

Utvrđivanje toksičnosti i genotoksičnosti efluenta sa deponije grada Valjeva i ispitivanje potencijala za primenu biljnog otpada u prečišćavanju otpadnih voda

Mnogobrojni su izvori otpadnih voda od kojih su najčešći urbana naselja, industrijski objekti i komunalne deponije. Postojeći sistemi za prečišćavanje otpadnih voda su veoma skupi i nedovoljno zastupljeni. U ovom istraživanju je ispitan potencijal za korišćenje biljnog otpada kao filtera za otpadne vode. Biljni otpad sadrži veliku količinu vlakana koja mogu apsorbovati mutagene iz vode pa zato ima potencijal za korišćenje pri izradi filtera za prečišćavanje otpadnih voda. Iz bare sa deponije u Valjevu uzet je uzorak otpadne vode. Uzorak je filtriran kroz filtere napravljene od suvih listova kukuruza i piljevine hrasta. Na dobijenim filtratima je izvedena baterija testova, kako bi se utvrdila toksičnost i genotoksičnost nefiltriranog uzorka vode i uzorka vode nakon filtriranja. U bateriju su uključeni Ames test, Allium test i Komet test. Rezultati Ames testa su pokazali da filteri nemaju sposobnost apsorpcije mutagena iz otpadnih voda, a sami filteri od listova kukuruza imaju mutageni potencijal. Allium test ukazuje da se toksičnost ispitivanih uzoraka vode povećala nakon filtracije kroz konstruisane filtere. Komet testom je detektovan genotoksični potencijal vode, ali nisu uočene razlike između filtriranih i nefiltriranih uzoraka. Na osnovu navedenih rezultata zaključujemo da se filteri konstruisani u ovom eksperimentu ne mogu koristiti za tretman otpadnih voda.

Uvod

Nedostatak pijaće vode postaje sve ozbiljniji problem u svetu. Razlozi su brza urbanizacija, porast populacije i nagla ekspanzija industrije (Ma *et al.* 2009). Komunalne i industrijske otpadne vode su jedan od najznačajnijih izvora zagađenja površinskih voda u Evropi. Mnoge supstance koje se nalaze u otpadnim vodama mogu imati subletalne ili letalne efekte na organizme. Mutagenost i genotoksičnost su među najčešćim subletalnim efektima (Muz *et al.* 2017). Mutagenost predstavlja sposobnost nekog agensa da izazove mutacije, tj. nasledne promene na molekulima DNK. Efekat mutagena zavisi od tipa ćelije na koji mutagen utiče, kao i od toga da li mutacija remeti normalan metabolizam (Brusseau *et al.* 2019). Genotoksičnost je širi pojam od mutagenosti, i predstavlja sposobnost nekog agensa da izazove lezije na molekulima DNK koje rezultuju ćelijskom smrću ili mutacijama.

Izvori otpadnih voda su urbana naselja, industrijski objekti i deponije komunalnog i industrijskog otpada, pa se prema tome otpadne vode dele na: otpadne vode iz naseljenih područja (potiču od ljudi i životinja), industrijske otpadne vode i atmosfere vode nastale spiranjem sa zemljišta (Đukanović 1991). Neposredno (direktnim izlivanjem) ili posredno (putem padavina), otpadne vode dospevaju u površinske ili podzemne vode koje se koriste za vodosnabdevanje. Pored toga, otpadne vode mogu dospeti do poljoprivrednog zemljišta, i na taj način kontaminirati hranu koju čovek konzumira. U ovim

Simonida Tubić (2001), Beograd, 6. Ličke divizije 70, učenica 3. razreda XII beogradske gimnazija

Lazar Kristić (2000), Valjevo, Doktora Pantića 102, učenik 4. razreda Tehničke škole Valjevo

MENTORI:

