UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikola R. Stanković

Uticaj fitoplanktona na bentosne makrobeskičmenjake slatkovodnih ekosistema u multistres uslovima: laboratorijsko testiranje toksičnog efekta cijanobakterija i zelenih mikroalgi na jedinke vrste *Chironomus riparius*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.

Niš, 2021.

UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikola R. Stanković

Uticaj fitoplanktona na bentosne makrobeskičmenjake slatkovodnih ekosistema u multistres uslovima: laboratorijsko testiranje toksičnog efekta cijanobakterija i zelenih mikroalgi na jedinke vrste *Chironomus riparius*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.

UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS

Nikola R. Stanković

Phytoplankton influence on benthic macroinvertebrates of freshwater ecosystems in multistress conditions: laboratory testing of the toxic effect of cyanobacteria and green microalgae on individuals of the species *Chironomus riparius*

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Др Ђурађ Милошевић, ванредни професор на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу
Наслов:	Утицај фитопланктона на бентосне макробескичмењаке слатководних екосистема у мултистрес условима: лабораторијско тестирање токсичног ефекта цијанобактерија и зелених микроалги на јединке врсте *Chironomus riparius*
Резиме:	Мултистресори имају јак негативан утицај на водене екосистеме. Еутрофизација воде је један од главних стресора у слатководним екосистемима, услед којег може доћи до цветања токсичних врста цијанобактерија и микроалги. Ово истраживање се бави испитивањем утицаја цијанобактерија и зелених микроалги на ларве хирономида у условима мултистреса.. Методом ХПЛЦ је утврђено да сој *Anabaena* sp. продукује цијанотоксин микроцистин-ЛР, и да концентрација продукованог токсина и стопа раста *Anabaena* sp. зависе од нутријената у подлози. Доказано је да чист микроцистин-ЛР у срединski релевантој концентрацији (10 µg/l) нема инхибиторно дејство на Грам-негативне и Грам-позитивне бактерије, али да стимулише раст микроалге *Chlorella* sp. Применом УВ-ВИС методе је утврђено да су сојеви *Anabaena* sp. и *Chlorella* sp. богати извори протеина и угљених хидрата, док је ГЦ-МС методом доказано да *Chlorella* sp. садржи велику количину масних киселина. Спроведени су мултипараметарски биоесеји, на основу ОЕЦД протокола, на тест организму, *Chironomidae* (*Diptera*), *Chironomus riparius*. Одређене су леталне концентрације срединских стресора (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) и токсина микроцистин-ЛР, као и летална концентрација сваког стресора у комбинацији са цијанотоксином. У оквиру биоесеја анализирани су следећи биомаркери: преживљавање, морталитет, маса, степен развића, параметри оксидативног стреса (оксидација протеина и липида, активност ензима каталазе и супероксид дисмутазе), концентрација хемоглобина, генотоксичност (Комета тест). Доказано је да микроцистин-ЛР у мултистрес условима (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) има адитивно токсично дејство на тест организам. Хроничним излагањем ларви сој *Anabaena* sp. у присуству мултистресора је доказано да сви тестирани стресори појачавају сублетално штетно деловање на ларве, што је утврђено смањеном масом, мањом концентрацијом хемоглобина

и већим оштећењем ДНК код ларви. Промена маса ларви, концентрација хемоглобина и оштећење ДНК соматских ћелија су показали високу сензитивност у испитивању токсичног утицаја фитопланктона и његових метаболита на модел организам *Chironomus riparius*. Наведени сет маркера представља добре параметре за унапређење постојећег ОЕЦД протокола број 218.

Научна област:	Биологија
Научна дисциплина:	Екотоксикологија
Кључне речи:	Фитопланктон, цијанобактерије, микроалге, *Anabaena, Chlorella, Chironomus,* биомаркери, микроцистин-ЛР, ОЕЦД протокол
УДК:	574.583+574.587:592/595+574.58 371.388+502.51:582.232+582.263.1:595.771
CERIF класификација:	B 003; Б 230; B 260

Тип лиценце Креативне заједнице:	**CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Djuradj Milošević, associate professor, Department of biology and Ecology, Faculty of Sciences and mathematics, University of Niš
Title:	Phytoplankton influence on benthic macroinvertebrates of freshwater ecosystems in multistress conditions: laboratory testing of the toxic effect of cyanobacteria and green microalgae on individuals of the species *Chironomus riparius*
Abstract:	Multristressors have strong influence on aquatic ecosystems. Eutrophication is one of the main stressors in freshwater ecosystems, which can lead to the blooming of toxic species of cyanobacteria and microalgae. This study examines the effects of cyanobacteria and green microalgae on chironomid larvae under multistress conditions. By using the HPLC method, it was determined that the strain *Anabaena* sp. produces microcystin-LR toxin; while the toxin production and the growth rate of *Anabaena* sp. is depending on the nutrients in the medium. Pure microcystin-LR, at an environmentally relevant concentration (10 µg/l), has no inhibitory effect on Gram-negative and Gram-positive bacteria, however, stimulates the growth of the microalgae *Chlorella* sp. By UV-VIS method it was determined that *Anabaena* sp. and *Chlorella* sp. are rich protein and carbohydrates sources, whereas the GC-MS method showed *Chlorella* sp. contains a large amount of fatty acids. Multiparameter bioassays, based on the OECD protocol, were performed on the test organism, *Chironomidae* (*Diptera*), *Chironomus riparius*. Lethal concentrations of environmental stressors (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) and microcystin-LR were determined, as well as the lethal concentration of each stressor in combination with cyanotoxin. The following biomarkers were analyzed within the bioassay: survival, mortality, mass, stage of development, oxidative stress parameters (oxidation of proteins and lipids, catalase and superoxide dismutase activity), hemoglobin concentration, and genotoxicity (Comet assay). Microcystin-LR has an additive toxic effect under multistress conditions (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}). Chronic exposure of larvae to *Anabaena* sp. in the presence of the multistressors, showed all tested stressors enhance sublethal effects on larvae, based on: reduced mass, lower hemoglobin concentration and higher DNA damage in larvae. Change in larval mass, hemoglobin concentration and DNA damage of somatic cells showed high sensitivity in the study of the toxic effect of phytoplankton and its metabolites on the model organism *Chironomus riparius*. This set of markers represents good parameters for improving the existing OECD protocol number 218.
Scientific Field:	Biology

Scientific Discipline:	Ecotoxicology
Key Words:	Phytoplankton, cyanobacteria, microalgae, Anabaena, Chlorella, Chironomus, biomarkers, microcystin-LR, OECD protocol
UDC:	574.583+574.587:592/595+574.58 371.388+502.51:582.232+582.263.1:595.771
CERIF Classification:	B 003; B 230; B 260
Creative Commons License Type:	**CC BY-NC-ND**

Прилог 4/1

	ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ **НИШ**
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, **РБР**:	
Идентификациони број, **ИБР**:	
Тип документације, **ТД**:	монографска
Тип записа, **ТЗ**:	текстуални / графички
Врста рада, **ВР**:	докторска дисертација
Аутор, **АУ**:	Никола Станковић
Ментор, **МН**:	Ђурађ Милошевић
Наслов рада, **НР**:	Утицај фитопланктона на бентосне макробескичмењаке слатководних екосистема у мултистрес условима: лабораторијско тестирање токсичног ефекта цијанобактерија и зелених микроалги на јединке врсте *Chironomus riparius*
Језик публикације, **ЈП**:	српски
Језик извода, **ЈИ**:	енглески
Земља публиковања, **ЗП**:	Србија
Уже географско подручје, **УГП**:	Србија
Година, **ГО**:	2021.
Издавач, **ИЗ**:	ауторски репринт
Место и адреса, **МА**:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, **ФО**: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/ прилога)	8 поглавља; 228 страна; 432 цитата; 27 табела; 24 слика; 6 прилога
Научна област, **НО**:	Биологија
Научна дисциплина, **НД**:	Екотоксикологија
Предметна одредница/Кључне речи, **ПО**:	Фитопланктон, цијанобактерије, микроалге, *Anabaena*, *Chlorella*, *Chironomus*, биомаркери, микроцистин-ЛР, ОЕЦД протокол
УДК	574.583+574.587:592/595+574.58 371.388+502.51:582.232+582.263.1:595.771
Чува се, **ЧУ**:	библиотека
Важна напомена, **ВН**:	/

Извод, **ИЗ**:	Мултистресори имају јак негативан утицај на водене екосистеме. Еутрофизација воде је један од главних стресора у слатководним екосистемима, услед којег може доћи до цветања токсичних врста цијанобактерија и микроалги. Ово истраживање се бави испитивањем утицаја цијанобактерија и зелених микроалги на ларве хирономида у условима мултистреса.. Методом ХПЛЦ је утврђено да сој *Anabaena* sp. продукује цијанотоксин микроцистин-ЛР, и да концентрација продукованог токсина и стопа раста *Anabaena* sp. зависе од нутријената у подлози. Доказано је да чист микроцистин-ЛР у сродински релевантој концентрацији (10 µg/l) нема инхибиторно дејство на Грам-негативне и Грам-позитивне бактерије, али да стимулише раст микроалге *Chlorella* sp. Применом УВ-ВИС методе је утврђено да су сојеви *Anabaena* sp. и *Chlorella* sp. богати извори протеина и угљених хидрата, док је ГЦ-МС методом доказано да *Chlorella* sp. садржи велику количину масних киселина. Спроведени су мултипараметарски биоесеји, на основу ОЕЦД протокола, на тест организму, *Chironomidae* (*Diptera*), *Chironomus riparius*. Одређене су леталне концентрације срединских стресора (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) и токсина микроцистин-ЛР, као и летална концентрација сваког стресора у комбинацији са цијанотоксином. У оквиру биоесеја анализирани су следећи биомаркери: преживљавање, морталитет, маса, степен развића, параметри оксидативног стреса (оксидација протеина и липида, активност ензима каталазе и супероксид дисмутазе), концентрација хемоглобина, генотоксичност (Комета тест). Доказано је да микроцистин-ЛР у мултистрес условима (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) има адитивно токсично дејство на тест организам. Хроничним излагањем ларви сојy *Anabaena* sp. у присуству мултистресора је доказано да сви тестирани стресори појачавају сублетално штетно деловање на ларве, што је утврђено смањеном масом, мањом концентрацијом хемоглобина и већим оштећењем ДНК код ларви. Промена маса ларви, концентрација хемоглобина и оштећење ДНК соматских ћелија су показали високу сензитивност у испитивању токсичног утицаја фитопланктона и његових метаболита на модел организам *Chironomus riparius.* Наведени сет маркера представља добре параметре за унапређење постојећег ОЕЦД протокола број 218.
Датум прихватања теме, **ДП**:	29.09.2020.

Датум одбране, **ДО**:

Чланови комисије, Председник:

Члан:

Члан:

Члан:

Члан, ментор:

Прилог 4/2

	ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ **НИШ**
	KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number, **ANO**:	
Identification number, **INO**:	
Document type, **DT**:	monograph
Type of record, **TR**:	textual / graphic
Contents code, **CC**:	doctoral dissertation
Author, **AU**:	Nikola Stanković
Mentor, **MN**:	Djuradj Milošević
Title, **TI**:	Phytoplankton influence on benthic macroinvertebrates of freshwater ecosystems in multistress conditions: laboratory testing of the toxic effect of cyanobacteria and green microalgae on individuals of the species *Chironomus riparius*
Language of text, **LT**:	Serbian
Language of abstract, **LA**:	English
Country of publication, **CP**:	Serbia
Locality of publication, **LP**:	Serbia
Publication year, **PY**:	2021
Publisher, **PB**:	author's reprint
Publication place, **PP**:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, **PD**: (chapters/pages/ref./tables/pictures/ graphs/appendixes)	8 chapters; 228 pages; 432 references; 27 tables; 24 figures; 6 appendixes
Scientific field, **SF**:	Biology
Scientific discipline, **SD**:	Ecotoxicology
Subject/Key words, **S/KW**:	Phytoplankton, cyanobacteria, microalgae, Anabaena, Chlorella, Chironomus, biomarkers, microcystin-LR, OECD protocol
UC	574.583+574.587:592/595+574.58 371.388+502.51:582.232+582.263.1:595.771
Holding data, **HD**:	1ibrary
Note, **N**:	/

Abstract, **AB**:		Multristressors have strong influence on aquatic ecosystems. Eutrophication is one of the main stressors in freshwater ecosystems, which can lead to the blooming of toxic species of cyanobacteria and microalgae. This study examines the effects of cyanobacteria and green microalgae on chironomid larvae under multistress conditions. By using the HPLC method, it was determined that the strain *Anabaena* sp. produces microcystin-LR toxin; while the toxin production and the growth rate of *Anabaena* sp. is depending on the nutrients in the medium. Pure microcystin-LR, at an environmentally relevant concentration (10 µg/l), has no inhibitory effect on Gram-negative and Gram-positive bacteria, however, stimulates the growth of the microalgae *Chlorella* sp. By UV-VIS method it was determined that *Anabaena* sp. and *Chlorella* sp. are rich protein and carbohydrates sources, whereas the GC-MS method showed *Chlorella* sp. contains a large amount of fatty acids. Multiparameter bioassays, based on the OECD protocol, were performed on the test organism, *Chironomidae* (*Diptera*), *Chironomus riparius*. Lethal concentrations of environmental stressors (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) and microcystin-LR were determined, as well as the lethal concentration of each stressor in combination with cyanotoxin. The following biomarkers were analyzed within the bioassay: survival, mortality, mass, stage of development, oxidative stress parameters (oxidation of proteins and lipids, catalase and superoxide dismutase activity), hemoglobin concentration, and genotoxicity (Comet assay). Microcystin-LR has an additive toxic effect under multistress conditions (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}). Chronic exposure of larvae to *Anabaena* sp. in the presence of the multistressors, showed all tested stressors enhance sublethal effects on larvae, based on: reduced mass, lower hemoglobin concentration and higher DNA damage in larvae. Change in larval mass, hemoglobin concentration and DNA damage of somatic cells showed high sensitivity in the study of the toxic effect of phytoplankton and its metabolites on the model organism *Chironomus riparius*. This set of markers represents good parameters for improving the existing OECD protocol number 218.
Accepted by the Scientific Board on, **ASB**:		29.09.2020.
Defended on, **DE**:		
Defended Board,	President:	
	Member:	
	Member,	

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj majci Radici koja je uvek verovala u mene i u ono što radim. Neizmerno hvala na podršci koju si mi uvek pružala da bih danas bio čovek kakav jesam.

Najveću zahvalnost dugujem svom prijatelju i mentoru, profesoru dr Đurađu Miloševiću na bezrezervnoj podršci, veri u uspeh i viziji u istraživanju koje je najviše od svega bilo interesantno. Hvala za korisne savete i preneseno znanje koje mi je otvorilo nove vidike i dalo ideje za dalji rad.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj prijateljici i saradnici, naučnom saradniku dr Ivani Kostić na bezrezervnoj podršci koju mi je pružala od samog početka zajedničkog rada. Kompleksne i nekada naizgled nerešive probleme je učinila jednostavnim, a hemiju kroz rad predstavila na najlepši način.

Veliku zahvalnost dugujem profesorki dr Tatjani Mihajilov-Krstev, od koje sam stekao prva praktična znanja iz mikrobiologije, algologije i mikologije i koja je načinila prve korake da ovo istraživanje bude sprovedeno u delo.

Zahvaljujem prof. dr Nataši Joković, koja mi je na najlepši način predstavila svet nauke i istraživanja u poljima mikrobiologije i biotehnologije, glavnom „krivcu“ da iz primenjene nauke krenem u istraživački rad.

Hvala prof. dr Zorici Stojanović i Ani Aleksić, prvim „saborcima“ u laboratorijskom radu, na stručnoj pomoći i vedrom duhu kojim rad u laboratoriji čine interesantnim.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Jelici Simeunović na stručnoj pomoći, nesebično prenesenom znanju i savetima od prvog dana istraživanja.

Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Bašić na stručnoj pomoći i brzom nalaženju praktičnih rešenja za mnoge probleme prilikom istraživanja.

Puno se zahvaljujem dr Dimitriji Savić-Zdravković na stručnoj i kreativnoj pomoći, kao i korisnim savetima svih ovih godina.

Veliko hvala dragim prijateljima i kolegama iz Poliklinike Human, sa kojima timski već više od deset godina nauku mikrobiologiju pretvaramo u zanat, a zanat pretačemo u nauku.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Slatkovodni ekosistemi 6
1.1.1. Zagađenje voda 7
1.1.2. Osnovke karakteristike vodenih ekosistema 8
1.1.3. Multistresori 9
1.2. Eutrofizacija i cvetanje vode 13
1.3. Opšte karakteristike fitoplanktona slatkovodnih ekosistema 17
1.3.1. Opšte karakteristike cijanobakterija 17
1.3.1.1. Osobine ćelija cijanobakterija 19
1.3.1.2. Ekofiziologija cijanobakterija 21
1.3.2. Eukariotski fitoplankton – mikroalge 22
1.4. Cijanotoksini 27
1.4.1. Hepatotoksini - Mikrocistini 27
1.4.2. Neurotoksini 29
1.4.3. Dermatotoksini 30
1.5. Zašto cijanobakterije produkuju toksine? 31
1.5.1. Faktori koji utiču na produkciju toksina 32
1.5.2. Taksoni - producenti toksina 35
1.5.3. Stabilnost mikrocistina 37
1.5.4. Abiotička transformacija toksina 38
1.5.5. Biotička transformacija toksina 39
1.5.6. Metode detekcije cijanotoksina 43
1.5.7. Rizici po zdravlje uzrokovani toksičnim cijanobakterijama 44
1.6. Akvatična toksikologija 47
1.6.1. Testovi za detekciju toksičnosti i procena ekološkog rizika 49
1.6.2. Testiranje toksičnosti po protokolima OECD 50
1.7. Praćenje parametara (biomarkera) u ekotoksikološkim testovima 52
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 55
3. MATERIJAL I METODE 59
3.1. Kultivacija fitoplanktona 61
3.2. Model-organizam (*Chironomus riparius*) za testiranje toksičnosti 64
3.2.1. Uzgoj laboratorijske populacije *C. riparius* 64
3.3. Detekcija toksina mikrocistina u soju *Anabaena sp.* 67
3.4. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR 68

3.4.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR.....68

3.4.2. Ispitivanje uticaja cijanotoksina mikrocistin-LR na rast zelene mikroalge *Chlorella sp.* 68

3.5. Uticaj stresora na rast fitoplanktona 70

3.6. Testiranje različitih režima ishrane na rast i razviće larvi *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 218.....72

3.7. Hemijski sastav sojeva fitoplanktona (*Anabaena* sp. i *Chlorella* sp.) i larvi hranjenih TetraMin hranom, suspenzijom ćelija i suvom masom *Chlorella* sp., pekarskim kvascem i biofilterom.....77

3.8. Ispitivanje uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve na osnovu OECD protokola broj 218.....82

3.9. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa i testiranje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora ..86

3.9.1. Ispitivanje akutne toksičnosti izabranih stresora na larve *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 235.....86

3.9.2. Ispitivanje interakcije toksičnog efekta cijanotoksina mikrocistin-LR i stresora na larve *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 235.....87

3.10. Ispitivanje hroničnog efekta toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *C. riparius* u multistres uslovima, na osnovu OECD protokola broj 218.....89

3.10.1. Analize hroničnog efekta soja *Anabaena* sp. na larve *C. riparius* u multistres uslovima na subletalnom nivou 90

3.11. Statističke analize podataka.....91

4. REZULTATI.....93

4.1. Detektovanje toksina u soju cijanobakterije *Anabaena* sp. 95

4.2. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR.....97

4.2.1. Antimikrobna aktivnost cijanotoksina mikrocistin-LR 97

4.2.2. Ispitivanje uticaja cijanotoksina mikrocistin-LR na rast zelene mikroalge *Chlorella* sp. 97

4.3. Uticaj stresora na rast fitoplanktona 99

4.3.1. Uticaj stresora na rast i produkciju toksina soja *Anabaena* sp.....99

4.3.2. Uticaj stresora na rast soja *Chlorella* sp. 100

4.4. Testiranje različitih režima ishrane na rast i razviće larvi *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 218.....102

4.5. Hemijski sastav sojeva fitoplanktona (*Anabaena* sp. i *Chlorella* sp.) i larvi hranjenih različitim tipovima hrane 104

4.6. Ispitivanje uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve na osnovu OECD protokola broj 218.....108

4.7. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa i definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora 112

4.7.1. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa 112

4.7.2. Definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora 116

4.8. Hronični efekat toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *Chironomus riparius* u multistres uslovima 118

5. DISKUSIJA 123

5.1. Detektovanje toksina u soju cijanobakterije *Anabaena* sp. 125

5.2. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR 127

5.2.1 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR 128

5.2.2 Ispitivanje uticaja cijanotoksina MC-LR na rast zelene mikroalge *Chlorella* sp. 130

5.3. Uticaj stresora na rast fitoplanktona 132

5.3.1. Uticaj stresora na rast i produkciju MC-LR soja *Anabaena* sp. 132

5.3.2. Uticaj stresora na rast soja *Chlorella* sp. 134

5.4. Testiranje različitih režima ishrane na rast i razviće larvi C. *riparius* na osnovu OECD protokola broj 218 136

5.5. Hemijski sastav sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. i larvi hranjenih različitim tipovima hrane 138

5.6. Ispitivanje uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve na osnovu OECD protokola broj 218 141

5.7. Definisanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa i definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora 146

5.7.1. Definisanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa 146

5.7.2. Definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora 150

5.8. Hronični efekat toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *Chironomus riparius* u multistres uslovima 153

6. ZAKLJUČAK 157

7. LITERATURA 161

8. PRILOZI 205

Spisak slika 207

Spisak tabela 209

Izvod 211

Summary 213

Biografija autora sa bibliografijom 215

Izjave autora 219

1. UVOD

Tehnološki napredak u industriji i upotreba hemijskih agenasa su donele ogromne koristi čovečanstvu. Međutim, zagađenje hemijskim proizvodima i nusproizvodima ljudske aktivnosti ima široko rasprostranjene i dalekosežne uticaje na planetu Zemlju i zdravlje živih organizama na njoj. Tragovi kontaminacije antropogenog porekla su pronađeni od stratosfere do dubokih okeana, od pola do pola, u mnogim oblicima divljeg života, ali i u svim modernim društvima, u lancu ishrane, i kod većine jedinki živih organizama (Schwarzenbach i sar., 2010).

Najveći uzročnik bolesti u životnoj sredini i prevremene smrti u današnjem svetu je zagađenje (Jorgenson, 2009). Zagađenje vazduha, zemlje i vode uzrokuje više od 9 miliona prevremenih smrtnih slučajeva (16% svih smrtnih slučajeva širom sveta). To je tri puta više smrtnih slučajeva nego od SIDE, tuberkuloze i malarije zajedno u kombinaciji, i čak 15 puta više nego kod svih ratova i smrtnih slučajeva izazvanih drugim oblicima nasilja. U najozbiljnije pogođenim zemljama smatra se da je jedna četvrtina bolesti uzrokovana zagađenjem (Landrigan i sar., 2018).

Zagađenje ugrožava planetarno zdravlje, uništava ekosisteme i usko je povezano sa globalnim klimatskim promenama (Schwarzenbach i sar., 2010). Raznolikost gena, vrsta i ekosistema opada globalno brže nego bilo kada u ljudskoj istoriji, što su zaključili eksperti iz 50 zemalja tokom poslednje tri godine, u Izveštaju o globalnoj proceni biodiverziteta i usluga ekosistema IPBES (IPBES, 2019). Promene u korišćenju zemljišta i mora, direktno iskorišćavanje organizama, klimatske promene, zagađenje i invazija stranih vrsta su direktni pokretači promena u prirodi koje se uvećavaju eksponencijalnom stopom tokom poslednjih 50 godina. Vodeni ekosistemi pokazali su se kao najpogođeniji uz alarmantno ubrzanje gubitka biodiverziteta (Reid i sar., 2020).

Organizmi, populacije, biocenoze i na kraju celi ekosistemi su prirodno pod dejstvom brojnih biotičkih i abiotičkih stresora kao što su klimatske fluktuacije, različita zračenja, odnosi predator-plen, paraziti, bolesti i kompeticija unutar vrste i između vrsta (Ormerod i sar., 2010). Stres ima veliki uticaj na svaki nivo biološke organizacije, zbog čega je sposobnost reagovanja na stres važna karakteristika svih živih organizama, jer razvoj vrsta i ekosistema u celini nije moguć bez prirodnih stresora. Stres je lokomotiva evolucije (Markert i sar., 2003).

Najnovija naučna dostignuća prepoznaju sve veći uticaj kombinacije različitih stresora na vodene ekosisteme na planeti. Proučavanje interakcije stresora i njihovog uticaja na biološki i hemijski status vodenih ekosistema jedan je od glavnih izazova u oblikovanju budućih

strategija za zaštitu životne sredine. Kako bi odgovorili na navedeni izazov, uticaje stresora treba sagledati jednako iz perspektive stresora i receptora (Jackson i sar., 2016).

Nestašica vode i multistresori, koji uključuju organska i neorganska zagađenja, geomorfološke alteracije, upotrebu zemljišta, korišćenje vodenih resursa, invazivne vrste i različite patogene, imaju jak negativan uticaj na vodene ekosisteme, naročito stajaćih voda (Brondizio i sar., 2019). Interakcija između stresora izaziva negativan kombinovani efekat na vodene organizme, čiji mehanizam delovanja još uvek nije u potpunosti razjašnjen (Jackson i sar., 2016). Posmatrano iz perspektive receptora, potrebno je razjasniti kako vodeni ekosistemi reaguju na multistresore (Petrović i sar., 2011).

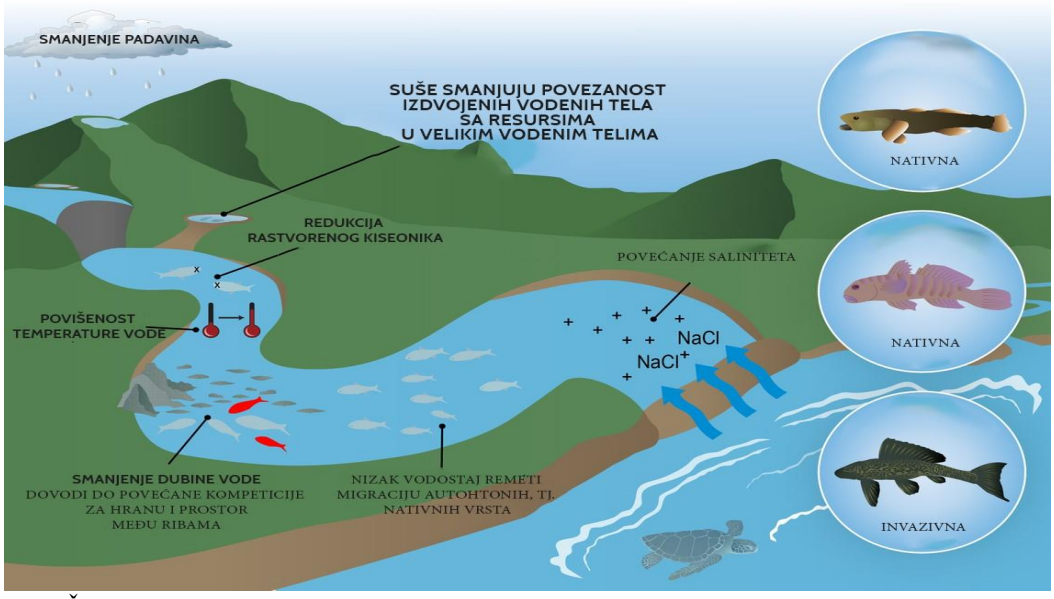
Fitoplankton čini zajednicu fotosintetskih mikroorganizama, primarnih producenata u vodenim ekosistemima, koji predstavljaju dobar izvor nutrijenata i kiseonika za žive organizme u njima (Gangstad, 1959). Čineći osnovu u lancu ishrane vodenih ekosistema, fitoplankton predstavlja izvor hrane za sve, od mikroskopskog zooplanktona do višetonskih kitova. Sitne ribe i beskičmenjaci konzumiraju fitoplankton, nakon čega te manje životinje postaju hrana većim. Fitoplankton takođe može biti uzrok smrti ili bolesti. Sačinjen je prevashodno od prokariotskih mikroorganizama, cijanobakterija i eukariotskih mikroalgi. Rast fitoplanktona zavisi od dostupnosti ugljen-dioksida, sunčeve svetlosti i hranljivih sastojaka. Posle masovnog cvetanja, mrtvi fitoplanktoni tonu do dna okeana ili jezera. Bakterije koje razlažu fitoplanktonske organizme iscrpljuju kiseonik u vodi, što dovodi do ugrožavanja života u njoj (Hulot i Huisman, 2004).

Larve hironomida su stalni članovi bentosnih zajednica slatkih voda, imajući u vidu da su najdominantnija i najraznovrsnija grupa makrobeskičmenjaka (Milošević i sar., 2013). Ova grupa beskičmenjaka, koja pokazuje različite načine života i hranjenja, odgovorna je za recikliranje organske materije i igra veliku ulogu u lancu ishrane. Uopšteno govoreći, vrste hironomida (naročito subfamilije *Chironominae*) preferiraju eutrofne vode, gde formiraju guste populacije (Takahashi i sar., 2008). Produkcija velike biomase fitoplanktona je pojava koja se često javlja u eutrofnim vodenim ekosistemima i može biti izvor toksičnih sekundarnih metabolita, ali i glavni izvor hrane za bentosne organizme. Na primer, cijanobakterije su primarna komponenta u ishrani larvi *Chironomus crassicaudatus* (Ali, 1990), ali sa druge strane, neke mikroalge mogu predstavljati primarnu hranu drugim vrstama hironomida (Provost i Branch, 1959; Frouz i sar., 2004b; Henriques Oliveira i sar., 2003). U isto vreme, neke hironomide su veoma osetljive na sredinske stresore zbog čega predstavljaju pogodne organizme za biomonitoring i testove toksičnosti (Michailova i sar., 2012). Na ovaj način, larve

hironomida su stresirane cijanotoksinima (Mills i Wyatt, 1974; Laurén-Määttä i sar., 1995; Chen i sar., 2005; Martins i sar., 2007; Michailova i sar., 2012; Zanchett i Oliveira-Filho, 2013) i u nekim slučajevima je dokazana i mogućnost akumulacije i daljeg trofičkog transfera na druge žive organizme (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011; Laurén-Määttä i sar., 1995).

1.1. Slatkovodni ekosistemi

Prirodni slatkovodni ekosistemi predstavljaju kopnene faze globalnog hidrološkog ciklusa i uključuju reke, potoke, jezera, bare, močvare, kao i podzemne vode (Cavin, 2017). Iako slatke vode sadrže samo 0,01% vode na Zemlji i čine manje od jedne desetine globalne površine kopna, one podržavaju više od 10% svih zabeleženih vrsta, uključujući oko 30% svih kičmenjaka (Reid i sar., 2018). Slatkovodni ekosistemi imaju različite uloge u biosferi koje se kreću od prirodnog upravljanja poplavama, preko vodosnabdevanja, očuvanja zdravlja, do značajnog izvora hrane (Bailey i sar., 2004).



Slika 1 Šematski prikaz nekih od stresora koji mogu delovati na slatkovodne ekosisteme. (preuzeto sa https://www.usgs.gov/ecosystems/climate-adaptation-science-centers/drought-impacts-freshwater-ecosystems-us-caribbean)

Sastav i kvalitet vode su promenljivi i zavise od čitavog niza faktora; značajno je njihovo poreklo, geomorfologija tla, hemijski sastav, biološke karakteristike i dr. Na procese u vodi utiče temperatura vode, pH, sadržaj kiseonika, količina svetlosti u vodi i drugi ekološki faktori koji znatno variraju u toku dana i noći u toku godine. Voda se u prirodi ne pojavljuje u hemijski čistom obliku, jer na svom putu dolazi u dodir, rastvara i prima različite materije (slika 1). Od količine i vrste ovih sastojaka zavise karakteristike vode (Jablanović i sar., 2003).

Slatkovodni ekosistemi se odlikuju visokim biodiverzitetom, zbog čega globalni trend narušavanja i gubitka slatkovodnih staništa predstavlja značajnu pretnju biljkama, životinjama i ljudima (Dayton, 2018). Trend narušavanja biodiverziteta i funkcija koje slatkovodni ekosistemi imaju su uslovljeni mnoštvom antropogenih stresora. Neki od ovih stresora nastaju interno (promena staništa, fragmentacija, prekomerna eksploatacija), dok su drugi generisani

spolja (invazivne strane vrste, klimatske promene, zagađenje atmosfere). Srećom, postoje mnoge opcije za očuvanje slatkovodnih ekosistema na kojima se mora kontinuirano raditi (Reid i sar., 2020).

1.1.1. Zagađenje voda

Mnogi od glavnih problema sa kojima se čovečanstvo suočava u 21. veku su povezani sa problemima količine i kvaliteta vode (Hassing i sar., 2009). Ovi problemi će se u budućnosti pogoršavati zbog klimatskih promena, što će rezultirati višim temperaturama vode, topljenjem glečera i pojačavanjem vodenog ciklusa (Huntington, 2006), sa potencijalno više poplava i suša (Oki i Kanae, 2006). U pogledu zdravlja ljudi, najdirektniji i najteži uticaj je nedovoljan rad na poboljšanju sanitacije, a s tim u vezi je i nedostatak zdravstveno bezbedne vode za piće, što trenutno utiče na više od trećine svetske populacije. Dodatne pretnje uključuju, na primer, izloženost patogenima ili hemijskim toksikantima preko lanca ishrane (npr. rezultat navodnjavanja biljaka kontaminiranom vodom i bioakumulacijom toksičnih supstanci od strane vodenih organizama, uključujući morske plodove i ribu) ili tokom rekreacije (npr. plivanje u zagađenoj površinskoj vodi) (Schwarzenbach, 2010).

Zagađenje prirodno čiste vode predstavlja svaku kvalitativnu i kvantitativnu promenu prirodnog hemijskog, fizičkog i biološkog svojstva, koje može negativno uticati na ljudsko zdravlje, ekonomiju i ekosisteme uopšte, naročito akvatične (Jablanović i sar., 2003). Na osnovu prirode zagađivača, efekte i posledice koje zagađivanje može imati na životnu sredinu, različiti oblici zagađenja se mogu svrstati u tri kategorije: biološko, fizičko i hemijsko (Jablanović i sar., 2003).

Biološko zagađenje voda podrazumeva prisustvo raznih patogenih bakterija, virusa, gljiva, protista i drugih organizama koji su direktni uzročnici oboljenja ili su prenosioci patogena.

Fizičko zagađenje podrazumeva promene osnovnih fizičkih karakteristika voda, kao što su temperatura, providnost (pojava zamućenja), radioaktivnost i drugo.

Hemijsko zagađenje je bazirano na širokom spektru hemijskih agenasa koji mogu narušiti osnovne prirodne karakteristike vode kao što je pH, osmotska vrednost, mineralni sastav, miris, ukus itd. Na osnovu hemijske prirode zagađivača, hemijsko zagađenje se deli na neorgansko (soli, kiseline i baze) i organsko.

Hemijski zagađivači vode se mogu podeliti u dve kategorije, makro i mikrozagađivače (Schwarzenbach i sar., 2010). Makrozagađivači su relativno mali broj, uglavnom neorganskih zagađivača, čije se koncentracije mere u miligramima po litru. U makrozagađivače spadaju uglavnom neorganski nutrijenti, kao što su soli azota i fosfora, ili neki koji su organskog porekla (Schwarzenbach i sar., 2010; Jorgenson, 2009).

Mikrozagađivači se mogu definisati kao hemijski agensi koji se u vodenoj sredini, usled ljudskih aktivnosti, pojavljuju u znatno većoj količini od prirodne, ali se njihove koncentracije mere u nanogramima ili mikrogramima po litru. U ovu grupu se svrstavaju hiljade sintetičkih i prirodnih zagađivača koji se u vodi nalaze u tragovima, ali u tako malim koncentracijama mogu imati toksične efekte po mnoge organizme, naročito kada su prisutni u vidu mešavina (Schwarzenbach i sar., 2006). Između ostalih, u mikrozagađivače spadaju pesticidi i cijanobakterijski toksini (León i sar., 2019).

1.1.2. Osnovke karakteristike vodenih ekosistema

Vodeni ekosistemi se prema fizičko-hemijskim i biološkim osobinama koje se odnose na prisustvo nutrijenata, mineralnih soli (fosfati i nitrati) i organskih materija, kao i produktivnost, mogu svrstati u četiri grupe (Stamenković i Đekić, 2019):

- oligotrofni (niskoproduktivni) – sadrže malu količinu hranljivih materija i imaju malu potrošnju kiseonika (BPK – biološka potrošnja kiseonika), zbog čega je voda u slojevima blizu dna njime zasićena. Količina fito i zooplanktona je mala, zbog čega je voda bistra. Dubina ovakvih ekosistema je obično velika, ali sa postojanjem izuzetaka.
- eutrofni (visokoproduktivni) – sadrže veliku količinu hranljivih materija, zbog čega je prisutna velika količina fito i zooplanktona (fitoplankton i više biljke, bogata ihtiofauna). U ovakvim ekosistemima se intenzivno odvijaju biohemijski procesi i razlaganje organske materije, zbog čega se troši velika količina kiseonika (BPK je velika). Uglavnom su u pitanju plitke vode.
- mezotrofni – ovaj tip predstavlja prelaz između oligotrofnih i eutrofnih,
- distrofni – tip močvarnog vodenog ekosistema koji je karakteristika severnih predela. Odlikuje se velikom organskom produkcijom i slabom razgradnjom iste, zbog čega je voda zamućena, pH vrednost niska (4-5) i nedostatak kiseonika jako izražen.

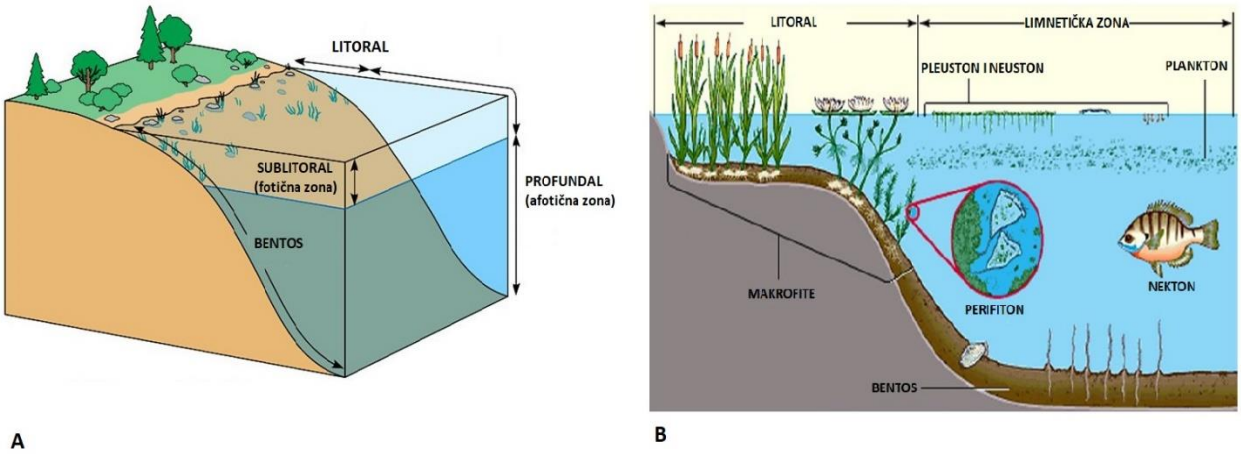
Navedena podela definiše krajnje stadijume vodenih ekosistema, dok se u prirodi dominantno javljaju njihovi prelazni oblici.

Zone dna vodenih basena se mogu podeliti u tri osnovne grupe (Stamenković i Đekić, 2019):

- Litoral – plićak u zoni obale,
- Sublitoral – predstavlja zonu basena, odnosno dubinu do koje svetlost može da prodre,
- Profundal – mračna ili afotična zona.

Pelagijska zona predstavlja zonu slobodne vode koja može biti iznad litorala, iznad sublitorala i iznad profundala (slika 2). Organizmi koji žive na dnu (bentos) vodenih basena se nazivaju bentosna; organizmi koji žive u pelagijalu se označavaju kao (Stamenković i Đekić, 2019):

- plankton (kretanje je pasivno i uslovljeno vodenim strujama),
- nekton (kretanje je aktivno),
- pleuston i neuston (organizmi koji slobodno plivaju).



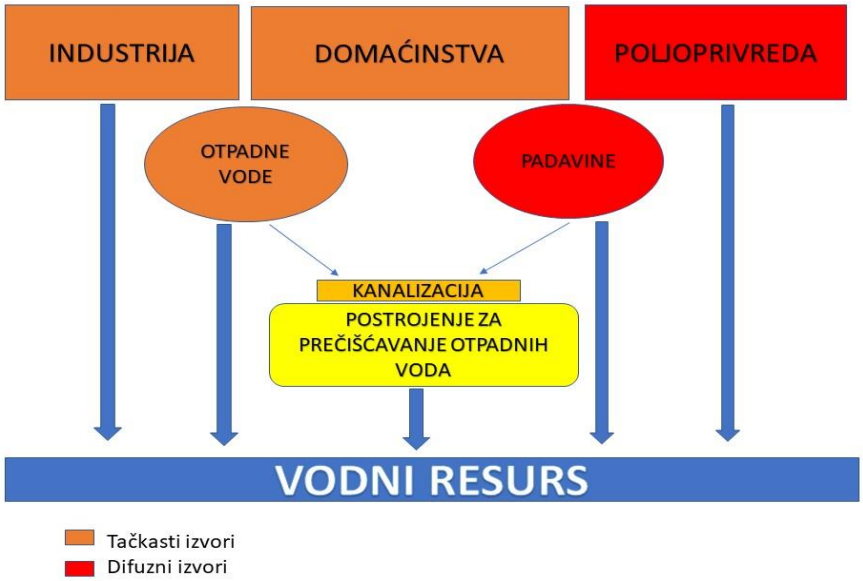
Slika 2. Zone vodenih basena na primeru jezera (A) i bioekocenoze u njima (B).

1.1.3. Multistresori

Organizmi, populacije, biocenoze i na kraju celi ekosistemi su prirodno pod dejstvom brojnih biotičkih i abiotičkih stresora kao što su klimatske fluktuacije, različita zračenja i snabdevanje hranom, odnosi predator-plen, paraziti, bolesti, i kompeticija unutar vrste i između vrsta. Stres može biti krucijalan za svaki nivo biološke organizacije, zbog čega je sposobnost reagovanja na stres važna karakteristika svih živih organizama, jer razvoj vrsta i ekosistema u celini nije moguć bez prirodnih stresora (Schüürmann, 1998).

Kao što je već navedeno, stres predstavlja lokomotivu evolucije (Markert i sar., 2003). Unutar evolutivnih epoha opseg varijacija stresora je uglavnom prilično konstantan i

omogućava vrstama da se prilagode promenljivim uslovima životne sredine. U poslednjim vekovima su ove promene dobile novu dimenziju, kako u kvantitativnom, tako i u kvalitativnom obliku (Reid i sar., 2020). Kroz ljudske aktivnosti, životna sredina se suočila sa potpuno novim supstancama koje ranije nisu postojale (ksenobiotici, mnogi radionuklidi) i potencijalno štetnim supstancama oslobođenim u količinama koje su u prošlosti bile nezamislive (teški metali, prirodni radionuklidi). Štaviše, novi stresori mogu imati multiplicirajući efekat, odnosno njihov efekat se može dodati efektima prirodnih sistema, što dovodi do prevazilaženja nivoa tolerancije organizama na koje stresori deluju (Oehlmann i Markert, 1999).



Slika 3. Difuzni i tačkasti izvori emisije zagađujućih materija u vode.

Pod stresorom se podrazumeva bilo koji sredinski faktor koji smanjuje rast populacije smanjenjem stope preživljavanja ili reprodukcije u odnosu na optimalne uslove (Folt i sar., 1999). Broj hemijskih, bioloških i fizičkih stresora koji se smatraju potencijalno opasnim po životnu sredinu se sa godinama ubrzano povećava. Efekti stresora se obično testiraju individualno (Vouk i sar., 1987), ali u prirodi organizmi su često izloženi simultanom dejstvu nekoliko stresora (Schindler i sar., 1996; Yan i sar., 1996). Ove činjenice dovode do fundamentalnog pitanja: da li su stresori štetniji u kombinaciji ili pojedinačno? Da bi došli do odgovora potrebno je izvesti eksperimentalno ispitivanje potencijalnih stresora kako bi se, na osnovu empirijskih podataka, ocenile predikcije njihove interakcije.

Osnovni mehanizmi interakcije stresora su: aditivnost, sinergizam, potencijacija i antagonizam (Teodorović i Kaišarević, 2015). Aditivnost je najčešći oblik interakcije

jedinjenja, pri čemu toksičnost smeše predstavlja sumu toksičnih dejstava pojedinačnih jedinjenja koja su prisutna u smeši. Sinergizam predstavlja pojačano dejstvo udruženih stresora, dok je potencijacija interakcija slična sinergizmu, koja se javlja kod jedinjenja koja se ne odlikuju sopstvenim specifičnim toksičnim dejstvom, ali u prisustvu drugog toksičnog jedinjenja pojačavaju dejstvo toksičnog jedinjenja koje je prisutno u smeši. Antagonizam predstavlja smanjeni efekat stresora usled simultanog dejstva pojedinačnih jedinjenja (Folt i sar., 1999; Teodorović i Kaišarević, 2015).

Multistresori su u sve većoj meri prepoznati kao glavni problem za vodene ekosisteme i za organizacije koje se bave monitoringom i upravljanjem tih ekosistema (Ormerod, 2010). Stresori često međusobno interaguju i utiču na slatkovodne vrste i zajednice u vodenim ekosistemima, ali je pitanje u kolikom stepenu se eksperimentalno dokazani efekti u laboratoriji mogu ispitati u realnim uslovima na terenu (Côté, 2016). Dominacija jednog stresora, pre svega povećana koncentracija nutrijenata, je česta u jezerima, dok je za reke relevantnija interakcija stresora. Ranije su najveći problem slatkovodnim ekosistemima predstavljali pojedinačni stresori, kao što su zagađenja organskim i neorganskim nutrijentima poreklom iz tačkastih izvora, odnosno mesta izvora zagađivača koje je može tačno da se locira (van Dijk, 1994). Takvi stresori se u današnje vreme lakše kontrolišu, dok veći izazov predstavljaju difuzni izvori zagađenja, odnosno veći broj zagađivača na određenoj površini koje je teže locirati (Posthuma i sar., 2020) (Slika 3).

Direktnim ispuštanjem otpadnih voda bez njihove prethodne obrade, iz industrije i domaćinstava, ali i spiranjem zagađujućih čestica iz vazduha (kisele kiše) i spiranjem zemljišta, dolazi do zagađenja površinskih voda. Hemijske supstance predstavljaju najveće zagađivače prirodnih ekosistema (Markert i sar., 2003). Vodene ekosisteme obično zagađuju razgradiva organska jedinjenja, perzistentna organska jedinjenja, i neorganska jedinjenja (tabela 1).

Živi organizmi se mogu smatrati fundamentalnim senzorima koji reaguju na svaki stres koji utiče na sredinu u kojoj žive (Charles i sar., 1994). Svaki stres, fizički, hemijski ili biološki, prisutan u vodenom sistemu utiče na zdravlje živih organizama, populacija i zajednica koje žive u tom ekosistemu. Zdravlje akvatičnog ekosistema je ugroženo kada je premašena njegova sposobnost da apsorbuje stres. Ovakav koncept predlaže da zdravlje akvatičnog ekosistema može biti procenjeno biološkim monitoringom koristeći organizme kao dijagnostičke alate (Wells, 2009).

Tabela 1. Primeri hemijskih zagađivača površinskih voda.

Zagađivači	***Primeri***	***Mesto porekla***
Razgradiva organska jedinjenja	Fekalije, rastvarači, pesticidi, materijali industrijskih procesa, masti, ulja, rastvorivi životinjski i biljni ostaci, osnovne hemikalije, međuprodukti i krajnji produkti	Gradovi i sela, domaćinstva, poljoprivredno zemljište, tekstilna industrija, metalna industrija, industrije farbi, prehrambena industrija, tekstilna industrija, papirna industrija
Perzistentna organska jedinjenja	Rastvarači, pesticidi, materijali, industrijskih procesa, osnovne hemikalije, međuprodukti i krajnji produkti	Tekstilna industrija, metalna industrija, industrije farbi, prehrambena industrija, tekstilna industrija, papirna industrija
Neorganska jedinjenja	Teški metali, soli, cijanidi, đubriva	Metalna industrija, rudnici, gradovi i sela, poljoprivredno zemljište

1.2. Eutrofizacija i cvetanje vode

Jedan od glavnih stresora u slatkovodnim ekosistemima je eutrofikacija, fenomen koji predstavlja povećanje koncentracije nutrijenata do kojeg dolazi prirodnim putem (Waycott i sar., 2009; Romero i sar., 2006; Short i Wyllie-Echeverria, 1996; Stamenković i Đekić, 2019). Ukoliko je povećanje koncentracije nutrijenata izazvano antropogenim uticajem (upotrebom poljoprivrednih đubriva, ispuštanjem gradskih komunalnih voda i kanalizacije u vodene tokove), ovaj proces se označava kao eutrofizacija (Stamenković i Đekić, 2019). Ovaj problem je primećen širom sveta u mnogim rekama, jezerima i rezervoarima, naročito tokom leta, kada se zelena masa formira po površini vode. Tu masu najčešće formira fitoplankton, gde često dominiraju cijanobakterije koje su producenti toksičnih supstanci (Falconer i Humpage, 2005).

Proces eutrofizacije u najvećoj meri zavisi od dva nutrijenta, azota (N) i fosfora (P). U slatkim vodama je P najmanje zastupljen od makronutrijenata neophodnih za rast fotosintetskih organizama, što ga čini primarnim nutrijentom koji ograničava njihov rast (Schindler, 1977). U umerenim i polarnim obalnim morskim vodama, N je najvažniji nutrijent koji ograničava primarnu proizvodnju fotosintetskih organizama (Dugdale i Goering, 1967). Azot se najčešće u vodi može naći u obliku nitrata ili amonijuma (Yin i sar., 1997). Nutrijenti kao što su silicijum (Si) i gvožđe (Fe) takođe mogu značajno uticati na ishod dominacije vrsta i na strukturu i na zajednicu fitoplanktona u procesu eutrofizacije (Hecky i Kilham, 1988; Wilhelm, 1995).

Voda obogaćena nutrijentima, solima azota i fosfora, je pogodan medijum za obilan rast biomase fitoplanktona, odnosno pojavu koja se definiše kao cvetanje (Paerl, 2018). Iz perspektive ekosistema, velika količina nutrijenata udružena sa zadržavanjem vode dovoljno dugo da obezbedi adekvatan rast i visoku stopu reprodukcije, u kombinaciji sa relativno malim prisustvom konzumenata fitoplanktona (predatora), predstavljaju idealne uslove za razvoj fitoplanktona (Paerl i sar., 2001). Efekti količine nutrijenata i temperature na rast i cvetanje fitoplanktona se razlikuju među vrstama. Kod nekih vrsta povećanje količine odgovarajućih nutrijenata ima veći efekat po rast, dok druge cvetaju u uslovima povišene temperature (Rigosi i sar., 2014).

Cvetanja su glavni agens smanjenja kvaliteta voda, uključujući neprijatne mirise i ukus, deoksigenaciju dna vodenih basena (hipoksija i anoksija), toksičnost, pomor riba, i promena u lancu ishrane. Brojni slatkovodni rodovi (taksoni) fitoplanktona su u stanju da formiraju cvetanja; međutim, cijanobakterije se smatraju najopasnijom varijantom tvoraca cvetanja

(Paerl i sar., 2001). Cvetanje vode, cvetanje fitoplanktona, i cvetanje algi su izrazi koji označavaju isti proces, tokom kojeg vrste u zajednici imaju ekvivalentnu ekološku i fiziološku valencu (Smayda, 1997). Ovakva pojava je suštinski korisna za procese u lancu ishrane. Cvetanja vode se manifestuju kao zelenkaste skrame (ili crvenkasto-braon u zavisnosti od pigmenta koji produkuju sojevi koji cvetaju) koje plutaju po površini vode (Huisman i sar., 2018). Međutim, neke cijanobakterije formiraju masu u dubljim slojevima i ne produkuju vidljiva cvetanja (npr. *Cylindrospermopsis* i *Planktothrix*) (Huisman i sar., 2018).

U okeanima, morima i jezerima na umerenim geografskim širinama, početak proleća donosi brzi porast aktivnosti fitoplanktona. Povećavanje sunčeve svetlosti i porast temperatura promovišu fotosintezu u osvetljenim površinskim vodama (eufotična zona) koje su, nakon vertikalnog mešanja vetra i talasa tokom oluja prethodne zime, takođe bogate osnovnim hranjivim sastojcima poput nitrata, fosfata i silikata. Hlorofil u rastućem fitoplanktonu smanjuje vidljivost u vodi i merljiv je iz svemira. Brzo ozelenjavanje površinskih voda u proleće naziva se „prolećni cvet“ (Brierley, 2017).

Globalno povećanje temperature udruženo sa nestašicom vode i eutrofizacijom dovodi do cvetanja voda (Huisman i sar., 2018). Geomorfološke karakteristike vodenog ekosistema, kao i kapacitet i vreme retencije takođe mogu uticati na cvetanje fitoplanktona (Paerl, 2017). Rezultujuća cvetanja mogu imati različite negativne uticaje na vodene organizme, naročito indukovanom produkcijom toksičnih sekundarnih metabolita u stresnom okruženju (Falconer i Humpage, 2005; Huisman i sar., 2018).

Štetna cvetanja algi (engl. Harmful Algal Blooms – HAB) su značajna uvećanja populacije algi (i cijanobakterija – modrozelenih algi), bilo da su ona u moru ili slatkoj vodi, do kojih dolazi usled njihovog nekontrolisanog rasta i tom prilikom stvaraju toksične ili štetne efekte na ljude, ribe, i druge organizme (Paerl i sar., 2001; Smayda, 1997; Huisman i sar., 2018). Određene vrste fitoplanktona proizvode moćne biotoksine, čineći ih odgovornim za štetno cvetanje algi. Toksično cvetanje ispoljava negativna uticaj kako na vodene organizme tako i na sve kopnene koji na bilo koji način dolaze u kontakt sa takvom vodom (Simeunović, 2010.)

U odnosu na ekološke efekte, rezultati sa terena i eksperimentalnih ispitivnja otkrivaju različite načine i mehanizme kojima štetne vrste izazivaju mortalitet ili fiziološki oslabljuju određene organizme. Svi ti načini i mehanizmi štetnog delovanja se mogu svrstati u dva opšta

tipa: hemijski tip koji se pripisuju fizičko-hemijskim reakcijama na toksine ili druge metabolite, i tip efekata koji vodi do izgladnjivanja ili izaziva štetna mehanička i fizička oštećenja.

Koliko treba biti obilna količina štetne vrste kako bi formirala štetno cvetanje? Da li je štetan efekat zavistan od gustine populacije, odnosno ćelija fitoplanktona koje čine cvetanje? Za definisanje cvetanja i kategorizacije u štetno ili benigno postoje različiti kriterijumi. Za netoksične vrste, biomasa je najčešće korišćeni kriterijum za utvrđivanje statusa cvetanja. Za toksične vrste, samo prisustvo ili nivoi toksina koji su merljivi predstavljaju kriterijume za definisanje cvetanja. Ovakvi kriterijumi, koji su subjektivni i proizvoljni, za definiciju i razlikovanje štetnog cvetanja od ostalih, ne uključuju činjenicu da su cvetanja „trofodinamični" procesi. Cvetanja, kao fenomen, zajedno imaju osobine koje nisu vezane za biomasu, numeričku gustinu populacije i potencijal cvetajućih vrsta da izazovu štetan efekat. Ove osobine su takođe relevantne za njihovu definiciju, pojavu i *in situ* trofodinamičke konsekvence. Procesi koji utiču na pojavu vrsta, bilo da su štetne ili ne, mogu se značajno razlikovati od onih koje regulišu svoje cvetanje. Maksimalni potencijal cvetanja se razlikuje u zavisnosti od vrste, sa varijacijama u odnosu na sredinu u kojoj cveta (Agusti i sar., 1987). Vrsta ne mora da dostigne visoku biomasu ili veliku gustinu populacije da bi bila u stanju cvetanja, niti da bude u stanju da dostigne obilan rast. Cvetanje može biti sačinjeno od populacije koja broji 10^4 ćelija po litru ili čak i manje. Cvetanje može biti i u obliku izolovane zajednice ili u kombinaciji sa drugim vrstama. Jedan od parametara koji se uzima u obzir prilikom karakterizacije cvetanja vode jeste i koncentracija hlorofila u vodi. Činioci cvetanja vode imaju regionalni, sezonski i neke specifične aspekte, pa prema tome cvetanje nije samo pitanje biomase. Specifični nivo biomase (hlorofil) kao kriterijum za definisanje cvetanja, bilo da je u pitanju specifična vrsta ili uopšteno fitoplankton, nije dovoljan (Smayda, 1997).

Vidljiv kriterijum za definisanje „štetne" vrste u cvetanju i specifičnost takvog cvetanja nije u broju ćelija, već da li takva pojava izaziva štetne posledice. Kao primer gde mali broj ćelija može izazvati štetne posledice se može navesti toksična vrsta *Alexandrium tamarense*, gde je dokazano da je ingestija 6-11 ćelija bila letalna po larve vrste *Pagrus major* (White i sar., 1989). Takođe, samo jedna ćelija još toksičnijeg soja je bila letalna po larve *Mallotus villolus* i *Clupea harengus harengus* (Gosselin i sar., 1989). Dakle, osim broja ćelija koje čine cvetanje voda bitna je i količina toksičnih metabolita koje produkuju.

Pojava štetnih cvetanja se povećala na globalnom nivou tokom poslednjih decenija, i najverovatnije će se dalje proširiti u decenijama koje dolaze usled kontinuirane eutrofikacije, povećanja koncentracije CO_2 u atmosferi i globalnog zagrevanja (Huisman i sar., 2018).

Problemi izazvani štetnim cvetanjima i njihovom predviđenom daljom ekspanzijom zahtevaju opsežni napor za daljim praćenjem formiranja cvetanja, ispitivanje mehanizama koji određuju sastav vrsta i produkciju toksina u cvetanjima fitoplanktona. Prevencija cvetanja zahteva efikasniju kontrolu ispuštanja nutrijenata u akvatične ekosisteme, na lokalnom nivou. Na globalnom nivou, kontrolisanje emisije CO_2, i drugih gasova koji izazivaju efekat staklene bašte, je najlogičniji korak u izbegavanju formiranja klime koja pospešuje cvetanja.

1.3. Opšte karakteristike fitoplanktona slatkovodnih ekosistema

Fitoplankton je zajednica fotosintetskih mikroorganizama, prokariota i eukariota, adaptiranih da kolonizuju različita vodena staništa, od izvora slatke vode i potoka, jezera, laguna, priobalnih morskih područja i otvorenog okeana (Basset i sar., 2018, Shiozaki i sar., 2019). Ovi oksigeni fototrofi energiju dobijaju od svetla, dok voda služi kao donor elektrona kako bi redukovali CO_2 u organsku materiju, zbog čega se označavaju kao primarni producenti (Madigan i sar., 2008). Vrste fitoplanktona su kolektivno najrasprostranjeniji i kvantitativno najznačajniji primarni producenti u vodenim ekosistemima. Kao takav, fitoplankton je fotoautotrofni deo planktona i glavni primarni producent organskog ugljenika u pelagijalu mora i kopnenih voda. Fitoplankton je trenutno odgovoran za ~50% globalne primarne produkcije (Falkowski i Raven, 2014).

Postoji približno 25000 poznatih vrsta fitoplanktona, uključujući bakterijske i eukariotske vrste (Marañón, 2009; Reynolds, 2006). Raznolikost fitoplanktona može biti izuzetno velika, sa desetinama ili više vrsta po kubnom metru vode. U homogenim sredinama, pojava kompeticije obično rezultira dominacijom nekoliko vrsta koje nadmašuju druge (Brierley, 2017).

Fitoplankton je veoma osetljiv na sredinske promene, koje utiču na rast i strukturu zajednice, zbog čega je poznavanje obrasca variranja strukture i dinamike fitoplanktona od suštinskog značaja za predviđanje budućih promena u životnoj sredini (Giovannoni i Vergin, 2012; Winder i Sommer, 2012). Na ekološku dinamiku fitoplanktona utiču različiti faktori: fizički (npr. temperatura, salinitet i zračenje), hemijski (npr. hranljive materije i metali) i biološki (npr. predatorstvo, virusne infekcije i algicidni efekti bakterija) (Nagasaki i Brussaard, 2008), usled čega je gustina biomase svake pojedine lokalne populacije izuzetno promenljiva i vremenski nepredvidljiva (Basset i sar., 2018). Osnovne potrebe za rast fitoplanktona – voda, svetlost, i određene neorganske materije - su praktično iste kao i za druge fotosintetske organizme (biljke).

Prokariotski oblici fitoplanktona su označeni kao cijanobakterije, dok se eukariotski deo fitoplanktona svrstava u grupu mikroalgi (Shiozaki i sar., 2019).

1.3.1. Opšte karakteristike cijanobakterija

Cijanobakterije obuhvataju veliku, morfološki i ekološki heterogenu grupu fototrofnih bakterija (Madigan i sar., 2008). Ovi autotrofni mikroorganizmi se odlikuju dugom

evolucionom istorijom, širokim spektrom metaboličkih puteva i adaptivnih mehanizama (Beck i sar., 2012). Cijanobakterije su fotosintetski prokarioti koji pomoću hlorofila a i pomoćnih pigmenata (fikobiliproteina), koriste sunčevu svetlost kao izvor energije (Lewin, 1981). Nemaju polnu reprodukciju (Echlin, 1966). Pored toga, određene cijanobakterije imaju i sposobnost fiksacije azota iz atmosfere i uvođenja u svoj metabolizam (Stal, 2015). Imaju glavnu ulogu u globalnom snabdevanju kiseonikom, fiksaciji ugljen-dioksida (CO2), fiksaciji azota, kao i primarnoj fototrofnoj proizvodnji biomase (Beck i sar., 2012).

Tačno vreme pojave prvih cijanobakterija na Zemlji još uvek nije utvrđeno zbog kontraverzi vezanih za interpretaciju prekambrijskih fosila; današnji diverzitet je postignut pre više od 2 miliona godina i one su verovatno imale glavnu ulogu u akumulaciji kiseonika u ranoj atmosferi Zemlje. Pretpostavlja se da su hloroplasti biljaka i algi izvedene iz endosimbioze u kojoj je cijanobakterija usvojena i zadržana u bezbojnoj eukariotskoj ćeliji (Vincent, 2009). Atmosfera Zemlje bogata kiseonikom i cijanobakterijsko poreklo plastida u biljkama su dva najveća doprinosa cijanobakterija evoluciji (Knoll, 2005).

