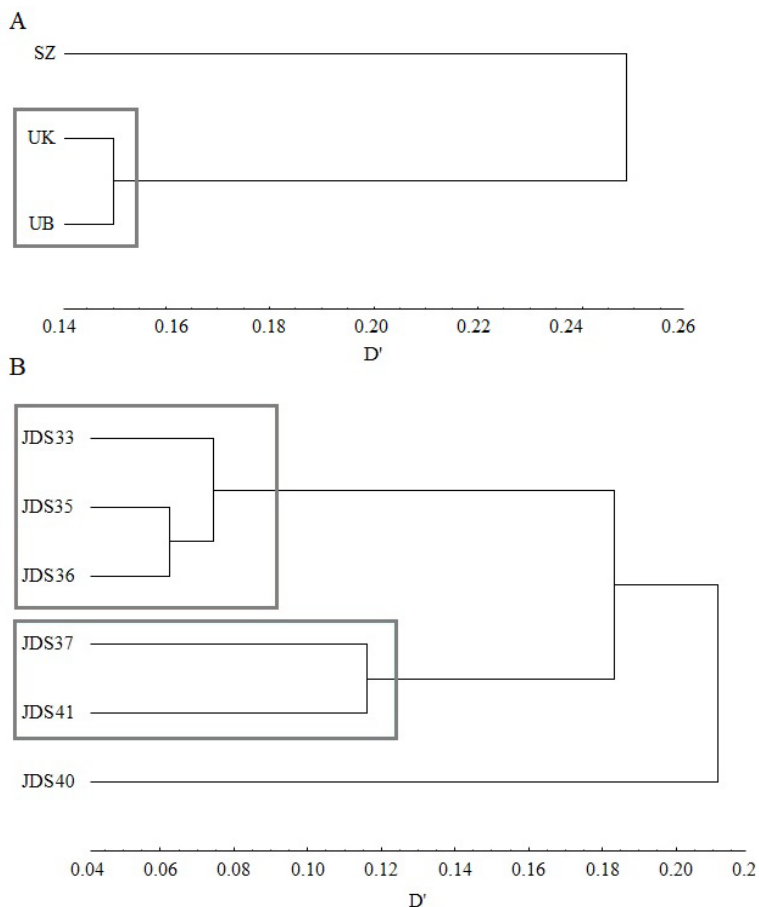
REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati dobijeni RAPD metodom poređeni su sa rezultatima alkalnog komet testa, i na osnovu toga izvršena je procena osetljivosti RAPD metode. Alkalni komet test se u brojnim istraživanjima pokazao kao osetljiva metoda u detekciji genotoksičnih efekata koji su posledica izlaganja organizama različitim tipovima, kao i različitim stepenu zagađenja.

Izolovana genomska DNK uklija umnožena je pomoću šest prajmera. Poređenjem RAPD profila jedinki uklija dobijenih nakon umnožavanja pojedinačnim prajmerima utvrđena je genetička sličnost/razlika između jedinki uzorkovanih sa različitih lokaliteta.

U studiji slučaja na Savi, uočava se izdvajanje lokaliteta SZ u odnosu na UK i UB (Slika 1A). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima alkalnog komet testa koji je korišćen u istom istraživanju i koji je pokazao visok stepen osetljivosti u detekciji genotoksičnog efekta rečne vode (Jovanović Marić i sar., 2020). Pored toga, na osnovu podataka hemijskih analiza godišnjeg monitoringa Gradskog zavoda za javno zdravlje Beograd dobijen je isti način razdvajanja analiziranih lokaliteta, ukazujući na visok stepen zagađenja lokaliteta UK i UB u odnosu na lokalitet UZ (Jovanović Marić i sar., 2020). Dobijeni rezultati mogu ukazati na uticaj genotoksičnih agenasa koji su prisutni na lokalitetima UK i UB na narušavanje integriteta DNK molekula ćelija krvi uklija, ali i na sličnosti/razlike između dobijenih RAPD profila.

U studiji slučaja na Dunavu, RAPD analiza ukazuje na grupisanje lokaliteta koji se nalaze na pritokama u odnosu na one koji su na samom Dunavu (Slika 1B). Iako su u studiji slučaja na Savi usaglašeni rezultati RAPD analize, alkalnog komet testa i hemijskih analiza polutanata u vodi, u studiji slučaja na Dunavu neophodno je sprovesti dodatne analize za jasno tumačenje podataka.



