



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Невена Б. Ђорђевић

**УТИЦАЈ ПРОМЕНА ЕКОЛОШКИХ ФАКТОРА НА
САСТАВ И ДИНАМИКУ ФИТОПЛАНКТОНСКИХ
ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА (СУАНОВАСТЕРИЈА) У МАЛИМ
АКУМУЛАЦИЈАМА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Nevena B. Đorđević

**THE EFFECT OF CHANGES OF ECOLOGICAL
FACTORS ON COMPOSITION AND DYNAMICS OF
PHYTOPLANKTON CYANOBACTERIA
(CYANOBACTERIA) IN SMALL RESERVOIRS**

Doctoral Dissertation

Крагујевац, 2021

Аутор
Име и презиме: Невена Б. Ђорђевић
Датум и место рођења: 03. 04. 1982. год. Крагујевац
Садашње запослење: Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, Институт за биологију и екологију, звање - асистент
Докторска дисертација
Наслов: Утицај промена еколошких фактора на састав и динамику фитопланктонских цијанобактерија (Cyanobacteria) у малим акумулацијама
Број страница: 133
Број слика: 54 слике; 14 табела
Број библиографских података: 250
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет Крагујевац
Научна област (УДК): Општа екологија, Хидробиологија, Биогеографија (574). Алге. Cyanobacteria (582.232).
Ментор: Проф. др Снежана Б. Симић, редовни професор; Природно-математички факултет; Институт за биологију и екологију; Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 25. 04. 2018.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-352/8; 16. 05. 2018.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
1. Др Снежана Симић , редовни професор; Природно-математички факултет; Институт за биологију и екологију; Универзитет у Крагујевцу; ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине
2. Др Бранислав Ранковић , редовни професор; Природно-математички факултет; Институт за биологију и екологију; Универзитет у Крагујевцу; ужа научна област: Алгологија, микологија и лихенологија
3. Др Гордана Субаков - Симић , ванредни професор; Биолошки факултет; Универзитет у Београду; ужа научна област: Алгологија и микологија
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:
<hr/> Проф. др Гордана Субаков - Симић , ванредни професор; Биолошки факултет; Универзитет у Београду; ужа научна област: Алгологија и микологија
<hr/> Проф. др Александар Остојић , ванредни професор; Природно-математички факултет; Универзитет у Крагујевцу; ужа научна област: Екологија, биогеографија и заштита животне средине
<hr/> Доц. др Драгана Предојевић , доцент; Биолошки факултет; Универзитет у Београду; ужа научна област: Алгологија и микологија
Датум одбране докторске дисертације:

Луки и Николи

Захвалница

Како ова дисертација представља плод дугогодишњег рада и сарадње са професорима и колегама, овом приликом желим да се најискреније захвалим особама које су ме подржавале, помогле ми и веровале у мене.

Велику захвалност првенствено дугујем мојој менторки др Снежани Симић, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, која ме је увела у свет алгологије и једна је од особа заслужних за мој избор управо овог „алголошког“ пута, поред тога умногоме је и допринела мом осамостаљивању на научно-истраживачком путу. Свакако, у току читавог овог процеса велико знање, многобројне идеје, изузетну помоћ и подршку добијала сам од ње, на свему томе сам јој неизмерно захвална.

Желим да се захвалим члановима комисије: др Гордани Субаков-Симић, ванредном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду; др Александру Остојићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и др Драгани Предојевић, доценту Биолошког факултета Универзитета у Београду, на темељном прегледању писаног материјала, на корисним саветима и сугестијама које су значајно допринеле квалитету ове дисертације.

Захваљујем се др Владици Симићу, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на усмеравању и несебичним саветима нарочито на самом почетку мојих докторских студија.

Захваљујем се колегама са Института за хемију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, доц. др Андрији Ђирићу и дос. др Владимиру Михаиловићу за помоћ приликом експерименталног рада, на подршци и надзору у анализи цијанотоксина и антиоксидативних ензима; др Сањи Матић, вишем научном сараднику Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу, за изузетно изведене *in vivo* експерименте и испитивања генотоксичности; др Ђурађу Милошевићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, на неизмерној помоћи везано за статистичке анализе.

Мојим драгим колегама Александри, Симони, Милени, Наташи, Сандри, Тијани, Марији, Маријани, Марку и Вити велико хвала на проведеним дивним данима у њиховом друштву, помоћи у теренском раду и изузетној колегијалности.

Посебну захвалност дугујем мојој Ани, хвала на безусловној помоћи, незаменљивој подршци, љубави, искреном пријатељству и охрабрењу у тешким тренуцима. Анчи привилегија је имати те за пријатеља. Велико хвала и свим осталим колегама и пријатељима који су ме подржавали, инспирисали, бодрили својом љубављу, искреношћу, пажњом, разумевањем, духовитошћу и били уз мене током израде дисертације.

Највећу захвалност дугујем мојој породици, супругу, синовима, родитељима и брату на безусловној љубави, разумевању, подршци и зато што су веровали у мене све ове године.

Невена Ђорђевић

Утицај промена еколошких фактора на састав и динамику фитопланктонских цијанобактерија (Cyanobacteria) у малим акумулацијама

Сажетак

Предмет истраживања ове докторске дисертације су фитопланктонске цијанобактерије (Cyanobacteria) у малим акумулацијама и утицаји еколошких фактора на присуство и доминацију различитих врста, са посебним аспектом на потенцијално инвазивне и токсичне цијанобактерије. Трогодишњи мониторинг је спроведен једном месечно на три акумулације (акумулација Шумарице, акумулација Бубањ и Александровачка акумулација). Применом методе самоорганизујућих мапа (COM) омогућена је класификација узорака на основу физичких и хемијских параметара, као и визуализација просторне дистрибуције биотичких параметара. Три поменута водна тела значајно се разликују по општим карактеристикама, хемијском саставу воде и динамици фитопланктонских цијанобактерија. Различитост испитиваних акумулација се огледа у малом броју заједничких таксона и у таксонима који су били најфреквентнији и цветајући: акумулација Шумарице (*Aphanizomenon flos-aquae*), акумулација Бубањ (*Microcystis aeruginosa*) и Александровачка акумулација (*Raphidiopsis raciborskii*). Најзначајнији средински параметри који утичу на заједницу цијанобактерија су концентрације укупног фосфора и азота. Наша студија показује да екстремне падавине могу да доведу до повећања концентрације хранљивих материја у резервоарима, и узрокују значајан еколошки поремећај заједнице (цветање потенцијално токсичних цијанобактерија). Појава и доминација инвазивне врсте *R. raciborskii* у Александровачкој акумулацији показује да ова врста шири свој ареал распрострањења. Приликом спроведеног истраживања у оквиру ове дисертације у Србији први пут је детектован токсин цилиндроспермопсин (CYN). Ова студија је показала да је екстракт врсте *R. raciborskii* испољио генотоксичност чак и у ниским концентрацијама и повећао оксидативни стрес у јетри пацова након једног излагања.

Кључне речи: фитопланктонске цијанобактерије, Cyanobacteria, цијанотоксини, инвазивне врсте, еколошки фактори, мале акумулације.

The effect of changes of ecological factors on composition and dynamics of phytoplankton cyanobacteria (Cyanobacteria) in small reservoirs

Abstract

The research subject of this doctoral dissertation includes phytoplankton cyanobacteria (Cyanobacteria) in the small reservoirs and the effects of ecological factors on the presence and dominance of different species, with particular aspects on invasive and potentially toxic cyanobacteria. Three-year monitoring was conducted (monthly) on three reservoirs (Šumarice reservoir, Bubanj reservoir, and Aleksandrovac reservoir). The method of self-organizing map (SOM) provided the efficient classification of samples, based on physical and chemical parameters, as well as the visualization of the spatial distribution of biotic parameters. These three water bodies are significantly different according to their general characteristics, chemical water composition, and cyanobacteria dynamics. The dissimilarity of the examined reservoirs is reflected in the small number of common taxa and in the taxa that were the most frequent and blooming: Šumarice reservoir (*Aphanizomenon flos-aquae*), Bubanj reservoir (*Microcystis aeruginosa*) and Aleksandrovac reservoir (*Raphidiopsis raciborskii*). The most important environmental parameters affecting the cyanobacteria community are concentrations of total phosphorus and nitrogen. Our study shows that extreme precipitations can cause an increase in nutrient concentration in reservoirs and significant environmental disturbance to the community (blooming of potentially toxic cyanobacteria). The domination of invasive species *R. raciborskii* in Aleksandrovac reservoir indicates that this species is expanding its areal distribution. The research conducted in this dissertation has detected the toxin cilindrospermopsin (CYN) for the first time in Serbia. This study shows that the extract of *R. raciborskii* exhibited genotoxicity even at low concentrations and increased oxidative stress in rat liver after a single exposure.

Keywords: phytoplankton cyanobacteria, Cyanobacteria, cyanotoxins, invasive species, ecological factors, small accumulations

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. ОСНОВНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА	4
1.2. СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА (ЦИЈАНОТОКСИНИ).....	7
1.3. ПРЕГЛЕД ДОСАДАШЊИХ ИСТРАЖИВАЊА ФИТОПЛАНКТОНСКИХ ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА У РЕПУБЛИЦИ СРБИЈИ. 11	
2. ЦИЉЕВИ	13
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	15
3.1. ПОДРУЧЈЕ ИСТРАЖИВАЊА	16
3.1.1. Акумулација Шумарице	17
3.1.2. Акумулација Бубањ	19
3.1.3. Александровачка акумулација.....	21
3.2. ПРИКУПЉАЊЕ УЗОРАКА	24
3.3. МЕТЕОРОЛОШКИ ПОДАЦИ.....	24
3.4. АНАЛИЗА ФИЗИЧКИХ И ХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ВОДЕ.....	24
3.5. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ХЛОРОФИЛА А.....	25
3.6. ТРОФИЧКИ СТАТУС АКУМУЛАЦИЈА.....	26
3.7. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА ФИТОПЛАНКТОНА	26
3.8. ИНДЕКСИ СЛИЧНОСТИ.....	26
3.8.1. Индекс сличности (Sørensen, 1948).....	26
3.8.1. Индекс сличности (Jaccard, 1928).....	26
3.9. HPLC МЕТОДА ЗА ДЕТЕКЦИЈУ И КВАНТИФИКАЦИЈУ ЦИЈАНОТОКСИНА У ВОДИ И ЦИЈАНОБАКТЕРИЈСКОМ ЕКСТРАКТУ	27
3.10. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА МЕТАНОЛСКОГ ЕКСТРАКТА ТОКСИЧНИХ ВРСТА ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА НА ФУНКЦИЈУ ГЕНЕТИЧКОГ МАТЕРИЈАЛА, АКТИВНОСТ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА СЕРУМА, АНТИОКСИДАТИВНИХ ЕНЗИМА И НА ХИСТОПАТОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ.....	29
3.10.1. Експериментални модел организми	29
3.10.2. Индуковано оштећење ДНК.....	29
3.10.3. Експериментални дизајн	29
3.10.4. Одређивање степена оштећења ДНК Комет тестом.....	30
3.10.5. Одређивање биохемијских параметара у серуму пацова у <i>in vivo</i> условима	31
3.10.6. Одређивање маркера оксидативног стреса у хомогенату ткива јетре у <i>in vivo</i> условима	31
3.10.7. Хистопатолошко испитивање ткивних исечака јетре пацова.....	31
3.11. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА	32
3.11.1. Статистичка анализа физичких, хемијских и биотичких података	32
3.11.2. Статистичка анализа података добијених приликом испитивања утицаја метанолског екстракта	34
4. РЕЗУЛТАТИ.....	35
4.1. АКУМУЛАЦИЈА ШУМАРИЦЕ.....	36
4.1.1. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године.....	36
4.1.2. Укупна количина падавина по месецима на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године.....	37

4.1.3. Просторна и временска дистрибуција физичких и хемијских параметара воде	38
4.1.4. Просторна и временска дистрибуција вредности концентрације хлорофила <i>a</i> на претходно тренираној СОМ мрежи	42
4.1.5. Трофички статус акумулације Шумарице	43
4.1.6. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктонских цијанобактерија	44
4.1.7. Резултати присуства цијанотоксина у води акумулације Шумарице	47
4.2. АКУМУЛАЦИЈА БУБАЊ	48
4.2.1. Просторна и временска дистрибуција физичких и хемијских параметара воде	48
4.2.2. Просторна и временска дистрибуција вредности концентрације хлорофила <i>a</i> на претходно тренираној СОМ мрежи	52
4.2.3. Трофички статус акумулације Бубањ	53
4.2.4. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктонских цијанобактерија	54
4.2.5. Резултати присуства цијанотоксина у води акумулације Бубањ	58
4.3. АЛЕКСАНДРОВАЧКА АКУМУЛАЦИЈА	59
4.3.1. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године	59
4.3.2. Укупна количина падавина по месецима на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године	60
4.3.3. Просторна и временска дистрибуција физичких и хемијских параметара воде	61
4.3.4. Просторна и временска дистрибуција вредности концентрације хлорофила <i>a</i> на претходно тренираној СОМ мрежи	65
4.3.5. Трофички статус Александровачке акумулације	66
4.3.6. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктонских цијанобактерија	67
4.3.7. Резултати присуства цијанотоксина у води Александровачке акумулације	73
4.4. УПОРЕДНИ ПРИКАЗ СЛИЧНОСТИ И РАЗЛИЧИТОСТИ ИСПИТИВАНИХ АКУМУЛАЦИЈА НА ОСНОВУ САСТАВА ФИТОПЛАНКТОНСКИХ ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА	75
4.5. УПОРЕДНИ ПРИКАЗ БИОТИЧКИХ ПАРАМЕТАРА У ИСТРАЖИВАНИМ АКУМУЛАЦИЈАМА	76
4.6. УТИЦАЈ ОДАБРАНИХ ЕКОЛОШКИХ ФАКТОРА НА ЦВЕТАЈУЋЕ ТАКСОНЕ У ИСТРАЖИВАНИМ АКУМУЛАЦИЈАМА	78
4.7. ЕФЕКАТ МЕТАНОЛСКОГ ЕКСТРАКТА ЦИЈАНОБАКТЕРИЈЕ <i>R. raciborskii</i> НА ЈЕТРУ ПАЦОВА СОЈА WISTAR	82
4.7.1. Генотоксични ефекат метанолског екстракта цијанобактерије <i>R. raciborskii</i> у јетри пацова соја Wistar	82
4.7.2. Утицај екстракта <i>R. raciborskii</i> на биохемијске параметре у серуму пацова соја Wistar	85
4.7.3. Ефекат екстракта <i>R. raciborskii</i> на активност антиоксидативних ензима у јетри пацова соја Wistar	87
4.7.4. Ефекти метанолског екстракта <i>R. raciborskii</i> на морфолошке параметре у јетри пацова соја Wistar	88
5. ДИСКУСИЈА	91
6. ЗАКЉУЧЦИ	109
7. ЛИТЕРАТУРА	112
8. ПРИЛОЗИ	133

Листа табела

Табела 1. Листа потенцијално токсичних цијанобактеријских родова и њихових токсина (Meriluoto и сар., 2017).....	8
Табела 2. Средња вредност \pm стандардна девијација срединских параметара акумулације Шумарице по групама.	41
Табела 3. Састав фитопланктонских цијанобактерија у акумулацији Шумарице у периоду јун 2012. – децембар 2014. године	45
Табела 4. Средња вредност \pm стандардна девијација срединских параметара акумулације Бубањ по групама.	51
Табела 5. Састав фитопланктонских цијанобактерија у акумулацији Бубањ у периоду јун 2012. – децембар 2014. године.	55
Табела 6. Средње вредности \pm стандардна девијација параметара Александровачке акумулације по групама.	64
Табела 7. Састав фитопланктонских цијанобактеријау Александровачкој акумулацији у периоду јун 2012. – децембар 2014. године.	68
Табела 8. Вредности концентрације цилиндроспермопсина – CYN у води Александровачке акумулације у периоду јун 2012. – децембар 2014. године.	74
Табела 9. Индекс сличности и различитости фитопланктонских цијанобактерија испитиваних акумулација по Соренсену.....	75
Табела 10. Индекс сличности и различитости фитопланктонских цијанобактерија испитиваних акумулација по Жакарду.....	75
Табела 11. Генотоксични ефекат метанолског екстракта цијанобактерије <i>R. raciborskii</i> у јетри пацова соја Wistar 24 и 72 сата након третмана применом Комет есеја у <i>in vivo</i> условима.....	83
Табела 12. Утицај екстракта <i>R. raciborskii</i> на биохемијске параметре у серуму пацова соја Wistar.....	86
Табела 13. Ефекат метанолског екстракта <i>R. raciborskii</i> на активност антиоксидативних ензима у јетри пацова соја Wistar	88
Табела 14. Ефекти метанолског екстракта <i>R. raciborskii</i> на морфолошке параметре у јетри пацова.	89

Листа слика

Слика 1. Структура ћелије код цијанобактерија (извор: https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria - модификовано).....	6
Слика 2. Хемијска структура цијанотоксина: а) микроцистин (MC); б) нодуларин (NOD); в) цилиндроспермопсин (CYN); г) сакситоксин (STX); д) анатоксин-а.	9
Слика 3. Подручја истраживања (1. акумулација Шумарице, 2. акумулација Бубањ, 3. Александровачка акумулација) на којима је вршено узорковање током трогодишњег мониторинга	16
Слика 4. Сателитски снимак акумулације Шумарице (извор: https://www.google.com/maps/ - модификовано) и приказ локалитета на којима је вршено узорковање: 1. близина бране; 2. средина акумулације;	17
Слика 5. Акумулација Шумарице (Фото Н. Ђорђевић - јун, 2012. године)	18
Слика 6. Акумулација Шумарице (Фото Н. Ђорђевић - јул, 2012. године)	18
Слика 7. Сателитски снимак акумулације Бубањ (извор: https://www.google.com/maps/ - модификовано) и приказ локалитета на којима је вршено узорковање: 1. локалитет (аутопут); 2. средина акумулације;	19
Слика 8. Акумулација Бубањ (Фото Н. Ђорђевић - јун, 2012. године)	20
Слика 9. Акумулација Бубањ (Фото Н. Ђорђевић - август, 2012. године).....	20
Слика 10. Сателитски снимак Александровачке акумулације (извор: https://www.google.com/maps/ - модификовано) и приказ локалитета на којима је вршено узорковање: 1. близина бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа	21
Слика 11. Александровачка акумулација – пре санације (Фото С. Симић - јун, 2008. године).....	22
Слика 12. Александровачка акумулација – након санације (Фото С. Симић - септембар, 2010. године).....	23
Слика 13. Александровачка акумулација (Фото Н. Ђорђевић - јун, 2012. године).....	23
Слика 14. Структура самоорганизујућих мапа. Тачке представљају променљиве неуроне улазног слоја. Линије представљају векторе, који се сликају у излазни слој неурона (модификовано из Janowski и Apanowicz, 2015).....	33
Слика 15. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године (°C).....	36
Слика 16. Укупна количина падавина по месецима на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године (L/m ²).....	37
Слика 17. Ординација и класификација узорака базираних на физичким и хемијским параметрима акумулације Шумарице помоћу Самоорганизујућих мапа (СОМ). Различите боје означавају различите групе: I (жута), II (плава), III (зелена). Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете акумулације узорковане у различитом периоду (месец/година/локалитет). Локалитет 1. у близини бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа акумулације	38
Слика 18. Визуализација дистрибуције 12 физичких и хемијских параметара акумулације Шумарице на претходно тренираној СОМ мрежи (где је: NO ₃ -N – концентрација нитрата, PO ₄ -P – концентрација фосфата, NH ₄ -N – концентрација амонијака). Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност, а плава најмању.....	40

Слика 19. Визуализација дистрибуције концентрације хлорофила <i>a</i> акумулације Шумарице на претходно тренираној СОМ мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметра, где црвена боја одговара највећој вредности, а плава најмањој	42
Слика 20. Месечне вредности индекса трофичног стања (ИТС) акумулације Шумарице израчунате на темељу провидности воде, концентрације укупног фосфора и хлорофила <i>a</i>	43
Слика 21. Сезонска динамика укупне бројности фитопланктона и бројности цијанобактерија током периода истраживања акумулације Шумарице. Примарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) током 2012. и 2013. године. Секундарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) у 2014. години	46
Слика 22. Цветање врсте <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> у акумулацији Шумарице (Фото С. Симић – октобар 2014. године)	47
Слика 23. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> у акумулацији Шумарице (бар скала 10 µm) (Фото Н. Ђорђевић – октобар 2014. године).....	47
Слика 24. Ординација и класификација локалитета базираних на физичким и хемијским параметрима акумулације Бубањ помоћу Самоорганизујућих мапа (СОМ). Различите боје означавају различите групе. Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете акумулације узорковане у различитом периоду (месец/година/локалитет). 1. локалитет (аутопут); 2. средина акумулације; 3. локалитет (у непосредној близини оскудне шумске вегетације)	48
Слика 25. Визуализација дистрибуције 12 физичких и хемијских параметара акумулације Бубањ на претходно тренираној СОМ мрежи (где је: NO ₃ -N – концентрација нитрата, PO ₄ -P – концентрација фосфата, NH ₄ -N – концентрација амонијака). Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању	50
Слика 26. Визуализација дистрибуције концентрације хлорофил <i>a</i> акумулације Бубањ на претходно тренираној СОМ мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању	52
Слика 27. Месечне вредности индекса трофичног стања (ИТС) акумулације Бубањ израчунате на темељу провидности воде, концентрације укупног фосфора и хлорофила <i>a</i>	53
Слика 28. Сезонска динамика укупне бројности фитопланктона и укупне бројности цијанобактерија током периода истраживања акумулације Бубањ. Примарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) у периоду истраживања од јуна 2012. до децембра 2014. године	56
Слика 29. Цветање врсте <i>Microcystis aeruginosa</i> у акумулацији Бубањ (Фото Н. Ђорђевић - август 2012. године).....	57
Слика 30. <i>Microcystis aeruginosa</i> у акумулацији Бубањ (бар скала 50 µm) (Фото Н. Ђорђевић).....	57
Слика 31. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године (°C)	59
Слика 32. Укупна количина падавина по месецима на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године (L/m ²).....	60
Слика 33. Ординација и класификација локалитета базираних на физичким и хемијским параметрима Александровачке акумулације помоћу Самоорганизујућих мапа (СОМ). Различите боје означавају различите групе. Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете акумулације узорковане у различитом периоду (месец/година/локалитет). Локалитет 1. у близини бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа акумулације	62