Iva Atanasković, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Jelena Đorđević, Katedra za mikrobiologiju, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

vodama se mogu naći visoke koncentracije toksičnih metala poput kadmijuma, žive i nikla, kao i mnoga toksična organska jedinjenja. Pored toga što su pomenute zagađujuće materije većinom kancerogene, nek od njih se akumuliraju u tkivima mekušaca i riba, te do čoveka dolaze kako direktno, tako i indirektno putem ishrane organizmima u čijim su tkivima akumulirane. Otpadne vode mogu biti veoma opasne, jer mogu dovesti i do bakteriološkog zagađenja površinskih voda i hidričnih epidemija. Usled neadekvatnog tretmana otpadnih voda (direktno ispuštanje vodene tokove bez prethodnog prečišćavanja), može doći do značajnih negativnih posledica po vodene ekosisteme (Đukanović 1991).

Komunalne deponije su značajan izor zagađenja voda, pošto se često nalaze na obalama reka. Jedinjenja prisutna na deponijama mogu naneti veliku štetu vodenim ekosistemima. Ispod otpadnog materijala se stvara tečni filtrat, nastao atmosferskim padavinama, koji lako dospeva do podzemnih voda i do vodenih tokova. Ovakav filtrat najčešće sadrži nitrata, hloride, sulfata i mnoge druge supstance koje nisu biorazgradive (Đukanović 1991). Sistemi koji se koriste za prečišćavanje otpadnih voda su uglavnom skupi i nedovoljno zastupljeni, te se traga za alternativnim ekonomičnijim načinima da se otpadne vode učine bezbednim za životnu sredinu.

Biljna vlakna su konstituenti poput celuloze, hemiceluloze, lignina i pektina, koji se nalaze u ćelijskom zidu biljaka. Zbog svoje strukture ona imaju veliku adsorpcionu moć, i mogu se ponajviše koristiti kao dezmutageni (vezuju mutagene i sprečavaju njihovu interakciju sa DNK) (Hayatsu *et al.* 1988). Zbog navedenih svojstava, aktuelno je i značajno ispitivati potencijal poljoprivrednog otpada kao biofiltera za otpadne vode. Kao izvor biljnih vlakana se može koristiti poljoprivredni otpad poput stabljika pšenice, opni zrna pšenice, listova čaja, ljuske oraha i lešnika, kore drveta i sl. Ovakvi filteri su biorazgradivi i ekonomski isplativi. Potencijalni problem prilikom korišćenja ovakvih filtera predstavlja dalje odlaganje upotrebljenih filtera, kao i neispitan kapacitet filtera.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi toksičnost i genotoksičnost efluenta koji se sa gradske deponije u Valjevu sliva u Kolubaru, kao i da se ispita mogućnost primene listova kukuruza i piljevine hrasta kao biofiltera za prečišćavanje otpadnih voda.

Materijal i metode

Otpadna voda sa komunalne deponije grada Valjeva je sterilno uzorkovana neposredno ispod deponije, na levoj obali reke Kolubare. Napravljeni su filteri od biljnog otpada i pripremljeni filtrati otpadne vode, čiji je mutageni, odnosno genotoksični potencijal ispitivan. *Allium* testom je ispitana citotoksičnost filtriranih i nefiltriranih uzoraka, Ames testom je ispitana mutagenost uzorka otpadne vode pre i nakon filtriranja, dok je Komet test korišćen za detekciju dvolančanih prekida na DNK ćelija crva *Caenorhabditis elegans*, prethodno tretiranih filtriranim i nefiltriranim uzorcima vode.

Priprema filtera i filtriranje uzorka

U ovom istraživanju su korišćene dve vrste biljnog otpada: listovi kukuruza i piljevina hrasta. Listovi kukuruza su uzorkovani sa njive u selu Petnica, a piljevina hrasta je dobijena iz stolarske radionice. Prikupljeni listovi kukuruza su usitnjeni, a zatim osušeni na temperaturi od 60°C.