Cijanobakterije su česte u jezerima, barama, izvorima, močvarama, potocima i donjim tokovima velikih reka, gde igraju važnu ulogu u biogeohemijskim ciklusima azota, ugljenika i kiseonika mnogih akvatičnih sredina (Gaysina i sar., 2018). U akvatičnim sredinama, cijanobakterije predstavljaju važne primarne producente i pored zelenih algi čine značajan deo fitoplanktona (Reynolds, 2006). Mogu formirati biofilmove i prevlake pa u tom slučaju pripadaju bentosnoj hidrobiocenozi (bentosne cijanobakterije) (Quiblier i sar., 2013). Cijanobakterije i njihovi metaboliti su izazvali veliki broj trovanja životinja i predstavljaju pretnju i po zdravlje ljudi (Kubickova i sar., 2019).

Iako jako dugo opstaju kao slobodnoživeći organizmi, cijanobakterije takođe formiraju simbioze sa kompleksnim organizmima; na primer, azoto-fiksirajuće vrste *Anabaena azollae* formiraju simbiozu sa plutajućom paprati *Azolla*, koja je široko rasprostranjena u barama i poplavljenom zemljištu (Peters, 1991).

Diverzitet današnjih cijanobakterija je predstavljen sa oko 2000 vrsta iz 150 rodova i 5 redova (Tabela 2), sa velikom raznolikošću oblika i veličina (Vincent, 2009). Ekološki, postoje tri glavne grupe u vodenoj sredini: vrste koje formiraju prevlake, koje formiraju perifitne biofilmove preko kamenja, sedimenta, i submerznih biljaka; cvetajuće, koje stvaraju različite probleme u kvalitetu vode i koje su najčešće u eutrofnim vodama; i pikocijanobakterije, čije su ćelije ekstremno male (<3μm u prečniku) i koje su prisutne u velikom broju u vodama

nezagađenih jezera. Pored ove tri grupe, postoje i kolonijalne cijanobakterije, koje su česte u različitim vodenim staništima, uključujući i mezotrofna jezera, močvare, i slane vode; metafitne vrste koje formiraju agregacije sa vodenim makrofitama; određene vrste koje rastu kao perifiton ali mogu da postanu i plankton; i različiti simbiontski oblici (Vincent, 2009).

Tabela 2. Redovi u okviru Cyanobacteria, prepoznatih u klasičnoj botaničkoj taksonomskoj šemi, njihove karakteristike i rodovi u okviru redova. Preuzeto iz rada Vincent, W.F. (2009) Cyanobacteria. Encyclopedia of Inland Waters, 3, 226-232.

Pet redova cijanobakterija prepoznatih u klasičnoj botaničkoj taksonomiji		
RED	**KARAKTERISTIKE**	**PREDSTAVNICI**
Chroococcales	Kokoidne ćelije koje se razmnožavaju binarnom deobom	*Aphanocapsa, Aphanothece, Gloeocapsa, Merismopedia, Microcystis, Synechococcus, Synechocystis*
Pleurocapsales	Kokoidne ćelije, agregati ili pseudo-filamentikoji se razmnožavaju beocitima	*Chroococcidiopsis, Pleurocapsa*
Oscillatoriales	Homocitni trihomi, bez heterocista ili akineta	*Lyngbya, Leptolyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Phormidium, Planktothrix*
Nostocales	Trihalne cijanobakterije koje se dele u samo jednoj ravni, sa heterocistama; lažno grananje kod rodova kao što je Scitonema	*Anabaena, Aphanizomenon, Calothrix, Cylindrospermopsis, Nostoc, Scytonema, Tolypothrix*
Stigonematales	Podela u više ravni; pravo grananje; prisutne heterociste	*Mastigocladus (Fischerella), Stigonema*

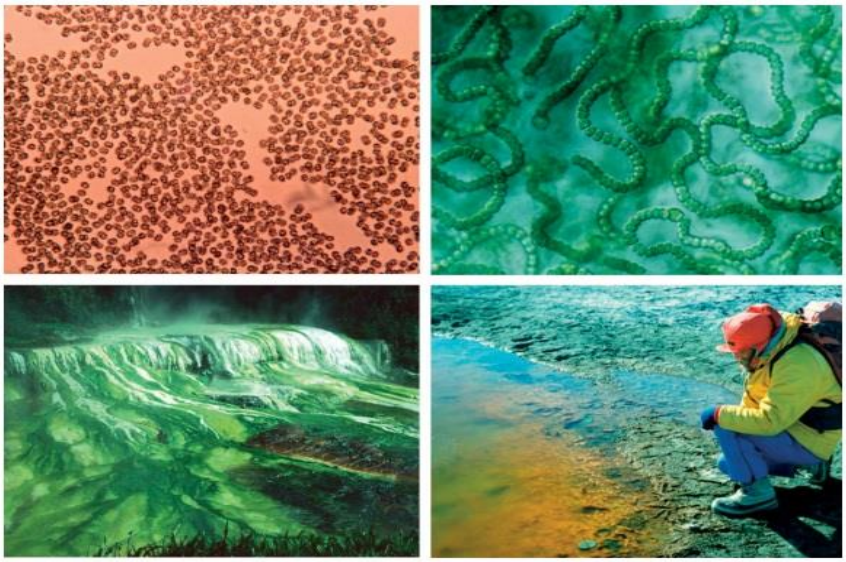
1.3.1.1. Osobine ćelija cijanobakterija

Cijanobakterije su ranije bile klasifikovane kao modrozelene alge zbog osobina sličnih algama, kao što su prisustvo hlorofila više nego bakteriohlorofila, i njihove fotosintetičke produkcije kiseonika (Vincent, 2009). Međutim, ultrastrukturalna ispitivanja jasno pokazuju da su cijanobakterije prokariotski organizmi; da nemaju razvijeno jedro i druge organele i da imaju peptidoglikanski ćelijski zid koji je tipičan za Gram-negativne eubakterije (Ponce-Toledo, 2017). One takođe poseduju nekoliko osobina koje ih razdvajaju od drugih bakterija, naročito njihov fotosintetski aparat i produkcija kiseonika. Izraz „modrozelene alge“ se još uvek koristi, kako u javnim tako i naučnim krugovima (Palinska i Surosz, 2014).

Sve cijanobakterije sadrže hlorofil a i većina sadrži plave fikobiliproteine, fikocijanin i alofikocijanin, dajući ćelijama karakterističnu modrozelenu boju. Mnogi taksoni, takođe, sadrže fikobiliprotein fikoeritrin, dajući ćelijama crvenu boju, ili nekada crnu. Fikobiliproteini su locirani u strukturama koje se nazivaju fikobilizomi na membranama tilakoida, koji su

veoma efikasni u transferu prihvaćene sunčeve energije (ekscitacione energije) do reakcionih centara fotosinteze, naročito do fotosistema II (Glazer, 1977).

Iako cijanobakterije nemaju membranski-vezane organele, imaju različite ćelijske strukture i inkluzije sa specijalizovanim funkcijama koje doprinose njihovim ekološkim karakteristikama. Ovo uključuje fotosintetske tilakoidne membrane koje sadrže fikobilizome, kao i nukleoidni region ili centroplazmu u centru ćelije, koji sadrži kompleksni savijenu, cirkularnu DNK (Ponce-Toledo, 2017). Ćelije, takođe, sadrže mnoge strukture za skladištenje rezervnih hranljivih materija, uključujući glikogenske granule (skladištenje ugljenika), cijanoficinske granule (skladištenje azota u obliku arginina i asparaginske kiseline), karboksizome (skladištenje ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza i azota) i polifosfatne granule (rezerve fosfora). Ove inkluzije omogućavaju ćeliji da akumulira energiju i hranu u većoj meri od njenih trenutnih potreba u povoljnim uslovima, kako bi naknadno koristila ove rezerve za održavanje i rast kada se nađe u nepovoljnim uslovima (Vincent, 2009). Ćelije nekoliko planktonskih rodova sadrže do nekoliko stotina gasnih vakuola (Slika 4), koje se pune gasovima iz okolne sredine i omogućavaju plutanje ćelija i kolonija cijanobakterija prema površini, gde su svetlosni uslovi povoljniji za proces fotosinteze. Neke vrste se mogu podvrgnuti dnevnoj migraciji u vodenom stubu, menjanjem količine ugljenohidratnih inkluzija koje imaju ulogu balasta u njihovim ćelijama (Vincent, 2009).



Slika 4. Cijanobakterije slatkovodnih ekosistema. Gore levo: fotomikrografija kulture Microcystis aeruginosa iz eutrofnog jezera. Svetla područja unutar ćelija nastala su usled rasipanja svetlosti u gasnim vakuolama. Gore desno: fotomikrografija kulture roda Nostoc. Veće ćelije, više sferičnog oblika su heterociste, mesta vezivanja atmosferskog azota. Dole desno: cijanobakterijski sloj bogat karotenoidima formiran u bari na Antarktiku. Dole levo: cijanobakterijski slojevi formirani u geotermalnom izvoru na Novom Zelandu.
(preuzeto iz rada Vincent, 2009)

Mnoge filamentozne cijanobakterije produkuju različite tipove ćelija koji imaju specifične fiziološke, reproduktivne i ekološke uloge (Herdman, 1988). Heterociste, tankozidne ćelije (slika 4) se formiraju kod članova *Nostocales* i *Stigonematales* i predstavljaju mesta gde je lociran enzim nitrogenaza za fiksaciju azota, konverziju gasa azota u amonijum i zatim u amino kiseline. Sledeći specijalizovani tip ćelija su akinete, strukturno reorganizovane ćelije koje se formiraju pod nepovoljnim uslovima, koje u tom slučaju omogućavaju cijanobakterijama preživljavanje. Neki rodovi, kao što je *Nostoc*, produkuju hormogonije, pokretne grupe ćelija formiranih za reprodukciju. U redu kokoidnih cijanobakterija, *Pleurocapsales*, reprodukcija se odvija preko produkcije do nekoliko stotina malih (minutnih) ćelija nazvanih beocite (Vincent, 2009).

1.3.1.2. Ekofiziologija cijanobakterija

Cijanobakterije vrše fotosintezu koristeći vodu kao donor elektrona i produkuju kiseonik kao i alge. Mali broj sojeva može koristiti vodonik sulfid (H_2S) i konvertovati ga u elementarni sumpor. Uglavnom, cijanobakterije mogu tolerisati uslove niske koncentracije kiseonika i H_2S koji su toksični po eukariotske alge. Sposobnost tolerancije ovakvih uslova im omogućava da prežive u anoksičnim sedimentima eutrofnih jezera (Vincent, 2009).

Cijanobakterije su visoko tolerantne na UV zračenje i imaju razvijene strategije za eliminaciju ili smanjivanje toksičnih efekata ovog najreaktivnijeg talasnog opsega podvodne sunčeve radijacije (Castenholz i Garcia-Pichel, 2012). Neke vrste izbegavaju UV izloženost izabirom staništa, kao na primer rastom u koritima obraslim marofitama ili u metalimnionu (region termokline) jezera. Mnoge vrste imaju efikasnu UV zaštitu koja podrazumeva prisustvo pigmenta scitonemin-a (vrh apsorbcije u UV-A opsegu) i mikosporinu sličnih amino kiselina (vrh apsorpcije u UV-B) (Proteau, 1993). Neke bentosne vrste cijanobakterija, kao što su *Nostoc*, *Calothrix* i *Gloeocapsa* imaju visoke koncentracije scitomenina zbog čega imaju crnu boju (Johnson i Castenholz, 2000). Sve cijanobakterije produkuju karotenoide, npr. β-karoten, miksoksantofil, ehinenon, osciloksantin i kantaksantin, koji su efikasni čistači slobodnih radikala kiseonika (ROS- reactive oxygen species), štetnih fotoprodukata nastalih usled izloženosti UV svetlosti (Vincent, 2009; Kelman i sar., 2009).

Cijanobakterije poseduju različite enzime koji imaju ulogu zaštite od ROS, kao što su katalaze i superoksid dismutaze (Cassier-Chauvat i Chauvat, 2014). Takođe, cijanobakterije imaju različite mehanizme za reparaciju oštećenja koji identifikuju i obnavljaju proteine oštećene UV svetlošću, npr. u fotosintetskom reakcionom centru, i oštećenja DNK (Vincent,

2009). Ova kombinacija mehanizama i visoka tolerancija na UV svetlost, u kombinaciji sa višestrukim kopijama (šest ili više identičnih hromozoma) cijanobakterijskog genoma u svakoj ćeliji, verovatno doprinosi njihovoj rezistentnosti i sposobnosti da formiraju guste populacije u mnogim tipovima staništa izloženih jakoj sunčevoj svetlosti, npr. površinska cvetanja, bentosni slojevi plitkih voda i u pikoplanktonu oligotrofnih, providnih jezera.

Cijanobakterije su euritermni organizmi i imaju široku ekološku valencu za temperaturu; međutim, većina je termofilna i zahteva toplije uslove za rast. Možemo ih naći u termalnim izvorima, sa najvišom zabeleženom temperaturom od 74 ^{o}C u Jelouston Nacionalnom parku, USA (Ward i Castenholz, 2000). Cvetajuće cijanobakterije preferiraju temperature preko 15 ^{o}C, pa čak i vrste koje formiraju prevlake u polarnim regionima, u hladnim vodama ili na ledu, nisu psihrofilne (optimalan rast na niskim temperaturama). Umesto toga, one su psihrotolerantne, odnosno mogu tolerisati hladnoću i rasti veoma sporo u odnosu na optimalanu stopu rasta na dosta višim temperaturama (Vincent, 2009). Generalno, cijanobakterije preferiraju alkalne uslove i u toku cvetanja pH vrednost može da raste i preko 9 (Summerfield i Sherman, 2008). Pod ovim uslovima, većina neorganskog ugljenika se nalazi u formi karbonata i nije dostupan mnogim eukariotskim algama (Vincent, 2009).

1.3.2. Eukariotski fitoplankton – mikroalge

Mikroalge su definisane kao polifiletska grupa jednoćelijskih fotosintetičkih eukariota i među najstarijim su i najraznovrsnijim organizmima na planeti. Evolucija mikroalgi je tekla u pravcu adaptacije na život u različitim staništima i dokazano je da predstavljaju bogat izvor genetičkog i hemijskog diverziteta (Hildebrand i sar., 2013; Gimpel i sar., 2015). Pomoću molekularnih tehnika je otkriveno da eukariotski fitoplankton krasi izuzetan diverzitet koji nije bilo moguće otkriti konvencionalnim tehnikama, analizom pigmenata i mikroskopijom (Vaulot i sar., 2008; Not i sar., 2012). Procenjuje se da broje između 40 i 70 hiljada vrsta koje su grupisane u razdele: *Glaucophyta, Prasinophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Raphidophyta, Xanthophyta, Eustigmatophyta, Chrysophyta, Bacillariophyta, Haptophyta* i *Dinophyta* (Reynolds, 2006). Postoje procene da broj mikroalgi može biti i do osam puta veći, ali još uvek nisu otkrivene niti klasifikovane (Gimpel i sar., 2015; Guiry, 2012).

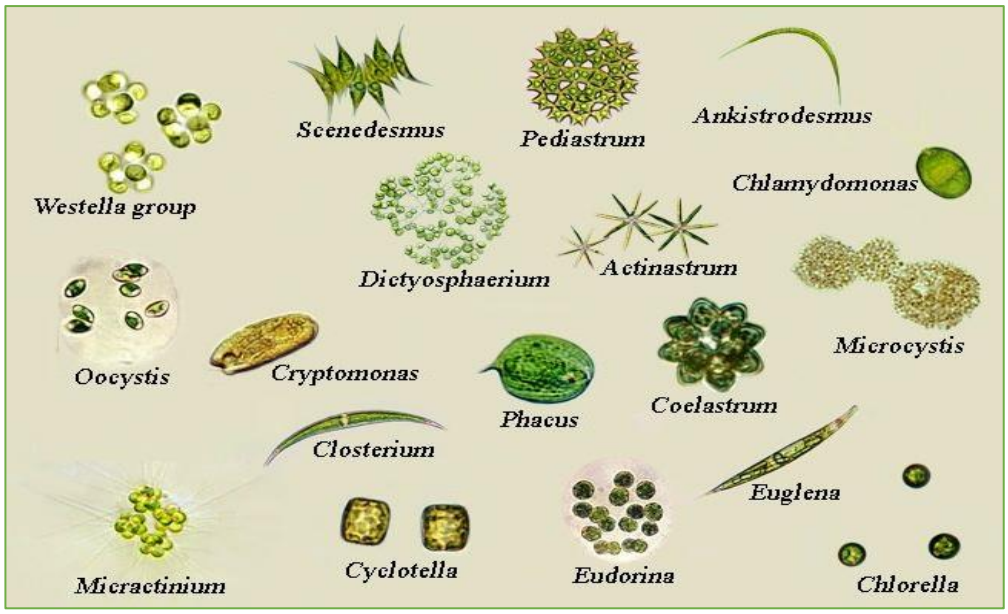
Alge imaju mnogo veću stopu rasta i fiksacije CO_2 od ostalih biljaka na Zemlji (Sander i Murthy, 2010). Smatra se da su mikroalge odgovorne za oko 32% globalne fotosinteze (Whittaker, 1975) i da produkuju više od 60% kiseonika na planeti. Mikroalge se mogu definisati i kao mikrofite koje sadrže organele karakteristične za eukariotske organizme, kao i

plastide u kojima se nalazi hlorofil koji im omogućava obavljanje fotosinteze (Suganya i sar, 2016). Ovi organizmi žive u slatkim vodama kao i u morskim ekosistemima (Suganya i sar, 2016) i njihova veličina se kreće od 3 do 30 μm (Molina-Grima i sar, 2003). Zbog taksonomskog diverziteta i metaboličkih osobina koje poseduju, mikroalge su od velike važnosti za globalnu ekologiju (Brown i Zeiler, 1993).

Zelene mikroalge (Razdeo *Chlorophyta*) obično dominiraju u zajednicama fitoplanktona slatkovodnih ekosistema i odlikuju se visokim diverzitetom. Često su u slatkim vodama zastupljeni rodovi *Chlamydomonas, Volvox, ChlorelIa, Pediastrum, Ankistrodesmus, Scenedesmus,* kao i mnogi drugi (Metting, 1996) (slika 5). Zelene mikroalge od organela imaju i hloroplaste koji sadrže hlorofile a i b, koji im daju karakterističnu zelenu boju. Po sastavu njihovih fotosintetskih pigmenata, slične su biljkama, sa kojima su filogenetski blisko povezane. Mikroalge iz ovog razdela mogu biti jednoćelijske, kolonijalne ili trihalne forme (Paerl i sar., 2001).

Poznato je i da mnoge vrste mikroalgi mogu izazvati cvetanje vode. Cvetanja mikroalgi mogu imati negativan uticaj po organizme u sredini u kojoj se formiraju, kao što su smanjenje diverziteta zooplanktona ili menjanje sastava zajednica. Vode obogaćene nutrijentima favorizuju rast zelenih mikroalgi, zbog čega se prisustvo njihove guste mase predstavlja indikator eutrofnih uslova. U visoko eutrofnim vodama, zelene mikroalge često kodominiraju sa cijanobakterijama. Ipak, za razliku od cijanobakterija, nije zabeležena toksičnost kod mikroalgi razdela *Chlorophyta*. Neki rodovi zelenih mikroalgi, kao što su *Botriococcus, Sphaerocystis, Dictyosphaerium, Scenedesmus* i *Chlorococcus*, mogu formirati karakteristična cvetanja i izazvati probleme kao što su hipoksija, promenjen ukus i miris vode, što u velikoj meri utiče na kvalitet vode (Paerl i sar., 2001). Cvetanje netoksične vrste *Scenedesmus dimorphus* je bilo smrtonosno za zooplankton koji se nije mogao prilagoditi promenama životne sredine, istovremeno omogućavajući brzo širenje populacije određenih vrsta koje bi mogle brzo da se prilagode uslovima cvetanja (Ma i sar., 2018).

Mikroalge imaju sposobnost produkcije nekoliko jedinstvenih metabolita kao što su antioksidanti, vitamini, enzimi, polimeri, peptidi, toksini, steroli, polinesaturisane masne kiseline (PUFA). Mikroalge mogu akumulirati visok nivo lipida, zbog čega su npr. idealne kao sirovina za proizvodnju biodizela (Sharara i sar, 2012). Zbog lakše kultivacije, mikroalgama je posvećena veća pažnja i rađeno više istraživanja za potrebe proizvodnje biodizela, ali i u farmaceutskoj industriji (Suganya i sar, 2016).



Slika 5. Fotomikrografija čestih rodova mikroalgi u cvetanjima slatkih voda

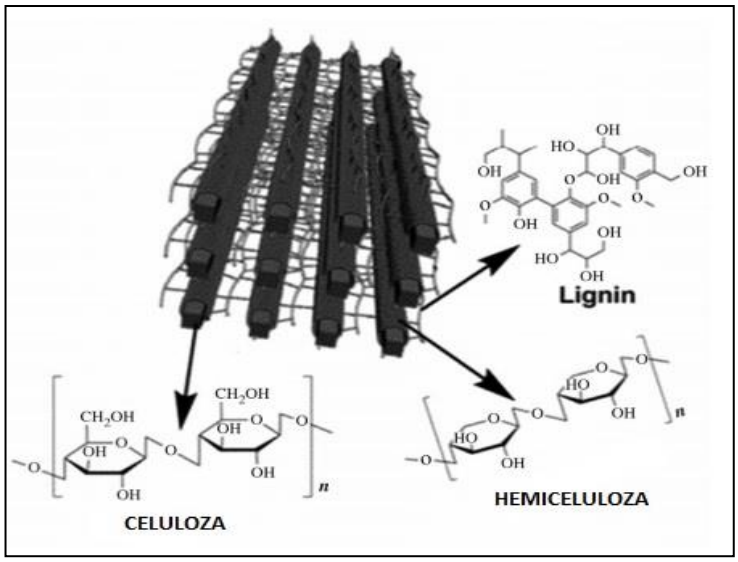
Zbog svog velikog fotosintetskog potencijala, mikroalge su veoma bogate pigmentima. Ovi pigmenti, koji uključuju karotenoide, hlorofile i fikobiliproteine, imaju svojstva koja mogu unaprediti zdravlje čoveka, kao što su prekursori vitamina, antioksidanti, pojačivači imuniteta i antiinflamatorna sredstva. Shodno tome, pigmenti mikroalgi mogu naći komercijalnu primenu kao inovativni funkcionalni sastojci u prehrambenoj industriji, kao i u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima (Christaki i sar., 2015).

Neke vrste algi se mogu koristiti kao organska đubriva u sirovom ili polurazgrađenom obliku. Mikroalge imaju sposobnost specifične konverzije jer mogu inkorporirati neorganski ugljenik i mogu se koristiti u proizvodnji izotopa 13C (Riesing, 2006).

1.3.2.1. Sastav mikroalgi

Mikroalge sadrže ugljene hidrate, lipide i proteine. Ugljeni hidrati, poznati i kao „lignocelulozna biomasa“ čine najveći deo fizičke strukture mikroalgi. Lignocelulozna biomasa kod mikroalgi sadrži celulozu, hemicelulozu, i lignin (slika 6).

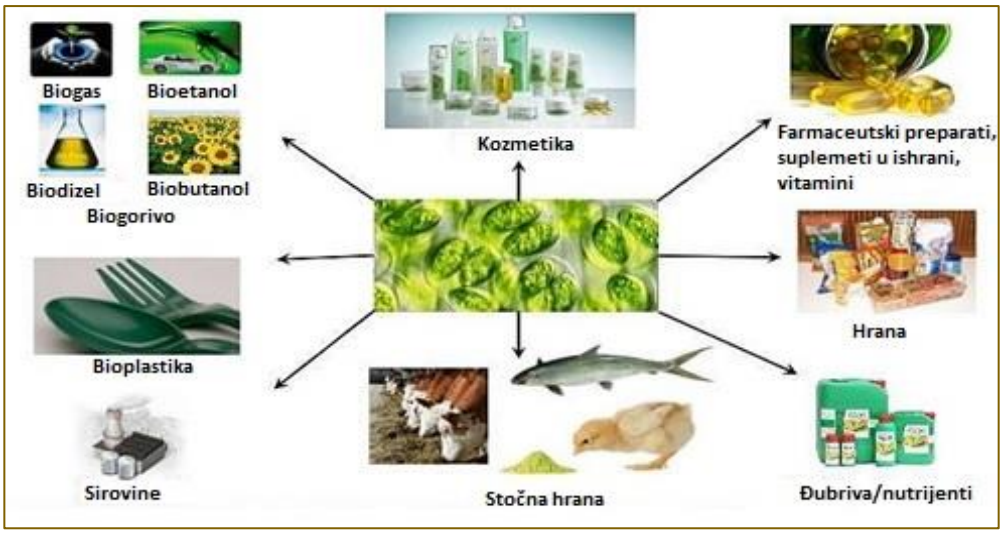
Alge se smatraju najbrže rastućim fotoautotrofima na svetu (Brennan i Owende, 2010). Zbog mnogobrojnih metabolita koji se mogu iskoristiti u industrijske svrhe, mikroalge se gaje u različitim uslovima kao što su morska voda ili otpadne vode. Kultivacija mikroalgi u otpadnim vodama doprinosi uklanjanju polutanata kao što su azot i fosfor, koje je inače teško ukloniti iz vode (Christenson i Sims, 2011). Na ovaj način se zadovoljavaju nutritivne potrebe algi, a sa druge strane se vrši prečišćavanje vode.



Slika 6. Šematski prikaz lokacije i strukture lignina (mreža), hemiceluloze (kućište), i celuloze (unutar hemiceluloze) u masi lignoceluloze (preuzeto iz rada Dahman i sar., 2019)

Mikroalge imaju veliki kapacitet vezivanja teških metala za sebe, zbog čega su ovi organizmi pogodni za korišćenje u bioremedijaciji voda (Schiewer i Volesky, 2000). Ovo svojstvo mikroalgi je pripisano prisustvu polisaharida, proteina i lipida na površini njihovog ćelijskog zida koji imaju na sebi funkcionalne grupe kao što su amino, hidroksil, karboksil, i sulfatnu, koje mogu biti mesta za vezivanje teških metala (Yu i sar, 1999). Zbog ovog svojstva se mikroalge smatraju efikasnim i pouzdanim sredstvom za uklanjanje teških metala iz vodenih rastvora (Volesky and Holan, 1995; Schiewer and Volesky, 2000). Kao primer efikasnosti uklanjanja teških metala jesu rezultati eksperimenta sprovedenog od strane Matsunaga i saradnika (1999), u kojem je soj *Chlorella* bio sposoban da preživi u koncentraciji kadmijuma od 11,24 mg/l, a prilikom izlaganja koncentraciji od 5,62 mg/l da ukloni čak 65% kadmijuma. Osnovni mehanizam mikroalgi kojim uklanjaju teške metale iz vode je zasnovan na produkciji peptida koji mogu da ih vežu i sa njima formiraju organometalne komplekse (Cobbett i Goldsbrough, 2002).

Zelene mikroalge se eksploatišu u velikoj meri kao izvor bioaktivnih jedinjenja kao što su karotenoidi, masne kiseline, steroli, amino kiseline, fikobilini, poliketidi, pektini, halogena jedinjenja, toksini, itd., (Leu i Boussiba, 2014; Gimpel i sar., 2015). Zbog svog bogatog hemijskog sastava, mikroalge predstavljaju dobre sirovine za kozmetičku, farmaceutsku, i prehrambenu industriju, ali predstavljaju i odličan izvor za proizvodnju obnovljivih goriva (Slika 7) (Larkum i sar., 2011; Gimpel i sar., 2015).



Slika 7. Primena mikroalgi kao sirovina za različite industrijske grane.

1.4. Cijanotoksini

Cijanotoksini obuhvataju veoma potentne toksine koji izazivaju smrt životinja za nekoliko minuta (neurotoksini) ili nekoliko sati (hepatotoksini) ukoliko prime akutnu dozu, tj. količinu toksina koja za kratko vreme može izazvati letalni efekat (Sivonen, 2009). Većina cijanotoksina potiče od planktonskih cijanobakterija, koje se nalaze u slatkim ili brakičnim vodama (Kaebernick i Neilan, 2001). Toksični sojevi cijanobakterija su takođe izolovani iz bentosnih, rečnih sredina, i retko iz zemljišnih habitata (Sivonen, 2009). Cijanotoksini su veoma heterogena grupa jedinjenja imajući u vidu njihovu hemijsku strukturu i mehanizme delovanja (Hrouzek i sar., 2011) (Tabela 3). Ova jedinjenja mogu imati dejstvo na druge organizme i to prvenstveno na određena tkiva i organe, zbog čega su kategorisani u pet funkcionalnih grupa: hepatotoksini, neurotoksini, citotoksini, dermatotoksini i toksini koji izazivaju iritacije (Jonas i sar., 2015).

1.4.1. Hepatotoksini - Mikrocistini

Najčešći toksini kod cijanobakterija u cvetanjima slatkih voda su ciklični heptapeptidi mikrocistini (Kabernik i Neilan, 2001). Mikrocistini su dobili ime po vrsti *Microcystis aeruginosa*, cijanobakteriji u kojoj je ovaj toksin prvi put izolovan i opisan (Sivonen, 2009). Opšta struktura mikrocistina je cyclo(D-alanine1 -X2 -D-MeAsp3 -Z4 - Adda5 -D-glutamate6 -Mdha7), u kojoj su X i Z promenljive L-amino kiseline, D-MeAsp3 je D-erythro-ß-methyl asparaginska kiselina, i Mdha je N-methyldehydroalanine. Amino kiselina Adda (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoična kiselina je nađena samo u cijanobakterijskim hepatotoksinima. Hemijska struktura mikrocistina varira ([M + H] + 910–1117), i opisano je najmanje 85 različitih varijeteta mikrocistina u naučnoj literaturi (Sivonen, 2009). Razlike se javljaju u svim amino kiselinama ali su najčešće nađene u L-amino kiselinama u poziciji 2 i 4, i u demetilaciji amino kiselina u poziciji 3 i/ili 7. Imena mikrocistina ukazuju na metilaciju/demetilaciju kao i na različite amino kiseline, npr. mikrocistin-LR označava varijantu mikrocistina koja ima leucin (L) u poziciji 2 i arginin (R) u poziciji 4. [D-Asp3]microcistin-LR je druga varijanta u kojoj amino kiselini na poziciji 3 nedostaje metal grupa. Najčešća varijacija među poznatim strukturama mikrocistina se javlja u amino kiselinama na poziciji 2, gde je najčešće leucin a zatim i arginin, iako je 13 drugih amino kiselina povremeno nađeno na toj poziciji. Varijacija u metilaciji je najčešće viđena u amino kiselini na poziciji 7.

Tabela 3. Glavne grupe cijanobakterijskih toksina. Preuzeto iz doktorske disertacije Olivere Babić (2018).

Vrsta toksina	**Toksini LD_{50}- akutna toksičnost**	**Hemijska struktura (broj varijanti)**	**Aktivnost**	**Toksični rodovi**
Hepatotoksini	Mikrocistini (25 do 1000)	Ciklični heptapeptidi (71)	Hepatotoksičnost, inhibicija protein fosfataza, dovode do poremećaja integriteta i provodljivosti membrana, promoteri tumora	*Microcystis*BCD, *Anabaena*BCD, *Nostoc*BC, *Planktothrix*BCD, *Anabaenopsis*B, *Hapalosiphon*BC
	Nodularini (30 do 50)	Ciklični pentapeptidi (9)	Hepatotoksičnost, inhibicija protein fosfataza, dovode do poremećaja integriteta i provodljivosti membrana, promoteri tumora, karconogeni	*Nodularia*BCD
	Cilindrospermopsini (200 do 2100)	Guanidni alkaloidi (3)	Izazivaju nekrotične povrede jetre, bubrega, slezine, pluća, creva, inhibitori sinteze proteina, genotoksičnost	*Cylindrospermopsis*BC, *Aphanizomenon*BC, *Anabaena*C, *Raphidiopsis*BC, *Umezakia*B
Neurotoksini	Anatoksin-a (250)	Tropan-povezani alkaloidi (5)	Postsinaptički, depolarizirajući neuromuskulatorni blokatori	*Aphanizomenon*B, *Anabaena*BCD, *Raphidiopsis*BC, *Oscillatoria*BC, *Planktothrix*BC, *Cylindrospermum*B
	Anatoksin-a(S)	Estar guanidin metil fosfata (1)	Inhibitori enzima acetilholinesterze	*Anabaena*BC
	Saksitoksini (10 do 30)	Karbamat alkaloidi (20)	Blokatori natrijumovih kanala	*AphanizomenonBC, AnabaenaBC, PlanktothrixBC, CylindrospermopsisBC, LyngbyaBC*
Dermatotoksini i citotoksini	Lingbiatoksin-a	Alkaloid (1)	Inflamatorni agens, aktivator protein kinaze C	*Lyngbya*B, *Schizotrix*B, *Oscillatoria*B
	Aplaziatoksini	Alkaloid (2)	Inflamatorni agensi, aktivatori protein kminaze C	*Lyngbya*B, *Schizotrix*B, *Oscillatoria*B
Endotoksini	Lipopolisaharidi	Lipopolisaharidi	Inflamatorni agensi, gastrointestinalni iritanti	Sve cijanobakterije?

A - akutna toksičnost u bioeseju sa miševima (LD_{50} - μg/kg telesne težine); B-toksin identifikovan u prirodnim populacijama sa dominantnim rodovima; C toksin identifikovan u neaksenim monocijanobakterijskim kulturama (sa prisustvom bakterija); D toksini identifikovani u aksenim monocijanobakterijskim kulturama (bez prisustva bakterija).

Najčešće je u pitanju amino kiselina metildihidroalanin, ali su detektovane dehidroalanin i ka oi dehidrobutirin. Manje varijacije u strukturi mikrocistina su alanin na poziciji 1, glutaminska kiselina na poziciji 6, i Adda na poziciji 5. Toksično delovanja mikrocistina se primarno ispoljava na nivou hepatocita preko inhibicije enzima protein fosfataza 1 i 2A (Pearson i sar., 2010).

Nodularini su, kao i mikrocistini, veoma potentni hepatotoksini. U brakičnim vodama je ciklični pentapeptid nodularin jako čest. Nađen je i Baltičkom moru kao i u slanim jezerima. Ime „nodularin“ potiče od vrste cijanobakterije *Nodularia spumigena* koja je producent ovog toksina (Pearson i sar., 2010). U bioesejima sa miševima, akutne doze ovih toksina izazivaju smrt oštećenjem jetre i unutrašnjim krvarenjem u roku od jednog do nekoliko sati. Ovi toksini se smatraju hepatotoksičnim jer imaju sposobnost prodiranja u hepatocite preko nosača žučne kiseline koji su prisutni u njihovim ćelijskim zidovima. Mehanizam toksičnog delovanja je isti kao i u slučaju mikrocistina.

Cilindrospermopsin, ciklični guanidin alkaloid sa molekularnom težinom 415, reprezent je citotoksina. To je tropski ili subtropski cijanotoksin koji je detektovan i u umerenim regionima. Cilindrospermopsin utiče na ćelije različitih organa poput jetre, bubrega, slezine, štitine žlezde, i srca, tako što inhibira proces sinteze proteina u njima (Jang i sar., 2003).

1.4.2. Neurotoksini

Ovi toksini nisu toliko česti kao što je to slučaj sa hepatotoksinima. U bioesejima sa miševima, smrt nastaje prestankom disanja nakon 2-30 min od primene toksina. Poznata su 3 tipa cijanobakterijskih neurotoksina: anatoksin-a, anatoksin-a(S), i saksitoksini (STX).

Anatoksin-a je mali (molekulska težina 165) alkaloid, sekundarni amin, 2-acetil-9-azabiciklo(4-2-1)non-2-ene. To je bio prvi cijanobakterijski toksin čija je struktura u potpunosti determinisana.

Anatoksin-a(S) je fosfatni ester cikličnog N-hidroksiguanina (molelukska težina 252), identifikovanom kod soja *Anabaena flos-aque* NRC 525-17.

Saksitoksini su grupa karbamat alkaloidnih neurotoksina, koji su ili nesulfinisani, monosulfinisani (goniautoksini (GTX), ili disulfinisani (C-toksini). Ovi toksini su detektovani u morskim sredinama kod određenih dinoflagelata. U morskim sredinama ovi toksini se akumuliraju u morskoj hrani (školjke i dagnje) i izazivaju paralitičko trovanje školjki (Jang i sar., 2003).

1.4.3. Dermatotoksini

Toksini koji izazivaju ozbiljne dermatitise kod plivača koji dođu u kontakt sa bentosnim cijanobakterijama su detektovani na Havajima i Okinavi. Organizmi koji ih produkuju su sojevi *Lyngbya*, *Oscillatoria*, i *Schizotrix*. Toksini sojeva iz roda *Lynbya* su nazvani aplasiatoksini i debromoaplasiatoksini, koji su potentni promoteri tumora i aktivatori protein kinaze C. Lingbiatoksin-a je pronađen kod nekih *Lyngbya* sojeva i izaziva dermatitis i ozbilne oralne i gastronitestinalne upale (Sivonen, 2009).

1.5. Zašto cijanobakterije produkuju toksine?

Razlozi zbog kojih cijanobakterije produkuju različite toksine i bioaktivna jedinjenja još uvek nisu razjašnjeni u potpunosti. Jedna od pretpostavki je da ova jedinjenja imaju veliki biološki značaj za producente, jer je potrebna velika količina energije za produkciju enzimskog kompleksa sa sintezu mikrocistina (Baselga-Cervera, 2014; Sivonen, 2009). Primer da toksični sojevi mogu imati adaptivne prednosti nad netoksičnim predstavljaju rezultati ispitivanja koji su pokazali da je mikrocistin-produkujući soj *Microcystis aeruginosa* bio superiorniji u odnosu na mikrocistin-neprodukujući soj iste vrste (Jacinavicius i sar., 2019). Ta superiornost se ogledala u većoj količini pigmenata toksičnog soja, većem antioksidativnom potencijalu, većoj ekspresiji gena za proteine fotosinteze, presavijanje proteina i ćelijske redoks homeostaze. Sa druge strane, neke studije ukazuju da mikrocistin-produkujući sojevi mogu zahtevati više hranljivih materija kako bi bili uspešniji nad netoksičnim sojevima (Jankowiak, 2019).

Većina cijanobakterijskih toksina, kao što su hepatotoksini i neurotoksini, su produkovani od strane planktonskih cijanobakterija (Sivonen, 2009). Postoje indicije da stanište utiče na produkciju bioaktivnih jedinjenja od strane cijanobakterija. Pošto su klasični cijanobakterijski neuro- i hepatotoksini toksični po eukariotske organizme, postavljena je hipoteza da se ova jedinjenja produkuju kao oružje protiv predatora, npr. protiv planktonskih herbivora (Holland i Kinnear, 2013). Ova jedinjenja bez sumnje mogu imati štetno dejstvo po zooplankton i ribe. Drevno poreklo biosinteze mikrocistina i nodularina, koja prethodi nastanku eukariota, ukazuje da uloga ovih jedinjenja ipak nije primarno u odbrani od predatora (Sivonen, 2009). Dokazano je i da cijanobakterijska jedinjenja mogu inhibirati rast drugog fitoplanktona, bakterija i virusa (Suikkanen i sar., 2004). U ovom slučaju, mnoga od ovih jedinjenja mogu zaista biti ciljano produkovana kako bi inhibirala rast kompetitora i služila kao oružje za odbranu od predatora. Veći deo mikrocistina se nalazi unutar zdravih ćelija cijanobakterija. Moglo bi se pretpostaviti da, kako bi producent bio efikasan, ova jedinjenja trebaju biti ekskretovana u spoljašnju sredinu. Međutim, u tom slučaju bi ekskretovani toksini u vodi brzo postali razređeni i izgubili na toksičnosti. Stoga bi toksini trebalo biti konzumirani zajedno sa ćelijama od strane predatora kako bi imali efekat (Sivonen, 2009).

Pretpostavlja se i da toksini imaju ulogu u regulaciji ćelijskog metabolizma organizma producenta. Uloga signalnog molekula je takođe pretpostavka, na osnovu dokaza da mikrocistin reguliše sopstvenu ili biosintezu drugih proteina. Takođe, razmatrana je i uloga mikrocistina kao intracelularnih helatora gvožđa na osnovu istraživanja koje je detektovalo

sekvence za regulator unosa gvožđa koje su vezane za promoter regione gena sintetaze mikrocistina kod vrsta roda *Microcystis*, ali ne i u sojevima roda *Anabaena*. Među mnogim pretpostavkama nalazi se i ona koja mikrocistine dovodi u vezu sa procesom fotosinteze kao i sa usvajanjem ugljenika (Sivonen, 2009).

1.5.1. Faktori koji utiču na produkciju toksina

Laboratorijska ispitivanja

Cijanobakterije mogu simultano produkovati nekoliko varijanti toksina ili bioaktivnih jedinjenja (Tonk i sar., 2008). Osim mikrocistina, nekoliko drugih porodica peptida su produkovane od strane cijanobakterija. Nasuprot tome, simultana produkcija neurotoksina i hepatotoksina je veoma retko primećena (Sivonen, 2009). Laboratorijska ispitivanja hepatotoksičnih sojeva su pokazala da ovi sojevi najverovatnije kontinuirano proizvode toksine (Zurawell i sar., 2005). Ispitivanja su pokazala da kultivacija toksin-produkujućih cijanobakterija u manje povoljnim uslovima ne prekida produkciju toksina u potpunosti, dok je trajni prekid produkcije toksina retka pojava koja se dešava u kulturama koje nisu čiste, tj, nisu klonalni izolati (Sivonen, 2009).

Efekti nekoliko sredinskih faktora na rast i produkciju toksina cijanobakterija su ispitani na kontinuiranim i serijskim kulturama (Rapala i sar., 1994; Rapala i Sivonen, 1998). Najčešće ispitivani parametri su starost kulture u serijskim kulturama i temperature, zatim svetlost, nutrijenti, salinitet, pH, i mikronutrijenti. Kada su uslovi za rast organizama povoljni, hepatotoksini i anatoksin-a se u najvećoj meri nalaze unutar ćelija, dok se cilindrospermopsin najčešće detektuje u podlozi u kojoj se soj kultiviše. Količina hepatotoksina se povećava tokom logaritamske faze rasta, dok je najveća u kasnoj logaritamskoj fazi. Čini se da se mikrocistini sintetišu i da su prisutni u ćelijama u svim fazama rasta. Maksimalna produkcija anatoksin-a je zabeležena tokom logaritamske faze rasta (Sivonen, 2009). Stopa produkcije sekundarnih metabolita, uključujući i cijanotoksine, zavisi od faze rasta cijanobakterija. Maksimalna stopa produkcije se obično postiže kada kultura uđe u stacionarnu fazu rasta (Simeunović, 2009).

Utvrđeno je da sredinski faktori utiču na produkciju toksina od strane cijanobakterija (Song i sar., 1998; Neilan i sar., 2013). Pretpostavljalo se da je produkcija toksina izazvana faktorima stresa (Harland i sar, 2013). Na osnovu ispitivanja utvrđeno je da su ćelije cijanobakterija toksičnije ukoliko su kultivisane na visokoj ili niskoj pH. Neka druga ispitivanja su pokazala da je smanjeni nivo gvožđa uvećao produkciju toksina (Harland i sar., 2013). U svakom slučaju, većina ispitivanja je pokazala da cijanobakterije proizvode najviše toksina u

uslovima koji su povoljni za njihov rast (Sivonen, 2009). Svetlost, pH, temperatura, azot, fosfor, i gvožđe dokazano utiču na sadržaj mikrocistina po biomasi, zapremini, ili ćelija u laboratorijskim ispitivanjima. U većini studija, najveća produkcija mikrocistina je zabeležena pod povoljnim uslovima koji omogućavaju optimalan rast cijanobakterija. Ovo je dovelo do hipoteze da sredinski faktori utiču indirektno na produkciju mikrocistina preko njihovih efekata po rast. Takva povezanost je jasno dokazana u uslovima ograničene količine azota prilikom kultivacije *Microcystis aeruginosa* (Sevilla i sar., 2010), ali ne mora da važi za druge organizme i uslove rasta.

Laboratorijska ispitivanja su pokazala da sojevima različitih rodova odgovaraju različiti uslovi za optimalan rast, tako na primer: *Planktotrix* preferira svetlost slabijeg intenziteta, *Anabaena* umerenog, dok *Aphanizomenon* svetlost jakog intenziteta (Zapomělová i sar., 2008). Većina ispitivanih sojeva produkuje najviše toksina kada raste pod optimalnim svetlosnim uslovima (Sivonen, 2009). Što se tiče temperaturnih uslova, tu takođe postoje razlike među sojevima različitih vrsta. Ispitivanja su pokazala da produkcija toksina bila najviše na temperaturama između 18 i 25°C, dok niske temperature (10 °C) ili visoke temperature (30 °C) smanjuju produkciju toksina. Različiti mikrocistini mogu biti produkovani na različitim temperaturama i u različitim svetlosnim uslovima. Hepatotoksični sojevi produkuju više toksina u uslovima visoke koncentracije fosfora, ali na produkciju anatoksina-a fosfor nije imao uticaj (Sivonen, 2009). Vrste kao što su *Microcystis* i *Planktothrix* produkuju više toksina u uslovima visoke koncentracije azota. Intracelularni ekstrakti kultura *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 kultivisanih u prisustvu azota su imale jače toksične efekte na vrstu *Artemia salina*, u odnosu na kulture gajene bez prisustva azota (Davidović i sar., 2019). Koncentracije nodularina u ćelijama rodova *Aphanizomenon* i *Nodularia* i podlogama za rast, kao i stope fiksiranja azota, bile su generalno najviše pod uslovima koji pospešuju rast (Lehtimaki i sar., 1997). Azotofiksirajuće vrste kao što su *Anabaena*, *Aphanizomenon*, i *Nodularia* nisu zavisne od azota u podlozi za produkciju toksina. Elementi u tragovima, gvožđe i cink, mogu imati neke efekte na produkciju toksina kod cijanobakterija (Sivonen, 2009).

Faktori okoline kao što su temperatura, intenzitet svetlosti, pH, hranljive materije, salinitet, ultraljubičasto zračenje, vetar, metali u tragovima i zagađivači životne sredine mogu uticati na rast vrsta cijanobakterija i njihovu produkciju cijanotoksina (Neilan i sar., 2013). Stoga, razumevanje uticaja promena životne sredine na stvaranje cvetanja cijanobakterija i proizvodnju toksina je presudan za upravljanje toksičnim cvetanjem cijanobakterija. Na isti

način, promena pomenutih faktora utiče na dobijanje biomase i produkciju toksina kultivacijom cijanobakterija u laboratorijskim uslovima.

Ispitivanja prirodnih ekosistema

Faktore koji kontrolišu stvaranja mase cijanobakterija je teže ispitivati u prirodi nego u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Takva ispitivanja naročito otežavaju nepredvidivi faktori kao što su to vremenski uslovi, koji imaju veliki uticaj na razvoj fitoplanktona (Sivonen, 2009).

Mnoga ispitivanja na terenu su pokazala pozitivnu korelaciju između koncentracije mikrocistina i nutrijenata, kao što su fosfor i azot (Orihel i sar., 2012). Često postoji i pozitivna korelacija između koncentracije mikrocistina i temperature (Lehman i sar., 2008). Takva ispitivanja ukazuju da faktori koji dovode do eutrofikacije mogu biti povezani sa koncentracijom toksina u prirodi. Dobro je poznato da u hipereutrofnim uslovima zelene alge dominiraju nad cijanobakterijama (Sivonen, 2009; Xie i sar., 2012). Postoje podaci i o korelaciji između hlorofila-a i koncentracije toksina (Oh i sar., 2001; Wang i sar., 2018). Takva korelacija postaje očigledna samo kada populacijom dominiraju toksični sojevi. Takođe je dokazano da se većina cijanobakterijskih cvetanja sastoji od toksičnih i netoksičnih sojeva, kao i da se brojni rodovi/vrste mogu naći u tim cvetanjima (Davis i sar., 2009; Vezie i sar., 1998). U jezeru Dianchi u Kini, mikrocistini su detektovani u vodi u letnjoj sezoni (Wu i sar., 2014), dok je anatoksin-a nađen pri nižim temperaturama vode (Wang i sar., 2015). Na severnoj hemisferi, cijanobakterijska cvetanja su detektovana pod ledom tokom zime (Fritsen i Priscu, 1998; Fritsen i sar., 1996). U umerenim regionima, tokom leta često dominira *Microcystis* koji u jesen biva zamenjen azotofiksirajućim vrstama kao što su *Anabaena* i *Aphanizomenon* (Robarts i Zohary, 1987; Dokulil i Teubner, 2000).

Ispitivanje na teritoriji Vojvodine sprovedeno u periodu jesen 2005 – leto 2006. godine je pokazalo da u više od 50% ispitivanih vodenih ekosistema dolazi do čestih cvetanja cijanobakterija, i to najčešće potencijalno toksičnih koje pripadaju rodovima *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Oscillatoria* i *Planktothrix*. U istom istraživanju su zabeležene koncentracije toksina MC-LR u rasponu 0.95-603.61 μg/l. Cijanobakterijska cvetanja su zabeležena najčešće tokom kasnog proleća, leta i rane jeseni (Simeunović i sar., 2010). Istraživanje koje je sprovedeno na vodenim ekosistemima teritorije Vojvodine u 2007. godini je pokazalo da vrste *Aphanizomenon flos– aquae*, *PseudAnabaena limnetica*, *Planktothrix agardhii*, *Microcystis aeruginosa* i *Anabaena spiroides* dominiraju u zajednici fitoplanktona.

Tom prilikom detektovano je prisustvo mikrocistina u koncentracijama do 238 µg/l, dok je pojava ovako visokih koncentracija toksina dovedena u vezu sa cvetanjima koja su zabeležena u jezerima Palić i Ludaš (Svirčev i sar., 2013). U Aleksandrovačkom jezeru je sredinom decembra 2012. godine došlo do masivnog pomora riba izazvanog cvetanjem vrste *Cylindrospermopsis raciborskii*, kod koje je biološkim testovima potvrđen toksični potencijal (Svirčev i sar., 2016).

Koncentracija toksina u vodi može varirati od niske koja je ispod nivoa detekcije do količina od miligrama po litru vode. U uslovima cvetanja, visoke koncentracije toksina mogu biti izmerene. Miligramske količine toksina su zabeležene za sve vrste cijanotoksina: mikrocistine, anatoxin-a, anatoxin-a(S), nodularine, i saksitonine (po gramu suve mase cvetanja). Ovako visoke koncentracije toksina su se često manifestovale kao uzroci trovanja životinja (Sivonen, 2009).

Lokalni klimatski i vremenski uslovi utiču na sastav i razvoj cvetanja, zbog čega se ne može generalizovati o toksinima i njihovim producentima. Umesto donošenja generalnih zaključaka, potrebno je sprovoditi monitoring i studije na lokalnom nivou koje će doprineti otkrivanju potencijalnih producenata toksina, tipove toksina koje produkuju, kao i periode i uslove pod kojima se cvetanja cijanobakterija pojavljuju.

1.5.2. Taksoni - producenti toksina

Cijanobakterije za koje se sumnja da produkuju toksine moraju biti izolovane i dokazana njihova toksičnost. Za planktonske cijanobakterije to nije uvek lako izvodljivo. Uspešnost izolacije je obično mala, jer su izolacija i prečišćavanje procesi koji zahtevaju dosta vremena. Da bismo dobili čistu (akseničnu) kulturu potrebno je vršiti kultivaciju na čvrstim podlogama (što nije uobičajeno stanište, naročito planktonskim vrstama). Da bismo potvrdili produkciju toksina potrebno je dobiti klonalne izolate. Postoje primeri gde su kulture prilikom masovne kultivacije kontaminirane hepatotoksičnim sojevima *Microcystis*, zbog čega je po prirodi netoksična kultura okarakterisana kao toksična usled detekcije toksina produkovanog od strane kontaminenta. Nasuprot tome, postoje primeri gde su kulture toksičnih sojeva kontaminirane netoksičnim sojevima (npr. pikocijnobakterijama) koji su ih prerasli, što je dovelo da se produkcija toksina okarakteriše kao nestabilna osobina. Bitno je dobiti akseničnu kulturu kako bi rezultati molekularnih analiza bili tačni, uključujući i ispitivanja biosinteze toksina (Sivonen, 2009).

Druga otežavajuća okolnost u identifikaciji cijanobakterija kao producenta toksina je nastala usled menjanja taksonomije cijanobakterija. Klasična taksonomija je zasnovana na korišćenju ključeva za identifikaciju i mikroskopiji. Tako je na primer, hepatotoksin produkujuća planktonska cijanobakterija *Plankthotrix agardhii* ranije nosila naziv *Oscillatoria agardhii* (Johansson i Wallström, 2001). Danas ovo ime nosi rod filamentoznih bentosnih cijanobakterija, koji ne sadrži gasne vezikule. Skorašnji višefazni pristup ispitivanja toksin-produkujućih cijanobakterija je jasno pokazao da u okviru iste vrste mogu postojati toksični i netoksični sojevi. Molekularna taksonomska istraživanja su pokazala da različite *Microcystis* vrste ne mogu biti diferencirane na osnovu najčešće korišćenog taksonomskog markera, 16S rRNK gena. Pored toga, određeni *Anabaena* i *Aphanizomenon* sojevi su veoma slični, pa njihovo odvajanje na dva zasebna roda nije genetički opravdano (Sivonen, 2009).

Kao producenti mikrocistina identifikovani su planktonski sojevi iz rodova *Anabaena, Microcystis, Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, i *Anabaenopsis*. *Microcystis* je globalno najčešći producent mikrocistina, zatim *Planktothrix* i *Anabaena* (Tabela 4). Pored nabrojanih rodova, mikrocistini su nađeni i kod drugih planktonskih i bentosnih cijanobakterija, od tropskih krajeva preko alpskih vodenih rezervoara, pa sve do Antarktika. Pored sojeva u vodi, kod nekih terestrijalnih cijanobakterija (*Hapalosiphon* i *Nostoc*) je takođe zabeležena produkcija mikrocistina (Sivonen, 2009).

Tabela 4. Prikaz hepatotoksina, njihova hemijska klasifikacija i mehanizam delovanja.

HEPATOTOKSINI	**RODOVI**	**HEMIJSKA KLASIFIKACIJA**	**MEHANIZAM DELOVANJA**
MIKROCISTINI	*Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Anabaenopsis*	Ciklični heptapeptidi	Inhibicija protein fosfataze tipa 1 i 2A
NODULARINI	*Nodularia*	Ciklični pentapeptidi	Inhibicija protein fosfataze tipa 1 i 2A
CILINDROSPERMOPSINI	*Cylindrospermopis raciborskii, Aphanizomenon ovalisporum, Aphanizomenon flos-aque*	Guanidin alkaloidi	Glutation i protein sinteza kao i citohrom P450

Nodularin je isključivo produkt vrste *Nodularia spumigena* (Jonasson i sar, 2008; Sivonen, 2009). Cilindrospermopsine produkuju vrste *Cylindrospermopsis raciborskii, Umezakia natans, Aphanizomenon ovalisporum, Aphanizomenon flos-aque, Raphidiopsis*

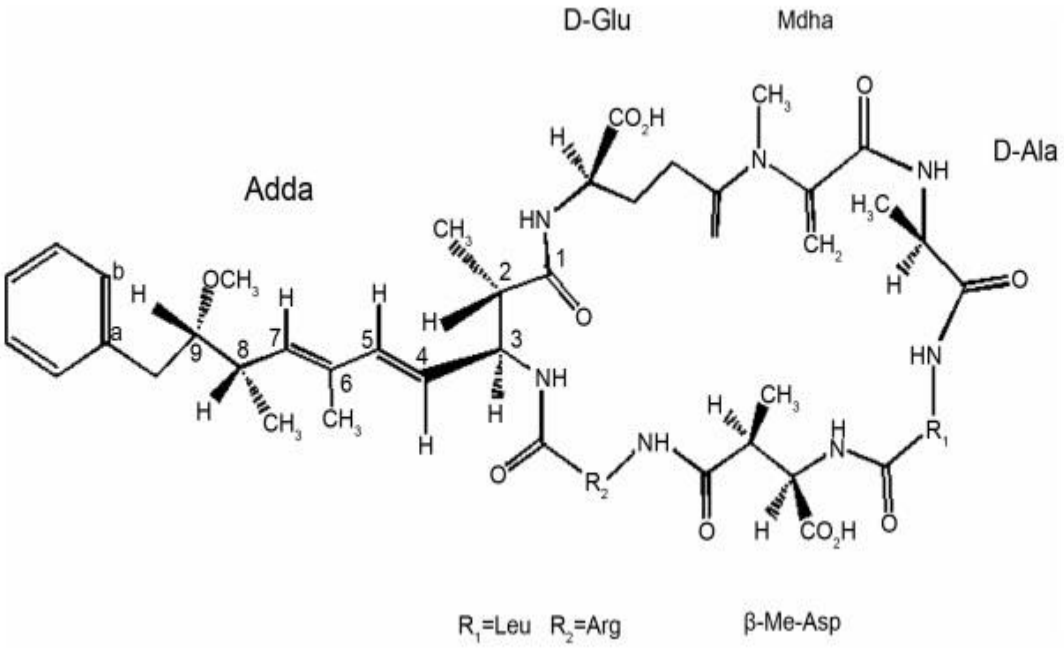
curvata, *Anabaena bergii*, i *Anabaena laponica*, kao i bentosna vrsta *Lynbya wollei*. Anatoksin-a produkuju nekoliko vrsta iz rodova *Anabaena* i *Aphanizomenon*, kao i *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, vrste *Planktothrix rubescens* i bentosna *Phormidium flavosum*. Saksitoksini su prvenstveno izolovani iz morskih dinoflagelata. Ovi toksini su izazvali trovanja ljudi zbog njihove osobine da se koncentruju u školjkama. U cijanobakterijama, saksitoksini su nađeni u vrstama *Anabaena circinalis*, *Anabaena lemmermanni*, *Aphanizomenon flos-aque*, *Aph. issatschenkoi*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei*, i *Planktothrix* sp (Sivonen, 2009).

1.5.3. Stabilnost mikrocistina

Mikrocistini su sekundarni metaboliti, produkovani od strane cijanobakterija, koji deluju kao hepatotoksini u viših organizama (Carmichael, 1992). Ovi toksini mogu biti promenjeni abiotičkim procesima, kao što su fotodegradacija i adsorpcija, ali i biološkim procesima preko metabolizma i biološke degradacije (Schmidt i sar., 2014). Neke vrste bakterija mogu degradirati mikrocistine, ali i mnogi drugi organizmi metabolišu mikrocistine u seriju konjugovanih proizvoda. Metaboliti mikrocistina nastaju kao produkt mehanizma detoksikacije, i malo je poznato koliko brzo nastaju ovi metaboliti. Može se zaključiti da mikrocistini mogu biti podvrgnuti biotičkim i abiotičkim procesima koji menjaju toksičnost i strukturu molekula mikrocistina.

Toksičnost mikrocistina je posledica inhibicije protein fosfataza i prekida formacije citoskeleta (Pearson i sar., 2010). Ovi toksini takođe izazivaju oksidativni stres u tkivu jetre (Smith i sar., 2008). Mikrocistini dospevaju do tkiva organizama ishranom ili ingestijom kontaminirane vode (Smith i sar., 2008; Runnegar i sar., 1995; Gupta i sar., 2003) jer su lako rastvorivi u vodi. Mikrocistini se akumuliraju u jetri preko transportnog sistema žučne kiseline (Pearson i sar., 2010; Runnegar i sar., 1995; Eriksson i sar., 1990; Falconer i Humpage, 2005) koji se sastoji od proteina koji aktivno trnsportuju peptide i žučne kiseline u hepatocite (Wolkoff i Kohen, 2003). Toksičnost mikrocistina varira u zavisnosti od kombinacije amino kiselina na dve različite pozicije peptidnog prstena (slika 8) (Zurawell i sar., 2005; Puerto i sar., 2009) . MC-LR predstavlja opasnost po životnu sredinu jer je veoma rasprostranjen i može se naći u slatkovodnim basenima širom sveta. Poznato je da kod čoveka mikrocistini mogu izazvati trovanja i smrt (Bláha i sar., 2009; Pouria i sar., 1998), jer je dokazano da mogu izazvati razvoj tumora jetre (Nishiwaki-Matsushima i sar., 1992). Hronično izlaganje niskim

koncentracijama mikrocistina može izazvati rast tumora ne samo jetre već i drugih organa kod čoveka (WHO, 1999).



Slika 8. Molekularna struktura mikrocistina-LR (preuzeto iz rada Liu i sar., 2008).

1.5.4. Abiotička transformacija toksina

Mikrocistini mogu proći kroz hemijsku transformaciju faktorima koji nisu vezani za žive sisteme. Abiotička transformacija se može desiti: dilucijom u vodi, adsorpcijom na predmetima u vodi, jonizacijom, i fotodegradacijom sunčevom svetlošću (Schmidt i sar., 2014). Mikrocistini se obično ne mogu termički razložiti jer je dokazano da su stabilni na visokim temeperaturama i da mogu izdržati i kuvanje (WHO, 1999; Harada, 1996).

Dilucija je glavni proces kojim se toksičnost mikrocistina redukuje u prirodnim vodama (Harada, 1996; Tsuji i sar., 2001). Mikrocistini se otpuštaju u okolnu sredinu starenjem ćelija koje su cvetale ili iz ćelija koje su oštećene. Dilucija mikrocistina se dešava kada se oni otpuste u velikoj količini vode, kao što su na primer jezera.

Mikrocistini se adsorbuju na suspendovane čestice u vodenim sistemima (Morris, 2000; Liu i sar., 2008). Adsorpcija od strane suspendovanih čestica je inače važan mehanizam uklanjanja kontaminenata u vodenim sredinama, kako morskim tako i slatkovodnim (Liu i sar., 2008; Hakanson, 2006). Ovaj proces ograničava izlaganje živih organizama u vodi slobodnim mikrocistinima vezivanjem za čestice, i na ovaj način umanjuje rizik od prenosa ovih toksina mrežom ishrane (Liu i sar., 2008; Munusamy i sar., 2012). Stepen kojim će se mikrocistini

adsorbovati za čestice je u funkciji pH (De Maagd i sar., 1999). Precizan mehanizam vezivanja mikrocistina za sedimente nije u potpunosti razjašnjen.

Molekul mikrocistina sadrži dve karboksilne grupe i jednu amino grupu koja nije ugrađena u peptidni prsten, koji je u stanju da se jonizuje (Schmidt i sar., 2014). Međutim, vrlo niska pH vrednost potrebna za jonizaciju ovih grupa karboksilnih kiselina (približno pH 2,1) je retka pojava u prirodnim ekosistemima (De Maagd i sar., 1999).