Слика 34. Визуализација дистрибуције 12 физичких и хемијских параметара Александровачке акумулације на претходно тренираној СОМ мрежи (где је: $\text{NO}_3\text{-N}$ – концентрација нитрата, $\text{PO}_4\text{-P}$ – концентрација фосфата, $\text{NH}_4\text{-N}$ – концентрација амонијака). Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању.....	63
Слика 35. Визуализација дистрибуције концентрације хлорофила <i>a</i> Александровачке акумулације на претходно тренираној СОМ мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању.....	65
Слика 36. Месечне вредности индекса трофичног стања (ИТС) Александровачке акумулације израчунате на темељу провидности воде, концентрације укупног фосфора и хлорофила <i>a</i>	66
Слика 37. Сезонска динамика укупне бројности фитопланктона и укупне бројности цијанобактерија током периода истраживања Александровачке акумулације. Примарна у оса даје приказ бројности (ћел/mL) током 2013. и 2014. године. Секундарна у оса даје приказ бројности (ћел/mL) у 2012. години	70
Слика 38. Александровачка акумулација – август 2012. године (Фото Н. Ђорђевић).....	71
Слика 39. Александровачка акумулација – септембар 2012. године (Фото Н. Ђорђевић).....	71
Слика 40. Цветање врсте <i>Raphidiopsis raciborskii</i> у Александровачкој акумулацији – октобар 2012. године (Фото Н. Ђорђевић).....	71
Слика 41. <i>Raphidiopsis raciborskii</i> у Александровачкој акумулацији (бар скала 10 μm) (октобар, 2012. год.)	72
Слика 42. Александровачка акумулација – новембар 2012. године (Фото Н. Ђорђевић)	72
Слика 43. Александровачка акумулација – децембар 2012. године – помор рибе у акумулацији (Фото Н. Ђорђевић).....	72
Слика 44. Хроматограм стандарда цилиндроспермопсина (5 mg/L) (262 nm, ретенционо време 5.392 минут) и UV спектар стандарда	73
Слика 45. Хроматограм узорка воде Александровачке акумулације (262 nm, ретенционо време 5.371 минут) и UV спектар узорка (ретенционо време 5.371 минут)	73
Слика 46. Визуализација упоредног приказа дистрибуције три биотичка параметра (укупна бројност фитопланктона, бројност и биомаса цијанобактерија) акумулације Шумарице, акумулације Бубањ и Александровачке акумулације на претходно тренираној СОМ мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја одговара највећој вредности, а плава најмањој	77
Слика 47. Упоредни приказ температуре воде испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија.....	79
Слика 48. Упоредни приказ рН воде испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија.....	79
Слика 49. Упоредни приказ концентрације амонијака воде испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија.....	80
Слика 50. Упоредни приказ концентрације укупног N у води испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија. Примарна у оса даје приказ концентрације укупног N у води акумулације Бубањ и Александровачке акумулације. Секундарна у оса даје приказ концентрације укупног N у води акумулације Шумарице.....	80
Слика 51. Упоредни приказ концентрације укупног P у води испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија.....	81

Слика 52. Упоредни приказ односа концентрације укупног N и P (TN:TP) у води испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија81

Слика 53. Микрофотографије дистрибуције "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са етидијум бромидом; Негативна контрола (А и В, 24 и 72 сата после третмана), ЕМС-ом третирано пацово (С и D, 24 и 72 сата после третмана), СУN-ом третирано пацово (Е и F, 24 и 72 сата после третмана), 1 500 µg/kg т.м. (G и H, 24 и 72 сата после третмана), 3 000 µg/kg т.м. (I и J, 24 и 72 сата после третмана), 6 000 µg/kg т.м. (K и L, 24 и 72 сата после третмана) и 12 000 µg/kg т.м. (M и N, 24 и 72 сата после третмана) 84

Слика 54. Репрезентативне микрофотографије ткивних препарата јетре пацова: А – контрола, 24 сата после третмана; В – СУN-ом третирано пацово, 24 сата после третмана; С – 1500 µg/kg т.м., 24 сата после третмана; D – 3000 µg/kg т.м, 24 сата после третмана; Е – 6000 µg/kg т.м, 24 сата после третмана; F – 12000 µg/kg т.м, 24 сата после третмана; G – контролна група, 72 сата после третмана; H – СУN-ом третирано пацово, 72 сата после третмана; I – 1500 µg/kg т.м, 72 сата после третмана; J – 3000 µg/kg т.м, 72 сата после третмана; K – 6000 µg/kg т.м, 72 сата после третмана; L – 12000 µg/kg т.м, 72 сата после третмана. Увећање, 100x и 200x. Ознаке: sd – синусоидна дилатација централне вене; hd – хидропсна дегенерација; vd – вакуоларна дегенерација; il – интралобуларна инфилтрација лимфоцита; fn – фокална некроза; sp – конфлуентна некроза; a – апоптоза; kc – хипертрофија Купферових ћелија90

1. Увод

Последњих деценија један од основних глобалних еколошких проблема у свету је недостатак квалитетне воде за потребе водоснабдевања становништва, али и употребу воде у различите сврхе. У циљу обезбеђивања довољних количина воде која ће имати различите намене (водоснабдевање, спорт, рекреација, туризам) све више се користе површинске воде. Углавном се у ту сврху користе реке, природна и вештачка језера (акумулације) (Wetzel, 2001). Актуелизацији овог проблема доприноси и чињеница да се квалитет водених екосистема великом брзином погоршава, доводећи у питање не само опстанак водених екосистема, него и целокупног живог света.

Мале акумулације су вештачка језера запремине до једног милиона метра кубног формиране изградњом бране и имају вишеструки значај. Користе се за наводњавање земљишта, за задржавање поплавних таласа, и на тај начин штите низводни терен од поплава, као и за заштиту земљишта од ерозије (Lee, 2007; Abbasi и сар., 2017). Мале акумулације и баре су глобално најзаступљенији типови лентичких система. Обично се јављају у низијским подручјима и под снажним су утицајем сезонских промена у режиму поплава река. Схватање је такво да упркос томе што чине најзаступљенији слатководни систем, мале акумулације још увек не представљају велики проценат укупне површине слатке воде на свету. Пружају велики број екосистемских и социјалних услуга и истовремено имају и велику заштитну улогу (на пример за птице селице). Корисне су и за развој туризма, спорта, различитих видова рекреације. Мале акумулације често показују веће богатство врста по јединици површине од великих језера због јаке интеракције између литорала и пелагијала. Значајне су и као специфични водени екосистеми са аспекта биодиверзитета у којима долази до развоја великог броја организама који припадају заједницама планктона, бентоса и нектона. Овакви екосистеми су и продуктивнији у поређењу са великим акумулацијама, захваљујући интензивнијем кружењу хранљивих састојака који постају доступни фитопланктону. Продуктивност је још и у вези са чињеницом да се ови екосистеми врло често налазе у близини култивисаних подручја и зато су подложни уносу веће количине хранљивих састојака (Abbasi и сар., 2017).

Током година у малим акумулацијама долази до интензивних процеса еутрофикације, који су праћени пренамножавањем фотоаутоτροφних организама, укључујући и цветање фитопланктонских цијанобактерија. Таква масовна популација може се појавити у нетакнутим воденим телима која нису под утицајем људске активности, при чему се обогаћивање хранљивим материјама неопходним за раст цијанобактерија врши природним геолошким и хидролошким процесима (Graham и сар., 2008).

Међутим, данас је препознато да је повећање трофичног стања малих водених екосистема најчешће узроковано негативним и интензивним антропогеним утицајима. Услед повећаног оптерећења хранљивим материјама из домаћинства, пољопривредних и индустријских извора, појачане ерозије у сливном подручју, као и повећане употребе воде као ресурса, уз повољне температурне услове, продирање светлости дуж воденог стуба, рН воде, може доћи до масовне продукције фитопланктонских цијанобактерија у кратком временском периоду. Масовна појава популација цијанобактерија на тим локацијама доводи до цветања у виду биофилма или формирања скрама на површини воде (Chorus и

Bartram, 1999; Meriluoto и Codd, 2005). Појава цветања алги представља најочљивији знак, али и последицу еутрофикације воденог екосистема. Еутрофикација као биолошки одговор на сувишан прилив нутријената (обично фосфата и азотних једињења) у водени екосистем, представља процесе повећања биолошке продукције у води. Еутрофикација заузима веома важно место у Директиви Европске уније (Water Framework Directive (WFD), 2000) и разним међународним уговорима, где се сматра да убрзан раст алги или васкуларних биљака доводи до нарушавања равнотеже заједница организама који живе у води и до деградације у квалитету воде. Потребно је нагласити да сваки водени екосистем има своје специфичности и захтева континуирано праћење физичких, хемијских и биолошких параметара у изналажењу узрока и последица еутрофикације, као и мера неопходних за санацију постојећег стања.

Еутрофикација представља природни процес повећања количине органске материје који може да траје годинама и тешко се може зауставити, али се свакако може успорити (Ђukić и сар., 2000). Према је еутрофикација природни процес “старења” воденог екосистема, јасно је да је знатно бржа вештачка еутрофикација која се одвија под утицајем различитих антропогених фактора. Пренамножавање фитопланктонских цијанобактерија и појава цијанотоксина, као њихових метаболита, су фаворизовани у воденим екосистемима која су богата минералним и органским једињењима, као што су споротекуће еутрофне воде, еутрофна језера, баре, мале акумулације, канали и рибњаци (Codd, 2000). Последњих деценија масовна појава цијанобактерија у воденим екосистемима сматра се значајним глобалним еколошким проблемом. Подаци указују да у Европи, Америци и Азији више од 40% водних тела је еутрофно и представљају повољну средину за масовни развој цијанобактерија (Chorus и Bartram, 1999; Mateo-Sagasta и сар., 2017).

Цветање воде се дешава када је у воденим срединама пролиферација једне или неколико врста цијанобактерија масовна, односно када је концентрација цијанобактеријских ћелија већа од 10 000 у милилитру воде (Falconer, 1998; 1999). Изучавање узрока и последица еутрофикације површинских вода је у порасту последњих неколико деценија, а показало се и веома актуелно са циљем очувања водних ресурса и све већом потребом људи за изворима чисте воде.

Са друге стране и нагле промене еколошких услова, нпр. обилне падавине или исушивање водених екосистема, које за последицу имају мењање абиотичких и биотичких фактора у воденом екосистему и околини, могу да имају различите утицаје на састав и динамику заједнице фитопланктона (Scheffer и van Nes, 2007). У условима глобалних климатских промена мали водени екосистеми су често погодна станишта за развој тропских, алохтоних, потенцијално токсичних цијанобактерија (Scheffer и сар., 2001).

Савремена истраживања показују да хидролошке екстремне појаве могу изазвати катастрофалне промене у системима као што су мале акумулације (Scheffer и сар., 2001). Још увек је непознато како фитопланктонске заједнице малих акумулација одговарају на екстремне поплаве и драстичан пораст дубине воде, те могу ли такви услови довести до промена еколошког стања и у којој мери.

Фитопланктонске цијанобактерије су због своје сензитивности на промене средине, веома значајне као индикаторски организми. У процени квалитета вода користе се на различите начине. Оквирна Директива о водама Европске Уније (WFD, 2000), а у складу са овом Директивом, Закон о водама Републике Србије (“Сл. гласник РС”, бр. 30/2010) и

Правилник о параметрима еколошког и хемијског статуса површинских вода и параметрима хемијског и квантитативног статуса подземних вода ("Сл. гласник РС", бр. 74/2011), препоручују фитопланктон као обавезан елемент за процену еколошког потенцијала акумулација (ткз. значајно измењених водних тела).

Поред штетних ефеката на биодиверзитет екосистема, цијанобактеријско цветање може негативно утицати на саму употребу водених екосистема, на њихов естетски квалитет, да изазове здравствени ризик приликом коришћења такве воде, али да има и негативан економски утицај са аспекта трошкова водених ресурса који се користе за људску употребу. Људски захтеви и водене активности које могу негативно утицати, укључују снабдевање пијаћом водом, наводњавање стоке, наводњавање усева, аквакултуру, индустријску прераду, рекреацију и туризам (Graham и сар., 2008). Специфични ефекти на употребу воде и активности укључују повећање трошкова третмана пијаће воде (нпр. зачепљење филтера) и појаву ризика за здравље људи и животиња због потенцијалне производње токсина, тј. цијанотоксина од стране цијанобактерија (Graham и сар., 2008; Newcombe, 2009).

1.1. Основне карактеристике цијанобактерија

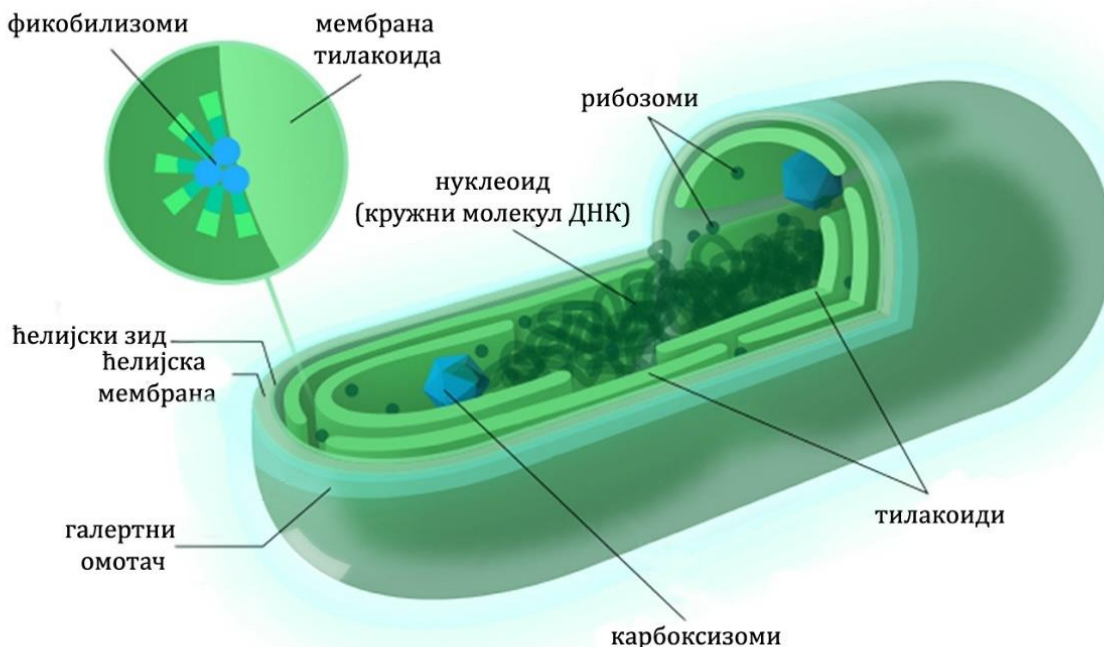
Алге су у природи широко распрострањена и значајна група организама. Њихова улога посебно долази до изражаја у општем циклусу кружења материје и протичања енергије у коме се јављају као примарни органски продуценти. Назив алга потиче од латинске речи *algae* и у буквалном преводу значи морска трава. У биолошком смислу под овим називом подразумева се више различитих раздела алги које у својим ћелијама имају хлорофил и које су типични представници водених биотопа (Blaženčić, 2000; Guiry, 2012). Највећи број врста алги се налази у воденој средини, али се могу наћи и у терестричној, на осветљеним и влажним стаништима. Све алге се сврставају у 15 раздела, док се укупан број врста процењује на 72 500. Више од 10% укупног броја врста чине модрозелене алге (Cyanobacteria) (Guiry, 2012).

Цијанобактерије (модрозелене алге) су фотосинтетски древни прокариоти чија се старост процењује на око 3.5 милијарди година. То су еволутивно стари микроорганизми са глобалном дистрибуцијом. Одговорне су биле за стварање Земљине аеробне атмосфере пре 2200–2400 милиона година кроз своју фотосинтезу стварајући кисеоник, а данас су главни агенти у биолошком циклусу угљеника, азота и минерала (Whitton и сар., 2012). Они су природни становници различитих средина, укључујући слатке, бракичне и морске воде, као и осветљене површине стена и тла. У воденом окружењу, цијанобактерије се могу појавити на различитим стаништима: суспендоване у распршеном облику или као агрегати у води, на воденој површини, на дну седимента или причвршћене на обалне стене и биљке. Због свог фотосинтетског начина раста, способности многих врста да фиксирају азот у амонијак и аминокиселине и способности да издрже неповољне и екстремне услове средине, цијанобактерије су примарни колонизатори. У периоду када су ресурси обилно доступни, цијанобактерије могу да складиште есенцијалне хранљиве материје (фосфор, азот, угљеник, гвожђе) што им омогућава раст у неповољним условима у периоду ограничене доступности хранљивих састојака. Цијанобактерије чине основу бројних водених и копнених ланаца исхране и налазе све већу примену у биотехнологији, од

производње органских ђубрива до потенцијалних фармацеутских производа (Whitton и сар., 2012).

Цијанобактерије су филогенетски веома стари, прокариотски грам-негативни организми, који живе у широком распону екосистема, од аерофитских до свих водених (Whitton и сар., 2012). Назив ове групе прокариотских организама је прилично дискутабилан. У савременим научним и стручним радовима користи се назив *Cyanobacteria*, знатно ређе се користе називи *Cyanophyta*, *Cyanophyceae* или *Cyanoprokaryota* (Свијан, 2013). Понекад се користи назив и *Chloroxybacteria* (Graham и Wilcox, 2000). С обзиром на то да је реч о организмима који имају својства блиска и алгама и бактеријама Blaženčić (2000) уводи назив *Cyanobacteriophyta*. Номенклатуром цијанобактерија управља Међународни кодекс ботаничке номенклатуре (МКБН) (McNeill и сар., 2012) и Међународни кодекс номенклатуре прокариота (МКНП) (Lapage и сар., 1992). Ботаничка класификација се заснива на ћелијској морфологији, присуству овојница или омотача, дељењу ћелија, гранању, еколошким карактеристикама и молекуларном филогенетском приступу (Anagnostidis и Komárek, 1988; Komárek и сар., 2014). Бактериолошки приступ такође узима у обзир морфолошка својства, али и физиолошка, цитолошка и биохемијска својства живих, аксеничних цијанобактеријских сојева, а не заснива се на концепту врста (Castenholz, 2001). Покушаји да се ускладе оба система још су под дебатом. Oren и Garrity (2014) предложили су да се цијанобактерије искључе из група организама чија је номенклатура обухваћена МКНП кодом. Међутим, савремена цијанобактеријска таксономска класификација сажима оба ова концепта (полифазни приступ), класификујући целу цијанобактеријску групу у више филогенетски подржаних кластера (Zapomělová и сар., 2010; Komárek, 2013; <https://www.algaebase.org/>).

Морфолошки су цијанобактерије прилично разнолике и одликују се једноставном грађом. По структури и функцији код ћелија цијанобактерија разликују се четири основна дела: спољашњи галертни омотач, ћелијски зид, хроматоплазма и нуклеоплазма (Свијан, 2013) (Слика 1). Спољашњи галертни омотач је присутан код већине представника, није саставни део ћелијског зида и то је јасно уочљиво при ћелијској деоби у којој овај омотач не учествује. Компоненте ћелијског зида су сличне као код грам негативних бактерија и у основи га граде четири слоја. У хроматоплазми поред разбацаних 70S рибозома налази се фотосинтетски апарат у форми појединачних тилакоида са пигментима. Поред пигмената хлорофила *a* и каротеноида, пигментни састав карактерише и присуство специфичних помоћних пигмената из групе фикобилина (фикоцијанин, алофикоцијанин, фикоеритрин и фикоеритроцијанин (Wolk, 1980)). На тилакоидима се налазе посебна зрнаста телашца (фикобилизоми) у којима су смештени фикобилини (Свијан и Blaženčić, 1996). У безбојној маси нуклеоплазме налази се прстенаста ДНК. Цијанофицинска зрнца су резервне супстанце, изграђена од полипептидних полимера аспартанске киселине и аргинина. Карбоксизоми су вишеугаона тела ограничена су једнослојном мембраном и у ћелији их има 40 (Свијан и Blaženčić, 1996). Између хроматоплазме и нуклеоплазме смештене су гасне вауколе, посебно код планктонских облика. Вакуоле су испуњене азотом при чему једнослојна мембрана гасних мехурића не пропушта азот неко време и након угинућа ћелије. Овим вакуолама смањује се специфична тежина алги, чиме је алгама омогућено лебдење у одређеном слоју воде (Свијан и Blaženčić, 1996).



Слика 1. Структура ћелије код цијанобактерија (извор: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria> - модификовано).

Цијанобактерије карактерише талус који може бити на једноћелијском, колонијском и филаментозном (трихалном) ступњу морфолошке организације (Holt, 1994; Holt и сар., 2001).

Трихалне цијанобактерије имају талус који може бити хомоцитног или хетероцитног типа. Хетероцитни тип талуса, поред вегетативних ћелија, карактерише присуство специјализованих ћелија као што су хетероцисте и акинети (Singh и Montgomery, 2011). Хетероцисте настају диференцијацијом вегетативних ћелија и имају улогу у процесу азотофиксације у аеробним условима уз присуство слободног азота и уз учешће ензима нитрогеназе (Komárek и Anagnostidis, 1989; Kumar и сар., 2010). Функција акинета огледа се у обезбеђивању преживљавања неповољних услова спољашње средине, а настају терминалном диференцијацијом вегетативних ћелија (Flores и Herrero, 2010). Цијанобактерије се размножавају различитим типовима вегетивног размножавања, док полно размножавање код цијанобактерија није заступљено (Rippka, 1988; Blaženčić, 2000; Holt и сар., 2001). Вегетивно размножавање се врши у зависности од типа талуса, деобом вегетативних ћелија, раскидањем колонија или фрагментацијом трихома. Фрагментацијом трихома настају хормогоније (Свијан, 2013). Хормогоније су кратки низови ћелија цијанобактерија који су изграђени од ћелија мањих димензија и представљају један од најчешћих начина размножавања код кончастих цијанобактерија (Holt и сар., 2001; Свијан, 2013). Поред тога, значајна је улога хормогонија и у формирању симбиотских односа са другим организмима (Wong и Meeks, 2002; Adams и Duggan, 2008). Поједине цијанобактерије се могу размножавати и спорама, егзоспорама и ендоспорама.

