

UTVRĐIVANJE GENOTOKSIČNOSTI VODA NA NEKIM LOKALITETIMA ZA NAPAJANJE DIVLJAČI U LOVIŠTIMA VOJVODINE^{1*}

Slavica Košarčić¹, Mira Kovačević¹, Dubravka Milanov¹,
Dejan Bugarski¹, Bojana Prunić¹, Nada Plavša²

¹Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

²Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Kratak sadržaj

Životna sredina je danas opterećena raznim biotičkim i abiotičkim faktorima koji utiču na procese živih organizama. Neki agensi, koji dospevaju u prirodne vodotokove, su genotoksični. To znači da utiču na genom i tokom mitoze i mejoze dovode do numeričkih i strukturnih promena u kariotipu. Istraživanja o stepenu genotoksičnosti voda sprovedena su na nekim lokalitetima u lovištima Vojvodine. Odabrana su tri lokaliteta u Sremu, Bačkoj i Banatu gde je uzorkovana voda na različitim nivoima navedenih staništa i za svako mesto je sačinjen zbirni uzorak. Metodom genotoksičnog testa *Allium cepa* i na kulturama limfocita sisara analizirane su citološke i citogenetičke promene u mitozima. Dobijeni rezultati ukazuju da je različit stepen genotoksičnosti voda i da zavisi od nivoa zagađenja životnog okruženja. Lovište iz Srema se nalazi u šumi gde su vođeni resursi nezaagađeni što je uticalo na rezultate testova koji su pokazali da je citogenetski nalaz uredan. Genotoksičnost voda je utvrđena na lokalitetu u Bačkoj gde je okruženje kanala dostupnog za napajanje divljači okruženo zagađenim zemljištem. Ovde su otkrivene promene u deobi ćelija kao i numeričke i strukturne u genomu. Banatsko lovište se nalazi u ataru, nije uočeno zagađenje, a citogenetičkom analizom otkrivene su promene na citološkom nivou koje nisu statistički značajne. Istraživanja je potrebno nastaviti i proširiti, jer ovaj obim nije dovoljan, ali je ukazao da genotoksičnost voda u lovištima postoji.

Ključne reči: lovište, voda, genotoksičnost, citogenetske promene

^{1*} Rad je rezultat istraživanja na projektu Ministarstva prosvete i nauke RS, TR 31084.

¹ E-mail: slavica@niv.ns.ac.rs

DETERMINING WATER GENOTOXICITY AT SOME SITES ON HUNTING GROUNDS IN VOJVODINA

Slavica Košarčić,¹ Mira Kovačević¹, Dubravka Milanov¹,
Dejan Bugarski¹, Bojana Prunić¹, Nada Plavša²

¹Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

²Faculty of Agriculture, Novi Sad

Abstracts

Various biotic and abiotic factors are present in ecosystem and they influence the processes of living organisms. Some agents that come into natural waterways are genotoxic. They affect genome and during mitosis and meiosis, and cause numerical and structural changes in karyotype. A research on the degree of genotoxicity on water was carried out on some hunting grounds in Vojvodina. Three sites were selected in Srem, Banat and Backa and water was sampled at different levels of the above mentioned habitats. A cumulative sample was made for each site. Cytological and cytogenetic changes in mitosis were analyzed on the lymphocyte mammalian samples applying *Allium cepa* genotoxic test. The obtained results point out that the toxicity of water is of different degree and depends on the level of environmental pollution. The hunting ground in Srem is located in the forest where water resources are not polluted, what affected the results showing favorable cytogenetic findings. Genotoxicity of water was detected in Backa where the channel, available to the game, is surrounded by contaminated ground. The changes in cell division were detected, as well as numerical and structural changes in the genome. Banat hunting ground is located in the fields. No contamination was observed. Changes in cytological level that were detected by cytogenetic analysis were statistically not significant. Further and expanded research is needed, as the applied scope of this work proved to be insufficient. However, it indicates the presence of water genotoxicity on hunting grounds in Vojvodina.