Mikrocistini su takođe podložni transformaciji usled izlaganja sunčevoj svetlosti u prisustvu fotosenzibilizatora, odnosno materija osetljivih na svetlost (Tsuji i sar., 1994; Welker i Steinberg, 2000). Kao posledica se može javiti izomerizacija konjugovane ADDA strane lanca molekula mikrocistina (Tsuji i sar., 1994; Li i sar., 2003; Song i sar., 2007). Ovaj proces zahteva nisku koncentraciju fotosenzibilizatora, kao što su huminska kiselina ili pigmenti; mikrocistini ne mogu biti transformisani samo sunčevom svetlošću (Tsuji i sar., 1994; Welker i Steinberg, 2000; Wörmer i sar., 2010). Stepen transformacije mikrocistina svetlošću zavisi od nekoliko faktora, kao što su pH, koncentracija huminske kiseline i talasne dužine svetla. Zabeležena je kompletna degradacija mikrocistina usled petodnevnog izlaganja svetlosti od 365 nm, ali i usled jednočasovnog izlaganja svetlosti na 254 nm (Munusamy i sar., 2012). Veći deo MC-LR (79%) je degradovan za 22 dana, izlaganjem punom spektru ultraljubičastog svetla (Wörmer i sar., 2010). Polu-život MC-LR u prirodnom sistemu je 90 do 120 dana po metru dubine vode (Welker i Steinberg, 2000). Visoka pH i visoka koncentracija huminske kiseline može sprečiti izlaganje organizama kritičnim nivoima mikrocistina u prirodnim sistemima.

1.5.5. Biotička transformacija toksina

Degradacija od strane mikroorganizama

Mikrobijalna degradacija mikrocistina je potvrđena kao mehanizam detoksikacije određenih sojeva gljiva (Wang i sar., 2010; Jia i sar., 2012) i bakterija (Bourne i sar., 1996; Bourne i sar., 2001; Imanishi i sar., 2005). Kod određenih sojeva bakterija je utvrđeno prisustvo enzima koji su svrstani u mikrocistinaze, i koji deluju posebnim putevima kako bi razgradili MC-LR (Bourne i sar., 2001).

U eksperimentu koji su sproveli Ho i saradnici (2007), dokazano je da bakterijski soj *Sphingopyxis* sp. C1 vrši degradaciju toksina MC-LR. Nakon 24 h, 25% MC-LR je razgrađeno. Bakterijska degradacija dovodi do detoksikacije mikrocistina u laboratorijskim uslovima pri neutralnoj pH (Schmidt i sar., 2014). Bakterije koje rastu u vodi sa formiranim cvetanjem fitoplanktona moraju biti tolerantne na alkalne uslove (Codd, 1995). Maksimalna stopa

degradacije MC-LR od strane *Sphingopyxis* sp. C-1 je zabeležena na pH između 6,5 i 8,5. Da prisustvo toksina u vodi može da uveća diverzitet bakterija u njoj koje će vršiti njihovu degradaciju svedoče ranija ispitivanja (Christoffersen i sar., 2002; Steffen i sar., 2012), dok neke vrste *Eubacteria* mogu biti blisko povezane sa cvetanjima i koristiti toksine produkovane tom prilikom kao izvor ugljenika (Jones i Orr, 1994).

Iako su bakterije brojne i veoma raznovrsne, nisu svi bakterijski sojevi u stanju da razgrade mikrocistine. Na osnovu brojnih ispitivanja utvrđeno je da se u vodama u kojima se često javljaju cvetanja fitoplanktona najčešće mogu naći sojevi iz roda *Sphingomonas* kao dominantne bakterije (Berg i sar., 2009). Mikrocistini se mogu akumulirati i ostati u vodenoj koloni ukoliko određeni bakterijski soj koji razgrađuje mikrocistine nije prisutan tokom toksičnog cvetanja (Jones i Orr, 1994; Lahti i sar., 1988).

Metabolizam i konjugacija

ADDA grupa na MC-LR molekulu je važna za vezivanje toksina na target enzim, protein fosfataze 1 i 2A (Goldberg i sar., 1995). Mdha grupa mikrocistina se može naknadno kovalentno vezati za cistein enzima protein fosfataze (MacKintosh i sar., 1995). Mikrocistini permanentno blokiraju aktivno mesto i narušavaju funkcionalnost enzima protein fosfataze. Organizmi koji su izloženi mikrocistinima su razvili mehanizme za detoksikaciju kako bi postali otporni na intoksikaciju ovim toksinima (Vermeulen, 1996; Manahan, 2003). Glutation (GSH) je čest peptid koji je aktivan u fazi II biotransformacije ksenobiotika. Konjugacijom ksenobiotika od strane GSH povećava se njegova rastvorljivost u vodi pa toksin može biti lakše eliminisan (Manahan, 2003).

Ispitivanja koja su vršena na zooplanktonu (*Daphnia magna* i *Dreissena polymorpha*) i makrofitama (*Ceratophyllum demersum*), su pokazala da je prvi korak u biotransformaciji MC-LR vezivanje glutationa na Mdha reziduum ovog toksina (Pflugmacher i sar., 1998; Pflugmacher i sar., 2002). Konjugat glutationa se enzimski konvertuje u cistein konjugat preko cistein-glicin intermedijera. Finalni konjugat koji se formira ovim biohemijskim putem je konjugat merkapturne kiseline. Slobodan (nekonjugovani) MC-LR može biti eliminisan preko urina i fecesa kod miša (Robinson i sar., 1991). Konjugati MC-LR i GSH je detektovan kod ljudi (Buratti i sar., 2011), dok je isti konjugat kao i konjugat MC-LR i cistein detektovan u sekretima miševa (Ito i sar., 2002; Kondo i sar., 1996), pacova (Takenaka, 2001), riba (Xie i sar., 2005) i puževa (Zhang i sar., 2009).

Navedeni načini biološke detoksikacije su važni za određivanje toksičnosti mikrocistina u ekosistemu. Biotransformacijom se mikrocistini uklanjaju iz organizma i vraćaju u sredinu iz koje su usvojeni. Konjugat MC-LR-GSH je tri do deset puta manje toksičan po sisare od slobodnog MC-LR (Falconer i Humpage, 2005; Metcalf i sar., 2000; Campos i sar., 2010). Slobodan i konjugovani MC-LR (MC-LR-GSH, MC-LR-Cys, itd.) mogu dalje da se kreću vodenom mrežom ishrane (Smith i Haney, 2006). MC-LR je efikasnije prenesen između organizama koji se hrane zooplanktonom (zooplankton kao vektor toksina), nego direktnim prenosom toksina do *Lepomis gibbosus* izlaganjem vodi koja je kontaminirana toksinom. Tako je npr. *Daphnia* označena kao potencijalni vektor prenosa mikrocistina jer konzumira fitoplankton, samim tim i toksične cijanobakterije (Oberhaus i sar., 2007).

Stepen rezistencije na mikrocistine

Organizmi mogu izbeći intoksikaciju mikrocistinom adaptacijama u ishrani. Određene vrste riba i zooplanktona će preferirati konzumaciju netoksičnog fitoplanktona u slučaju prisustva toksičnih i netoksičnih sojeva (Codd, 1995). Izbegavanjem unošenja toksičnih sojeva, organizmi smanjuju rizik od izlaganja mikrocistinu. U sredinama gde selektivna ishrana nije moguća, kao što su to vodena staništa sa velikim toksičnim cvetanjima, organizmi se mogu adaptirati razvijanjem tolerancije na toksičnost mikrocistina (Freitas de Magalhães i sar., 2001; Gustafsson i Hanson, 2004).

Vodeni organizmi izloženi mikrocistinima mogu razviti rezistenciju na intoksikaciju i adaptirati se na toksičnu sredinu. Stepen u kojem će organizam biti otporan na toksičnost mikrocistina se razlikuje između vrsta. Školjke, kao što su *Dreissena polymorpha* i *Mytilus galloprovincialis,* mogu se aklimatizovati na izlaganje mikrocistinu i akumulirati merljive koncentracije mikrocistina u svojim tkivima bez izazivanja mortaliteta (Williams i sar., 1997; Amorim i Vasconelos, 1999; Pietsch i sar., 2001; Contardo-Jara i sar., 2008). Neke vrste *Daphnia* takođe pokazuju različitu osetljivost na izlaganje mikrocistinu (Blanchette i Haney, 2002). Primer rezistencije na cijanotoksine jesu nimfe roda *Hexagenia,* koje su izdržale nivo MC-LR do 10 μg/l, kada je detektovana pojava toksičnog cvetanja u visoko eutrofnom jezeru u Severnoj Americi (Sivonen i Jones, 1999; Smith i sar., 2007).

Zooplankton je važan deo lanca ishrane u prirodnim sistemima kod kojeg se rezistencija na mikrocistine razlikuje u zavisnosti od vrste. U kojoj će meri zooplankton konzumirati fitoplankton ne zavisi samo od koncentracije toksina u njemu. Cijanobakterije mogu produkovati sekundarne metabolite, kao što su inhibitori proteaza ili druga organska jedinjenja

koja deluju kao repelent za zooplankton, i samim tim sprečavaju da budu konzumirane od zooplanktona (Smith i sar., 2008; Namikoshi i Rinehart, 1996). Za toksična jedinjenja, kao što su mikrocistini, je smatrano da smanjuju konzumaciju od strane zooplanktona (Lampert, 1981; Nizan i sar., 1986; Fulton i Paerl., 1987b; Benndorf i Henning, 1989). Pokazano je da toksini prisutni tokom cvetanja fitoplanktona nisu uspeli da inhibiraju konzumaciju od strane *Daphnia* sp., iako su ingestijom toksičnih ćelija jedinke bile otrovane, što se manifestovalo promenama u obrascu plivanja ovih životinja (Rohrlack i sar., 1999; Chislock i sar., 2013). Cijanobakterije su obično smatrane kao nedovoljno dobar izvor hrane za zooplankton zbog niskog sadržaja masnih kiselina i celokupnog nutritivnog sadržaja (Lampert, 1981; Porter i Orcutt, 1980; Holm i Shapiro, 1984; Ahlgren i sar., 1990).

MC-LR je snažan inhibitor protein fosfataza kod zooplanktona (DeMott i Dhawale, 1995). Vrste kopepoda, *Acartia bifilosa* i *Eurytemora affinis* su izlaganjem toksinu MC-LR u medijumu sa filtriranom vodom, u koncentracijama koje se mogu naći u prirodnim vodenim sistemima, imale veću stopu mortaliteta. Ove vrste su osetljivije na MC-LR od dafnija (DeMott i sar., 1991; Reinikainen i sar., 2002; Ger i sar., 2011). U prirustvu toksičnog cvetanja, kopepode imaju sposobnost selektivne ishrane, odnosno mogu iz ishrane isključiti toksične vrste fitoplanktona (DeMott i Moxter, 1991). Primer selektivne ishrane kopepoda je vrsta *Diaptomus birgei*, koja je iz ishrane isključila toksične sojeve cijanobakterija, ali i netoksične cijanobakterije koje su imale sličnu morfologiju sa toksičnim vrstama (Fulton i Paerl, 1987a; Fulton i Paerl, 1987b; DeMott i Moxter, 1991). Ovakav vid selekcije omogućuje kopepeodama mehanizam kojim će sprečiti intoksikaciju mikrocistinom.

Kladocere, kao što je *Daphnia*, su relativno neselektivne što se tiče hrane, zbog čega ne isključuju sojeve toksičnih cijanobakterija iz ishrane (Lampert, 1987). Vrste *Daphnia* se razlikuju po osetljivosti na mikrocistine, najverovatnije zbog fizioloških razlika (DeMott i sar., 1991), ali osetljivost zavisi i od starosti jedinki (Guo i Xie, 2006; Ortiz-Rodríguez i Wiegand, 2011). Dafnije koje su ranije bile izložene mikrocistinu su imale manju stopu mortaliteta od vrsta koje nisu imale kontakt sa ovim toksinima (Gustafsson i Hanson, 2004; Guo i Xie, 2006). Jedinke *Daphnia galeata* koje su se izlegle iz jaja koja su formirana u eutrofnom jezeru sa visokom koncentracijom mikrocistina su se dobro adaptirale na prisustvo mikrocistina (Hairston i sar., 1999). Rast jedinki koje su se izlegle iz jaja formiranih u sredini sa niskom koncentracijom mikrocistina je bio više inhibiran kada su bile izložene mikrocistinu (Hairston i sar., 1999).

1.5.6. Metode detekcije cijanotoksina

Detekciju cijanotoksina omogućavaju metode koje se mogu svrstati u analitičke, bio-analitičke, molekularne i bioeseje (Koreivienė i Belous, 2012).

Bio-analitičke metode u detekciji cijanotoksina su ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) i PPIA (test inhibicije protein fosfataze). ELISA je pogodna metoda za detekciju hepatotoksina (mikrocistina, nodularina, i cilindrospermopsina) i saksitoksina, dok PPIA se koristi za detekciju mikrocistina nodularina. ELISA i PPIA su osetljive i brze skrining metode, ali one ne vrše efikasnu diskriminaciju među strukturno srodnih jedinjenja. U novije vreme se koriste i imunohromatografski brzi testovi za detekciju cijanotoksina, prvenstveno mikrocistina. (Sivonen, 2009).

Analitičkim metodama se vrši identifikacija i kvantifikacija cijanotoksina u uzorcima vode i ekstraktima cijanobakterija. Matricom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija, vremenski nezahtevna masena spektrometrija (MALDI-TOF) je brza hemijska skrining metoda za detekciju cijanobakterijskih peptidnih toksina i bioaktivnih jedinjenja. Za tačnu identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih toksina, koriste se metode kao što su tečna hromatografija visoke performanse (HPLC) kombinovana sa UV, fluorescencijom, ili masenom detekcijom. Takođe, kapilarna elektroforeza (CE) kao i gasna hromatografija (GC) se koriste u detekciji cijanotoksina. Najveći problemi i izazovi u determinaciji cijanotoksina su postupci pripreme uzoraka koji su vremenski zahtevni, i nedostatak standarda za različite toksine. Metode za analizu toksina se koriste u laboratorijskim eksperimentima za ispitivanje uticaja sredinskih faktora na produkciju toksina. Ovim metodama se došlo do važnih informacija o sredinski relevantnim koncentracijama cijanotoksina na osnovu kojih su sprovedene procene rizika (Sivonen, 2009).

Molekularnim metodama se indirektno mogu odrediti prisutni cijanotoksini, utvrđivanjem genotipova toksičnih cijanobakterija. Ove metode omogućavaju brzu detekciju cijanobakterija koje su producenti cijanotoksina, primenom prajmera dizajniranih na osnovu *mcy* gena (Pan i sar., 2002). PCR (engl. polymerase chain reaction) metodama se može dokazati prisustvo toksičnih cijanobakterija i pre nego dođe do njihovog cvetanja i produkcije detektibilnih koncentracija toksina (Koreivienė i Belous, 2012). Kvantitativna Real-Time PCR metoda se koristi u cilju kvantifikacije toksičnih gena u određenoj zapremini vode (Kurmayer i Kutzenberger, 2003; Koreivienė i Belous, 2012).

Biološki eseji, ili bioeseji, su metode koje su se prve sprovodile u cilju detekcije toksičnosti cijanobakterija i njihovih produkata, najčešće sprovođene na miševima (Sivonen, 2009). Bioeseji su važno sredstvo za procenu nivoa toksičnosti nepoznatih cijanotoksina. Bioesejima se ne dobijaju kvantitativni tezultati, ne omogućavaju razlikovanje varijanti mikrocistina i imaju nisku osetljivost, zbog čega se smatraju pogodnim samo za utvrđivanje ukupne toksičnosti određenog uzorka vode ili sojeva cijanobakterija (Agrawal i sar., 2012). Bioesejima se dobijaju rezultati koji predstavljaju osnovu za upotrebu osetljivijih metoda u cilju identifikacije i kvantifikacije toksičnih metabolita cijanobakterija (Hamidi i sar., 2014). U bioeseje spadaju testovi u kojima se mogu koristiti mikroorganizmi, životinje (beskičmenjaci i kičmenjaci), biljke, kao i ćelijske kulture (Agrawal i sar., 2012).

Od bakterija se u biotestovima najčešće koriste *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus. subtilis* (Koreivienė i Belous, 2012). Korišćenje bakterija u detekciji cijanotoksina je pokazalo da prirodna heterotrofna bakterijska populacija nije smanjena cijanotoksinima prisutnim u sredinskim koncentracijama (Lam i sar., 1995; Christoffersen, 1996) i neke sojeve bakterija zapravo stimulišu cvetanje cijanobakterija i njihovi ekstrakti (Tsuji i sar., 1994; Lam i sar., 1995). Biljke koje se najčešće koriste u bioesejima su *Spirodela oligorrhiza*, *Solanum tuberosum*, *Sinapis alba*, *Lemna minor* (Figueiredo i sar., 2004), dok se od sisara najčešće koriste miševi i pacovi (Agrawal i sar., 2012). Primena ćelijskih kultura u *in vitro* ispitivanjima se iz etičkih razloga sve češće primenjuje u bioesejima.

Zooplankton čine životinje koje se hrane drugim planktonom, usled čega su direktno pod uticajem fitoplanktona i njihovih metabolita, što ih čini pogodnim za ispitivanje toksičnog potencijala cijanobakterija (Agrawal i sar., 2001; Rohrlack i sar., 2003). Bioeseji koji uključuju zooplankton, artropode *Artemia salina* i *Daphnia* spp., kao i embrione riba *Danio rerio* se koriste u rutinskim ispitivanjima prisustva toksina u vodenim ekosistemima, kao i u ispitivanju toksičnosti cijanobakterijskih sojeva (Hamidi i sar., 2014; OECD, 2006; Lammer i sar., 2009).

1.5.7. Rizici po zdravlje uzrokovani toksičnim cijanobakterijama

Masovan razvoj cijanobakterija u vodi za piće ili u vodama za rekreaciju predstavljaju zdravstveni rizik po životinje i ljude (Falconer i Humpage, 2005; Svirčev i sar., 2009). Proliferacija cijanobakterija je poslednjih godina dovela do smanjenja kvaliteta vode za rekreaciju kao i vode za piće na teritoriji republike Srbije, što je glavni razlog za pokretanje sistematskih istraživanja vodenih ekosistema, uključujući i detaljne epidemiološke studije u poslednjih 15 godina (Svirčev i sar., 2013). Svetska zdravstvena organizacija je ustanovila

standarde po kojima se smatra da mikrocistin-LR u vodi za piće predstavlja opasnost ukoliko se nađe u koncentracijama većim od 1 μg po litru (WHO, 2003). Slična vrednost je predložena i za cilindrospermopsin.

Glavni putevi izlaganja ljudi cijanotoksinima su: hronična i slučajna ingestija zagađenih voda za piće; udisanje ili kontakt sa sluzokožom gornjih respiratornih puteva i dermalni kontakt sa toksinima tokom rekreativnih i sportskih aktivnosti u vodi; konzumacija zagađenog povrća i voća koje je navodnjavano vodom koja sadrži cijanotoksine; konzumacija vodenih organizama (riba, školjke itd.) iz zagađenih voda; oralni unos cijanobakterijskih suplemenata u ishrani (ukoliko nije kontrolisano prisustvo cijanotoksina); kao i intravenski, obično dijalizom (Drobac i sar., 2013).

Visok nivo rizika po ljudsko zdravlje povezan je sa unosom velikih količina cijanotoksina iz vode ili unosom malih doza tokom produženog hroničnog izlaganja (Svirčev i sar., 2010). Dugotrajno hronično izlaganja visokim i/ili niskim koncentracijama mikrocistina može indukovati inicijaciju i promociju tumora. Dokazana je povezanost između cijanobakterijskih cvetanja u rezervoarima za snabdevanje vodom i povećane učestalosti primarnog karcinoma jetre u centralnoj Srbiji. Bilo kao inicijatori ili kofaktori razvoja primarnog karcinoma jetre, cijanotoksini imaju sinergistički efekat sa drugim faktorima rizika u nastanku ove bolesti (Svirčev i sar., 2013).

Do dermalnog kontakta sa cijanotoksinima obično dolazi u vodama za rekreaciju u kojima su prisutna cvetanja cijanobakterija. Problemi koji mogu biti izazvani na ovaj način su najčešće: deskvamacija kože, osip, astma, upala pluća, suv kašalj udružen sa povraćanjem i drugim gastrointestinalnim simptomima, visoka temeperatura, konjuktivitis, iritacija ušiju i očiju, alergijske reakcije, glavobolja, vrtoglavica itd. (Drobac i sar., 2013).

Bioakumulacija cijanotoksina se može javiti kod mnogih vodenih životinja koje se koriste u ljudskoj ishrani. Tako su npr. mikrocistini detektovani kod slatkovodnih račića (*Palemon modestus*, *Macrobrachium nipponensis*) i rakova (*Procamburus clarkii*), slatkovodnih puževa (*Bellamya aeruginosa*), kao i kod mnogih vrsta slatkovodnih i morskih riba (*Carassius gibelio, Oreochromis niloticus, Tilapia rendalli*) (Negri i i sar., 1995; Chen i sar., 2005; Peng i sar., 2010; Papadimitriou i sar., 2010). Imajući u vidu veliku otpornost mikrocistina na visoke temperature, termička obrada hrane najverovatnije ne utiče na smanjenje toksičnog potencijala ovih toksina koji se unose putem hrane. Istraživanja su dokazala bioakumulaciju i drugih cijanotoksina u vodenim organizmima (Drobac i sar., 2013).

Cijanobakterijski toksini su rastvorljivi u vodi i ne akumuliraju se u lipidnim slojevima. Najveća koncentracija hepatotoksina je nađena u jetri životinja; zbog čega je preporučeno da se jetre i iznutrice riba i vodenih životinja ne koriste u ljudskoj ishrani, naročito onih koje potiču iz voda u kojima je primećeno cvetanje cijanobakterija. Takođe je detektovano prisustvo cijanotoksina i u suplementima za ishranu koji su pravljeni od cijanobakterija, zbog čega je potrebna odgovarajuća kontrola kvaliteta takvih proizvoda.

Prevencija problema izazvanih toksičnim cijanobakterijama

Zaštita voda od eutrofikacije je najvažniji način prevencije nastanka štetnih cijanobakterijskih cvetanja u vodenim staništima. Na primer, istraživanja su pokazala da fosfor ne samo što uvećava rast cijanobakterija, već i uvećava količinu produkovanog toksina . Sa druge strane, visoke koncentracije azota u vodi mogu uticati na promenu sastava cijanobakterijske populacije, odnosno od azotofoksirajućih vrsta dovesti do dominacije nefiksirajućih vrsta rodova kao što su *Microcystis* ili *Planktothrix* čiji su sojevi često toksični. Dokazano je da je pojava potencijalno toksičnih genotipova producenata mikrocistina češća u eutrofnim nego u oligotrofinim vodama, što ukazuje da bi zaštita voda od eutrofikacije mogla da spreči razvoj cvetanja hepatotoksičnih cijanobakterija (Paerl i sar., 2011).

Na osnovu mnogih ispitivanja koja su pokazala da su cvetanja toksičnih cijanobakterija veoma česta, kompanije za proizvodnju vode, vodovodi i istraživači koji se bave ispitivanjem voda su uklanjanje toksina i toksičnih ćelija postavili kao prioritet. Razvijene su efikasne metode za uklanjanje toksina i toksičnih sojeva iz vode. Kao što je već ranije opisano, cijanotoksini se uglavnom nalaze unutar živih ćelija toksičnih sojeva i dolaze u spoljašnju sredinu liziranjem tih ćelija. Zbog toga je uklanjanje cijanobakterijskih ćelija jednako važno kao i uklanjanje toksina oslobođenih u vodi. Dokazano je da hemijska flokulacija uspešno uklanja cijanobakterijske ćelije. Za uklanjanje toksina iz vode se uspešno koriste aktivni ugalj i tretmani ozonizacije. Postupci filtracije, naročito ultrafiltracija mogu biti efikasni u uklanjanju ćelija cijanobakterija pa samim tim i intracelularnih cijanotoksina (Schmidt i sar., 2014).

1.6. Akvatična toksikologija

Akvatična toksikologija je disciplina koja se bavi proučavanjem uticaja hemikalija, koje su prirodnog porekla ili nastala antropogenim aktivnostima, na svim nivoima biološke organizacije akvatičnih organizama, od subcelularnog nivoa, preko jedinke, populacije, zajednice i sve do nivoa ekosistema (Rand, 1995). Od industrijske revolucije, pre više od 200 godina, mnoge supstance su dospele u vodene tokove izazivajući letalne i subletalne efekte po ribe i druge akvatične organizme, kao što su beskičmenjaci i vodene ptice, čime su dovele do narušavanja i uništavanja njihovih staništa. Ove supstance imaju veliki uticaj po svetsku ekonomiju i zdravlje ljudi, zbog čega su ovakva zagađenja stvorila globalnu zabrinutost za kvalitet vode i stanje reka, jezera, mora i okeana. Ovaj globalni problem je doveo do razvoja različitih hemijskih i bioloških metoda za proučavanje zagađenosti ekosistema i organizama koji žive u njima, kao i metoda za sprečavanje ili smanjenje zagađenja koja potiču od industrijskih i uopšteno antropogenih aktivnosti (Wells, 2009).

Glavni zadatak akvatične toksikologije je procena štetnog uticaja hemijskih supstanci i fizičkih agenasa, pojedinačno ili u kombinaciji, na vodene organizme i njihove ekosisteme (Broderius, 1991; Di Giulio i sar., 1995). Akvatična toksikologija je začeta kao grana toksikologije, da bi danas već imala sopstvene metode, pristupe i aplikacije. Ciljevi ove discipline su: (a) proučiti kako hemijski i fizički agensi izazivaju stres na vodene organizme; ovo podrazumeva identifikaciju načina toksičnog dejstva i merenje indirektnih efekata stresora na ekosisteme; (b) proučiti posledice efekata na jednom nivou koje bi se odrazile na druge nivoe biološke organizacije; (c) proučiti sličnosti i razlike u odgovoru između različitih organizama u različitim ekosistemima i geografskim lokalitetima; (d) izračunati granične koncentracije za sigurne i opasne biološke efekte stresora; (e) uveriti se da su primenjene tehnike adekvatne za skrining stresora i biomonitoring voda (Wells, 2009). Da bi se ispunili navedeni ciljevi potrebno je uključiti naučne disipline, kao što su hemija životne sredine, toksikologija, mikrobiologija, ekologija, statistika i pravo (Rand, 1995), što akvatičnu toksikologiju čini interdisciplinarnom naukom.

Postoji jasna povezanost zdravlja ljudi sa stanjem vodenih ekosistema, jer kontaminacija ili zagađenost voda može imati drastične posledice na ljude i ostale žive organizme (Di Giulio i Benson, 2002; Sindermann, 2006). Jedan od principa akvatične toksikologije je i zaštita „zdravlja“ vodenih ekosistema, površinskih i podzemnih, kako obezbeđivanjem dobrog kvaliteta vode za piće, tako i kontrolom vektora zaraznih bolesti

poreklom iz vode (Rapport i sar., 1998; Wells, 2003; Wells, 2009). Hemikalije koje se akumuliraju u živim akvatičnim vrstama i staništima mogu biti toksične po ljude. Primeri ovakvih trovanja ljudi su akumulirana metil-živa u ribama (Minamata, Japan), živa u ribama (severozapadni Ontario, Kanada), arsen u podzemnim vodama (Bangladeš, Indija), hlorisani rastvarači u vodi za piće, kao i mnogi primeri prirodnih toksina produkovanih od strane mikroalgi i cijanobakterija u vodama bogatim nutrijentima (Wells, 2009). Kao što je već navedeno, vode opterećene nutrijentima i eutrofikacijom su pogodne za cvetanja algi koje produkuju toksine, koji dalje mogu kontaminirati i akumulirati se u organizmima koji se koriste u ljudskoj ishrani (kao što su školjke, rakovi, ribe...), ili mogu biti inhalirani putem toksičnih aerosola. Osim navedenog, voda može biti i stanište različitih infektivnih agenasa, odnosno patogenih mikroorganizama. U ovom kontekstu, akvatična toksikologija daje značajan doprinos čišćenju, zaštiti i sigurnoj upotrebi vode i živih resursa u njoj.

Da bi razumeli koncept i principe akvatične toksikologije, potrebno je definisati pojmove i objasniti terminologiju koja se u ovoj disciplini koristi. U daljem tekstu će biti definisani neki od pojmova (Pesch i Wells, 2004; Wells, 2009).

Akutna toksičnost: neželjeni efekti koji se javljaju brzo nakon kratkotrajnog izlaganja hemijskom ili fizičkom agensu. Efekti koji se kod akvatičnih organizama jave nakon nekoliko sati, dana ili nedelja se smatraju akutnim. Uopšteno govoreći, akutni efekti su ozbiljni, kao što je to mortalitet. Hemijski agens koji za relativno kratko vreme, 24-96 sati, izazove smrt 50% (ili više) populacije test organizma se smatra akutno toksičnim.

Bioakumulacija: Opšti izraz koji opisuje procese kojima akvatični organizmi usvajaju hemijske supstance direktno iz vode ili izlaganjem na neki drugi način, kao što su konzumiranje hrane i sedimenta u kojima se nalazi supstanca (ili više njih). Rezultat usvajanja hemijskih supstanci je njihovo prisustvo u tkivu ili tkivima organizma.

Biomagnifikacija: Rezultat procesa biokoncentracije i bioakumulacije kojima koncentracija bioakumuliranih hemijskih supstanci raste prelaskom sa jednog na drugi trofički nivo. Ovaj izraz podrazumeva efikasan prenos supstanci sa hrane na konzumenta, tako da se koncentracije sistematski povećavaju sa jednog trofičkog nivoa na sledeći.

Hronična toksičnost: Efekti koji nastaju ponovljenom ili kontinuiranom izloženošću nekog organizma agensu, veći deo ili do kraja njegovog života, odnosno životnog ciklusa.

Kontaminenti: Potencijalno štetne supstance ili agensi prisutni u prirodnoj sredini u koncentracijama iznad prirodnih nivoa, i ispod nivoa poznatih da izazivaju štetne efekte.

Inhibiciona koncentracija (IC): Koncentracija hemikalije koja može izazvati određeni procenat redukcije (npr. IC50) bioloških procesa nekog organizma, kao što su reprodukcija ili rast. IC50 treba biti navedena za specifični period izlaganja.

Srednja letalna koncentracija (LC50): Koncentracija u rastvoru koja izaziva 50% smrtnosti test organizma, obično izražena za testiranje akutne toksičnosti. Ova vrednost se izračunava na osnovu dobijene stope mortaliteta test organizma izlaganjem različitim koncentracijama određenog agensa. Pošto mortalitet zavisi od vremena izlaganja tom agensu, LC50 treba biti navedena za specifični period izlaganja.

Subletalna koncentracija: Koncentracije supstanci ili agenasa iznad nivoa koji mogu izazvati subletalne (nisu letalni) efekte po organizme ili njihove populacije, kao što su odlaganje rasta i razvoja, abnormalno ponašanje ili abnormalni razvoj embriona.

Mehanizam toksičnosti: Način na koji hemikalija menja osnovne biološke funkcije i strukture u cilju ispoljavanja svog toksičnog efekta.

Polutant: Hemijski ili fizički agens koji izaziva neželjene ili štetne efekte po organizme (biljke ili životinje); po čemu se razlikuje od kontaminenata.

Nivo praga (engl. Threshold level/concentration): Koncentracija iznad koje će određeni agens izazvati neki efekat ili posledicu, odnosno ispod te koncentracije efekta ili posledice neće biti.

Toksične supstance ili hemikalije: Hemikalije (pojedinačne ili mešavine) koje su otrovne, kancerogene ili na neki drugi način direktno ugrožavaju biljke i životinje.

1.6.1. Testovi za detekciju toksičnosti i procena ekološkog rizika

Testovi za detekciju toksičnosti se koriste kako bi se biološki test organizmi izložili testiranom agensu u nekom sredinskom medijumu – vazduh, voda, tlo, zemljište – i ocenili efekti zagađenja na preživljavanje, rast, reprodukciju, ponašanje tih organizama. Ovi testovi mogu otkriti da li su koncentracije polutanta u sredinskom medijumu dovoljno visoke da izazovu letalne, subletalne ili uopšteno štetne efekte u organizmima. Testovi za detekciju toksičnosti mogu pokazati da li su hemijski polutanti biološki dostupni i da li imaju potencijal da izazovu biohemijska oštećenja bioloških tkiva i organa organizama. Ukoliko postoji mešavina polutanata u sredinskom medijumu, testovi toksičnosti mogu oceniti agregaciju toksičnih efekata. Ovi testovi mogu okarakterisati prirodu toksičnog efekta, da li je akutan, ne letalan, hroničan ili drugačiji. Subletalni efekti uključuju smanjen rast, neuparenu reprodukciju,

promene u ponašanju, redukciju veličine veličine organizama na nivou zajednica, prekid u funkcionisanju zajednice unutar vrste i funkcije na nivou ekosistema. Testovi toksičnosti mogu biti izvedeni praćenjem sa različitih pozicija u različito vreme, kako bi se okarakterisala distribucija toksičnosti u životnoj sredini kroz vreme (EPA, 1994).

U poslednja dva veka svetski ekosistemi su pod uvećanim pritiskom različitih antropogenih aktivnosti koje izazivaju zagađenje životne sredine i otpuštaju velike količine otpada i toksičnih supstanci. Najvažniji izvori zagađenja su industrijska proizvodnja, rudarstvo, ubrzano uvećanje ljudske populacije i urbanizacija, kao i poljoprivredne aktivnosti. Poljoprivreda igra esencijalnu ulogu za održavanjem ljudske populacije, ali u isto vreme zbog obimne mehanizacije, upotrebe hemijskih đubriva i pesticida, decenijama direktno remeti ionako osetljivo funkcionisanje ekosistema (Power, 2010).

Neki od uticaja udruženih sa intenzivnom upotrebom poljoprivrednih mera uključuju pretvaranje prirodnih staništa u poljoprivredna polja, štetne efekte pesticida na organizme protiv kojih nisu primenjeni, kroz hemijska đubriva i hranu koja dospeva u okolne vode. Procena ekološkog rizika (ecological risk assessment - ERA) je proces kojim se ocenjuju potencijalno štetni efekti i rizici po ekosisteme, koji je u poslednjim decenijama dizajniran kako bi se uglavnom bavio toksičnim hemikalijama. Pesticidi su, na primer, hemijski dizajnirani kako bi bili veoma toksični po specifične organizme i propisno s namerom pušteni u životnu sredinu. Kao takvi, pesticidi moraju proći kroz proces procene rizika kako bi se dokazao minimalni rizik na ekosisteme i žive organizme u njima (Galić i sar., 2010; Hommen i sar., 2010), 24).

1.6.2. Testiranje toksičnosti po protokolima OECD

OECD (Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj) vrši standardizaciju međunarodno priznatih metoda za biološke testove kojima se ispituje efekat hemijskih supstanci. Ove metode su u početku služile za testiranje fiziko-hemijskih osobina, ispitivanje efekata na biotičke sisteme (ekotoksikologija), procenu ekoloških posledica (degradacije i akumulacije) i na kraju uticaja po ljudsko zdravlje (toksikologija).

Svi protokoli OECD su sačinjeni od sledećih elemenata:

- uvoda (objašnjava razlog kreiranja protokola);
- principa testa;
- informacija o testiranom agensu;
- opisa metode (instrukcija za sprovođenje testa);

- izveštaja (smernica za analizu podataka i načina pisanja izveštaja);
- referenci;
- načina validacije testa – uslovi koji moraju biti ispunjeni kako bi test bio validan.

Protokoli OECD koji uključuju testiranje hemijskih agenasa na hironomide su sledeći: 218 – test toksičnosti u kojem se ispitivana supstanca nalazi u sedimentu (eng. Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment) (OECD, 2004); 219 – test toksičnosti u kojem se ispitivana supstanca nalazi u vodi (eng. Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water) (OECD, 2004a); 233 – test životnog ciklusa (eng. Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment) (OECD, 2010); 235 – akutni imobilizacioni test (eng. *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test) (OECD, 2011). U svim navedenim testovima se za ispitivanje koriste larve prvog stupnja, koje se izlažu testiranim hemijskim agensima.

Cijanobakterije i mikroalge se smatraju dobrim bioindikatorima zbog čega je OECD organizacija uvrstila i ove organizme u testiranje štetnih hemikalija. Test broj 201 je namenjen ispitivanju efekata hemikalija na rast slatkovodnih cijanobakterija i mikroalgi, tako što se ovi organizmi izlože na najmanje pet različitih koncentracija ispitivanog agensa. Međutim, ispitivanje štetnosti fitoplanktona po druge vodene organizme nije definisano ni jednim posebnim protokolom od strane OECD. Zbog rastućeg problema sa štetnim cvetanjima fitoplanktona, usled klimatskih promena, trebalo bi razmotriti definisanje i standardizaciju testa koji bi vršio ispitivanje uticaja fitoplanktona na vodene organizme, konkretno bentosne makrobeskičmenjake.

1.7. Praćenje parametara (biomarkera) u ekotoksikološkim testovima

Testovi toksičnosti analiziraju promene parametara koje mogu detektovati toksičan efekat supstanci koje se testiraju. Parametri koji se koriste u ovim testovima se nazivaju biomarkeri, a na osnovu njihove promene se vrši procena efekata primenjenih agenasa na test organizam. Biomarkeri su po definiciji objektivne i merljive karakteristike bioloških procesa (Strimbu i Tavel, 2010).

Upotreba biomarkera u ekotoksikološkim testovima kao krajnjih tačaka (engl. endpoint), podrazumeva izražavanje rezultata u kvantitativnom i kvalitativnom obliku. Kvantitativni parametri mogu biti: broj uginulih jedinki, broj položenih i izleglih jaja, dužina ili masa jedinki, merenje metaboličkih parametara, itd. Kvalitativni parametri mogu biti npr. promena obrasca ponašanja ili frekventnosti presvlačenja kod makrobeskičmenjaka. Ekotoksikološka ispitivanja mogu rezultovati letalnim efektom na test organizam, na osnovu čega se rezultat izražava procentom mortaliteta koji testirani agens u određenoj koncentraciji izaziva. Osim letalnog efekta, spoljni agensi mogu izazvati promene na subletalnom nivou, koje mogu biti posledica biohemijskih i fizioloških promena. Monitoring životne sredine podrazumeva analizu subletalnih parametara koji omogućavaju ranu detekciju ekoloških problema, što čini da proces njihove sanacije bude blagovremen i efikasan (Hellou, 2011).

Usled metaboličkih procesa u ćelijama nastaju slobodni radikali, odnosno atomi, joni ili molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjem elektronskom omotaču. Slobodni radikali se često označavaju i kao reaktivne vrste, a odlikuju se veoma kratkim poluživotom i izuzetno velikom reaktivnošću. Usled težnje za elektronskom stabilnošću, reaktivne vrste reaguju sa susednim stabilnim molekulima, pri čemu preuzimaju njegov elektron i na taj način stvaraju novi slobodni radikal. Slobodni radikali se stvaraju prvenstveno tokom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (Stanković i Radovanović, 2012).

Sistem antioksidativne zaštite konvertuje slobodne radikale u manje toksične metabolite, i sačinjen je od enzimskog i neenzimskog dela. Enzimski deo neutrališe superoksidne anjone, vodonik peroksid i lipidne peroksidaze, a čine ga superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Neenzimski deo antioksidativnog sistema čine liposolubilni i hidrosolubilni antioksidanti (Stanković i Radovanović, 2012).

Oksidativni stres je pojava definisana kao poremećaj ravnoteže između stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) i antioksidativne odbrane (Betteridge, 2000). RVK mogu

ispoljiti negativne efekte oksidativnom modifikacijom lipida, proteina i nukleinskih kiselina, što dalje može prouzrokovati povećanu propustljivost ćelijske membrane, ubrzan katabolizam proteina i genske mutacije (Martinović i sar., 2009).

Brojni sredinski polutanti indukuju oksidativni stres. Balans između intracelularnih prooksidanata (uključujući ekstracelularne stimuluse kao što su polutanti) i antioksidativnog sistema se može koristiti za procenu sredinskog stresa. Iz ovog razloga, antioksidanti enzimi se smatraju osetljivim biomarkerima oksidativnog stresa, naročito kod akvatičnih organizama (Valavanidis i sar., 2006). Stoga, otpornost izložene populacije na niz stresora zavisi od zaštite koju pružaju mehanizmi detoksikacije i antioksidanasa, čija je funkcija obnavljanje ćelijske homeostaze (Bonnefoy i sar., 2002; Vertuani i sar., 2004).

Superoksid dizmutaza (SOD) je enzim koji katalizuje reakciju dizmutacije superoksid anjon radikala u vodonik peroksid. Katalaza (KAT) je oksidoreduktaza, tetramer, hemin enzim koji katalizuje reakciju razgradnje vodonik peroksida na vodu i molekulski kiseonik. Malondialdehid (MDA) predstavlja krajnji produkt lipidne peroksidacije i spada u reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS), dok AOPP (engl. Advanced oxidation protein product) su produkti uznapredovale oksidacije proteina. Jedna od osobina *Chironomus* larvi je da poseduju hemoglobin (Myers i sar., 1986). Hemoglobin je respiratorni pigment koji se sintetiše u masnom tkivu larvi i luči u hemolimfu (Myers i sar., 1986; Lee i sar., 2006). Ovaj pigment je potencijalni biomarker za monitoring sredinskih uslova i ima važnu ulogu u oksidativnim procesima (Saffarini i sar., 1991; Choi i sar., 1999; Ha i Choi, 2008).

Osim oksidativnog stresa, ispitivani agensi mogu imati genotoksičan efekat po test organizme koji se može utvrditi različitim testovima zasnovanim na proceni oštećenja DNK. Genotoksičnost je termin koji opisuje osobine hemijskih agenasa, koje se odnose na njihovu sposobnost da nanesu štetu genetskom materijalu. Genotoksičnost može dovesti do indirektnih ili direktnih efekata na DNK, uključujući indukciju mutacija i direktno oštećenje DNK koje dovodi do mutacija. Izaziva direktne, nasledne promene koje se mogu preneti na buduće generacije ćelija (Collins, 2004). Kometa test (jednoćelijska gel elektroforeza) je često korišćena tehnika kojom se mere prekida lanca DNK u ćelijama. Ova tehnika je korisna jer može otkriti nizak nivo oštećenja DNK i relativno je jednostavna i jeftina procedura koja daje brze rezultate. Međutim, kometa test ne otkriva osnovni mehanizam za genotoksični efekat hemikalije (Collins, 2004; Park i Choi, 2009).

U tradicionalnoj morfometriji analizirane morfološke strukture (objekti analize) definišu se dužinskim rastojanjima (širina, dužina, visina) među definisanim tačkama i podaci se analaziraju multivarijantim statističkim metodama. Podaci dobijeni na ovaj način sadrže veoma malo informacija o generalnom obliku analiziranih struktura.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu trend zagađenja na globalnom nivou i uticaj polutanata i klimatskih promena na slatkovodne ekosisteme, javlja se potreba za stalnim praćenjem parametara koji ukazuju na stanje zagađenosti i uslove života za organizme u slatkovodnim ekosistemima. Cvetanje voda, odnosno fitoplanktona kojeg čine cijanobakterije i mikroalge, je česta posledica eutrofikacije vodenih ekosistema koja dodatno može ugroziti sam ekosistem. Kako bi praćenje uslova bilo kontinuirano kroz vreme, potrebno je da izabrani parametri kvalitativno i kvantitativno ukazuju na promene u slatkovodnim ekosistemima, i budu ekološki relevantni za te ekosisteme. S obzirom na to da su larve hironomida stalni članovi bentosnih zajednica slatkih voda, a cvetanja fitoplanktona sve češća pojava u vodama, opšti cilj ovog istraživanja je ispitati da li cijanobakterije i zelene mikroalge imaju toksičan efekat na larve vrste *Chironomus riparius* i definisati interakciju toksičnog efekta sa najčešćim polutantima u multistres sredini.

U skladu sa opštim ciljem, definisani su sledeći specifični ciljevi istraživanja:

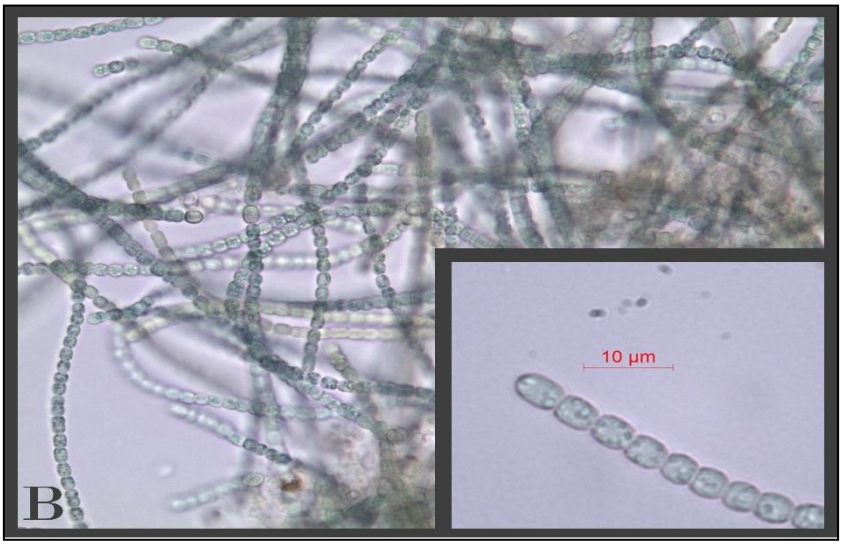
1. Detektovanje toksina u soju cijanobakterije *Anabaena*.
2. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR.
3. Ispitivanje rasta sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. u multistres uslovima.
4. Testiranje fitoplanktona kao izvora hrane za larve *Chironomus riparius*.
5. Određivanje nutritivne vrednosti testiranih sojeva fitoplanktona i utvrđivanje da li njihov hemijski sastav utiče na rast i faze razvoja larvi *Chironomus riparius*.
6. Utvrđivanje toksičnog efekta sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na larve *Chironomus riparius* preko biomarkera na različitim nivoima biološke i ekološke organizacije.
7. Definisanje akutnog toksičnog uticaja toksina mikrocistin-LR na larve vrste *Chironomus riparius* u uslovima multistresa i definisanje interakcije toksičnog efekta cijanotiksina i polutanata (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-} i Cd^{2+}).
8. Određivanje hroničnog efekata toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *Chironomus riparius* u multistres uslovima (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-} i Cd^{2+}).
9. Definisanje izmene postojećeg OECD protokola u cilju povećanja njegove osetljivosti i efikasnosti u detekciji toksičnosti cijanobakterija. Uvođenje biohemijskih i molekularnih metoda u ekotoksikološka ispitivanja subletalnog efekta cijanotoksina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kultivacija fitoplanktona

Za eksperimente u kojima je testiran uticaj fitoplanktona na larve *C. riparius* je korišćen jedan filamentozni, heterocitni cijanobakterijski soj *Anabaena* sp. i jedan soj zelenih mikroalgi vrste *Chlorella* sp. Sojevi su izabrani na osnovu literature u kojoj su opisani najčešći predstavnici fitoplanktona poznati po sposobnosti da izazovu cvetanje, odnosno da se nađu u velikoj masi i u vodenim staništima budu dostupni kao hrana beskičmenjacima (Sotero-Santos i sar., 2008; Paerl i sar., 2001; Negri i sar., 1997; Li i sar., 2016; Moffatt, 1981; Elliot i sar., 2006; Krambeck, 1988, Simeunović, 2010).

Testirani soj *Anabaena* sp. (Slika 9) je poreklom iz Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija-NSCCC Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Ovaj soj je okarakterisan na osnovu bioeseja *Artemia salina* kao toksičan (Kovač i sar., 2017).

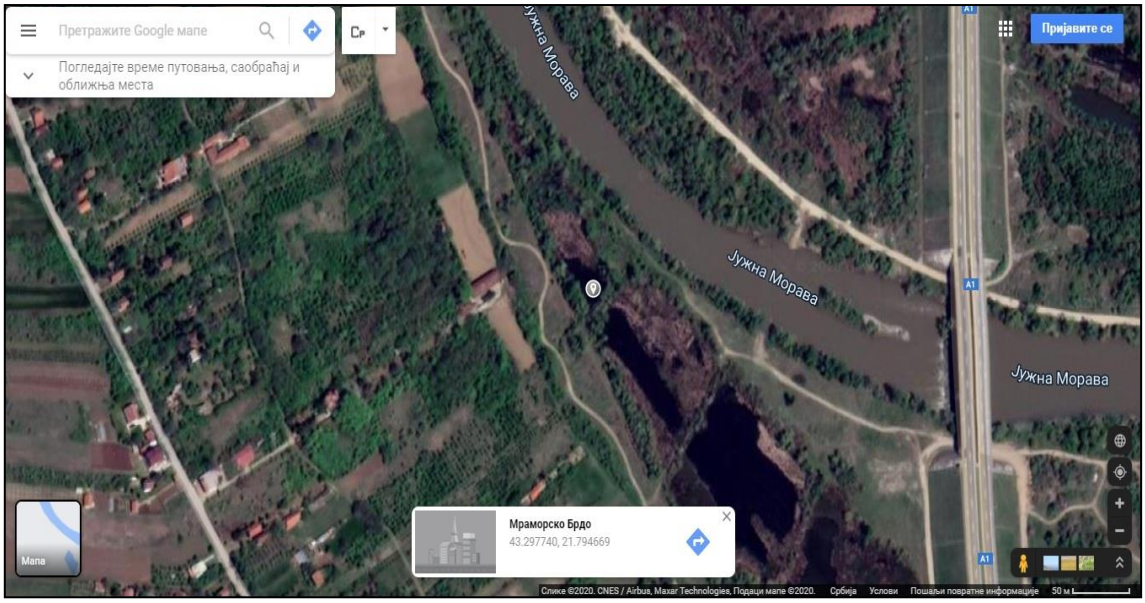


Slika 9. Mikrografija trihoma testirane kulture *Anabaena* sp.

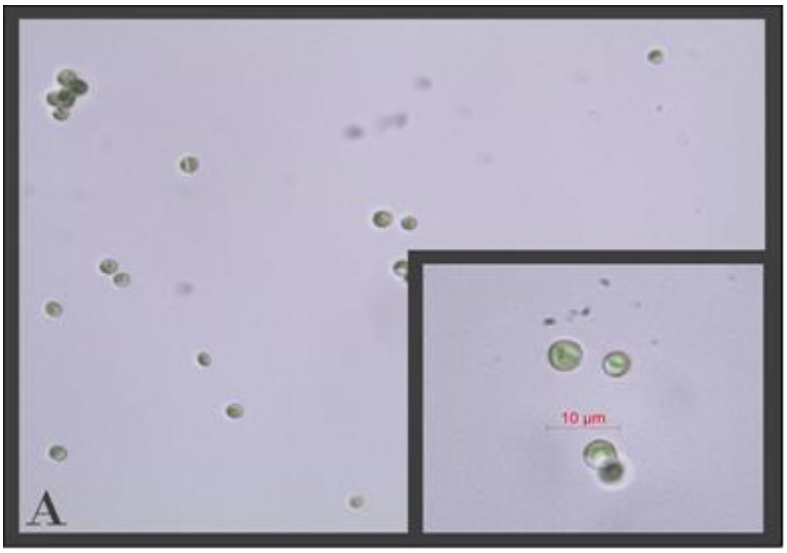
Soj *Chlorella* sp. (slika 10) koji je korišćen u ovom istraživanu je izolovan iz Batušinačkih bara (43°17'51.9"N 21°47'40.8" E) (slika 10).

Uzorci vode iz bare su sakupljeni i inicijalno ispitani pomoću svetlosnog mikroskopa kako bi se ocenio sadržaj mikroalgi u njima. Sojevi su izolovani i prečišćeni kultivacijom i više puta ponovljenim presejavanjem na agarizovanoj podlozi BG-11. Za zasejavanje primarnih uzoraka su korišćeni stakleni štapići „L“ oblika, dok su za presejavanje korišćene bakteriološke eze. Zasejane agar ploče sa podlogom su inkubirane na 25 °C pod konstantnim LED osvetljenjem (26,81 µmol/s/m2) do pojave zasebnih kolonija. Posebne kolonije su sterilnom ezom prebačene u sterilnu tečnu BG-11 podlogu u cilju dobijanja biomase potrebne za

izvođenje eksperimenata. Identifikacija do nivoa roda je izvršena pomoću ključa za determinaciju (Burchadt, 2014).



Slika 10. Lokacija označena na Google mapi sa koje je uzet uzorak iz koga je izolovan testirani soj *Chlorella* sp.



Slika 11. Mikrografija ćelija testiranog soja *Chlorella* sp.

Oba soja fitoplanktona su kultivisana u laboratorijskim uslovima. Za kultivaciju i produkciju biomase oba soja korišćena je podloga BG-11 (Rippka, 1978). Podloga je sadržala makro i mikroelemente neophodne za rast cijanobakterija i mikro algi (tabela 5).

Podloga BG-11 je pripremana tako što je 100 ml osnovnog rastvora 1, 10 ml osnovnih rastvora 2-8 i 1 ml osnovnog rastvora 9 odmereno u normalni sud od 1000 ml koji je zatim dopunjen destilovanom vodom do 1000 ml. Krajnja pH vrednost podloge je podešena na 7.1 dodavanjem 1M HCl ili NaOH. Ukoliko se vrši kultivacija cijanobakterija koje imaju

sposobnost azotofiksacije, kao što je to slučaj sa *Anabaena* sp., tada se ova podloga priprema bez prvog štoka, odnosno bez izvora azota u samoj podlozi. Podloga se steriliše 15 minuta u autoklavu na temperaturi od 121° C.

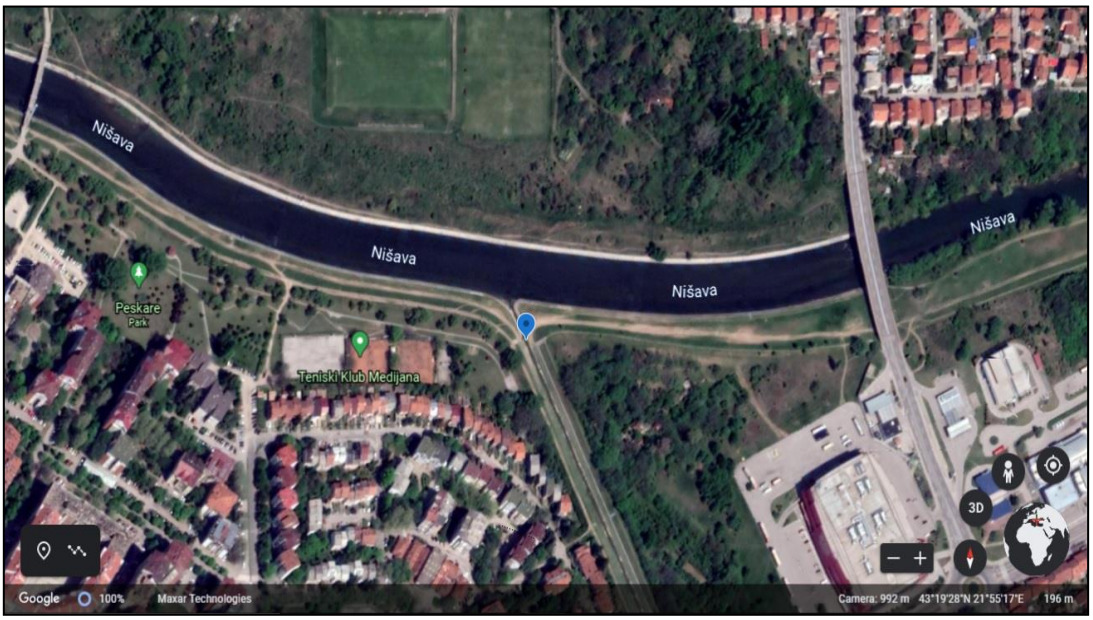
Za dobijanje biomase oba soja su pripremana u erlenmajerima od 250 ml na temperaturi od 24 °C, pod hladnim LED osvetljenjem (26.81 μmol/s/m^2) sa fotoperiodom od 16:8 h (svetlo:mrak). Kultivacija oba soja je vršena u tečnoj BG-11 podlozi, gde je za kultivaciju soja *Anabaena* sp. pripremana podloga bez azota. Ćelije za hranjenje larvi *C. riparius* su pripremane centrifugiranjem tečnih kultura koje su bile u stacionarnoj fazi rasta, u trajanju od 10 minuta na 5000 rpm. Larve prvog i drugog stupnja su hranjene sa 0,5 mg, dok su larve trećeg i četvrtog stupnja hranjene sa 1 mg ćelija po larvi.

Tabela 5. Hemijski sastav podloge BG-11 za kultivaciju cijanobakterija i mikroalgi.

Osnovni sastojci	Zapremina (ml)	Količina (g)
(1) $NaNO_3$	1000	15,00 g
(2) K_2HPO_4	500	2,00 g
(3) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		3,75 g
(4) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$		1,80 g
(5) Limunska kiselina		0,30 g
(6) Amonijum feri citrat		0,30 g
(7) $EDTANa_2$		0,05 g
(8) Na_2CO_3		1,00 g
(9) Rastvor oligoelemenata	1000	g/1000 ml
a) H_3BO_3		2,86 g
b) $MnCl_2 \cdot 4H_2O$		1,81 g
c) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$		0,22g
d) $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$		0,39 g
e) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$		0,08 g
f) $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$		0,05 g

3.2. Model-organizam (*Chironomus riparius*) za testiranje toksičnosti

U eksperimentima su korišćene larve hironomida, vrste *C. riparius*, poreklom iz laboratorijske populacije Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu.



Slika 12. Lokacija označena na Google mapi sa koje je uzet uzorak iz kojeg su sakupljene larve od kojih je kasnije u laboratoriji formirana populacija *C. riparius*.

Jedinke koje su korišćene za uzgoj laboratorijske populacije hironomida su uzorkovane iz prirodnog staništa u Nišu, (korito Gabrovačke reke, neposredno pre ušća u reku Nišavu, 43°19'28" N; 21°55 '17" E, 196 metara nadmorske visine (Slika 12). Uzorak larvi je identifikovan do nivoa vrste, od strane prof dr Đurađa Miloševića i mast. biol. Marka Jankovića. Molekularnom tehnikom DNK bar-kodiranja je potvrđena identifikacija vrste, analizom COI gena (mitohondrijalni gen za citohrom c oksidazu, subjedinica 1).

3.2.1. Uzgoj laboratorijske populacije *C. riparius*

Populacija larvi je uzgajana i održavana u skladu sa OECD protokolom koji je opisan u Aneksu II, OECD testa 218 (OECD, 2004). Uzgajanje larvi je vršeno u staklenim akvarijumima, dimenzija 10 × 20 × 20 cm, zapremine 4 litara. Akvarijumi su pokriveni mrežom koja je sprečavala izletanje adultnih jedinki. Odrasle jedinke su prebačene u takozvanu rojilicu, predstavljenu akvarijumom u kojem se jedinke razmnožavaju, dimenzija 50 × 40 × 40 i zapremine 80 litara, koji je takođe prekriven mrežom.

Na dnu akvarijuma se nalazla podloga ili supstrat sačinjen od celuloznog papira, dubine 2,5 do 4 cm. Podloga je pripremljena usitnjavanjem oko 50 grama čistog celuloznog papira prelivanog 100% acetonom. Nakon toga je podloga ostavljena u digestoru oko 30 minuta, oceđena i ponovo prelivena acetonom. Opisani postupak je ponovljen tri puta. Papir je zatim prebačen u sito gde je izvršeno njegovo ispiranje vodom sa česme, sve dok se miris acetona u potpunosti nije izgubio. Nakon toga je papir ispran destilovanom vodom i kuvan u destilovanoj vodi oko 1 sat. Posle kuvanja papir je homogenizovan blenderom, isceđen pomoću sita i nakon toga je bio spreman za upotrebu. Ovako pripremljena podloga je uronjena u akvarijum koji je prethodno napunjen vodom i raspoređena po dnu.

Voda koja je korišćena u akvarijumima bila je mešavina dehlorisane vode sa česme i destilovane vode, pripremljena u razmeri 1:1. Ovako pripremljena voda je sipana preko podloge u akvarijum tako da je vodeni stub bio visok oko 15 centimetara. Da bi se obezbedila konstantna aeracija korišćene su akvarijumske pumpe sa raspršivačima koje su postavljene dovoljno daleko od podloge kako je ne bi odigle sa dna akvarijuma. U cilju obezbeđivanja konstantne temperature vode od 22±0,5°C korišćeni su akvarijumski grejači. Ostali parametri vode su proveravani jednom dnevno i kretali su se u rasponu: pH 6,50±0,5; tvrdoća vode 7,3±0,25 °dH; konduktivitet 325 µS/cm^3.

Za ishranu larvi skorišćena je hrana za akvarijumske ribice TetraMin® (Tetra, Nemačka), koja je odmerena u zavisnosti od broja larvi i nakon toga blenderom homogenizovana u destilovanoj vodi i dodavana Pasterovom pipetom u akvarijum.

Laboratorija je bila osvetljena neonskim lampama, a fotoperiod je bio podešen na 16 sati svetlosti i 8 sati mraka. Temperatura u laboratoriji u kojoj su se nalazili akvarijumi sa kulturama hironomida bila je 20±2°C.

Nakon uzorkovanja larvi sa terena u akvarijume je dodato po tridesetak larvi. Adultne forme hironomida su mrežom, koja se nalazi preko akvarijuma, zadržavane iznad površine vode i prenošene u rojilicu. U rojilici su se odrasle jedinke parile i polagale jaja koja su se koristila za eksperimente ili obnavljanje populacije. U kontrolisanim uslovima je za razvoj larve od prvog stadijuma do adulta bilo potrebno 13-15 dana.

Larve *C. riparius* su korišćene u izvođenju eksperimenata akutne i hronične toksičnosti sojeva, cijanobakterije *Anabaena* sp. i zelene mikroalge *Chlorella* sp. Sveže položeni paketi jaja su izolovani u petri posude sa vodom iz akvarijuma, nedelju dana pre izvođenja eksperimenata. Za eksperimente su korišćene larve prvog stupnja koje su se izlegle 2-4 dana

nakon izolovanja paketa jaja. Da bi larve u eksperimentu bile jednake starosti i genetički uniformne, za svaki od eksperimenata su korišćene larve poreklom iz istog paketa jaja.

3.3. Detekcija toksina mikrocistina u soju *Anabaena sp.*

Za identifikaciju i kvantifikaciju tipa toksina produkovanog od strane soja *Anabaena* sp., korišćena je sledeća procedura: 500 mg osušene biomase je ekstrahovano dodavanjem 5 ml ekstrakcionog rastvarača sastavljenog od 75% metanola i 25% vode. Naknadno je ova mešavina tretirana 30 minuta u ultrazvučnom kupatilu kako bi se izvršilo liziranje ćelija. Ekstrakt je zatim centrifugiran 10 minuta na 4000 rpm pri temperaturi od 20 °C, nakon čega je supernatant sakupljen i filtriran kroz mikrofiltere sa veličinom pora 0,22 µm (Agilent) (Minasyan i sar., 2018).