1.2. Секундарни метаболити цијанобактерија (цијанотоксини)

Цијанобактерије продукују биолошки активне материје које су значајне као богат извор биоактивних једињења и које поседују разноврсне биолошке функције. Поред примарног метаболизма код цијанобактерија, који има основну улогу у обезбеђивању интермедијера неопходних за синтезу есенцијалних макромолекула, секундарни метаболизам такође има изузетан значај код цијанобактерија (Dos Santos и сар., 2005). Цијанобактерије показују способност продукције широког спектра секундарних метаболита са специјализованим функцијама у циљу успешног прилагођавања условима животне средине (Rastogi и Sinha, 2009). Као резултат секундарног метаболизма цијанобактерије поседују и способност продукције токсина (цијанотоксина), од којих су неки токсични за биљке, животиње и људе. Цијанобактерије које поседују способност продукције цијанотоксина детектоване су широм света и утврђено је да више од 50 описаних врста цијанобактерија има способност синтезе цијанотоксина (Meriluoto и сар., 2017; Svirčev и сар., 2019).

Уколико узмемо у обзир хемијску структуру и механизме деловања цијанотоксина, они представљају веома хетерогену групу једињења (Hrouzek и сар., 2011). Познато је да међу отприлике 150 идентификованих родова цијанобактерија њих 40 , углавном водених сојева, поседује способност продукције цијанотоксина који могу негативно да утичу на друге организме (van Apeldoorn и сар., 2007). Meriluoto и сар., (2017) су дали свеобухватни приказ потенцијално токсичних цијанобактеријских родова и њихових токсина (Табела 1).

Табела 1. Листа потенцијално токсичних цијанобактеријских родова и њихових токсина (Meriluoto и сар., 2017)

Токсини	Родови
Микроцистини	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Annamia</i> , <i>Aphanizomenon</i> *, <i>Aphanocapsa</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Geitlerinema</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Limnothrix</i> , <i>Merismopedia</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Trichodesmium</i> *, <i>Trichormus</i> , <i>Woronichinia</i> *
Нодуларини	<i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i>
Анатоксин-а	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Cuspidothrix</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i> *, <i>Pseudanabaena</i> , <i>Tychonema</i>
Анатоксин-а (S)	<i>Dolichospermum</i>
Цилиндроспермопсин	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Chrysoosporum</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Dolichospermum</i> *, <i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Umezakia</i>
Лингбиатоксин	<i>Lyngbya</i> *, <i>Moorea</i> *†
Сакситоксин	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Cuspidothrix</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Hydrocoleum</i> *, <i>Limnothrix</i> (?), <i>Lyngbya</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Trichodesmium</i> *
Аплизиатоксин	<i>Lyngbya</i> *, <i>Moorea</i> *†
Дебромоеплизиатоксин	<i>Leibleinia</i> *, <i>Lyngbya</i> *
Цигуатоксин	<i>Trichodesmium</i> *
Палитоксин	<i>Trichodesmium</i> *

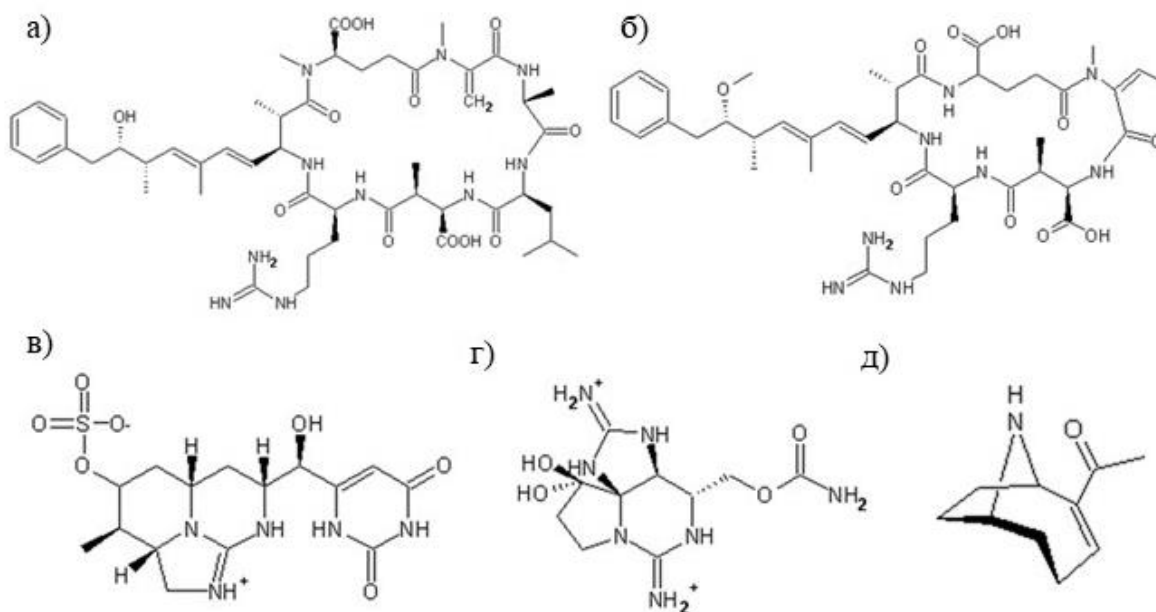
* Потенцијално токсични родови идентификовани искључиво у узорцима водених екосистема.

Нису све врсте из наведених родова увек присутне са токсичним генотиповима.

Родови који су у литератури углавном описани као произвођачи токсина наведени су подебљано.

† *Moorea producens* често се у литератури погрешно наводи као *Lyngbya majuscula* и *L. sordida*.

Цијанотоксини су подељени у пет функционалних група: хепатотоксини, неуротоксини, цитотоксини, дерматотоксини и токсини који изазивају иритације (Jonas и сар., 2015). Ако узмемо у обзир хемијску структуру, цијанобактеријски токсини су сврстани у три групе: циклични пептиди (микроцистини и нодуларини), алкалоиди (неуротоксини и цилиндроспермопсин) и липополисахариди (Msagati и сар., 2006) (Слика 2).



Слика 2. Хемијска структура цијанотоксина: а) микроцистин (MC); б) нодуларин (NOD); в) цилиндроспермопсин (CYN); г) сакситоксин (STX); д) анатоксин-а

Већина истраживања која се баве цијанотоксинима усредсређена су на микроцистине, који су, како се чини, најчешћи токсини који се јављају током цветања у слатководним екосистемима. У последњих 10 година спроведена су бројна истраживања како би се боље разумео утицај услова животне средине на садржај токсина у цијанобактеријским ћелијама (Meriluoto и сар., 2017).

Најчешће описани ефекти цијанотоксина су активирање оксидативног стреса (Ding и Ong, 2003; Botha и сар., 2004), интерференција са процесом репликације ДНК (Patterson и Carmeli, 1992; Teneva и сар., 2003) или деполимеризација актина (Patterson и сар., 1993; Smith и сар., 1994). Иако фактори животне средине могу да утичу на удео ћелија које производе и не производе цијанотоксине и на производњу цијанотоксина у ћелијама, било је проблематично предвидети са великим поуздањем потенцијалну токсичност цветања и здравствене ризике повезане са истим (Dolman и сар., 2012).

Иако је знање о екологији и токсичности цијанобактерија значајно напредовало у последњих 20 година, још увек је веома тешко дати прогнозе за више од неколико дана унапред о динамици популације и о потенцијалној токсичности цијанобактеријских цветања. Чини се да на динамику популације и потенцијалну токсичност цветања углавном утичу различити притисци животне средине. Сходно томе, цветања

цијанобактерија, која се јављају у неколико екосистема на истом подручју, и њихова потенцијална токсичност могу показати врло различите путање. Штавише, за одређени екосистем могу се пронаћи велике варијације из године у годину. Стога се чини да је стратегија узорковања (укључујући број места узорковања, локацију, али и учесталост узорковања) најважнији део мониторинга цијанобактерија и да се ова стратегија мора прилагодити локалним условима и у односу на циљ мониторинга (било да је у научне сврхе, ради заштите здравља итд.).

Последњих година цијанобактерије се све више истражују и као потенцијални произвођачи цијанотоксина. У многим земљама су прихваћене препоруке од стране Светске Здравствене Организације (СЗО) за контролу воде за пиће и рекреативне воде, да број цијанобактерија и концентрације цијанотоксина буду имплементирани у националне прописе и буду значајан параметар при одређивању квалитета вода (Chorus и Watram, 1999). У Србији параметар концентрација цијанотоксина још увек није прихваћен при обавезном мониторингу водених екосистема, али све чешћа појава инвазивних и потенцијално токсичних врста цијанобактерија, али и негативних последица које се у тим случајевима јављају, намеће потребу детекције токсина и евалуацију њихове активности.

1.3. Преглед досадашњих истраживања фитопланктонских цијанобактерија у Републици Србији

Први подаци о алгама у Србији налазе се у радовима са краја IX века (Scharschmidt, 1883). Ове ране студије, иако доста спорадичне и доста ограничене у истраживању, пружају прве податке о таксономским и флористичким подацима (Milovanović, 1949). Након тога почиње се са знатно интензивнијим, свеобухватнијим и вишегодишњим планским алголошким истраживањима (Blaženčić, 1986). Cvijan и Blaženčić (1996) дали су значајан допринос морфологији, таксономији и екологији цијанобактерија. Последњих деценија је појачано интересовање када је реч о научним истраживањима у Републици Србији која се тичу цијанобактерија и цијанотоксина (Svirčev и сар., 2014; Jovanović, 2020).

Истраживања спроведена у периоду од 1996. до 2020. године у Србији указују да је број таксона цијанобактерија нађених у водама које се користе за водоснабдевање и рекреацију порастао за 174 (Jovanović, 2020), а међу њима 30 таксона представља нове налазе за испитивани тип водних тела. Подаци објављени у флори цијанобактерија (Cvijan и Blaženčić, 1996) дају приказ о 154 таксона колико их је до 1996. године било идентификовано.

Од свих идентификованих таксона фитопланктонских цијанобактерија које су нађене у воденим екосистемима Србије, родови *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Oscillatoria* и *Cylindrospermopsis* су најфреквентнији родови и родови који најчешће цветају у еутрофним резервоарима у Србији (Ђорђевић и Simić, 2014; Svirčev и сар., 2014; Simić и сар., 2014; Simić и сар., 2017; Jovanović, 2020; Tokodi и сар., 2020).

Последњих деценија у Србији је са порастом појаве цветања значајно повећан и број истраживања која су у вези са токсичним цијанобактеријама и цијанотоксинима (Simeunović и сар., 2005; Svirčev и сар., 2007; Svirčev и сар., 2008b; Svirčev и сар., 2009; Sedmak и Svirčev, 2011; Pantelić и сар., 2013; Svirčev и сар., 2014; Ђорђевић и сар., 2015; Predojević и сар., 2015; Tokodi, 2016; Tokodi и сар., 2018; Tokodi и сар., 2020; Jovanović, 2020), испитивањем еколошких фактора који би могли бити одговорни за појаву цијанобактеријског цветања (Karadžić и сар., 2013; Ђорђевић и Simić, 2014; Ћirić и сар., 2015; Jovanović и сар., 2017; Predojević, 2017; Simić и сар., 2017; Jovanović, 2020) и утицајем на живи свет (Perendiја и сар., 2011; Drobac и сар., 2013; Drobac, 2015; Ђорђевић и сар., 2017).

У доступној литератури постоји велики број студија које говоре да се стање многих екосистема са тог аспекта оцењује и прати. Бројним истраживањима која су спроведена у Србији обухваћено је око стотину различитих водних тела: језера, акумулација, река, рибњака и канала, а посебан фокус је стављен на акумулације које се користе за водоснабдевање (Karadžić и сар., 2010; Sedmak и Svirčev, 2011; Kostić и сар., 2014; 2015; 2016; Svirčev и сар., 2017; Blagojević Ponjavić и сар., 2019, Trbojević и сар., 2019a, 2019b). Када су реке у питању детаљна истраживања су спроведена на Поњавици и Дунаву (Karadžić и сар., 2013; Jovanović, 2020). Последњих година је све већи акценат стављен на истраживања у рибњацима Војводине, због све веће забринутости са здравственог аспекта

услед ефекта цијанотоксина на рибе и потенцијално на људе услед конзумирања рибе оптерећене цијанотоксинима (Drobac и сар., 2013; Drobac, 2015).

Имајући у виду све наведено, али и све карактеристике цијанобактерија и цијанотоксина, у Србији још постоји простора за њихово истраживање са аспекта појаве и утицаја у различитим воденим екосистемима која су још увек недовољно истражена. Пре свега реч је о истраживањима у малим акумулацијама која на територији наше земље становништво углавном користи у рекреативне сврхе.

Досадашња истраживања о токсичности фитопланктонских цијанобактерија углавном су била усмерена на детекцију цијанотоксина у воденим екосистемима (Natić и сар., 2012) и на преглед потенцијалних фактора ризика и могуће везе са цветањем цијанобактерија и појаву примарног карцинома јетре у Србији (Simeunović и сар., 2010; Drobac и сар., 2013; Svirčev и сар., 2013). Лабораторијске студије токсичности цветајућих токсичних фитопланктонских цијанобактерија на нивоу соматских ћелија у *in vivo* условима до сада нису спроведене.

2. Циљеви

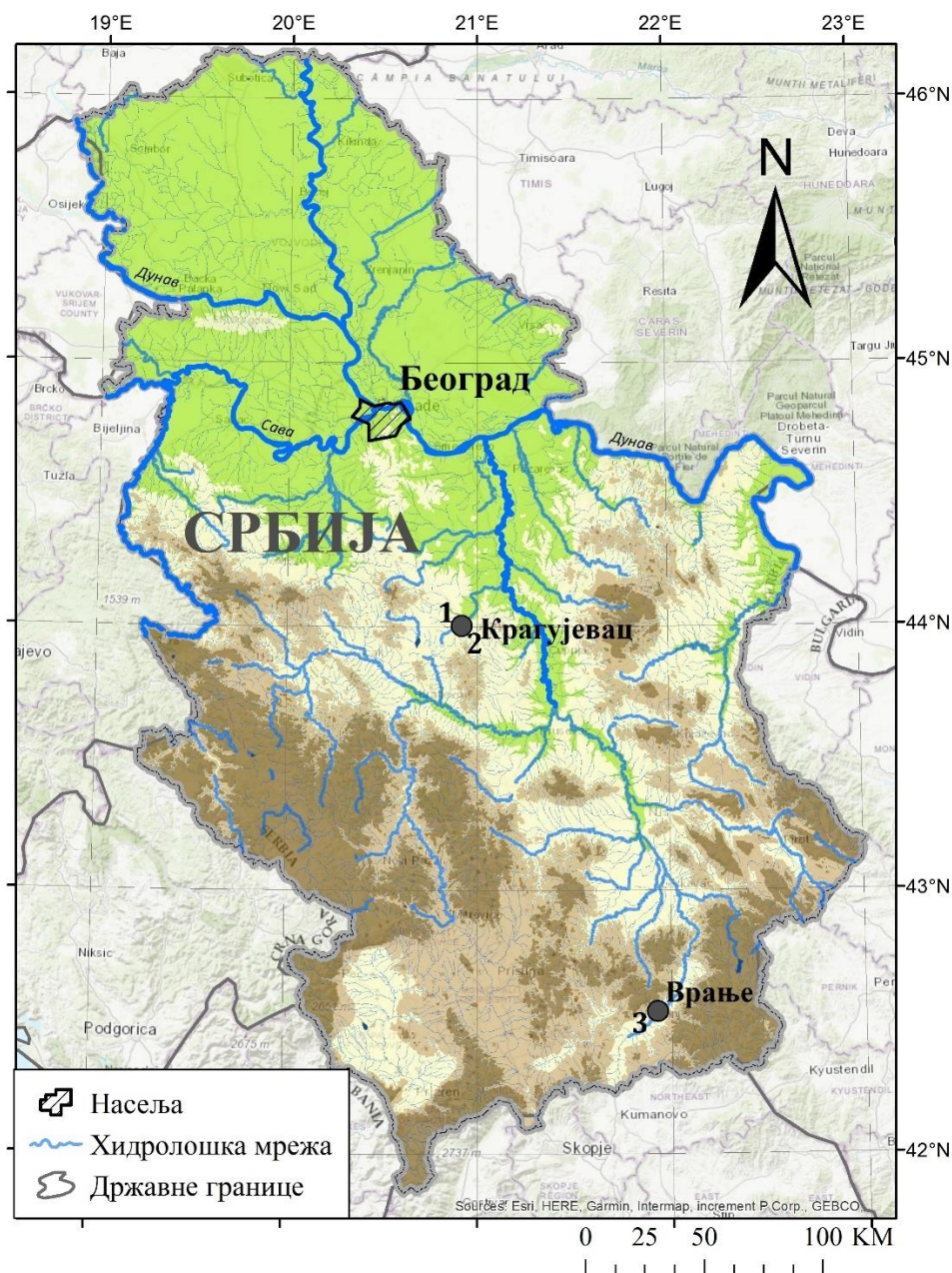
Узимајући у обзир претходне наводе, циљеви овог рада су следећи:

- ❖ Утврђивање вредности физичких и хемијских параметара на испитиваним локалитетима и одређивање најзначајнијих срединских фактора који делују на фитопланктонске цијанобактерије;
- ❖ Анализа квалитативног и квантитативног састава фитопланктонских цијанобактерија испитиваних малих акумулација са посебним освртом на потенцијално инвазивне и токсичне врсте;
- ❖ Утврђивање просторне и сезонске динамике фитопланктонских цијанобактерија испитиваних водних тела;
- ❖ Утврђивање реакције заједнице фитопланктонских цијанобактерија на различите екстремне хидролошке услове;
- ❖ Праћење случајева цветања цијанобактерија ради детекције и потенцијалног присуства цијанотоксина у акумулацијама;
- ❖ Проучавање негативних ефеката метанолског екстракта цветајућих и токсичних врста цијанобактерија из испитиваних акумулација на функцију генетичког материјала пацова соја Wistar на нивоу соматских ћелија у *in vivo* условима;
- ❖ Утврђивање хепатотоксичности метанолског екстракта цветајућих и токсичних врста цијанобактерија из испитиваних акумулација праћењем биохемијских параметара јетре у серуму крви пацова соја Wistar и антиоксидативних параметара у ткиву јетре, као и праћењем хистопатолошких промена ткива јетре пацова у *in vivo* условима.

3. Материјал и методе

3.1. Подручје истраживања

Истраживања спроведена у оквиру дисертације обухватају студију фитопланктонских цијанобактерија три мале акумулације: акумулације Шумарице, акумулације Бубањ и Александровачке акумулације (Слика 3).



Слика 3. Подручја истраживања (1. акумулација Шумарице, 2. акумулација Бубањ, 3. Александровачка акумулација) на којима је вршено узорковање током трогодишњег мониторинга

3.1.1. Акумулација Шумарице

Акумулација Шумарице се налази у централној Србији, на периферији града Крагујевца (44°01'49"N; 20°52'28"E) на надморској висини од 185 m (Слике 4-6). Формирана је 1967. године преграђивањем Сушичког потока и део је спомен парка "21. октобар". Максимална дужина акумулације је 1300 m са просечном ширином од 175 m. Запремина акумулације је $0.95 \times 10^6 \text{ m}^3$, а површина је 20 ha. Највећа забележена дубина акумулације је 15 m, а просечна дубина је око 5-6 m. Током лета температура воде расте и до 26–29°C, а током зиме површина акумулације замрзава (Ranković и сар., 2006).

Највећим делом, акумулација добија воду из Сушичког потока и падавина. У сливу Сушичког потока постоје шуме, ливаде, пољопривредно земљиште, као и насеља са делимично уређеном канализационом мрежом. Изнад једне стране акумулације постоји насеље, док су на другој страни елементи ливадске вегетације који се протежу скоро до воде и шумски фрагменти заједнице *Quercetum confertae-ceris* Rudski 1949. (Ranković и сар., 2006). Страна акумулације која је добро уређена намењена је за спортску употребу (терен за одбојку на песку, авантура парк, столови за стони тенис, игралиште за децу). Поред уређене плаже посетиоцима су на располагању угоститељски објекат, шетња уређеном стазом, бициклизам, вожња чамцем или педалином, купање и риболов. Акумулација Шумарице са свим својим садржајима је најпопуларније рекреационо водно тело на територији града Крагујевца.



Слика 4. Сателитски снимак акумулације Шумарице (извор: <https://www.google.com/maps/> - модификовано) и приказ локалитета на којима је вршено узорковање: 1. близина бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа



Слика 5. Акумулација Шумарице (Фото Н. Ђорђевић - јун, 2012. године)



Слика 6. Акумулација Шумарице (Фото Н. Ђорђевић - јул, 2012. године)

3.1.2. Акумулација Бубањ

Акумулација Бубањ се налази у централној Србији, у урбаној зони града Крагујевца, на удаљености један километар од центра (44°01'01"N; 20°55'33"E). Акумулација је формирана 1955. године у алувијалној равни реке Лепенице на локацији некадашње циглане, у напуштеној котлини (Слике 7-9) (Ranković и сар., 2006). У почетку, на подручју данашњег језера било је неколико мањих локви. Локве су расле и од њих је настало мало језеро, које се постепено повећавало (<https://sr.wikipedia.org>). Највећи део воде језеро добија из подземног извора, из чесме „Бубањ“ и од падавина (Ranković и сар., 2006). Акумулација се налази на надморској висини од 172 m и његова површина износи приближно 2.7 ha. Дубина акумулације Бубањ у просеку износи 1.20 m са максималном дубином од 1.80 m и минималном дубином од 0.50 m. Највећи део дна акумулације је муљевит. Просечна дебљина муља је 0.50-0.70 m, при чему је већина лежишта усмерена према централним деловима (Ranković и сар., 2006).

Током зиме цела површина акумулације је замрзнута. Копнени појас око акумулације је раван терен са оскудном шумском вегетацијом и угоститељским објектом са друге стране. Акумулација је окружена прометним саобраћајем са две стране и градским гробљем са друге стране (Ranković и сар., 2006). Такође, акумулација Бубањ пружа могућности за рекреацију људи (шетња и бициклизам) и риболов, али купање није препоручљиво. Током 2008. године спроведен је еколошки приступ санацији акумулације Бубањ који је подразумевао физичко одстрањивање емерзне и субмерзне макровегетације са већег дела акумулације специјалним комбајном (Simić и Simić, 2009).