Filteri su pripremljeni na sledeći način: na dno 6 tuba od špriceva (od 60 mL) su stavljeni inertni filteri od staklenog vlakna, kako biljni materijal ne bi ispadao iz njih. Tuba su zatim postavljene na kleme i napunjene: tri tube su napunjene sa po 4.2 g listova kukuruza pripremljenih na prethodno opisan način, a ostale tri tube su napunjene sa po 7.3 g piljevine hrasta. Ovakvo pripremljeni filteri su isprani sa po 250 mL dH₂O, zatim sa 25 mL 0.07 N HCl i na kraju sa još 300 mL dH₂O da bi se uklonili tragovi HCl iz filtera (Moorman *et al.* 1983).

Kroz četiri pripremljena filtera (dva sa listovima kukuruza i dva sa piljevinom) je filtrirana uzorkovana voda, dok nije prikupljeno po 250 mL filtrata.

Kroz preostala dva filtera je filtrirana voda sa česme. Ovi filtrati su korišćeni kao kontrola mutagenog potencijala samih filtera (dalje u radu navođeno kao kontrola filtera od kukuruza i kontrola filtera od piljevine)

Ames test

Ames test je urađen prema standardnom protokolu broj 471 Evropske organizacije za bezbednost i saradnju (Ames *et al.* 1975). Korišćen je bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA00, koji zbog mutacije na genu hisG46 ne može da

sintetiše aminokiselinu histidin, koja je esencijalna aminkosilina, bez koje ova bakterija ne može da raste. Ova mutacija je reverzibilna, i ukoliko pod dejstvom nekog mutagenog agensa dođe do mutacije, bakterija može da sintetisuje histidin, odnosno može da raste. Poređenjem broja izraslih kolonija nakon tretmana filtratima sa netretiranim kontroloma procenjena je efikasnost napravljenih filtera.

Pre samog testa svaki od filtrata je sterilisan dodatnim filtriranjem kroz filtere promera pora 0.22 μm . Za test je korišćeno po 100 μL svakog filtrata.

Allium test

Allium test je urađen po standardnom protokolu prema Fiskesjö (1985).

Test genotoksičnosti na *C. elegans*

Crvi *Caenorhabditis elegans* su kultivisani na NGM podlozi. Tokom 16 h, crvi su tretirani nefiltriranim vodom sa deponije i filtratima vode koji su umešani u S podlogu sa udelom od 5, 10 i 15 procenata.

Izolacija ćelija. Crvi su prebačeni u kivete i isprani 0.9% rastvorom NaCl 5 puta (1300 \times g, 1 min). Nakon toga su prebačeni u nove tube, a zatim je dodato po 250 μL SDS- β -merkaptotetanol (20 nM HEPES pH8, 0.25% SDS, 200 mM β -merkaptotetanol, 3% saharoza) i inkubirano 4 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije je dodato po 800 μL Egg pufera (25 mM HEPES, pH 7.3, 118 mM NaCl, 48 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2) i centrifugirano na 14 300 \times g 2 minuta. Supernatant je potom bio uklonjen, a crvi isprani u 1 mL Egg pufera 5 puta. Supernatant je ponovo uklonjen, a na talog je dodato po 200 μL pronaze E (20 mg/mL), i inkubirano na sobnoj temperaturi 60 minuta na šejkeru. Crvi su homogenizovani 21G iglom uvlačenjem i ispuštanjem 140-160 puta u toku 20-25 minuta. U homogenat je dodato po 900 μL medijuma za ćelije DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) koji je sadržao 15% goveđeg fetalnog seruma, nakon čega su 5 minuta centrifugirani na 150 \times g. Broj ćelija po mililitru je određen prebrojavanjem na hemocitometru, nakon bojenja tripan plavim.

