

## CITOGENOTOKSIČNA PROCJENA EFIKASNOSTI BIOLOŠKE OBRADE OTPADNIH VODA

*Amela Hercegovac<sup>1</sup>, Melina Zolotić<sup>1</sup>, Snježana Hodžić<sup>1</sup>, Edina Hajdarević<sup>1</sup>,  
Emina Hadžić<sup>1</sup>, Rifet Terzić<sup>1</sup>*

**Izvod:** Cilj istraživanja je bio analizirati citogenotoksični efekat uzoraka vode uzetih sa postrojenja za biološko prečišćavanje komunalnih otpadnih voda. Uzorci su uzeti iz različitih faza obrade sa prečišćavača vode grada Odžak, te iz rijeka Bosne i Save. Kao bioindikator korištene su lukovice *Allium cepa*. Najmanja vrijednost mitotičkog indeksa zabilježena je na ulazu u sistem prečišćavanja (1,9%), a najveća na đubrivu koje predstavlja nus-produkt prečišćavanja (16,85%). Broj hromosomskih aberacija se u procesu prečišćavanja smanjio za 52,7%. Rezultati ukazuju na zaključak da se biološkom obradom otpadne vode smanjuje njen genotoksični i citotoksični efekat.

**Ključne reči:** citotoksičnost, genotoksičnost, voda, *Allium*, test

### Uvod

Genotoksični efekat vode kao životne sredine utemeljen je na činjenici da u prirodne vodotokove dopijevaju različite štetne materije koje izazivaju nestabilnost genetičkog materijala vodenih i terestričnih organizama koji je usvajaju na bilo koji način. Često su količine ovih materija ispod nivoa detekcije, ali dugoročnim djelovanjem utiču na genom izazivajući različite uočljive promjene. Osnovni preduslov zaštite biljnog, animalnog i humanog nasljednog materijala je upravo uspostavljanje sistema praćenja i kontrole djelovanja genotoksičnih agenasa (Košarčić i sar., 2003). U sjevernom dijelu Bosne i Hercegovine je grad Odžak na čijem je području izgrađena kanalizacijska mreža mješovitog tipa. Sve vrste otpadnih voda njegovog gravitirajućeg područja, sanitarno-fekalne, industrijske i oborinske, zajedno se odvođe do postrojenja za prečišćavanje koji podrazumijeva i biološki tretman vode aktivnim muljem. Konačni prijemnik prečišćene otpadne vode je rijeka Bosna koja je kategorizirana kao prijemnik III kategorije. Na lokaciji postrojenja izgrađeni su građevinski objekti mehaničkog dijela prečišćavanja u dvije linije: linija sanitarno-fekalnih voda i linija oborinskih voda. Biološki tretman otpadne vode podrazumijeva uspostavljanje mješovite mikrobne zajednice u kojoj aerobni organizmi razgrađuju organske sastojke različitog porijekla iz otpadne vode uz unešeni kisik. Na navedenom postrojenju vrši se u dva odvojena bazena, sa ugrađenim sistemom za finomjehuričastu aeraciju: bioeracijskom – gdje se vrši razgradnja ugljikovih spojeva i stabilizacijskom – u kojem se vrši stabilizacija mulja. Smjesa prečišćene otpadne vode i aktivnog mulja odvodi se iz bioeracijskih bazena u sekundarni taložnik gdje se vrši finalno razdvajanje prečišćene otpadne vode i mulja (Proton, 2010).

---

<sup>1</sup>Univerzitet u Tuzli, Prirodno–matematički fakultet, Univerzitetska 4, Tuzla, BiH (amela.hercegovac@untz.ba);

Promjene u genomu indukovane citogenotoksičnim djelovanjem citološki se mogu detektovati najčešće u vidu fragmentacija DNA, inhibiranju stanične diobe, i prekidanju staničnog ciklusa u njegovim različitim fazama (Grant, 1999; Gustavino i sar., 2012). Za procjenu citogenotoksičnog učinka različitih faktora na žive organizme primjenjuju se biotestovi. Krajnji cilj je otkriti utiče li primijenjeni faktor na testni organizam, ćelijsku strukturu, tkivo ili organ i na kraju uočenu promjenu kvalitativno i kvantitativno izraziti (Vidaković-Cifrek i sar., 1995). *Allium* test predstavlja praktičan sistem za analizu anatomskih (rast korijena, deformacija, uvijanje) i mikroskopskih parametara (hromosomske abnormalnosti, izmjenjen mitotski indeks i formacije mikronukleusa). Pogodan je biološki indikatorski sistem za utvrđivanje toksičnog i genotoksičnog efekta određenih agenasa, pri čemu se za test citotoksičnosti prati rast korijena u dužinu, a za test genotoksičnosti se registruju vrijednosti mitotičkog indeksa i sve promjene vezane za hromosome u smislu kinetike, separacije, strukture i organizacije hromosoma, te promjene diobenog vretena tokom mitotičke diobe (Tedesco, Laughinghouse, 2012).