Слика 7. Сателитски снимак акумулације Бубањ (извор: <https://www.google.com/maps/> - модификовано) и приказ локалитета на којима је вршено узорковање: 1. локалитет (аутопут); 2. средина акумулације; 3. локалитет (у непосредној близини оскудне шумске вегетације)



Слика 8. Акумулација Бубањ (Фото Н. Ђорђевић - јун, 2012. године)



Слика 9. Акумулација Бубањ (Фото Н. Ђорђевић - август, 2012. године)

3.1.3. Александровачка акумулација

Александровачка акумулација се налази на крајњем југу Србије, 8 km је удаљена од Враћа (42°29'22"N; 21°53'54"E), на надморској висини од 412 m (Слике 10-13). Акумулација је формирана 1963-64. године, изградњом насуте бране висине 8 m на Александровачкој реци на локалитету Ратајска Слатина. Површина језера је 12 ha, максимална запремина језера је 250 000 m³, дужина акумулације је око 500 m, максимална ширина око 250 m, максимална дубина језера је 3-4 m, а просечна дубина је 1.5-2 m. На дну језера је велика количина муља. Акумулација је окружена обрадивим површинама (Ђорђевић и Simić, 2014).

Водена маса језера прекрива већим делом тзв. Александровачко сланиште. Акумулација прекрива 2/3 сланишта, док је 1/3 сланишта ван акумулације. Ова микроакумулација је у почетку коришћена за наводњавање пољопривредног земљишта низводно од формиране бране и акумулације, на десној обали Јужне Мораве. Пољопривредно земљиште је припадало пољопривредном комбинату "Пољопродукт". У току досадашњег експлоатационог века, језеро је све више добијало функцију рекреације и риболова, а истовремено се његова иригациона функција смањивала заједно са пољопривредним активностима према првобитном замишљеном задружном концепту (Prokić и сар., 2008).



Слика 10. Сателитски снимак Александровачке акумулације (извор: <https://www.google.com/maps/> - модификовано) и приказ локалитета на којима је вршено узорковање: 1. близина бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа

У више наврата у акумулацији се дешавао помор рибе. Током 2008. године у једном дану угинуло је 65 примерака толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, 1844) укупне тежине 1600 kg (Слика 11) (Simić и Simić, 2009). Након овог инцидента од 2009. до 2010. године спроведене су мере за комплетну реконструкцију језера (Prokić и сар., 2008). Изловљена је преостала риба, вода из акумулације је испуштена, а затим се приступило санацији која је подразумевала: изградњу цевовода и канала у дужини од 2 027 m, којим је планирано довођење воде из водозавода, изградњу одводног канала (дужине 2 267 m) којим би вода из акумулације одводила и уливала у најближу реку Јужну Мораву. Овом приликом је завршено уређење акваторије самог језера (чишћење 35-40 000 m³ муља, затим изградња плажа, пешачких стаза) (Слика 12), санација објекта и прелива на брани (Prokić и сар., 2008). Спроведени су и антиерозивни радови (биолошки радови, садња појаса од жбуња-илофилтера (појас око језера)) који представљају баријеру за материјал од спирања падина око језера. Сланиште на ком је акумулација формирана није разматрано у оквиру пројекта санације.



Слика 11. Александровачка акумулација – пре санације (Фото С. Симић - јун, 2008. године)



Слика 12. Александровачка акумулација – након санације (Фото С. Симић - септембар, 2010. године)



Слика 13. Александровачка акумулација (Фото Н. Ђорђевић - јун, 2012. године)

3.2. Прикупљање узорака

Теренска истраживања и прикупљање узорака на свим акумулацијама су спроведена једном месечно у периоду од јуна 2012. до децембра 2014. године. На свакој акумулацији узорковање је спроведено на три тачке. У случају акумулације Шумарице и Александровачке акумулације локалитети су били распоређени на следећи начин: 1. у близини бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа (најплићи део акумулација). С обзиром на то да акумулација Бубањ није формирана преграђивањем бране локалитети су дефинисани на другачији начин: 1. локалитет (аутопут); 2. средина акумулације; 3. локалитет (у непосредној близини оскудне шумске вегетације).

За физичку и хемијску анализу воде узоци су прикупљени на три различите дубине у стакленим посудама у складу са стандардом SRPS EN ISO 5667-14:2017. Узорци воде за биохемијску анализу (концентрација хлорофила *a*) прикупљени су у боцама од 1 L захватањем са површине воде и до лабораторијске анализе ти узорци су чувани у мраку на +4°C. Анализа концентрације хлорофила *a* урађена је одмах по повратку са терена.

Узорци за квалитативну и квантитативну анализу фитопланктона узимани су истовремено и са истом динамиком као и узорци за хемијску анализу воде. Узорковање фитопланктона вршено је у складу са стандардном методом SRPS EN 16698:2016 помоћу планктонске мрежице пречника 25 cm и промера окаца 22 μ m, а за квантитативну анализу помоћу Рутнерове боце запремине 2 L. Након спроведеног поступка прикупљања, узорци су фиксирани формалдехидом до коначне концентрације 4% формалдехида у узорку.

За анализу цијанотоксина у води узорци су прикупљени у тамним боцама од 1 L захватањем са површине воде, боце су пуњене до врха и узорци су транспортовани до лабораторије у фрижидерима на +4°C. Узорци цветајућих таксона цијанобактерија прикупљени су када је ова заједница била развијена и на местима где је била заступљена, односно када је уочено цветање на површини акумулација. У периоду цветања, узорци биомасе са површине акумулације и воде су сакупљени у боцама од 5 L, у периоду цветања.

3.3. Метеоролошки подаци

Метеоролошки подаци (температура ваздуха и количина падавина) су преузети из Метеоролошких годишњака Републичког хидрометеоролошког завода Србије за 2012, 2013. и 2014. годину (RHMZ 2013; 2014, 2015) (<http://www.hidmet.gov.rs/>).

3.4. Анализа физичких и хемијских параметара воде

За утврђивање физичких и хемијских параметара воде коришћене су стандардне методе (APHA, 2005). На сваком локалитету су мерени одабрани физички и хемијски параметри: температура воде (°C), рН, концентрација раствореног кисеоника (mg/L) и

његова сатурација (%), електропроводљивост ($\mu\text{S}/\text{cm}$), тврдоћа воде (mg/L) и провидност (m). Физички и хемијски параметри су мерени на терену помоћу комбинованог дигиталног инструмента (кондуктометар, рН метар, термометар - HANNA instruments), концентрација и сатурација кисеоника оксиметром (Mettler toledo), а провидност воде Секијевим диском.

Одређивање концентрације фосфата ($\text{PO}_4\text{-P}$, mg/L), нитрата ($\text{NO}_3\text{-N}$, mg/L), амонијум јона ($\text{NH}_4\text{-N}$, mg/L), концентрације укупног фосфора (TP, mg/L) и концентрације укупног азота (TN, mg/L) урађено је у Лабораторији за хидробиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу одмах по повратку са терена помоћу фотометра (Aqualytic AL400) применом одговарајућих реагенса.

3.5. Одређивање концентрације хлорофила *a*.

Одређивање концентрације хлорофила *a*, вршено је спектрофотометријски, након екстракције етанолом на 75°C (ISO 10260, 1992) у Лабораторији за хидробиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Метода се заснива на екстракцији пигмента након филтрације узорка воде и мерењу апсорбанце екстракта узорковане воде на 665 nm и 750 nm пре и после закишељавања. За филтрацију узорка је коришћен филтер папир Whatman GF/F $0.45\ \mu\text{m}$, а филтрација је вршена помоћу Сарториус лабораторијске вакуум пумпе. Након филтрације, филтер папир је потопљен у етанол и екстракциони суд је загреван у воденом купатилу до 75°C . Током екстракције водило се рачуна да екстракт буде заштићен од светлости и ваздуха. Екстракт је филтриран још једном како би се добио потпуно бистар финални екстракт који је коришћен за читавање апсорбанци. За референтну кивету коришћен је етанол.

На спектрофотометру марке Jenway 6105 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK), читаване су вредности апсорбанце екстракта (на 665 nm и 750 nm) пре и после закишељавања хлороводоничном киселином (0.01 mL 3M HCl). Концентрација хлорофила *a* ($\mu\text{g}/\text{L}$) је добијена прорачуном из следеће формуле:

$$\text{Хлорофил } a = \frac{(A - A_a)}{K_c} \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{10^3 \times V_e}{V_s \times d}$$

где је:

A ($A_{665} - A_{750}$) – апсорбанца пре закишељавања

A_a ($A_{665} - A_{750}$) – апсорбанца после закишељавања

$K_c = 82\text{ L}/\mu\text{g}^*\text{cm}$ – спектрални апсорпциони коефицијент за хлорофил *a*

V_e – запремина екстракта у милилитрима (mL)

V_s – запремина узорка који је филтриран у литрима (L)

$R = 1.7$ - однос A/A_a за раствор чистог хлорофила *a*,

d – ширина кивете (cm)

10^3 – димензиони фактор који одговара V_e

3.6. Трофички статус акумулација

Трофички статус акумулација утврђен је на основу Индекса трофичности (Carlson, 1977), а за израчунавање индекса коришћена су три параметра: провидност измерена Секијевим диском (m), концентрација укупног фосфора (mg/L) и концентрација хлорофила a ($\mu g/L$).

3.7. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктона

Идентификација таксона цијанобактерија урађена је у Лабораторији за хидробиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу на привременим препаратима уз помоћ светлосног микроскопа на максималном увећању 1000x (Nikon Eclipse E100; Motic BA310 Elite Series) са камером (Bresser 9MP) уз помоћ Micro Cam Lab софтвера, а према стандардној таксономској литератури (Komárek и Anagnostidis, 1998; 2005; Hindák, 2001; Komárek, 2013).

Квантитативна анализа фитопланктона (бројност) урађена је на инвертном микроскопу (Motic AE 2000 Series) Utermöhl-овом (1958) методом према стандарду (SRPS EN 15204:2008), а биомаса цијанобактерија одређена је употребом стандардних формула на основу геометријских апроксимација (Hillebrand и сар., 1999; Sun и Liu, 2003; SRPS EN 16695:2016), која је након тога прерачуната у тежинске јединице и изражена је као mg/L .

3. 8. Индекси сличности

3. 8. 1. Индекс сличности (Sørensen, 1948)

За израчунавање квалитативне сличности и различитости фитопланктонских цијанобактерија између истраживаних акумулација коришћен је индекс сличности (ISs) по Соренсену (Sørensen, 1948).

$$ISs = \frac{2C}{A + B} * 100$$

ISs – индекс сличности по Соренсену

A – број врста једне акумулације

B – број врста друге акумулације

C – заједнички број врста између две акумулације

3. 8. 1. Индекс сличности (Jaccard, 1928)

За упоредну анализу сличности и различитости фитопланктонских цијанобактерија коришћен је и индекс сличности (J) према Жакарду (Jaccard, 1928).

$$J = \frac{A}{A + B + C}$$

A – број заједничких врста испитиваних акумулација (I и II)

B – број врста фитопланктонских цијанобактерија I акумулације које нису присутне у акумулацији II

C – број врста фитопланктонских цијанобактерија II акумулације које нису присутне у акумулацији I

3.9. HPLC метода за детекцију и квантификацију цијанотоксина у води и цијанобактеријском екстракту

Квантификација појединих цијанотоксина урађена је применом течне хроматографије високе резолуције (HPLC) са PDA детекцијом. Коришћен је HPLC систем Agilent 1100 који се састоји од бинарне пумпе дегазера, аутосемплера, термостата колоне и PDA детектора. Раздвајање цијанотоксина је вршено на колони 150x4.6 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Пре убризгавања у систем сви узорци воде су припремљени помоћу течне-чврсте екстракције коришћењем одговарајућих SPE кертрица (C₁₈, C8, PGC), а према протоколу Meriluoto и Codd (2005) и Meriluoto и сар., (2017). Припрема узорка за анализу обухвата филтрирање, пречишћавање и концентровање. Филтрирање се врши кроз стаклени мембрански филтер (0.7 µm, GF/C, Whatman). Након пречишћавања и концентровања одговарајућим хемикалијама, а зависно од типа цијанотоксина који се испитује (Meriluoto и Codd, 2005; Meriluoto и сар., 2017), узорак је спреман за убризгавање.

За анализу концентрације цијанотоксина у биомаси користи се талог задржан на филтер папиру, који се екстрахује са 50% метанолом. Екстракција цијанотоксина из ћелија одабраних врста цијанобактерија за анализу цијанотоксина је вршена у складу са протоколом Светске Здравствене Организације (Harada и сар., 1999). Петолитарски узорак воде је филтриран кроз претходно мерене филтере од стаклених влакана од 70 mm, GF/C, 1.2 µm под вакуумом. Филтер папири су сушени на температури испод 50°C док им тежина није постала константна. За детекцију цијанотоксина у биомаси, суви узорци са филтер папира су екстраховани са десет пута већом запремином метанола од тежине ћелија. На ћелије је деловано ултразвучним таласима 3 минута на 100 Hz и након тога су екстраховане један сат у мраку на собној температури. Суспензија је потом филтрирана кроз филтере од стаклених влакана и растварач је уклоњен на ротационом вакуум упаривачу до сува. Суви остатак је чуван на тамном до даље примене.

Припремљени узорци чија запремина износи 50 µL се ињектују, и кретањем испитиване смеше растворене у "мобилној фази", кроз "стационарну фазу" делови смеше се раздвајају и изолују. Пре убризгавања узорка колоне је кондиционирана мобилном фазом (контрола), након чега се ињектује стандард цијанотоксина.

Подешавање HPLC система и детекција цијанотоксина урађени су према протоколу Светске здравствене организације (Chorus и Batram, 1999) и Welker и сар., (2002), Meriluoto и Codd (2005), Vláhová и сар., (2008), Meriluoto и сар., (2017). Детектор детектује

присутне цијанотоксине, а HPLC софтвер даје хроматограм. Заправо, хроматограм је графички приказ раздвајања цијанотоксина који се десио на колони и који служи за квалитативну анализу и за квантитативно одређивање токсина. Обрада података и спектрална евалуација потврде пика вршена је применом софтвера ChemStation (Agilent, Санта Клара, САД).

Током детекције цијанотоксина коришћене су хемикалије одговарајућег степена чистоће (HPLC grade) и стандарди микроцистин (MC), анатоксин-а (ANA-A), сакситоксин (STX) и цилиндроспермопсин (CYN) (LGC Standards, NRC CRM, Канада). Припрема узорака воде за анализу цијанотоксина и детекција цијанотоксина урађена је у оквиру Лабораторије за аналитичку хемију, а припрема екстракта одабраних цветајућих цијанобактерија у Лабораторији за биохемију Института за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

3.10. Испитивање утицаја метанолског екстракта токсичних врста цијанобактерија на функцију генетичког материјала, активност биохемијских параметара серума, антиоксидативних ензима и на хистопатолошке промене

3.10.1. Експериментални модел организми

За одређивање степена оштећења ДНК и извођење Комет теста у *in vivo* условима коришћени су албино пацови соја Wistar, адултни мужјаци, старости 2 месеца и телесне масе 230 ± 20 g који су добијени од Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња Војномедицинске Академије, Београд, Србија. Експерименталне животиње су подвргнуте процесу аклиматизације на лабораторијске услове (температура 24°C , циклус 12 сати светлост/12 сати мрак), са слободним приступом храни и води. Експерименти са животињама спроведени су по протоколима одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама, Института за биолошка истраживања у Београду и у складу су са директивама Савета Европе (86/609/ЕЕС) о заштити животиња коришћених у експерименталне и научне сврхе.

3.10.2. Индуковано оштећење ДНК

По препоруци Међународне радионице за експерименталне процедуре за испитивање генотоксичности (Tice и сар., 2000), као позитивна контрола је коришћен етил метаносулфонат (ЕМС, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) растворен у NaCl. ЕМС доза (300 mg/kg телесне масе (т.м.), одабрана је на основу своје ефикасности у изазивању оштећења ДНК (Hartmann и сар., 2003).

3.10.3. Експериментални дизајн

За процену утицаја метанолског екстракта одабраних цветајућих цијанобактерија из испитиваних акумулација на функцију генетичког материјала и хепатотоксичности на сисарском модел организму, пацови соја Wistar су подељени у 7 група са по пет животиња. Прва група је служила као негативна контролна група и животињама је интраперитонеално (и.п.) ињектован 0.9% NaCl. Пратећи методологију Falconer и сар., (1999), у зависности од начина планираног уноса, тестиране супстанце се растварају до потребне концентрације или дестилованом водом за орална аплицирања, или са 0.9% NaCl за интраперитонеална аплицирања. Интраперитонеалне ињекције су изабране уместо оралне примене како би свака животиња добила тачну дозу испитиваног екстракта. Како би се проценила генотоксичност коришћењем Комет теста, друга експериментална група је примила 300 mg/kg т.м. ЕМС-а и.п. и представљала је позитивну контролу.

Сваки пацов у трећој експерименталној групи је примио и.п. ињекцију од цијанобактеријског стандарда CYN (98% чистоћа, NRC CRM, Канада) растворене у физиолошком раствору (Shen и сар., 2002; Bazin и сар., 2012).

Преостале четири групе животиња су примиле по једну и.п. дозу метанолског екстракта различитих концентрација 1 500, 3 000, 6 000 и 12 000 µg/kg т.м.. Животиње (пет за сваки временски интервал) су жртвоване декапитацијом 24 или 72 сата након третмана. Из сваке групе животиња су узети узорци крви и јетре свих експерименталних животиња. Три потпуно независна експеримента су изведена са узетим узорцима крви и ткива.

3.10.4. Одређивање степена оштећења ДНК Комет тестом

Оштећење ДНК је мерено коришћењем Комет теста у алкалним условима под пригушеним индиректним светлом, према процедури Singh и сар., (1988). Узорци јетре су уситњени и мали фрагменти су преношени на леду. Фрагменти су растворени у 1 mL свеже припремљеног и охлађеног HBSS пуфера (0.14 g/L CaCl₂, 0.4 g/L KCl, 0.06 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L MgCl₂·6H₂O, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 8.0 g/L NaCl, 0.35 g/L NaHCO₃, 0.09 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 1.0 g/L D-глукоза, 20 mM EDTA и 10% DMSO), а затим су узорци уситњени и процеђени. Наведени поступак се понавља три пута и потом се прикупља коначна суспензија ћелија. Раствор са изолованим ћелијама је преношен на леду до припреме препарата. Након тога је направљена смеша која се састоји од 10 µL ћелијске суспензије и 75 µL 1% LMPA (агароза са ниском тачком топљења). Из смеше се одпипетира 85 µL и наноси на претходно припремљене плочице које се одмах прекрију покровним стаклом, како би се у танком слоју на предметном стаклу распоредила ћелијска суспензија заједно са LMPA. Након потпуне солидификације (10 минута), покровно стакло је уклоњено и на препарат је пипетом нанет трећи заштитни слој 100 µL 1% LMPA. Као и у претходном случају, покровна стакла су постављана и уклањана након солидификације. Микроскопски препарати су потапани у хладни раствор за лизирање (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10.0) и инкубирани 2 сата на 4°C. По завршеној инкубацији, плочице се пребацују у пластичне посуде са пуфером за електрофорезу, 30 минута хоризонталне електрофорезе (2 kV; 139 mA; 30 минута). Плочице се изваде из кадице за електрофорезу, обришу се и поређају у пластичне посуде са пуфером за неутрализацију (0.4 Tris-HCl, pH 7.4, на собној температури 3 пута по 5 минута), а затим у 97% етанолу 20 минута (Singh и сар., 1988). Пре анализирања потребно је да се плочице осуше у *Easy breeze gel dryer*-у 30 минута или током ноћи на собној температури. Непосредно пре анализе, плочице су бојене са 80 µL етидијум бромидом (20 µg/mL) и покриване покровним стаклом. Комете су визуализоване и снимане 40x објективом Nikon (Ti-Eclipse) флуоресцентног микроскопа прикаченог на CCD камеру. Сто слика комета по слајду је насумично снимано и анализирано.

Комете без главе, оне код којих је скоро сав ДНК био у репу или са веома дугим репом су искључене из анализе, јер би могле бити у питању мртве ћелије. Анализиране су само комете које се нису преклапале и које су имале јасну границу (Hartmann и Speit, 1997). Како би се проценила генотоксична активност, три параметра су одабрана као индикатор оштећења ДНК: репни моменат (изражен у арбитрарним јединицама) је изабран као параметар за процену обима оштећења ДНК; % ДНК у репу (процент ДНК у

репу) као преферирани параметар; као и дужина репа (Collins и сар., 2008). Испитивање генотоксичне активности екстраката спроведено је у Лабораторији за генетику Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

3.10.5. Одређивање биохемијских параметара у серуму пацова у *in vivo* условима

У крвном серуму су одређене активности ензима аспартат аминотрасферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP) и гама глутамил трансферазе (GGT), као и концентрације укупног билирубина (TB), укупних протеина (TP) и укупног албумина (ALB). Серум је одвајан након стајања узорка крви на амбијенталној температури (15 минута) центрифугирањем на 2500 о/минуто у трајању од 15 минута и коришћен је за мерење биохемијских параметара, који су одређени према клиничким протоколима Интернационалне Федерације за Клиничку Хемију (енг. *International Federation of Clinical Chemistry*, IFCC). Параметри су одређивани уз коришћење BioSystems комерцијалних комплета и аутоматског анализатора (Roche/Cobas Mira).

3.10.6. Одређивање маркера оксидативног стреса у хомогенату ткива јетре у *in vivo* условима

Хомогенат ткива јетре (10%) је припремљен коришћењем фосфатног-PBS пуфера (50 mM, pH 7.4). Делови ткива су хомогенизовани са одговарајућом количином пуфера, у односу 1:10 (w/v). Хомогенат је центрифугиран на 4000 о/минуто у трајању од 15 минута на 4°C и супернатанти добијени након центрифугирања су одвојени, замрзнути и коришћени за одређивање антиоксидативних маркера у ткиву јетре. Параметри, као што су активност ензима каталазе (CAT) (Góth, 1991) и супероксид дисмутазе (SOD) (Misra и Fridovich, 1972), као и концентрација редукованог глутатиона (GSH) (Ellman, 1959), и тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS) (Ohkawa и сар., 1979) одређивани су спектрофотометријским методама на двозрачном UV-Vis спектрофотометру Halo DB-20S (Dynamica GmbH, Швајцарска) стандардним методама. Концентрације протеина су одређиване према методи Lowry и сар., (1951), коришћењем говеђег албумин серума као стандарда. Одређивање биохемијских параметара и параметара оксидативног стреса је урађено у Лабораторији за биохемију Института за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

3.10.7. Хистопатолошко испитивање ткивних исечака јетре пацова

За испитивање утицаја припремљених екстраката на ткивну структуру јетре, исечци јетре су подвргнути хистопатолошкој анализи. Исечци су фиксирани у пуферисаном раствору формалина (4%) и фиксација је трајала 24 сати. Након дехидратације у серији раствора етанола исечци се калупе у парафинске блокове и праве

се ткивни пресеци дебљине 5 μm помоћу микротома, који су потом бојени хистолошким бојама, прво базном бојом, хематоксилином (боји једра), након тога киселом, еозином (боји цитоплазму) (H&E бојење).