HPLC sistem (Agilent Technologies (USA), serije 1200, opremljen Agilent fotodiodnim detektorom (DAD), automatskim ubrizgavačem, binarnom pumpom, i Chem Station softverom) korišćen je za detekciju i identifikaciju toksina. Odvajanje komponenata dobijenog ekstrakta je izvršeno pomoću kolone Supelcosil ABZ Plus (Supelco, 150 × 4.6 mm, 5 µm), a kao mobilne faze korišćeni su sledeći rastvarači: voda (rastvarač A) i acetonitril sa 0.1% trifluorosirćetnom kiselinom (TFA) (rastvarač B). Primenjen je gradijent 20% B prema 80% B u trajanju od 30 minuta, sa protokom 1 ml/min, zapremina ubrizgavanja je iznosila 10 µl, a temperatura kolone je bila 40°C. Snimanje je izvršeno u opsegu talasnih dužina 190 – 300 nm. Identifikacija i kvantifikacija toksina je izvršena korišćenjem standarda mikrocistina-LR (LGC, Nemačka).

3.4. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR

U ovom radu je ispitan efekat toksina mikrocistin-LR na mikroorganizme koji se u slatkovodnim ekosistemima mogu naći kao autohtoni organizmi. Ispitano je da li mikrocistin-LR ima antimikrobnu aktivnost na bakterije koje se mogu smatrati indikatorima fekalnog zagađenja vode, ali i da li postoji efekat ovog toksina na rast zelene mikroalge *Chlorella* sp.

3.4.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR

Određivanje precizne koncentracije aktivnosti toksina mikrocistin-LR realizovano je metodom mikrodilucije (Stojanović-Radić i sar., 2012). Od prekonoćnih kultura testiranih sojeva mikroorganizama (*Bacillus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, izolat *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715) uzgajanih na hranljivom agaru, napravljene su suspenzije bakterija u sterilnom 0,9% fiziološkom rastvoru. Nakon podešavanja suspenzija tako da odgovaraju turbiditetu 0,5 McFarland-a, što je približno koncentraciji bakterija od 1-5 x 10^8 CFU/ml (NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003), suspenzije su korišćene za inokulisanje Mueller-Hinton bujona koji predstavlja osnovnu podlogu za izvođenje ove metode. Nakon inokulisanja bujona finalna koncentracija bakterija bila je 10^6 CFU/ml. Napravljena je serija razređenja ispitivanog toksina u koncentracijama od 0,01 µg/ml do 0,000078 µg/ml, dok je kao pozitivna kontrola korišćen antibiotik streptomicin početne koncentracije 100 µg/ml. U bunariće koji su prethodno napunjeni inokulisanom suspenzijom odgovarajuće bakterije dodate su određene koncentracije toksina napravljene u dvostrukim razblaženjima. Ovako pripremljena mikrotitar ploča inkubirana je na 37 °C naredna 24 h. Nakon tog perioda očitavane su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) korišćenjem TTC-a (trifenil-tetrazolijum hlorid) koji je inokulisan u bunarčiće u količini od 20 µl (Sartoratto i sar., 2004). Eksperiment je rađen u tri ponavljanja.

3.4.2. Ispitivanje uticaja cijanotoksina mikrocistin-LR na rast zelene mikroalge *Chlorella sp.*

Da bi ispitali uticaj toksina mikrocistin-LR na ćelije eukariotskog fitoplanktona, u laboratorijskim uslovima je vršena kultivacija *Chlorella* sp. u standardnom tečnom medijumu BG-11 sa dodatkom toksina. U erlenmajer zapremine 250 ml je pripremljeno 100 ml podloge, sterilisano i nakon toga dodato 100 µl mikrocistina-LR, koncentracije 10 µg/ml. Koncentracija

toksina je u finalnoj zapremini bila 10 µg/l. Navedena koncentracija mikrocistina-LR je izabrana kao sredinski relevantna u uslovima cvetanja cijanobakterija koje produkuju ovaj toksin. Eksperiment je rađen u dva ponavljanja. Rast ove mikroalge je praćen merenjem koncentracije hlorofila a. Prethodna ispitivanja su pokazala da ovaj toksin ima antialgalno dejstvo u većim koncentracijama od sredinski relevantnih (Singh i sar., 2000), ali ne postoji literatura u kojoj je opisan efekat ovog toksina na alge u manjim koncentracijama. Kao kontrola rasta kulture *Chlorella* sp. zasejan je isti soj u BG-11 podlozi ali bez prisustva toksina.

3.5. Uticaj stresora na rast fitoplanktona

Kako bi finalne postavke eksperimenata vezanih za ovo istraživanje bile što relevantnije, potrebno je ispitati rast testiranih sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. u koncentracijama stresora u kojima će larve *C. riparius* biti tretirane fitoplanktonom kao hranom. Da bi izveli ovo testiranje, standardna podloga za kultivaciju cijanobakterija BG-11 je modifikovana kako bi se u njoj našle koncentracije stresora koje će biti primenjene u finalnom eksperimentu.

Kulture *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp., koje su korištene za ova ispitivanja, kultivisane su u erlenmajerima zapremine 500 ml. U svakoj Erlenmajer posudi, osim kontrolne, se nalazila sterilna hranljiva podloga BG-11 modifikovana tako da se postigne određena koncentracija stresora.

Anabaena sp. je kultivisana na sledeći način: erlenmajer I – standardna BG-11 podloga bez izvora azota, za kultivaciju azotofiksirajućih cijanobakterija (kontrola); erlenmajer II – modifikovana BG-11 podloga sa koncentracijom NO_3^- od 0,2 g/l; erlenmajer III – modifikovana podloga sa koncentracijom NH_4^+ od 39,84 mg/l; erlenmajer IV – modifikovana BG-11 podloga sa koncentracijom PO_4^{3-} od 0,435 g/l; erlenmajer V – standardna BG-11 podloga bez azota, sa koncentracijom kadmijuma od 1,04 mg/l. Postavka eksperimenta je vršena u tri ponavljanja.

Chlorella sp. je kultivisana u standardnoj BG-11 podlozi sa azotom: erlenmajer I – standardna BG-11 podloga bez modifikacije (kontrola); erlenmajer II – modifikovana BG-11 podloga sa koncentracijom NO_3^- od 0,2 g/l; erlenmajer III – modifikovana podloga sa koncentracijom NH_4^+ od 39,84 mg/l; erlenmajer IV – modifikovana BG-11 podloga sa koncentracijom PO_4^{3-} od 0,435 g/l; erlenmajer V – standardna BG-11 podloga sa koncentracijom kadmijuma od 1,04 mg/l; erlenmajer VI – standardna BG-11 podloga sa dodatkom toksina mikrocistin-LR u finalnoj koncentraciji od 10 µg/l.

Erlenmajeri sa zasejanom kulturom *Anabaena* sp. su ostavljeni na kultivaciju u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (metodologija opisana u poglavlju 3.1.) do utvrđivanja stacionarne faze rasta kulture. Na svakih sedam dana je po mililitar kulture, prethodno vorteksovane, prebačeno u kivete i očitavana optička gustina na 678, 720 i 750 nm. Po utvrđivanju stacionarne faze kulture, vršeno je ispitivanje produkcije toksina mikrocistin-LR iz svih erlenmajera, sa namerom da se ispita da li i u kojoj meri uslovi rasta (prisustvo

nutrijenata/stresora) utiče na produkciju mikrocistina-LR. Način ekstrakcije i detekcije mikrocistina je prethodno opisan (poglavlje 3.3.).

Koncentracija ćelija je određena merenjem apsorbance na 750 nm, čime se prikazuje linearni odnos sa suvom ćelijskom masom u opsegu od OD_{750} od 0 do 0,6. Koncentracija hlorofila (Chl a) je bila izračunata prema sledećoj formuli (1) (Yu i sar., 2011),

$$Chl(\mu g \cdot ml^{-1}) = 14{,}96 \cdot (OD_{678} - OD_{750}) - 0{,}616 \cdot (OD_{720} - OD_{750}) \qquad (1)$$

gde su OD_{678} i OD_{720} vrednosti dobijene, odnosno izmerene istovremeno kada i OD_{750}.

Erlenmajeri sa zasejanom kulturom *Chlorella* sp. su kultivisani u kontrolisanim laboratorijskim uslovima do utvrđivanja stacionarne faze rasta kulture. Na svakih sedam dana je po mililitar kulture, prethodno vorteksovane, prebačeno u kivete i očitavana optička gustina na 678 nm. Na kraju kultivacije je napravljena kriva rasta na osnovu koje je utvrđeno u kojim je uslovima ova kultura produkovala najveću biomasu, i na koji je način mikrocistin-LR uticao na rast *Chlorella* sp.

3.6. Testiranje različitih režima ishrane na rast i razviće larvi *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 218

U okviru eksperimenta korišćeni su različiti režimi ishrane i u skladu sa tim je definisan kontrolni tretman i četiri eksperimentalna tretmana.

TetraMin® je komercijalna hrana za akvarijumske ribe koja predstavlja mešavinu žitarica, algi, kvasca, školjki, rakova itd. Nutritivne vrednosti date od strane proizvođača: udeo proteina iznosi (min) 47,0%, lipida (min) 10,0%, vlakana (max) 3,0% i vlage (max) 6,0%. TetraMin® je prema OECD protokolu preporučena hrana za uzgoj hironomida i u ovom ispitivanju je korišćen u kontrolnoj grupi larvi.

Slika 13. Suspenzija živih ćelija algi pripremljena za prehranu larvi

Pored kontrole, dizajnirano je četiri tretmana u kojima su za ishranu larvi *C. riparius* korišćeni:

1. suspenzija ćelija zelenih mikroalgi iz roda *Chlorella* sp. (Slika 13);
2. suva masa zelenih mikroalgi roda *Chlorella* sp.;
3. komercijalno dostupan suvi pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*);
4. sadržaj biofiltera, odnosno materijal koji se sakuplja u filteru iz akvarijuma u kojem se gaje ribe tinjaci (*Tinca tinca*); obezbeđen od strane Centra za ribarstvo i konzervaciju kopnenih voda, Akvarijum, Kragujevac. Sadržaj biofiltera je dominantno bio sačinjen od roda *Euglena* (Protista). Nakon prikupljanja, sadržaj biofiltera je, za vreme trajanja eksperimenta, čuvan u frižideru (≈5 °C).

Prema OECD protokolu, u toku trajanja eksperimenta dnevna količina hrane za ishranu larvi starih do pet dana iznosi 0,25-0,50 mg/larvi, dok su za kasnije larvalne stupnjeve potrebne nešto veće količine hrane (0,50-1 mg/larvi/danu). Kako bi larve iz različitih tretmana bile prehranjivane podjednakom količinom (masom) odgovarajuće hrane, odnosno, kako bi različiti

tipovi hrane bili aplicirani u podjednakoj količini, određen je sadržaj suve mase/materije u rastvoru ćelija algi i sadržaju biofiltera. Nakon centrifugiranja tečne kulture algi (BG-11 bujon), višak tečnosti je odliven, a ćelije algi su prikupljene u maloj keramičoj posudi i izmerene na analitičkoj vagi (Kern, Germany). Potom, posuda s ćelijama je pokrivena gazom i ostavljena u sušnici na temperaturi od 80 °C narednih 48 sati. Time je dobijena suva materija algi, koja je zatim izmerena na analitičkoj vagi. Jednostavnom jednačinom (formula 2) je određeno da ≈10% živih ćelija algi čini suva materija i da je za validne rezultate, prilikom prehranjivanja na 48 sati, neophodno najpre 10 mg živih ćelija algi po larvi (0,5 mg suve mase algi po danu), a potom 20 mg živih ćelija algi po larvi (1 mg suve mase algi po danu) (pogledati odeljak 3.3).

$$X = \left\{\left(\frac{M2}{M1}\right) * 100\%\right\} \tag{2}$$

pri čemu je: X- procenat suve materije živih ćelija algi; M1- masa živih ćelija algi; M2- masa suve materije dobijene sušenjem živih ćelija algi.

Na osnovu proporcije (formula 3) je određeno kolikom zapreminom rastvora biofiltera je potrebno prehranjivati larve, kako bi one bile opskrbljene odgovarajućom masom suve materije (0,5 mg po larvi, po danu, tokom prva tri hranjenja, a do kraja eksperimenta, tokom narednih pet hranjenja, 1 mg po larvi, po danu).

$$\frac{Z}{M3} = \frac{X}{M4} \rightarrow X = Z \cdot \frac{M4}{M3} \tag{3}$$

Pri čemu je: Z- 1 ml rastvora biofiltera; X- zapremina rastvora biofiltera koju sačinjava željena količina suve materije (M4); M3- masa suve materije dobijene sušenjem Z (1 ml rastvora). Sve korišćene vrste hrane u eksperimentu su najpre bile razblažene u demineralizovanoj vodi, zatim homogenizovane mutilicom i pipetom dodate u test posude s larvama.

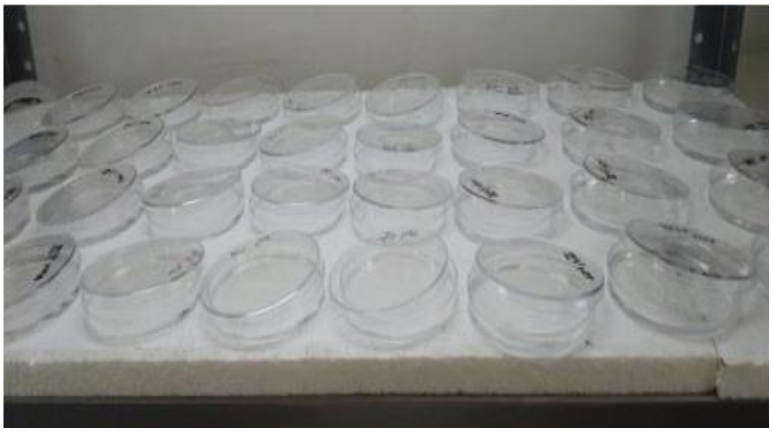
Princip i postavka eksperimenta

Dizajn eksperimenta je urađen prema protokolu OECD testa broj 218, koji služi za procenu efekata dugoročne izloženosti larvi štetnim supstancama u sedimentu (eng. Sediment water chironomid toxicity test using spiked sediment) (OECD, 2016). Prema pomenutom protokolu, potrebno je da stopa preživljavanja (P) u kontrolama bude veća od 70%, kako bi eksperiment bio validan.

Slika 14. Aparatura za postavku eksperimenta. Stakleni akvarijum sa test-teglama u kojima je sproveden sistem za aeraciju

Aparatura koja je korišćena za postavku eksperimenta (slika 14) se sastojala od izotermalnog vodenog kupatila u kojem su bile smeštene test posude; sistema za aeraciju i neonskog osvetljenja s dnevno-noćnim režimom 16:8 sati (svetlost:tama). U izotermalnom kupatilu je održavana konstantna temperatura od 21±1 °C. Kao test posude korišćene su staklene tegle zapremine 700 ml i prečnika 8 cm u kojima je stavljen sediment (kvarcni pesak) i vodeni stub sačinjen od mešavine demineralizovane i dehlorisane vode sa česme (pH 6,52±0,4; tvrdoća vode 7,3 °dH; konduktivnost vode 325 µS/cm3) u odnosu 1:1. Odnos visina sedimenta i vode je iznosio 1:4. Test posude su bile pokrivene slojem gaze kroz koji je sprovedena izvodna cev aeracionog sistema.

Šest dana pre početka eksperimenta, četiri sveže položenih paketa jaja je premešteno iz rojilice (akvarijuma za parenje) u posebne petrijeve posude (Slika 15) u kojima se nalazila voda iz akvarijuma. Na posudama je obeležen datum polaganja paketa jaja, kako bi bila poznata starost larvi. Jaja su u petrijevim posudama čuvana do izleganja, do koga je došlo u naredna dva do tri dana, nakon čega je nasumično odabrana jedna posuda iz koje su larve biti korišćene u eksperimentu. Larve iz zasebne posude su poreklom iz istog paketa jaja. Na taj način se smanjuje uticaj prirodne genetičke varijabilnosti na krajnje rezultate istraživanja. U odabranoj posudi, do izleganja je došlo dva dana nakon polaganja jaja, tako da su larve bile starosti tri dana (prvi stupanj) na samom početku eksperimenta.



Slika 15. Petri posude sa paketima jaja premeštenih iz rojilice.

Dva dana pre stavljanja larvi u test posude, sistem za aeraciju je uključen, da bi se voda u njima obogatila kiseonikom, potom je stopiran neposredno pre stavljanja larvi, da bi zatim, 24 sata nakon stavljanja larvi, ponovo bio uključen. Po 20 larvi prvog larvalnog stupnja (starosti tri dana) je pažljivo prebačeno u svaku test posudu (ukupno 400 larvi).

Prema uputstvu datom iz testa 218 OECD protokola, ishrana larvi ranih stupnjeva se vrši količinom od 0,25-0,50 mg TetraMin®-a/larvi/danu, dok se za ishranu kasnijih stupnjeva larvi koristi duplo više hrane. U ovom eksperimentu, larve su hranjene ranije navedenom hranom na svakih 48 sati, u količinama koje su definisane protokolom. Prva ishrana je obavljena neposredno nakon stavljanja larvi u test posude. Prvog, trećeg i petog dana eksperimenta, dodata je hrana u količini od 0,5 mg po larvi (0,25 mg po larvi, po danu), dok je narednih pet prehranjivanja (do kraja eksperimenta) dodavana hrana u količini od 1 mg po larvi (0,50 mg po larvi, po danu).

Nakon završenog eksperimenta evidentiran je broj preživelih larvi i procenjena je stopa preživljavanja (P) na osnovu formule (4):

$$P = {}^{ne}/_{na} \tag{4}$$

(gde je “ne” suma larvi preživelih na kraju eksperimenta; “na” početni broj larvi); Stopa mortaliteta (M) je određena na osnovu formule (5):

$$M = 1 - P \tag{5}$$

Merenje dimenzija morfoloških karakteristika larvi

Morfometrijskim analizama je utvrđen uticaj različitih tipova hrane na morfološke karakteristike larvi. Izmerena je dužina tela larvi, dužina i širina glavene kapsule, kao i mokra masa jedinki. Za analizu karaktera korišćen je svetlosni mikroskop (Nikon SMZ 745T, sa C-

W 10xB/22 Nikon objektivom i 1x uvećanjem okulara), koji je povezan sa računarom, što je omogućilo preciznije merenje morfometrijskih parametara. Larve hironomida su fotografisane mikrokamerom, dok su pomoću programa (ImageJ) izmerene dimenzije dužine tela larvi, kao i dužine i širine glave. Merenje mokre mase larvi hironomida je izvršeno u laboratoriji pomoću analitičke vage, a dobijene vrednosti su izražene u miligramima.

Validnost testa

Kako bi testiranje bilo validno, sledeći kriterijumi moraju biti zadovoljeni:

- U kontrolnim tretmanima mora biti najmanje 70% preživelih larvi na kraju eksperimenta;
- Izlazak adulta iz tegli sa kontrolnim tretmanima treba da se dogodi između 12 i 23 dana nakon uvođenja larvi u test tegle;
- na kraju testa, u svakoj tegli treba izmeriti pH i koncentraciju rastvorenog kiseonika; koncentracija kiseonika treba da bude najmanje 60 procenata vrednosti zasićenja vazduhom (ASV- air saturation value) na korištenoj temperaturi, a pH vode treba da bude u opsegu 6-9 u svim teglama;
- temperatura vode ne bi trebalo da se razlikuje za više od 1,0 °C, što se postiže postavljanjem tegli u izotermalnu komoru.

3.7. Hemijski sastav sojeva fitoplanktona (*Anabaena* sp. i *Chlorella* sp.) i larvi hranjenih TetraMin hranom, suspenzijom ćelija i suvom masom *Chlorella* sp., pekarskim kvascem i biofilterom

Svi reagensi i rastvarači, korišćeni za analizu hemijskog sastava mikroalgi i larvi, bili su *p.a.* čistoće i nabavljeni su od kompanija *Sigma-Aldrich* (Sent Luis, Mizuri, SAD), *CarlRoth* (Karlsrue, Nemačka), *Merck* (Darmštat, Nemačka). Rastvarači su predestilovani neposredno pre korišćenja, dok su ostale hemikalije upotrebljene bez prethodnog prečišćavanja.

Priprema biomase fitoplanktona i larvi

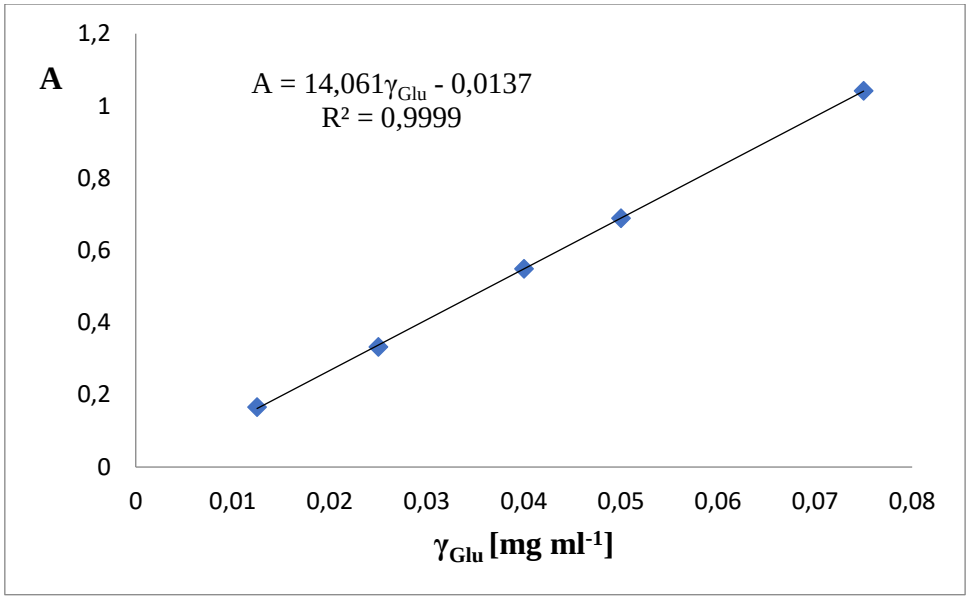
Biomasa je dobijena centrifugiranjem kultura *Chlorella* sp. i *Anabaena* sp. (4000 rpm, 10 min), isprana i zatim ponovo centrifugirana. Dobijena biomasa je sušena 24 h na 80 °C (Vargas i sar, 1998). Larve su pokupljene iz vodenog medijuma i sušene 24 h na 80 °C.

Pre analiziranja je biomasa homogenizovana, jer je homogenizacija od velike važnosti za merenja koja zahtevaju rastvaranje male količine biomase (~10 do 20 mg), kako bi alikvot biomase bio reprezentativan i predstavljao uzorak kao celinu (Laurens i sar, 2015).

Određivanje sadržaja ugljenih hidrata UV-VIS spektrofotometrijskom metodom sa fenol-sumpornom kiselinom

Sadržaj ugljenih hidrata analiziran je UV-VIS spektrofotometrijskom metodom (*UV-VIS-1800 Shimadzu* (Tokio, Japan)) sa fenol-sumpornom kiselinom, pri čemu je kao standard korišćena glukoza (Dubois i sar, 1956). Uzorci biomase (15 mg) su suspendovani 20 minuta u 50 ml vode, u ultrazvučnom kupatilu, radi pripreme suspenzije poznate koncentracije (0,3 mg/ml). Alikvoti od 2 ml su preneti u epruvete nakon čega je dodat 1 ml vodenog rastvora fenola (w/v). Zatim je dodato 5 ml koncentrovane sumporne kiseline (98%, v/v), direktno u reakcionu smešu kako bi se obezbedilo što bolje mešanje. Smeše su ostavljene da stoje 10 minuta, zatim su promešane i inkubirane na 30 °C tokom 15 minuta u vodenom kupatilu. Apsorbanca žuto-narandžastog rastvora je merena na 490 nm i poređena sa standardnom krivom, koja je dobijena snimanjem apsorbanci standardnih rastvora glukoze koji su tretirani na isti način kao i uzorak (Slika 16). Kao slepa proba korišćena je destilovana voda.

U cilju dobijanja relevantnih rezultata, postupak je ponavljan šest puta kroz šest serija merenja, nakon čega je izračunata srednja vrednost koja je korišćena za tumačenje rezultata.



Slika 16. Standardna kriva korišćena za određivanje sadržaja ugljenih hidrata (Apsorbanca (A) *vs* masena koncentracija standardnog rastvora glukoze (γGlu [mg ml^{-1}]), snimljenog na 490 nm).

Određivanje proteina metodom po *Lowry*-ju

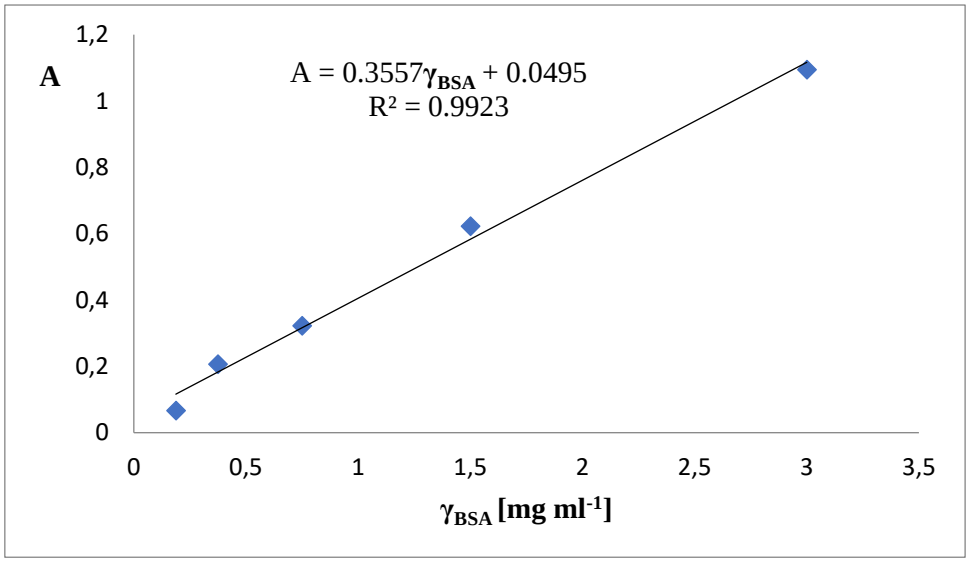
Za određivanje sadržaja proteina u uzorcima biomase korišćena je *Lowry*-jeva metoda (Lowry i sar., 1951). Ova metoda je zasnovana na poređenju apsorbance uzorka na talasnoj dužini od 550 nm sa apsorbancom standardnih rastvora proteina (*UV-VIS-1800 Shimadzu* (Tokio, Japan)), u ovom slučaju, albumina izolovanog iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*), nakon dodavanja *Folin-Ciocalteu*-ovog reagensa.

Za određivanje sadržaja proteina u biomasi, korišćeni su sledeći rastvori, pripremljeni u destilovanoj vodi:

- pufer za lizu ćelija, natrijum-fosfatni pufer (PBS, engl. *phosphate buffered saline*),
- rastvor albumina goveđeg seruma (3 mg/ml BSA u PBS-u),
- reagens A (1% vodeni rastvor $CuSO_4$, w/v),
- reagens B (2% vodeni rastvor kalijum-natrijum-tartrata, w/v),
- reagens C (2% Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH, w/v),
- reagens ABC (1 ml reagensa A, 1 ml reagensa B i 98 ml reagensa C), koji je pripremljen neposredno pre upotrebe,
- *Folin–Ciocalteu*-ov reagens (1:1, v/v, *Folin*-ov reagens/destilovana voda), koji je pripremljen neposredno pre upotrebe.

Suspenzija uzorka biomase poznate koncentracije (1 mg/ml) pripremljena je suspendovanjem 15 mg biomase u 15 ml PBS-a, 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Alikvot rastvora proteina (60 µl) i 900 µl reagensa ABC su odmereni u kiveti po *Epppendorf*-u i mešani na *Vortex*-u 25 minuta na 25 °C. Nakon toga je dodato 180 µl *Folin*-ovog reagensa i mešano je na *Vortex*-u još 20 minuta. Apsorbanca uzorka je merena na talasnoj dužini 550 nm i koncentracija izračunata uz pomoć standardne krive (slika 17). Slepa proba se pripremljena tako što je umesto uzorka biomase/standardnog rastvora proteina, korišćen PBS.

Analiza je ponovljena šest puta kroz šest serija merenja, a zatim je izračunata srednja vrednost koja je korišćena za tumačenje rezultata.



Slika 17. Standardna kriva za određivanje sadržaja proteina (Apsorbanca (A) vs masena koncentracija standardnog rastvora albumina goveđeg seruma (γ_{BSA} [mg ml^{-1}], na 550 nm).

Određivanje ukupnih lipida izraženih kao sadržaj metil-estara masnih kiselina dobijenih transesterifikacijom

Ukupni lipidi su određeni kao metil-estari mastih kiselina, prema metodologiji koju su opisali *Wychen*-a i saradnici (2015). Metil-estri masnih kiselina su dobijeni kiselom transesterifikacijom uzoraka biomase (Lepage i Roy, 1984). Oko 15 mg suve biomase suspendovano je u 3 ml smeše metanol:benzen (3:2, v:v). Kao interni standard korišćena je pentadekanska kiselina rastvorena u istoj smeši rastvarača. U reakcioni balon je dodato 50 µl pentadekanske kiseline koncentracije 10 mg ml/l, a zatim 1 ml sveže pripremljene smeše acetil-hlorid:metanol (1:20, v:v) i smeša je zagrevana do refluksa 1 sat. Nakon hlađenja do sobne temperature, rastvarači su upareni na vakuum uparivaču, a ostatak nakon uparavanja je raspodeljen između heksana i zasićenog rastvora NaCl. Vodeni sloj je dva puta ekstrahovan

heksanom. Organski slojevi su spojeni, sušeni pomoću anhidrovanog $MgSO_4$, nakon čega je je rastvarač uparen na vakuum uparivaču. Uzorak je prebačen u GC-vijalu rastvaranjem u 1 ml heksana i zatim analiziran metodom GC-MS.

Dimetilsulfid (DMDS) derivatizacija

Derivatizacija dimetildisulfida (DMDS) izvedena je da bi se potvrdila pozicija dvostruke veze u metilesterima nezasićenih masnih kiselina, po postupku koji su prethodno objavili Ilić-Tomić i saradnici (2014). Uzorci transesterifikovane biomase rastvoreni su u DMDS (0,25 ml po mg uzorka) i dodato je 0,05 ml rastvora I2 u dietil etru (60 mg ml/l) po mg uzorka. Smeša je mešana na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je dodato 5 ml Et20 po mg uzorka. Dobijena smeša je isprana vodenim rastvorom $Na_2S_2O_3$ (10%, m/m), osušena bezvodnim $MgS0_4$ i uparena do suva. Ostatak je prenet u GC-bočicu rastvaranjem u 0,5 ml dietil etra i naknadno analiziran pomoću GC-MS.

Gasna hromatografija (GC) i gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Gasno-hromatografska analiza reakcionih smeša izvršena je za svaki uzorak u triplikatu na *HP 6890N* gasnom hromatografu (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, Kalifornija, SAD), koji je bio direktno kuplovan sa *HP 5975B* masenim detektorom iste kompanije. Gasni hromatograf je bio opremljen kapilarnom kolonom HP-5MS ili DB-5MS (95% dimetil-, 5% difenil-polisiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm; *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Režim rada GC-MS-a je bio sledeći: temperature injektora i detektora su održavane na 250 °C i 320 °C; temperatura peći programirana je linearno od 70 do 315 °C brzinom od 5 °C/min, nakon toga je temperatura održavana 10 min na 315 °C; kao noseći gas korišćen je helijum, čiji je konstantni protok održavan na 1,0 ml/min; injektiran je 1 μl rastvora uzorka u heksanu bez *split*-ovanja. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV. Pun sken masenog detektora beležen je u intervalu *m/z* 35-750 (brzina skeniranja 5 skenova u sekundi), a vreme skeniranja bilo je 0,32 sekunde. Obrada TIC (engl. ***t**otal **i**on **c**urrent* –totalna jonska struja) hromatograma vršena je u programu *MestReNova* (ver. 6.0.2-5475, *Mestrelab Research S.L.*, *Santiago de Compostela*, Španija).

Podaci su obrađeni pomoću *MSD ChemStation* softvera (ver. D.03.00.611, *Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD) u kombinaciji sa programskim paketima *AMDIS Version 2.68* (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) i *NIST MS Search Version 2.0d* (*National Institute of Standards and Technology* - Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gejtersburg, Merilend, SAD). *AMDIS* je korišćen za dekonvoluciju

masenog skena, tj. ekstrakciju masenih spektara iz skenova preklopljenih pikova, dok je *NIST MS Search* obezbedio algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara.

Procentualni sastav metil-estara masnih kiselina je određen integraljenjem površine pikova u hromatogramima bez korišćenja korekcionih faktora. Kvalitativna analiza izvršena je na osnovu: (1) poređenja linearnih retencionih indeksa pojedinih sastojaka, izračunatih u odnosu na retenciona vremena ko-injektiranih homologa serije *n*-alkana C_{16}-C_{24} (Van den Dool i Kratz, 1963) sa literaturnim vrednostima, (2) poređenjem masenih spektara sa masenim spektrima standarda, kao i masenim spektrima iz biblioteka *Wiley Registry: Mass Spectral Library, 10th Edition / NIST 2014*; (3) analize fragmentacionih šablona u masenim spektrima; (4) ko-injektiranjem standarda, gde god je to bilo moguće.

3.8. Ispitivanje uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve na osnovu OECD protokola broj 218

U okviru eksperimenta ispitivanja uticaja cijanobakterijskog soja *Anabaena* sp. i zelene mikroalge *Chlorella* sp., definisana su dva tretmana kojima su tretirane larve i jedan kontrolni tretman. Tretmani su:

1. suspenzija toksičnog soja cijanobakterije *Anabaena* sp.,
2. suspenzija soja zelenih mikro algi *Chlorella* sp.,
3. kontrolni tretman komercijalnom hranom za akvarijumske ribice TetraMin.

Princip i postavka eksperimenta

Eksperiment je izveden pod laboratorijskim uslovima prateći protokol OECD 218 (OECD, 2004). Za eksperiment su korišćene staklene tegle zapremine 700 ml i dijametra 8 cm. Eksperiment je trajao 12 dana. Svaka tegla je u sebi imala sloj sedimenta od kvarcnog peska dubine 3 cm i 400 ml mešavine vode sa česme i destilovane vode (odnos 1:1). Tegle sa sedimentom su prethodno sterilisane u suvom sterilizatoru (VimS elektrik SSW 120, Srbija) na temperaturi od 180 °C u trajanju od 60 minuta, i zatim stavljene u izotermalnu komoru na temperaturi od 23 ± 1 °C. Eksperiment je sproveden u uslovima svetlo-mrak u odnosu 16:8 h. Tretmani (*Chlorella* sp. i *Anabaena* sp.) i kontrole su sačinjeni od po 8 replikata tegli, u svakoj po 25 larvi *C. riparius* prvog stupnja razvoja. Larve su hranjene svakih 48 h do kraja eksperimenta sojevima *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. Kontrolne larve su hranjene TetraMin® hranom za ribice. Aeracija je bila sprovedena u tegle 24 h nakon stavljanja larvi u tegle, u vidu tankih plastičnih cevi fiksiranih na oko 2 cm iznad sloja sedimenta.

Validnost testa

- Kriterijumi koji moraju biti zadovoljeni kako bi testiranje bilo validno su prethodno opisani (poglavlje 4.6.).

Mortalitet i masa larvi

Mortalitet i rast (masa) larvi su određeni u cilju testiranja podobnosti cijanobakterijskog soja *Anabaena* sp. i soja zelenih mikroalgi *Chlorella* sp. kao izvora hrane larvi *C. riparius*. Ukupan broj preživelih larvi je utvđen na kraju eksperimenta u cilju određivanja stope mortaliteta. Kako bi izmerili mokru masu larvi, 10 jedinki iz svake tegle je sušeno na filter papiru u trajanju od 5 minuta, nakon čega su merene na anlitičkoj vagi (Kern, Nemačka).

Koncentracija hemoglobina u hemolimfi larvi

Za određivanje koncentracije hemoglobina u hemolimfi larvi je korišćena fotometrijska metoda (Yang i sar., 2013) na hematološkom analizatoru (Medonic M16M/M20M, Švedska). Testiranje je izvršeno na živim larvama četvrtog stupnja njihovom dekapitacijom i ekstrakcijom hemolimfe iz njihovog tela pomoću kapilarnih cevčica. Koncentracija hemoglobina je automatski izražena na analizatoru u jedinici g/l hemolimfe.

Oksidativni stres

Ispitivanje oksidativnog stresa kod larvi *C. riparius* je rađeno merenjem četiri različita biomarkera: koncentracija TBARS, koncentracija AOPP, aktivnosti SOD i aktivnosti KAT.

Po 10 larvi iz svake tegle, prethodno izmerenih na analitičkoj vagi, je uzeto za analizu nakon 12 dana eksperimenta. Larve su homogenisane 30 sekundi u 2,5 ml Tris-EDTA puferu (40 mM, pH 7.8; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pomoću homogenizatora (IKA® Works de Brasil Ltd. Taquara, RJ 22713-00). Dobijeni homogenizat je centrifugiran 15 minuta na 500 g (4 °C), zatim je supernatant prebačen u novu ependorficu i centrifugiran 10 minuta na 12,000 g (4 °C). Dobijeni supernatant (postmitohondrijalna frakcija) je korišćena za merenje nivoa produkata oksidativne modifikacije i enzimske aktivnosti. Koncentracija proteina je određena po ranije pomenutoj metodi (Lowry i sar., 1951) koristeći goveđi serum albumin kao standard.

Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS)

Ispitivanje lipidne peroksidacije je vršeno merenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) po standardnoj metodi (Andreeva i sar., 1988). Produkt reakcije roze hromogen nastaje reakcijom malondialdehida (MDA) i tiobarbiturne kiseline (TBA), na visokoj temperaturi i kiseloj sredini, a intenzitet boje meri se spektrofotometrijski (Multiscan Ascent 96/384 plate reader, Thermo Labsystems) na 532 nm. Koncentracija TBARS je određena koristeći molarni ekstinkcioni koeficijent od 1.56 x 105 M− 1 cm− 1 a rezultati izraženi u μmol/l su zatim konvertovani i izraženi u μmol/mg proteina.

Određivanje koncentracije produkata oksidacije proteina (AOPP)

Koncentracija AOPP je određena spektrofotometrijskom metodom (Witko-Sarsat i sar., 1996). Kalibracija je izvršena koristeći rastvor hloramina T, koji apsorbuje svetlost na $\lambda = 340$ nm u prisustvu kalijum jodida. Rezultati su preračunati i zatim izraženi u μmol/l hloramin-T ekvivalenata u odnosu na ukupan nivo proteina (μmol/mg proteina).

Određivanje aktivnosti katalaze (KAT)

Aktivnost katalaze je određena spektrofotometrijskom metodom (Goth, 1991), zasnovanom na sposobnosti katalaze da razloži supstrat (H_2O_2), pri čemu se enzimska reakcija zaustavlja dodavanjem amonijum molibdata. Ovom reakcijom nastaje žuti kompleks H_2O_2 i molibdata koji se meri na 405 nm u odnosu na slepu probu. Enzimska aktivnost je izražena u U/l, a zatim konvertovana i izražena u U/mg proteina.

Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost enzima superoksid dismutaze je određena metodom koja je zasnovana na formiranju produkata obojenih formazanom (Minami i Yoshkawa, 1979). U reakciji sa nitroplavo tetrazolijumom (NBT) anjoni superoksida, produkovanih autooksidacijom pirogalola formiraju obojene produkte. Superoksid dismutaza inhibira reakciju. Enzimska aktivnost je izražena u U/l a zatim konvertovana i izražena u U/mg proteina. Jedna jedinica superoksid dismutazne aktivnosti je definisana kao količina koja izaziva 50% inhibicije stope fotoredukcije NBT.

DNK oštećenja – kometa test

Da bi smo odredili da li cijanobakterije i zelene alge mogu izazvati oštećenja DNK u somatskim ćelijama, za ispitivanje su korišćene larve *C. riparius* četvrtog stupnja razvoja.

Fosfatni pufer (PBS) bez kalcijuma i magnezijuma, agaroza za DNK elektroforezu i nisko-otapajuća agaroza (LMA) su obezbeđeni od strane Alfatrade Enterprise D.O.O. (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Četrdeset larvi *C. riparius* četrvtog stupnja razvoja iz svakog od četiri tretmana, a to su negativna kontrola, pozitivna (H_2O_2, 20 mM, Bernabò i sar., (2017)), *Chlorella* sp., i *Anabaena* sp. su prebačene u Eppendorf tube, homogenizovane, filtrirane i resuspendovane u 3 ml pufera (1× PBS, 20 mM EDTA, 10% DMSO, pH 7.4). Nakon centrifugiranja od 15 minuta na 1500 rpm na 4 °C (Eppendorf centrifuga 5415 R) homogenat je resuspendovan u 150 µl pufera. Iz ćelijske suspenzije je uzeto 10 µl i pomešano sa 75 ml 1% LMA, nakon čega je 75 µl ove mešavine naneto na mikroskopsko predmetno staklo. Kako bi procenili genotoksični potencijal cijanobakterije *Anabaena* sp. i zelene mikroalge *Chlorella* sp. obim DNK oštećenja u larvama je meren kod netretiranih larvi, koje predstavljaju negativnu kontrolu, i ćelije larvi tretiranih sa 20 mM H_2O_2, što je predstavljalo pozitivnu kontrolu.

Kometa test je izveden po protokolu napisanom od strane Singh-a i saradnika (1988), koji je u manjoj meri modifikovan (Bernabò i sar., 2017). Predmetnice su obojene etidijum bromidom (10 minuta u mraku) i analizirane pod Nikon (Ti-Eclipse) fluorescentnim mikroskopom povezanim sa CCD (charge-coupled device) kamerom. DNK oštećenja indukovana sojevima *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. su vizuelno ocenjena (Collins, 2004), a komete klasifikovane u pet kategorija (0 do 4). Ukupni kometa rezultat je određen po sledećoj jednačini (Miyaji i sar., 2004): (% ćelija u klasi 0 × 0) + (% ćelija u klasi 1 × 1) + (% ćelija u klasi 2 × 2) + (% ćelija u klasi 3 × 3) + (% ćelija u klasi 4 × 4). Ukupni rezultat je rangiran od 0 (sve neoštećene ćelije) do 400 (sve maksimalno oštećene ćelije).

3.9. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa i testiranje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora

3.9.1. Ispitivanje akutne toksičnosti izabranih stresora na larve *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 235

Kako bi se odredile letalne koncentracije odabranih stresora po larve *C. riparius*, testiranje je izvršeno prema OECD 235 protokolu „*Chironomus* sp. akutni imobilizacioni test“. Navedeni protokol je dizajniran kako bi upotpunio OECD protokole 218, 219 i 233 za testiranje hronične toksičnosti hemijskih agenasa na hironomidama. Metodologija je zasnovana na osnovu protokola 202: *Daphnia* sp., akutni imobilizacioni test.

Na osnovu pregledane literature (Waycott i sar., 2009; Romero i sar., 2006; Short i Wyllie-Echeverria, 1996) utvrđeno je da do eutrofnih uslova u vodenim ekosistemima najčešće dovode organska zagađenja (amonijak), neorganska (nitrati i fosfati) i toksična zagađenja (teški metali). Kako bi simulirali zagađenje vode u laboratorijskim uslovima, korišćeni su rastvori nitrata, amonijumovih jona, fosfata i kadmijuma (tabela 6). Test organizam koji je korišćen u ispitivanjima za izradu ove disertacije preferira eutrofne uslove, ali i sam može biti stresiran uzročnicima eutrofikacije zbog čega je bilo potrebno odrediti letalne koncentracije korišćenih stresora na larve *C. riparius*.

Tabela 6. Soli korišćene za pripremu rastvora jona prilikom ispitivanja letalnih koncentracija stresora za larve *C. riparius*

Soli	Koncentracije ispitivanih jona
$NaNO_3$	0,5; 1; 2; 4; 8 g/l
$(NH_4)_2S_2O_8$	0,25, 0,5; 1; 2; 4; 8 g/l
K_2HPO_4	0,5; 1; 2; 4; 8 g/l
$CdCl_2 \cdot 2H_2O$	1; 2; 4; 8; 16 mg/l

Na isti način vršeno je testiranje uticaja cijanotoksina mikrocistin-LR (prečišćeni analitički standard), da bi se ustanovilo da li postoji letalalni efekat po larve *C. riparius* kada se primeni u određenim koncentracijama. Koncentracije koje su primenjene u testiranju su takođe određene na osnovu literature, odnosno već zabeleženih koncentracija ovog toksina u slatkovodnim ekosistemima. Primenjene su koncentracije od 1, 5 i 10 µg/l.

Princip i postavka eksperimenta

Larve prvog stupnja razvoja *C. riparius* se izlažu različitim koncentracijama testiranih supstanci u posudama sa vodom u kojoj se nalazi samo supstanca koja se ispituje u periodu od 48 sati. Imobilizacija se beleži nakon 24 i 48 sati. Polovina efektivne koncentracije (EC_{50}) se računa nakon 24 i 48 sati. Test je rađen u tri ponavljanja pri čemu su rezultati prezentovani kao srednja vrednost koja je korišćena za dalji rad.

Validnost testa

Kako bi testiranje bilo validno, sledeći kriterijumi moraju biti zadovoljeni:

1) u kontrolama, uključujući kontrole rastvarača ukoliko se koriste, ne sme biti više od 15 procenata larvi koje su imobilisane ili pokazuju neke druge znakove stresa (abnormalno ili neobično ponašanje, kao što je zarobljenost na površini vode) na kraju testa;
2) koncentracija rastvorenog kiseonika na kraju testa bi trebalo biti ≥ 3 mg/l u posudama sa kontrolama i testiranim supstancama.

3.9.2. Ispitivanje interakcije toksičnog efekta cijanotoksina mikrocistin-LR i stresora na larve *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 235

Za ispitivanje interakcije toksičnog efekta agenasa, toksina mikrocistin-LR i stresora (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-} i Cd^{2+}), rađeno je testiranje u trajanju od 48 h. Testiranje je izvedeno po protokolu OECD 235 (Akutni imobilizacioni test). Za potrebe izvođenja eksperimenta korišćene su sterilne plastične čaše zapremine 50 ml, u koje su sipani pripremljeni rastvori određene koncentracije, i larve *C. riparius* prvog stupnja razvoja. Testirane supstance i njihove koncentracije su: PO_4^{3-} (0,87224 g/l), NO_3^- (0,40169 g/l), NH_4^+ (79,68786 mg/l), kadmijum (2,08174 mg/l), i mikrocistin-LR (10 µg/l).

Princip i postavka eksperimenta

Četiri dana pre dodavanja larvi prvog stupnja u posude, nekoliko svežih paketa jaja je izvađeno iz rojilice i stavljeno u posebne petri kutije sa vodom. Dva dana nakon postavljanja paketa jaja u petri kutije su se larve izlegle u prisustvu hrane TetraMin. Za eksperiment su korišćene larve prvog stupnja (Slika), iz nasumično izabrane petri posude. Tokom testiranja od 48 h larve nisu hranjene. Međutim, hranjenje larvi pre izlaganja toksičnim agensima (direktno nakon izleganja) je važno kako bi se osiguralo preživljavanje $\geq$ 85% larvi u kontrolama na kraju perioda izlaganja. U svrhu hranjenja larvi korišćen je filtrat suspenzije TetraMin hrane za akvarijumske ribice, u količini od 0,5 mg po larvi.

Kako larve ne bi bile zarobljene na površini vode i samim tim im bilo onemogućeno da uđu u vodeni stub test posude, stavljanje larvi je izvršeno pasterovim pipetama ispod površine vode. U test posude je pripremljeno po 20 ml odgovarajućeg rastvora i u svaku od posuda stavljeno po 10 larvi, kako ±bi se obezbedilo po 2 ml testiranog rastvora po larvi.

Svaki test tretman je rađen u triplikatu. Osim testiranih rastvora u triplikatu je postavljena i kontrola, odnosno voda u kojoj su pravljeni testirani/diluirani rastvori. U tri posude je stavljeno po 20 ml vode i introdukovano po 10 larvi u svaku od njih.

Test je izveden na sobnoj temperaturi 20 °C ± 1 i sa dnevno-noćnim režimom 16:8 sati (svetlost:tama), pri intenzitetu svetla od 700 lux. Test posude su postavljene u nasumičnom rasporedu. Nakon 24 h je izvršena provera da li ima imobilisanih larvi, dok je eksperiment završen nakon 48 h. Larve koje nisu vršile nikakve pokrete u roku od 15 sekundi nakon mehaničke stimulacije (kapima vode iz pasterove pipete ili agitacijom test posude) su smatrane imobilisanim. Provera i brojanje imobilisanih larvi je izvršeno pomoću binokularne lupe. Imobilisanost, odnosno nepokretnost, se u ovom testu koristi kao parametar za letalnost jer je nju teško ustanoviti kod larvi prvog stupnja razvoja.

Validnost testa

Kriterijumi koji moraju biti zadovoljeni kako bi se testiranje smatralo validnim su prethodno opisani (poglavlje 3.9.1.).

3.10. Ispitivanje hroničnog efekta toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *C. riparius* u multistres uslovima, na osnovu OECD protokola broj 218

Cilj ovog eksperimenta je bio utvrditi hronični efekat soja *Anabaena* sp. na larve *C. riparius* u prisustvu 4 različita stresora čije su efektivne koncentracije određene u prethodnom eksperimentu, na osnovu poređenja sa efektima kontrolne netoksične hrane u prisustvu istih stresora.

U eksperimentu je pored dve kontrole (negativna kontrola je voda sa TetraMin-om i pozitivna kontrola voda sa sojem *Anabaena* sp.) postavljeno 8 tretmana:

1) NH_4^+ i TetraMin;
2) NH_4^+ i *Anabaena* sp.;
3) PO_4^{3-} i TetraMin;
4) PO_4^{3-} i *Anabaena* sp.;
5) NO_3^- i TetraMin;
6) NO_3^- i *Anabaena* sp.;
7) kadmijum i TetraMin;
8) kadmijum i *Anabaena* sp.

Priprema rastvora

Priprema osnovnih rastvora NH_4^+, NO_3^-, PO_4^{3-} i Cd^{2+} jona izvršena je korišćenjem sledećih soli: NH_4Cl, $NaNO_3$, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ i $CdCl_2 \cdot H_2O$, odmeravanjem tačnih masa pomoću analitičke vage (Kern, Nemačka) sa preciznošću ± 0,0001 g. Osnovni rastvori NH_4^+, NO_3^-, PO_4^{3-} jona su pripremljeni u normalnim sudovima zapremine 500 mL, rastvaranjem odmerenih masa soli (11,8889 g NH_4Cl, 5,4838 g $NaNO_3$ i 5,8105 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) u dejonizovanoj vodi. Osnovni rastvor Cd^{2+} jona napravljen je u normalnom sudu zapremine 250 ml rastvaranjem 0,0224 g odgovarajuće soli pomoću dejonizovane vode. Koncentracija osnovnih rastvora NH_4^+, NO_3^-, PO_4^{3-} bila je 8 g/l, dok je koncentracija rastvora Cd^{2+} jona bila 50 mg/l.

Princip i postavka eksperimenta

Dizajn eksperimenta je urađen prema protokolu OECD testa broj 218, koji služi za procenu efekata dugoročne izloženosti larvi štetnim supstancama u sedimentu (eng. Sediment water chironomid toxicity test using spiked sediment) (OECD, 2016). Prema pomenutom protokolu, potrebno je da stopa preživljavanja (P) u kontrolama bude veća od 70%, kako bi

eksperiment bio validan. Postupak postavke eksperimenta je ranije opisan u odeljku (Ispitivanje prehrane larvi *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 218). U teglama su pripremljeni rastvori određenih koncentracija (Tabela 7), dok je svaki tretman rađen u triplikatu.

Tabela 7. Prikaz stresora i njihovih koncentracija.

Stresori	**Koncentracija (mg/l)**
NH_4^+	39,84
PO_4^{3-}	435,00
NO_3^-	200,00
Kadmijum	1,04

Validnost testa

Kriterijumi koji moraju biti zadovoljeni kako bi se testiranje smatralo validnim su prethodno opisani (poglavlje 3.6.).

3.10.1. Analize hroničnog efekta soja *Anabaena* sp. na larve *C. riparius* u multistres uslovima na subletalnom nivou

Ispitivanje hroničnog efekta toksičnog soja *Anabaena* sp. na *C. riparius* larve u multistres uslovima je obuhvatilo analize mortaliteta, rasta, koncentracije hemoglobina u hemolimfi i DNK oštećenja ćelija larvi korišćenih u eksperimentu. Metodologija navedenih analiza je prethodno opisana (poglavlje 3.8.1.).

3.11. Statističke analize podataka

Pre ispitivanja statistički značajnih razlika u analiziranim parametrima po grupama, vršeno je testiranje normalnosti i homogenosti varijanse skupova podataka pomoću nekog od testova normalnosti (Kolmogorov-Smirnov10 sa Lilliefors korekcijom značajnosti, Shapiro-Wilk ili Levene, $p<0,05$). U slučajevima da je p vrednost testa normalnosti veća od 0,05 (podaci sa normalnom raspodelom) vršene su parametarske analize varijansi (jednofaktorska analiza varijansi, eng. One-Way ANOVA); u slučaju kada je p vrednost ispod 0,05 (analizirani podaci značajno odstupaju od normalne distribucije) korišćene su neparametarske alternative parametarskih analiza (Kruskal-Wallis-ov test). Ukoliko je dokazana opšta razlika između grupa, izvođeni su *post hoc* testovi, kako bi se utvrdilo između kojih grupa postoje značajne razlike. Za *post hoc* poređenje primenjeni su Tukey HSD, LSD ili Mann-Whitney test, pri čemu je nivo značajnosti postavljen na $p<0.05$ (Karadžić i Marinković, 2009) sa Bonferoni korekcijom (čime se nivo značajnosti određuje deljenjem vrednosti 0.05 brojem tretmana). Korelaciona analiza izvršena je pomoću parametarskog Pearson korelacionog testa. Svi navedeni statistički testovi su korišćeni pomoću dva statistička paketa: "IBM SPSS", verzije 19.0.0 za Windows operativni sistem (IBM, 2010) ili "Statistica", verzije 7.0 za Windows operativni sistem (Stat Soft, 2004).

Rezultati **testiranja različitih režima ishrane na rast i razviće larvi *C. riparius*** su analizirani tako što je ukupna masa jedinki i stopa preživljavanja testirana analizom varijansi (ANOVA) dok je za *post hoc* testiranje razlika između grupa korišćen LSD test. Za testiranje ostalih morfometrijskih parametara primenjena je neparametarska analiza varijansi (Kruskal-Wallisov test). Za pojedinačna poređenja tretmana korišćen je Mann-Whitney test i izvršena Bonferonijeva korekcija praga značajnosti.

Nakon **ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa** dobijene vrednosti su analizirane pomoću Wilcoxon neparametarskog testa, radi ispitivanja vremenski zavisne toksičnosti. Dozno zavisna toksičnost je ispitana Kruskal-Wallis testom.

Dobijeni rezultati **ispitivanja uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve** su analizirani tako što su svi biomarkeri vezani za rast larvi, oksidativni stres i oštećenje DNK analizirani na normalnost i homogenost koristeći Kolmogorov-Smirnov (sa Lilliefors korekcijom značajnosti) statistiku i testirani za svaku značajnu razliku pomoću ANOVA (jedan faktor varijabiliteta), koja je praćena LSD *post hoc* testom za poređenje rasta, oksidativnog

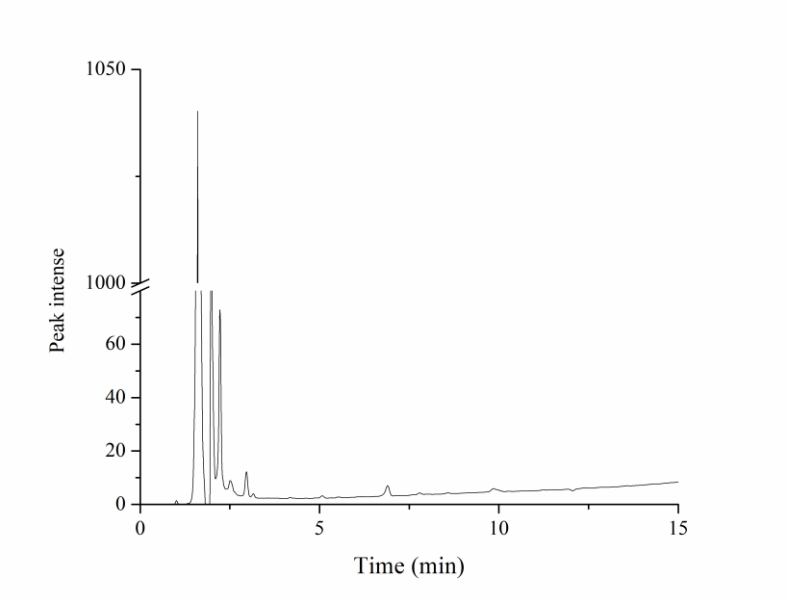
stresa, i parametara DNK oštećenja. Nivo značajnosti je podešen na $p<0.05$. Pošto je set podataka za koncentraciju hemoglobina sastavljen od dve grupe, statistička razlika je testirana Studentovim t-testom. Pirsonova korelacija je korišćena za ispitivanje odnosa između AOPP koncentracije i aktivnosti enzima KAT i SOD.

Rezultati stope preživljavanja nakon ispitivanja **hroničnog efekta toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *Chironomus riparius* u multistres uslovima** su testirani analizom varijansi (ANOVA) koja je praćena posthoc Kruskal-Wallis testom. Ukupna masa larvi i koncentracija hemoglobina su analizirani testom ANOVA, koja je praćena *post hoc* Tukey HSD testom. Za analizu razlika u DNK oštećenju (repa komete) somatskih ćelija testiranih grupa larvi, korišćen je Mann-Whitney test.

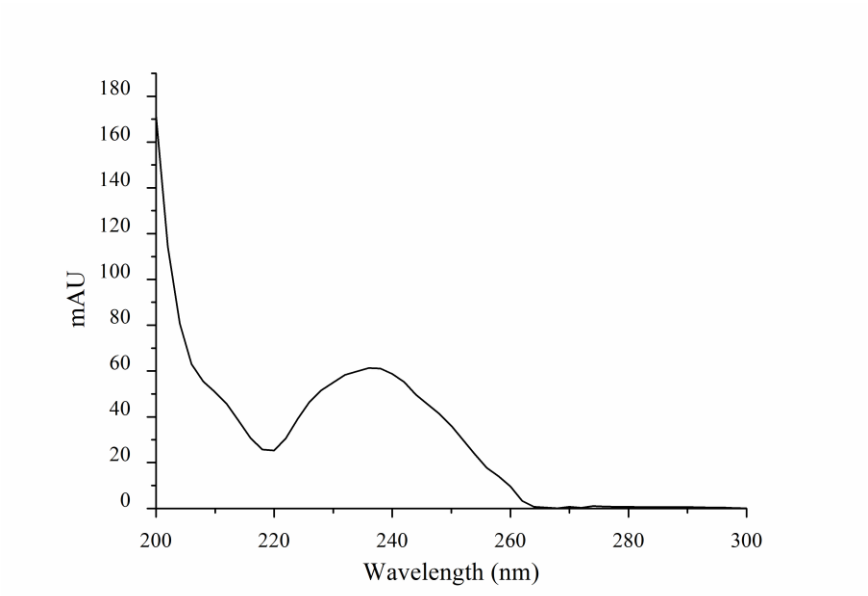
4. REZULTATI

4.1. Detektovanje toksina u soju cijanobakterije *Anabaena* sp.

Koristeći HPLC-DAD tehniku, toksin mikrocistin-LR je identifikovan i kvantifikovan u metanolnom ekstraktu soja *Anabaena* sp. UV spektar za svaku odvojenu frakciju dobijen u HPLC hromatogramu (slika 18) ekstrakta je validiran a MC-LR varijanta identifikovana na osnovu karakterističnog UV spektra (maksimalna apsorpcija na 238 nm) i poređenja sa karakterističnim retencionim vremenom (6.893 min) na hromatogramu MC-LR standarda (slika 19).

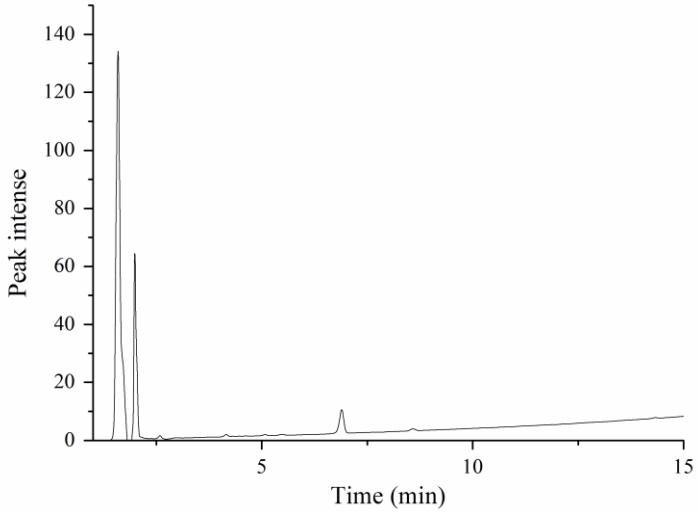


Slika 18. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta *Anabaena* sp.



Slika 19. Karakterističan UV spektar toksina mikrocistin-LR

Mikrocistin-LR je kvantifikovan na osnovu pikova u hromatogramima standardnih rastvora i uzoraka (Slika 20). Izmerena je koncentracija mikrocistina-LR od približno 1,9 µg/g suve mase cijanobakterija *Anabaena* sp. Dobijeni rezultati ovog ispitivanja ukazuju da je testirani soj *Anabaena* sp. producent hepatotoksina mikrocistin-LR.



Slika 20. HPLC hromatogram standardnog rastvora mikrocistin-LR

4.2. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR

4.2.1. Antimikrobna aktivnost cijanotoksina mikrocistin-LR

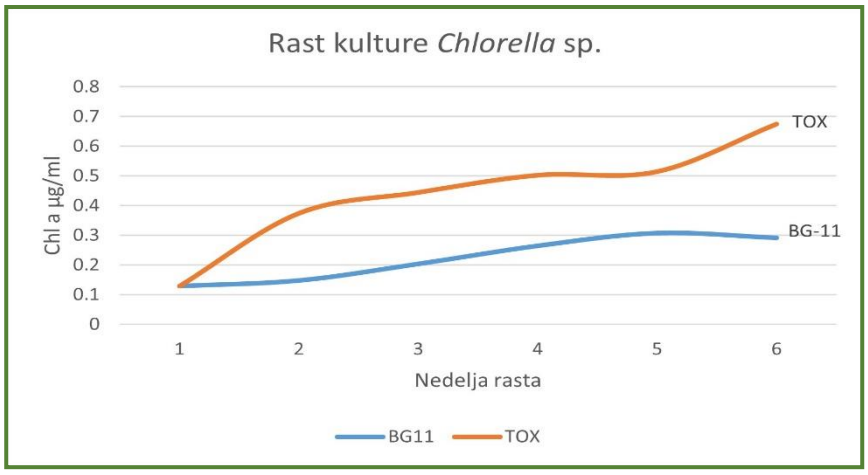
U tretmanima koji su pokrivali opseg koncentracija cijanotoksina MC-LR, od najviše 10 µg/l do najniže 0.078 µg/l, nije bilo antimikrobne aktivnosti ni na jednom od testiranih sojeva mikroorganizama (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, izolat *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715), odnosno MC-LR nije inhibirao njihov rast. Odsustvo inhibicije rasta testiranih sojeva je rezultovalo zamućenjem podloge u svim mikrotitar bunarićima gde su primenjene različite koncentracije čistog toksina, definisane u tretmanima. Rast je inhibiran samo u kontrolnim bunarićima gde su primenjena razređenja antibiotika.