Key words: hunting ground, water, genotoxicity, cytogenetic changes

UVOD

Genotoksišnost podrazumeva uticaj raznih štetnih biotičkih i abiotičkih faktora na strukturu i funkciju genetskog materijala koji se menja kroz pojave narušenih faza deobe ćelija u mitozu i mejozu kao i numeričke i strukturne promene u kariotipu. Današnji savremeni svet zbog načina organizovanja društva-

va i stvaranja profita opteretio je životnu sredinu raznim genotoksičnim agensima koji dospevaju u staništa i uključuju se u ekosisteme. Životni uslovi, gde spada i voda u svim svojim pojavnim oblicima, narušeni su i to se manifestuje kroz promene u genomu živih organizama. Genotoksičnost voda je moguća, jer je utemeljena u činjenici da u prirodne vodotokove dospevaju razne štetne materije koje mogu uticati na nestabilnost genetskog materijala u ćeliji, kako vodenih organizama tako i terestričnih koji su u kontaktu sa prirodnim vodotokovima. Često su ove količine ispod nivoa detekcije, ali dugoročnim delovanjem utiču na genom izazivajući razne promene. Osnovni preduslov zaštite naslednog materijala biljnog, animalnog i humanog je uspostavljanje sistema praćenja i kontrole delovanja genotoksičnih agenasa (Košarčić et al 2003).

Cilj ovog rada je utvrđivanje stepena genotoksičnosti voda na različitim lokalitetima u lovištima Vojvodine.

MATERIJAL I METODE

Za utvrđivanje genotoksičnosti voda odabrana su tri lokaliteta u lovištima Vojvodine gde se divljač slobodno kreće i gde ta voda može da posluži za napajanje. S obzirom da je područje Vojvodine široko, odabrana su neka lovišta iz Srema, Bačke i Banata. Uzimani su uzorci voda sa različitih mesta i nivoa od površnog do nivoa dna i tako je za svaki lokalitet sačinjen zbirni uzorak. Genotoksičnost je moguće utvrditi poznatim testovima koji su registrovani kao: Ames Test, Green Skreen HC Genotoxicity Test, *in vitro* micronucleus test i test Allium cepa, kao i provera genotoksičnosti u kulturama ćelija i na limfocitima sisara. U ovim istraživanjima korišćen je test Allium cepa (Fiskesjo et al., 1988) i citogenetička kontrola u kulturama ćelija. Allium test je veoma jednostavan ali pouzdan način proučavanja delovanja hemijskih agenasa iz vode na genom. Pouzdanost je dokazana u komparaciji sa drugim testovima tokom dugogodišnje primene. Ovaj test omogućuje praćenje hromozoma tokom mitoze i eventualni rizik od numeričkih promena, kao i oštećenja genetičkog materijala na hromozomskom nivou u smislu kinetike, separacije, strukture i organizacije hromozoma, kao i promena u mitotskom ciklusu. Prema zvaničnom protokolu za ovaj test je potrebno odabrati zdravih 12 lukovica crnog luka veličine 15–20 mm, težine 2–4 g citogenetske formule $2n=16$, kao i posude sa tečnošću i materijalom za zamračivanje zbog korenskog sistema. Nakon dva dana formira se koren i tada odabere po pet lukovica za kontrolu koje nastavljaju rast u destilovanoj vodi, a drugih pet u uzorkovanoj vodi čiju genotoksičnost proveravamo. Posle 24 h od odsečaka korenčića uz maceraciju, fiksaciju i bojenje 2% aceto-orceinom dobijamo preparate za mikroskopiranje hromozoma i pratimo promene u mitozu kontrolnih i eksperimentalnih lukovica.