Сам поступак припреме хистолошких препарата јетре има за циљ да очува што више нативних карактеристика узорка. Овако припремљени хистолошки препарати анализирани су под светлосним микроскопом Carl Zeiss (Axio Scope) у циљу уочавања хистопатолошких промена у ткиву јетре експерименталних животиња. Направљене су микрофотографије сваког слајда са увећањем од 40x и 100x. Хистопатолошка анализа је урађена у оквиру Института за патологију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.11. Статистичка анализа података

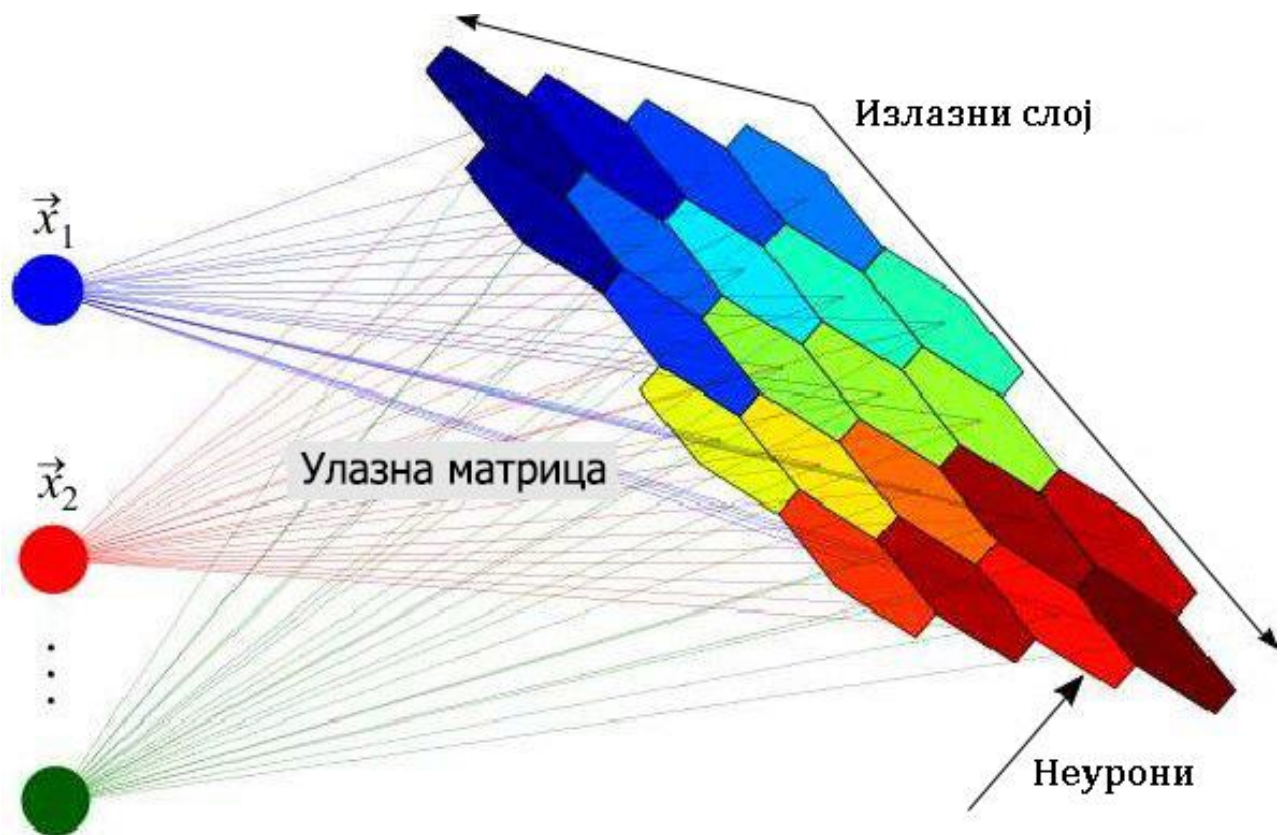
3.11.1. Статистичка анализа физичких, хемијских и биотичких података

Како би се представила просторна и временска дистрибуција свих срединских параметара и одредио модел повезаности концентрације хлорофила *a*, бројности и биомасе фитопланктонских цијанобактерија са срединским параметрима, коришћене су вештачке неуро мреже (АНН – *eng.* Artificial Neural Network).

У оквиру ове дисертације за класификацију података коришћене су самоорганизујуће мапе (COM – *eng.* Self Organizing Map) (Kohonen, 1982). Једне од најпопуларнијих неуро мрежа су COM, оне успешно процесуирају нелинеарну варијабилност у скупу података. Структура COM-а има два слоја неурона: улазни слој, који се састоји од једног неурона за сваку променљиву и дводимензионални излазни слој, који се састоји од хексагоналних неурона. Улазни слој је потпуно повезан са дводимензионалним слојем (Kiang, 2001). Број неурона у улазном слоју (број анализираних променљивих) се разликовао у зависности од потреба истраживања. У основи, самоорганизујуће мапе су организоване тако да су сви неурони у мрежи у директној вези са улазним подацима. За сваку малу акумулацију појединачно улазну матрицу су чиниле просечне вредности физичких и хемијских параметара воде за сваки испитивани локалитет. Сваки неурон носи специфичан модел података. У случају овог истраживања то су места за узорковање са сличним моделом квалитета воде. Повећање међусобне удаљености између неурона у излазној мрежи је у складу са разликама у моделима које носе неурони (Milošević and cap., 2013).

Унос података за сваку акумулацију посебно је спроведен у виду улазне матрице, самим тим је за ову студију било потребно конструисати три улазне матрице за сваку малу акумулацију. Свака улазна матрица је састављена од 93 реда (укупан број узорака прикупљених за период јун 2012 – децембар 2014) и 12 измерених физичких и хемијских параметара (колона). По спроведеном поступку уноса података из улазне матрице у COM започиње процес тренирања мреже, који се спроводи кроз секвенцијално укључивање сваког улазног вектора у COM. Када се улазни вектор (x) пропусти кроз мрежу, долази до пресликавања у одређени неурон излазне мреже рачунањем сличности између улазног (x) и излазног вектора (w). Излазни слој је формиран у облику дводимензионалне решетке коју граде хексагонални неурони (Слика 14). Улазни подаци сличних узорака формирају

неуроне који су физички близу један другом у излазном слоју (Gulson и сар., 2007). То значи да ће слични узорци бити постављени близу једни других у крајњој мапи, док ће различити узорци бити удаљени једни од других (Vesanto и сар., 2000). Узорци позиционирани у непосредној близини и са малим растојањем на хексагоналном саћу представљају кластере. На тренираној SOM мапи коришћена је "k-mean" метода како би се формирале групе сличних неурона (Jain и Dubes, 1988).



Слика 14. Структура самоорганизујућих мапа. Тачке представљају променљиве неуроне улазног слоја. Линеје представљају векторе, који се сликају у излазни слој неурона (модификовано из Jankowski и Amanowicz, 2015)

Током поступка SOM анализе, а за што поузданији резултат, најважније је правилно одредити резолуцију мреже. Како би се избегао велики број празних излазних неурона, уколико је мрежа сувише велика или пак када је мрежа мала, проблем губитка података решен је коришћењем две препоручене методе (Vesanto и сар., 2000; Park и сар., 2003). Vesanto и сар., (2000) су израчунали да је оптималан број неурона на SOM мапи $5\sqrt{n}$, где је n број тренинг узорака. Друга метода за формирање оптималне решетке узима у обзир локални минимум квантизационе (QE) и топологизационе грешке (TE) (Park и сар., 2003). Употребом обе методе упоредо, а са циљем да се избегне велики број празних неурона (Penczak и сар., 2012), у овој студији је одређена оптимална величина мреже 7×6 неурона.

Непараметарски ANOVA тест (Kruskal-Wallis test) коришћен је за проверу да ли су активне варијабле варирале између група неурона. Mann-Whitney-ев тест је извршио поређење између сваке две групе понаособ. Како би се што јасније представила веза између биотичких параметара и СОМ мреже употребљена је визуализациона техника компонентних графикона (енг. *component planes*). На већ тренираној СОМ мапи, пасивно су укључени биотички параметри (вредност хлорофила *a*, укупна бројност фитопланктона и цијанобактерија и биомаса цијанобактерија), чиме се омогућава тестирање везе између срединских и биотичких параметара. Биотички параметри пасивно се уводе у СОМ, на тај начин се не утиче на претходне ординационе процесе засноване на абиотичким подацима (физички и хемијски параметри воде). Током овог процеса, средње вредности биотичких параметара израчунавају се за сваки неурон СОМ мреже, окупиран најмање једним улазним вектором (Park и сар., 2003). Компонентни графикони представљају дистрибутивни образац биотичких параметара на тренираној СОМ мрежи, омогућавајући визуелну корелацију између абиотичких и биотичких параметара. Ако дистрибуција биотичких параметара приказује јасан градијент на мапи, то значи да је овај биотички параметар у значајној корелацији са одређеним физичким и хемијским параметаром. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност, а плава најмању. Визуелна презентација сваког параметра улазне матрице помоћу компонентних графикона пружа додатне информације о односу између биомасе и бројности фитопланктонских цијанобактерије и сваког физичко-хемијског параметра воде. СОМ анализа је урађена у програму Matlab ver. 6.1.0.450 algorithm interface (<http://www.cis.hut.fi/projects/som-toolbox>).

3.11.2. Статистичка анализа података добијених приликом испитивања утицаја метанолског екстракта

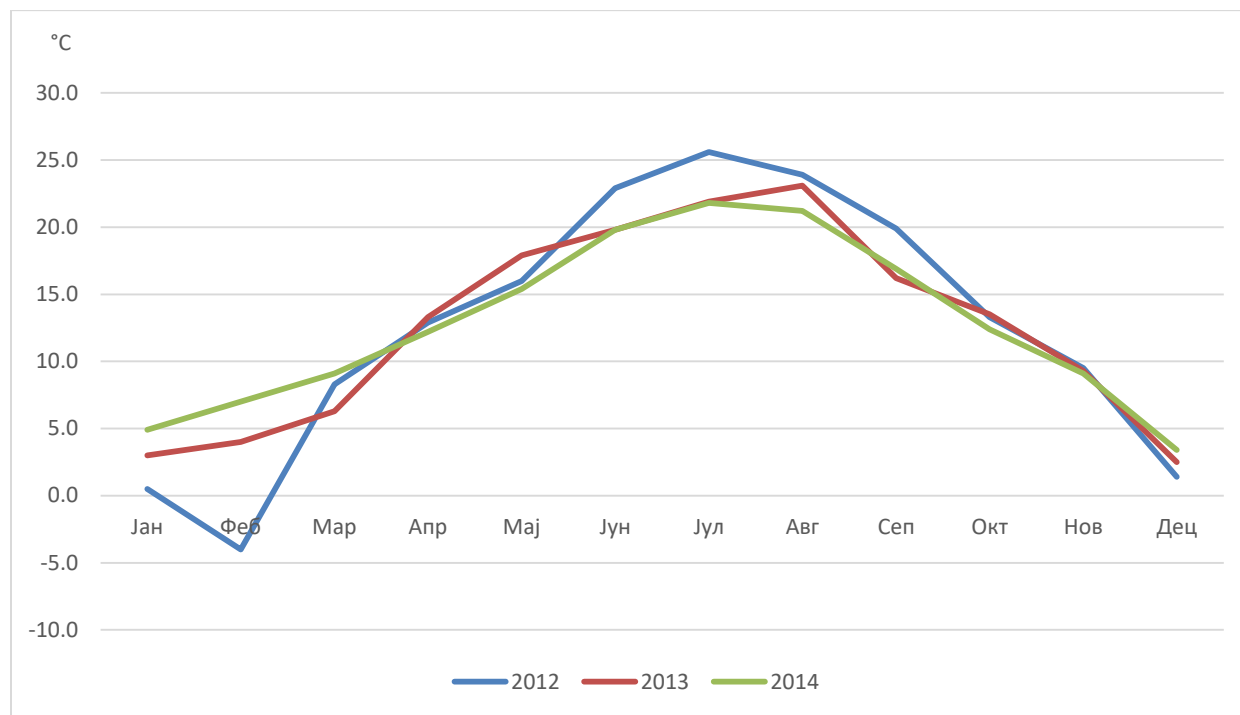
Подаци добијени приликом испитивања утицаја метанолског екстракта статистички су анализирани помоћу компјутерски софтверског програм SPSS-а верзија 13.0 за оперативни систем Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Разлике између експерименталних и контролних група одређене су употребом анализе варијансе (ANOVA тест). Помоћу Levene и Kolmogorov-Smirnov теста одређена је варијанца хомогености и дистрибуција података. Уколико варијанце нису биле хомогене, контролне и третиране групе поређене су помоћу T3 Dunnett-овог или Bonferroni-јевог теста. Резултати су сматрани статистички значајним за $p < 0.05$.

4. Резултати

4.1. Акумулација Шумарице

4.1.1. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године

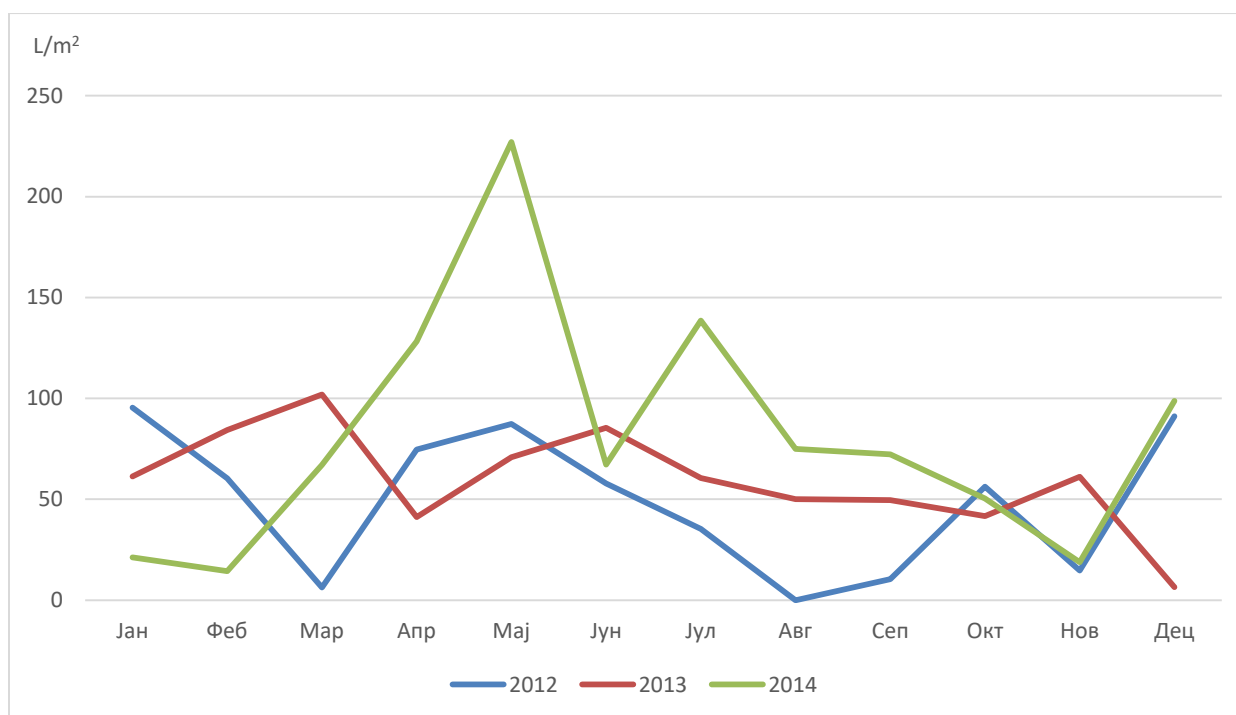
Највиша просечна месечна температура ваздуха на територији Крагујевца у току 2012. године измерена је у јулу месецу (25.6°C), а најнижа у фебруару (-4°C) (Слика 15). Просечна годишња температура ваздуха у 2012. години је износила 12.5°C . Током 2013. године просечне месечне температуре ваздуха биле су у распону од 23.1°C (август) до 2.5°C (децембар), док је средња годишња била 12.6°C . У Крагујевцу је током 2014. године максимална средња месечна температура ваздуха евидентирана у јулу (21.8°C), а најнижа у децембру (3.4°C). Просечна годишња температура ваздуха забележена током 2014. године је 12.8°C .



Слика 15. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године ($^{\circ}\text{C}$)

4.1.2. Укупна количина падавина по месецима на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године

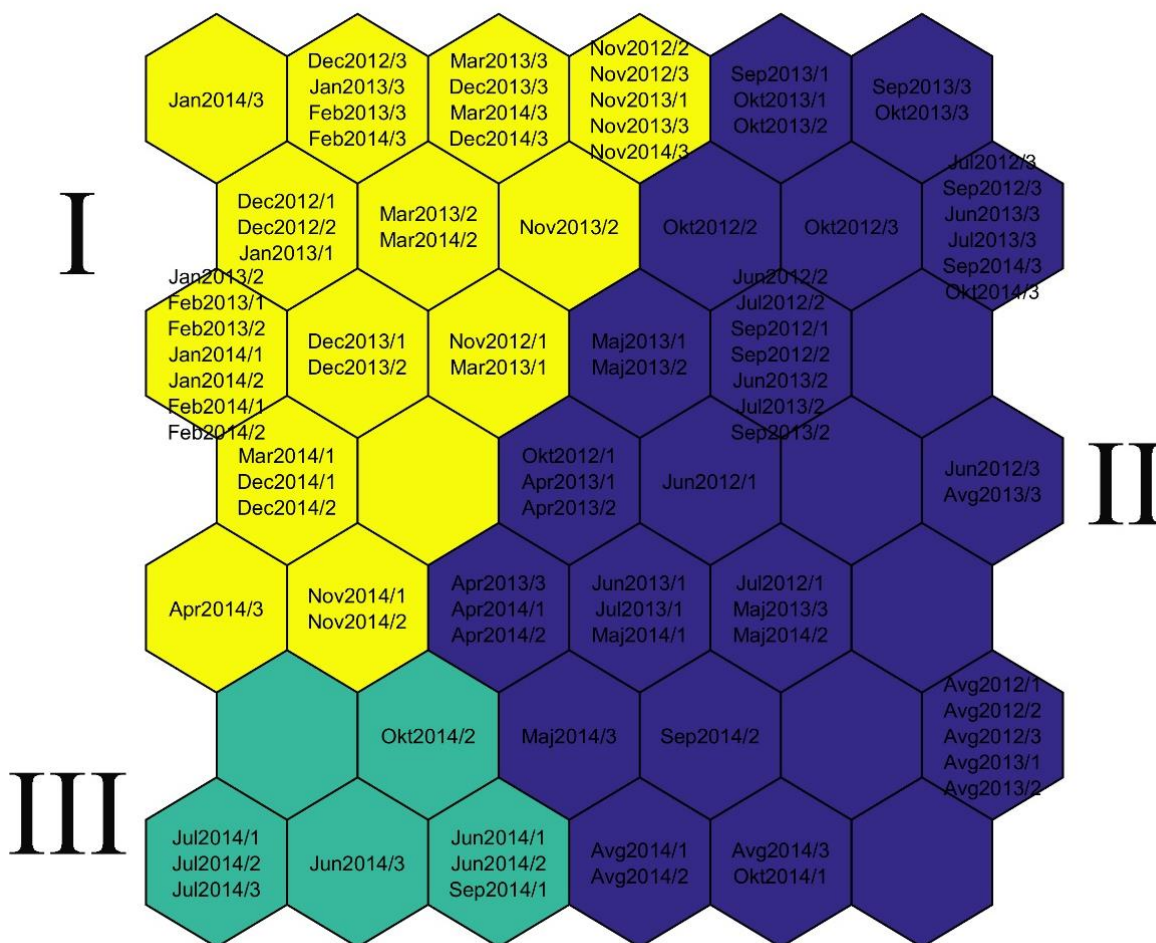
Укупна годишња количина падавина на територији Крагујевца (Слика 16) током 2012. године износила је 589.6 L/m^2 , највеће измерене вредности падавина су биле у јануару (95.4 L/m^2), док је август месец био без падавина. Током 2013. године годишња вредност количине падавина износила је 714.9 L/m^2 , највећа вредност падавина је измерена током фебруара (101.9 L/m^2), а најнижа у децембру месецу (6.4 L/m^2). Укупна годишња количина падавина евидентирана током 2014. године је 978.9 L/m^2 . Највећа вредност забележена је у мају месецу (227 L/m^2), док су најмање вредности биле у фебруару (14.4 L/m^2).



Слика 16. Укупна количина падавина по месецима на територији града Крагујевца у периоду од 2012. до 2014. године (L/m^2)

4.1.3. Просторна и временска дистрибуција физичких и хемијских параметара воде

Улазна матрица за СОМ анализу Шумаричке акумулације садржала је податке о измереним физичким и хемијским параметарима (укупно 12 параметара) из 93 узорка сакупљених приликом истраживања које је спроведено у периоду јун 2012. – децембар 2014. Према сличности измерених физичких и хемијских параметара Шумаричке акумулације, сви испитивани узорци распоређени су у неуроне дводимензионалне мреже (7 x 6) (Слика 17).