4.2.2. Ispitivanje uticaja cijanotoksina mikrocistin-LR na rast zelene mikroalge *Chlorella* sp.

Kultivacija soja *Chlorella* sp. u prisustvu MC-LR je pokazala da cijanotoksin ispoljava određeni efekat na rast fitoplanktona (slika 21).

Nakon 7 dana kultivacije uočeno je da kultura *Chlorella* sp., kultivisana u prisustvu MC-LR, ima nagli rast, zabeležen merenjem na spektrofotometru u poređenju sa kultivacijom u kontrolnim uslovima. Od treće nedelje kultivacije u prisustvu toksina zabeležen je postepeni rast kulture, dok je maksimalna koncentracija hlorofila a (0,674 µg/ml) zabeležena nakon pet nedelja kultivacije.

Soj *Chlorella* sp. koji je kultivisan u kontrolnim uslovima je od početka kultivacije imao postepen rast, da bi maksimalnu koncentraciju hlorofila a (0,308 µg/ml) postigao nakon četiri nedelja kultivacije. Rast soja *Chlorella* sp. je bio duplo veći u prisustvu MC-LR.

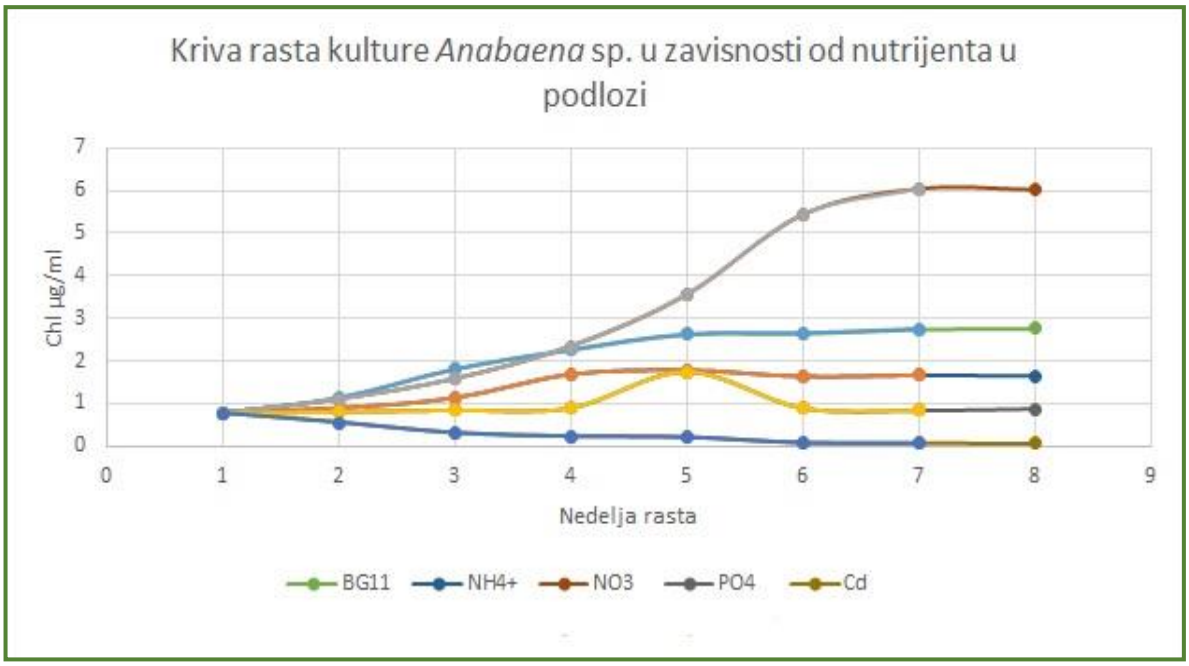


Slika 21. Spektrofotometrijsko poređenje rasta soja *Chlorella* sp. u prisustvu toksina mikrocistin-LR, u odnosu na rast istog soja u podlozi bez toksina. Rast očitavan na osnovu koncentracije hlorofila a.

4.3. Uticaj stresora na rast fitoplanktona

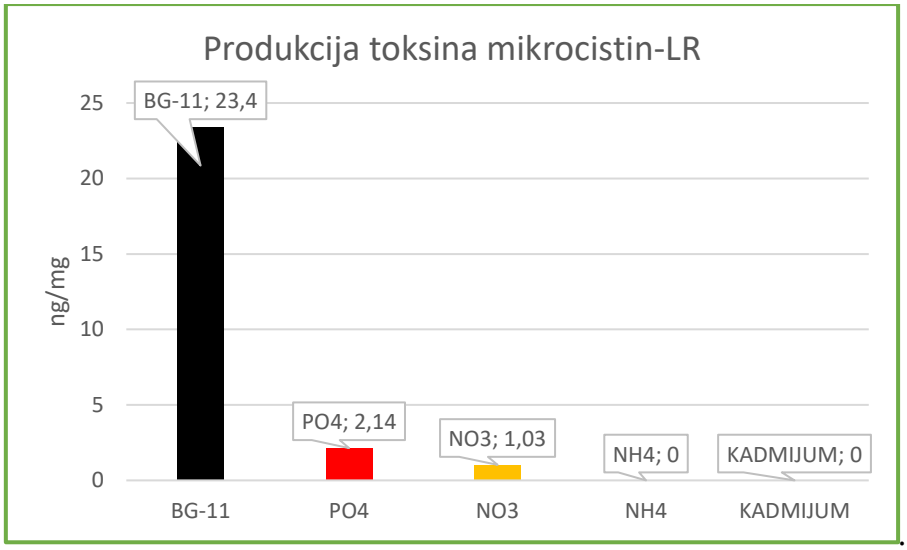
4.3.1. Uticaj stresora na rast i produkciju toksina soja *Anabaena* sp.

Tokom perioda od 7 nedelja je ispitivan uticaj nitrata, amonijuma, fosfata i kadmijuma na rast i produkciju toksina MC-LR kod soja *Anabaena* sp. Rast kultura je određen na osnovu preračunavanja količine *hlorofila a*, u medijumima u kojima su kulture kultivisane. Na osnovu merenja utvrđeno je da je najviše hlorofila a (6,03 µg/ml) produkovano u prisustvu NO_3^- i to nakon 6 nedelja kultivacije (slika 22). Kultivacijom soja *Anabaena* sp. u standardnim uslovima (BG-11 bez azota), koja je služila kao kontrola, je nakon šest nedelja konstatovana koncentracija hlorofila a od 2,77 µg/ml. Najviše vrednosti hlorofila a kultivacijom u prisustvu NH_4^+ i PO_4^{3-} su postignute nakon 42 dana kultivacije (1,67 µg/ml i 0,88 µg/ml, respektivno). Koncentracija hlororfila a je u prisustvu kadmijuma počela da pada već od prve nedelje kultivacije.



Slika 22. Krive rasta kulture *Anabaena* sp. u zavisnosti od koncentracije nutrijenata u podlozi.

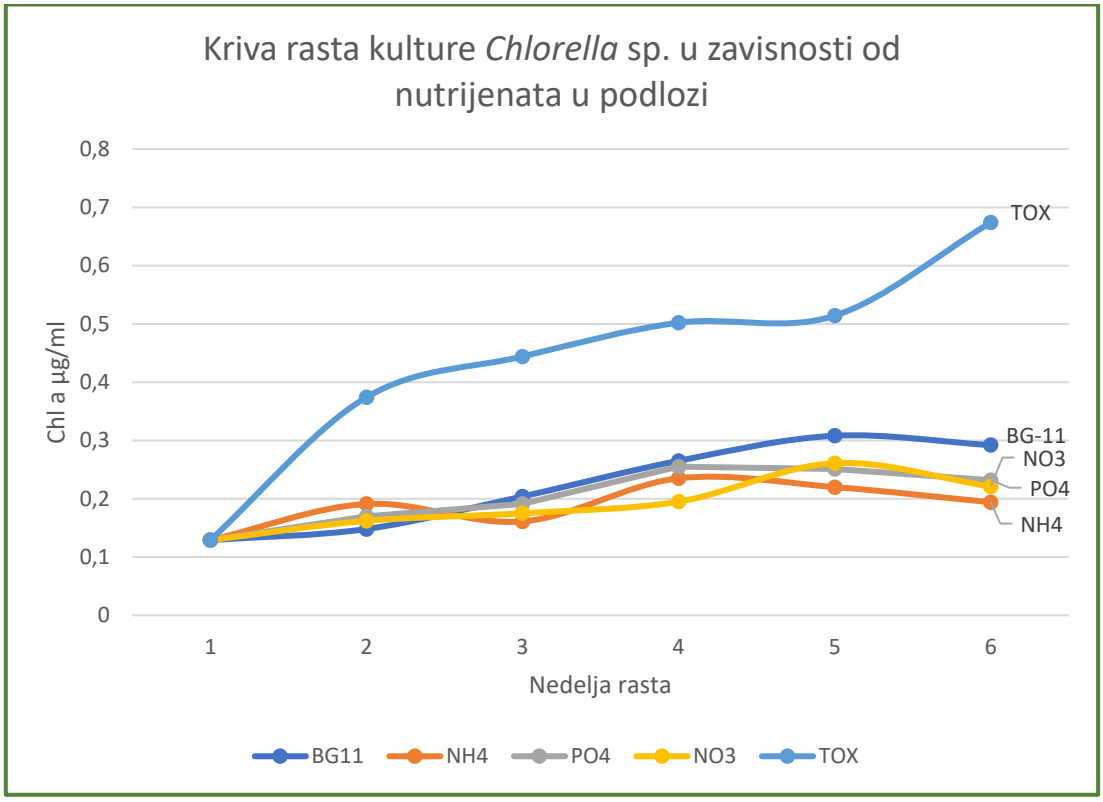
Analizom ekstrakata biomase kulture, pripremanih 42. dana kultivacije, iz svih medijuma u kojima je *Anabaena* sp. kultivisana, utvrđeno je da je najviše toksina MC-LR (23,4 ng/mg suve mase) produkovano u standardnim uslovima kultivacije, u BG-11 podlozi bez prisustva azota (slika 23). U prisustu PO_4^{3-} i NO_3^- je soj *Anabaena* sp. produkovao toksin u značajno nižim koncentracijama (2,14 ng/mg i 1,03 ng/mg, respektivno), dok u prisustvu NH_4^+ toksin nije detektovan. Kultivacijom u prisustvu kadmijuma nije bilo porasta kulture, pa samim tim ni produkovanog toksina.



Slika 23. Produkcija cijanotoksina mikrocistin-LR u multistres uslovima. Koncentracija je prikazana u ng/mg suve mase soja *Anabaena* sp. u prisustvu svakog stresora ponaosob

4.3.2. Uticaj stresora na rast soja *Chlorella* sp.

Ispitivanjem uticaja stresora, u već navedenim koncentracijama (4.3.) utvđeno je da je MC-LR stimulisao rast soja *Chlorella* sp., dok su ostali stresori inhibirali rast kulture (Slika 24).



Slika 24. Krive rasta kulture *Chlorella* sp. u zavisnosti od koncentracije nutrijenata u podlozi.

Kultivacijom u standardnoj BG-11 podlozi, soj *Chlorella* sp je najveći rast imao nakon četiri nedelje kultivacije (Chl a 0,308 µg/ml), nakon čega je ta vrednost počela da pada. U prisustvu MC-LR, kod soja *Chlorella* sp. je najveća koncentracija hlorofila a od 0,674 µg/ml zabeležena posle pet nedelja kultivacije, nakon čega koncentrantracija hlorofila a nije više merena. Kultivacijom u prisustvu NO_3^-, PO_4^{3-} i NH_4^+ su najveće koncentracije hlorofila a zabeležene posle četriri nedelja kultivacije (0,261, 0,251 i 0,220 µg/ml, respektivno), nakon čega je kriva počela da pada.

Rezultati ispitivanja ukazuju da je jedino MC-LR imao stimulativno dejstvo, dok su ostali stresori (NO_3^-, PO_4^{3-} i NH_4^+) delovali inhibitorno na rast soja *Chlorella* sp, u odnosu na kontrolne uslove kultivacije.

4.4. Testiranje različitih režima ishrane na rast i razviće larvi *C. riparius* na osnovu OECD protokola broj 218

Eksperiment u kojem je ispitan efekat različitih tipova hrane na rast i razviće larvi *C. riparius* je završen četrnaestog dana i okarakterisan kao uspešan, jer su rezultati kontrole prošli validaciju (stopa preživljavanja (P=pa vrednost) je bila veća od 70%). Rezultati jednofaktorske analize varijansi – ANOVA su pokazali da nije bilo značajne razlike u stopi preživljavanja (P) između kontrole i tretmana (p>0,05) (Tabela 8). Sve larve u tretmanu sa suvom masom *Chlorella* sp. je preživelo (P=100%).

Tabela 8. Prikaz preživelih larvi u zavisnosti od tretmana.

Tretman (tip hrane)	Replikat	Broj preživelih larvi	Prosečan broj preživelih larvi po tretmanu	% preživljavanja po tretmanu
Kontrola (TetraMin)	I	20	18,25	91,25
	II	20		
	III	20		
	IV	13		
Suva materija *Chlorella* sp.	I	20	20	100
	II	20		
	III	20		
	IV	20		
Suspenzija *Chlorella* sp.	I	20	18,75	93,75
	II	19		
	III	17		
	IV	19		
Pekarski vasac (Saccharomyces cerevisiae)	I	17	18,5	92,5
	II	17		
	III	20		
	IV	20		
Biofilter	I	20	18	90
	II	12		
	III	20		
	IV	20		

Ukupna mokra masa po replikatu je značajno varirala između tretmana i kontrole (ANOVA; p<0,01). Pojedinačna poređenja su pokazala da su larve hranjene suvom materijom soja *Chlorella* sp. postigle najveću masu (Tabela 9). Sličnu masu su imale i larve hranjene kvascem *S. cerevisiae* i TetraMin® hranom u kontroli. Sličnu srednju vrednost mase su imale i jedinke hranjene kvascem i TetraMin® hranom u kontroli. Međutim, ove tri grupe su imale značajno veću masu od tretmana gde je korišćena sveža biomasa (suspenzija algi i biofilteri; LSD, p<0,05). Tačnije, najniža masa jedinki je zabeležena u tretmanu gde su korišćeni biofilteri kao hrana (Tabela 9).

Tabela 9. Srednja vrednost ± standardna devijacija za merene parametre po tretmanima

Parametar / Tretman	Masa (mg)	Dužina tela (µm)	Dužina glave (µm)	Širina glave (µm)
Kontrola (TetraMin)	64,925 ± 46,532[a]	29,225 ± 4,754	1,340 ± 0,180	1,240 ± 0,083
Suva masa *Chlorella* sp.	80,5 ± 6,637[ab]	24,357 ± 4,486[a]	1,170 ± 0,211[a]	1,148 ± 0,178[a]
Suspenzija *Chlorella* sp.	26,8 ± 8,178[c]	15.462 ± 3,086	0,946 ± 0,303	0,932 ± 0,231
Kvasac	71,4 ± 25,979[ab]	24,473 ± 5,470[a]	1,171 ± 0,241[a]	1,112 ± 0,177[a]
Biofilter	14,0 ± 4,192[c]	6,463 ± 1,628	0,442 ± 0,142	0,401 ± 0,114

*Vrednosti označene istim slovom (a,b,c) u koloni nisu statistički značajno različiti (Mann-Whitney test, p>0,01)

Morfometrijski parametri (Tabela 9) su pokazali identičan trend i značajno varirali između kontrole i svih tretmana (Mann-Whitney test; p<0,01) osim između suve materije algi i suvog kvasca gde su zabeležene slične vrednosti (Mann-Whitney test; p>0,01). Kao i u slučaju sa parametrom ukupna mokra masa larvi po replikatu, najviše vrednosti morfometrijskih parametara su zabeležene kod jedinki hironomida koje su hranjene suvom hranom (suvi kvasac i suva masa algi).

4.5. Hemijski sastav sojeva fitoplanktona (*Anabaena* sp. i *Chlorella* sp.) i larvi hranjenih različitim tipovima hrane

Izvršena je hemijska analiza suve mase dva soja fitoplanktona, kao i šest grupa larvi *C. riparius* koje su hranjene različitim tipovima hrane, na osnovu čega je utvrđen procentualni sastav ugljenih hidrata, proteina i lipida (tabela 10).

Soj cijanobakterije *Anabaena* sp. je sadržao veći procenat ugljenih hidrata i manji procenat proteina i lipida (25%, 42% i 4,7%, respektivno) u odnosu na soj *Chlorella* sp. (20%, 46% i 9,4%, respektivno).

Najveći procenat ugljenih hidrata kod larvi je zabeležen u grupi koja je hranjena kontrolnom hranom u sedimentu od papira, dok je manji procenat zabeležen u grupama larvi u sedimentu od peska hranjenih kontrolnom hranom, zatim suspenzijom ćelija *Chlorella* sp., kvascem, biofilterom i dehidrovanom masom *Chlorella* sp. (23%, 18,1%, 5,7%, 5,5%, 5,4%, 4,3%, respektivno). Proteina je u najvećem procentu bilo kod larvi hranjenih kontrolnom hranom u sedimentu od papira, dok je manji procenat zabeležen kod larvi hranjenih biofilterom, zatim kontrolnom hranom u sedimentu od peska, larvi hranjenih suspenzijom ćelija *Chlorella* sp., i najmanje kod larvi hranjenih kvascem i dehidrovanom masom *Chlorella* sp. (51%, 48%, 45%, 36%, 22%, 22%; respektivno).

Tabela 10. Sadržaj ugljenih hidrata, proteina, i lipida sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp., i larvi preračunato na osnovu hemijske analize suve mase.

Biomasa	**Grupa**	**Sadržaj (% suve mase)**		
		Ugljeni hidrati	**Proteini**	**Lipidi**
Cijanobakterije	***Anabaena* sp.**	25 ± 5*	42 ± 4	4,7 ± 0,5
Zelene alge	***Chlorella* sp.**	20 ± 2	46 ± 7	9,4 ± 0,7
Larve koje su hranjene:	**Kontrola (pesak)**	18,1 ± 1,5	45 ± 8	7,1 ± 0,4
	Kontrolnom hranom (papir)	23 ± 1	51 ± 6	9,0 ± 0,6
	Biofilterom	5,4 ± 0,4	48 ± 8	n.d.**
	Kvascem	5,5 ± 0,6	28 ± 6	0,8 ± 0,2
	Dehidrovanom masom *Chlorella* sp.	4,3 ± 0,4	28 ± 2	1,2 ± 0,2
	Rastvorom ćelija *Chlorella* sp.	5,7 ± 0,5	36 ± 4	n.d. **

* Prikazani podaci (iz 6 replikata) u vidu srednje vrednosti procenata (%) i SD.

** n.d. – nije determinisano

Najveći procenat lipida je zabeležen kod larvi u sedimentu od papira hranjenih kontrolnom hranom, dok je kod larvi u sedimentu od peska hranjenih kontrolnom hranom,

zatim hranjenih dehidrovanom masom *Chlorella* sp. i kvascem bilo manje lipida (9,0%, 7,1%, 1,2%, 0,8%; respektivno). Lipidi u larvama koje su hranjene biofilterom i suspenzijom ćelija *Chlorella* sp. nisu detektovani.

Dalja anliza lipida je rađena u cilju određivanja masnokiselinskog sastava suve mase sojeva fitoplanktona *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp., kao i larvi hranjenih različitim tipovima hrane (tabela 11).

Tabela 11. Sastav metil estara masnih kiselina sojeva fitoplanktona *Anabaena* sp. (*A.* sp.), *Chlorella* sp. (*C.* sp.) i larvi hranjenih različitim tipovima hrane

RIa	Sastojak	Oznaka	Klasa b	*C.* sp.	*A.* sp.	L1	L6	L2	L3	Metod identifikacije
1526	Metil-dodekanoat (sin. metil-laurate)	8:0	n-SFA	n.o.	n.o.	tr	n.o.	n.o.	tr	RI, MS, CoI
1626	Metil-tridekanoat	13:0	n-SFA	n.o.	n.o.	tr	n.o.	n.o.	n.o.	RI, MS, CoI
1690	Metil-12-metiltridekanoat	i-14:0	i-SFA	n.o.	n.o.	tr	n.o.	n.o.	n.o.	RI, MS
1698	Metil-(Z)-9-tetradecenoat	14:1ω5c	MUFA	n.o.	n.o.	0,58	n.o.	n.o.	tr	RI, MS, DMDS
1726	Metil-tetradekanoat (sin. metil-miristat)	14:0	n-SFA	n.o.	tr	3,26	tr	n.o.	3,9	RI, MS, CoI
1790	Metil-13-metiltetradekanoat	i-15:0	i-SFA	n.o.	tr	0,38	tr	tr	tr	RI, MS
1826	Metil-pentadekanoat (sin. metil-pentadecilat)	15:0	n-SFA	n.o.	n.o.	tr	n.o.	n.o.	n.o.	RI, MS, CoI
1895	Metil-(Z,Z)-7,10-heksadekadienoat	16:2ω6c	PUFA	9,42	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	RI, MS
1900	Metil-(Z)-7-heksadecenoat	16:1ω9c	MUFA	n.o.	n.o.	1,92	tr	n.o.	tr	RI, MS, DMDS
1901	Metil-(Z,Z,Z)-7,10,13-heksadekatrienoat	16:3ω3c	PUFA	6,19	n.o.	n.o.	tr	n.o.	2,16	RI, MS
1903	Metil-(Z)-9-heksadecenoat (sin. metil-palmitoleat)	16:1ω7c	MUFA	tr	12,29	5,19	tr	tr	7,8	RI, MS, CoI, DMDS
1915	Metil-(E)-9-heksadecenoat	16:1ω7c	MUFA	n.o.	n.o.	tr	tr	tr	tr	RI, MS, DMDS

1926	Metil-heksadekanoat (sin. metil-palmitat)	16:0	n-SFA	19,74	11,53	16,32	4,47	2,33	23,02	RI, MS, CoI
1990	Metil-15-metilheksadekanoat	i-16:0	i-SFA	tr	n.o.	tr	n.o.	n.o.	tr	RI, MS
2026	Metil-heptadekanoat (sin. metil-margarat)	17:0	n-SFA	n.o.	tr	0,4	tr	tr	tr	RI, MS, CoI
2096	Metil-(Z,Z)-9,12-oktadekadienoat (sin. metil-linoleat)	18:2ω6c	PUFA	22,21	5,99	16,8	1,82	2,11	17,57	RI, MS, CoI
2103	Metil-(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienoat (sin. metil-linolenat)	18:3ω3c	PUFA	36,11	12,69	12,73	2,81	1,16	19,42	RI, MS, CoI
2109	Metil-(Z)-9-oktadecenoat (sin. metil-oleat)	18:1ω9c	MUFA	tr	3,23	2,77	tr	tr	4,33	RI, MS, CoI, DMDS
2126	Metil-oktadekanoat (sin. metil-stearat)	18:0	n-SFA	tr	1,11	9,21	2,37	1,98	11,32	RI, MS, CoI
2267	Metil-(Z,Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14,17-eikozatetraenoat (sin. metil-arahidonat)	21:4ω6c	PUFA	n.o.	n.o.	1,32	n.o.	n.o.	tr	RI, MS, CoI
2303	Metil-(Z)-11-eikozenoat	21:1ω9c	MUFA	n.o.	n.o.	tr	n.o.	n.o.	tr	RI, MS, DMDS
2326	Metil-eikozanoat (sin. metil-arahidate)	20:0	n-SFA	n.o.	n.o.	tr	tr	n.o.	tr	RI, MS, CoI
2526	Metil-dokozanoat (sin. metil-behenat)	22:0	n-SFA	n.o.	n.o.	tr	n.o.	n.o.	n.o.	RI, MS, CoI

tr – trag (<0.1 μg g^{-1}), n.o. – nije određeno

[a] RI – retencioni indeksi na DB-5 hromatografskoj koloni izračunati poređenjem sa serijom ko-injektiranih *n*-alkana (C_{15}–C_{26})

[b] *n*-SFA (engl. *normal-chain saturated fatty acid*) – zasićena masna kiselina normalnog niza, *i*-SFA (engl. *iso-chain saturated fatty acid*) – zasićena *izo*-masna kiselina, MUFA (engl. *monounsaturated fatty acid*) – mononezasićena masna kiselina, PUFA (engl. *polyunsaturated fatty acid*) – polinezasićena masna kiselina

[c] RI – sastojak je identifikovan poklapanjem retencionog indeksa sa literaturnim podacima, MS – sastojak je identifikovan poređenjem masenog spektra sa masenim spektrima iz baze

podataka, CoI – identitet sastojka je dodatno potvrđen ko-injekcijom sa autentičnim standardom, DMDS – položaj dvoostruke veze je određen na osnovnu fragmentacije odgovarajućeg DMDS-adukta

Analiza masnokiselinskog sastava je pokazala da je biomasa soja *Chlorella* sp. sadržala najviše polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), i to metil-linolenata (36,11 µg), metil-linoleata (22,21 µg), metil-(Z,Z)-7,10-heksadekadienoata (9,42) i metil-(Z,Z,Z)-7,10,13-heksadekatrienoata (6,19). Zasićena masna kiselina normalnog niza (*n*-SFA), metil-palmitat detektovana je u koncentraciji od 19,74 µg. Ostalih masnih kiselina je bilo u tragovima ili nisu detektovane (tabela 11).

U soju *Anabaena* sp. su detektovane dve PUFA, i to metil-linolenat (12,69 µg) i metil-linoleat (5,99 µg). Od MUFA su detektovane i kvantifikovane metil-palmitoleat i metil-oleat (12.29, 3.23; respektivno), dok su od n-SFA prisutne metil-palmitat i metil-stearat (11,53 i 1,11; respektivno). Ostale masne kiseline su detektovane u tragovima ili ih nije ni bilo (tabela 11).

Lipidi su detektovani kod larvi koje su hranjene kontrolnom hranom Tetramin u sedimentu od papira (L3), kontrolnom hranom Tetramin u sedimentu od peska (L1), dehidrovanom masom soja *Chlorella* sp. (L6) i kvascem (L2). Analizom masnokiselinskog sastava u sve četiri grupe su detektovane zasićene masne kiseline normalnog niza (n-SFA), metil-palmitat (16,32 µg u L1; 4,47 µg u L6; 2,33 µg u L2; 23,02 µg u L3) i metil-stearat (9,21 µg u L1; 2,37 µg u L6; 1,98 µg u L2; 11,32 µg u L3). Od polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u sve četiri grupe larvi su detektovane i kvantifikovane metil-linoleat (16,8 µg u L1; 1,82 µg u L6; 2,11 µg u L2; 17,57 µg u L3) i metil-linolenat (12,73 µg u L1; 2,81 µg u L6; 1,16 µg u L2; 19,42 µg u L3). Ostale masne kiseline su detektovane pojedinačno u grupama larvi u manjim količinama, u tragovima ili ih nije bilo (tabela 11).

4.6. Ispitivanje uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve na osnovu OECD protokola broj 218

Sojevi *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. nisu značajno uticali na stopu mortaliteta larvi *C. riparius* (ANOVA, p >0,05). Preciznije, stopa preživljavanja je uvek bila veća od 90% u svim tretmanima, kontrolama i replikatima, što je bilo u okviru prihvatljivih granica za kontrolne uzorke postavljenih po protokolu OECD (OECD, 2004).

Statistička analiza ANOVA je pokazala statistički značajne razlike u masi larvi između tretmana (F = 9,166, p =0,007), pri čemu su hironomide hranjene sojem *Anabaena* sp. imale značajno veću masu u odnosu na larve hranjene sojem *Chlorella* sp. (Tukey HSD, p<0,05; Tabela 13). Ipak, larve iz oba tretmana su imale manju telesnu masu u poređenju sa larvama hranjenim kontrolnom hranom. Koncentracija hemoglobina je imala isti obrazac, pa je u tretmanu sojem *Anabaena* sp., fotometrijskom metodom detektovana veća koncentracija hemoglobina nego u larvama tretiranim sojem *Chlorella* sp. (tabela 12).

Tabela 12. Efekat fitoplanktona kao hrane na rast i koncentraciju hemoglobina u hemolimfi larvi hironomida izraženoj kao srednja vrednost ± SD mase larvi. Vrednosti unutar iste kolone koje ne dele isto slovo u superskriptu su značajno različite: a

Treatman	**Kontrola**	***Chlorella* sp.**	***Anabaena* sp.**
Srednja vrednost mase	5,14 ± 2,33 mg[a]	0,51 ± 0,08 mg	3,61 ± 0,15 mg[a]
Srednja koncentracija hemoglobina g/L	27,3 g/L	Ispod nivoa detekcije	10,5 g/L

p<0.05 (ANOVA i Post hoc Tukey HSD test za masu larvi i Studentov t-test za koncentraciju hemoglobina. Ukoliko nedostaje slovo u superskriptu, sve vrednosti među grupama su značajno različite.

Statističkom obradom rezultata analize parametara oksidativnog stresa utvrđene su statistički značajne razlike, kao i korelacije između određenih parametara (Tabela 13).

Tabela 13. Srednje vrednosti ± SD koncentracije parametara oksidativnog stresa larvi *C. riparius*. *Chlorella* sp. – larve C. *riparius* hranjene sojem *Chlorella* sp.; *Anabaena* sp. – *C. riparius* larve hranjene sojem *Anabaena* sp; Kontrola – larve *C. riparius* hranjene kontrolnom hranom TetraMin. Vrednosti unutar iste kolone koje ne dele isto slovo u superskriptu su značajno različite: a (LSD p<0.05)

Uzorak	Proteini mg%	AOPP µmol/mg prot.	TBARS µmol/mg prot	SOD U/mg prot	KAT U/mg prot
Chlorella sp.	63,4±24,006[a]	0,286±0,104	0,025±0,043[a]	2,91±3,092[a]	0,029±0,011
Anabaena sp.	66,63±11,47[a]	0,184±0,032[a]	0,026±0,004[a]	6,47±2,004[a]	0,089±0,013
Kontrola	106,23±8,034	0,122±0,01[a]	0,024±0,003[a]	2,25±0,434[a]	0,059±0,004

Analizom ANOVA je utvrđeno da koncentracija proteina značajno varira između grupa (F=6,626, p=0,017, tabela 13). Značajna je razlika u koncentraciji proteina između kontrole i larvi hranjenih sojem *Chlorella* sp. (LSD, p=0,010), takođe između kontrole i larvi hranjenih sojem *Anabaena* sp. (LSD, p=0,014). Između larvi hranjenih sojevima *Chlorella* sp. i *Anabaena* sp, nije bilo statistički značajne razlike (LSD, p=0,811). Značajno manji procenat proteina je bio zastupljen kod larvi iz oba tretmana, u odnosu na kontrolnu grupu larvi.

Statistička analiza ANOVA je pokazala da koncentracija AOPP značajno varira između grupa hironomida (F=5,131, p=0,033; Tabela 13). Najveća koncentracija AOPP je zabeležena kod larvi tretiranih sa *Chlorella* sp. ($\bar{X}$= 0,286, SD = 0,104 µmol/mg prot) i značajno je veća u odnosu na kontrolnu grupu (LSD, p=0,009) i u odnosu na larve koje su tretirane sojem *Anabanaena* sp. (LSD, p=0,002). Značajne razlike između larvi tretiranih sojem *Anabaena* sp. i kontrolne grupe nije bilo (LSD , p=0,355).

Analiza parametara (ANOVA) je pokazala da koncentracije TBARS značajno ne variraju između testiranih grupa hironomida (p>0,05, tabela 13), što je slučaj i sa aktivnosti SOD.

Analizom ANOVA utvrđeno je da je aktivnost KAT značajno varirala između grupa testiranih larvi (F=23,948, p<0,001, tabela 13). Aktivnost KAT je bila najniža kod larvi koje

su bile tretirane sojem *Chlorella* sp. ($\bar{x}$= 0,029, SD = 0,011 μmol/mg prot.) i značajno je različita u odnosu na kontrolnu grupu larvi (LSD, p=0,008), kao i u odnosu na larve tretirane sojem *Anabaena* sp. (LSD, p<0,001). Aktivnost KAT je bila najviša u larvama hranjenim sojem *Anabaena* sp. ($\bar{x}$=0,089±SD=0,013), značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu larvi (LSD, p=0,007).

Pirsonovim korelacionim testom je utvrđena negativna korelacija koncentracije AOPP i aktivnosti KAT (Pearson's r=−0,77, p<0,01) kod larvi hranjenih sojem *Chlorella* sp., pri čemu je usled rasta koncentracije AOPP došlo do smanjenja aktivnosti KAT (Tabela 14).

Tabela 14. Test Pirsonove korelacije u grupi larvi hranjenih sojem *Chlorella* sp.

Korelacije		SOD U/ml	SOD U/mg prot	KAT U/L	KAT U/mg prot
AOPP umol/L	Pirsonova korelacija	-.215	-.200	-.771**	-.774**
	P vrednost	.503	.533	.003	.003
	N	12	12	12	12

** p=0.01.

U testu procene genotoksičnosti ukupan kometa rezultat za larve četvrtog stupnja *C. riparius* se značajno razlikovao (ANOVA, F = 9,894, p = 0,005) između kontrolnih grupa i grupa larvi tretiranih fitoplanktonom, *Chlorella* sp. i *Anabaena* sp. (tabela 15).

Tabela 15. Genotoksični efekat nakon izlaganja larvi *C. riparius* sojevima *Chlorella* sp. i *Anabaena sp*. [a]Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti unutar iste kolone koje ne dele isto slovo u superskriptu su značajno različite: [a] (ANOVA p<0.05)

Tretman	**Klasa kometa**					**Ukupan kometa rezultat[a]**
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	
Negativna kontrola	86,2 ± 0,62	13,8 ± 0,74	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,8 ± 0, 42[a]
Pozitivna kontrola	59,1 ± 0,62	24,1 ± 0,41	10,1 ± 0,52	4,2 ± 0,94	2,5 ± 0,35	66,9 ± 1,4
Chlorella sp.	73 ± 0,20	21,9 ± 0,31	5,1 ± 0,24	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,1 ± 0,6[ab]
Anabaena sp.	69,7 ± 0,94	17,6 ± 0,27	12,7 ± 0,60	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	43,05 ± 0,22[b]

Statistički značajan porast ukupnog kometa rezultata je primećen je u grupi larvi tretiranih sojem *Chlorella* sp. (32,1) u odnosu na negativnu (13,8) i pozitivnu kontrolnu grupu (66,9). Oštećenje DNK se značajno povećava kod larvi tretiranih sojem *Anabaena sp.* (43,05) u poređenju sa negativnom kontrolnom grupom, ali niža u odnosu na grupu tretiranu sa H_2O_2.

Klase komete 3 i 4 primećene su samo kod larvi tretiranih sa H_2O_2. Klasa 0 bila je češće u negativnoj kontrolnoj grupi i grupama larvi tretiranih fitoplanktonom nego u pozitivnoj kontroli. Kometa klase 2 je primećena u pozitivnoj kontrolnoj grupi, *Chlorella* sp. i *Anabaena* sp. tretiranim grupama.

Dobijeni rezultati ukazuju da sojevi *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. imaju genotoksičan efekat na larve *C. riparius*.

4.7. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa i definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora

4.7.1. Ispitivanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa

Cilj ovog eksperimenta je utvrđivanje akutne toksičnosti MC-LR i stresora na larve C. *riparius*, nakon izlaganja od 24 i 48h. Kako bi simulirali zagađenje vode u laboratorijskim uslovima, korišćeni su rastvori nitrata, amonijumovih jona, fosfata i kadmijuma (tabela 16), u opsegu koncentracija koje bi trebalo da imaju letalni efekat na larve prvog stupnja *C. riparius*.

Tabela 16. Jedinjenja od kojih su pripremani rastvori za ispitivanje letalnih koncentracija stresora za larve *C. riparius*

Vrsta jona	Soli	Koncentracije jona u rastvoru	
Nitrati	$NaNO_3$	0,5; 1; 2; 4; 8	
Amonijum joni	$(NH_4)_2S_2O_8$	0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8	**g/l**
Fosfati	K_2HPO_4	0,5; 1; 2; 4; 8	
Kadmijum (II)	Cd	1; 2; 4; 8	**mg/l**

Pomoću širokog opsega koncentracija navedenih stresora, definisan je njihov akutni toksični uticaj na larve *C. riparius*, nakon 24 i 48h testiranja (tabela 17).

Testiranjem uticaja fosfata (PO_4^{3-}) u opsegu koncentracija od 0,5 do 8 g/l, najviša koncentracija je izazvala smrt svih larvi nakon 48h, dok je nakon 24h preživelo 3,33% larvi. U prisustvu nižih koncentracija fosfata preživljavanje larvi se kretalo u opsegu od 16,6% (4 g/l; 48h) do 96,6% (0,5 g/l; 24h).

Nitrati (NO_3^-) su primenjeni u opsegu koncentracija od 0 do 8 g/l, pri čemu su koncentracije u opsegu 2-8 g/l uticale da stopa preživljavanja larvi nakon 24 i 48 h bude 0%. Primena nitrata u koncentraciji od 1 g/l je omogućila da nakon 24 i 48h preživelih larvi bude 46,6 i 36,6%, respektivno.

Amonijum (NH_4^+) je primenjen u opsegu koncentracija od 0,5 do 8 g/l. Samo je u prisustvu najniže koncentracije bilo preživelih larvi, 30% nakon 24h, dok je izlaganje amonijumu nakon 48h u istoj koncentraciji smanjilo broj preživelih larvi na 23,3%.

Kadmijum (Cd^{2+}) je primenjen u opsegu koncentracija od 0,5 do 8 µg/l, pri čemu je u prisustvu najniže koncentracije preživelo 100% larvi nakon 24 i 48h testiranja. Primenom viših koncentracija kadmijuma preživljavanje larvi se kretalo od 96,66% (1 µg/l; 24h) do 33,3% (8 µg/l; 48h).

Wilcoxon neparametarski test za ponovljena merenja je pokazao da ne postoji vremenski zavisna toksičnost prilikom primene iste dozetestiranih agenasa. Kruskal-Wallis test je pokazao da postoji statistički značajna dozno zavisna toksičnost kod svih testiranih stresora ($p<0,05$).

Tabela 17. Broj preživelih larvi nakon izlaganja određenim koncentracijama stresora nakon 24 i 48 h. Rezultati su izraženi u procentima ±SD. Preživljavanje kontrola je bilo oko 90%.

Stresor	**PO_4^{3-}**		**NO_3^-**		**NH_4^+**		**Cd^{2+}**	
Period vremena / Koncentracija	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
8 g/l	3,33±4,71	0	0	0	0	0	43,33±9,42	33,3±4,71
4 g/l	26,6±4,71	16,6±12,47	0	0	0	0	63,66±4,71	50±8,16
2 g/l	63,3±4,71	43,3±12,47	0	0	0	0	86,66±4,71	83,33±4,71
1 g/l	76,6±4,71	73,3±4,71	46,6±4,71	36,6±4,71	0	0	96,66±4,71	93,3±4,71
0,5 g/l	96,6±4,71	93,3±4,71	73,3±4,71	63,3±9,42	30,0±8,16	23,3±9,42	100	100

Primenom mikrocistina-LR u opsegu koncentracija od 1 do 10 µg/l, ispitan je toksični efekat na larve *C. riparius* nakon 24 i 48h (tabela 18).

Tabela 18. Broj preživelih larvi *C. riparius* prvog stupnja nakon izlaganja standardu mikrocistina -LR (metanolni ekstrakt – standard). Rezultati su izraženi u procentima ±SD.

Period vremena	**KONTROLA**	**Koncentracija mikrocistina-LR**		
		10 µg/l	**5 µg/l**	**1 µg/l**
24 h	100	70,0±8,16	83,3±4,71	100
48 h	93,3±9,42	60,0±8,16	83,3±4,71	96,6±4,71

Najniža koncentracija MC-LR nakon 24h testiranja nije imala toksičan efekat po larve, dok je pri istoj koncentraciji nakon 48h preživelo 96,6% larvi. Primenom MC-LR u koncentraciji od 5 µg/l nakon 24 i 48h preživljavanje larvi je bilo zastupljeno u istom procentu

83,3%. Najviša koncentracija MC-LR od 10 µg/l je uticala da nakon 24h preživi 70% larvi, dok je nakon 48h preživelo 60% larvi *C. riparius*.

Dobijeni rezultati (Tabela 17) su dalje obrađeni kompjuterskim programom *Risk Assessment Tool Analysis Software – RA V1.0.,* u cilju procene koncentracija stresora sa letalnim efektom koji se izražava u procentima (tabele 19, 20, 21 i 22). Dobijene koncentracije letalnosti su određene na osnovu gornjeg i donjeg nivoa koncentracija, sa 95% intervala poverenja.

Obradom podataka dobijenih analizom akutne toksičnosti nitrata (NO_3^-) na larvama prvog stupnja *C. riparius*, dobijene su letalne koncentracije u opsegu 0,01 do 50% (tabela 19). Za dalja testiranja uticaja fosfata na larve korišćena je LC_{20} 48h koja je iznosila 0,40 g/l.

Tabela 19. Rezultati letalnih koncentracija NO_3^- na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h.

Nitrati (NO_3^-)							
24 h				48 h			
Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo	Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo
0,01 %	0,09893	0,09893	0,09893	0,01 %	0,06807	0,01342	0,13962
0,10 %	0,14058	0,14058	0,14058	0,10 %	0,10031	0,02533	0,18507
1,00 %	0,21544	0,21544	0,21544	1,00 %	0,16068	0,05470	0,26119
5,00 %	0,31533	0,31533	0,31533	5,00 %	0,24466	0,10829	0,35656
10,00 %	0,38636	0,38636	0,38636	10,00 %	0,30615	0,15543	0,42218
20,00 %	0,49415	0,49415	0,49415	20,00 %	0,40169	0,23944	0,52090
30,00 %	0,59009	0,59009	0,59009	30,00 %	0,48859	0,32465	0,61045
40,00 %	0,68662	0,68662	0,68662	40,00 %	0,57751	0,41724	0,70535
50,00 %	0,79088	0,79088	0,79088	50,00 %	0,67503	0,52042	0,81786

Obrada podataka dobijenih analizom akutne toksičnosti fosfata (PO_4^{3-}) na larvama prvog stupnja *C. riparius*, dobijene su letalne koncentracije u opsegu 0,01 do 50% (tabela 20). Za dalje testiranja uticaja nitrata u eksperimentima je korišćena LC_{20} 48h koncentracija koja je iznosila 0,87224 g/l.

Tabela 20. Rezultati letalnih koncentracija PO_4^{3-} na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h.

Fosfati (PO_4^{3-})							
24 h				48 h			
Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo	Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo
0,01 %	0,09741	0,03162	0,19028	0,01 %	0,09201	0,03186	0,17337
0,10 %	0,16538	0,06442	0,29099	0,10 %	0,15039	0,06158	0,25731
1,00 %	0,31462	0,15239	0,48931	1,00 %	0,27319	0,13669	0,41707
5,00 %	0,55850	0,32635	0,78335	5,00 %	0,46539	0,27683	0,64567
10,00 %	0,75847	0,48720	1,01227	10,00 %	0,61829	0,40145	0,81894
20,00 %	1,09885	0,78346	1,39520	20,00 %	0,87224	0,62433	1,10162
30,00 %	1,43557	1,08960	1,78080	30,00 %	1,11787	0,84959	1,37840
40,00 %	1,80363	1,42413	2,22404	40,00 %	1,38166	1,09279	1,68815
50,00 %	2,23173	1,80026	2,77926	50,00 %	1,68367	1,36434	2,06626

Tabela 21. Rezultati letalnih koncentracija Cd^{2+} na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h.

Kadmijum (Cd^{2+})							
24 h				48 h			
Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo	Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo
0,01 %	0,23159	0,07388	0,45354	0,01 %	0,18226	0,05865	0,35799
0,10 %	0,39427	0,15187	0,69396	0,10 %	0,31027	0,11989	0,54869
1,00 %	0,75255	0,36312	1,16791	1,00 %	0,59220	0,28478	0,92509
5,00 %	1,33993	0,78469	1,87226	5,00 %	1,05437	0,61224	1,48434
10,00 %	1,82262	1,17642	2,42255	10,00 %	1,43416	0,91599	1,92021
20,00 %	2,64569	1,89901	3,34866	20,00 %	2,08174	1,47727	2,64943
30,00 %	3,46126	2,64359	4,29075	30,00 %	2,72341	2,05941	3,38328
40,00 %	4,35390	3,45183	5,38621	40,00 %	3,42569	2,69785	4,22606
50,00 %	5,39331	4,35349	6,77240	50,00 %	4,24344	3,41805	5,28126

Obrada podataka dobijenih analizom akutne toksičnosti kadmijuma (Cd^{2+}) na larvama prvog stupnja *C. riparius*, dobijene su letalne koncentracije u opsegu 0,01 do 50% (tabela 21). Dalja analiza uticaja kadmijuma na larve *C. riparius* je podrazumevala upotrebu LC_{20} 48h koja je iznosila 2,08 µg/l.

Tabela 22. Rezultati letalnih koncentracija NH_4^+ na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h.

Amonijum (NH_4^+)							
24 h				48 h			
Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo	Prob	Koncentracija	Donji nivo	Gornji nivo
0,01 %	12,18764	3,13901	24,58873	0,01 %	2,20701	0,35858	5,89830
0,10 %	20,39300	6,70184	36,46647	0,10 %	4,83111	1,09877	10,83302
1,00 %	38,11561	16,76115	59,14954	1,00 %	12,51506	4,25594	22,81977
5,00 %	66,60450	37,58876	92,03179	5,00 %	29,26485	14,04617	45,01144
10,00 %	89,69652	57,27677	117,61435	10,00 %	46,03493	26,18425	65,57203
20,00 %	128,63454	93,42424	161,64790	20,00 %	79,68786	53,86943	106,89446
30,00 %	166,82452	129,32482	208,99630	30,00 %	118,36409	86,61086	159,09668
40,00 %	208,28836	166,04282	267,57999	40,00 %	165,93592	124,34471	233,43835
50,00 %	256,22427	204,70926	345,10254	50,00 %	227,42844	168,46599	345,30717

Obrada podataka dobijenih analizom akutne toksičnosti amonijuma (NH_4^+) na larvama prvog stupnja *C. riparius*, dobijene su letalne koncentracije u opsegu 0,01 do 50% (tabela 22). U eksperimentima koji su podrazumevali ispitivanje uticaja amonijuma na larve *C. riparius* korišćena je koncentracija LC_{20} 48h koja je iznosila 79,68 mg/l.

4.7.2. Definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora

Kombinacijom svakog pojedinačnog stresora (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) u koncentraciji LC_{20} 48h) sa toksinom MC-LR u koncentraciji od 10 µg/l, otkriveno je da najveću stopu mortaliteta izaziva kombinacija toksina sa PO_4^{3-} (tabela 23).

Tabela 23. Rezultati mortaliteta larvi prvog stupnja izazvanog testiranjem efekta pojedinačnih stresora i kombinacije svakog stresora sa mikrocistinom-LR (MC-LR).

Parametar	**kontrola**	**MC-LR**	**NO_3^-**	**MC-LR + NO_3^-**	**NH_4^+**	**MC-LR + NH_4^+**	**PO_4^{3-}**	**MC-LR + PO_4^{3-}**	**Cd^{2+}**	**MC-LR + Cd^{2+}**
Mortalitet (%)	6±9,42	23±4,71	13±4,71	47±16,99	20±8,16	43±4,71	27±4,71	57±9,42	27±4,71	53±4,71

*MC-LR – mikrocistin-LR; NO_3^- – nitrati; NH_4^+ – amonijum; Cd^{2+} - kadmijum

Kontrola je podrazumevala praćenje mortaliteta larvi u vodi nakon 48h, bez prisustva stresora, što je rezultovalo niskom stopom mortaliteta od 6%. Primenom toksina i svakog pojedinačnog stresora izračunata je stopa mortaliteta nakon 48h testiranja, pri čemu NO_3^- indukuju najmanju stopu mortaliteta (13%), veći mortalitet su izazvali NH_4^+ (20%) i toksin

MC-LR (23%), dok su PO_4^{3-} i Cd^{2+} izazvali najveću stopu mortaliteta (27%). Ispitivanjem kombinovanog efekta stresora otkriveno je da je cijanotoksin MC-LR u kombinaciji sa amonijumom (MC-LR + NH_4^+) izazvao najmanju stopu mortaliteta (43%), dok su kombinacije MC-LR-NO_3^-, MC-LR-Cd^{2+}, MC-LR-PO_4^{3-} izazvale veći mortalitet (47%, 53%, 57%, respektivno).

4.8. Hronični efekat toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *Chironomus riparius* u multistres uslovima

Eksperiment hroničnog izlaganja larvi *C. riparius* toksičnom soju cijanobakterije *Anabaena* sp. u prisustvu stresora (NH_4^+, PO_4^{3-}, NO_3^- i Cd^{2+}) je trajao 13 dana i ocenjen je kao uspešan, jer je preživljavanje kontrolnih larvi (P=94,5%) bilo veće od 70%. U oba tretmana gde je korišćen kadmijum, na kraju eksperimenta nisu detektovane preživele jedinke (tabela 24). Kruskal-Wallis test nije detektovao ($p>0,05$) značajna varianja u stopi preživljavanja između kontrola i ostalih tretmana (ne uključujući tretmane koji su sadržali kadmijum i gde je P=0%; Tabela 25).

Tabela 24. Preživljavanje larvi u uslovima različitih kombinacija stresora i hrane izraženo u procentima ± SD.

Hrana	Stresori				
	Voda – Kontrola	**NH_4^+**	**PO_4^{3-}**	**NO_3^-**	**Kadmijum**
Kontrola - Tetramin	94,5±5,21	62,66±4,98	78,66±15,43	80±16,32	0
***Anabaena* sp.**	93,33±9,42	92 ±6,53	89,33±8,21	81,33±13,19	0

Vreme razvića izraženo procentualnim učešćem jedinki IV stupnja razvića po tretmanu je pokazalo jasnu razliku između različitih režima ishrane (Tabela 25). Sve preživele jedinke u kontroli, hranjenoj TetraMin® hranom su prilikom prekidanja eksperimenta bile u IV stupnju razvića, dok je 100% preživelih jedinki u kontroli hranjenoj suspenzijom *Anabaena* sp. bilo u III stupnju larvalnog stadijuma. Tretman hranom Tetramin je zadržao isti trend u prisustvu svih stresora, odnosno većina preživelih jedinki je bila u IV stupnju razvića (tabela 25). Najveći procenat jedinki četvrtog stupnja razvoja su imali tretmani Tetramin hranom u prisustvu PO_4^{3-} i NO_3^- (94,91% i 91,66%, respektivno), dok je procenat jedinki četvrtog stupnja u prisustvu NH_4^+ bio manji (57,44%). Veći procenat larvi trećeg stupnja razvoja je bio zastupljen kod larvi koje su tretirane suspenzijom *Anabaena* sp., u kontroli i NH_4^+ tretmanu 100%, dok je procenat larvi trećeg stupnja razvoja bio niži u prisustvu PO_4^{3-} i NO_3^- (76,11% i 65,57%, respektivno).

Tabela 25. Broj preživelih larvi određenog stupnja razvoja zabeležen u momentu završetka ispitivanja hroničnog efekta soja *Anabaena* sp. u multistres uslovima. Broj izražen u procentima ±SD.

Hrana	**Stresori**				
	Voda – Kontrola	**NH_4^+**	**PO_4^{3-}**	**NO_3^-**	**Kadmijum**
Tetramin	IV stupanj 100	III stupanj 42,56±41,40 IV stupanj 57,44±41,35	III stupanj 5,09±5,65 IV stupanj 94,91±5,65	III stupanj 8,33±9,42 IV stupanj 91,66±9,42	0
***Anabaena* sp.**	III stupanj - 100	III stupanj - 100	III stupanj 76,11±34,28 IV stupanj 23,89±34,28	III stupanj 65,57±34,24 IV stupanj 34,43±34,24	0

ANOVA test je u okviru eksperimenta hronične toksičnosti pokazao da masa larvi i koncentracija hemoglobina u hemolimfi jedinki značajno varira ($F=30,86$, $p<0,001$ i $F=51,99$, $p<0,001$, respektivno) između kontrola (Tetramin i *Anabaena* sp.) i tretmana (Tetramin i *Anabaena* sp. u kombinaciji sa stresorima NH_4^+, PO_4^{3-}, NO_3^- i Cd^{2+}; tabela 26).

Post Hoc Tukey HSD testom je dokazana statistički značajna razlika u masi larvi između kontrole (larve tretirane Tetraminom bez prisustva stresora) i larvi tretiranih sojem *Anabaena* sp., kako bez prisustva stresora ($p=0.003$), tako i u prisustvu PO_4^{3-} i NO_3^- ($p=0,000$, $p=0,006$, respektivno). Statistički značajne razlike jedino nije bilo u prisustvu NH_4^+ ($p=0,997$) u odnosu na kontrolu. Istim testom je dokazano i da je u odnosu na kontrolu, koncentracija hemoglobina značajno manja u larvama koje su tretirane sojem *Anabaena* sp. bez prisustva stresora ($p=0,013$), ali i u prisustvu NH_4^+, PO_4^{3-} i NO_3^- ($p=0,001$, $p=0,000$, $p=0,000$, respektivno).

Utvrđeno je Post Hoc Tukey HSD testom da je masa larvi tretiranih Tetraminom u prisustvu NO_3^- i NH_4^+ značajno veća ($p=0,002$, $p=0,000$, respektivno) u odnosu na kontrolne larve, dok prisustvo PO_4^{3-} nije uticalo da masa bude značajno veća ($p=0,451$). Značajno manju koncentraciju hemoglobina su imale larve tretirane Tetramin hranom u prisustvu NO_3^- i PO_4^{3-} ($p=0,001$, $p=0,003$, respektivno), dok je koncentracija hemoglobina larvi u prisustvu NH_4^+ bila manja, ali bez statističkog značaja ($p=0,315$).

Tabela 26. Uticaj hroničnog izlaganja larvi soju *Anabaena* sp. u multistres uslovima na masu larvi i koncentraciju hemoglobina u hemolimfi. Masa larvi prikazana u vidu srednje vrednosti data u mg ± standardna devijacija i koncentracija hemoglobina data u vidu srednje vrednosti g/l ± standardna devijacija.

Tretman	***Anabaena* sp.**	**Tetramin**	**NO_3^- + *Anabaena* sp.**	**NO_3^- + Tetramin**	**NH_4^+ *Anabaena* sp.**	**NH_4^+ Tetramin**	**PO_4^{3-} + *Anabaena* sp.**	**PO_4^{3-} + Tetramin**
Srednja vrednost mase (mg)	2,96±0,16	6,03±0,46	3,23±0,77	9,2±1,26	6,43±0,24	11,46±0,60	2,98±0,20	7,33±0,36
Srednja vrednost hemoglobina (g/l)	8,66±0,94	15,66±2,62	2,33±1,69	6±2,44	6±2,16	11,66±1,24	3,33±1,24	7,33±0,94

Ispitivanjem genotoksičnog efekta soja *Anabaena* sp. u prisustvu stresora utvrđeno je da najveće oštećenje DNK somatskih ćelija larvi *C. riparius* izaziva prisustvo NH_4^+ (tabela 27).

Tabela 27. Vrednosti kometa testa za parametre analizirane kompjuterskim programom *CometScore* u cilju ispitivanja genotoksičnog efekta soja *Anabaena* sp. i Tetramin hrane na larve *C. riparius* u multistres uslovima

Stresori	**PO_4^{3-}**		**NH_4^+**		**NO_3^-**		**Kontrola**		
Tretmani (hrana)	***Anabaena***	**TetraMin**	***Anabaena***	**TetraMin**	***Anabaena***	**TetraMin**	***Anabaena***	**TetraMin**	**TetraMin + H_2O_2**
Comet Length (px)	85.62	61.95	133.18	54.76	79.64	45.28	49.69	40.40	187.88
SD	49.72	35.62	92.70	19.70	52.47	15.90	13.34	9.45	81.95
Comet Height (px)	49.58	44.77	82.54	40.26	51.96	33.33	33.52	28.88	103.89
SD	21.28	26.31	52.82	13.09	29.81	13.67	10.57	8.43	50.90
Comet Area (px)	5213.0	3656.1	15495.9	2429.0	5482.5	1709.7	1771.5	1230.8	22980.8
SD	4975.7	4623.9	19861.4	1561.5	6359.2	1459.8	1042.5	672.7	20110.8
Comet Intensity	141757.7	204779.3	564402.1	97667.4	274195.5	58458.7	49699.2	32732.2	1027433.1
SD	158355.3	345678.4	872849.5	74796.8	385242.8	63071.8	55930.8	24518.4	934711.5
Comet Mean Intensity	24.94	42.43	30.66	38.14	37.90	29.56	25.62	25.90	48.22
SD	10.15	18.85	12.96	15.71	17.93	16.86	13.56	8.87	22.21
Head Diameter (px)	49.58	44.77	79.35	39.50	48.57	33.07	32.76	28.89	99.24
SD	21.28	26.31	53.28	12.92	30.03	13.80	10.73	8.50	49.41
Head Area (px)	5212.0	3655.1	15487.9	2426.3	5470.7	1708.2	1761.3	1229.2	22969.0
SD	4975.7	4623.9	19862.1	1561.1	6357.1	1460.0	1043.2	672.7	20094.0
Head Intensity	98203.9	151390.1	351580.0	67139.2	164598.6	43797.7	45480.3	28146.2	560014.3
SD	116639.1	236178.4	508424.9	47640.6	212938.9	47295.9	51673.9	20428.4	503585.9
Head Mean Intensity	18.64	34.51	22.58	27.34	25.65	22.13	23.37	22.71	26.90
SD	7.71	13.52	9.28	11.24	10.63	12.65	12.48	8.17	12.33
%DNA in Head	76.15	83.34	75.64	72.75	70.53	75.72	91.21	88.16	57.62
SD	13.36	8.92	15.06	12.19	14.14	8.99	9.16	11.19	12.35
Tail Length (px)	36.04	17.18	53.83	15.26	31.07	12.21	16.93	11.51	88.64
SD	31.14	13.33	47.79	10.34	30.56	5.85	7.77	5.46	58.37
Tail Area (px)	1.0	1.0	8.0	2.7	11.8	1.5	10.3	1.6	11.8
SD	0.0	0.0	29.3	7.9	40.4	2.6	21.6	3.1	50.5
Tail Intensity	43553.8	53389.2	212822.1	30528.2	109596.8	14661.0	4219.0	4586.0	467418.8
SD	52369.9	119344.9	375739.0	34972.2	184436.5	18388.1	6869.4	6481.5	492916.9
Tail Mean Intensity	43553.77	53389.20	210164.01	29527.45	98516.18	14156.87	3730.40	4500.01	433120.44
SD	52369.94	119344.95	377082.69	35457.59	176833.76	18400.42	7011.95	6517.28	496263.09
%DNA in Tail	23.85	16.66	24.36	27.25	29.47	24.28	8.79	11.84	42.38
SD	13.36	8.92	15.06	12.19	14.14	8.99	9.16	11.19	12.35
Rep komete	11.045	3.315	18.168	4.199	10.613	2.809	1.209	1.213	39.678
SD	12.15	3.78	21.36	3.57	12.97	1.52	1.16	1.22	32.46
Olive Moment	7.747	3.542	13.400	4.556	8.207	3.096	1.017	1.333	27.863
SD	7.43	4.14	14.92	3.61	8.42	1.91	0.77	1.34	17.73

Oštećenje DNK somatskih ćelija larvi *C. riparius* je procenjeno na osnovu parametra „rep komete“, koji je pokazao da su oštećenja DNK bila značajno veća u kombinaciji *Anabaena* sp. sa stresorima NH_4^+, PO_4^{3-} i NO_3^- (18.16, 11.04, 10.61, respektivno), nego što je to slučaj u tretmanu Tetramin hranom u prisustvu NH_4^+, PO_4^{3-} i NO_3^- (4.19, 3.31, 2.80, respektivno) (tabela 27).

Korišćenjem Mann-Whitney testa utvrđeno je da su oštećenja DNK somatskih ćelija larvi, tretiranih sojem *Anabaena* sp. u kombinaciji sa svakim od pojedinačnih stresora (PO_4^{3-}, NH_4^+, NO_3^-) statistički značajno veća ($p<0,05$), u odnosu na oštećenja kod larvi tretiranih Tetramin hranom u prisustvu navedenih stresora.

5. DISKUSIJA

5.1. Detektovanje toksina u soju cijanobakterije *Anabaena* sp.

Prvi cilj ovog istraživanja bio je utvrditi da li izabrani soj cijanobakterije *Anabaena* sp. produkuje toksine koji se u literaturi navode kao najčešći, naročito u cvetanjima slatkih voda, a to su hepatotoksini mikrocistini (Kabernik i Neilan, 2001). Rezultati analize su pokazali da je izabrani soj *Anabaena* sp., koji je u prethodnim istraživanjima na osnovu bioeseja okarakterisan kao toksičan (Kovač i sar., 2017), producent mikrocistina-LR. Imajući u vidu da cijanobakterije mogu produkovati različite sekundarne metabolite koji mogu imati toksičan efekat po druge organizme i da jedan soj može istovremeno produkovati više toksina (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011), pošlo se od pretpostavke da je najveća verovatnoća da izabrani soj *Anabaena* sp. produkuje neki od mikrocistina. Kao glavni producenti mikrocistina u literaturi se navode cijanobakterije iz roda *Microcystis*, kao globalno najčešći producenti, a zatim vrste rodova *Planktothrix* i *Anabaena* (Izaguirre i sar., 2007; Sivonen, 2009). Neki sojevi iste vrste cijanobakterija mogu biti producenti mikrocistina, dok drugi nemaju tu sposobnost. Toksični sojevi se od netoksičnih ne mogu razlikovati na osnovu klasične morfološke taksonomije, već pomoću molekularnih metoda kojima se utvrđuje prisustvo gena za biosintezu toksina (Rouhiainen, 2003).