Budući da otpadne vode mogu sadržavati neke agense koji između ostalog imaju mutageno, genotoksično i citotoksično djelovanje na jedinke koje u njoj žive, sakupljanje, obrada i pravilna dispozicija takvih voda je od prioritetnog značaja za unaprjeđenje razvoja i kvalitete življenja. Postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda u pravilu su locirana na kraju kanalizacijskog sistema, neposredno prije ispuštanja otpadnih voda u prijemnik, i predstavljaju osnovni element u zaštiti voda od zagađenja. Cilj ovog istraživanja bio je analizom mitotičkog indeksa meristemskih ćelija *Allium cepa* i učestalosti različitih tipova hromosomskih abnormalnosti odrediti citotoksični i genotoksični efekat ispitivanih uzoraka vode uzetih prije, u toku i nakon biološke obrade otpadne vode aktivnim muljem u smislu procjene efekta biološke obrade otpadnih voda.

### Materijal i metode rada

Uzorci vode su uzeti iz različitih faza biološke obrade: otpadna voda pri ulasku na prečistač (u daljnjem tekstu lokalitet 1), voda iz bioaeracijskog bazena sa aktivnim muljem (u daljnjem tekstu lokalitet 2), voda na izlazu iz prečistača (u daljnjem tekstu lokalitet 3), đubrivo kao jedan od nusprodukata prečišćavanja vode (u daljnjem tekstu lokalitet 4), te iz rijeke Bosne na području Odžaka koja predstavlja recipijent biološki obrađene vode (u daljnjem tekstu lokalitet 5), i iz rijeke Save (u daljnjem tekstu lokalitet 6). Lukovice *Allium cepa* L., su prvobitno postavljene u epruvete sa česmenskom vodom na naklijavanje na sobnoj temperaturi tokom 48 sati ili više, nakon čega je česmenska voda zamijenjena sa vodom odgovarajućeg uzorka i lukovice su ostavljene da klijaju još 72 sata. Za svaki lokalitet je korišteno po 6 lukovica *Allium cepa* L., te još po jedna lukovica za pozitivnu i negativnu kontrolu. Česmenska voda je korištena kao negativna kontrola, dok je pozitivna kontrola sadržavala 8 mM etilen di aminotetra sirćetnu kiselinu (EDTA).

Za svaku grupu uzoraka je pregledano najmanje 2000 ćelija kroz 2 tretmana pripreme mikroskopskih preparata, među kojima je utvrđen mitotički indeks i frekvencija uočenih hromosomskih aberacija. Vrijednost mitotičkog indeksa računata je

kao proporcija sume svih ćelija u ćelijskoj diobi i ukupnog broja posmatranih ćelija pomnoženo sa 100 (Prabhakar i Sakya, 2008.):

$$M(\%) = \frac{\sum(P + M + A + T)}{\sum(P + M + A + T + I)} \times 100$$

P- profaza, M- metafaza, A- anafaza, T- telofaza, I- interfaza.