Komet test. Predmetna stakla su presvučena 1% rastvorom agaroze normalne tačke topljenja. U bunariće mikrotitar ploče dodata je agarozna i

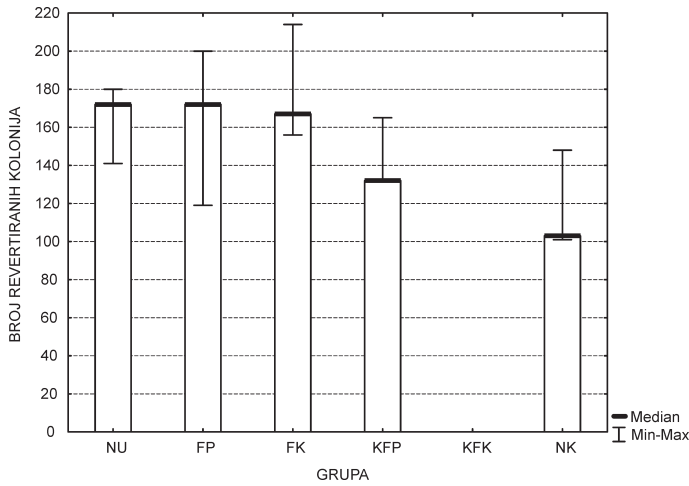
suspenzije od približno 3×10^5 nematodskih ćelija tretiranih i izolovanih na opisan način. Na predmetna stakla dodato je 30 μL ćelijske suspenzije u agarozu i 70 μL 1% agaroze niske tačke topljenja ukupno na 8 mesta u obliku kupola. Preparati su ostavljeni u frižideru 5 minuta da bi se agarozna stegla. Zatim su ćelije lizirane 1 h u puferu za liziranje (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5 Triton X-100, pH 10). Nakon toga pločice su prebačene u komoru za elektroforezu i prelivene puferom za denaturaciju i elektroforezu (0.2 M EDTA, 10 M NaOH, pH 13). Denaturacija je podrazumevala inkubaciju ćelija 20 minuta bez struje, nakon čega je izvršena elektroforeza ukupno 20 minuta (0.75 V/cm, 300 mA). Neutralizacija baza je izvršena inkubacijom u trajanju od 15 minuta u 0.4 M Tris puferu pH 7.5 u frižideru. Ćelije su zatim fiksirane u hladnom metanolu 15 minuta, nakon čega su pločice ostavljene da se suše 24 h na 4°C u mraku. Po 20 μL rastvora akridin-oranža (2 g/mL) bilo je korišćeno za vizuelizaciju DNK. Analizirano je po 50 jedara po uzorku fluorescentnom mikroskopijom (Leica, DMLS) koristeći softver Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Oštećenje DNK je kvantifikovano preko intenziteta fluorescencije fragmenata DNK nastalih dvolančanim prekidima, koji se nakon elektroforeze raspoređuju tako da podsećaju na rep komete.

Rezultati i diskusija

Na slici 1 je prikazan broj kolonija soja *Salmonella typhimurium* TA00 utvrđen Ames testom. Broj kolonija je najveći nakon tretmana filtratom kukuruza. Filtriranje uzorka kroz piljevinu i listove kukuruza nije dovelo do smanjenja broja revertantnih kolonija.

Dužina korenčića lukovica *Allium cepa* nakon 48 h tretmana filtratima je prikazana na slici 2. U grupama tretiranim nefiltriranim uzorkom, kao i filtratima uzorka kroz filtere od listova kukuruza i piljevine, rast je u potpunosti izostao. Čak su i kontrolni filtrati česemske vode kroz filter od piljevine, kao i filter od listova kukuruza značajno smanjili rast korenčića u odnosu na negativnu kontrolu.

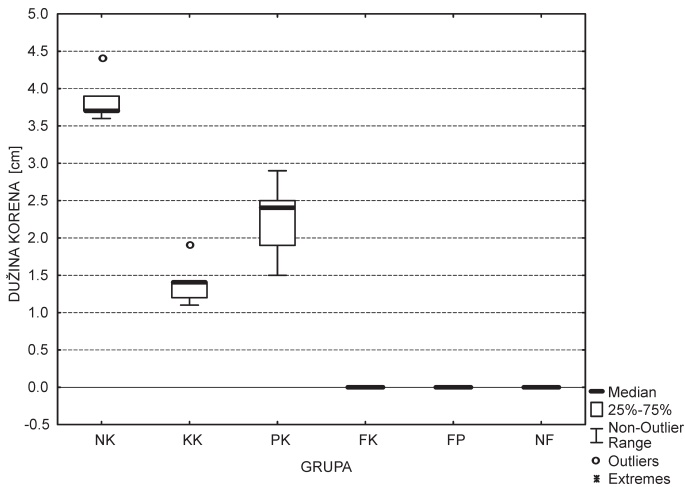
Intenzitet fluorescencije repova komete (TI) je prikazan na slici 3. Veće vrednosti ovog parametra ukazuju na postojanje više fragmenata DNK nastalih dvolančanim prekidima, odnosno