Mikrocistini predstavljaju veoma raznovrsnu grupu hemijskih jedinjenja, koju čine više od 200 strukturnih varijanti mikrocistina (Spoof i Catherine, 2016), među kojima je mikrocistin-LR najčešći (Pearson i sar., 2010; Zurawell i sar., 2005; Niedermeyer i sar., 2014). Koristeći HPLC-DAD tehniku, toksin mikrocistin-LR je identifikovan i kvantifikovan u metanolnom ekstraktu testiranog soja *Anabaena* sp. Ovaj toksin je kvantifikovan na osnovu pikova u hromatogramima standardnih rastvora i uzoraka, na osnovu čega je registrovana njegova koncentracija od približno 1.9 µg/g suve mase cijanobakterije. Ranija ispitivanja su pokazala da se sadržaj MC-LR u cijanobakterijskim sojevima koji izazivaju cvetanje na teritoriji Republike Srbije kreće u rasponu od 0,19 do 9,16 µg/mg suve mase (Simeunović i sar., 2010). Sadržaj mikrocistina toksičnih sojeva *Anabaena* roda, izolovanih iz Baltičkog mora se kretao u rasponu od 1,3 do 3,9 µg/mg suve mase (Halinen i sar., 2007). Najveća zabeležena koncentracija mikrocistina iz uzoraka cijanoakterijskih cvetanja je 7,300 µg/g suve mase, zabeležena u Kini i Portugalu (Bartram, 1999).

Koncentracija toksina je određena iz suve mase kulture *Anabaena* sp. koja je kultivisana u standardnim laboratorijskim uslovima, u standardnoj tečnoj podlozi za kultivaciju cijanobakterija BG-11. Masa korišćena za detekciju i kvantifikaciju toksina je pripremljena

kada je kultura *Anabaena* sp. bila u stacionarnoj fazi rasta. Imajući u vidu da količina toksina zavisi od uslova u kojima se određena kultura kultiviše, vršena je kultivacija *Anabaena* sp. i u prisustvu stresora, i to u koncentracijama koje će kasnije biti određene kao adekvatne za ispitivanje hroničnog efekta ove kulture u multistres uslovima.

5.2. Ispitivanje alelopatske (alelohemijske) aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR

Na osnovu relevantne literature zaključeno je da uloge cijanotoksina uopšte, kao i mikrocistina-LR (MC-LR), nisu u potpunosti razjašnjene. Alelopatski odnosi podrazumevaju stimulatorne i inhibitorne efekte na druge organizme kao i direktne i indirektne biohemijske interakcije (Rice, 1984). Ranija istraživanja pokazuju da cijanobakterijska jedinjenja mogu inhibirati rast drugih fitoplanktonskih organizama i mikroorganizama u vodi (Suikkanen i sar., 2004). Da bi ispitali kako detektovani toksin kod soja *Anabaena* sp., mikrocistin-LR, deluje na neke mikroorganizme koji se mogu naći u planktonu slatkih voda u neizmenjenim zajednicama fitoplanktona ili kao kontaminenti voda, vršeno je ispitivanje dejstva na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije, ali i na soj zelene mikroalge *Chlorella* sp. U cilju ispitivanja uticaja cijanotoksina mikrocistin-LR na mikroorganizme u vodi postavljena su dva eksperimenta. U prvom je ispitano da li postoji antimikrobna aktivnost ovog cijanotoksina na neke od bakterija koje se često mogu naći u vodi, dok je u drugom eksperimentu praćen rast kulture *Chlorella* sp. u prisustvu toksina.

Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je prepoznala mikrocistine kao globalnu pretnju po zdravlje ljudi, imajući u vidu da su ovi hepatotoksini do danas najistraženija grupa cijanotoksina. Pretpostavka je da se glavni unos mikrocistina u organizam čoveka odvija putem pijeće vode, dok se oni mogu uneti i hranom koja je kontaminirana ovim toksinima (alge, ribe, školjke, itd...) (WHO, 1998). Na osnovu mnogih kliničkih istraživanja sprovedenih širom sveta, MC-LR je prepoznat kao najčešća i najtoksičnija varijanta mikrocistina, što je dovelo do potrebe da se donesu regulative koje bi definisale nivo dozvoljenih vrednosti ovog toksina u vodi za piće.

U smernicama koje su date od strane SZO definisana je vrednost koncentracije cijanotoksina MC-LR od 1 µg/l vode, koja predstavlja nivo preko kojeg se voda za piće ne smatra bezbednom za upotrebu (WHO, 1998).

Pregledom literature je ustanovljeno da se poslednjih godina na teritoriji Republike Srbije sprovode opsežna istraživanja prisustva cijanotoksina u površinskim vodama. Na lokalitetu Bačko gradište, kanala Dunav-Tisa-Dunav, 2006. godine je zabeležena koncentracija MC-LR od 346,85 µg/l (Simeunović, 2009). Ispitivanja sprovedena na rečnim ekosistemima su pokazala da je u reci Ponjavici zabeležene najviša koncentracija MC-LR od 1,5 µg/l (Natić i sar., 2012), dok je najviša koncentracija MC-LR od 79,6 µg/l zabeležena u reci Krivaji

(Simeunović, 2009). Na teritoriji Centralne Srbije je zabeležena najveća koncentracija mikrocistina od 650 µg/l, u akumulaciji Ćelije, koja služi za snabdevanje vodom za piće (Svirčev i sar., 2009). Prvi podaci o detekciji cijanotoksina u površinskim vodama na teritoriji Republike Srbije su objavljeni 2010. godine, gde je navedeno da je iz jezera Lugoš najviša zabeležena koncentracija toksina MC-LR bila 603.61 µg/l (Simeunović i sar., 2010).

Na osnovu pregledane literature, ustanovljeno je da se MC-LR u vodama slatkovodnih basena može naći u opsegu koncentracija od najmanjih koje se mogu detektovati (0.1 µg/l na osnovu HPLC metode) do najviše zabeleženih 650 µg/l. Zbog navedenih podataka iz pregledane literature, zaključeno je da bi za ovo istraživanje bilo prikladno izabrati sredinski relevantnu koncentraciju toksina od 10 µg/l, koja se može javiti u eutrofnim vodama prilikom cvetanja cijanobakterija koje produkuju MC-LR.

5.2.1 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti cijanotoksina mikrocistin-LR

Mikrocistin-produkujuće cijanobakterije istovremeno se javljaju sa složenom i dinamičnom zajednicom slobodno živećih heterotrofnih bakterija (Berg i sar., 2009; Louati i sar., 2015; Parveen i sar., 2013), zbog čega se postavlja ekološko pitanje: kako mikrocistin utiče na fiziologiju heterotrofnih bakterija istovremeno sa cvetanjem? Primenom opsega koncentracija cijanotoksina MC-LR, od najviše 10 µg/l do najniže 0.078 µg/l, nije bilo inhibitornog dejstva ni na jednom od testiranih sojeva mikroorganizama (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, izolat *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživanja, u kojima je takođe izostala antimikrobna aktivnost ovog toksina. U ispitivanju delovanja toksina na određene vrste bakterija, antimikrobna aktivnost na soj *Escherichia coli* je izostala, dok je antimikrobna aktivnost hidrofobnih antibiotika primenjenih u kombinaciji sa mikrocistinom bila smanjena (Dixon i sar., 2003). Da mikrocistin nema efekta na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije pokazalo je i istraživanje koje su sproveli Foxhall i Sasner (1981). Mikrocistini (MC-LR i MC-RR) nisu imali inhibitorno dejstvo po vrste *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Aeromonas hydrophila* i *Escherichia coli*, u primenjenim koncentracijama do 8 mg/l (Ostenvik i sar., 1998). Koncentracije MC-LR od 1 mg/l i 10 mg/l nisu uticale na stopu rasta *E. coli* (Martin i sar., 2017). Ranija ispitivanja antimikrobne aktivnosti cijanobakterija su uglavnom bila vršena testiranjem ekstrakata koji su u sebi sadržali MC-LR, a ne izolovanih toksičnih produkata (Østensvik i sar., 1998). Tako je pokazano da metanolni ekstrakti cijanobakterija koje su producenti mikrocistina, *Romeria*

gracilis i *Synechocystis aquatilis* su inhibirali rast Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, dok su etanolni ekstrakti istih cijanobakterija inhibirali rast Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (Barboza i sar., 2017).

Razlog zbog kojeg MC-LR, ili mikrocistini uopšteno, nemaju antimikrobnu aktivnost na ispitivane bakterije možda leži u sposobnosti testiranih bakterija da vrše degradaciju mikrocistina. Ishii i saradnici su 2004. godine dokazali da soj Gram-negativne bakterije iz roda *Sphingomonas* ima sposobnost kompletne degradacije mikrocistina-LR, -LY, -LW i -LF nakon 4 dana od dodavanja ovih toksina u koncentraciji od 6 µg/ml. Istraživanje sprovedeno na cijanotoksinu MC-LR je pokazalo da u procesu njegove degradacije od strane bakterijskog soja iz roda *Sphingomonas* posreduju najmanje tri intracelularna hidrolitička enzima (Bourne i sar., 1996). Jedan od razloga zbog kojeg MC-LR nema inhibitorno dejstvo na bakterije je možda nepostojanje mehanizama, odnosno odgovarajućih nosača koji bi toksin uneli u ćeliju. Većina Gram-negativnih bakterija je otporno na toksične agense u životnoj sredini, pa samim tim i na mikrocistine, zbog posedovanja spoljašnje mebrane koja čini efikasnu barijeru (Dixon i sar., 2004).

Da mikrocistini mogu imati antimikrobno dejstvo pokazuje istraživanje u kojem je MC-LR u koncentraciji od 5 mg/l i višim od nje, inhibirao rast *E. coli* (Valdor i Aboal, 2007).

Sa druge strane, postavlja se pitanje da li cijanotoksin MC-LR može vršiti stimulaciju rasta onih bakterija na koje nema antimikrobnu ativnost? Stimulaciju rasta soja *Pseudomonas putida* mikrocistinima (mikrocistin-RR) zabeležili su Lahti i saradnici (1995). U tom slučaju bi prisustvo cijanotoksina MC-LR u vodenim ekosistemima moglo uticati na veću stopu rasta mikroorganizama koji su prisutni u njima. Imajući u vidu da su mikrocistini u većoj meri prisutni u samim ćelijama njihovih producenata nego u ekstracelularnom prostoru, ovi toksini postaju dostupniji drugim mikroorganizmima prilikom lize ćelija cijanobakterija (Jones i Orr, 1994). Prilikom cvetanja cijanobakterija dolazi do formiranje velikog broja njihovih ćelija, što bi značilo da prilikom odumiranja ćelija toksičnih sojeva može doći do otpuštanja velike količine cijanotoksina u vodeni sistem, što eventualno dalje vodi ka razmnožavanju bakterija čiji je rast stimulisan cijanotoksinima.

Izostankom antimikrobne aktivnosti MC-LR na testirane bakterije, u koncentraciji od 10 µg/l, postavlja se pitanje da li je primenjena koncentracija toksina mala kako bi imala negativan efekat na bakterije. Iako su rezultati ranijih istraživanja oprečni, zaključak je da samo visoke doze mikrocistina, koje su nekada i više od sredinski relevantnih, mogu imati

inhibitorno dejstvo na heterotrofne bakterije koje koegzistiraju sa cijanobakterijama, ili se mogu naći kao kontaminenti vode usled fekalnih zagađenja.

5.2.2 Ispitivanje uticaja cijanotoksina MC-LR na rast zelene mikroalge *Chlorella* sp.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da MC-LR, u koncentraciji od 10 µg/l, nije imao inhibitorni efekat na rast kulture *Chlorella* sp. Naprotiv, poređenjem rasta ove kulture u prisustvu toksina sa rastom kulture u standardnim uslovima, utvrđeno je da je MC-LR delovao stimulativno na rast *Chlorella* sp. Rast kulture je praćen na osnovu merenja koncentracije hlorofila a u periodu od 6 nedelja, gde je duplo veća stopa rasta *Chlorella* sp. zabeležena već u prvoj nedelji kultivacije.

Istraživanja su pokazala da neki pripadnici fitoplanktona mogu biti producenti jedinjenja koja vrše inhibiranje procesa fotosinteze kod drugih pripadnika fitoplanktona (Singh i sar., 2001; Pflugmacher, 2002). Jako algicidno dejstvo cijanotoksina mikrocistin-LR na vrste *Nostoc muscorum* i *Anabaena* BT1, mehanizmom inhibicije fotosinteze i smanjenjem nitrogenazne aktivnosti je dokazano primenom toksina u koncentraciji od 50µg/ml (Singh i sar., 2001). U istraživanju alelopatskog potencijala cijanotoksina MC-LR na akvatične makrofite *Ceratophyllum demersum* i *Myriophyllum spicatum* dokazano je da ovaj toksin inhibira njihov rast, vrši redukciju fotosintetske produkcije kiseonika i dovodi do promena u obrascu pigmenata (Pflugmacher, 2002). U pomenutom istraživanju su primenjene koncentracije MC-LR od 0,5 do 5 µg/l, gde je zapaženo da je i najmanja koncentracija imala inhibitorni efekat na fotosintetsku produkciju kiseonika vrste *C. demersum*, dok je najviša koncentracija izazvala inhibiciju istog procesa u mnogo većem procentu. Koncentracija MC-LR od 0,5 µg/l nije inhibirala proces fotosinteze soja zelene mikroalge *Scenedesmus armatus* (Pietsch i sar., 2001).

Izostanak negativnog efekta i postojanje pozitivnog efekta toksina MC-LR na sojeve eukariotske fitoplanktonske alge su dokazana i u drugim istraživanjima. Primena ekstrakata *Microcystis aeruginosa* i *Aphanizomenon ovalisporum* koji su sadržali MC-LR u koncentracijama 0.025–2.5 mg/l na sojeve zelenih algi *Nannochloropsis* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, i *Chlorella vulgaris* je rezultirala stimulacijom njihovog rasta. Stimulativno dejstvo ekstrakata cijanobakterija na rast mikroalgi je uglavnom bilo objašnjeno prisustvom drugih organskih materija u ekstraktima koji mogu poslužiti kao hrana mikaroalgama (Pinheiro i sar., 2013).

Stimulacija rasta mikro i makroalgi je takođe dokazana i u istraživanjima u kojima su korišćeni čisti mikrocistini, ali uglavnom u koncentracijama znatno višim (od 0.1 do 8 mg/l) (Sedmak i Kosi, 1998; Ou i sar., 2005; Pinheiro i sar., 2013) nego u ovom istraživanju. Nasuprot stimulacije rasta, određena istraživanja su pokazala da čisti mikrocistini u koncentracijama od 0.001 do 25 mg/l mogu inhibirati rast fitoplanktona (Babica i sar., 2007; Mohamed, 2008).

Rastvoreni mikrocistini se u vodama najčešće mogu naći u koncentracijama manjim od 0,01 mg/l, i vrednosti ovih toksina se u rasponu od 5×10^{-5} do 5×10^{-3} mg/l smatraju tipičnim za vodene ekosisteme sa masivnim cijanobakterijskim razvojem (Babica i sar, 2006).

Jedan od razloga zbog kojeg soj *Chlorella* sp. ima veću stopu rasta u prisustvu toksina u odnosu na standardne uslove može biti i razgradnja mikrocistina-LR što oslobađa ugljenik iz njega, koji testirana mikroalga može dalje iskoristiti u svom metabolizmu. Naime, Cousins i saradnici (1996) su postavili hipotezu da usled degradacije cijanotoksina MC-LR dolazi do procesa mineralizacije, odnosno konverzije ugljenika iz MC-LR u CO_2. Ukoliko je ova hipoteza tačna, ugljenik iz toksina je u obliku CO_2 postao lako dostupan soju *Chlorella* sp., što je pospešilo rast ove mikroalge. Sa druge strane, potencijal koji mikrocistin-LR ima za inhibiranje cijanobakterija, ostavlja prostor da cijanobakterije-producenti ovog toksina na taj način sebi ostavljaju prostor za dominiranjem nad drugim cijanobakterijama.

Dobijeni rezultati ukazuju da mikrocistin-LR, u relativno niskim i sredinski relevantnim koncentracijama, ima alelopatsku aktivnost i to u smislu stimulacije rasta zelene mikroalge *Chlorella* sp. Ovakav rezultat upućuje na dalja istraživanja koakcija cijanobakterija i ostalih fotoautotrofa u akvatičnim ekosistemima kako bi se utvrdili mehanizmi putem kojih mikrocistin-LR utiče na rast drugih vrsta organizama.

5.3. Uticaj stresora na rast fitoplanktona

Da bi se utvrdilo kako testirani sojevi fitoplanktona, cijanobakterija *Anabaena* sp. i mikroalga *Chlorella* sp., rastu u prisustvu određenih stresora (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-} i Cd^{2+}), postavljen je eksperiment u kojem je standardna BG-11 podloga modifikovana. Za stresore su izabrana jedinjenja u koncentracijama koje su korišćene u finalnom eksperimentu u kojem se ispitivao hronični uticaj toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve *C. riparius*.

5.3.1. Uticaj stresora na rast i produkciju MC-LR soja *Anabaena* sp.

Najveća stopa rasta je zabeležena u medijumu u kojem je bilo dodato jedinjenje $NaNO_3$, i to u koncentraciji od 200 mg/l, dok je kadmijum (Cd^{2+}) imao toksičan efekat po soj *Anabaena* sp. Cijanobakterije roda *Anabaena* su azotofiksatorske vrste, što za njihovu kultivaciju u laboratorijskim uslovima, kao i za rast u vodenim ekosistemima ne zahteva prisustvo azota u medijumu odnosno vodi, jer ga usvajaju iz atmosfere.

Kao česti stresori u vodama se javljaju nitrati i amonijumovi joni, koji vodenim organizmima predstavljaju izvor azota (Chen i sar., 2011). Mnogi sojevi cijanobakterija mogu koristiti ova neorganska jedinjenja kao izvor azota, pri čemu redukcija nitrata u nitrite zahteva trošenje znatne količine energije, zbog čega se smatra da je usvajanje amonijuma od strane ćelija energetski efikasnije (Safafar i sar., 2016). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su za rast soja *Anabaena* sp. nitrati efikasniji izvor azota, u odnosu na amonijumove jone. Razlog tome je najverovatnije velika količina nitrata u modifikovanom medijumu (200 mg/l) u odnosu na količinu amonijumovih jona (39,84 mg/l). Inače, gledano sa staništa ćelijske „ekonomičnosti“, količina energije koja je potrebna za asimilaciju različitih azotnih supstrata se uvećava sledećim redom: NH_4^+, NO_3^- i N_2 (Guerrero i Lara, 1987).

Nitrati su neophodni kako bi se odvijala sinteza proteina u cijanobakterijama. Redukcija nitrata i fiksacija azota su primarni enzimski sistemi od kojih zavisi količina azota u azotofiksirajućim cijanobakterijama (Bone, 1971). Pozitivan efekat nitrata u podlozi na rast soja *Anabaena flos-aque* su dokazali Oleson i Makarewicz, 1990. godine. U njihovom istraživanju je utvrđeno da usvajanje azota u mnogome zavisi od prisustva natrijuma, jer natrijum kontroliše aktivnost nitrat-reduktaze. Manjak natrijuma može dovesti do izgladnjivanja ćelija azotom, što dalje može izazvati redukciju sinteze proteina, degradaciju proteina (Ownby i sar., 1979) i smanjenje stope rasta cijanobakterija (Oleson i Makarewitz, 1990). Nasuprot pomenutom istraživanju, Choi i Markakis (1981) su utvrdili da $NaNO_3$ može

smanjiti prinos ćelija soja *Anabaena flos-aque*, dok urea i pepton značajno ne utiču na rast ovog soja.

Iako se smatra da azot ne može biti limitirajući faktor cvetanja azotofiksirajućih cijanobakterija (Schindler i sar., 2008; Schindler i sar., 2012), ovo istraživanje je pokazalo da veća koncentracija nitrata u medijumu može pospešiti rast soja *Anabaena* sp. Imajući u vidu da je za ispitivanje rasta soja *Anabaena* sp. u prisustvu nitrata korišćen rastvor $NaNO_3$, pretpostavka je da je na usvajanje azota iz podloge uticaj imao i prisutan natrijum iz jedinjenja. Svi ostali stresori su izazvali smanjenu stopu rasta u odnosu na standardne uslove kultivacije u podlozi koja pri tom ne sadrži izvor azota, nitrate i amonijumove jone, ali sadrži skoro duplo manju koncentraciju fosfata (21,8 mg/l) u odnosu na primenjenu koncentraciju (39,84 mg/l) u eksperimentu.

Duplo veća koncentracija fosfata u modifikovanoj podlozi je rezultovala smanjenjem stope rasta soja *Anabaena* sp. u odnosu na standardnu podlogu za kultivaciju cijanobakterija. Rezultati ranijih istraživanja su pokazali da povećana koncentracija fosfata u vodi može dovesti do proliferacije cijanobakterija (Seale i sar., 1987). Velika koncentracija fosfata u vodi se smatra glavnim uzrokom cvetanja cijanobakterija iz roda *Microcystis* (Kim i Kang 1993, Lee i sar., 1998). Prekomerna količina fosfora je najčešći uzrok eutrofikacije jezera i drugih vodenih ekosistema, gde koncentracije od 0,1 mg/l predstavljaju neprihvatljivo visok nivo fosfora (Correll, 1998). Pretpostavka je da tako visoke koncentracije fosfora mogu dovesti do proliferacije fitoplanktona, kojem eutrofni uslovi odgovaraju. Imajući u vidu da je primenjena koncentracija fosfora u eksperimentu bila značajno visoka, dok azota u podlozi nije bilo, smanjena stopa rasta soja *Anabaena* sp. je možda izazvana velikom razlikom u odnosu N:P.

Produkcija toksina MC-LR

Na osnovu pretpostavke da cijanobakterije proizvode najviše toksina u uslovima koji su povoljni za njihov rast (Sivonen, 2009), rezultati ovog istraživanja ukazuju da je *Anabaena* sp. produkovala najviše MC-LR u standardnim uslovima kultivacije, u BG-11 podlozi bez prisustva azota. Iako je najveći rast ove cijanobakterije zabeležen u uslovima prisustva NO_3^- u podlozi, produkcija MC-LR je bila znatno manja u odnosu na standardne uslove. U podlozi sa većom koncentracijom fosfata od standardnih uslova je takođe produkovano znatno manje MC-LR, dok u podlozi sa amonijumovim jonima toksin MC-LR nije detektovan. Sa druge strane, pretpostavka da je veća produkcija sekundarnih metabolita, u koje spadaju i mikrocistini, često odgovor na abiotičke i biotičke faktore stresa (Kultschar i Llewellyn, 2018), može se zaključiti

da primenjene koncentracije NO_3^-, NH_4^+ i PO_4^{3-} nisu delovale stresogeno na soj *Anabaena* sp., osim kadmijuma.

Biomasa ćelija dobijena iz svih tretmana kultivacije je pripremana, za ispitivanje prisustva MC-LR, nakon 35 dana kultivacije. Kultura *Anabaena* sp. je u tom momentu u svim tretmanima bila u stacionarnoj fazi, što je dokazano izostankom velikih varijacija u koncentraciji hlorofila a u poslednja tri merenja. Zabeležena je mala količina MC-LR u odnosu na veliku biomasu ćelija (visoku koncentraciju hlorofila) u medijumu obogaćenom nitratima, dok je znatno veća koncentracija MC-LR zabeležena u standardnom kontrolnom tretmanu, gde je koncentracija hlorofila a bila duplo manja. Samim tim, visoka koncentracija hlorofila, što je posledica velikog broja ćelija toksične cijanobakterije u medijumu, nije dobar indirektni pokazatelj koncentracije toksina MC-LR u ćelijama toksične cijanobakterije.

U ovom istraživanju je vršeno određivanje intracelularnog MC-LR, međutim, ekstracelularna frakcija MC-LR nije uzimana u obzir. Razlog ovakvom pristupu ispitivanja leži u podacima datim u pregledanoj literaturi, gde je navedeno da se produkovani MC-LR većim delom nalazi u samim ćelijama producenta, dok se njegovo oslobađanje u ekstracelularni prostor dešava prilikom lize ćelije (Kim i sar., 2009). Jedan od razloga za manju količinu intracelularnog toksina u ćelijama kulture *Anabaena* sp. kultivisanim u prisustvu NO_3^- može biti to što je analiza rađena u kasnoj stacionarnoj fazi. Ranija istraživanja su pokazala da se najviše mikrocistina produkuje u kasnoj eksponencijalnoj fazi (Briand i sar., 2012), ili kada producent uđe u stacionarnu fazu rasta (Simeunović, 2009). Drugi razlog može biti da su nitrati prisutni u medijumu povećali oslobađanje intracelularnih supstanci usled povećanja propustljivosti membrane, što je bio slučaj u istraživanju koje je vršeno na soju *Microcystis aeruginosa* (Chen i sar., 2011).

5.3.2. Uticaj stresora na rast soja *Chlorella* sp.

Već je opisan uticaj toksina mikrocistin-LR na rast soja *Chlorella* sp, gde je na osnovu rezultata utvrđen stimulišući efekat toksina na ovaj soj zelene mikro alge. Ostali stresori su bili prisutni u duplo manjim koncentracijama od LC_{20} za *C. riparius* larve prvog stupnja.

Nitrati su u modifikovanoj podlozi bili u koncentraciji od 200 mg/l, dok je u kontrolnoj podlozi BG-11 koncentracija nitrata iznosila 1500 mg/l. Imajući u vidu da je stopa rasta *Chlorella* sp. bila skoro ista u kontrolnoj i modifikovanoj podlozi, manjak nitrata nije delovao stresno po ovaj soj fitoplanktona. Mikroalge se smatraju efikasnim agensima za uklanjanje nitrata iz vode, pri čemu mikroalge vrše asimilaciju azota koji konvertuju u biomasu (Taziki i

sar., 2016). Do inhibicije rasta *Chlorella vulgaris* je dovela visoka koncentracija NO_3^- od 3000 mg/l (Taziki i sar., 2016). Relativno niska koncentracija NO_3^- (200 mg/l) u podlozi nije u velikoj meri uticala na rast soja *Chlorella* sp., ali je najverovatnije uticala na njen hemijski sastav, imajući u vidu da u uslovima bez NO_3^- dolazi do nagomilavanja lipida u ćelijama *Chlorella* sp.

Viša koncentracija NH_4^+ u modifikovanoj podlozi je inhibirala rast soja *Chlorella* sp., u poređenju sa standarnom BG-11 podlogom. Mehanizam kojim bi višak NH_4^+ inhibirao rast ove mikroalge nije poznat, jer je soj *Chlorella vulgaris* rastao i u koncentracijama do 1000 mg/l (Tam i Wong, 1996). Imajući u vidu da je modifikovana BG-11 podloga osim NH_4^+ u višku imala i NO_3^- (1500 mg/l) kao izvor azota, moguće je da je *Chlorella* sp. favorizovala usvajanje NH_4^+, koji je sadržao manje azota od NO_3^-. Asimilacija NO_3^- kod algi je proces koji reguliše enzim nitrat reduktaza, čiju sintezu indukuju NO_3^- i svetlo, dok represiju njene sinteze mogu izazvati NH_4^+ i amino kiseline (Ullrich i sar., 1981).

Mikroalge su organizmi koji su efikasni u odstranjivanju nutrijenata iz otpadnih voda, naročito fosfora (Hoffmann, 1998; Patel i sar., 2012). Povećana koncentracija fosfora (fosfata) u vodama je opisana kao faktor koji može dovesti do proliferacije fitoplanktona, pa bi očekivani rezultat povećanja koncentracije PO_4^{3-} bila i veća stopa rasta soja *Chlorella* sp. Nasuprot očekivanju, rast je znatno manji u uslovima povećane koncentracije PO_4^{3-} (435 mg/l) u odnosu na standardne uslove (20 mg/l) koji su služili kao kontrola. Smanjena stopa rasta *Chlorella* sp. u uslovima povećane koncentracije PO_4^{3-} u odnosu na kontrolne uslove je zabeležena i u ranijem istraživanju (Patel i sar., 2012). Linearan rast *Chlorella* sp. i niža produktivnost biomase su najverovatnije uzrokovani viškom PO_4^{3-} koji nije praćen sa dovoljno potrebne svetlosti i/ili vazduha za obezbeđivanje energije (Aitchison i Butt, 1973; Patel i sar., 2012).

5.4. Testiranje različitih režima ishrane na rast i razviće larvi C. *riparius* na osnovu OECD protokola broj 218

Rezultati ove studije pokazuju da larve *C. riparius* mogu preživeti ukoliko se za njihovu ishranu koriste samo ćelije mikroalgi, čime je potvrđena ekološka relevantnost model organizma koji je odabran. Larve hironomida pokazale su visoku stopu preživljavanja u svim tretmanima i kontroli u ovom eskperimentu, što ukazuje na to da ni jedan tip testirane hrane ne utiče značajno na stopu njihovog preživljavanja. Međutim, daljim analizama utvrđena je velika varijabilnost u masenim i morfološkim parametrima larvi izmedju tretmana. Larve hranjene suvom masom algi postigle su najveću masu, dok su manju masu imale jedinke hranjene kvascem, zatim larve iz kontrolnog tretmana hranjene TetraMin® hranom. Larve hranjene svežom masom alge *Chlorella* sp. i biofilterom imale su značajno manju masu od ostalih tretmana, čak petostruko manje od larvi hranjenih suvim algama. Slično ovome, najviše vrednosti morfometrijskih parametara su zabeležene kod larvi hironomida koje su hranjene suvom hranom (TetraMin®, kvasac i suva masa algi; Tabela 9). Larve koje su tretirane svežom biomasom su bile značajno manje u pogledu veličine tela i glavene čaure (Tabela 9). Imajući u vidu dobijene rezultate, dalja istraživanja bi trebalo usmeriti u pravcu ispitivanja trenda preferencije suve u odnosu na vlažnu hranu i uzroke povećanja veličine larvi u tretmanima sa suvom prehranom.

Rezultati ovog istraživanja, vezani za ispitivanje prehrane larvi, su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija na istu temu. U istraživanju koje je sproveo Habashy (2005) vršeno je ispitivanje uticaja tri vrste hrane na larve hironomida (TetraMin®, žive ćelije algi i kvasac), pri čemu su rezultati pokazali da se najvećom dužinom i masom tela odlikuju larve hranjene TetraMin®-om, zatim larve hranjene kvascem i na kraju, najmanje vrednosti pomenutih parametara su zabeležene kod larvi hranjenih živim ćelijama algi. Sredinom 20. veka, pažnja mnogih istraživača je bila usmerena ka određivanju nutritivnog potencijala algi, pre svega radi ljudske konzumacije (Kovač i sar., 2013). Danas, masovna proizvodnja kultura jednoćelijskih algi, kao hrane za larve riba, rakova i mekušaca u vodi, zbog svojih nutritivnih vrednosti postala je veoma zastupljena (Ścieszka i Klewicka, 2019).

Visoke vrednosti mase i dužine larvi u ovom eksperimentu pokazale su se i kod jedinki hranjenih kvascem. Kvasci se mogu direktno koristiti kao hrana za larve mnogih vrsta u akvakulturi, ali se najčešće koriste kao hrana za zooplankton, kojim se kasnije hrane larve (Das i sar., 2012).

Da su mikroalge dobar izvor hrane larvama *C. riparius* i da ne izazivaju manju stopu preživljavanja u odnosu na kontrolnu hranu, dokazali su rezultati ovog eksperimenta. Iako je suva masa algi uticala na bolji rast larvi, u realnim uslovima vodenih ekosistema suva masa fitoplanktona je nedostupna ovim bentosnim organizmima. Zbog relativno lake kultivacije soja *Chlorella* sp. u laboratorijskim uslovima, moguće je predložiti suvu masu ovog soja kao kontrolnu hranu larvama *C. riparius* prilikom održavanja laboratorijskih kultura, ili prilikom ishrane kontrolnih grupa u eksperimentima. Ova studija, iako zasnovana na *ex situ* ispitivanjima, ima za cilj da simulira uticaj fitoplanktona na larve *C. riparius* u *in sit*u uslovima, sličnim prirodnoj sredini. U cilju postizanja što realnijih uslova, dalje ispitivanje je nastavljeno tretiranjem larvi suspenzijom svežih ćelija, a ne sušenim ćelijama fitoplanktona.

5.5. Hemijski sastav sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. i larvi hranjenih različitim tipovima hrane

Hranljiva vrednost nekog izvora hrane se utvrđuje analiziranjem zastupljenosti sastojaka u njemu (Tuncturk i sar., 2015; Napiórkowska-Krzebietke, 2017). Određivanjem procentualne zastupljenosti hranljivih sastojaka utvrđeno je kakav izvor proteina, ugljenih hidrata, masti i masnih kiselina predstavljaju sojevi fitoplanktona koji su korišćeni u ovom istraživanju. Imajući u vidu da hemijski sastav neke vrste zavisi i od faze rasta u kojoj se nalazi, bilo je potrebno ispitati hranljivu vrednost fitoplanktona u momentu u kojem je bio primenjen u eksperimentu. Oba soja fitoplanktona su analizirana u stacionarnoj fazi njihovog rasta. Osim fitoplanktona, ovoj analizi su podvrgnute i larve koje su njime hranjene, kao i drugim izvorima hrane opisanim u prethodnom eksperimentu.

Da bismo utvrdili značaj fitoplanktona za larve u nutritivnom pogledu, urađena je analiza hemijskog sastava testiranog soja zelene mikroalge, *Chlorella* sp. Nakon prvog eksperimenta u kojem je ispitana prehrana larvi, utvrđeno je da testirani soj *Chlorella* sp. može zadovoljiti potrebe u prehrani larvi *C. riparius* i omogućiti razvoj od prvog do krajnjeg četvrtog razvojnog stadijuma larvi. Ipak, utvrđeno je da morfometrijski parametri larvi hranjenih suspenzijom ćelija *Chlorella* sp. imaju manje vrednosti u odnosu na kontrolnu hranu i ostale sušene/dehidrovane tretmane.

Kako bi dalja istraživanja uticaja fitoplanktona na larve *C. riparius* proširili, uključen je i soj cijanobakterije *Anabaena* sp. Prethodnim analizama je utvrđeno da je navedeni soj toksičan i da produkuje jedan od najčešćih i najpotentnijih cijanotoksina, MC-LR. Osim toksina, poznato je da cijanobakterije mogu produkovati i biti bogat izvor proteina i masnih kiselina, kao i vitamina i minerala. Sam hemijski sastav cijanobakterija i fitoplanktona uopšte zavisi i od uslova u kojima se vrši njihova kultivacija, odnosno od sastava medijuma.

Proteini čine veliki deo biomase aktivno rastućih mikro algi i cijanobakterija, koji se kreće od oko 30% do oko 55% suve mase (Vargas i sar., 1998; López i sar., 2010). Hemijske analize su pokazale da je testirani soj *Chlorella* sp. sadržao 46% proteina, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima proteinskog sastava *Chlorella* vrsta (Lubitz, 1963; Berliner, 1986; Seyfabadi i sar., 2011). Osim procentualne zastupljenosti proteina u ćelijama *Chlorella*, dokazano je da su proteini ove mikroalge bogati amino kiselinama kao što su asparaginska kiselina, serin, alanin, leucin i glicin, što daje određeni kvalitet ovim proteinima (Lubitz, 1963; Enyidi, 2017). Testirani soj *Anabaena* sp. je sadržao 42% proteina što je u skladu sa ranijim

istraživanjem (Vargas i sar., 1998), koje je pokazalo da se u većini azotofiksirajućih cijanobakterija sadržaj proteina kreće iznad 40%. Na primeru roda *Nostoc*, takođe azotofiksirajuće cijanobakterije, je utvrđeno da se procenat proteina povećava ukoliko se u sredini u kojoj raste nalaze i nitrati kao izvor azota (Bagchi i sar., 1985).

Ugljenih hidrata u suvoj materiji soja *Chlorella* sp. je bilo 20%, dok su neka istraživanja pokazala da ih u ćelijama *Chlorella* može biti i preko 50% (Ho i sar., 2012). Ugljeni hidrati u ćelijama zelenih mikro algi su smešteni u ćelijskom zidu, obogaćeni celulozom bez sadržaja lignina i hemiceluloze, ali i u citoplazmi sa skrobom kao glavnim izvorom ugljenih hidrata (Rosenberg i sar., 2008; Subhadra i Edwards, 2010). Sam sadržaj ugljenih hidrata zavisi od vrste ali i od uslova kultivacije, što pokazuje primer „izgladnjivanja“ azotom koji je doveo do akumuliranja 51.3% ugljenih hidrata u ćelijama *C. vulgaris* (Ho i sar., 2013). Zastupljenost ugljenih hidrata u suvoj masi analiziranog soja *Anabaena* sp. je bio 25%, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima u kojima su različite vrste roda *Anabaena* sadržale od 22 do 28% ugljenih hidrata (Vargas i sar., 1998). Cijanobakterije akumuliraju glikogen kao rezervu ugljenih hidrata, nastalog od ugljenika iz CO_2 fiksiranog fotosintezom, koji služi kao glavno intracelularno skladište ugljenika i energije tokom fotosinteze (De Porcellinis i sar., 2017).

Lipidi su jedna od najvažnijih komponenti živih organskih supstanci, koji u znatnoj meri određuju strukturno-funkcionalne osobenosti i energetski potencijal i ćelije i organizma u celini. Lipidni sadržaj mikroalgi je u obliku glicerola i masnih kiselina, od kojih neke mogu biti sintetisane samo od strane mikroalgi (Basova, 2005), zbog čega je u ovom istraživanju osim ukupnih lipida određen i sastav masnih kiselina. Ukupni lipidi u ćelijama fitoplanktona mogu najšeće biti zastupljeni od 2 do 44 procenata, u zavisnosti od vrste i uslova kultivacije (Basova, 2005). Minimalne vrednosti ovog parametra su zabeležene kod cijanobakterijskih vrsta iz rodova *Anabaena* oko 2% i *Oscillatoria* 6-7% (Sirenko i Kozitskaya, 1988), što je u skladu sa ovim istraživanjem koje je pokazalo da je soj *Anabaena* sp. sadržao 4,7% ukupnih lipida. U drugim istraživanjima je najveći procenat lipida 35-44% zabeležen kod *Bacillariophyta* (Basova, 2005), dok je kod *Chlorophyta* i roda *Chlorella* zabeleženo do 18% ukupnih masti (Dunstan i sar., 1992) što je u skladu sa ovim istraživanjem gde je kod soja *Chlorella* sp. ustanovljeno 9,4% ukupnih masti. Pod određenim uslovima, mikroalge mogu produkovati i do 85% lipida (Jay, 2018). Ranijim istraživanjima je utvrđeno da se najveća količina lipida nalazi u stacionarnoj fazi rasta fitoplanktona (Taub i Dollar, 1965; Materasi i sar., 1980; Basova, 2005). Većina istraživanja o masnim kiselinama u cijanobakterijama ukazuje na dužinu acilnog lanca od 18 ili manje atoma ugljenika, sa 16: 0, 16: 1, 18: 2 i ALA

kao glavne masne kiseline (Vargas i sar., 1998), što se dokazalo i u ovom istraživanju. Hemijska analiza soja *Chlorella* sp. je pokazala da najveću količinu masnih kiselina ovog soja čine polinezasićene masne kiseline (PUFA), i to metil-linolenat i metil-linoleat. Imajući u vidu da su za životinje i ljude linolna i linolenska kiselina neophodne, tj. esencijalne PUFA (Basova, 2005), ispitivani soj može biti od velike nutritivne vrednosti za bentosne makrobeskičmenjake. Prisustvo obe masne kiseline je utvrđeno i u soju *Anabaena* sp., ali u manjoj količini. Cijanobakterije su prilično promenljive u svom masno kiselinskom sastavu, sa značajnim razlikama koje se javljaju čak i unutar istog roda (Kenyon i sar., 1972; Murata i sar., 1992). Zbog svog sadržaja masnih kiselina, zelene mikroalge, i *Chlorella* među njima, predstavlja dobru sirovinu za produkciju biogoriva (Chen i sar., 2018).

Iako je hranljiva vrednost određena na osnovu sastava suve mase fitoplanktona, ostaje nerazjašnjeno iz kog razloga su larve *C. riparius* koje su hranjene dehidrovanom masom *Chlorella* sp. bile krupnije od larvi hranjenih suspenzijom ćelija istog soja. Dehidratacija ćelija ne dovodi do promene njihovog hemijskog sastava, osim mogućeg smanjenja dimenzija samih ćelija koje na taj način eventualno postaju lakše za usvajanje i varenje od strane konzumenata, odnosno larvi. Da li sadržaj vode u ćeliji izaziva neku vrstu organoleptičke repelencije larvama *C. riparius*, predstavlja pitanje na koje treba odgovoriti daljim istraživanjima.

5.6. Ispitivanje uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na *C. riparius* larve na osnovu OECD protokola broj 218

Rezultati koji su pokazali da fitoplankton može biti pogodan izvor hranljivih materija larvama hironomida, poslužili su kao osnova za ispitivanje uticaja toksičnog soja *Anabaena* sp. i soja zelene mikroalge *Chlorella* sp., na larve *C. riparius*. Izabrani sojevi fitoplanktona su česti konstituenti cvetanja slatkovodnih ekosistema, samim tim mogu biti dostupni makrobeskičmenjacima koji nastanjuju isto vodeno stanište. Ovo je prvo ispitivanje koje ima cilj da otkrije i uporedi efekte toksičnih i netoksičnih sojeva fitoplanktona na bentosne larve *C. riparius*, merenjem bioloških parametara kod testiranih larvi.

Da li će larve hironomida u ishrani koristiti fitoplankton zavisi od osobina larvi (veličina, pokretljivost, sposobnost digestije) ali i cijanobakterija ili algi (veličina, lakoća prikupljanja, gustina, nutritivna vrednost), imajući u vidu da su neke filamentozne cijanobakterije i mikroalge relativno nesvarljive (Tarkowska-Kukuryk, 2013; Marten, 2007). Neka istraživanja su pokazala da su larve hironomida konzumenti algi u plitkim jezerima u kojima je fitoplankton dominantan, i takođe da je konzumiranje algi zavisno od taksona, bez ikakvih značajnih razlika tokom razvoja larvi (Tarkowska-Kukuryk, 2013). Nasuprot ovom istraživanju, istraživanje u okviru ove doktorske disertacije je pokazalo da su masa i koncentracija hemoglobina larvi hranjenih sojem *Chlorella* sp. značajno niži u odnosu na tretman sojem *Anabaena* sp. i TetraMin-om. Razlog ove pojave bi mogla da bude manja svarljivost soja *Chlorella* sp. (eukariot sa celuloznim ćelijskim zidom), u odnosu na svarljivost cijanobakterije *Anabaena* sp (prokariot bez celuloze u ćelijskom zidu). Usled prisustva rigidnog ćelijskog zida, koji je uglavnom sastavljen od celuloze, *Chlorella* sp. ne može biti u potpunosti usvojena od strane mnogih organizama (Yamada i Sakaguchi, 1982). Kapacitet svarljivosti celuloznih jedinjenja *Chironomus* larvi je nizak ili uopšte i ne postoji, dok neke larve mogu završiti svoj somatski razvoj konzumiranjem bakterija (Koroiva i sar., 2013).

Genotoksični efekat *Chlorella* sp. na larve nije bio značajan, što su pokazala i ranija istraživanja koja su bila sprovedena u cilju ispitivanja genotoksičnog i antigenotoksičnog efekta ovih mikroalgi, uglavnom na kičmenjacima. Na primer, vodeni ekstrakti *Chlorella* sp. su pokazali značajnu redukciju DNK oštećenja u kulturi fibroblasta mlađih i starijih individua čoveka (Makpol i sar., 2009). Takođe, zajednički tretman monosodijum glutamata i vodenog ekstrakta *Chlorella vulgaris* redukuje oštećenja DNK kod miševa (Makawy i sar., 2016). Ispitivanje koje su vršili Zamri i saradnici (2018) je pokazalo da je oštećenje DNK kod pacova

koji su bili izloženi duvanskom dimu redukovano nakon tretmana sa *Chlorella vulgaris*. Nasuprot navedenim primerima antigenotoksičnog efekta, postoje i ispitivanja koja su pokazala da *Chlorella* vrste mogu imati i genotoksičan efekat. Tako su Zhang i saradnici (2017) pokazali genotoksičan efekat *Chlorella vulgaris* faktora rasta (CGF) i vodenog ekstrakta na ćelije humanog karcinoma pluća (A549 and NCI- H460). Yusof i saradnici (2010) su pokazali da je DNK oštećenje bilo povećano u ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2) u svim koncentracijama (0-4 mg/ml) testiranih vodenih ektrakata. Na kraju, navedena ispitivanja pokazuju oprečne rezultate u pogledu efekta *Chlorella* vrsta, uglavnom njihovih ekstrakata, na DNK oštećenja kod različitih organizama, naglašavajući potrebu za daljim istraživanjima genotoksičnih efekata na živim organizmima u vodenim ekosistemima.

Pošto su masa i rast larvi hranjenih sa *Chlorella* sp. bili na niskom nivou, očekivano je bilo i da ostali metabolički parametri budu značajno izmenjeni u odnosu na drugi tretman i kontrolu. Nivo AOPP je bio značajno viši u larvama *C. riparius* koje su bile tretirane sojem *Chlorella* sp. nego u druge dve grupe. Povećana koncentracija AOPP u ovoj grupi larvi ukazuje da *Chlorella* sp. sadrži ili produkuje agense koji mogu izazvati oksidativnu modifikaciju proteina. Negativna korelacija između koncentracije AOPP i aktivnosti KAT dovodi do pretpostavke da uvećani oksidativni stres i oksidativna modifikacija KAT može biti uzrok za smanjenu aktivnost KAT. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim ispitivanjem u kojem je *Chlorella vulgaris* redukovala katalaznu aktivnost (KAT) kod pacova kod kojih je prethodno indukovan kancer jetre (Sulaiman i sar., 2006; Martínez-Francés i Escudero-Oñate, 2018). I na kraju, koncentracija TBARS se nije razlikovala u larvama iz grupe tretirane sojem *Chlorella* sp. i kontrolne grupe. Ovakav rezultat indikuje da *Chlorella* sp. ne izaziva modifikaciju lipidnih komponenti u somatskim ćelijama larvi *C. riparius*.

Koncentracija hemoglobina u larvama tretiranim sojem *Chlorella* sp. je bila značajno manja nego u kontrolnoj grupi i grupi hranjenoj sa *Anabaena* sp., što je bilo praćeno značajnim porastom nivoa AOPP. Uvećanje koncentracije enzima antioksidativne zaštite u slučaju smanjene koncentracije hemoglobina se može objasniti njihovom kompenzatornom ulogom, sa ciljem održavanja detoksikacije slobodnih radikala (Choi i sar., 1999). Potencijal hemoglobina da bude biomarker sredinskog stresa je pokazan u ispitivanju koje su vršili Ha i Choi (2008) u kojem su hemijski kontaminenti, bisfenol A i insekticid hlorpirifos, uticali na koncentraciju hemoglobina. Ekspresija gena za hemoglobin pokazuje hemijski-specifičan odgovor, pri čemu izlaganje fenitrotionu izaziva smanjenje u telesnoj težini zajedno sa smanjenjem ekspresije gena za hemoglobin kod vrste *Chironomus tentans* (Lee i sar., 2006).

Ovo istraživanje, zajedno sa prethodnim ispitivanjem, potvrđuje da je hemoglobin dobar biomarker za naredna ispitivanja testiranja toksičnosti u bioesejima.

Nekoliko studija je vršeno kako bi se ispitali efekti *Chlorella* vrsta na preživljavanje i razvoj beskičmenjaka (Ahmad i sar., 2001; Raja i Kumar, 2016). Procenat mortaliteta larvi *Aedes aegipty* hranjenih sa *Chlorella vulgaris* je nakon šest dana bila 100% (Ahmad i sar., 2001). Nasuprot ovakvim rezultatima, rast larvi vrste *Bombyx mori* L., ishrana suplementovana ekstraktima soja *Chlorella pyrenoidosa* je poboljšala njihov rast (Raja i Kumar, 2016). Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije je pokazalo suprotan ishod u odnosu na oba prethodna istraživanja, jer tretman sojem *Chlorella* sp. nije uticao na stopu mortaliteta larvi *C. riparius*, ali je imao negativan uticaj na rast larvi.

Ovo je prvo istraživanje koje se bavilo ispitivanjem uticaja živih, fizički i hemijski netretiranih i nepromenjenih ćelija *Chlorella* sp. na vodene beskičmenjake, i koje je pokazalo negativan uticaj na njih na osnovu ispitivanja unapred definisanih biomarkera. U skladu sa efektima izazvanim od strane *Chlorella* sp. kao agensa, aktivnost KAT je značajno uvećana kod larvi hranjenih sa *Anabaena* sp. sojem. Ostali antioksidativni enzimi koji su bili testirani nisu bili značajno promenjeni kod larvi iz ovog tretmana, iako je komet test pokazao da su oštećenja DNK bila značajno ozbiljnija nego u grupi larvi tretiranih sa *Chlorella* sp. Imajući u vidu da je primenjeni soj *Anabaena* sp. producent toksina MC-LR, i da su ćelije bile dobro svarene od strane larvi, povećanje aktivnosti KAT i oštećenje DNK može biti odgovor na stres izazvan produkovanim toksinom. U prethodnim ispitivanjima je dokazano da mikrocistini imaju potencijal da indukuju formiranje velikih količina slobodnih radikala, koji mogu izazvati DNK oštećenja (Zanchett i Oliveira-Filho, 2013; Žegura, 2016). Rezultati kometa testa su pokazali da konzumiranje soja *Anabaena* sp. može izazvati DNK oštećenja u somatskim ćelijama larvi *C. riparius*. Druga klasa kometa, koja je zabeležena kod larvi tretiranih sojem *Anabaena* sp., opisuje DNK oštećenje kao umereno. Uvećano oštećenje može biti izazvano produkovanim toksinom MC-LR, jer uticaj različitih bioloških toksina može dovesti do oštećenja DNK i različitih genetičkih poremećaja (Singh i Sharma, 2018). Mehanizam po kojem mikrocistini funkcionišu, uključujući stepen potencijalnog oštećenja DNK, je slabo ispitan kod beskičmenjaka. Ipak, mikrocistin-LR može indukovati mutacije u ćelijama sisara i uticati na proces reparacije oštećenja DNK, što dalje može dovesti do genetičke nestabilnosti (Žegura i saradnici, 2016). U prethodnim ispitivanjima je vršeno testiranje efekta ekstrakata cijanobakterija koje produkuju mikrocistine kao i čistog toksina mikrocistin-LR, pri čemu je dokazano DNK oštećenje kod sadnica pirinča i spermatogenih ćelija pacova (Singh i Sharma,

2018; Lone i sar., 2015). Takođe je utvrđeno i da mikrocistini mogu izazvati oštećenja hromozoma povećavajući frekvenciju mikronukleusa u eritrocitima miševa i u humanoj TK6 ćelijskoj liniji (Menezes i saradnici, 2013).

Istraživanje sprovedeno od strane Palusa i saradnika (2007) je pokazalo povećanje DNK oštećenja i frekvencije mikronukleusa u humanim limfocitima koja su bila indukovana ekstraktima cijanobakterija (*Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *PseudoAnabaena* sp., i *Anabaena* sp.). Ispitivanja interakcije mikroalgi i organizama koji se hrane mikrofaunom (Berry i sar., 2008; Kaczorowska i Kornijów, 2012; Toporowska i sar., 2014), su pokazala da ingestija različitih toksin-produkujućih cijanobakterija može dovesti do akumulacije toksina u larvama *Chironomus* spp., kao i do mortaliteta i smanjenja stope rasta kod roda *Daphnia*. Na osnovu tih ispitivanja, pretpostavka je da direktna ingestija mikrocistin-LR produkujućeg soja *Anabaena* sp. može imati sličan efekat na organizme koje se hrane mikrofaunom, kao što su to larve hironomida.

Mikrocistin-LR inhibira protein fosfataze, što dovodi do hiperfosforilacije mnogih ćelijskih proteina (Žegura i sar., 2016). Ipak, ova studija indikuje da proteini u somatskim ćelijama larvi *C. riparius* nisu modifikovani dejstvom toksina prisutnog u ćelijama soja *Anabaena* sp. koji smo koristili u istraživanju. Razlog ovakvog rezultata može biti niska koncentracija mikrocistina-LR, nedovoljna da izazove modifikacije proteina kod larvi hironomida.

Tretman sojem *Anabaena* sp. u ovom istraživanju nije uticao na preživljavanje i razvoj larvi *C. riparius*, što je u suprotnosti sa sličnim istraživanjem (Laurén-Määttä i saradnici, 1995). Naime, larve roda *Chaoborus* su bile stresirane toksinom MC-LR, sa statistički značajnim uvećanjem mortaliteta putem trofičkog transfera, ingestijom *Daphnia* koje su prethodno u sebi akumulirale pomenuti toksin. Visoka stopa preživljavanja može biti posledica niske koncentracije toksina produkovanog od strane *Anabaena* sp., ili larve stiču otpornost pomoću prisustva značajne količine jakog antioksidansa glutationa (GSH) (Toporowska i saradnici, 2014). Uprkos tome, detektovani toksin MC-LR predstavlja opasan agens po druge vodene organizme u lancu ishrane, jer su cijanotoksini okarakterisani kao jedinjenja otporna na hemijsku i biološku degradaciju i mogu biti bioakumulirani u lancu hrane (Takser i sar., 2016; Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011).

Preživljavanje larvi je znatno smanjeno kada su izložene koncentracijama toksina koje su znatno više u odnosu na one koje su zabeležene u samom staništu iz kojeg su uzorkovane.

Ovakva činjenica govori da larve hironomida mogu posedovati neki specifičan mehanizam odbrane od cijanotoksina. Ranija istraživanja su pokazala da se izlaganjem larvi cijanotoksinima u larvama povećava nivo specifičnih enzima, kao što su glutation-S-transferaza, glutation peroksidaza i glutation sintetaza (Forcella i sar., 2007). Uzrok povećanja nivoa pomenutih enzima u larvama jeste oksidativni stres, izazvan mikrocistinima, jer je dokazano da cijanotoksini mogu biti uzrok takvoj pojavi kod vodenih organizama (Blaha i sar., 2004). Glutation (GSH), je dokazan kao snažan antioksidans i ima važnu ulogu u savladavanju oksidativnog stresa. Glutation-S-transferaza konjuguje mikrocistine sa GSH i metabolišе ih u manje štetna jedinjenja (Pflugmacher i sar., 1998), koja dalje mogu biti fiziološki razgrađena i ekskretovana iz ćelija (Toporowska i sar., 2014).

5.7. Definisanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa i definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora

Larve *Chironomus riparius* su globalno distribuirane i predstavljaju najrasprostranjeniju grupu insekata koja se nalazi u slatkovodnim ekosistemima (Ha i Choi, 2008). Tako visok diverzitet dovodi do širokog sprektra ekoloških odgovora zbog čega se koriste u ispitivanjima akutne i hronične toksičnosti kontaminiranih sedimenata i vode (Matthew i David, 1998; Choi i sar., 2000; Lee i sar., 2006). Kao dobri indikatori hemijskih zagađenja vode, ovo istraživanje se bavilo i određivanjem nivoa osetljivosti larvi *C. riparius* na toksin MC-LR i izabrane polutante: amonijum (NH_4^+), nitrati (NO_3^-), fosfate (PO_4^{3-}) i kadmijum (Cd^{2+}).

5.7.1. Definisanje akutne toksičnosti cijanotoksina mikrocistin-LR na larve *C. riparius* u uslovima multistresa

Glavno toksično delovanje NO_3^- nastaje pretvaranjem pigmenata koji imaju funkciju prenosa kiseonika u oblike koji nisu sposobni za tu funkciju (Camargo i sar., 2005). Nitrati konvertuju hemoglobin u methemoglobin, ograničavajući tako transfer kiseonika do ćelija i tkiva, što dovodi do pojave koja se naziva methemoglobinemija (Taziki i sar., 2016). Imajući u vidu da larve *C. riparius* produkuju hemoglobin, pretpostavka je da nitrati mogu štetno delovati na ovaj respiratorni pigment. Toksičnost nitrata za vodene beskičmenjake raste sa povećanjem koncentracije nitrata i vremena izlaganja (Alonso i Camargo, 2003). U vodenoj sredini najčešći jonski (reaktivni) oblici neorganskog azota su amonijum (NH_4^+), nitriti (NO_2^-) i nitrati (NO_3^-). Ovi joni mogu biti prirodno prisutni u vodenim ekosistemima kao rezultat atmosferskog taloženja, oticanja površinskih i podzemnih voda, rastvaranja geoloških naslaga bogatih azotom, fiksacije N_2 od strane cijanobakterija i biološke razgradnje organske materije (Spencer, 1975; Kinne, 1984; Gleick, 1993; Camargo, 2005). Amonijum teži oksidaciji do nitrata koja se odvija dvofaznim procesom nitrifikacije ($NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$), koju vrše aerobne hemoautotrofne bakterije, prvenstveno *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* (Wetzel, 2001; Camargo i sar., 2005). Kao posledica navedenih procesa, koncentracija NO_3^- u vodenim ekosistemima uglavnom je viša od koncentracija amonijuma i nitrita (Wetzel, 2001; Rabalais, 2002). Nitrati, ali i amonijum i nitriti, mogu biti usvojeni kao izvor azota od strane fitoplanktona i drugih vodenih mikroorganizama (Camargo, 2005).

U ispitivanju akutne toksičnosti NO_3^- na larve *C. riparius* korišćene su larve prvog stupnja. Ranija ispitivanja su pokazala da su larve vodenih beskičmenjaka osetljivije na polutante kada su u nižem razvojnom stadijumu, pa tako i na NO_3^- (Camargo i Ward, 1995). Na osnovu uticaja ispitanih koncentracija NO_3^-, nakon izlaganja od 24 h i 48 h, na larve prvog stupnja, softverski su preračunate letalne koncentracije (LC) NO_3^- koje izazivaju letalnost larvi u rasponu od 0,01 do 50%. Vrednost LC_{50} nakon 48h izlaganja za $NaNO_3$ je 675 mg/l, što je koncentracija koja je slična vrednosti LC_{50} dobijene u slučaju larvi vrste *Hydropsyche exocellata* (Camargo i sar., 2005). Isto ispitivanje je pokazalo da su larve drugih vodenih beskičmenjaka, *Echinogammarus echinosetosus* (48 h LC_{50} 106,9 mg/l) i *Eulimnogammarus toletanus* (48 h LC_{50} 180,3 mg/l), dosta osetljivije na dejstvo NO_3^-.

Nitriti i amonijum joni su toksičniji po vodene organizme u poređenju sa nitratima (Camargo i sar., 2005). Ovo istraživanje je upravo to i potvrdilo, jer su LC koncentracije NH_4^+ jona, merene u miligramima po litru, bile znatno niže u poređenju sa LC koncentracijama NO_3^- . LC_{50} vrednosti NH_4^+ jona po larve *C. riparius* su bile 256 mg/l (24 h LC50) i 227 mg/l (48h LC_{50}), što je u skladu sa rezultatima istraživanja koje su sproveli Wang i saradnici (2014). Toksičnost NH_4^+ jona zavisi od temperature i pH vrednosti vode, i na osnovu istraživanja je pokazano da za mnoge organizme njihova toksičnost raste sa povećanjem pH sredine (Emerson i sar., 1975; Schubauer-Berigan i sar, 1995).

Amonijak (amonijumovi joni pod fiziološkim uslovima) je jedan od glavnih izvora azota neophodnog za biosintezu amino kiselina. Neprekidno se stvara u živim organizmima, ali može biti toksičan po sve žive organizme ukoliko dođe do njegove akumulacije u ćelijama, koja dalje može dovesti do oštećenja tkiva (Lea, 1985).

Kod riba i rakova, toksično dejstvo NO_3^- je zasnovano na smanjenju kapaciteta prenošenja kiseonika hemoglobina i hemocijanina. Toksičnost NO_3^- je verovatno posledica redukcije nitrata u nitrite u krvi, izazivajući isti efekat kao nitriti (Camargo i Alonso, 2006). Usvajanje NO_3^- od strane vodenih organizama je manje frekventno od unosa nitrita i amonijuma, što rezultuje relativno slabom toksičnošću (Camargo i sar., 2005). Toksičnost NO_3^- po vodene organizme zavisi i od drugih faktora kao što su tvrdoća vode, koncentracija hlorida itd. (Hickey i sar., 2013; Soucek i Dickenson, 2016).

Fosfor je, poput azota, krucijalni nutrijent potreban za odvijanje životnih procesa. Najčešći oblik fosfora koji koriste biološki organizmi je fosfat (PO_4^{3-}), koji igra glavnu ulogu u stvaranju DNK, ćelijske energije i ćelijskih membrana živih organizama. Fosfati su derivati

fosfora koji vezuju za sebe minerale kao što je kalcijum. Ispitivanja trikalcijum fosfata na test organizam *Daphnia* sp. su pokazali da akutnu toksičnost izazivaju koncentracije veće od 100 mg/l, što je u skladu sa rezultatima istraživanja ove doktorske disertacije kada su registrovane vrednosti bile LC_{50} 2,23 g/l (24h) i LC_{50} 1,68 g/l (48h).

Kadmijum dospeva u vodene ekosisteme iz različitih prirodnih i industrijskih ekosistema i smatra se veoma toksičnim za sve komponente vodenih zajednica (Mohlenberg i Jensen, 1980; Williams i sar., 1986). Kao što je već navedeno, prvi stupanj larvi *C. riparius* je najosetljiviji na mnoge polutante, pa tako i na teške metale. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je LC_{50} nakon 24h sata izlaganja 5,39 mg/l, dok je LC_{50} nakon 48 h 4,24 mg/l. Duplo manje koncentracije su bile potrebne za postizanje istog efekta u ranije sprovedenom istraživanju (Williams i sar., 1986). Rezultati istog istraživanja su pokazali da su larve *C. riparius* četvrtog stupnja do 950 puta otpornije na dejstvo kadmijuma, što opravdava korišćenje ranijih stadijuma za ispitivanje akutne toksičnosti kadmijuma. Jedna od bitnih osobina kadmijuma je da se veoma brzo vezuje za hranu što olakšava ulazak ovog teškog metala u larve (Pascoe i sar., 1990). Razlike u rezultatima toksičnoste polutanta na istu vrstu u različitim istraživanjima uglavnom zavise od temperature, pH, trvdoće vode, i mnogih drugih sredinskih faktora.

Larve usvajaju kadmijum preko površine tela i ingestijom, ukoliko je prethodno vezan za hranu kadmijum će u većoj meri dospeti u samu larvu. Kadmijum ima dug poluživot i akumulira se u beskičmenjacima, ali i drugim organizmima (Zhang i Reynolds, 2019). Najvažniji mehanizmi kojima kadmijum manifestuje svoje toksične efekte uključuju promene u ekspresiji gena i inhibiciju reparacije oštećene DNK, ometanje apoptoze i autofagije, izaziva oksidativni stres i interakciju sa bioelementima (Đukić-Ćosić i sar., 2020). Izloženost kadmijumu (Cd^{2+}) dovodi do promene ravnoteže bioelemenata (Zn, Cu, Fe, Mn, Se, Ca, Mg, itd.) u organizmu, dok povećan unos nekih bioelemenata dovodi do smanjenja toksičnog efekta kadmijuma (Cd^{2+}) (Matović i sar, 2010., Bulat i sar, 2017., Andrulewicz-Botulińska i sar., 2018). Interakcija kadmijuma sa bioelementima sličnih fizičkih i hemijskih osobina se dešava na svim toksikokinetičkim nivoima: resorpcija, distribucija i eliminacija. Prilikom resorpcije, kadmijum i bioelementi vrše kompeticiju za vezujuće mesto na transportnim proteinima koji omogućavaju ulazak ovih elemenata u ćeliju. Ovaj proces dovodi do smanjenja koncentracije nekog od bioelemenata, odnosno do povećanja koncentracije kadmijuma u organizmu (Đukić-Ćosić i sar., 2020). Sve te promene na molekularnom nivou dovode do štetnih efekata u razvoju tkiva i organa intoksiciranih jedinki. Primer štetnog delovanja malih koncentracija kadmijuma

na vodene organizme jeste ometanje i smanjenje rasta 15 vrsta riba, do čega je dovela velika količina potrošene energije na odbrambene mehanizme od oksidativnog stresa indukovanog kadmijumom (Groh i sar., 2015). Veliki broj faktora utiče na razvijanje toksičnog uticaja kadmijuma, pa se ne može sa sigurnošću predvideti da li će kadmijum svojim dejstvom dovesti do oštećenja gena, apoptoze, autofagije, oksidativnog stresa ili do interakcije sa bioelementima. Zbog sveprisutnosti kadmijuma u životnoj sredini i njegove komplekse toksičnosti, potrebno je posvetiti pažnju ispitivanju molekulskih mehanizama dejstva ovog stresora na test organizme.