Analizom preparata bilježen je broj i prisustvo promjena u obliku i položaju hromozoma: anafazni i telofazni mostići, hromozomski lomovi i zaostajanje hromozoma. Testiranje statistički signifikantnih razlika između aritmetičkih sredina mitotskih indeksa uzoraka uzetih sa različitih lokaliteta izvršeno je analizom varijance (ANOVA) i T-testom.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati analize citogenotoksičnog efekta prikazani su u Tabeli 1. Najveći prosječan porast korjenčića evidentiran je kod lukovica iz uzorka sa lokaliteta 6 (13,8), a najmanji kod lukovica uzgajanih nad uzorkom vode sa lokaliteta 2 (4,1). Najmanja vrijednost mitotičkog indeksa zabilježena je na lokalitetu 1, odnosno na ulazu otpadne vode (1,9), a najveća na lokalitetu 4 (16,85), odnosno đubrivu koje predstavlja nus-produkt prečišćavanja. Frekvencija hromosomskih aberacija također se smanjuje sa većim stupnjem prečišćavanja otpadne vode. Od ukupno 2000 analiziranih meristemskih ćelija korijena lukovica *Allium cepa L.* po uzorku sa određenog lokaliteta, najmanji procenat hromosomskih abnormalnosti uočen je u uzorku vode sa lokaliteta 5 i to 1,9%, a najviši u uzorku vode uzetog sa lokaliteta 1, gdje je uočeno 6,35% aberacija. U uzorku vode sa lokaliteta 6, iz rijeke Save odnosno nakon procesa prečišćavanja, također se uočava veći procenat hromosomskih aberacija (4,4%) u odnosu na lokalitete 2, 3, 4 i 5. Na osnovu rezultata o prosječnoj dužini korjenčića lukovica *Allium cepa L.*, vrijednosti mitotskog indeksa, te procentu hromosomskih aberacija, možemo uočiti negativan efekat vode uzete sa lokaliteta 1, tj. prije biološke obrade otpadne vode na korjenčiće, budući da tu uočavamo najveći broj hromosomskih aberacija, kao i najmanju vrijednost mitotskog indeksa.

Analiza varijance (ANOVA) mitotičkih indeksa uzoraka lokaliteta 1 ( $F = 244,35 > 18,51$ ) i lokaliteta 6 ( $F = 39,63 > 18,51$ ) u odnosu na kontrolnu grupu ćelija također pokazuje statistički značajnu razliku na nivou značajnosti 0,05.

U dostupnoj literaturi nismo pronašli podatke o izvođenju sličnih analiza vode sa postrojenja koja podrazumijevaju biološki tretman otpadnih voda. Stoga smo rezultate mitotičkog indeksa komparirali sa vrijednostima utvrđenim u nekim prirodnim vodenim sistemima.

Tabela 1. Srednja vrijednost dužine korjenčića, mitotički indeks i učestalost hromosomskih aberacija prema uzorku  
 Table 1. The mean value of length roots, mitotic index and frequency of chromosomal aberrations according to the sample

Uzorak Sample	Srednja vrijednost dužine korjenčića (mm) <i>The mean value of length roots (mm)</i>	Mitotički indeks MI (%) <i>Mitotic index (%)</i>	Učestalost hromosomskih aberacija (%) <i>Frequency of chromosomal aberrations (%)</i>
L1.	5,50	1,90	6,35
L2.	4,10	13,80	3,85
L3.	5,90	12,40	3,00
L4.	5,40	16,85	2,30
L5.	11,60	14,85	1,90
L6.	13,80	8,90	4,40
Negativna kontrola <i>Negative control</i>	17,0	15,45	0,60

Tabela 2. Vrijednosti "p" dobijene kompariranjem aritmetičkih sredina mitotičkih indeksa pojedinih uzoraka primjenom T-testa  
 Table 2. The values of "p" obtained by comparing of the arithmetic means of mitotic indexes of individual samples using the T-test

Komparirani uzorci <i>Comparative samples</i>	L1-L2	L1-L3	L1- L4	L1-L5	L1-L6	L2-L5	L2-L6
p vrijednost T testa ( $p < 0,05$ ) <i>p value of T test (<math>p &lt; 0,05</math>)</i>	0,005	0,02	0,04	0,007	0,03	0,03	0,03

U istraživanju citogenotoksičnosti u uzorcima riječne vode kontaminirane teškim metalima tokom 2001., 2003. i 2005. godine (Ivanova i sar., 2008) vrijednosti mitotičkog indeksa su bile proporcionalne sadržaju teških metala i cijanida, i kretale su se između 3,5 % u 2001. godini do maksimalne vrijednosti 8,71 % u 2005. godini. Maksimalna vrijednost mitotičkog indeksa 8,71% prema navedenom istraživanju najbliža je vrijednosti utvrđenoj na našem lokalitetu 6, u rijeci Savi 8,9 % , dok je prema našim rezultatima u uzorcima uzetim iz različitih faza prečišćavanja ta vrijednost veća i kreće se do 16,85 %.