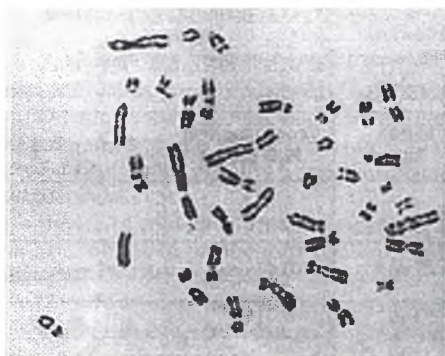
Iz uzorkovane vode hemijskim putem su identifikovani potencijalni genotoksici koji su injektovani u kulture ćelija MDBK PK15, koje su obrađene i pripremljene za citogenetsku analizu metodom (Seabright et al., 1971). Hromozomi su analizirani metodom za Međunarodnu kariotipizaciju (ISCENDA 1990). Mikrofotografije su urađene na mikroskopu Olympus BX 40.

REZULTATI I DISKUSIJA

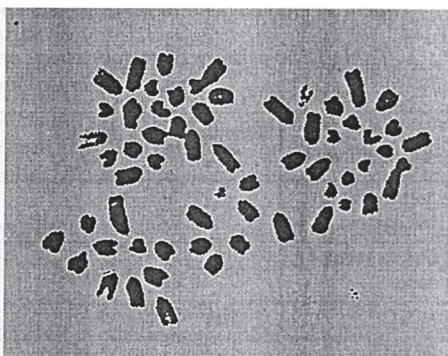
Tokom istraživanja utvrđeno je da su vode iz odabranih lokaliteta različitog stepena zagađenja što se odražava na genotoksičnost. U uzorku vode iz bare koja se nalazi u blizini reke Studve, u šumi gazdinstva Morović, nisu otkrivene promene tokom mitotske aktivnosti ćelija u ćelijama korena *Allium cepa* i ćelijama kultura sisara. Citogenetski nalaz je uredan bez numeričkih i strukturnih promena (Sl. 1).



Slika 1. Normalna anafaza u deobi *Allium cepa*



Slika 2. Normalan kariotip $2n=38XY$,
kultura ćelija, Gimsa, 1000X

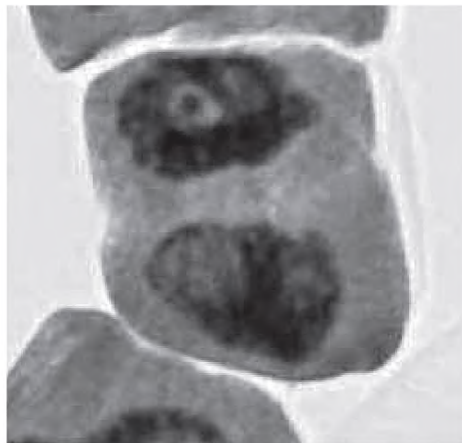


Slika 3. Normalan kariotip $2n=60XY$,
kultura ćelija, Gimsa, 1000X

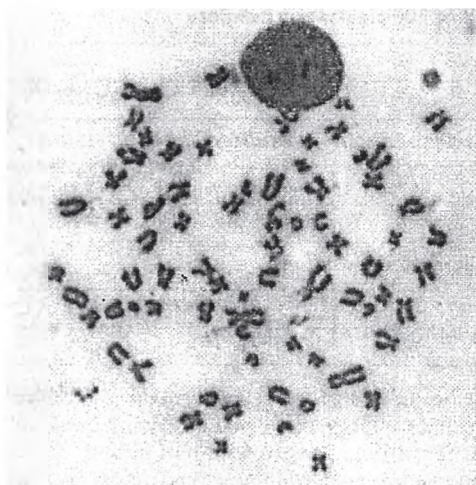
Dobijeni rezultati genotoksičnosti voda iz kanala u lovištu Begečkog atara ukazuju na prisustvo genotoksičnih agenasa u zbirnom uzorku poreklom sa različitih mesta i nivoa ovog vodotoka koji protiče kroz atar i okružen je divljim deponijama.