Mikrocistin-LR je cijanotoksin koji se na osnovu rezultata ovog istraživanja može okarakterisati kao toksičan po larve *C. riparius*, i to u koncentracijama koje su sredinski relevantne. Sredinski relevantnim se smatraju koncentracije cijanotoksina MC-LR manjim od 200 µg/l (Toporowska i sar., 2014). U poređenju sa tim, korišćene koncentracije MC-LR u ovom istraživanju su relativno niske, dok su se larve *C. riparius* prvog stupnja, inače najosetljiviji stadijum ovog organizma, pokazale kao njihov dobar indikator.

Relativno visoku rezistenciju na MC-LR su pokazale nimfe roda *Hexagenia*, koje su izdržale nivo MC-LR do 10 µg/l, koncentracije koja je zabeležena tokom veoma toksičnog cvetanja u visoko eutrofnom jezeru u Severnoj Americi (Sivonen i Jones, 1999; Smith i sar., 2007). Oko 10% je uginulo prilikom izlaganja koncentraciji od 1 µg/l, dok je samo 20% uginulo nakon jedne nedelje izloženosti koncentraciji od 10 µg/l MC-LR. Velike nimfe su imale manju stopu mortaliteta u odnosu na manje nimfe, najverovatnije zbog razlika u odnosu površina-volumen između organizama. Veće nimfe mogu imati razvijenije metaboličke puteve za detoksikaciju MC-LR od manjih i mlađih. Imajući u vidu da su nimfe *Hexagenia* uzorkovane iz vodenih staništa za koja se zna da su u njima česte pojave cvetanja fitoplanktona, ovi organizmi su najverovatnije razvili rezistenciju na MC-LR zbog prethodnog izlaganja toksinu, omogućavajući im da izdrže izlaganje visokim koncentracijama ovog toksina (Smith i sar., 2008).

Koncentracija MC-LR od 3,75 µg/ml je nakon 24h smanjila populaciju larvi *Artemia salina* za 50% (Delaney i Wilkins, 1995), dok su isti efekat po vrste *Daphnia pulicaria*, *Daphnia hyalina*, *Daphnia pulex* i *Diaptomus birgei* nakon 48h imale koncentracije 21,4, 11,6, 9,6 i 1,0 µg/ml, respektivno (DeMott i sar., 1991). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su larve prvog stupnja *C. riparius* znatno osetljivije na MC-LR, jer znatno niža koncentracija (10 µg/l) izaziva smanjenje populacije za 20% nakon 24h.

Mehanizam delovanja cijanotoksina MC-LR je ranije opisan na osnovu istraživanja sprovedenih na sisarima, zbog čega je i svrstan u hepatotoksine, dok su istraživanja na vodenim organizmima, naročito bentosnim beskičmenjacima retko sprovedena. MC-LR inhibira aktivnost protein fosfataze 1 i 2A na vrstama roda *Daphnia* i *Diaptomus birgei* (DeMott i Dhawale, 1995), dok su prečišćeni MC-LR i soj *Microcystis aeruginosa* (PCC7820) pokazali akutni toksični efekat na navedene vrste (DeMott i sar.,1991). Dokazane su i biohemijske promene enzima kao što su inhibicija glutationa (GSH) i glutation-S-transferaza (GST) kod vrste *Daphnia magna*, ali i stimulaciju laktat-dehidrogenaze (Chen i sar., 2005), kao i inhibiciju tripsina i himotripsina kod vrsta *D. magna* i *Moina macrocopa* (Agrawal i Bagchi., 2001; Agrawal i sar., 2005), inhibiciju acetilholinesteraze (AchE) kod vrste *D. pulicaria* (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011). Značajno uvećanje enzima antioksidativne zaštite KAT i GST nakon izlaganja vrste *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura) vodenim ekstraktima mikrocistina (Pinho i sar., 2005). Na primeru larvi komaraca *Aedes aegypti* je dokazana osetljivost na cijanobakterije, gde je primenom mikrocistin-produkujućeg soja *Microcystis aeruginosa* utvrđeno znatno duže vreme razvoja u odnosu na kontrole i larve tretirane sojem koji ne produkuje mikrocistine (Rey i sar., 2009).

Poznato je i da MC-LR može indukovati DNK oštećenja, i da je ovaj genotoksični efekat posredovan slobodnim radikalima (Žegura i sar., 2004; Gaudin i sar., 2008). Do sada nije opisan nijedan mehanizam direktne interakcije mikrocistina i DNK molekula (Vela i sar., 2008). Vezivanje za proteine je jedan od efekata MC-LR, i do sada je opisano da samo dva tipa proteina se mogu vezati kovalentno za ovaj toksin, protein fosfataze 1 i 2A i beta subjedinica ATP sintetaze (Mikhailov i sar., 2003). Kao posledica disfunkcije fosforilacije/defosforilacije, jedan od dominantnih efekata mikrocistina na eukariotske organizme je promena citoskeleta, koji je uključen u ključne funkcije poput determinacije oblika ćelije, kretanje ćelije i ćelijske deobe (Zurawell i sar., 2005).

5.7.2. Definisanje interakcije toksičnog efekta mikrocistina-LR i stresora

Mehanizam toksičnog delovanja MC-LR na ćelije eukariota se na osnovu dosadašnjih istraživanja može definisati kroz inhibiciju protein fosfataze 1 i 2A i indukciju oksidativnog stresa (Runnegar i sar., 2003). Mikrocistini se inače produkuju i zadržavaju unutar ćelija cijanobakterija, zbog čega se ovi toksini u vodi nalaze u koncentracijama koje se mogu meriti u nanogramima i mikrogramima po litru (Bogialli i sar., 2006; Song i sar., 2007). U visokim

koncentracijama, koje se kreću u mg/l vode, se ovi toksini mogu naći prilikom odumiranja velikog broja ćelija cijanobakterijskih cvetanja (Jones i Orr, 1994).

U vodenim ekosistemima MC-LR koegzistira sa drugim polutantima, imajući u vidu da se sama cvetanja cijanobakterija od kojih toksin potiče javljaju u eutrofnim uslovima. Samim tim, ispitivanje efekata pojedinačnih polutanata ne predstavljaju sredinski relevantne uslove usled mogućih interakcija MC-LR i drugih polutanata (sinergističkih, aditivnih ili antagonističkih). Podataka o kombinovanim toksičnim efektima MC-LR i drugih polutanata u naučnoj literaturi nema dovoljno za definisanje mehanizama interakcije u zivim sistemima. Značaj ovog istraživanja leži u otkrivanju efekata MC-LR i čestih sredinskih stresora, na najrasprostranjenije insekte slatkovodnih ekosistema, larve *C. riparius*.

Ispitivanjem kombinovanog efekta MC-LR sa svakim od pojedinačnih polutanata (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-} i Cd^{2+}) zaključeno je da testirani cijanotoksin u kombinaciji sa svakim od polutanata ima aditivni efekat. To znači da se toksični efekat MC-LR u eutrofnim uslovima, u kombinaciji sa drugim činiocima eutrofikacije uvećava tačno toliko, koliki je toksični efekat prisutnih polutanata. Ispitivanje je rađeno sa koncentracijama LC_{20} ispitanih polutanata u kombinaciji sa MC-LR toksinom u koncentraciji od 10 µg/l. Dakle, mikrocistin-LR i svi ostali testirani stresori deluju nezavisno jedan od drugog, odnosno prisustvo mikrocistina (ili stresora) ne potencira jači efekat druge supstance. Prema tome, sabiranjem pojedinačnih procenata mortaliteta stresora i MC-LR u svim slučajevima dobijen je rezultat koji predstavlja zbir dva nezavisna sabirka.

U prethodnim studijama, ispitivanjem kombinovanog efekta MC-LR i bakra, došlo se do zaključka da ova dva polutanta imaju sinergistički efekat, i da je njihova interakcija dovela do uvećanja bioakumulacije MC-LR i bakra u tkivo submerzne biljke *Vallisneria natans* (Wang i sar., 2017). Kao prirodna organska supstanca, MC-LR i mikrocistini uopšte imaju cikličnu polipeptidnu strukturu koja sadrži višestruke funkcionalne grupe, kao što su -O i -N, koje mogu postati potencijalno mesto vezivanja metala i eventualno nagraditi kompleks (Yann i Ozsoz, 200; Saito i sar., 2008). Metalni joni i MC-LR mogu promeniti ćelijsku permeabilnost (Ding i Ong, 2003; Huamg i sar., 2009). Samim tim, postoji i mogućnost stvaranja kompleksa MC-LR i kadmijuma.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da ekološka opasnost, koju cijanotoksin mikrocistin-LR nosi, može biti samo veća ukoliko je u kombinaciji sa nekim od polutanata. Na primeru larvi vrste *C. riparius* je dokazan štetan efekat sredinski relevantnih koncentracija

toksina MC-LR u multistres uslovima. Imajući u vidu da su mikrocistini dosta stabilni toksini i da njihova koncentracija u prirodi može biti i veća u uslovima cvetanja cijanobakterija (Carmichael, 1992; Turner i sar., 2018), eutrofikacija i štetni efekti koje ovaj proces nosi može ozbiljno naškoditi vodenim ekosistemima.

Mnoga istraživanja su pokazala da je toksični efekat po vodene organizme čistog MC-LR toksina manji od toksičnog efekta ekstrakata cijanobakterija koje ga produkuju. Jedan od razloga može biti produkcija i nekih drugih toksičnih metabolita od strane cijanobakterija, koje sa toksinom imaju sinergistički efekat. Još jedan razlog može biti i da neki od sastojaka ekstrakata cijanobakterija olakšava unos samog toksina u test organizam (Toporowska i sar., 2014).

5.8. Hronični efekat toksičnog soja *Anabaena* sp. na larve vrste *Chironomus riparius* u multistres uslovima

Hroničnim izlaganjem larvi *C. riparius* toksičnom soju *Anabaena* sp. u kombinaciji sa multistresorima (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-} i Cd^{2+}) dobijeni rezultati su pokazali da je efekat koji toksični soj ima na larve veći u prirustvu multistresora. Značajnog uticaja kombinacije toksičnog soja i stresora na letalnost larvi nije bilo, ali je uticaj na subletalnom nivou primetan kada su u pitanju faza razvoja, masa larvi, koncentracija hemoglobina i oštećenje DNK somatskih ćelija.

Larve koje su hranjene sojem *Anabaena* sp. su bile trećeg stupnja razvoja u svim tretmanima, odnosno kombinacijama sa stresorima, dok su kontrolne larve, hranjene TetraMin hranom, bile četvrtog stupnja razvoja bez obzira na prisustvo nekog od polutanata. Samim tim se može zaključiti da toksični soj *Anabaena* sp. usporava razvoj larvi *C. riparius*. Utvrđeno je da soj *Anabaena* sp. u momentu početka ispitivanja produkuje MC-LR u koncentraciji od 23,4 ng/mg suve mase. Potencijal MC-LR za usporavanje razvoja vodenih organizama je dokazan ranijim istraživanjima (Rey i sar., 2009), gde je tretman sojem *Microcystis aeruginosa* koji produkuje MC-LR znatno usporio vreme razvoja larvi *Aedes aegypti*, u odnosu na tretman sojem iste vrste cijanobakterije koji ne produkuje toksin. Postoji mogućnost da same ćelije soja *Anabaena* sp. produkuju i neke druge metabolite koji mogu uticati na razvoj larvi *C. riparius*.

Utvrđeno je i da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji hemoglobina larvi hranjenih sojem *Anabaena* sp., u prisustvu stresora PO_4^{3-} i NO_3^- u odnosu na kontrolni tretman. Navedeni stresori su uticali da larve imaju manju koncentraciju hemoglobina. Imajući u vidu da su larve bile trećeg stupnja, očekivalo se da će koncentracija hemoglobina biti manja u odnosu na larve četvrtog stupnja, hranjenih TetraMin hranom. Prisustvo stresora je uticalo da koncentracija hemoglobina bude još manja. Iako je masa navedenih larvi manja, statistička obrada rezultata nije ukazala da je ta razlika u masi larvi statistički značajna. Za potrebe ovog istraživanja prethodno je izvršena hemijska analiza soja *Anabaena* sp. kako bi se utvrdila hranljiva vrednost ove cijanobakterije. Utvrđeno je da ova cijanobakterija sadrži malu količinu esencijalnih masnih kiselina (PUFA), što se već ranije pokazalo kao razlog nedovoljno razvijene mase nekih vrsta zooplanktona, kao što je *Daphnia* (Porter i Orcut, 1980; DeMott i Müller-Navarra, 1997; Elert i Wolffrom, 2001). Na osnovu tih istraživanja se može dovesti u razmatranje nedostatak esencijalnih hranljivih materija soja *Anabaena* sp. kao važniji razlog manje mase larvi od toksičnosti. Pored toga, sama morfologija ove cijanobakterije

(filamentozni talus) može uticati na efikasnost filtracije vodenih beskičmenjaka, ugrožavajući njihov energetski balans (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011).

Imajući u vidu da je MC-LR opisan kao agens koji može dovesti do stvaranja slobodnih radikala, i da posredstvom oksidativnog stresa kod vodenih organizama može doći i do oštećenja DNK, somatske ćelije larvi su analizirane kometa testom kako bi se utvrdilo eventualno oštećenje ovog molekula. Ispitivanjem uticaja *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na larve *C. riparius* analizirani su i parametri oksidativnog stresa kao krajnje tačke, međutim krajnji rezultati su pokazali da analizirani markeri (KAT, SOD, AOPP) nisu odgovarajući pokazatelji štetnog efekta toksičnih cijanobakterija. Nasuprot tome, oštećenja DNK u ćelijama larvi su pokazala jasnu razliku među tretmanima, zbog čega je predpostavljeno da će se i u ovom eksperimentu pokazati kao dobar biomarker. U prethodnim istraživanjima nije dokazan direktan efekat MC-LR i drugih cijanotoksina na molekul DNK testiranih organizama (Žegura i sar., 2004; Gaudin i sar., 2008; Vela i sar., 2008), već su oštećenja DNK indirektna posledica oksidativnog stresa izazvanog toksinom. Zbog navedenih razloga odlučeno je da analiziranje enzima oksidativnog stresa ne bude uključeno u ovo istraživanje, već da analiziranjem oštećenja DNK posredno bude ispitan i ovaj fenomen.

Kometa testom se analizira 12 različitih parametara, od kojih se oštećenje DNK kvantifikuje parametrom „tail moment“ koji predstavlja stepen oštećenja DNK u pojedinačnim ćelijama (Mozaffarieh i sar., 2008). Tretman toksičnim sojem *Anabaena* sp. bez prisustva nekog od analiziranih stresora nije izazvao oštećenje DNK, koje bi se statistički smatralo značajno većim od oštećenja koje je zabeleženo kod larvi hranjenih TetraMin hranom, takođe bez prisustva stresora. Sami stresori su larvama hranjenim TetraMin hranom izazvali određeni nivo oštećenja, koji je znatno manji u odnosu na oštećenja DNK koja su izazvana sojem *Anabaena* sp. u prisustvu stresora. Dakle, kombinacija svakog od pojedinačnih stresora (NO_3^-, NH_4^+ i PO_4^{3-}) sa toksičnim sojem *Anabaena* sp. je dovela do oštećenja DNK koja su, na osnovu statističke analize podataka, značajno veća nego kod onih sa pojedinačnim stresorom.

Na osnovu prethodno sprovedenog testiranja akutnog efekta čistog toksina MC-LR i stresora utvrđen je aditivni efekat usled interakcije toksina i stresora, što se odrazilo na veći mortalitet larvi *C. riparius*. U ovom slučaju, soj *Anabaena* sp. je predstavljao izvor hrane, ali i izvor toksičnog agensa sa dokazanim štetnim dejstvom po larve. Toksičnost po bentosne makrobeskičmenjake, ali i vodene organizme uopšte, može biti izazvana i drugim jedinjenjima produkovanim od strane cijanobakterija. U istraživanjima sprovedenim na vrstama roda *Daphnia*, zatim vrsti *Artemia salina* i larvama komaraca *Aedes* aegypti, primenjeni su ekstrakti

prirodnih cvetanja voda koji su sadržali jedinjenja koja nisu cijanotoksini, ali su imala toksičan efekat po navedene vrste vodenih beskičmenjaka (Jungmann i Benndorf, 1994; Kiviranta i sar., 1993; Kirivanta i Andel-Hameed, 1994). Ustanovljeno je da cijanobakterije produkuju širok spektar nepoznatih toksičnih metabolita (Bláha i sar., 2009), što dovodi do potrebe za daljim istraživanjima u karakterizaciji takvih jedinjenja. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su larve *C. riparius* bile rezistentnije na čiste cijanotoksine, nego na ekstrakte cijanobakterija koji su sadržali i do 10 puta manje toksina (Toporowska i sar., 2014). Uzrok tome može biti i pojava da jedan isti soj cijanobakterije može produkovati više toksičnih metabolita. Tako npr., planktonske cijanobakterije roda *Dolichospermus* i bentosne roda *Anabaena*, mogu osim anatoksina produkovati i druge neurotoksine, anabenolizine (Jokela i sar., 2012). Vrste roda *Plankthotrix*, osim mikrocistina mogu produkovati i druge bioaktivne oligopeptide kao što su eruginozini i mikroviridini (Shin i sar., 1996; Blom i sar., 2003). Sadržaj cijanobakterijskih ekstrakata možda dovodi do olakšanog usvajanja cijanotoksina, ili sami cijanotoksini imaju sinergistički efekat sa nekim od sastojaka ekstrakta. Fitzgeorge i saradnici (1994) su dokazali sinergistički efekat toksina mikrocistin-LR i anatoksina, u bioeseju sprovedenom na miševima. Samim tim, moguće je da određeni produkti metabolizma *Anabaena* sp. mogu izazvati oštećenje DNK larvi, i/ili pojačati efekat MC-LR.

Ovo istraživanje je pokazalo da larve *C. riparius*, koje su stalni član i konstituent bentosa slatkovodnih basena, mogu biti pod hroničnim štetnim uticajem fitoplanktona. Taj uticaj može biti značajan u uslovima eutrofikacije vode i njenog cvetanja, odnosno formiranja velike biomase fitoplanktona, cijanobakterija i mikroalgi. Cijanobakterije i alge prezimljavaju na dnu vodenih basena, kada naročito postaju dostupna hrana bentosnim organizmima, kao što su larve *C. riparius* (Toporowska i sar., 2014), zbog čega je istraživanje uticaja primarnih producenata na bentosne organizme od velikog značaja. Larve *C. riparius* mogu biti pod uticajem cijanotoksina i drugih njihovih metabolita koji se nalaze u biomasi cijanobakterija koje ih produkuju, rastvoreni u vodi ili vezani za sediment na dnu basena.

Fitoplankton može imati negativan uticaj na rast i razvoj larvi *C. riparius* čak iako nije dokazana produkcija toksičnih metabolita, ukoliko ne predstavlja adekvatan izvor hranljivih materija ili u određenom obliku ne može biti usvojena od strane larvi usled morfoloških karakteristika. Ovakav primer predstavlja tretman larvi sojem zelene mikroalge *Chlorella* sp., koja u naučnoj literaturi nije opisana kao producent toksičnih metabolita, a sa druge strane je značajan izvor nutrijenata.

Ovo istraživanje je ukazalo na to da relativno male koncentracije najčešćeg cijanotoksina, MC-LR mogu u interakciji sa čestim polutantima akvatičnih ekosistema imati negativne efekte po bentosne makrobeskičmenjake, a da su promene na subletalnom nivou larvi *C. riparius* dobar indikator prisustva MC-LR u multistres uslovima koji može predvideti promena pre ozbiljnijih oštećenja i služiti kao dobar alat u predikciji i/ili prevenciji cvetanja cijanobakterija.

Jedan od problema izlaganja bentosnih larvi cijanotoksinima jeste i sposobnost akumulacije ovih toksina u larvama. Imajući u vidu da larve predstavljaju esencijalni izvor hrane mnogim vrstama riba, ovo se može odraziti i na trofički lanac u vodenim ekosistemima. Kao krajnji rezultat javlja se i potencijalna opasnost po zdravlje ljudi.

Imajući u vidu prezentovane rezultate ovog istraživanja i rezultate prethodnih sa kojima su poređeni, potrebno je sagledati uticaj cijanotoksina MC-LR kao jednog od činioca eutrofikacije u akvatičnim ekosistemima, koji u interakciji sa drugim toksičnim agensima mogu imati znatno štetnije efekte po akvatične organizme. Na osnovu ovog istraživanja, dokazano je da je hemoglobin u larvama dobar biomarker u proceni hroničnog toksičnog efekta polutanata, kao i da je DNK oštećenje verodostojan pokazatelj štetnog efekta polutanata na larve *C. riparius*, usled oksidativnog stresa nastalog njihovim solitarnim delovanjem, ili njihovom interakcijom. Usled sposobnosti da brzo odreaguju na toksično dejstvo hemijskih agenasa, biomarkeri na molekularnom nivou su dobri pokazatelji za rano otkrivanje štetnog dejstva cijanotoksina u uslovima multistresa.

Određivanje koncentracije hemoglobina u larvama, metodologijom opisanom u ovoj disertaciji, je proces koji ne zahteva puno vremena i novca. Takođe, primenjeni kometa test koji kvalitativno i kvantitativno može opisati oštećenje DNK larvi *C. riparius*, je od velikog značaja uzimajući u obzir detekciju problema koji može dovesti do znatno većih posledica po biocenoze akvatičnih ekosistema. Prema tome, predlaže se promena postojećeg OECD protokola broj 218, koji služi za ispitivanje hroničnog izlaganja larvi *Chironomus* sp. hemikalijama, na osnovu koje bi se uvrstile analize koncentracije hemoglobina i oštećenja DNK ćelija larvi kao biomarkera subletalnog efekta testiranih hemikalija.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da:

1. Soj cijanobakterije *Anabaena* sp. koji je korišćen u ovom ispitivanju produkuje jedan od najčešćih hepatotoksina koji se može naći u akvatičnim sredinama, mikrocistin-LR (1,9 µg/g suve mase);
2. Prečišćeni toksin mikrocistin-LR, u primenjenim sredinski relevantnim koncentracijama od 10 µg/l nema antimikrobnu aktivnost na ispitivane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, ali ima stimulišući efekat na rast zelene mikroalge *Chlorella* sp.;
3. Cijanobakterija *Anabaena* sp. ima uvećanu stopu rasta u prisustvu veće koncentracije nitrata u sredini u kojoj raste. U prisustvu primenjenih koncentracija fosfata i amonijuma u medijumu stopa rasta soja *Anabaena* sp. je bila manja u odnosu na standardni medijum. Primenjena koncentracija kadmijuma je imala toksičan efekat po soj *Anabaena* sp. Koncentracija produkovanog toksina mikrocistin-LR kod testiranog soja zavisila je od koncentracije različitih stresora u sredini, pa je u prisustvu fosfata zabeležena najviša koncentracija (2,14 µg/g);
4. Fitoplankton može biti hrana bentosnim larvama *Chironomus riparius* koja će obezbediti njihovo preživljavanje i razvoj. Zelena mikroalga *Chlorella* sp. u dehidrovanom obliku predstavlja bolji izvor hrane od suspenzija ćelija istog soja i kao takva se može koristiti za prehranu laboratorijskih linija *C. riparius* larvi;
5. Na osnovu određivanja hemijskog sastava suve mase sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. utvrđeno je da su ovi sojevi fitoplanktona dobri izvori proteina i ugljenih hidrata, dok je soj *Chlorella* sp. dobar izvor esencijalnih masnih kiselina (PUFA);
6. Komparacijom uticaja suspenzija sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp. na larve *C. riparius*, utvrđeno je da *Anabaena* sp. izaziva toksičan efekat po larve, ali da je u obliku suspenzije bolji izvor hranljivih materija za larve od soja *Chlorella* sp. Oštećenje DNK somatskih ćelija larvi je definisano kao dobar indikator štetnog delovanja fitoplanktona na bentosne organizme;
7. Definisane su letalne koncentracije stresora (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) na larve prvog stupnja *C. riparius* i istovremeno je dokazan akutni toksični efekat relativno malih, sredinski relevantnih koncentracija cijanotoksina, mikrocistin-LR (10 µg/l). Ustanovljeno je da mikrocistin-LR uzajamnim kombinovanjem sa svakim od testiranih stresora ima aditivni efekat;

8. Hroničnim izlaganjem larvi *C. riparius* toksičnom soju *Anabaena* sp. u prisustvu multistresora je dokazano da svi testirani stresori pojačavaju subletalno štetno delovanje na larve, što je utvrđeno smanjenom masom, manjom koncentracijom hemoglobina i većim DNK oštećenjem kod larvi;
9. Novi biomarkeri koje bi trebalo uvrstiti u OECD protokole za procenu efekata hroničnog izlaganja larvi *Chironomus riparius* hemijskim agensima su promene masa larvi, koncentracija hemoglobina i oštećenje DNK somatskih ćelija.

7. LITERATURA

Agrawal, M. K., & Bagchi, D., 2001. Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, Moina macrocopa, by Microcystis blooms collected in Central India. Hydrobiologia, 464, 37–44. https://doi.org/10.1023/A:1013946514556

Agrawal, M. K., Zitt, A., Bagchi, D., Weckesser, J., Bagchi, S. N., & Von Elert, E., 2005. Characterization of proteases in guts of Daphnia magna and their inhibition by Microcystis aeruginosa PCC 7806. Environmental Toxicology, 20(3), 314–322. https://doi.org/10.1002/tox.20123

Agusti, S., Duarte, C. M., & Kalff, J., 1987. Algal cell size and the maximum density and biomass of phytoplankton. Limnology and Oceanography, 32(4), 983–986. https://doi.org/10.4319/lo.1987.32.4.0983

Ahmad, R., Chu, W., Lee, H., Phang, S., 2001. Effect of four chlorophytes on larval survival, development and adult body size of the mosquito Aedes aegypti. J. Appl. Phycol. 13, 369–374. https://doi.org/10.1023/A:1017966802600.

Ahlgren, G.; Lundstedt, L.; Brett, M.; Forsberg, C., 1990. Lipid Composition and Food Quality of Some Freshwater Phytoplankton for Cladoceran Zooplankters. J. Plankton Res. 12, 809–818.

Aitchison, P. A., & Butt, V. S., 1973. The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella* vulgaris. Journal of Experimental Botany, 24(3), 497–510. https://doi.org/10.1093/jxb/24.3.497

Ali, A., 1990. Seasonal changes of larval food and feeding of *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae) in a subtropical lake. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6 (1), 84–88.

Alonso, A., Camargo, J.A., 2003. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the aquatic snail Potamopyrgus antipodarum (Hydrobiidae, Mollusca). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70, 1006–1012. https://doi.org/10.1007/s00128-003-0082-5

Andrulewicz-Botulińska, E., Wiśniewska, R., Brzóska, M. M., Rogalska, J., Galicka, A., 2018. Beneficial impact of zinc supplementation on the collagen in the bone tissue of cadmium-exposed rats. J Appl Toxicol. 2018 Jul;38(7):996-1007. doi: 10.1002/jat.3608

Antoniou, M.G., Shoemaker, J. a., de la Cruz, A. a., Dionysiou, D.D., 2008. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO2 photo- catalysis of microcystin-LR. Toxicon 51, 1103e1118. https://doi.org/10.1016/ j.toxicon.2008.01.018.

Amorim, A.; Vasconcelos, V., 1999. Dynamics of microcystins in the mussel Mylilus galloprovincialis. Toxicon, 37, 1041–1052.

Babica, P., Bláha, L., & Maršálek, B., 2006. Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. Journal of Phycology, 42(1), 9–20. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00176.x

Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L., & Maršálek, B., 2007. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. Phycologia, 46(2), 137–142. https://doi.org/10.2216/06-24.1

Bailey, R. C., Norris, R. H., & Reynoldson, T. B., 2004. Bioassessment of Freshwater Ecosystems. In: Bioassessment of Freshwater Ecosystems. Springer, Boston, MA. Bioevaluación de Ecosistemas de Agua Dulce, 1–15.

Barboza, Giuseppe F. O., Gorlach-Lira, Krystyna, Sassi, Cristiane F. C., & Sassi, Roberto., 2017. Microcystins production and antibacterial activity of cyanobacterial strains of Synechocystis, Synechococcus and Romeria from water and coral reef organisms (Brazil). Revista de Biología Tropical, 65(3), 890-899. https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v65i3.29437

Baselga-Cervera, B., García Balboa, C., Costas, E., & Lopez-Rodas, V., 2014. Why Cyanobacteria Produce Toxins? Evolutionary Game Theory Suggests the Key. International Journal of Biology, 7(1), 64–77. https://doi.org/10.5539/ijb.v7n1p64

Basset, A., Carrada, G. C., Fedele, M., & Sabetta, L., 2018. Equilibrium concept in phytoplankton communities. Encyclopedia of Ecology, 61–68. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63768-0.00711-3

Basova, M. M., 2005. Fatty acid composition of lipids in microalgae. International Journal on Algae, 7(1), 33–57. https://doi.org/10.1615/interjalgae.v7.i1.30

Bagchi, S. N., Sharma, R., & Singh, H. N., 1985. Inorganic Nitrogen Control of Growth, Chlorophyll, and Protein Level in Cyanobacterium Nostoc muscorum. Journal of Plant Physiology, 121(1), 73–81. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80092-4

Benndorf, J, Henning, M., 1989. Daphnia and toxic blooms of Microcystis aeruginosa in Bautzen reservoir (GDR). Int Rev Hydrobiol 74:3–18.

Berg, K. A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., & Rapala, J., 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. ISME Journal, 3(3), 314–325. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110

Berry, J.P., Gantar, M., Perez, M.H., Berry, G., Noriega, F.G., 2008. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. Mar. Drugs 6 (2), 117–146. https://doi.org/10.3390/md6020117

Beck, C., Knoop, H., Axmann, I. M., & Steuer, R., 2012. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. BMC genomics, 13, 56. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-56

Berliner, M.D., 1986. Proteins in *Chlorella vulgaris*. Microbios, 46, 199–203.

Betteridge, D. J., 2000. What is oxidative stress? Metabolism. 49(2 Suppl 1):3-8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3.

Blaha, L. & Kopp, R., Mare, J., 2004. Oxidative Stress Biomarkers are Modulated in Silver Carp (Hypophthalmichthys molitrix Val.) Exposed to Microcystin-Producing Cyanobacterial Water Bloom. Acta Veterinaria Brno. 73. 10.2754/avb200473040477.

Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B., 2009. Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. 2(2), 36–41. https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2

Blanchette, M.; Haney, J.F., 2002.The Effect of Toxic Microcystis Aeruginosa on Four Different Populations of Daphnia. UNH Cent. Freshw. Biol. Res., 4, 1–10.

Blom, J. F., Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G., Jung, G., Süssmuth, R. D., & Jüttner, F., 2003. Oscillapeptin J, a new grazer toxin of the freshwater cyanobacterium Planktothrix rubescens. Journal of Natural Products, 66(3), 431–434. https://doi.org/10.1021/np020397f

Bone, D. H., 1971. Nitrogenase Activity and Nitrogen Assimilation in *Anabaena* flos-aquae Growing in Continuous Culture. 241, 234–241. https://doi.org/10.1007/BF00410124

Bonnefoy, M., Drai, J., and Kostka, T., 2002. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. Presse Med. 31, 1174–1184.

Bourne, D. G., Jones, G. J., Blakeley, R. L., Jones, A., Negri, A. P., & Riddles, P., 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. Applied and Environmental Microbiology, 62(11), 4086–4094. https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4086-4094.1996

Bourne, D. G., Riddles, P., Jones, G. J., Smith, W., Blakeley, R. L., 2001. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. Environ. Toxicol. 16 523–534. 10.1002/tox.10013.abs

Brennan, L., & Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and

Sustainable Energy Reviews, 14(2), 557–577. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009

Briand, E., Bormans, M., Quiblier, C., Salençon, M. J., & Humbert, J. F., 2012. Evidence of the cost of the production of microcystins by Microcystis aeruginosa under differing light and nitrate environmental conditions. PLoS ONE, 7(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029981

Brondizio, E., Settele, J., Diaz, S., NGO, H., 2019. Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services of the Intergovernmental Science-policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. IPBES Secretariat, Bonn

Broderius, S. J., 1991. Modelling the joint toxicity of xenobiotics to aquatic organisms: basic concepts and approaches. In Mayers, M. A. and Barron, M. G. (Eds), Aquatic Toxicology and Risk Assessment, Vol. 14, ASTM STP 1124, ASTM, Philadelphia, pp. 107–127.

Brierley, A. S., 2017. Plankton. Current Biology, 27(11), R478–R483. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.045

Brown, L. M., Zeiler, K., 1993. Energy Conv. Mgmt 34:1005-1013

Bulat, Z., Đukić-ćosić, D., Antonijević, B., Buha, A., & Bulat, P., 2017. Can zinc supplementation ameliorate cadmium-induced alterations in the bioelement content in rabbits ? 38–45. https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2919

Buratti, F.M.; Scardala, S.; Funari, E.; Testai, E., 2011. Human Glutathione Transferases Catalyzing the Conjugation of the Hepatatoxin Microcystin-LR. Chem. Res. Toxicol. 24, 926–933.

Cavin, L., 2017 1 - Freshwater Environments and Fishes, Editor(s): Lionel Cavin, Freshwater Fishes: 250 Million Years of Evolutionary History, Elsevier, 2017, Pages 1-14, ISBN 9781785481383, https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-138-3.50001-7.

Castenholz R.W., Garcia-Pichel F., 2012. Cyanobacterial Responses to UV Radiation. In: Whitton B. (eds) Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_19

Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. Chemosphere, 58(9), 1255–1267. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044

Camargo, J. A., Alonso, Á., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. Environ Int. 32:831–849

Camargo, J.A., Ward, J.V., 1995. Nitrate (NO3-N) toxicity to aquatic life: a proposal of safe concentrations for two species of Nearctic freshwater invertebrates. Chemosphere 31, 3211–3216

Campos, A. & Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. Int J Mol Sci 11, 268–287.

Carmichael, W. W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, 72(6), 445–459. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x

Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F., 2014. Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: recent advances. International journal of molecular sciences, 16(1), 871–886. https://doi.org/10.3390/ijms16010871.

Charles, D.F., Smol, J.P., Engstrom, D.R., 1994. Paleolimnological approaches to biological monitoring. In: Loeb, S.L., Spacie, A. (Eds), Biological Monitoring of Aquatic Systems. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 233–293

Chen, W., Song, L., Ou, D., & Gan, N., 2005. Chronic Toxicity and Responses of Several Important Enzymes in Daphnia magna on Exposure to Sublethal Microcystin-LR. 323–330. https://doi.org/10.1002/tox.20108

Chen, W., Liu, H., Zhang, Q., & Dai, S., 2011. Effect of nitrite on growth and microcystins production of Microcystis aeruginosa PCC7806. Journal of Applied Phycology, 23(4), 665–671. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9558-y

Chen, Z., Wang, L., Qiu, S., & Ge, S., 2018. Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. BioMed Research International, 2018. https://doi.org/10.1155/2018/1503126

Chislock, M. F., Sarnelle, O., Jernigan, L. M. & Wilson, A. E., 2013. Do high concentrations of microcystin prevent Daphnia control of phytoplankton? Water Res. 47, 1961–1970.

Choi, J., Roche, H., Caquet, T., 2000. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 495–500. https://doi.org/10.1002/etc.5620190231

Choi, Y. R., & Markakis, P., 1981. Blue-green algae as a source of protein. Food Chemistry, 7(4), 239–247. https://doi.org/10.1016/0308-8146(81)90029-7

Choi, J., Roche, H., Caquet, T., 1999. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in

Chironomus riparius mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19 (2), 495–500. https://doi.org/10.1002/etc.5620190231

Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P., 2015. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00014-5

Christenson, L., & Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. Biotechnology Advances, 29(6), 686–702. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015

Christoffersen, K., Lyck, S., & Winding, A., 2002. Microbial activity and bacterial community structure during degra- dation of microcystins. Aquatic Microbial Ecology, 27, 125–136.

Christoffersen, K., 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. Phycologia 35 (6), 42–50. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-42.1.

Cobbett, C., & Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review of Plant Biology, 53, 159–182. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154

Codd, G. A., 1995. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. Water Sci Technol 32:149–156

Collins, A. R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology, 26(3), 249–261. https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249

Contardo-Jara, V.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C., 2008. Multi-xenobiotic Resistance a Possible Explanation for the Insensitivity of Bivalves towards Cyanobacterial Toxins. Toxicon, 52, 936–943.

Cousins, I. T., Bealing, D. J., James, H. A., & Sutton, A., 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. Water Research, 30(2), 481–485. https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00189-1

Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. Chemosphere 96, 1e15. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056.

Correll, D. L., 1998. The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review. Journal of Environmental Quality, 27(2), 261–266. https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x

Côté, I. M., Darling, E. S. & Brown, C. J., 2016. Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283(1824), 1–9. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2592

Dahman, Y., Dignan, C., Fiayaz, A., & Chaudhry, A., 2019. An introduction to biofuels, foods, livestock, and the environment. In Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00013-8

Das, P., Mandal, S. C., Bhagabati, S. K., Akhtar, M. S., & Singh, S. K., 2012. Important live food organisms and their role in aquaculture. Frontiers in aquaculture, 5(4), 69-86.

Davidović, P., Blagojević, D., Babić, O., & Simeunović, J., 2019. The influence of nitrogen and growth phase on the toxicity of the cyanobacterial strain Microcystis PCC 7806. Zbornik Matice Srpske Za Prirodne NaukeMatica Srpska Journal for Natural Sciences, (136), 89–100. https://doi.org/10.2298/zmspn1936089d

Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J., 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. Harmful Algae, 8(5), 715–725. https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004

Dayton, G. H., 2018. Water Availability. In Encyclopedia of Ecology, 2nd Edition (2nd ed.). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11134-0

De Maagd, P.G.; Hendriks, A.J.; Seinen, W.; Sijm, D., 1999. pH-dependent Hydrophobicity of the Cyanobacteria Toxin Microcystin-LR. Water Res. 33, 677–680.

DeMott, W. R., Zhang, Q. X., and Carmichael, W. W., 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of Daphnia. Limnol. Oceanogr. 36:1346–1357.

DeMott, W.R., Moxter, F., 1991. Foraging on cyanobacteria by copepods: responses to chemical defences and resource abundance. Ecology 72 (5), 1820–1834.

DeMott, W.R.; Dhawale, S., 1995. Inhibition of in vitro protein phosphatase activity in three zooplâncton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. Arch. Hydorbiol., 134, 417–424.

De Porcellinis, A., Frigaard, N. U., & Sakuragi, Y., 2017. Determination of the Glycogen Content in Cyanobacteria. Journal of visualized experiments : JoVE, (125), 56068. https://doi.org/10.3791/56068

Di Giulio, R. T. and Benson, W. H. (Eds), 2002. Intercon- nections Between Human Health and Ecological Integrity. SETAC Press, Pensacola, p. 136.

Di Giulio, R. T., W. H. Benson, B. M. Sanders and P. A. Van Veld., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In Rand, G. M. (Ed.), Fundamentals of Aquatic Toxicology, 2nd edn, Chapter 17. Taylor and Francis, Washington, DC. pp. 523–561

Dixon, R. A., Al-Nazawi, M., & Alderson, G., 2004. Permeabilising effects of sub-inhibitory concentrations of microcystin on the growth of Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters, 230(2), 167–170. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00910-8

Dokulil, M. T., & Teubner, K., 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. Hydrobiologia, 438, 1–12. https://doi.org/10.1023/A:1004155810302

Drobac, D., Tokodi, N., Simeunović, J., Baltić, V., Stanić, D., & Svirčev, Z., 2013. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju, 64(2), 305–316. https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2320

Dugdale, R. C. and J. J. Goering. 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. Limnology and Oceanog- raphy 12:196-206.

Dunstan, G. A., Volkman, K., Jeffrey, S. W., & Barrett, S. M., 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae . 2 . Lipid classes and fatty acids. 161, 115–134.

Đukić-Ćosić, D., Baralić, K., Javorac, D., Buha-Djordjevic, A., Bulat, Z., 2020. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity, Current Opinion in Toxicology, Volume 19, Pages 56-62, ISSN 2468-2020, https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.12.002.

Echlin, P., 1966. The blue-green algae. Scientific American, 214 6, 75-81 .

Emerson, K., R.C. Russo, R.E. Lund andR.V. Thurston., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board Can. 32:2379-2383.

Enyidi, U. D., 2017. *Chlorella vulgaris* as protein source in the diets of African Catfish *Clarias gariepinus*. Fishes, 2(4). https://doi.org/10.3390/fishes2040017

Eriksson, J. E., Toivola, D., Meriluoto, J. A. O., Karaki, H., Han, Y. G., & Hartshorne, D., 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 173(3), 1347–1353. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80936-2

EPA. Eco Update, Using Toxicity Tests in Ecological Risk Assessment. Intermittent Bulletin 2(1), 1994 [http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/ecoup/pdf/v2no1.pdf]

Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. Int. J. Environ. Res. Public Health 2 (1), 43–50. https://doi.org/10.3390/ijerph2005010043.

Falkowski, P. G., & Raven, J. A., 2014. 1. An Introduction to Photosynthesis in Aquatic Systems. Aquatic Photosynthesis, (Knoll 2003), 1–43. https://doi.org/10.1515/9781400849727.1

Ferrão-Filho, A.D.S., Kozlowsky-Suzuki, B., 2011. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. Mar. Drugs. 9 (12), 2729–2772. https://doi.org/10.3390/md9122729.

Forcella, M., Berra, E., Giacchini, R., & Parenti, P., 2007. Antioxidant Defenses Preserve Membrane Transport Activity in *Chironomus riparius* Larvae Exposed to Anoxia. 194(October 2006), 181–194. https://doi.org/10.1002/arch.20197

Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V, Burnaford, J., Henry, R., Hall, J., & Baumgartner, K., 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. 44, 864–877. https://doi.org 10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0864

Freitad de Magalhaes, V., Moraes Soares, R., Azevedo, S. M. .F. O., 2001: Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. Toxicon 39: 1077-1085

Fritsen, C.H. and Priscu, J.C., 1998. Cyanobacterial assemblages in permanent ice covers of Antarctic lakes: distribution, growth rate, and temperature response of photosynthesis, J. Phycol. 34, 587-597.

Fritsen, C.H., Christian, H. and Priscu, J.C., 1996. Photosynthetic characteristics of cyanobacteria in permanent ice-covers on lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica, Antarct. J. US 31, 216-218.

Frouz, J., Ali, A., Lobinske, R.J., 2004a. Laboratory evaluation of six algal species for larval nutritional suitability of the pestiferous midge glyptotendipes paripes (Diptera: Chironomidae). J. Econ. Entomol. 97 (6), 1884–1890. https://doi.org/10.1603/0022- 0493-97.6.1884.

Frouz, J., Ali, A., Lobinske, R.J., 2004b. Algal food selection and digestion by larvae of the pestiferous chironomid *Chironomus crassicaudatus* under laboratory conditions. J. Am. Mosq. Control Assoc. 20 (4), 458–461.

Fulton, R.S., III and Paerl, H.W., 1987a. Effects of colonial mor- phology on zooplankton utilization of algal resources dur- ing blue-green algal (Microcystis aeruginosa) blooms. Limnol. Oceanogr. 32, 634?644.

Fulton, R. S. III, Paerl, H. W., 1987b. Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga Microcystis aeruginosa on herbivorous zooplankton. J Plankton Res 9:837–855

Galic, N., Hommen, U., Baveco, J. M., van den Brink, P. J. 2010. Potential application of population models in the European ecological risk assessment of chemicals II: review of models and their potential to address environmental protection aims. Integrat Environ Assess Manage 6(3): 338-360

Gangstad, E.O., 1959. The role of algae in aquatic ecosystems. http://oai.dtic.mil/oai/oai?, Accessed date: 19 December 2019.

Gaudin, J., Huet, S., Jarry, G., Fessard, V., 2008. In vivo DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. Mutation Research 652, 65–71

Gaysina, L. A., Saraf, A., & Singh, P., 2018. Cyanobacteria in Diverse Habitats. In Cyanobacteria: From Basic Science to Applications. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5

Ger, K. A., Panosso, R., & Lurling, M., 2011. Consequences of acclimation to Microcystis on the selective feeding behavior of the calanoid copepod Eudiaptomus gracilis. Limnology and Oceanography, 56(6), 2103–2114. https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2103

Gimpel, J. A., Henríquez, V., & Mayfield, S. P., 2015. In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: Potential and challenges come with great diversity. Frontiers in Microbiology, 6(DEC), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01376

Giovannoni, S. J., and Vergin, K. L., 2012. Seasonality in ocean microbial communities. Science 335, 671–676. doi: 10.1126/science.1198078

Glazer, A.N., 1977. Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. Mol Cell Biochem 18, 125–140. https://doi.org/10.1007/BF00280278

Gleick, P.H. (Ed.), 1993. Water in Crisis: A Guide to the Worlds Fresh Water Resources. Oxford University Press, New York.

Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C., and Kuriyan, J., 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. Nature 376:745–753.

Gosselin, S. & Fortier, L., & Gagné, Jacques., 1989. Vulnerability of marine fish larvae to the toxic dinoflagellate Protogonyaulax tamarensis. Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER. 57. 1-10. 10.3354/meps057001.

Groh, K.J., Carvalho, R.N., Chipman, J.K., Denslow, N.D., Halder, M., Murphy, C.A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., Watanabe, K.H., 2015. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: II. A focus on growth impairment in fish. Chemosphere 120, 778–792. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.006

Guerrero, M. G. & Lara, C. 1987. Assimilation of inorganic nitrogen. In Fay, P. & Van Baalen, C. [Eds.] The Cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam, pp. 163–86

Guiry, M. D., 2012. How many species of algae are there? J. Phycol. 48, 1057–1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x

Guo, Nichun & Xie, Ping., 2006. Development of Tolerance Against Toxic Microcystis aeruginosa in Three Cladocerans and the Ecological Implications. Environmental pollution (Barking, Essex : 1987). 143. 513-8. 10.1016/j.envpol.2005.11.044.

Gupta, N., Pant, S. C., Vijayaraghavan, R., & Rao, P. V. L., 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. Toxicology, 188(2–3), 285–296. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00112-4

Gustafsson, S.; Hanson, L., 2004. Development of Tolerance against Toxic Cyanobacteria in Daphnia. Aquat. Ecol., 38, 37–44.

Ha, M., Choi, J., 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarker for ecotoxicity monitoring. Chemosphere 71, 1928–1936. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.018

Habashy, M., 2005. Culture of Chironomid Larvae (Insecta- Diptera- Chironomidae) Under Different Feeding Systems. Egyptian Journal of Aquatic Research, 31(2), 403–418.

Hairston Jr., N.G., Lampert, W., Ca`ceres, C.E., Holtmeier, C.L., Weider, L.J., Gaedke, U., Fischer, J.M., Fox, J.A., Post, D.M., 1999. Rapid evolution re- vealed by dormant eggs. Nature 401, 446.

Hakanson, L., 2006. Suspended Particulate Matter in Lakes, Rivers, and Marine Systems; Blackburn Press: West Caldwell, NJ, USA.

Haney, J. F., 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkin- seed sunfish (Lepomis gibbosus) Toxicon 48:580–589

Harada, K. I., 2004. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. Chem. Pharm. Bull. 52, 889–899.

Harada, K. I., Tsuji, K., Watanabe, M. F., & Kondo, F., 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria - III. Effect of pH and temperature. Phycologia, 35(SUPPL.), 83–88. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6s-83.1

Harland, F. M. J., Wood, S. A., Moltchanova, E., Williamson, W. M., & Gaw, S., 2013. Phormidium autumnale growth and anatoxin-a production under iron and copper stress. Toxins, 5(12), 2504–2521. https://doi.org/10.3390/toxins5122504

Harvey, H., 1940. Nitrogen and phosphorus required for the growth of phytoplankton. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 24(1), 115-123. doi:10.1017/S0025315400054485

Hassing, J., Ipsen, N., & Clausen, T. J., 2009. Integrated Water Resources Management (IWRM) in Action. The United Nations World Water Assessment Programme, 1–18.

Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. Environ Sci Pollut Res 18: 1–11.

Hecky, R. E.; Kilham, P., 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. Limnology and Oceanography 33(4part2): 796-822.

Henriques-Oliveira, A.L., Nessimian, J.L., Dorvillé, L.F., 2003. Feeding habits of chironomid larvae (Insecta: Diptera) from a stream in the Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro. Brazil. Braz. J. Biol. 63 (2), 269–281. https://doi.org/10.1590/S1519-69842003000200012.

Herdman, M., 1988. Cellular Differentiation: Akinetes. Methods in Enzymology, 167(C), 222–232. https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67024-8

Hickey, C. W., Thompson, K. A, Albert, A., Martin, M. L., 2013. Chronic sensitivity of juvenile inanga (Galaxias maculatus) and early life-stage rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to nitrate. HBR13207; HAM2013-012. NIWA report for Hawkeé Bay Regional Council. Data received via mail from Dr Chris Hickey 2016-11-14.

Hildebrand, M., Abbriano, R. M., Polle, J. E., Traller, J. C., Trentacoste, E. M., Smith, S. R., et al., 2013. Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. Curr. Opin. Chem. Biol. 17, 506–514. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.02.027

Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S., 2013. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella* vulgaris FSP-E. Bioresource Technology, 135, 157–165. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100

Hoffmann, J. P., 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. Journal of Phycology, 34(5), 757–763. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340757.x

Holland, A., & Kinnear, S., 2013. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? Marine Drugs, 11(7), 2239–2258. https://doi.org/10.3390/md11072239

Holm, N.P.; Shapiro, J.S., 1984. An Examination of Lipid Reserves and the Nutritional Status of Daphnia pulex Fed Aphanizomenon flos-aquae. Limnol. Oceanogr. 28, 677–687.

Hommen, U., Baveco, J. M., Gallic, N., van den Brink, P. J. 2010. Potential application of ecological models in the European environmental risk assessment of chemicals I: review of protection goals in EU directives and regulations. Integr Environ Assess Manage 6 (3), 325-337.

Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H., Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. Nat. Rev. Microbiol. 16, 471–483. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1.

Huntington, T. G., 2006. Evidence for intensification of the global water cycle: Review and synthesis. Journal of Hydrology, 319(1–4), 83–95. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2005.07.003

Hrouzek, P., Tomek P., Lukesova A., Urban J., Voloshko L., Pushparaj B., et al., 2011. Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial Nostoc strains, originating from different climatic/geographic regions and habitats: is their cytotoxicity environmentally dependent? Environ. Toxicol. 26 345–358. 10.1002/tox.20561

Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Tsuji, K., & Harada, K. I., 2005. Bacterial degradation of microcystins and nodularin. Chemical Research in Toxicology, 18(3), 591–598. https://doi.org/10.1021/tx049677g

IPBES, 2019. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystemservices.IPBES.Secretariat,Bonn.https://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/spm_unedited_advance_for_posting_htn.pdf. Accessed 1 June 2019

Ishii, H., Nishijima, M., & Abe, T., 2004. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. Water Research, 38(11), 2667–2676. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.014

Izaguirre, G., Jungblut, A. D., & Neilan, B. A., 2007. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. Water Research, 41(2), 492–498. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.012

Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., Harada, K., 2002. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity ofmicrocystins and relatedcompounds. Toxicon 40,1017–1025.

Jablanović, M., Jakšić, P., Kosanović, K., 2003: Uvod u ekotoksikologiju. Univerzitet u Prištini, PMF. Kosovska Mitrovica.

Jacinavicius, F. R., Pacheco, A. B. F., Chow, F., Verissimo da Costa, G. C., Kalume, D. E., Rigonato, J., … Sant'Anna, C. L., 2019. Different ecophysiological and structural strategies of toxic and non-toxic Microcystis aeruginosa (cyanobacteria) strains assessed under culture conditions. Algal Research, 41(May), 101548. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101548

Jackson, M.C., Loewen, C.J.G., Vinebrooke, R.D., Chimimba, C.T., 2016. Net effects ofmultiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. Glob. Chang. Biol. 22 (1), 180–189. https://doi.org/10.1111/gcb.13028

Jankowiak, J., Hattenrath-Lehmann, T., Kramer, B.J., Ladds, M. and Gobler, C.J., 2019, Deciphering the effects of nitrogen, phosphorus, and temperature on cyanobacterial bloom intensification, diversity, and toxicity in western Lake Erie. Limnol Oceanogr, 64: 1347-1370. doi:10.1002/lno.11120

Jay, M & Mujizat, Kawaroe & Effendi, Hefni., 2018. Lipid and fatty acid composition microalgae *Chlorella* vulgaris using photobioreactor and open pond. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 141. 012015. 10.1088/1755-1315/141/1/012015.

Jia, Y., Du, J., Song, F., Zhao, G., & Tian, X., 2012. A fungus capable of degrading microcystin-LR in the algal culture of Microcystis aeruginosa PCC7806. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166(4), 987–996. https://doi.org/10.1007/s12010-011-9486-6

Johansson, L., & Wallström, K., 2001. Urban impact in the history of water quality in the Stockholm archipelago. Ambio, 30(4–5), 277–281. https://doi.org/10.1579/0044-7447-30.4.277

Johnson, A. C., & Castenholz, R. W., 2000. Preliminary observations of the benthic cyanobacteria of Waldo Lake and their potential contribution to lake productivity. Lake and Reservoir Management, 16(1–2), 85–90. https://doi.org/10.1080/07438140009354225

Jokela, J., Oftedal, L., Herfindal, L., Permi, P., Wahlsten, M., Døskeland, S. O., & Sivonen, K., 2012. Anabaenolysins, novel cytolytic lipopeptides from benthic *Anabaena* cyanobacteria. PLoS ONE, 7(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041222

Jonas, A., Scholz, S., Fetter, E., Sychrova, E., Novakova, K., Ortmann, J., Benisek, M., Adamovsky, O., Giesy, J.P., Hilscherova, K., 2015. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and zebrafish embryos assays. Chemosphere 120, 321e327. https://doi.org/10.1016/ j.chemosphere.2014.07.074.

Jonasson, S. Vintila, S. Sivonen, K. El-Shehawy, R., 2008. Expression of the nodularin synthetase genes in the Baltic Sea bloom-former cyanobacterium Nodularia spumigena strain AV1. FEMS Microbiol. Ecol., 65, 31–39.

Jones, G. J., & Orr, P. T., 1994. Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of a Microcystis Aeruginosa Bloom in. 28(4), 871–876. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90093-0

Jorgenson, A. K., 2009. Political-economic integration, industrial pollution and human health: A panel study of less-developed countries, 1980-2000. International Sociology, 24(1), 115–143. https://doi.org/10.1177/0268580908099156

Jungmann, D., & Benndorf, J., 1994. Toxicity to Daphnia of a compound extracted from laboratory and natural Microcystis spp., and the role of microcystins. Freshwater Biology, 32(1), 13–20. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1994.tb00861.x

Kaczorowska, A., Kornijów, R., 2012. Palaeoecological evidence for changes over the past 200 years in chironomid communities of a shallow lake exposed to cyanobacterial toxins. Aquat. Ecol. 46, 465–473. https://doi.org/10.1007/s10452-012-9415-y.

Kaebernick, M. and Neilan, B. A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, FEMS Microbiology Ecology, Volume 35, Issue 1, March 2001, Pages 1–9, https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x

Kelman, D., Ben-Amotz, A., & Berman-Frank, I., 2009. Carotenoids provide the major antioxidant defence in the globally significant N2-fixing marine cyanobacterium Trichodesmium. Environmental Microbiology, 11(7), 1897–1908. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01913.x

Kenyon, C. N., Rippka, R. & Stanier, R. Y. 1972. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 83:216–36. https://doi.org/10.1007/BF00645123

Kim, I. S., Nguyen, G.-H., Kim, S.-Y., Lee, J.-W., & Yu, H.-W., 2009. Evaluation of Methods for Cyanobacterial Cell Lysis and Toxin (Microcystin-LR) Extraction Using Chromatographic and Mass Spectrometric Analyses. Environmental Engineering Research, 14(4), 250–254. https://doi.org/10.4491/eer.2009.14.4.250

Kim, E. H. & Kang, S. K., 1993. The effect of heavy metal ions on the growth of *Microcystis aeruginosa*. J. Korean Soc. Water Qual. 9:193-200

Kinne, O. (Ed.), 1984. Marine Ecology. John Wiley and Sons, London

Kiviranta, J., Abdel-Hameed, A., Sivonen, K., Niemelä, S. I., & Carlberg, G., 1993. Toxicity of cyanobacteria to mosquito larvae—screening of active compounds. Environmental Toxicology and Water Quality, 8(1), 63–71. https://doi.org/10.1002/tox.2530080107

Kiviranta, J., Abdel-Hameed, A., 1994. Toxicity of the blue-green alga Oscillatoria agardhii to the mosquito Aedes aegypti and the shrimp Artemia salina. World J Microbiol Biotechnol. 10(5):517-20. doi: 10.1007/BF00367656.

Knoll, A. H., 2005. Life on a Young Planet: The First Three Billion Years of Evolution on Earth, 277 pp. Princeton, NJ: Princeton University Press

Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M., Harada, K., 1996. Detection and identification ofmetabolites ofmicrocystins formed in vivo in mouse and rat livers. Chem. Res. Toxicol. 9, 1355–1359.

Koroiva, R., Souza, C.W.O., Toyama, D., 2013. Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *StenoChironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. Genet. Mol. Res. 12 (3), 3421–3434. https://doi.org/10.4238/2013.April.2.2

Koreivienė, J., Belous, O., 2012. Methods for cyanotoxins detection. Botanica Lithuanica 18(1): 58–65.

Kovač, D., Simeunović, J., Babić, O., Mišan, A. Č., & Milovanović, I. L., 2013. Algae in food and feed. Food and Feed Research, 40(1), 21–31.

Kovač, D., Babić, O., Janjušević, Lj., Knežević V., Svirčev, Z., Simeunović, J., 2017. Toxicity testing of cyanobacterial strains using different bioassays and enzymatic AChE assay. Cyanotoxins – toxicity, health and enviromental impact. July 13-14, 2017 Novi Sad, Serbia.

Krambeck, C., 1988. Control of bacterioplankton structures by grazing and nutrient supply during the decline of an algal bloom, SIL Proceedings, 1922-2010, 23:1, 496-502, DOI: 10.1080/03680770.1987.11897968

Kubickova, B., Babica, P., Hilscherová, K., & Šindlerová, L., 2019. Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. Environmental Sciences Europe, 31(1), 1–27. https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2

Kurmayer, R., Kutzenberger, T., 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium Microcystis sp. Appl Environ Microbiol 69: 6723–6730.

Lahti, K., Niemi, M. R., Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Biodegradation of cyanobacterial hepatotoxins—characterisa- tion of toxin degrading bacteria. In: Reguera B, Blanco J, Ferna´ndez ML, Wyatt T (eds). Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference of Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovern- mental Oceanographic Commission of UNESCO: Santiago de Compostela, Spain, pp 363–365.

Lampert, W., 1981. Toxicity of blue-green Microcystis aeruginosa: Effective defense mechanism against grazing pressure by Daphnia. Internationale Vereinigung fiir theoretische und angewandfe Limnologie, 21, 1436-1440.

Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. (Nil), … Zhong, M., 2018. The Lancet Commission on pollution and health. The Lancet, 391(10119), 462–512. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0

Larkum, A. W., Ross, I. L., Kruse, O., Hankamer, B., 2011. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. Trends Biotechnol 30:198–205

Laurén-Määttä, C., Hietala, J., Reinikainen, M., Walls, M., 1995. Do Microcystis aeruginosa toxins accumulate in the foodweb: a laboratory study. Hydrobiologia 304 (1), 23–27. https://doi.org/10.1007/BF02530700

Lea, P. J., 1985. Ammonia Assimilation and Amino Acid Biosynthesis. In Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis (2nd Editio). https://doi.org/10.1016/b978-0-08-031999-5.50024-8

Lee, T. -G., Park, S. -W., Yu, T. -S. & Kim, J., 1998. The growth and coagulation characteristics of Microcystis aerugino- sa during water treatment processes. J. Korea Technol. Soc. Water Waste Water Treat. 6:33-42.

Lee, S-m., Lee, S-b., Park, C.-H., Choi, J., 2006. Expression ofheat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. Cheposphere 65, 1074–1081. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.042.

Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M. et al., 2008. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of Microcystis cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. Hydrobiologia 600, 187–204. https://doi.org/10.1007/s10750-007-9231-x

Lehtimaki, J & Moisander, Pia & Sivonen, Kaarina & Kononen, Kaisa., 1997. Growth, Nitrogen Fixation, and Nodularin Production by Two Baltic Sea Cyanobacteria. Applied and environmental microbiology. 63. 1647-56. 10.1128/AEM.63.5.1647-1656.1997.

Leland, H.V.; Kuwabara, J.S., 1985. Trace metals. In Fundamentals of Aquatic Toxicology; Rand, G.M., Petrocelli, S.R., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, pp. 374–415.

Leu, S., & Boussiba, S., 2014. Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. Industrial Biotechnology, 10(3), 169–183. https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039

Lewin R.A., 1981. The Prochlorophytes in The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, eds Starr M. P., Stolp H., Trüper H. G., Balows A., Schlegel H. G. (Berlin: Springer-Verlag;), 257–266

León, C., Boix, C., Beltrán, E., Peñuela, G., López, F., Sancho, J. V., & Hernández, F., 2019. Study of cyanotoxin degradation and evaluation of their transformation products in surface waters by LC-QTOF MS. Chemosphere, 229, 538–548. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.219

Liu, G., Qian, Y., Dai, S., & Feng, N., 2008. Adsorption of microcystin LR and LW on suspended particulate matter (SPM) at different pH. Water, Air, and Soil Pollution, 192(1–4), 67–76. https://doi.org/10.1007/s11270-008-9635-x

Liu, Jin & Chen, Feng., 2014. Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. Advances in biochemical engineering/biotechnology. 153. 10.1007/10_2014_286.

Lone, Y., Koiri, R.K., Bhide, M., 2015. An overview of the toxic effect of potential human carcinogen microcystin-LR on the testis. Toxicol. Rep. 2, 289–296. https://doi.org/ 10.1016/j.toxrep.2015.01.008.