Mitotički indeks utvrđen analizom vode iz jezera Sniježnica, 10,73%, (Hercegovac i sar., 2016), znatno je veći u odnosu na mitotički indeks utvrđen u uzorcima neprečišćene kanalizacijske vode sa našeg lokaliteta 1, (1,9%), ali je manji u odnosu na lokalitet 3, tj. u uzorcima uzetim nakon biološke obrade otpadne vode (12,4 %).

### Zaključak

U uzorcima vode uzetim nakon biološkog tretmana utvrđene su veće vrijednosti mitotičkog indeksa i manja frekvencija hromosomskih abnormalnosti što upućuje na zaključak da ovakav tretman vode smajuje njen genotoksični i citotoksični efekat. Broj hromosomskih abnormalnosti se u procesu prečišćavanja aktivnim muljem smanjio za 52,7%. Rezultati istraživanja ukazuju na potrebu za većim brojem ovakvih prečišćaća, čime bi se doprinijelo poboljšanju kvalitete življenja i smanjenju toksičnih agenasa u vodama koje su nezaobilazan dio svakodnevnog života živih bića.

### Literatura

- Grant W. F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 426: 107-112
- Gustavino B., Ceretti E., Zani C., Zerbini I., Rizzoni M., Monarca S., Ferretti D. (2012). Influence of temperature on mutagenicity in plants exposed to surface disinfected drinking water, *Journal of water resource and protection*, 638-647
- Hercegovac A, Hodžić S, Husejnagić D, Hajdarević E, Širanović S, Majstorović A (2016). Cytogenotoxic and microbiological assessment of water quality of the lake Sniježnica. *Technologica Acta Journal of Science-professional from Chemistry and Technology Faculty of Technology Tuzla Vol. 9 Number 1*, page 1 – 96, Tuzla.
- Ivanova, E., Staykova T. and Velcheva I. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of heavy metal and cyanide-contaminated waters in some regions for production and processing of ore in Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 14: 262-268
- Košarčić S., Kovačević M., Milanov D., Bugarski D., Prunić B., Plavša N. (2003). Utvrđivanje genotoksičnosti voda na nekim lokalitetima za napajanje divljači u lovištima Vojvodine, *Arhiv veterinarske medicine*.
- Proton d.o.o. (2010). Projekat izvedenog stanja objekata sekundarnog tretmana postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda Odžak-10 000 ES, Gornji Kneginec, Hrvatska
- Prabhakar B., Sakya S.R. (2008). Study of mitotic activity and chromosomal behaviour in root meristem of *Allium cepa* L. treated with magnesium sulphate. *Ecological Society (ECOS)*15: 83-88. Nepal: Ecoprint.
- Tedesco S. B., Laughinghouse H. D. IV (2012). Bioindicator of genotoxicity: The *Allium cepa* test, environmental contamination, dr. Jatin Srivastava (Editor), InTech Publisher, ISBN: 978-953-51-0120-8
- Vidaković-Cifrek Ž, Krsnik-Rasol M, Regula I, Papeš D. (1995). Calcium chloride and calcium bromide in *Allium* test, Lemna test and their effect upon peroxidase in *Avena coleoptiles*. Abstract Book, 25-th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Noordwijkerhout, Nizozemska.

## CYTOGENOTOXICITY ASSESMENT EFFECTIBILITY OF BIOLOGICAL TREATMENT WASTEWATER

*Amela Hercegovac<sup>1</sup>, Melina Zolotić<sup>1</sup>, Snježana Hodžić<sup>1</sup>, Edina Hajdarević<sup>1</sup>,  
Emina Hadžić<sup>1</sup>, Rifet Terzić<sup>1</sup>*

### Abstract

The aim of the research was to analyze the cytogenotoxic effects of water samples taken from the biological wastewater treatment. Samples were taken from different stages of of wastewater treatment from the town of Odžak, and from the river Bosna and Sava. As a bioindicator, *Allium cepa* were used. The lowest value of the mitotic index was recorded at the entry into the purification system (1.9), and the largest on the fertilizer that represents the purification product (16.85). The number of chromosomal aberrations in the purification process decreased by 52.7%. The results indicate that biological wastewater treatment reduces its genotoxic and cytotoxic effects.

**Key words:** cytotoxicity, genotoxicity, water, *Allium*, test

---

<sup>1</sup>University of Tuzla, Faculty of Natural science and Mathematics, Univerzitetska 4, Tuzla, BiH (amela.hercegovac@untz.ba)