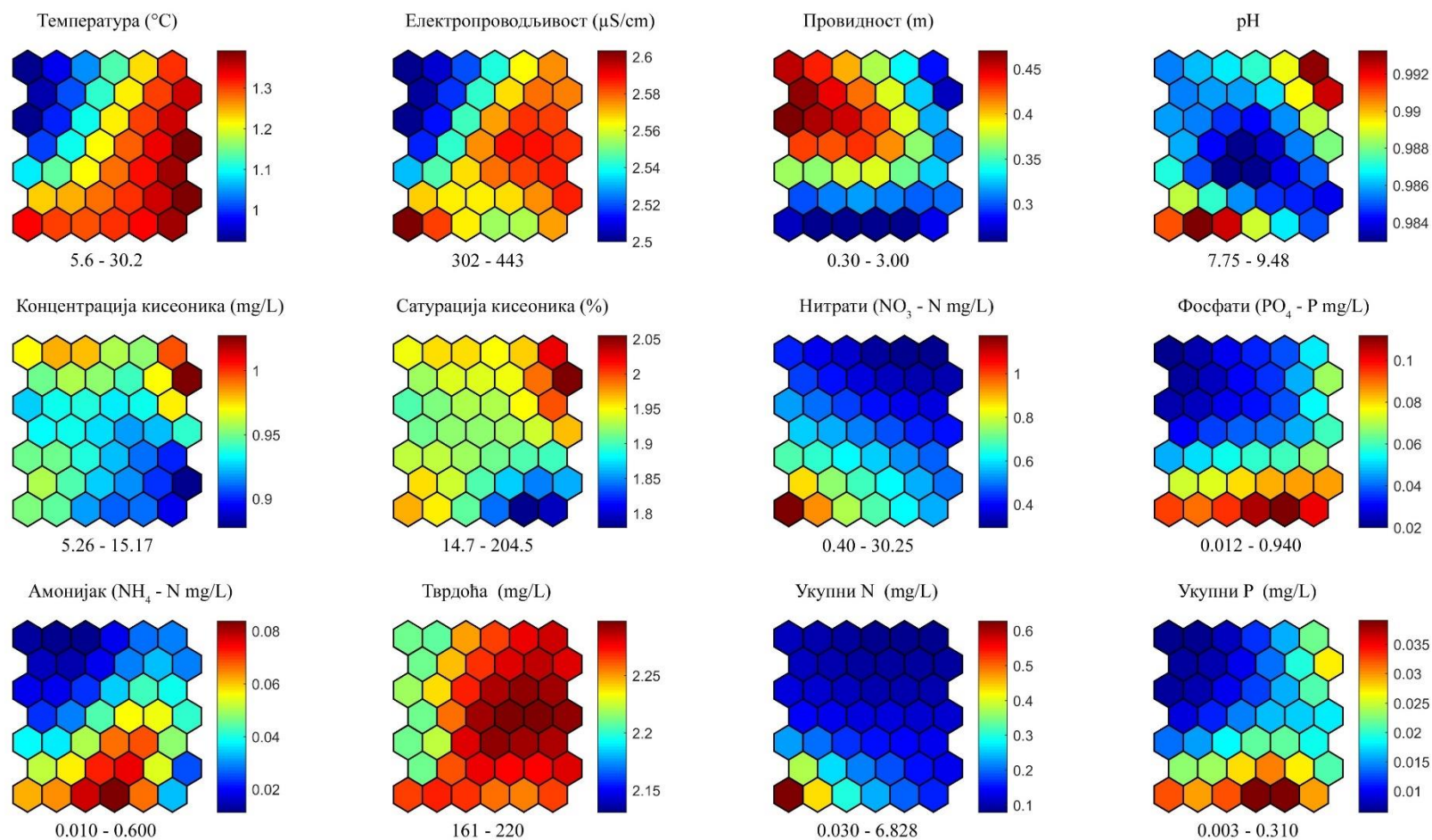


Слика 17. Ординација и класификација узорака базираних на физичким и хемијским параметрима акумулације Шумарице помоћу Самоорганизујућих мапа (СОМ). Различите боје означавају различите групе: I (жута), II (плава), III (зелена). Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете акумулације узорковане у различитом периоду (месец/година/локалитет). Локалитет 1. у близини бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа акумулације

СOM анализа је, на основу вредности измерених физичких и хемијских параметара, формирала 3 групе узорака: I (жута), II (плава), III (зелена) (Слика 17). На основу броја узорака по кластеру одређен је ниво класификације, довољан за даље статистичке анализе.

Од укупно 42 неурона излазне матрице (Слика 17) највише припада II групи, њих 23, I групи припада 14 и III групи припада само 5 неурона. Узорци прикупљени током зимског периода, али и они где је евидентирана ниска температура, распоређени су у горњем левом углу СOM мреже и формирали су I групу. Већина осталих узорака који су прикупљени током пролећа, лета и јесени (2012, 2013. и 2014. године) груписани су у десном делу мреже и формирали су II групу која је јако разнолика. Изузетак су узорци из 2014. године (јун, јул, септембар (локалитет 1) и октобар (локалитет 2)) који су груписани у доњем левом делу мреже и формирали су III групу.

СOM метода је такође визуелизовала и дистрибуцију вредности 12 физичких и хемијских параметара воде Шумаричке акумулације (Слика 18). На СOM мрежи вредности срединских параметара су се углавном мењале у правцу од горњег левог угла ка доњем десном углу. Температура је била најмања у горњем левом углу, одакле је расла према доњем десном углу, дуж успостављеног градијента. Дуж истог правца су се кретале и вредности за електропроводљивост, концентрацију фосфата, амонијака и укупног Р, али градијент није био јасно дефинисан. Са друге стране, вредности за концентрацију нитрата и укупног N су се мењале дуж истог смера, али у супротном правцу, такође формирајући јасан градијент. Остали мерени параметри на СOM мрежи нису показали уочљив градијент.



Слика 18. Визуализација дистрибуције 12 физичких и хемијских параметара акумулације Шумарице на претходно тренираној SOM мрежи (где је: NO₃-N – концентрација нитрата, PO₄-P – концентрација фосфата, NH₄-N – концентрација амонијака). Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност, а плава најмању

I група је представљена узорцима са ниском температуром воде, електропроводљивости, ниским минералним саставом и ниском концентрацијом амонијумовог јона, а са друге стране добро аерисаном водом високе провидности (Слика 18). Најнижа забележена температура у I групи је 5.6°C, а ова група има и минималну забележену вредност електропроводљивости (302 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Прву групу карактеришу и ниске вредности $\text{NO}_3\text{-N}$ (0.8 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.012 mg/L), NH_4 (0.01 mg/L) што је и потврђено компонентним графиконима (Слика 18). Садржај минералних соли у II групи је такође низак, али се примећује благи пораст, електропроводљивост је већа, док је концентрација кисеоника у благом паду у односу на I групу. Насупрот овим двама групама, III групу карактеришу изузетно високе вредности минералног састава ($\text{NO}_3\text{-N}$ (30.25 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.76 mg/L)) и ниска провидност воде (0.3 m). Максимална забележена вредност рН (9.48) припада неурону III групе (Слика 18).

Kruskall-Wallis ANOVA тест показао је да се сви мерени средински фактори статистички значајно разликују по групама, изузев рН вредности и сатурације (Табела 2). Како би се утврдило између којих група постоји значајна статистичка разлика за сваки средински параметар коришћен је Mann-Whitney тест.

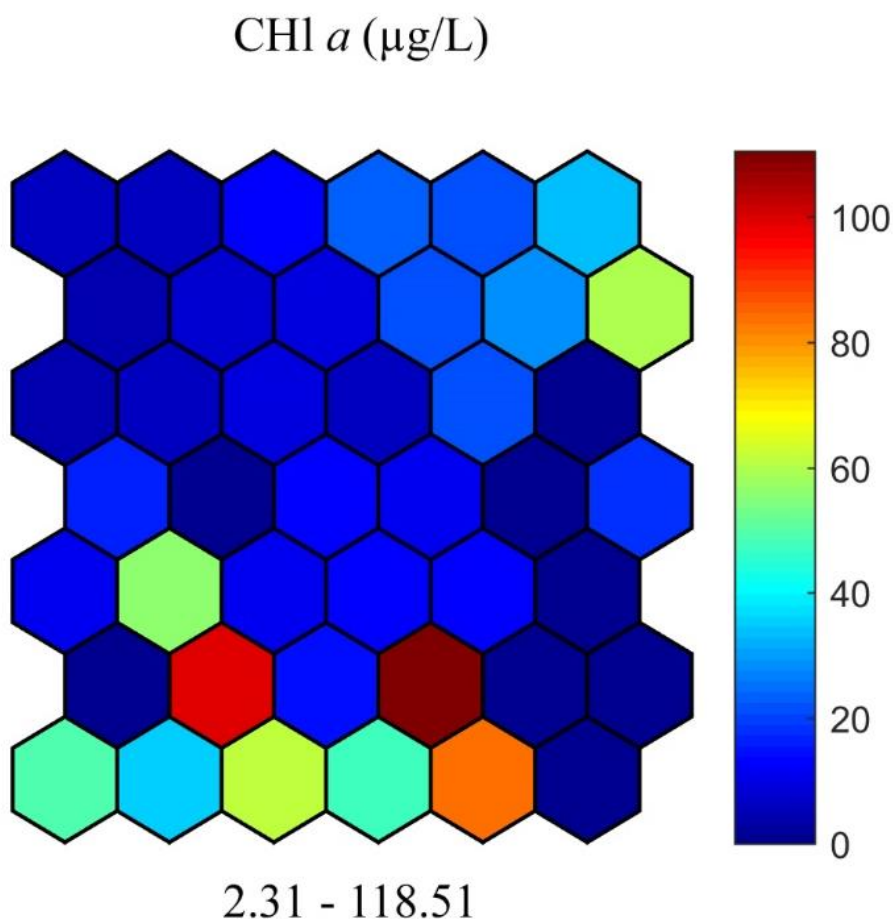
Табела 2. Средња вредност \pm стандардна девијација срединских параметара акумулације Шумарице по групама.

Средински параметри	Група		
	I	II	III
Температура ($^{\circ}\text{C}$)	9.09 \pm 2.398	20.35 \pm 4.400 ^a	20.26 \pm 3.360 ^a
Електропроводљивост ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	322.88 \pm 14.575	382.76 \pm 23.677 ^a	380.11 \pm 38.383 ^a
Провидност (m)	1.71 \pm 0.539	1.27 \pm 0.595	0.76 \pm 0.283
рН	8.69 \pm 0.073 ^a	8.68 \pm 0.227 ^a	8.85 \pm 0.351 ^a
Концентрација кисеоника (mg/L)	8.14 \pm 1.141 ^a	7.93 \pm 1.990 ^b	7.41 \pm 2.368 ^{ab}
Сатурација кисеоника %	85.48 \pm 11.023 ^a	89.14 \pm 26.963 ^a	87.53 \pm 30.358 ^a
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	1.930 \pm 0.8856 ^a	1.962 \pm 1.0520 ^a	11.692 \pm 11.1225
$\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/L)	0.066 \pm 0.0451	0.151 \pm 0.1596	0.290 \pm 0.1839
$\text{NH}_4\text{-P}$ (mg/L)	0.038 \pm 0.0490	0.109 \pm 0.1165	0.216 \pm 0.1567
Тврдоћа (mg/L)	168.65 \pm 36.885 ^a	194.70 \pm 11.9087 ^b	189.013 \pm 20.7090 ^{ab}
Укупни N (mg/L)	0.3085 \pm 0.1440 ^a	0.3222 \pm 0.1684 ^a	2.602 \pm 2.5410
Укупни P (mg/L)	0.019 \pm 0.0152	0.049 \pm 0.0553	0.0946 \pm 0.06128

Вредности које су у истом реду, а не деле исти суперскрипт, су статистички различите: ^{a,b} $p < 0.05$. Ако суперскрипт недостаје, све вредности су међусобно статистички значајно различите

4.1.4. Просторна и временска дистрибуција вредности концентрације хлорофила *a* на претходно тренираној СОМ мрежи

СОМ анализа, такође, има могућност да прикаже и дистрибуциони образац концентрације хлорофила *a* акумулације Шумарице на дводимензионалној мрежи. Оваква визуелизација дистрибуције концентрације хлорофила *a* по неуронима представљена је у виду компонентног графикана који је укључен у анализу појединачно (Слика 19). Овакав графикон даје податке и о вредностима, што је представљено градијентом боја који приказује интензитет параметра. На основу овог графикана, јасно се види издвајање неурона којима одговарају и највеће забележене вредности концентрације хлорофила *a* (Слика 19).

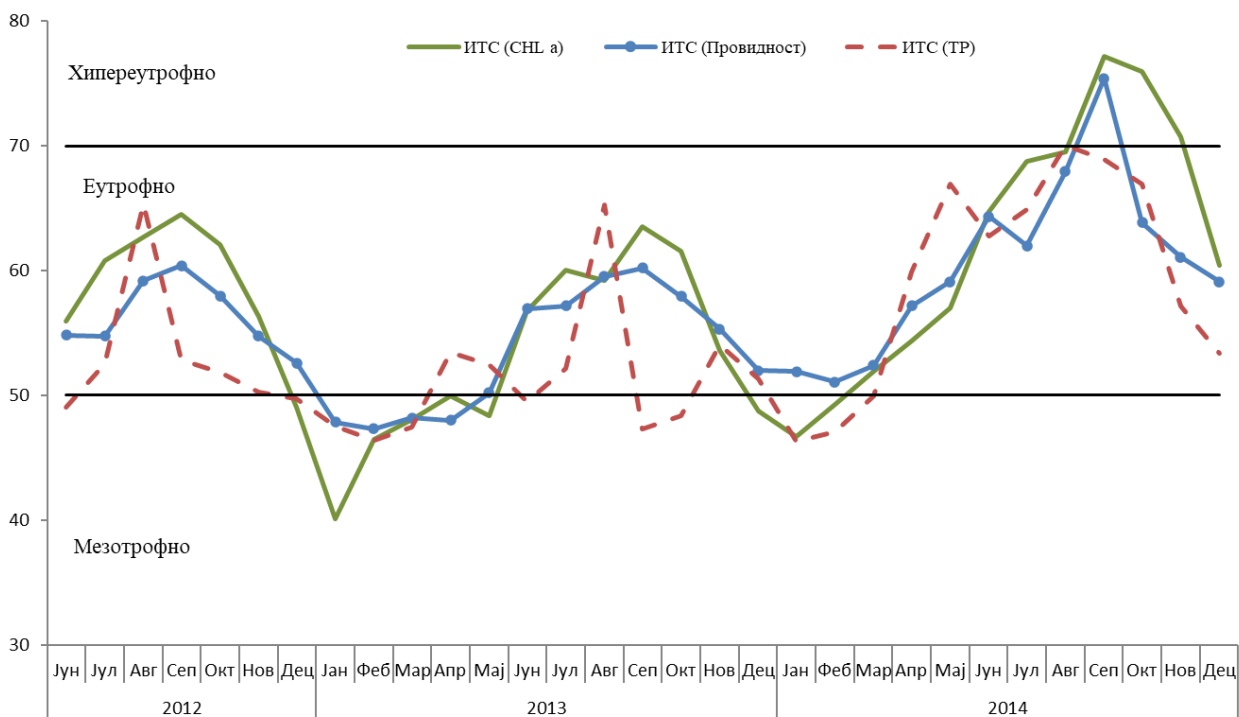


Слика 19. Визуелизација дистрибуције концентрације хлорофила *a* акумулације Шумарице на претходно тренираној СОМ мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметра, где црвена боја одговара највећој вредности, а плава најмањој

Вредности концентрације хлорофила *a* кретале су се од 2.31 $\mu\text{g/L}$ у јануару 2013. године на локалитету 1 до 118.51 $\mu\text{g/L}$ у септембру 2014. године на истом локалитету (Слика 19). Поред септембра 2014. године издвојили су се и неурони који бележе такође повишене вредности у односу на читав период истраживања, а то су неурони који одговарају узорковању које је спроведено у јуну, јулу, августу и октобру 2014. године.

4.1.5. Трофички статус акумулације Шумарице

Према средњим годишњим вредностима индекса трофичног стања израчунате на темељу провидности воде, концентрације хлорофила *a* и укупног фосфора, акумулација Шумарице је током летњег и јесењег периода 2012. и 2013. год. имала еутрофан статус (Слика 20). У зимском периоду 2013. године, а на основу сва три параметра, јасно се види тенденција ка мезотрофном статусу. Током 2014. године је на основу сва 3 параметра видљив прелазак из еутрофног статуса у хипереутрофан, изузев почетка године када је имала тендецију ка мезотрофном статусу.



Слика 20. Месечне вредности индекса трофичног стања (ИТС) акумулације Шумарице израчунате на темељу провидности воде, концентрације укупног фосфора и хлорофила *a*

4.1.6. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктонских цијанобактерија

Прегледом узорака фитопланктона са свих локалитета, током целог периода истраживања у акумулацији Шумарице је забележено присуство укупно 13 таксона планктонских цијанобактерија. Комплетан списак идентификованих таксона цијанобактерија обједињен за сва три локалитета је представљен у Табели 3, где је прецизирано у ком периоду је одређени таксон забележен.

У акумулацији Шумарице, током 2012. године у оквиру фитопланктонских Суанобактерија идентификовано је укупно 11 таксона (Табела 3). Уочава се повећање броја забележених таксона током летњих месеци (7 таксона), док је њихов број у јесењем и зимском периоду знатно смањен (2-1 таксона). Најучесталије врсте у 2012. години су *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing и *Limnococcus limneticus* (Lemmermann) Komárková et al.

Анализом узорака из 2013. године у акумулацији Шумарице је идентификовано 11 таксона фитопланктонских Суанобактерија. Оне нису детектоване у јануару, фебруару и марту месецу 2013. године (Табела 3). Почетком априла у акумулацији се појављују *Chrysoosporum bergii* (Ostenfeld) Zapomelova et al. и *Oscillatoria* sp. Највеће богатство Суанобактерија је забележено у летњим и касно летњим месецима 2013. године: *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault, *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, *Chrysoosporum minus* (Kiselev) Komárek, *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usachev) Rajaniemi et al, *Limnococcus limneticus*, *Microcystis aeruginosa*, *Snowella lacustris* (Chodat) Komárek & Hindák (Табела 3).

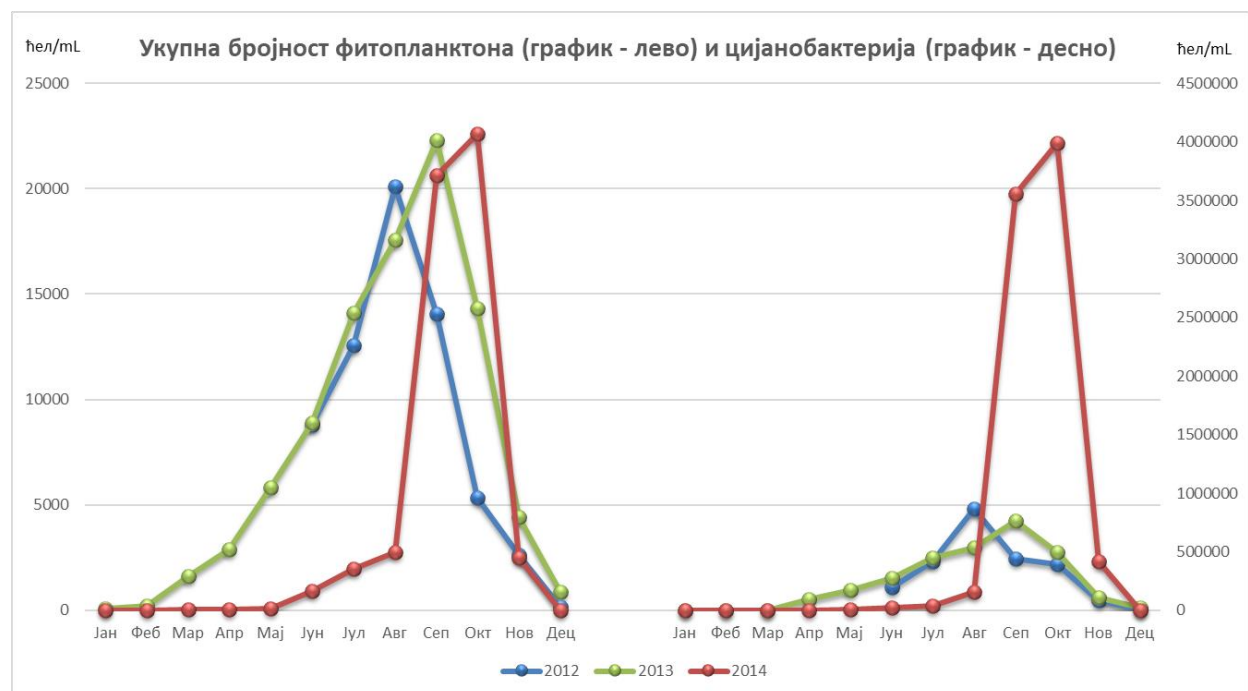
Током 2014. године, фитопланктонске Суанобактерија су биле представљене са 10 таксона (Табела 3). Нису детектоване у јануару и фебруару, али је у пролећним и летњим месецима њихова разноврсност била највећа: *Chrysoosporum minus*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Limnococcus limneticus*, *Merismopedia* sp., *Pseudanabaena limnetica* (Lemmermann) Komárek, *Oscillatoria tenuis* C. Agardh ex Gomont, *Snowella lacustris* (Табела 3).

Табела 3. Састав фитопланктонских цијанобактерија у акумулацији Шумарице у периоду јун 2012. – децембар 2014. године

Година истраживања		2012/ 2013/ 2014											
Врста	Месец	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
<i>Chrysoosporum bergii</i> (Ostenfeld) Zapomelova et al.		-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Chrysoosporum minus</i> (Kiselev) Komárek		-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> (Usachev) Rajaniemi et al.		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/-	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Limnococcus limneticus</i> (Lemmermann) Komárková et al.		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/-	+/+	-/-	+/-	-/+	+/+
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
<i>Merismopedia</i> sp. Meyen		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/-	-/-	-/-
<i>Oscillatoria tenuis</i> C. Agardh ex Gomont		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-
<i>Oscillatoria</i> sp. Vaucher ex Gomont		-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>Pseudanabaena limnetica</i> (Lemmermann) Komárek		-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Snowella lacustris</i> (Chodat) Komárek & Hindák		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-

+ таксон присутан у узорку; - таксон није присутан у узорку

Детаљан приказ и однос између укупне бројности фитопланктона (средње месечне вредности за сва три локалитета) и фитопланктонских цијанобактерија (средње месечне вредности за сва три локалитета) приказан је на Слици 21.



Слика 21. Сезонска динамика укупне бројности фитопланктона и бројности цијанобактерија током периода истраживања акумулације Шумарице. Примарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) током 2012. и 2013. године. Секундарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) у 2014. години

Током 2012. бројност заједнице фитопланктона била је у распону 160 - 20 103 ћел/мL. Највећа бројност ћелија (20 103 ћел/мL) уочава се у августу месецу, док је најнижа била у децембру месецу (160 ћел/мL) (Слика 21). Бројност фитопланктонских цијанобактерија кретала се од минималне забележене у децембру (43 ћел/мL) до максимално забележене у августу месецу (4 800 ћел/мL). Од укупне бројности фитопланктона, заједница цијанобактерија бележи највећи удео током октобра месеца (40.8%).