López, C. V. G., del Carmen Cerón García, M., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F., 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. Bioresource Technology, 101(19), 7587–7591. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077

Lubitz, J.A., 1963. The protein quality, digestibility, and composition of micro-algae, *Chlorella* 71105. J. Food Sci. 28, 229–232. [CrossRef]

Ma, Z., Yu, H., Thring, R. W., Dai, C., Shen, A., & Zhao, M., 2018. Interaction between simulated dense Scenedesmus dimorphus (Chlorophyta) bloom and freshwater meta-zooplankton community. Journal of Limnology, 77(2), 255–265. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2018.1742

MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T., Cohen, P., MacKintosh, C., 1995. The cyanobacterial toxin microcystin-LR binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. FEBS Letters 371, 236–240.

Makawy, A.I., Abdel-Aziem, S.H., Ibrahim, F.M., Sharaf, H.A., Abd-Elmoneim, O.M., Darwish, A.M., 2016. Potential modulator role of *Chlorella* vulgaris and Spirulina platensis on monosodium glutamate oxidative stress, genotoxicity, apoptotic gene expression, and histopathological alterations. Int. J. Pharmtech Res. 9 (11), 161–177

Makpol, S., Yaacob, N., Zainuddin, A., Yusof, Y.A.M., Ngah, W.Z.W., 2009. *Chlorella* vulgaris modulates hydrogen peroxide-induced DNA damage and telomere shortening

of human fibroblasts derived from different aged individuals. Afr J Tradit Complement Altern Med 6 (4), 560–572. https://doi.org/10.4314/ajtcam.v6i4.57210.

Manahan, S.E., 2003. Toxicological Chemistry and Biochemistry, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp.142–153.

Marañón, E., 2009. Phytoplankton Size Structure. Encyclopedia of Ocean Sciences, 0, 445–452. https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00661-5

Marten, G. G., 2007. Larvicidal Algae. Journal of the American Mosquito Control Association, 23(sp2), 177–183. https://doi.org/10.2987/8756-971x(2007)23[177:la]2.0.co;2

Markert, B., Wünschmann S., 2011. Bioindicators and Biomonitors: Use of Organisms to Observe the Influence of Chemicals on the Environment. In: Schröder P., Collins C. (eds) Organic Xenobiotics and Plants. Plant Ecophysiology, vol 8. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9852-8_10

Markert, Prof. Dr. Bernd & Breure, Anton & Zechmeister, Harald., 2003. Chapter 1 Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. 6. 3-39. 10.1016/S0927-5215(03)80131-5.

Martinović, J., Dopsaj, V., Dopsaj, M. J., KoturStevuljević, J., Stefanović, A., & Nešić, G., 2009. Long-term effects of oxidative stress in volleyball players. International Journal of Sports Medicine, 30(12), 851−856. doi: 10.1055/s-0029 -1238289

Martins, R.F., Fernández, N.L., Beiras, R., Vasconcelos, V.V., 2007. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine Synechocystis and Synechococcus cyanobacterial strains in marine invertebrates. Toxicon 50 (6), 791–799. https://doi. org/10.1016/j.toxicon.2007.06.020 24

Martínez-Francés, E., Escudero-Oñate, C., 2018. Cyanobacteria and microalgae in the production of valuable bioactive compounds. Microalgal Biotechnology, 105–128 https://doi.org/10.5772/intechopen.74043

Materasi, R., C. Paoletti, W. Balloni & C. Florenzano. 1980. Some considerations on the production of lipid substances by micro-algae and cyanobacteria. Pp. 619-625 in: Algae biomass. Elsevier/North –Holland Biomed. Press, Amsterdam.

Matović, V., Bulat, Z. P., Djuki, D., & Soldatovi, D., 2010. Antagonism between cadmium and magnesium : a possible role of magnesium in therapy of cadmium intoxication. 23(1), 19–26. doi: 10.1684/mrh.2010.0196.

Matsunaga, T., H. Takeyama, T. Nakao, & A. Yamazawa,1999. Screening of marine microalgae for bioremediation ofcadmium-polluted seawater. J. Biotech. 70: 33-38.

Matthew, M.W., David, P., 1998. Selection of an appropriate life cycle stage of *Chironomus riparius* meigen for use in chronic sediment toxicity testing. Chemosphere 36, 1405–1413. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)10041-8Get

Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Pflugmacher, S., Codd, G.A., 2000. Immuno-crossreactivity and toxicity assesment of conjugation productsof the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. FEMS Microbiol. Lett. 189, 155–158.

Metting, F. B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 17(5–6), 477–489. https://doi.org/10.1007/bf01574779

Menezes, C., Valério, E., Dias, E., 2013. The Kidney Vero-E6 Cell Line: A Suitable Model to Study the Toxicity of Microcystins. New Insights Into Toxicity and Drug Testing. Sivakumar Gowder. In Tech Open https://doi.org/10.3390/toxins1002007610.5772/54463 Chapter 2

Michailova, P., Sella, G., Petrova, N., 2012. Polytene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of trace-metal-induced genome instability. Fauna Norvegica 31, 227–234. https://doi.org/10.5324/fn.v31i0.1355.

Michael, P. Waalkes., 2000. Cadmium carcinogenesis in review, Journal of Inorganic Biochemistry, Volume 79, Issues 1–4, Pages 241-244, ISSN 0162-0134, https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00009-X

Mills, D., Wyatt, J., 1974. Ostracod reactions to non-toxic and toxic algae. Oecologia 17 (2), 171–177. https://doi.org/10.1007/BF00346279.

Milošević, D., Simić, V., Stojković, M., Čerba, D., Mančev, D., Petrović, A., Paunović, M., 2013. Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: toward the use of non-biting midges in bioassessment programs. Aquat. Ecol. 47, 37–55. https://doi.org/10.1007/s10452-012-9423-y.

Moffatt, N.M., 1981. Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom. Rapp. P.-v. R&n. Cons. bit. Explor. Mer 178, 475-480.

Mohamed, Z. A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella* vulgaris and Scenedesmus quadricauda and their possible

significance in the aquatic ecosystem. Ecotoxicology, 17(6), 504–516. https://doi.org/10.1007/s10646-008-0204-2

Mohlenberg, F., Jensen, A., 1980. The ecotoxicology of cadmium in fresh and seawater and water pollution with cadmium in Denmark. Charlottenlund Natn Angency Envir Protect Mar Poll Lab 42 pp

Molina-Grima, E., Belarbi, E. H., Acién Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. Biotechnology Advances, 20(7–8), 491–515. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2

Morris, R. J., Williams, D. E., Luu, H. A., Holmes, C. F. B., Andersen, R. J., & Calvert, S. E., 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. Toxicon, 38(2), 303–308. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00149-X

Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgül, S., Golubnitschaja, O., & Flammer, J., 2008. Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. Molecular vision, 14, 1584–1588.

Munusamy, T.; Hu, Y.; Lee, J., 2012. Adsorption and Photodegradation of Microcystin-LR onto Sediments Collected from Reservoirs and Rivers in Taiwan: A Laboratory Study to Investigate the Fate, Transfer, and Degradation of Microcystin-LR. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 2390–2399.

Murata, N., Wada, H. & Gombos, Z. 1992. Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 33:933–41. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078344

Myers, C. R., Collins, M. L. P., Agresti, M., & Bergtrom, G., 1986. Haemoglobin-producing tissues of larvae and pupae of *Chironomus* thummi (Diptera). Journal of Insect Physiology, 32(10), 845–851. https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90099-5

Nagasaki, K., and Brussaard, C. P. D., 2008. Algal Viruses, Editor(s): Brian W.J. Mahy, Marc H.V. Van Regenmortel, Encyclopedia of Virology (Third Edition), Academic Press, Pages 97-105, ISBN 9780123744104, https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00359-9.

Namikoshi, M., Rinehart, K. L., 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. J Ind Microbiol Biot 17:373–384.

Natić, D., Jovanović, D., Knežević, T., Karadžić, V., Bulat, Z., & Matović, V., 2012. Mikrocistin-LR u površinskim vodama reke Ponjavice. Vojnosanitetski Pregled, 69(9), 753–758. https://doi.org/10.2298/VSP1209753N

Napiórkowska-Krzebietke, A., 2017. Phytoplankton as a basic nutritional source in diets of fish. Journal of Elementology, 22(3), 831–841. https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.4.1375

Negri, A.P., Jones, G.J., Blackburn, S.I., Oshima, Y. and Onodera, H., 1997. Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena* circinalis. J. Phycol., 33, 26-35. Journal of Phycology, 33: 26-35. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00026.x

Negri, A.P. and Jones, G.J., 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena* circinalis by the freshwater mussel Alathyria condola. Toxicon, 33(5), 667-678.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. Environmental Microbiology, 15(5), 1239–1253. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x

Newcombe, G., Chorus, I., Falconer, I., & Lin, T., 2012. Cyanobacteria : Impacts of climate change on occurrence , toxicity and water quality management. Water Research, 46(5), 1347–1348. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.047

Niedermeyer, T.H.J., Schmieder, P. and Kurmayer, R., 2014. Isolation of microcystins from the cyano- bacterium Planktothrix rubescens strain No80. Natural Products and Bioprospecting 4, 37−45.

Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., … Fujiki, H., 1992. Cancer esearch C fical @ neology Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. 420–424. https://doi. org/10.1007/BF01629424

Nizan, S., Dimentman, C. & Sh, Uo, M., 1986. Acute toxic effects of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa Microbiology, 57(4), 1241-1254. on Daphnia magna. Limnology and Oceanography, 31, Sivonen K. (1990) Effects of light, temperature, nitrate, 497-502.

Not, F., Siano, R., Kooistra, W. H. C. F., Simon, N., Vaulot, D., & Probert, I., 2012. Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton. In Advances in Botanical Research (Vol. 64). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00001-3

Oberhaus, L.; Gelinas, M.; Pinel-Alloul, B.; Ghadouani, A.; Humbert, J., 2007. Grazing of Two Toxic Planktothrix Species by Daphnia pulicaria: Potential for Bloom Control and Transfer of Microcystins. J. Plankton Res. 29, 827–838.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004: Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris, DOI: https://doi.org/10.1787/9789264070264-en

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004a Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water, OECD Guidelines for the

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011. Test No. 235: *Chironomus* Sp., Acute Immobilisation Test. OECD Publishing. DOI: https://doi.org/10.1787/9789264122383-en

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, DOI: https://doi.org/10.1787/9789264090910-en

Oehlmann, J., Markert, B. (Eds), 1999. Ökotoxikologie – Ökosystemare Ansätze und Methoden. Ecomed, Landsberg.

Oh, H. M., Lee, S. J., Jang, M. H., & Yoon, B. D., 2000. Microcystin production by Microcystis aeruginosa in a phosphorus-limited chemostat. Applied and Environmental Microbiology, 66(1), 176–179. https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.176-179.2000

Oh, H.-M., Lee, S.J., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Yoon, B.-D., 2001. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentration in Daechung Reservoir, Korea. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1484–1489.

Oki, T., & Kanae, S., 2006. Global Hydrological Cycles and Freshwater Resources Freshwater. Science, 313(5790), 1068–1073.

Oleson, D. J., & Makarewicz, J. C., 1990. Effect of Sodium and Nitrate on Growth of *Anabaena* Flos-Aquae (Cyanophyta). Journal of Phycology, Vol. 26, pp. 593–595. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00593.x

Ou, D., Song, L., Gan, N., & Chen, W., 2005. Effects of microcystins on and toxin degradation by Poterioochromonas sp. Environmental Toxicology, 20(3), 373–380. https://doi.org/10.1002/tox.20114

Orihel, D. M., Bird, D. F., Brylinsky, M., Chen, H., Donald, D. B., Huang, D. Y., … Vinebrooke, R. D., 2012. High microcystin concentrations occur only at low nitrogen-to-phosphorus ratios in nutrient-rich Canadian lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 69(9), 1457–1462. https://doi.org/10.1139/F2012-088

Ormerod, S. J., Dobson, M., Hildrew, A. G., & Townsend, C. R., 2010. Multiple stressors in freshwater ecosystems. Freshwater Biology, 55(SUPPL. 1), 1–4. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02395.x

Ortiz-Rodriguez, R., Dao, T. S., & Wiegand, C., 2011. Effects of microcystin-LR on the physiological performance of Daphnia magna and its offspring. Abstract from SETAC 21st annual meeting, Milano, Italy.

Ownby, J. D., Shannahan, M., & Hood, E., 1979. Protein synthesis and degradation in *Anabaena* during nitrogen starvation. Journal of General Microbiology, 110(2), 255–261. https://doi.org/10.1099/00221287-110-2-255

Østensvik, Skulberg, O. M., Underdal, B., & Hormazabal, V., 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria - A comparative study of bacterial bioassays. Journal of Applied Microbiology, 84(6), 1117–1124. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00449.x

Paerl, H.W., 2018. Mitigating toxic planktonic cyanobacterial blooms in aquatic ecosys- tems facing increasing anthropogenic and climatic pressures. Toxins 10 (2), 76–92. https://doi.org/10.3390/toxins10020076.

Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisander, P. H., & Dyble, J., 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. TheScientificWorldJournal, 1, 76–113. https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16

Palinska, K. A., & Surosz, W., 2014. Taxonomy of cyanobacteria : a contribution to consensus approach. 1–11. https://doi.org/10.1007/s10750-014-1971-9

Palus, J., Dziubałtowska, E., Stańczyk, M., Lewińska, D., Mankiewicz-Boczek, J., Izydorczyk, K., Bonisławska, A., Jurczak, T., Zalewski, M., Wąsowicz, W., 2007. Biomonitoring of cyanobacterial blooms in a Polish water reservoir and the cytotoxicity and genotoxicity of selected cyanobacterial extracts. Int. J. Occup. Med. Environ. Health 20 (1), 48–65. https://doi.org/10.2478/v10001-007-0008-2

Pan, H., Song, L., Liu, Y., Börner, T., 2002. Detection of hepatotoxic Microcystis strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. Arch. Microbiol., 178: 421-427.

Papadimitriou, T.; Kagalou, I.; Bacopoulos, V.; Leonardos, I.D., 2010. Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek lakes. Environ. Toxicol. 25, 418–427.

Park, S. Y., Choi, J., 2009. Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposure in Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, Daphnia magna, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius* . Bull Environ Contam Toxicol 83, 463–468. https://doi.org/10.1007/s00128-009-9745-1

Pascoe, D., Brown, A.F., Evans, B.M.J. et al., 1990. Effects and fate of cadmium during toxicity tests with *Chironomus riparius*—the influence of food and artificial sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19, 872–877. https://doi.org/10.1007/BF01055053

Patel, A., Barrington, S., & Lefsrud, M., 2012. Microalgae for phosphorus removal and biomass production: A six species screen for dual-purpose organisms. GCB Bioenergy, 4(5), 485–495. https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2012.01159.x

Pearson, L.; Mihali, T.; Moffitt, M.; Kellmann, R.; Neilan, B., 2010. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. Mar. Drugs, 8, 1650-1680. https://doi.org/10.3390/md8051650

Peng, L.; Liu, Y.; Chen, W.; Liu, L.; Kent, M.; Song, L., 2010. Health Risks Associated with Consumption of Microcystin-contaminated Fish and Shellfish in three Chinese Lakes: Significance for Freshwater Aquacultures. Ecotox. Environ. Saf. 73, 1804–1811.

Pesch, G. G. and Wells, P. G. (Eds), 2004. Tides of Change Across the Gulf. Gulf of Maine Council on the Marine Environment. GOMC, Concord, p. 81.

Peters, G.A., 1991. Azolla and other plant-cyanobacteria symbioses: Aspects of form and function. Plant Soil 137, 25–36. https://doi.org/10.1007/BF02187428

Petrović, M., Ginebreda, A., Acuña, V., Batalla, R.J., Elosegi, A., Guasch, H., López de Alda, M., Marcé, R., Muñoz, I., Navarro-Ortega, A., Navarro, E., Vericat, D., Sabater, S., Barceló, D., 2011. Combined scenarios of chemical and ecological quality under water scarcity in Mediterranean rivers. Trends Anal. Chem. 30 (8), 1269–1278. https://doi.org/ 10.1016/j.trac.2011.04.012.

Pflugmacher, S, Wiegand, C., Oberemm, A, Beattie, K. A, Krause, E, Codd, G. A, Steinberg, C. E., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. Biochim Biophys Acta. 1425(3):527-33. doi: 10.1016/s0304-4165(98)00107-x.

Pflugmacher, S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. Environmental Toxicology, 17(4), 407–413. https://doi.org/10.1002/tox.10071

Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M. V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., & Pflugmacher, S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. Environmental Toxicology, 16(6), 535–542. https://doi.org/10.1002/tox.10014

Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S., & Vasconcelos, V., 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. Hydrobiologia, 705(1), 27–42. https://doi.org/10.1007/s10750-012-1372-x

Pinho, G. L. L., Moura Da Rosa, C., Maciel, F. E., Bianchini, A., Yunes, J. S., Proença, L. A. O., & Monserrat, J. M., 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. Ecotoxicology and Environmental Safety, 61(3), 353–360. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.11.014

Ponce-Toledo, R. I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K., & Moreira, D., 2017. An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. Current Biology, 27(3), 386–391. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056

Porter, K. G., and Orcutt, J. D., Jr., 1980. Nutritional adequacy, manageability and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue-green algae for Daphnia. Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp. 3:268–281.

Posthuma, L., Zijp, M. C., De Zwart, D., Van de Meent, D., Globevnik, L., Koprivsek, M., … Birk, S., 2020. Chemical pollution imposes limitations to the ecological status of European surface waters. Scientific Reports, 10(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71537-2

Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., … Codd, G. A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. Lancet, 352(9121), 21–26. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1

Power, A., G. 2010. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. Phil. Trans. R. Soc. B, 365:2959–2971 http://doi.org/10.1098/rstb.2010.0143

Proteau, P. J., Gerwick, W. H., Garcia-Pichel, F., & Castenholz, R., 1993. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. Experientia, 49(9), 825–829. https://doi.org/10.1007/BF01923559

Provost, M.W., Branch, N., 1959. Food of chironomid larvae in Polk County lakes. Fla. Entomol. 42, 49–62.

Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M., 2009. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. Toxicon, 54(2), 161–169. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.030

Quiblier, Catherine & Wood, Susanna & Echenique, Isidora & Heath, Mark & Aurelie, Villeneuve & Humbert, Jean-François., 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. Water research. 47. 10.1016/j.watres.2013.06.042.

Rabalais, N.N., 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. Ambio 31, 102–112

Raja, V.K.S., Kumar, S.A., 2016. Influence of *Chlorella* and Scenedesmus algal extracts on the economic traits of silkworm, Bombyx mori L. Int. J. Adv. Res. 4, 1521–1525. https://doi.org/10.21474/IJAR01/1649

Rand, D. A., & Wilson, H. B., 1995. Using spatio-temporal chaos and intermediate-scale determinism to quantify spatially extended ecosystems. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 259(1355), 111–117. https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0017

Rand, G., 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.

Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Assessment of Environmental Conditions That Favor Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena* spp. Strains Cultured under Light Limitation at Different Temperatures. Microb Ecol 36, 181–192. https://doi.org/10.1007/s002489900105

Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K. and Niemelä, S., 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. Letters in Applied Microbiology, 19: 423-428.

Rapport, D., Costanza, R., Epstein, P. R., Gaudet, C. and Levins, R. (Eds), 1998. Ecosystem Health. Blackwell Science, Malden, p. 372.

Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., … Cooke, S. J., 2018. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. https://doi.org/10.1111/brv.12480

Reid, A. J., Carlson, A. K., Hanna, D. E. L., Olden, J. D., Ormerod, S. J., & Cooke, S. J., 2020. Conservation Challenges to Freshwater Ecosystems. In Encyclopedia of the World's Biomes. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11937-2

Reinikainen, M., Lindvall, F., Meriluoto, S. R., Sivonen, S., Spoof, L., and Wahlsten, M. 2002. Effects of dissolved cyanobacterial toxins on the survival and egg hatching of estuarine calanoid copepods. Mar. Biol. 140:577–583.

Rey, J. R., Hargraves, P. E., & O'Connell, S. M., 2009. Effect of selected marine and freshwater microalgae on development and survival of the mosquito Aedes aegypti. Aquatic Ecology, 43(4), 987–997. https://doi.org/10.1007/s10452-009-9232-0

Reynolds, C., 2006. The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511542145

Rice, E. L., 1984. Allelopathy. 2nd ed. New York: Academic Press.

Riesing, T. F., 2006. Cultivating Algae for Liquid Fuel Production. Permaculture Activist 48 (59)

Rigosi, A., Carey, C. C., Ibelings, B. W., & Brookes, J. D., 2014. The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. Limnology and Oceanography, 59(1), 99–114. https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.1.0099

Robarts, R. D., & Zohary, T., 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 21:3, 391-399, DOI: 10.1080/00288330.1987.9516235

Robinson, N.A., Pace, J.G., Matson, C.F., Miura, G.A. and Lawrence, W.B., 1991. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther., 256(1), 176-182.

Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Bo¨rner, T, Kohl, J., 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of Daphnia galeata caused by the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Appl Env Microbiol 65:737–739.

Romero, J.; Lee, K.-S.; Pérez, M.; Mateo, M.A.; Alcoverro, T., 2006. Nutrients dynamics in seagrass ecosystems, in: Larkum, A.W.D. et al. (Ed.) Seagrasses: biology, ecology and conservation. pp. 227-254

Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J., 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. Current Opinion in Biotechnology, 19(5), 430–436. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.008

Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W., Haselkorn, R., & Sivonen, K., 2004. Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. Applied and Environmental Microbiology, 70(2), 686–692. https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.686-692.2004

Rudolph-Böhner, S., Mierke, D. F., and Moroder, L. 1994. Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. FEBS Lett. 349:319–323.

Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S. M., Lee, E. Y. C., & Zhang, L. F., 1995. In Vivo and in Vitro Binding of Microcystin to Protein Phosphatase 1 and 2A. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 216, pp. 162–169. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2605

Safafar, H., Hass, M. Z., Møller, P., Holdt, S. L., & Jacobsen, C., 2016. High-EPA biomass from Nannochloropsis salina cultivated in a flat-panel photo-bioreactor on a process water-enriched growth medium. Marine Drugs, 14(8). https://doi.org/10.3390/md14080144

Saffarini, D. A., Trewitt, P. M., Luhm, R. A., & Bergtrom, G., 1991. Differential thummi regulation of insect globin and actin mRNAs during larval development in *Chironomus* have been reported. 101, 215–222.

Sander, K., & Murthy, G. S., 2010. Life cycle analysis of algae biodiesel. International Journal of Life Cycle Assessment, 15(7), 704–714. https://doi.org/10.1007/s11367-010-0194-1

Schiewer, S., & Volesky, B., 2000. Biosorption by Marine Algae. Bioremediation, 139–169. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9425-7_8

Schindler, D. E., Carpenter, S. R., Cottingham, K. L., He, X., Hodgson, J. R., Kitchell, J. F., & Soranno, P. A., 1996. Food Web Structure and Littoral Zone Coupling to Pelagic Trophic Cascades. Food Webs, 96–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7007-3_9

Schindler, D. W., Hecky, R. E., Findlay, D. L., Stainton, M. P., Parker, B. R., Paterson, M. J., … Kasian, S. E. M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing

nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(32), 11254–11258. https://doi.org/10.1073/pnas.0805108105

Schindler, D. W., 2012. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 279(1746), 4322–4333. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1032

Schmidt, J. R., Wilhelm, S. W., & Boyer, G. L., 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. Toxins, 6(12), 3354–3387. https://doi.org/10.3390/toxins6123354

Schwarzenbach, R., Escher, B., Fenner, K., Hofstetter, T., Johnson, A., Gunten, U., & Wehrli, B., 2006. El desafío de los microcontaminantes en los sistemas acuáticos. Science, 313(August), 1072–1077.

Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., Von Gunten, U., & Wehrli, B., 2010. Global water pollution and human health. Annual Review of Environment and Resources, 35, 109–136. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342

Schubaur-Berigan, M.K., Monson, P.D., West, C.W. and Ankley, G.T., 1995. Influence of pH on the toxicity of ammonia to *Chironomus* tentans and Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry, 14: 713-717. https://doi.org/10.1002/etc.5620140419

Schüürmann, G., 1998. Ecotoxic modes of action of chemical substances. In: Schüürmann, G., Markert, B. (Eds), Ecotoxicology. Wiley, New York, and Spektrum, Heidelberg, pp. 665–749.

Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L. et al., 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the mcyD gene in Microcystis aeruginosa PCC7806. Ecotoxicology 19, 1167–1173. https://doi.org/10.1007/s10646-010-0500-5

Seale, D. B., Boraas, M. E., & Warren, G. J., 1987. Effects of sodium and phosphate on growth of cyanobacteria. Water Research, 21(6), 625–631. https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90072-8

Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Khoeyi, Z. A., 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella* vulgaris under different light regimes. Journal of Applied Phycology, 23(4), 721–726. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8

Sedmak, B., & Kosi, G., 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. Journal of Plankton Research, 20(4), 691–708. https://doi.org/10.1093/plankt/20.4.691

Sharara, M. A., Clausen, E. C., & Carrier, D. J., 2012. An Overview of Biorefinery Technology. Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing, 1–18. https://doi.org/10.1002/9780470976692.ch1

Shin, H. J., Murakami, M., Matsuda, H., & Yamaguchi, K., 1996. Microviridins D-F, serine protease inhibitors from the cyanobacterium Oscillatoria agardhii (NIES-204), Tetrahedron, Volume 52, Issue 24, Pages 8159-8168, ISSN 0040-4020, https://doi.org/10.1016/0040 4020(96)00377-8.

Shiozaki, T., Hirose, Y., Hamasaki, K., Kaneko, R., Ishikawa, K., & Harada, N., 2019. Eukaryotic Phytoplankton Contributing to a Seasonal Bloom and Carbon Export Revealed by Tracking Sequence Variants in the Western North Pacific. Frontiers in Microbiology, 10(November), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02722

Short, F. T., & Wyllie-echeverria, S., 1996. Natural and human-induced disturbance of seagrasses. 23(1), 17–27. https://doi.org/10.1017/S0376892900038212

Simeunović, J., 2009. Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Simeunović, J., 2010. Cijanobakterije i cijanotoksini u površinskim vodama Vojvodine. Andrejević K. i Andrejević T.(eds). Beograd, Biblioteka Dissertatio, Zadužbina Andrejević, ISBN: 978-86-7244-903-7

Simeunović, J., Marković, S., Kovač, D., Mišan, A., Mandić, A., Svirčev, Z., 2012. Filamentous cyanobacteria from Vojvodina region as source of phycobiliprotein pigments as potentional natural colorants. Food and Feed Research 39 (1): 23-31.

Simeunović, J., Bešlin, K., Svirčev, Z., Kovač, D., Babić, O., 2013. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. Journal of Applied Phycology 25 (2): 597-607.

Sirenko, L., Kozitskaya, V., 1988. Biologically active substances of algae and water quality. Kiev: Naukova Dumka.

Singh, N., Sharma, B., 2018. Biotoxins mediated DNA damage and role of phytochemicals in DNA protection. Biochem Mol Biol J 04 (01), 18–21. https://doi.org/10.21767/ 2471-8084.100054.

Singh, D. P. & Tyagi, Madhu & Kumar, Arvind & Thakur, J. & Kumar, Ashok., 2001. Antialgal activity of a hepatoxin-producing cyanobacterim Microcystis aeruginosa. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17. 15-22. 10.1023/A:1016622414140.

Singh, R.K., Chavan, S.L. & Sapkale, P.H. Heavy Metal Concentrations in Water, Sediments and Body Tissues of Red Worm (Tubifex spp.) Collected from Natural Habitats in Mumbai, India. Environ Monit Assess 129, 471–481 (2007). https://doi.org/10.1007/s10661-006-9377-4

Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J. (eds). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon: London, pp 41–111.

Sivonen, K., 2009. Cyanobacterial Toxins, Editor(s): Moselio Schaechter, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), Academic Press, Pages 290-307, ISBN 9780123739445, https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00005-5.

Sindermann, C. J., 2006. Coastal Pollution. Effects on Living Resources and Humans. CRC Press, Boca Raton, p. 280.

Smayda, T. J., 1997. Bloom dynamics : Physiology, behavior, trophic effects. Limonaology and Oceanography, 42, 1132–1136.

Smith, J. L., Smith, S. B., Savino, J. F. Blouin. M. A., 1988. Acute toxicity to Daphnia pulex of six classes of chemical compounds poten- tially hazardous to Great Lakes biota. J. Great Lakes Res. 14: 394–404.

Smith, K. L. Jr, Robison, B. H., Helly, J. J. et al., 2007. Free-drifting icebergs: hot spots of chemical and biological enrichment in the Weddell Sea. Science, 317, 478–482.

Smith, J. L., Boyer, G. L., Mills, E., Schulz, K. L., 2008. Toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, to multiple life stages of the burrowing mayfly, Hexagenia, and possible implications for recruitment. Environmental Toxicology. 23(4):499-506. DOI: 10.1002/tox.20369.

Smith, J. L., Boyer, G. L., & Zimba, P. V., 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. Aquaculture, 280(1–4), 5–20. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.007

Song, W., Bardowell, S., O'Shea, K.E., 2007. Mechanistic study and the influence of oxygen on the photosensitized transformations of microcystins (Cyanotoxins). Environ. Sci. Technol. 41, 5336e5341. https://doi.org/10.1021/es063066o

Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M.M., Liu, Y. and Kaya, K., 1998. Microcystin production of Microcystis viridis (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycological Research, 46: 19-23. doi:10.1046/j.1440-1835.1998.00120.x

Soucek, D. J., Dickinson, A., 2016. Influence of chloride on the chronic toxicity of sodium nitrate to Ceriodaphnia dubia and Hyalella Azteca. Ecotoxicology 25:1406.

Sotero-Santos, R.B., Garcia-Carvalho, E., Dellamano-Oliveira, M. J. Rocha, O., 2008. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil), Harmful Algae, Volume 7, Issue 5, Pages 590-598, ISSN 1568-9883, https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.12.017.

Spencer, C., 1975. The micronutrient elements. In: Riley, J.P., Skirrow, G. (Eds.), Chemical Oceanography, vol. II, second ed. Academic Press, London

Spoof, L., & Catherine, A., 2017. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, 526–537. https://doi.org/10.1002/9781119068761.app3

Stal, L.J., 2015. Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). doi:10.1002/9780470015902.a0021159.pub2

Stanković, M., Radovanović, D., 2012. Oxidative stress and physical activity. Sportlogia. 8. doi.org/10.5550/sgia.120801.en.001S.

Strimbu, K., & Tavel, J. A., 2010. What are biomarkers? Current Opinion in HIV and AIDS, 5(6), 463–466. https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177

Subhadra, B., & Edwards, M., 2010. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. Energy Policy, 38(9), 4897–4902. https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.036

Sulaiman, S., Wan Ngah, W.Z., Shamaan, N.A., Mohd Yusof, Y.A., 2006. Chemopreventive effect of *Chlorella* vulgaris in choline-deficient diet and ethionine induced liver carcinogenesis in rats. Int. J. Cancer Res. 2 (3), 234–241. https://doi.org/10.3923/ijcr.2006.234.241.

Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H., Renganathan, S., 2016. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefin- org/10.1016/j.rser.2015.11.026. ery approach. Renew Sustain Energy Rev;55:909?41.

Suikkanen, S., Fistarol, G. O., & Granéli, E., 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria Nodularia spumdigena, Aphanizomenon flos-aquae and *Anabaena*

lemmermannii on algal monocultures. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 308(1), 85–101. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.02.012

Suikkanen, S., G. O. Fistarol & E. Grane´li, 2005. Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. Marine Ecology Progress Series 287: 1–9.

Summerfield, T. C., Sherman, L. A., 2008. Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 to a pH 10 environment. Appl Environ Microbiol. 74(17):5276-84. doi: 10.1128/AEM.00883-08.

Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Pantelić, D., Dulić, T., 2013. Cyanobacterial blooms and their toxicity in Vojvodina lakes, Serbia. International Journal of Environmental Health Research 7: 745-758.

Svirčev, Z., Krstić, S., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V., Vidović, M., 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews 27: 36-55.

Svirčev, Z., Obradović, V., Codd, G. A., Marjanović, P., Spoof, L., Drobac, D., … Meriluoto, J., 2016. Massive fish mortality and Cylindrospermopsis raciborskii bloom in Aleksandrovac Lake. Ecotoxicology, 25(7), 1353–1363. https://doi.org/10.1007/s10646-016-1687-x

Ścieszka, S. & Klewicka, E., 2019. Algae in food: a general review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59:21, 3538-3547, DOI: 10.1080/10408398.2018.1496319

Takser, L., Benachour, N., Husk, B., Cabana, H., Gris, D., 2016. Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects inmurine brain cells: potential implications for neurodegenerative diseases. Toxicol. Rep. 3, 180–189. https://doi.org/10.1016/j. toxrep.2015.12.008.

Takahashi, M.A., Higuti, J., Bagatini, Y.M., Zviejkovshi, I.P., Velho, L.F.M., 2008. Composition and biomass of larval chironomid (Insecta, Diptera) as a potential indicator of trophic conditions in southern Brazil reservoirs. Acta Limnol. Bras. 20, 5–13.

Takenaka, S., 2001. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. Environ Toxicol Pharmacol 9:135–139.

Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S., 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella* vulgaris and nitrogen removal from media. Bioresource Technology, 57(1), 45–50. https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00045-4

Tarkowska-Kukuryk, M., 2013. Periphytic algae as food source for grazing chironomids in a shallow phytoplankton-dominated lake. Limnologica, 43(4), 254–264. https://doi.org/10.1016/j.limno.2012.11.004

Taub, F.B & A.M. Dollar. 1965. Control of protein levels in *Chlorella*. J. Food Sci. 30: 359-364

Taziki, M., Ahmadzadeh, H., & A. Murry, M., 2016. Growth of *Chlorella* vulgaris in High Concentrations of Nitrate and Nitrite for Wastewater Treatment. Current Biotechnology, 4(4), 441–447. https://doi.org/10.2174/2211550104666150930204835

Teodorović, I., Kaišarević, S. 2015. Ekotoksikologija. Novi Sad: Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematièki fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Tonk, L., Van De Waal, D. B., Slot, P., Huisman, J., Matthijs, H. C. P., & Visser, P. M., 2008. Amino acid availability determines the ratio of microcystin variants in the cyanobacterium Planktothrix agardhii. FEMS Microbiology Ecology, 65(3), 383–390. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00541.x

Toporowska, M., Pawlik-Skowrońska, B., Kalinowska, R., 2014. Accumulation and effects of cyanobacterial microcystins and anatoxin-a on benthic larvae of *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae). Eur. J. Entomol. 111, 83–90. https://doi.org/10.14411/eje.2014.010

Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Suzuki, M. and Harada, K. I., 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. Enviro. Sci. Technology, 28(1): 173-177.

Tsuji, K., Masui, H., Uemura, H., Mori, Y., & Harada, K. I., 2001. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. Toxicon, 39(5), 687–692. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00196-3

Tuncturk, M., Ozgokce, F., & Sekeroglu, N., 2015. Determination of nutritional value and mineral composition of some wild Scorzonera species. American Journal of Essential Oils and Natural Products, 3(2), 22–25. http://www.essencejournal.com/pdf/2015/vol3issue2/PartA/3-1-11-934.pdf

Turner, A. D., Dhanji-Rapkova, M., O'Neill, A., Coates, L., Lewis, A., & Lewis, K., 2018. Analysis of microcystins in cyanobacterial blooms from freshwater bodies in England. Toxins, 10(1). https://doi.org/10.3390/toxins10010039

Ullrich, W.R., Schmitt, H. D., Arntz, E., 1981. Regulation of Nitrate Uptake in Green Algae and Duckweeds Effect of Starvation and Induction. In: Bothe H., Trebst A. (eds) Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur. Proceedings in Life Sciences. Springer, Berlin, Heidelberg. 244–251. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67919-3_19

UN Educ. Sci. Cult. Organ. (UNESCO). 2009. The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World. Paris/New York: UNESCO/Berghahn Books.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64(2), 178–189. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013

van Dijk, G. M., van Liere, L., Admiraal, W., Bannink, B. A., & Cappon, J. J., 1994. Present state of the water quality of European rivers and implications for management. Science of the Total Environment, The, 145(1–2), 187–195. https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90309-3

Vargas, M. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J. A., Rivas, J., & Guerrero, M. G., 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. Journal of Phycology, 34(5), 812–817. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340812.x

Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M., & Moreau, H., 2008. The diversity of small eukaryotic phytoplankton (≤3 μm) in marine ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, 32(5), 795–820. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00121.x

Vela, L., Sevilla, E., Gonzalez, C., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L., 2008. Exploring the interaction of microcystin-LR with proteins and DNA. Toxicology in Vitro, 22(7), 1714–1718. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.07.008

Vermeulen, N.P.E., 1996. Role of Metabolism in Chemical Toxicity. In Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects; Ioannides, C., Eds. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 29–49.

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr Pharm Des 10:1677–1694

Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J. C., & Salkinoja-Salonen, M., 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). Microbial Ecology, 35(2), 126–135. https://doi.org/10.1007/s002489900067

Vincent, W.F., 2009. Cyanobacteria. Encyclopedia of Inland Waters, 3, 226-232.

Volesky, B., Holan, Z. R., 1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnol Prog. 1995 May-Jun;11(3):235-50. doi: 10.1021/bp00033a001

Vouk, V. B., Butler, G. C., Upton, A. C., Parke, D. V., and S. C. ASHER, S. C., [EDS.], 1987. Methods for assessing the effects of mix- tures of chemicals. Wiley.

Wang, Z., Zhang, J., Li, E., Zhang, L., Wang, X., Song, L., 2017. Combined toxic effects and mechanisms of microsystin-LR and copper on Vallisneria Natans (Lour.) Hara seedlings. J Hazard Mater. 15;328:108-116. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.12.059.

Wang, X., Parkpian, P., Fujimoto, N., Mathuros Ruchirawat, K., DeLaune, R. D., Jugsujinda, A., 2002. Environmental conditions associating microcystins production to Microcystis aeruginosa in a reservoir of Thailand, Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 37:7, 1181-1207, DOI: 10.1081/ESE-120005980

Wang, W-X, Rainbow, P. S., 2006. Subcellular Partitioning and the Prediction of Cadmium Toxicity to Aquatic Organisms. Environmental Chemistry 3, 395-399.

Wang, Q., Su, M., Zhu, W., Li, X., Jia, Y., Guo, P., … Tian, X., 2010. Growth inhibition of Microcystis aeruginosa by white-rot fungus Lopharia spadicea. Water Science and Technology, 62(2), 317–323. https://doi.org/10.2166/wst.2010.214

Wang, Pei & Liu, Zhihong & Xu, Ling & Tai, Peidong & Xiaojun, li & Deng, Xin & Yang, Xiaonan. (2014). Acute and chronic toxic effects of ammonia to *Chironomus riparius*. WIT Transactions on Biomedicine and Health. 18. 591-598. 10.2495/HHME131281.

Wang, S., Zhu, L., Li, Q., Li, G., Li, L., Song, L., & Gan, N., 2015. Distribution and population dynamics of potential anatoxin-a-producing cyanobacteria in Lake Dianchi, China. Harmful Algae, 48, 63–68. https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.005

Ward, D.M., Castenholz, R.W., 2000 Cyanobacteria in Geothermal Habitats. In: Whitton B.A., Potts M. (eds) The Ecology of Cyanobacteria. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_3

Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J. B., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S., … Williams, S. L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal

ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(30), 12377–12381. https://doi.org/10.1073/pnas.0905620106

Wells, P. G., 2003. Assessing health of the Bay of Fundy—concepts and framework. Marine Pollution Bulletin, 46, 1059–1077.

Wells, P. G., 2009. Aquatic Toxicology: Concepts, Practice, New Directions. In General and Applied Toxicology. https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat092

Wetzel, R.G., 2001. Limnology, 3rd ed. Academic Press, New York

Wilhelm, S. W. 1995. Ecology of iron-limited cyanobacteria: A review of physiological responses and implications for aquatic systems. Aquatic Microbial Ecology 9:295–303.

Williams, D.E., Craig, M., Dawe, S.C., Kent, M.C., Holmes, C.F.B. and Anderson, R.J. 1997. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon larvae and dungeness crab larvae. Chem. Res. Toxicol., 10, 463-469.

Williams, K. A., Green, D. W. J., Pascoe, D., & Gower, D. E., 1986. The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. Oecologia, 70(3), 362–366. https://doi.org/10.1007/BF00379498

Winder, M., and Sommer, U., 2012. Phytoplankton response to a changing climate. Hydrobiologia 698, 5–16. doi: 10.1007/978-94-007-5790-5_2

Welker, M., Steinberg, C., 2000. Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural waters. Environ Sci Technol 34:3415–3419. https://doi.org/10.1021/es991274t.

White, A.W., 0. Fukuhara and M. Anraku. 1989. Mortality of fish larvae from eating toxic dinoflagellates or zooplankton containing dinoflagellate toxins. p. 395-398, In: Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology, T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto (eds.), Elsevier, NY.

Whittaker, R.H., 1975. Communities and Ecosystems. 2nd Revise Edition, MacMillan Publishing Co., New York.

Wolkoff, A.W.; Cohen, D.E. Hepatic Transport of Bile Acids. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2003, 284, 175–179.

Wu, Y., Li, L., Gan, N., Zheng, L., Ma, H., Shan, K., … Song, L., 2014. Seasonal dynamics of water bloom-forming Microcystis morphospecies and the associated extracellular microcystin concentrations in large, shallow, eutrophic Dianchi Lake. Journal of

Environmental Sciences (China), 26(9), 1921–1929. https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.031

Wörmer, L., Huerta-Fontela, M., Cirés, S., Carrasco, D., & Quesada, A., 2010. Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin. Environmental Science and Technology, 44(8), 3002–3007. https://doi.org/10.1021/es9036012

Xie, L., Rediske, R. R., Hong, Y., O'Keefe, J., Gillett, N. D., Dyble, J., & Steinman, A. D., 2012. The role of environmental parameters in the structure of phytoplankton assemblages and cyanobacteria toxins in two hypereutrophic lakes. Hydrobiologia, 691(1), 255–268. https://doi.org/10.1007/s10750-012-1077-1

Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y., Park, H., 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the Eutrophic Lake Chaohu, China. Environmental Toxicology 20, 293–300.

Yamada, T., Sakaguchi, K., 1982. Electron microscopic studies of *Chlorella* ellipsoidea protoplast formation. MicroSoc 128 (6), 1319–1327. https://doi.org/10.1099/00221287-128-6-1319.

Yan, N., Keller, W., Scully, N. et al., 1996. Increased UV-B penetration in a lake owing to drought-induced acidification. Nature 381, 141–143. https://doi.org/10.1038/381141a0

Yin, Z., & Raven, J., 1997. A comparison of the impacts of various nitrogen sources on acid-base balance in C3 Triticum aestivum L. and C4 Zea mays L. plants. Journal of Experimental Botany, 48, 315-324.

Yusof, Y.A.M., Saad, S.M., Makpol, S., Shamaan, N.A., Ngah, W.Z.W., 2010. Hot water extract of *Chlorella* vulgaris induced DNA damage and apoptosis. Clinics 65 (12), 1371–1377. https://doi.org/10.1590/S1807-59322010001200023.

Yu, Q., Matheickal, J. T., Yin, P., & Kaewsarn, P., 1999. Heavy metal uptake capacities of common marine macro algal biomass. Water Research, 33(6), 1534–1537. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00363-7

Zamri, K. S., Norripin, M. K. N., Darus, F. I., Ekambaram, D. G., Abdul Raof, N. D., Roslan, N. H., … Mohd Yusof, Y. A., 2018. Protective effect of *Chlorella* vulgaris on dna damage, oxidative stress, and lung morphological changes in cigarette smoke-exposed rats. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 11(10), 145–149. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.26352

Zanchett, G., Oliveira-Filho, E.C., 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. Toxins 5 (10), 1896–1917. https://doi.org/10.3390/toxins5101896

Zapomělová, E., Hrouzek, P., Řeháková, K. et al., 2008. Morphological variability in selected heterocystous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. Folia Microbiol 53, 333. https://doi.org/10.1007/s12223-008-0052-8

Žegura, B., Lah, T. T., & Filipič, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. Toxicology, 200(1), 59–68. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.03.006

Žegura, B., 2016. An overview of the mechanisms ofmicrocystin-LR genotoxicity and potential carcinogenicity. Mini-Rev. Med. Chem. 16 (13), 1042–1062. https://doi.org/10.2174/1389557516666160308141549

Zhang, D., Deng, X., Xie, P., Chen, J., & Guo, L., 2013. Risk assessment of microcystins in silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) from eight eutrophic lakes in China. Food Chemistry, 140(1–2), 17–21. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.124

Zhang, D., Xie, P., Chen, Y., Dai, M., Qiu, T., Liu, Y. & Liang, G., 2009. Determination of microcystin-LR and its metabolites in snail (Bellemya aeruginosa), shrimp (Macrobrachium nippo- nensis) and silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) from lake Taihu, China. — Chemosphere 76: 974–981.

Zhang, H., & Reynolds, M., 2019. Cadmium exposure in living organisms: A short review. Science of the Total Environment, 678, 761–767. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395

Zhang, Z.-D., Liang, K., Li, K., Wang, G.-Q., Zhang, K.-W., Cai, L., Zhai, S.-T., Chou, K.-C., 2017. *Chlorella* vulgaris induces apoptosis of human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells. Med. Chem. 13 (6), 560–568. https://doi.org/10.2174/1573406413666170510102024

Zurawell, R. W., Chen, H., Burke, J. M., & Prepas, E. E., 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews, 8(1), 1–37. https://doi.org/10.1080/10937400590889412

8. PRILOZI

Spisak slika

Slika 1 Šematski prikaz nekih od stresora koji mogu delovati na slatkovodne ekosisteme. 6

Slika 2. Zone vodenih basena na primeru jezera (A) i bioekocenoze u njima (B). 9

Slika 3. Difuzni i tačkasti izvori emisije zagađujućih materija u vode. 10

Slika 4. Cijanobakterije slatkovodnih ekosistema. 20

Slika 5. Fotomikrografija čestih rodova mikroalgi u cvetanjima slatkih voda 24

Slika 6. Šematski prikaz lokacije i strukture lignina (mreža), hemiceluloze (kućište), i celuloze (unutar hemiceluloze) u masi lignoceluloze 25

Slika 7. Primena mikroalgi kao sirovina za različite industrijske grane. 26

Slika 8. Molekularna struktura mikrocistina-LR. 38

Slika 9. Mikrografija trihoma testirane kulture *Anabaena* sp. 61

Slika 10. Lokacija označena na Google mapi sa koje je uzet uzorak iz koga je izolovan testirani soj *Chlorella* sp. 62

Slika 11. Mikrografija ćelija testiranog soja *Chlorella* sp. 62

Slika 12. Lokacija označena na Google mapi sa koje je uzet uzorak iz kojeg su sakupljene larve od kojih je kasnije u laboratoriji formirana populacija *C. riparius*. 64

Slika 13. Suspenzija živih ćelija algi pripremljena za prehranu larvi 72

Slika 14. Aparatura za postavku eksperimenta. Stakleni akvarijum sa test-teglama u kojima je sproveden sistem za aeraciju 74

Slika 15. Petri posude sa paketima jaja premeštenih iz rojilice. 75

Slika 16. Standardna kriva korišćena za određivanje sadržaja ugljenih hidrata 78

Slika 17. Standardna kriva za određivanje sadržaja proteina. 79

Slika 18. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta *Anabaena* sp. 95

Slika 19. Karakterističan UV spektar toksina mikrocistin-LR 95

Slika 20. HPLC hromatogram standardnog rastvora mikrocistin-LR 96

Slika 21. Spektrofotometrijsko poređenje rasta soja *Chlorella* sp. u prisustvu toksina mikrocistin-LR, u odnosu na rast istog soja u podlozi bez toksina. 98

Slika 22. Krive rasta kulture *Anabaena* sp. u zavisnosti od koncentracije nutrijenata u podlozi. 99

Slika 23. Produkcija cijanotoksina mikrocistin-LR u multistres uslovima. 100

Slika 24. Krive rasta kulture *Chlorella* sp. u zavisnosti od koncentracije nutrijenata u podlozi. 100

Spisak tabela

Tabela 1. Primeri hemijskih zagađivača površinskih voda. 12

Tabela 2. Redovi u okviru Cyanobacteria, prepoznatih u klasičnoj botaničkoj taksonomskoj šemi, njihove karakteristike i rodovi u okviru redova. 19

Tabela 3. Glavne grupe cijanobakterijskih toksina.. 28

Tabela 4. Prikaz hepatotoksina, njihova hemijska klasifikacija i mehanizam delovanja. 36

Tabela 5. Hemijski sastav podloge BG-11 za kultivaciju cijanobakterija i mikroalgi. 63

Tabela 6. Soli korišćene za pripremu rastvora jona prilikom ispitivanja letalnih koncentracija stresora za larve *C. riparius* 86

Tabela 7. Prikaz stresora i njihovih koncentracija. 90

Tabela 8. Prikaz preživelih larvi u zavisnosti od tretmana. 102

Tabela 9. Srednja vrednost ± standardna devijacija za merene parametre po tretmanima ... 103

Tabela 10. Sadržaj ugljenih hidrata, proteina, i lipida sojeva *Anabaena* sp. i *Chlorella* sp., i larvi preračunato na osnovu hemijske analize suve mase. 104

Tabela 11. Sastav metil estara masnih kiselina sojeva fitoplanktona *Anabaena* sp. (*A.* sp.), *Chlorella* sp. (*C.* sp.) i larvi hranjenih različitim tipovima hrane 105

Tabela 12. Efekat fitoplanktona kao hrane na rast i koncentraciju hemoglobina u hemolimfi larvi hironomida izraženoj kao srednja vrednost ± SD mase larvi. 108

Tabela 13. Srednje vrednosti ± SD koncentracije parametara oksidativnog stresa larvi *C. riparius*. *Chlorella* sp. – larve C. *riparius* hranjene sojem *Chlorella* sp.; *Anabaena* sp. – *C. riparius* larve hranjene sojem *Anabaena* sp; Kontrola – larve *C. riparius* hranjene kontrolnom hranom TetraMin. 109

Tabela 14. Test Pirsonove korelacije u grupi larvi hranjenih sojem *Chlorella* sp. 110

Tabela 15. Genotoksični efekat nakon izlaganja larvi *C. riparius* sojevima *Chlorella* sp. i *Anabaena sp.* 110

Tabela 16. Jedinjenja od kojih su pripremani rastvori za ispitivanje letalnih koncentracija stresora za larve *C. riparius* 112

Tabela 17. Broj preživelih larvi nakon izlaganja određenim koncentracijama stresora nakon 24 i 48 h. Rezultati su izraženi u procentima ±SD.. 113

Tabela 18. Broj preživelih larvi *C. riparius* prvog stupnja nakon izlaganja standardu mikrocistina -LR (metanolni ekstrakt – standard). 113

Tabela 19. Rezultati letalnih koncentracija NO_3^- na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h. 114

Tabela 20. Rezultati letalnih koncentracija PO_4^{3-} na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h. 115

Tabela 21. Rezultati letalnih koncentracija Cd^{2+} na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h. 115

Tabela 22. Rezultati letalnih koncentracija NH_4^+ na larve *C. riparius* prvog stupnja, nakon 24 i 48 h. 116

Tabela 23. Rezultati mortaliteta larvi prvog stupnja izazvanog testiranjem efekta pojedinačnih stresora i kombinacije svakog stresora sa mikrocistinom-LR (MC-LR). 116

Tabela 24. Preživljavanje larvi u uslovima različitih kombinacija stresora i hrane izraženo u procentima ± SD. 118

Tabela 25. Broj preživelih larvi određenog stupnja razvoja zabeležen u momentu završetka ispitivanja hroničnog efekta soja *Anabaena* sp. u multistres uslovima. Broj izražen u procentima ±SD. 119

Tabela 26. Uticaj hroničnog izlaganja larvi soju *Anabaena* sp. u multistres uslovima na masu larvi i koncentraciju hemoglobina u hemolimfi. Masa larvi prikazana u vidu srednje vrednosti data u mg ± standardna devijacija i koncentracija hemoglobina data u vidu srednje vrednosti g/l ± standardna devijacija. 120

Tabela 27. Vrednosti kometa testa za parametre analizirane kompjuterskim programom *CometScore* u cilju ispitivanja genotoksičnog efekta soja *Anabaena* sp. i Tetramin hrane na larve *C. riparius* u multistres uslovima..... 121

Izvod

Multistresori imaju jak negativan uticaj na vodene ekosisteme. Eutrofizacija vode je jedan od glavnih stresora u slatkovodnim ekosistemima, usled kojeg može doći do cvetanja toksičnih vrsta cijanobakterija i mikroalgi. Ovo istraživanje se bavi ispitivanjem uticaja cijanobakterija i zelenih mikroalgi na larve hironomida u uslovima multistresa.

Metodom HPLC je utvrđeno da soj *Anabaena sp*. produkuje cijanotoksin mikrocistin-LR, i da koncentracija produkovanog toksina i stopa rasta ovog soja zavise od nutrijenata u podlozi. Čist mikrocistin-LR u sredinski relevantnoj koncentraciji (10 µg/l) nema inhibitorno dejstvo na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije, ali da stimuliše rast mikroalge *Chlorella sp*. Primenom UV-VIS metode je utvrđeno da su sojevi *Anabaena sp*. i *Chlorella sp*. bogati izvori proteina i ugljenih hidrata, dok je GC-MS metodom dokazano da *Chlorella sp*. sadrži veliku količinu masnih kiselina. Sprovedeni su multiparametarski bioeseji na osnovu OECD protokola, na test organizmu, *Chironomidae* (Diptera), *Chironomus riparius*. Određene su letalne koncentracije sredinskih stresora (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) i toksina mikrocistin-LR, kao i letalna koncentracija svakog stresora u kombinaciji sa cijanotoksinom. U okviru bioeseja analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje, mortalitet, masa, stepen razvića, parametri oksidativnog stresa (oksidacija proteina i lipida, aktivnost enzima katalaze i superoksid dismutaze), koncentracija hemoglobina, genotoksičnost (Kometa test). Rezultati su pokazali da mikrocistin-LR u multistres uslovima (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) ima aditivno toksično dejstvo na test organizam. Hroničnim izlaganjem larvi soju *Anabaena sp*. u prisustvu multistresora je dokazano da svi testirani stresori pojačavaju subletalno dejstvo na larve, što je utvrđeno smanjenom masom, manjom koncentracijom hemoglobina i većim oštećenjem DNK kod larvi.

Promena masa larvi, koncentracija hemoglobina i oštećenje DNK somatskih ćelija su pokazali visoku senzitivnost u ispitivanju toksičnog uticaja fitoplanktona i njegovih metabolita na model organizam *Chironomus riparius*. Navedeni set markera predstavlja dobre parametre za unapređenje postojećeg OECD protokola broj 218.

Summary

Multristressors have strong influence on aquatic ecosystems. Eutrophication is one of the main stressors in freshwater ecosystems, which can lead to the blooming of toxic species of cyanobacteria and microalgae. This study examines the effects of cyanobacteria and green microalgae on chironomid larvae under multistress conditions.

By using the HPLC method, it was determined that the strain *Anabaena* sp. produces microcystin-LR toxin; while the toxin production and the growth rate of *Anabaena* sp. is depending on the nutrients in the medium. Pure microcystin-LR, at an environmentally relevant concentration (10 µg/l), has no inhibitory effect on Gram-negative and Gram-positive bacteria, however, stimulates the growth of the microalgae *Chlorella* sp. By UV-VIS method it was determined that *Anabaena* sp. and *Chlorella* sp. are rich protein and carbohydrates sources, whereas the GC-MS method showed *Chlorella* sp. contains a large amount of fatty acids. Multiparameter bioassays, based on the OECD protocol, were performed on the test organism, *Chironomidae* (*Diptera*), *Chironomus riparius*. Lethal concentrations of environmental stressors (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}) and microcystin-LR were determined, as well as the lethal concentration of each stressor in combination with cyanotoxin. The following biomarkers were analyzed within the bioassay: survival, mortality, mass, stage of development, oxidative stress parameters (oxidation of proteins and lipids, catalase and superoxide dismutase activity), hemoglobin concentration, and genotoxicity (Comet assay). Microcystin-LR has an additive toxic effect under multistress conditions (NO_3^-, NH_4^+, PO_4^{3-}, Cd^{2+}). Chronic exposure of larvae to *Anabaena* sp. in the presence of the multistressors, showed all tested stressors enhance sublethal effects on larvae, based on: reduced mass, lower hemoglobin concentration and higher DNA damage in larvae.

Change in larval mass, hemoglobin concentration and DNA damage of somatic cells showed high sensitivity in the study of the toxic effect of phytoplankton and its metabolites on the model organism *Chironomus riparius*. This set of markers represents good parameters for improving the existing OECD protocol number 218.

Biografija autora sa bibliografijom

BIOGRAFIJA

Nikola Stanković je rođen 9. marta 1982. godine u Bitolju. Osnovnu školu „21 maj“, a potom i srednju medicinsku školu „Dr Milenko Hadžić“ u Nišu završava sa odličnim uspehom. Osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, na Departmanu za biologiju i ekologiju upisuje 2003. godine. Diplomski rad pod nazivom „Citološki aspekti fotorecepcije“ brani 2009. godine i stiče zvanje diplomirani biolog. Specijalističke akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Biologija mikroorganizama upisuje 2011. godine. Specijalistički rad pod nazivom „Učestalost i rezistencija urinarnih infekcija na teritoriji nišavskog okruga“ brani 2013. godine i stiče zvanje specijalista biolog. Doktorske akademske studije upisuje 2014. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu, na Departmanu za biologiju i ekologiju. U okviru Erasmus-mobility + programa 2017. godine boravi četiri meseca na Biološkom fakultetu Univerziteta „Alexandru Ioan Cuza“ u gradu Iaşi u Rumuniji, gde stiče interesovanje za istraživanje mikroorganizama i ekotoksikologiju vodenih ekosistema. Položio je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija.

Od januara 2010. godine radi u Poliklinici Human na mestu analitičara u mikrobiologiji, a zatim na mestu analitičara u molekularnoj dijagnostici. U zvanje asistenta na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu je izabran 12.5.2015. godine. Bavi se izvođenjem praktične nastave i naučnoistraživačkim radom u oblastima ekotoksikologije, algologije i mikrobiologije.

BIBLIOGRAFIJA

A. Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)

Stanković, N., Kostić, I., Jovanović, B., Savić-Zdravković, D., Matić, S., Bašić, J., Cvetković, T., Simeunović, J., Milošević, Dj. (2020): Can phytoplankton blooming be harmful to benthic organisms? The toxic influence of Anabaena sp. and Chlorella sp. on Chironomus riparius larvae, Science of The Total Environment, 138666, ISSN 0048-9697, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138666

B. Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

Stojanović-Radić, Z., Pejcić, M., Stojanović, N., Sharifi-Rad, J., **Stanković, N.** (2016): Potential of Ocimum basilicum L. and Salvia officinalis L. essential oils against biofilms of P. aeruginosa clinical isolates, Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand). 62(9): 27-33.

C. Radovi u nacionalnim časopisima (M53)

Stanković, N., Joković, N., Mihajilov Krstev, T., Pejčić, M., Dimitrijević, M. (2017): Frequency and antibiotic resistance of bacteria in urinary tract infections in south Serbia. Biologica Nyssana, 8(2): 129-136

Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Stanković, N., Aleksić, A., Pejčić, M. (2016) Frequency of isolation and antibiotic resistance patterns of bacterial isolates from wound infections. Biologica Nyssana, 7(2): 151-158.

D. Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)

Ćirić, J., **N. Stanković**, N., Živković, M., Lazarević, Đ. (2019) Producing of microbial oil using waste glycerol from biodiesel production – From by-product to raw material, eNergetics - 5th Virtual International Conference on Science, Technology and Management in Energy, October 28-29, 2019. ISBN: 978-86-80616-04-9

Ćirić, J., **N. Stanković**, M. Živković, Đ. Lazarević (2019) Utilization management of waste glycerol obtained in rapeseed oil-based biodiesel production, PaKSom - First Virtual International Conference of Science, December 9-10, 2019.

E. Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Stojanović, N., **Stanković, N**., Radulović, N. (2016) Antibiofilm potential of Ocimum basilicum and Salvia officinalis commercial essential oils, 12th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions, Book of abstracts, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia, pp. 89 - 90, 16. - 19. Jun, 2016.

Stanković, N., Matejić, J., Joković, N., Rajković, J., Đorđević, Lj., Mihajilov-Krstev, T. (2016) Antimicrobial and antioxidant activity of Allium cepa L. dried scales extracts, 12th Symposium of the flora of southeastern Serbia and neighbouring regions, Book of abstracts, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia, pp. 133 - 133, Kopaonik, Serbia, 16. - 19. Jun, 2016.

E. Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51)

Ilić, D., Ćirić, J., Vitošević, N., Nikolić, V., Stanojević, Lj., **Stanković, N.,** Popović, T. (2018) The treatment effect on the antioxidant activity of aronia products, Advanced technologies, Технолошки факултет,, 7, 2, pp. 25 - 30, 2406-2979, 582.711.71:663.8, 10.5937/SavTeh1802025I

F. Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

Stanković, N., Vitorović, J., Joković, N., Tošić, S., Kostić, I., Kostić, M., Stamenković, O., Veljković, V. (2018) Fitoremedijacioni potencijal vrste Lepidium sativum L., Fitoremedijacioni potencijal vrste Lepidium sativum., pp. 115 - 115, 978-86-81413-08-1, Kladovo, 25. - 30. Sep, 2018.

Dimitrijević, M., Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., **Stanković, N.**, Joković, N., Mihajilov-Krstev, T. (2018) Antimikrobna aktivnost i mehanizmi delovanja etarskog ulja omana (Inula helenium) na humane respiratorne izolate., pp. 248 - 248, 978-86-81413-08-1, Kladovo, 25. - 30. Sep, 2018

Joković, N., **Stanković, N**., Mihajilov-Krstev, T. (2017) The fermentation of soy milk with probiotic culture, Book of abstracts, pp. 51 - 51, 978-86-89429-22-0, Leskovac, 20. - 21. Oct, 2017.

Izjave autora

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Утицај фитопланктона на бентосне макробескичмењаке слатководних екосистема у мултистрес условима: лабораторијско тестирање токсичног ефекта цијанобактерија и зелених микроалги на јединке врсте *Chironomus riparius*

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

_____

Никола Р. Станковић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације:

Утицај фитопланктона на бентосне макробескичмењаке слатководних екосистема у мултистрес условима: лабораторијско тестирање токсичног ефекта цијанобактерија и зелених микроалги на јединке врсте *Chironomus riparius*

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу,** истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

_____

Никола Р. Станковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Утицај фитопланктона на бентосне макробескичмењаке слатководних екосистема у мултистрес условима: лабораторијско тестирање токсичног ефекта цијанобактерија и зелених микроалги на јединке врсте *Chironomus riparius*

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)**

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

_____

Никола Р. Станковић