Slika 1. Broj revertantnih kolonija. NU – nefiltriran uzorak, FP – filtrat piljevine, FK – filtrat kukuruza, KFP – kontrola filtera od piljevine, KFK – kontrola filtera od kukuruza (kontaminacija, neuspela), NK – negativna kontrola (kolonije spontanih revertanata).

Figure 1. Number of reverted colonies.

NU – unfiltered sample, FP – filtrate of sawdust, FK – filtrate of maize, KFP – control of sawdust filters, KFK – control of corn filter (not assessed because of contamination), NK – negative control (spontaneous revertant colonies).

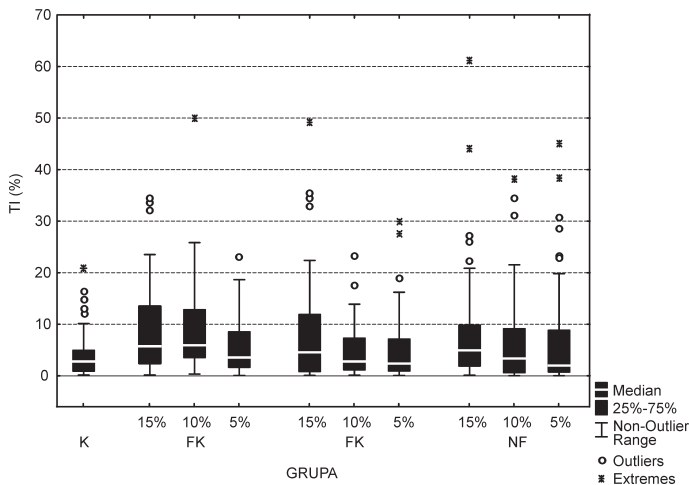


Slika 2. Dužina korena lukovica u cm nakon 48 h.

NK – negativna kontrola, KK – kontrola filtera od kukuruza, KP – kontrola filtera od piljevine, FK – filtrat kukuruza, FP – filtrat piljevine, NF – nefiltriran uzorak.

Figure 2. Length of root bulbs in cm after 48 h.

NK – negative control, KK – control of corn filters, KP – control of sawdust filters, FK – filtrate of maize, FP – filtrate of sawdust, NF – unfiltered sample



Slika 3. Efekat testiranih filtrata vode na nivo oštećenja DNK molekula.

FK – filtrat kukuruza, FP – filtrat piljevine, NF – nefiltriran uzorak, K – negativna kontrola.

Figure 3. Effect of tested water filtrates on the level of damage to DNA molecules.

FK – corn filtrate, FS – sawdust filtrate, NF – unfiltered sample, K – negative control.

na veće oštećenje DNK molekula. Tretman vodom filtriranom kroz oba testirana filtera nije doveo do manjih oštećenja na DNK molekulu u odnosu na tretman nefiltriranim uzorkom vode sa deponije.

Na osnovu rezultata Ames testa moglo bi se zaključiti da ni voda sa deponije pre filtriranja ni filtrati nemaju značajan mutageni potencijal.