Slika 1. Dendrogrami konstruirani na osnovu vrednosti genetičke distance (D') svih prajmera primenom UPGMA metode na osnovu rezultata studije na Savi (A) i Dunavu (B).

Figure 1. Dendrograms constructed based on genetic distance values (D') of all primers using UPGMA method according to results of studies on the Sava River (A) and the Danube River (B).

ZAKLJUČAK

Iako postoje brojne studije u kojima je pokazano da je RAPD osetljiva metoda i da se može koristiti u ekogenotoksikološkim istraživanjima, rezultati studije slučaja na Dunavu su pokazali da je neophodno sprovesti dodatne analize kako bi se utvrdilo koji su sve faktori uticali na sličnost/razlike u RAPD profilima jedinki sa različitih lokaliteta. Na osnovu toga može se zaključiti da je neophodno koristiti različite biotestove i biomarkere u *in situ* studijama kako bi se rezultati pravilno tumačili. Ovo je posebno važno u slučaju kada istraživanje ne podrazumeva komparaciju jedinki sa „kontrolnog/referentnog“ sa jedinkama uzorkovanih na zagađenim lokalitetima (npr. lokaliteta koji se nalazi u blizini ispusta otpadnih voda). Takođe, u budućim istraživanjima može se razmotriti primena RAPD analize

u *ex situ* ekogenotoksikološkim istraživanjima, na test/model model organizmima koji se mogu tretirati koncentrisanim ili nativnim uzorcima rečne vode. Analizom RAPD profila tretirane i netretirane grupe organizama može se ispitivati da li agensi koji su prisutni u ispitivanim uzorcima vode imaju uticaj na njihov nasledni materijal.

Zahvalnica

Ovaj rad realizovan je uz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br. ugovora 451-03-9/2021-14/ 200007) i međunarodne ekspedicije Joint Danube Survey 4. Autori se zahvaljuju Gradskom zavodu za javno zdravlje Beograd i Agenciji za zaštitu životne sredine Republike Srbije na ustupljenim podacima.

LITERATURA:

- Atienzar, F. A., Venier, P., Jha, A. N., Depledge, M. H. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 521(1-2) (2002) 151-163.
- Bardacki, F., Skibinski, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73(2) (1994), 117-123.
- Deuschmann, 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. 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 (2016) 1441-1449.
- Jovanović, J., Kolarević, S., Milošković, A., Radojković, N., Simić, V., Dojčinović, B., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Kostić, J., Sunjog, K., Timiljić, J., Djordjević, J., Gačić, Z., Žegura, B., Vuković-Gačić, B. Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin *in vitro* and *in situ*. *Science of the Total Environment* 621 (2018) 1289-1299.
- Marić, Jovanović, J., Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Đorđević, J., Paunović, M., Kostić-Vuković, J., Sunjog, K., Smiljanić, P., Vuković-Gačić, B. Sensitivity of vreak (*Alburnus alburnus*) in detection of the wastewater related pressure in large lowland rivers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 105(2) (2020) 224-229.
- Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Kostić-Vuković, J., Jovanović, J., Simonović, P., Simić, V., Piria, M., Gačić, Z., Lendhardt, M., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. The genetic variability (RAPD) and genotoxicity *in vivo* (alkaline and Fpg-modified comet assay) in chub (*Squalius cephalus*): The Sava River Case Study. *International Journal of Environmental Research* 12(5) (2018) 703-712.
- 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. Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. *PloS one* 11(9) (2016).
- Lynch, M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications* (1991) 113-126.
- Lynch, M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* 7(5) (1990) 478-484.
- Nadig, S. G., Lee, K. L., Adams, S. M. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. *Aquatic Toxicology*, 43(2-3), (1998) 163-178.

- Pandey, A. K., Nagpure, N. S., Trivedi, S. P. Genotoxicity assessment of pesticide profenofos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using comet assay and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Chemosphere* 211 (2018) 316-323.
- Salem, Z. B., Capelli, N., Grisey, E., Baurand, P. E., Ayadi, H., Aleya, L.. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: the advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101 (2014) 90-96.
- Sandoval-Castellanos, E., Uribe-Alcocer, M., Díaz-Jaimes, P. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fisheries Research* 83(1) (2007) 113-118.
- Welsh, J., McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18(24) (1990) 7213-7218.