Највећа забележена вредност абунданце фитопланктона у истраживању спроведеном током 2013. године била је у септембру и износила је 22 318 ћел/мL, а најмања у јануару месецу (70 ћел/мL). Бројност цијанобактерија прати тренд раста укупне абунданце фитопланктона и бележи максималне вредности у септембру (4 223 ћел/мL), док је највећи процентуални цијанобактеријски удео у фитопланктону био у октобру месецу (19.3%).

Анализом резултата током 2014. године уочава се да су се вредности абунданце фитопланктона кретале од 83 ћел/мL у јануару до 4 066 667 ћел/мL у октобру, са цијанобактеријским уделом од 98%. Управо је током истраживања у 2014. години забележен и највећи тренд раста абунданце који почиње од јуна месеца.

Од септембра до децембра месеца 2014. године у акумулацији Шумарице забележено је присуство само једне врсте *Cyanobacteria* – *Aphanizomenon flos-aquae*. Ова

врста је изазвала цветање воде и формирала је зелени биофилм на површини акумулације (Слике 22 и 23). Апсолутна доминација ове цијанобактеријске врсте у акумулацији Шумарице довела је до потискивања осталих врста фитопланктонске заједнице.



Слика 22. Цветање врсте *Aphanizomenon flos-aquae* у акумулацији Шумарице (Фото С. Симић – октобар 2014. године)



Слика 23. *Aphanizomenon flos-aquae* у акумулацији Шумарице (бар скала 10 μm) (Фото Н. Ђорђевић – октобар 2014. године)

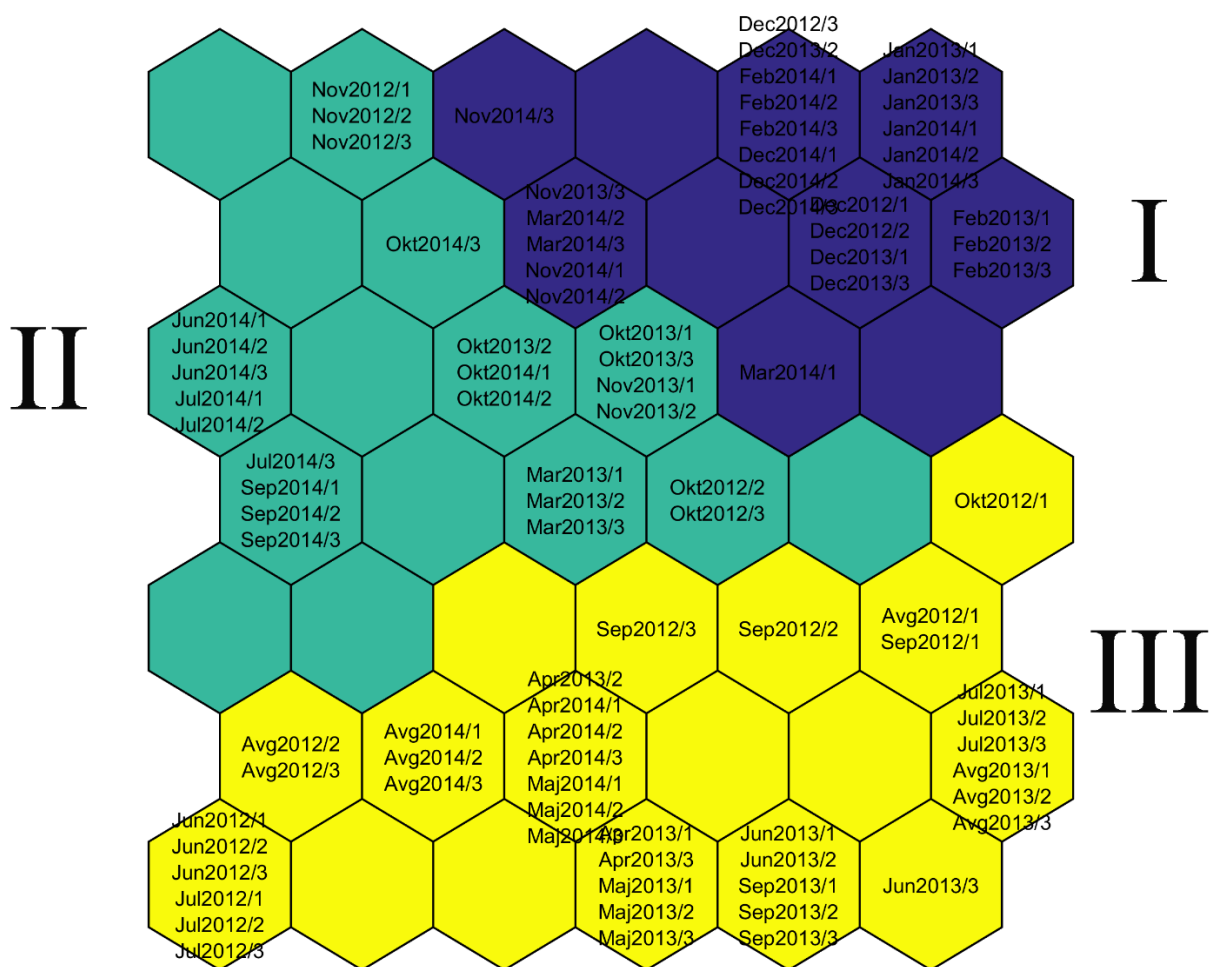
4.1.7. Резултати присуства цијанотоксина у води акумулације Шумарице

Анализама HPLC-PDA воде из акумулације Шумарице узорковане на три локалитета током мониторинга спроведеног у периоду јуна 2012. године до децембра 2014. године, нису детектовани испитивани цијанотоксини: микроцистини, цилиндроспермопсин, анатоксин и сакситоксин.

4.2. Акумулација Бубањ

4.2.1. Просторна и временска дистрибуција физичких и хемијских параметара воде

СОМ анализа је, на основу вредности измерених физичких и хемијских параметара (укупно 12 параметара) акумулације Бубањ из укупно 93 узорка сакупљених приликом истраживања које је спроведено у периоду јун 2012. – децембар 2014. године, формирала 3 групе: I (плава), II (зелена), III (жута) (Слика 24). Према сличности параметара акумулације Бубањ, сви испитивани узорци распоређени су у неуроне дводимензионалне мреже (7 x 6) (Слика 24).



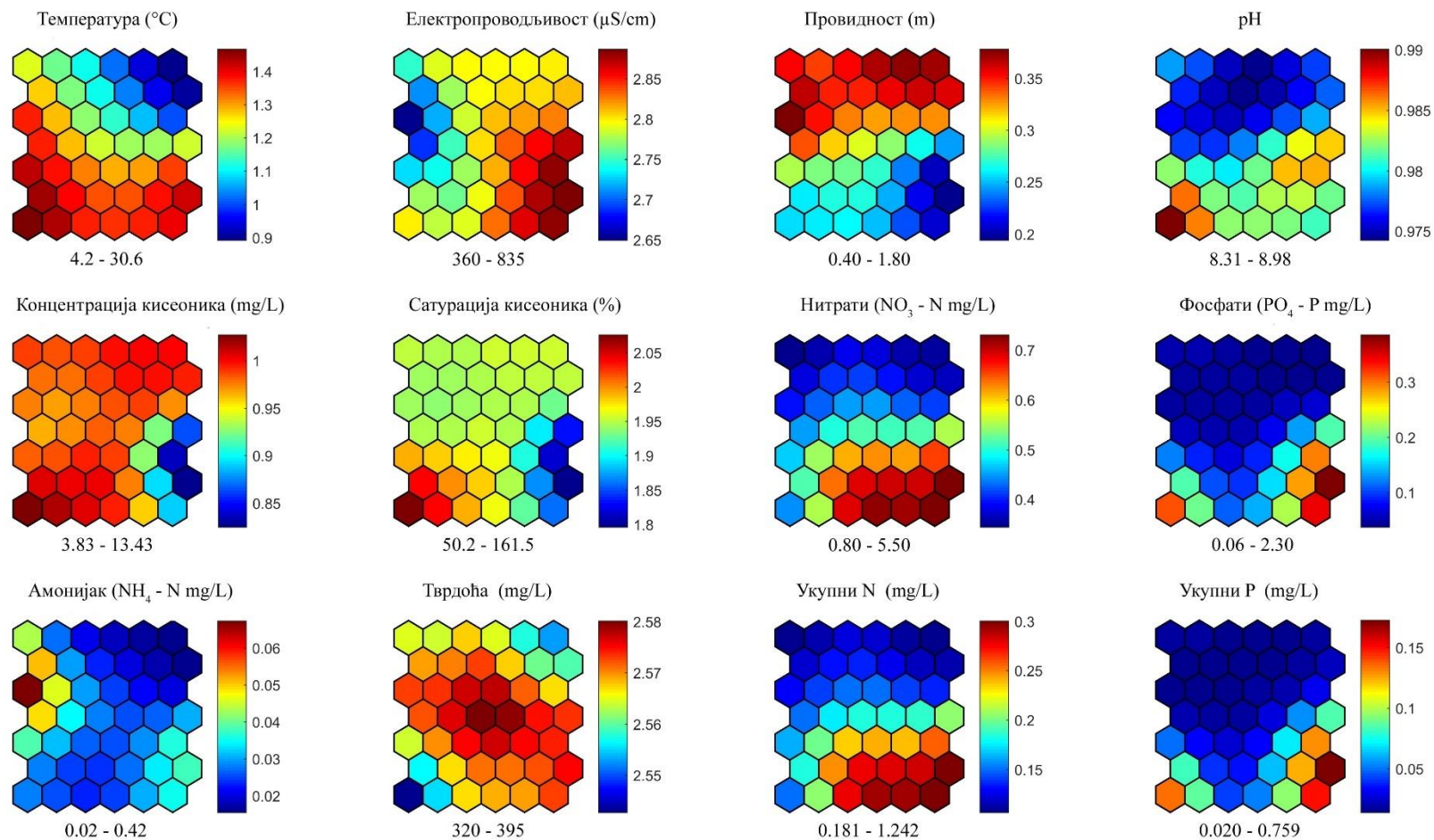
Слика 24. Ординација и класификација локалитета базираних на физичким и хемијским параметрима акумулације Бубањ помоћу Самоорганизујућих мапа (СОМ). Различите боје означавају различите групе. Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете акумулације узорковане у различитом периоду (месец/година/локалитет). 1. локалитет (аутопут); 2. средина акумулације; 3. локалитет (у непосредној близини оскудне шумске вегетације)

Ниво класификације одређен је на основу броја узорака по кластеру довољан за даље статистичке анализе. Излазна матрица је формирана од укупно 42 неурона, са највећим бројем неурона који припадају III групи и то њих 17, II групи припада њих 15 и најмање њих припада I групи, укупно 10 неурона (Слика 24). I група је униформна и њу су искључиво формирали узорци из зимских месеци. Слична је ситуација и код II групе с тим што су се у оквиру ове групе на мрежи издвојили узорци који су сакупљени током јесењег периода, марта 2013. године, јуна, јула и септембра 2014. године, а који су груписани у левом делу мреже у оквиру ове групе. Поред поменутих издвојених неурона, III групу су формирали и узорци прикупљени током истраживања које је спроведено током пролећа и лета.

За визуелизацију и дистрибуцију вредности 12 физичких и хемијских параметара акумулације Бубањ такође је искоришћена SOM метода и на формираној SOM мрежи већина параметара није имала успостављен градијент (Слика 25). Параметри код којих је јасно успостављен градијент су температура и провидност. Температура је била најмања у горњем десном углу одакле је опадала ка доњем левом углу, дуж успостављеног градијента. Када је провидност у питању градијент је текао од горњег дела неурона ка доњем делу.

Уколико упоредимо групе које је SOM анализа формирала и вредности физичких и хемијских параметара акумулације Бубањ, узорци са ниском температуром воде (4.2°C), добро аерисаном водом (9.47 mg/L), високе провидности (1.8 m), ниским минералним саставом ($\text{NO}_3\text{-N}$ (0.9 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.06 mg/L)) и ниском концентрацијом амонијумовог јона NH_4 (0.02 mg/L) распоређени су у горњем десном делу мреже и формирали су I групу (Слика 25). Са друге стране, III групу карактеришу узорци са високом температуром (30.6°C), високим минералним саставом ($\text{NO}_3\text{-N}$ (5.5 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (2.3 mg/L)), високом концентрацијом амонијумовог јона NH_4 (0.3 mg/L), изузетно ниском провидности воде (0.4 m), али је то и вода сиромашна кисеоником (3.83 mg/L). Максимална забележена вредност pH (8.98) припада неурону III групе.

Насупрот овим униформним групама, у оквиру II групе на SOM мрежи се уочавају неурони који се издвајају и бележе температуру у распону $12.3\text{-}26.3^{\circ}\text{C}$, електропроводљивост $360\text{-}820\text{ }\mu\text{S/cm}$, низак минерални састав ($\text{NO}_3\text{-N}$ (0.8 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.06 mg/L)), високу провидност (1.6 m), али повишене концентрације амонијумовог јона NH_4 (0.42 mg/L) (Слика 25).



Слика 25. Визуализација дистрибуције 12 физичких и хемијских параметара акумулације Бубањ на претходно тренираној SOM мрежи (где је: NO₃-N – концентрација нитрата, PO₄-P – концентрација фосфата, NH₄-N – концентрација амонијака). Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању

Једнофакторска ANOVA је приказала да се 11 срединских параметара акумулације Бубањ статистички значајно разликују по групама изузев сатурације кисеоником (Табела 4). За сваки средински параметар коришћен је MannWhitney тест, како би се утврдило између којих група постоји значајна статистичка разлика.

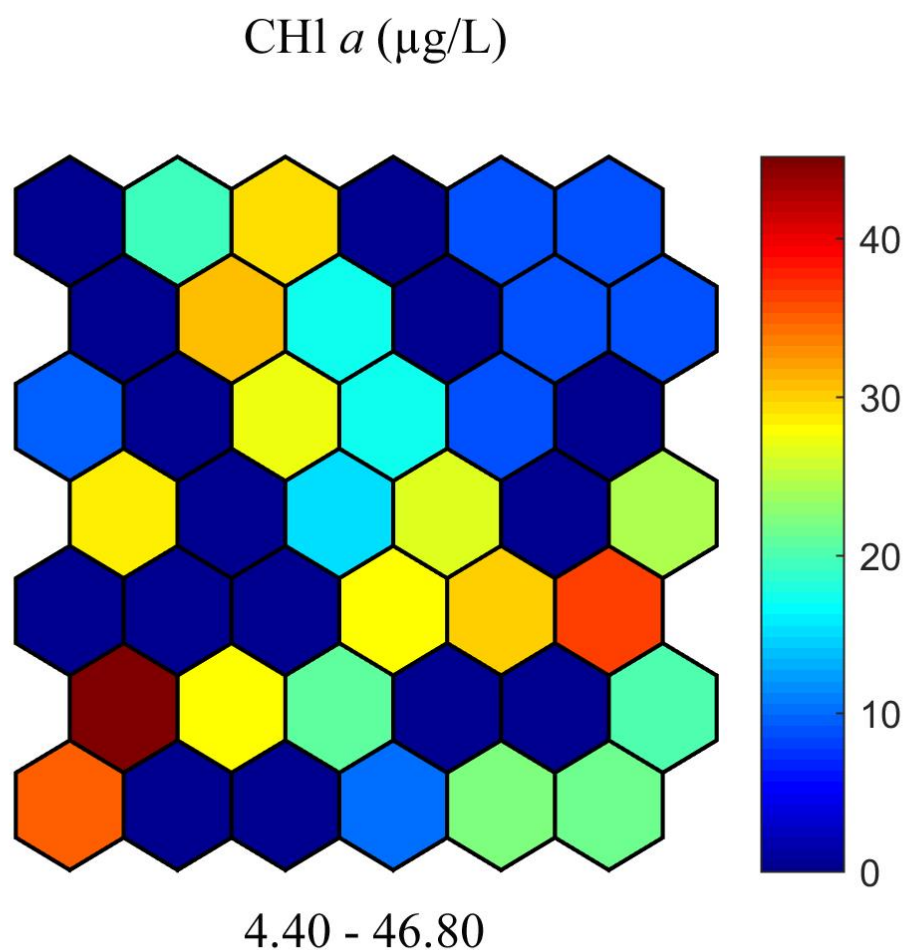
Табела 4. Средња вредност ± стандардна девијација срединских параметара акумулације Бубањ по групама.

Средински параметри	Група		
	I	II	III
Температура (°C)	17.70 ± 5.51	8.27 ± 2.38	24.18 ± 4.22
Електропроводљивост (µs/cm)	583.27 ± 133.85 ^a	627.28 ± 32.76 ^a	688.52 ± 110.42
Провидност (m)	1.16 ± 0.30	1.35 ± 0.15	0.73 ± 0.20
pH	8.48 ± 0.14 ^a	8.45 ± 0.15 ^a	8.64 ± 0.205
Концентрација кисеоника (mg/L)	8.45 ± 0.73 ^a	9.02 ± 0.26	8.23 ± 2.23 ^a
Сатурација кисеоника %	87.01 ± 5.68 ^a	89.45 ± 2.68 ^a	90.12 ± 25.54 ^a
NO ₃ -N (mg/L)	1.748 ± 0.5001	1.330 ± 0.1978	3.680 ± 1.3151
PO ₄ -P (mg/L)	0.109 ± 0.0296	0.093 ± 0.0219	0.821 ± 0.7215
NH ₄ -P (mg/L)	0.104 ± 0.1079 ^a	0.037 ± 0.0183	0.070 ± 0.0587 ^a
Тврдоћа (mg/L)	375.80 ± 13.12 ^a	362.57 ± 18.83 ^b	367.35 ± 17.49 ^{ab}
Укупни N (mg/L)	0.394 ± 0.1128	0.300 ± 0.4465	0.830 ± 0.2969
Укупни P (mg/L)	0.036 ± 0.0097 ^a	0.040 ± 0.0508 ^a	0.271 ± 0.2381

Вредности које су у истом реду не деле исти суперскрипт су статистички различите: ^{a,b} p<0.05. Ако суперскрипт недостаје, све вредности су међусобно статистички значајно различите

4.2.2. Просторна и временска дистрибуција вредности концентрације хлорофила a на претходно тренираној СОМ мрежи

Уз помоћ СОМ анализе приказан је и дистрибуциони образац вредности концентрације хлорофила a акумулације Бубањ на дводимензионалној мрежи. Визуелизација дистрибуције концентрације хлорофила a представљена је у виду компонентног графикана који је укључен у анализу појединачно (Слика 26).



Слика 26. Визуелизација дистрибуције концентрације хлорофил a акумулације Бубањ на претходно тренираној СОМ мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању

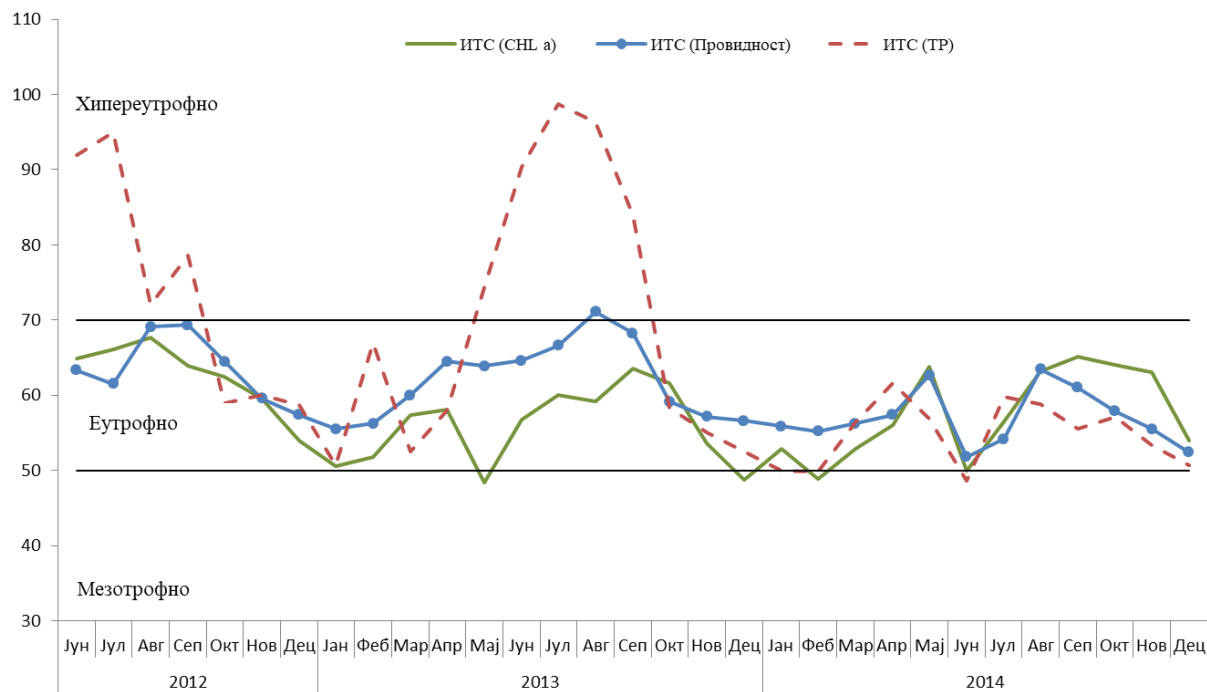
Компонентни графикон даје податке о вредности концентрације хлорофила *a* акумулације Бубањ, што је представљено градијентом боја који приказује интензитет параметра. На основу графикона, јасно се види издвајање неурона којима одговарају и највеће забележене вредности овог биотичког параметра, односно најмање (Слика 26).

У случају акумулације Бубањ вредности концентрације хлорофила *a* кретале су се од 4.40 µg/L у децембру 2013. године (локалитет 1) до 46.8 µg/L у августу 2012. године на локалитету 3 (Слика 26). Током 2014. године вредности концентрације хлорофила *a* биле су у распону од 6.14 µg/L (фебруар – локалитет 2) до 34.6 µg/L (септембар – локалитет 2).

Поред августа 2012. године, издвојили су се неурони који бележе, такође, повишене вредности у односу на читав период истраживања, а то су неурони који одговарају узорковању које је спроведено у јуну, јулу и септембру 2012. године.

4.2.3. Трофички статус акумулације Бубањ

Према средњим годишњим вредностима индекса трофичног стања израчунатих на темељу провидности воде и концентрације хлорофила *a*, акумулација Бубањ је током 2012. и 2013. године имала еутрофан статус, док је према вредностима концентрације укупног фосфора у летњим месецима имала тенденцију ка хипереутрофном стању (Слика 27). У 2014. години је на основу сва 3 параметра била еутрофна, изузев зимског периода и јуна месеца када је имала тенденцију ка мезотрофном статусу.