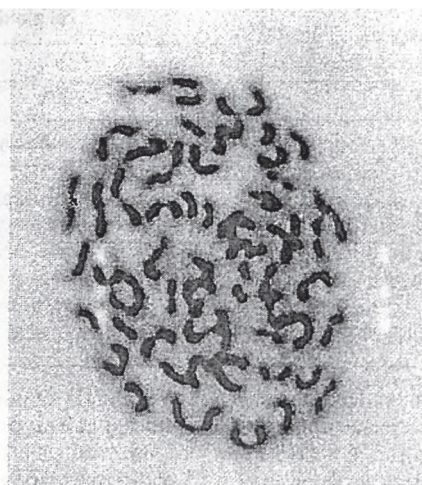
Slika 4a i 4b. Anafaza sa hromozomskim mostovima u ćeliji korena luka



Slika 5a i 5b. Aglutinacija u metafazi u ćeliji korena luka



Slika 6. Poliploidija $2n+76XYXY$



Slika 7. Segregacija hromozoma

Rezultati Allium testa su dobijeni utvrđivanjem i analizom mitotske aktivnosti (indeks mitoze) meristemskih ćelija korena luka, odnosno frekvencijom pojedinih faza mitoze na osnovu analize po dva preparata za kontrolne tretmane i po tri preparata za svaki eksperimentalni tretman. Mitotski indeks je iskazan postotkom ćelija u deobi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija. Frekvencija pojedinih faza mitoze izražena je apsolutnim brojem i postotkom u odnosu na ukupan broj ćelija u deobi.

U daljoj citogenetičkoj analizi observirane su eventualne promene strukture i kinetike hromozoma tj. iregularnosti na nivou ćelija i hromozoma tokom

svih faza ćelijskog ciklusa. Uočene su promene tipa hromozomskih mostova i aglutinacije hromozoma i to iznad tolerantnih 2%, a takođe je slabiji mitotski indeks (Slike 3–5). Rezultate istraživanja genotoksičnosti i slične manifestacije u ćelijskim deobama iznela je grupa autora za test Allijum cepa (Grant WF et al., 1982, Fatić et al., 2008). Numeričke i strukturne promene tipa poliploidije i segregacije hromozoma otkrivene su u kulturama limfocita ćelija sisara (Slika 6, 7). Citogenetičkom analizom kultura biljnih i animalnih ćelija sa navedenih lokaliteta lovišta u Banatu otkrivene citološke promene nisu statistički značajne, jer se kreću u nivou do 2%.

ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

Tokom istraživanja dobijeni rezultati ukazuju da postoji genotoksičnost voda i da se manifestuje kroz citološke promene u mitotskim fazama. Genotoksičnost utiče na status kariotipa, jer su na jednom lokalitetu otkrivene numeričke i strukturne promene u genomu. Step en citogenetskih promena direktno zavisi od step ena opterećenja vodotokova štetnim agensima. Istraživanja je neophodno nastaviti.

LITERATURA

1. Grant W.F.: Chromosome aberration assay in Allium, A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Washington. *Mutat. Res.* 99, 273-291, 1982.
2. Di Berardino D., Hayes H., Frigs K. Long: ISCENDA Cytogenet. Cell. Genet. 1990.
3. Fatić A: Istraživanje Genotoksičnih efekata sirovog ekstrakta biljke *Calendula officinalis* L. *Veterinarija*, 57, 3-4, 159 -336, 2008.
4. Fiskesjo G.: The Allium test-on alternative in environmental studies. The relative toxicity of metal ions, *Mutation Research*, 197, 243-260, 1988.
5. Košarčić S., Kovačević M., Stojanović D., Milanov D.: Utvrđivanje genotoksičnosti otpadnih voda na mestima proizvodnje namirnica animalnog porekla. U: Zbornik radova, Međunarodna konferencija, Otpadne vode, komunalni čvrsti otpad i opasan otpad, 102-107, 2003.
6. Seabright M.: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2, 971-972, 1971.

Primljeno: 15.10.2012.
Odobreno: 01.11.2012.