U našem eksperimentu, mimo očekivanja, nefiltrirana voda je u potpunosti sprečila rast korenčića, a isti efekat su ostvarili i filtrati dobijeni filtriranjem kroz filter od piljevine i filter od kukuruza. Čak i tretman česmenskom vodom profiltriranom kroz testirane filtere umanjuje rast korenčića u odnosu na negativnu kontrolu, što navodi na pretpostavku da voda sa deponije, ali i sami filteri imaju citotoksičan potencijal. Bilo je poželjno ponovo postaviti i do kraja izvesti *Allium test*, ali za to nije bilo mogućnosti tokom eksperimentalnog dela istraživanja.

Iako neka ranija istraživanja naglašavaju potencijal biljnih vlakana poput celuloze za apsorpciju mutagena iz vode (Moorman *et al.* 1983) i preporučuju korišćenje biljnog otpada kao izvora vlakana za apsorpciju (Sud *et al.* 2008), na osnovu našeg istraživanja se nameće zaključak da biljni otpad nije tako dobar izbor za proizvodnju ekonomičnih i efikasnih filtera za prečišćavanje otpadnih voda. Ipak, s obzirom na brojne improvizacije u našim eksperimentima, moguće je da bi korišćenje biljnog otpada od biljaka gajenih u kontrolisanim uslovima i netretiranih pesticidima, kao i drugačija konstrukcija samih filtera dala bolji rezultat.

Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih kroz izvedenu bateriju testova, čini si da voda uzorkovana ispod gradske deponije u Valjevu ima određeni cito-

toksičan i genotoksičan potencijal. Takođe, ispostavilo se da filteri sa biljnim otpadom konstruisani na opisani način nemaju sposobnost apsorpcije mutagena iz otpadnih voda.

Literatura

- Ames B. N., Mccann J., Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, **31** (6): 347.
- Brusseau M. L., Peper I. L., Gerba C. P. 2019. *Environmental and Pollution Science*. Academic Press
- Đukanović M. 1991. *Ekološki izazov*. Beograd: Elit
- Fiskesjö G. 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, **102** (1): 99.
- Hayatsu H., Arimoto S., Negishi T. 1988. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, **202** (2): 429.
- Ma J., Ding Z., Wei G., Zhao H., Hunag T. 2009. Sources of water pollution and evolution of water quality in the Wuwei basin of Shiyang river, Northwest China. *Journal of Environmental Management*, **90** (2): 1168.
- Moorman W. F. B., Moon N. J., Wortington R. E. 1983. Physical Properties of Dietary Fiber and Binding of Mutagens. *Journal of Food Science*, **48** (3): 1010.
- Muz M., Dann J. P., Ja'ger F., Brack W., Krauss M. 2017. Identification of Mutagenic Aromatic Amines in River Samples with Industrial Wastewater Impact. *Environmental science & technology*, **51** (8): 4681.
- Sud D., Mahajan G., Kaur M. P. 2008. Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – A review. *Bioresource Technology*, **99** (14): 6017.

Simonida Tubić and Lazar Kristić

Determination of Toxicity and Genotoxicity of Effluent from the Landfill of the City of Valjevo and Examination of the Potential for the Application of Plant Material in Wastewater Treatment

Wastewaters are a significant source of surface water pollution. Genotoxicity is a common sublethal effect of pollutants present in wastewaters and surface waters. Wastewaters treatment plants are expensive and therefore, they are poorly used. In this research, we examined the potential of agricultural waste to be used as a fil-

ter for wastewater. Agricultural waste contains plant fibers that can possibly absorb mutagens from wastewater. The sample of wastewater was taken from a pond on a communal landfill in Valjevo. The water sample was filtrated through the systems filled with dry corn leaves and sawdust of oak, and the genotoxic potential of filtrates was tested through a battery of tests including *Allium* test, Ames test and Comet assay.

Results of the Ames test showed that filters used in this experiment cannot absorb mutagens, and, moreover, that corn leaves can even contribute to water genotoxicity. Results of the *Allium* test also showed that the filters themselves are toxic. Comet assay results indicate that water from the landfill has certain genotoxic potential, but no significant difference between filtrated and non-filtrated samples was observed. Based on all the data obtained, we concluded that filters used in this experiment cannot be used for wastewater treatment. 