Слика 27. Месечне вредности индекса трофичног стања (ИТС) акумулације Бубањ израчунате на темељу провидности воде, концентрације укупног фосфора и хлорофила *a*

4.2.4. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктонских цијанобактерија

Анализом узорака фитопланктона са свих локалитета и током читавог периода истраживања у акумулацији Бубањ је забележено присуство укупно 15 таксона фитопланктонских цијанобактерија. Комплетан списак идентификованих таксона цијанобактерија обједињен за сва три локалитета је представљен у Табели 5, где је прецизирано у ком периоду је одређени таксон забележен.

У акумулацији Бубањ током 2012. године у оквиру фитопланктонских цијанобактерија идентификовано је укупно 11 таксона (Табела 5). Највећи број таксона идентификован је током летњих месеци (8-9), док број забележених таксона у јесењим (4), а посебно у зимским месецима (1), опада. Најфреквентније врсте акумулације Бубањ током истраживања у 2012. године су: *Woronichinia compacta* (Lemmermann) Komárek & Hindák, *Microcystis aeruginosa* и *Oscillatoria tenuis*.

Током истраживања у 2013. години укупан број забележених таксона фитопланктонских цијанобактерија је 13 (Табела 5). Приметно је повећање њиховог броја забележених таксона од пролећних (7-8) ка летњим месецима (10-11), док је број детектованих таксона у јесењим (7-8) и зимским (5) месецима смањен. Врсте *Microcystis aeruginosa* и *Oscillatoria tenuis* су забележене у свим месецима, изузев у јануару месецу када није забележен ни један цијанобактеријски таксон. Највеће богатство врста је било у августу и септембру месецу када су поред поменутих таксона биле присутне и следеће врсте: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chroococcus turgidus* (Kütz) Nag, *Chrysoosporum bergii* (Ostenfeld) Zapomelova et al., *Lyngbya* sp. (C. Agardh ex Gomont), *Merismopedia tenuissima* Lemmermann, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis wesenbergii* Komárek, *Oscillatoria limosa* C. Agardh ex Gomont, *Oscillatoria tenuis*, *Phormidium* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Woronichinia compacta*. Присуство врсте *Chrysoosporum bergii* и неке врсте из рода *Phormidium* је забележено само у 2013. години (Табела 5).

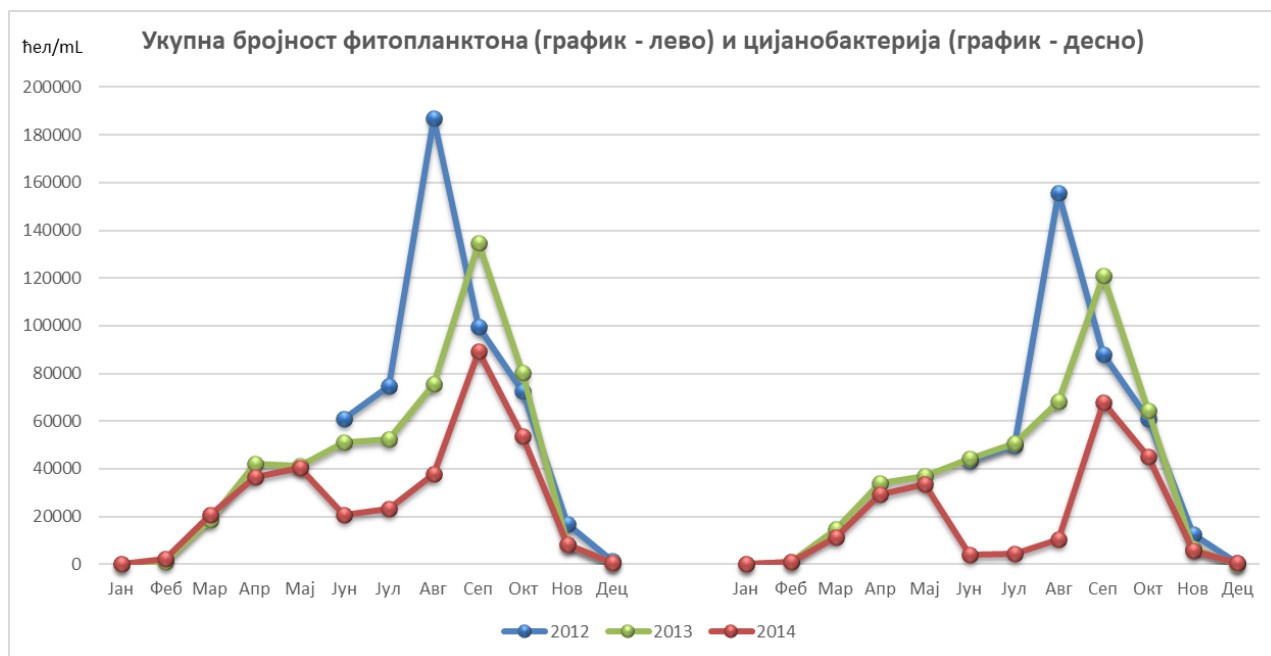
Анализом узорака из 2014. године у акумулацији Бубањ је идентификовано 12 таксона фитопланктонских цијанобактерија и једино нису биле присутне у узорцима из јануара месеца (Табела 5). У периоду од априла до новембра број присутних таксона је варирао од 7 до 9 и био прилично уједначен. Најфреквентније врсте у 2014. години акумулације Бубањ су: *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis aeruginosa* и *Oscillatoria tenuis*. Присуство врсте *Pseudanabaena limnetica* је забележено само током 2014. године (Табела 5).

Табела 5. Састав фитопланктонских цијанобактерија у акумулацији Бубањ у периоду јун 2012. – децембар 2014. године.

Година истраживања		2012/ 2013/ 2014											
Врста	Месец	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kütz) Nag		-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-
<i>Chrysoosporum bergii</i> (Ostenfeld) Zapomelova et al.		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-
<i>Gloeocapsa</i> sp. Kützing		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-
<i>Lyngbya</i> sp. C. Agardh ex Gomont		-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann		-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
<i>Merismopedia tranquilla</i> (Ehrenberg) Trevisan		-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing		-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+
<i>Microcystis wesenbergii</i> Komárek		-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
<i>Oscillatoria limosa</i> C.Agardh ex Gomont		-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-
<i>Oscillatoria tenuis</i> C. Agardh ex Gomont		-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+
<i>Phormidium</i> sp. Kützing ex Gomont		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Pseudanabaena limnetica</i> (Lemmermann) Komárek		-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
<i>Pseudanabaena</i> sp. Lauterborn		-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+
<i>Woronichinia compacta</i> (Lemmermann) Komárek & Hindák		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

+таксон присутан у узорку; - таксон није присутан у узорку

Детаљан приказ и однос између укупне бројности фитопланктона (средње месечне вредности за сва три локалитета) и фитопланктонских цијанобактерија (средње месечне вредности за сва три локалитета) приказан је на Слици 28.



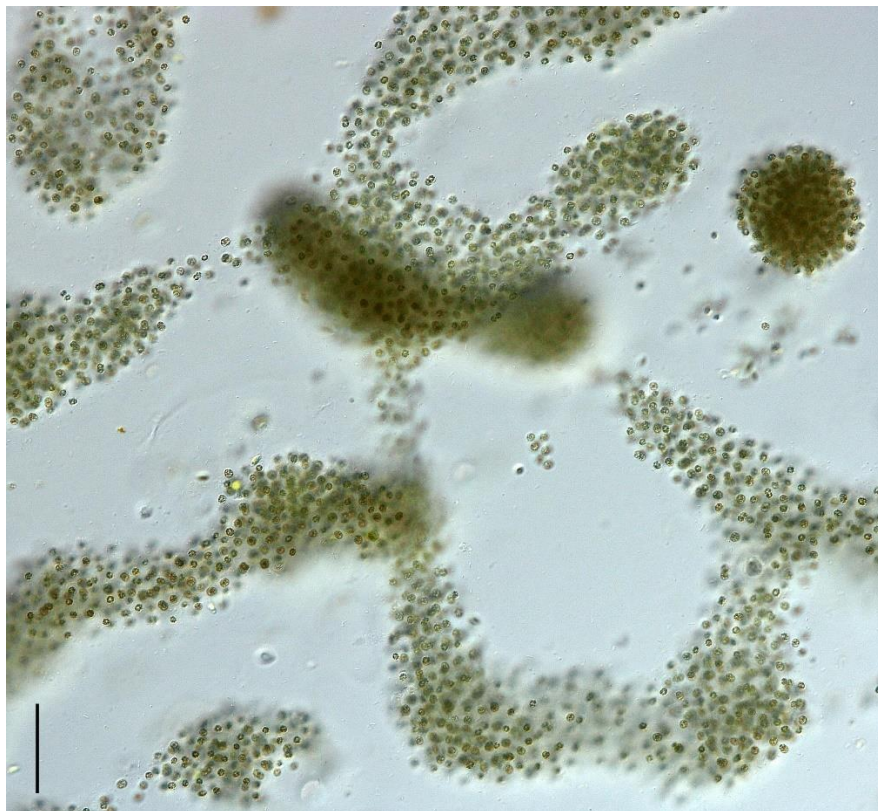
Слика 28. Сезонска динамика укупне бројности фитопланктона и укупне бројности цијанобактерија током периода истраживања акумулације Бубањ. Примарна у оса даје приказ бројности (ћел/мЛ) у периоду истраживања од јуна 2012. до децембра 2014. године

У истраживању које је спроведено током 2012. бројност заједнице фитопланктона била је у распону 1320 - 186 900 ћел/мЛ. Највећа бројност фитопланктона уочава се у августу месецу, док је најнижа била у децембру (Слика 28). Од укупне бројности фитопланктона, заједница цијанобактерија бележи највећи удео током августа месеца (86%).

Теренским истраживањем на акумулацији Бубањ током августа месеца 2012. године евидентирана је појава цветања (Слика 29). Анализом узорака је утврђено да је цијанобактеријска врста *Microcystis aeruginosa* (Слика 30) формирала зелени биофилм на површини акумулације.



Слика 29. Цветање врсте *Microcystis aeruginosa* у акумулацији Бубањ (Фото Н. Ђорђевић - август 2012. године)



Слика 30. *Microcystis aeruginosa* у акумулацији Бубањ (бар скала 50 μm) (Фото Н. Ђорђевић)

Највећа забележена вредност абунданце фитопланктона у истраживању спроведеном током 2013. године забележена је у септембру и износила је 134 515 ћел/mL, са цијанобактеријским уделом 90%.

Најниже вредности у бројности фитопланктона током читавог периода истраживања бележе се у 2014. години и варирају од 180 ћел/mL (јануар) до 89 217 ћел/mL (септембар). Од укупне бројности фитопланктона, заједница цијанобактерија бележи највећи удео током октобра месеца (84.2%). Током летњих месеци евидентан је пад вредности абунданце током јуна и јула 2014. године, али и процентуални удео цијанобактерија који је у јуну и јулу износио 18.7-19.24%.

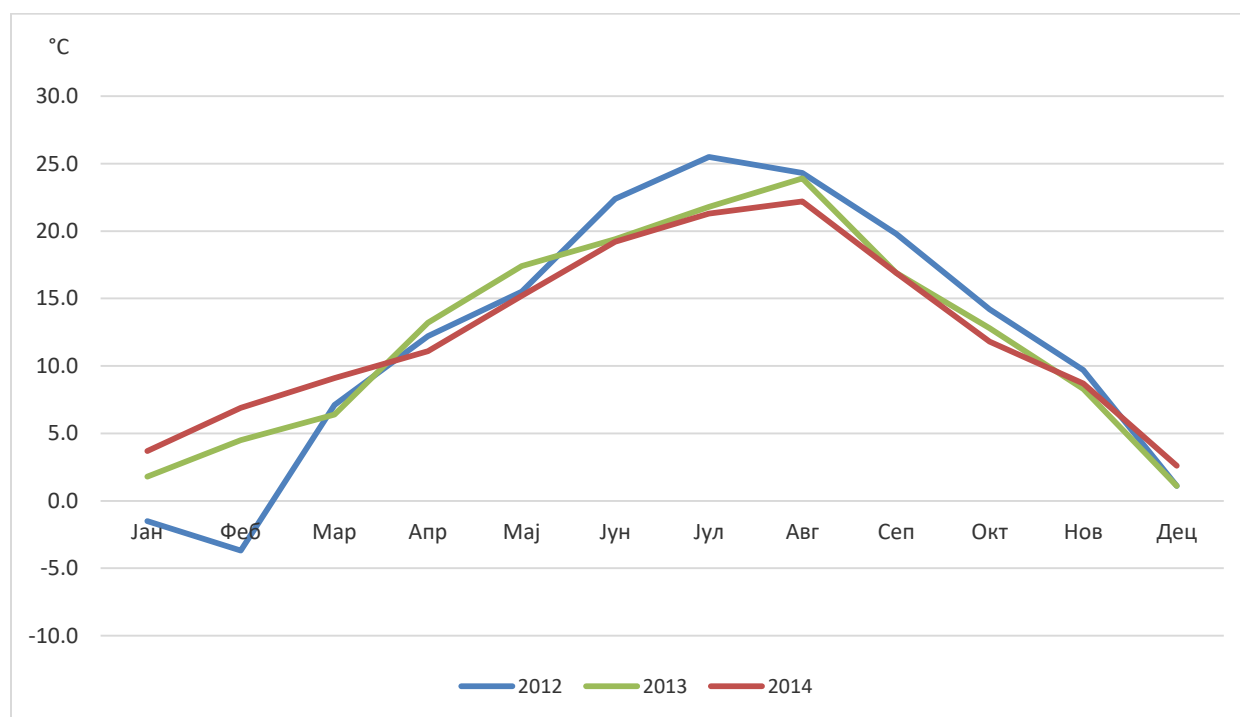
4.2.5. Резултати присуства цијанотоксина у води акумулације Бубањ

Анализама HPLC-PDA воде из акумулације Бубањ узорковане на три локалитета током мониторинга спроведеног у периоду од јуна 2012. до децембра 2014. године, нису детектовани испитивани цијанотоксини: микроцистини, цилиндроспермопсин, анатоксин и сакситоксин.

4.3. Александровачка акумулација

4.3.1. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године

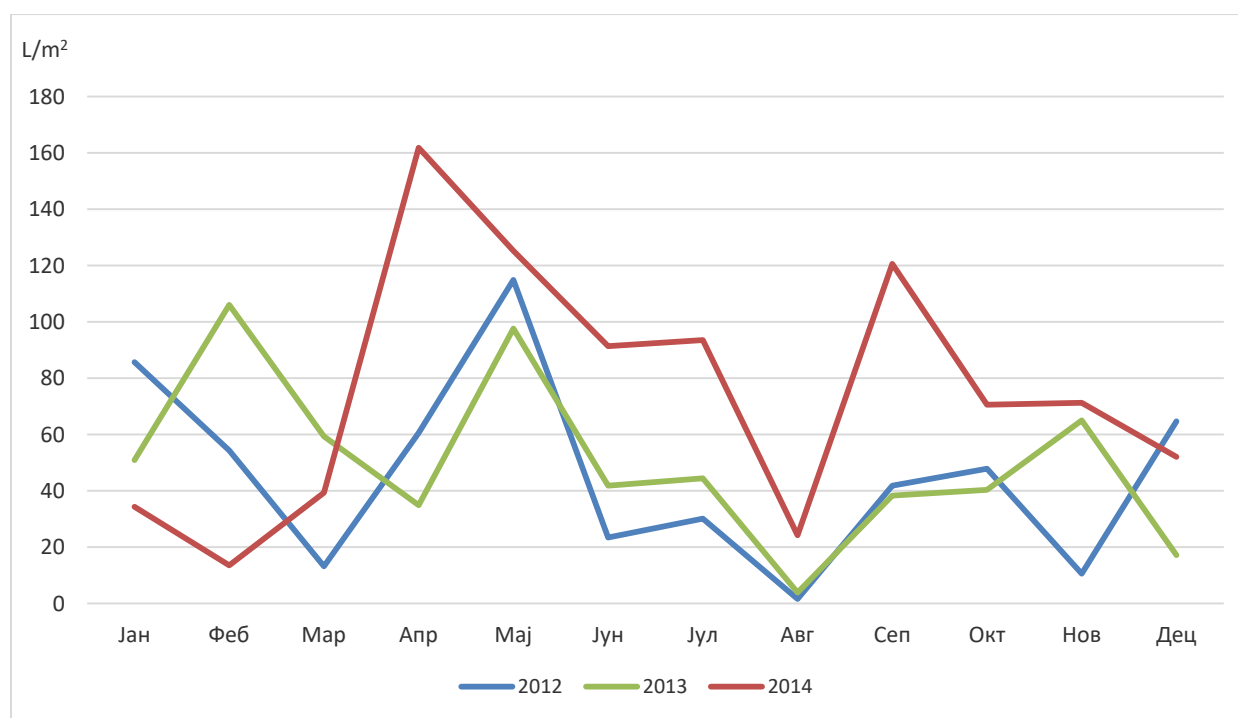
Највиша просечна месечна температура ваздуха на територији Врања у току 2012. године измерена је у јулу месецу (25.5°C), а најнижа у фебруару (-3.7°C) (Слика 31). Просечна годишња температура ваздуха у 2012. години је износила 12.2°C . Током 2013. године просечне месечне температуре ваздуха биле су у распону од 23.9°C (август) до 1.1°C (децембар), док је средња годишња била 12.3°C . У Врању је током 2014. године максимална средња месечна температура ваздуха евидентирана у августу (22.2°C), а најнижа у децембру (2.6°C). Максимална просечна годишња температура ваздуха је евидентирана током 2014. године (12.4°C).



Слика 31. Просечна месечна температура ваздуха на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године ($^{\circ}\text{C}$)

4.3.2. Укупна количина падавина по месецима на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године

Укупна годишња количина падавина на територији Врања (Слика 32) током 2012. године износила је 548.8 L/m^2 , највеће измерене вредности падавина су биле у мају (114.9 L/m^2), а најниже вредности у августу (1.6 L/m^2). Током 2013. године годишња вредност количине падавина износила је 600 L/m^2 , највећа вредност је измерена током фебруара (106 L/m^2), а најнижа као и током претходне године у августу месецу (3.9 L/m^2). Максимална укупна годишња количина падавина је евидентирана током 2014. године (898.1 L/m^2). Највећа вредност забележена је у мају месецу (161.8 L/m^2), док су најмање вредности биле у марту (13.6 L/m^2).



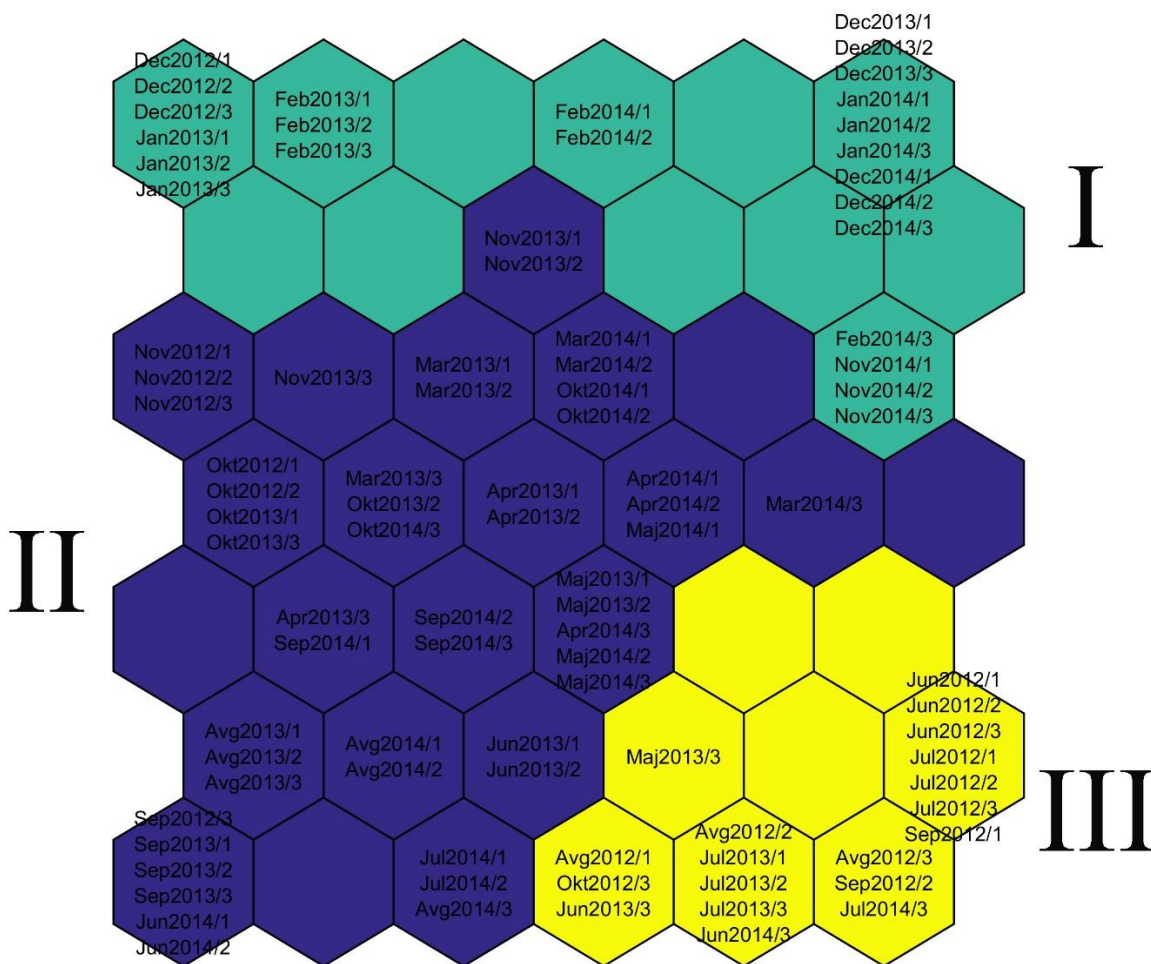
Слика 32. Укупна количина падавина по месецима на територији града Врања у периоду од 2012. до 2014. године (L/m^2)

4.3.3. Просторна и временска дистрибуција физичких и хемијских параметара воде

Улазна матрица за СОМ анализу Александровачке акумулације садржала је податке о измерним физичким и хемијским параметрима (укупно 12) из укупно 93 узорка који су сакупљени на локалитетима у периоду јун 2012. – децембар 2014. Према сличности измерених физичких и хемијских параметара Александровачке акумулације, сви испитивани узорци распоређени су у неуроне дводимензионалне мреже (7 x 6) (Слика 33).

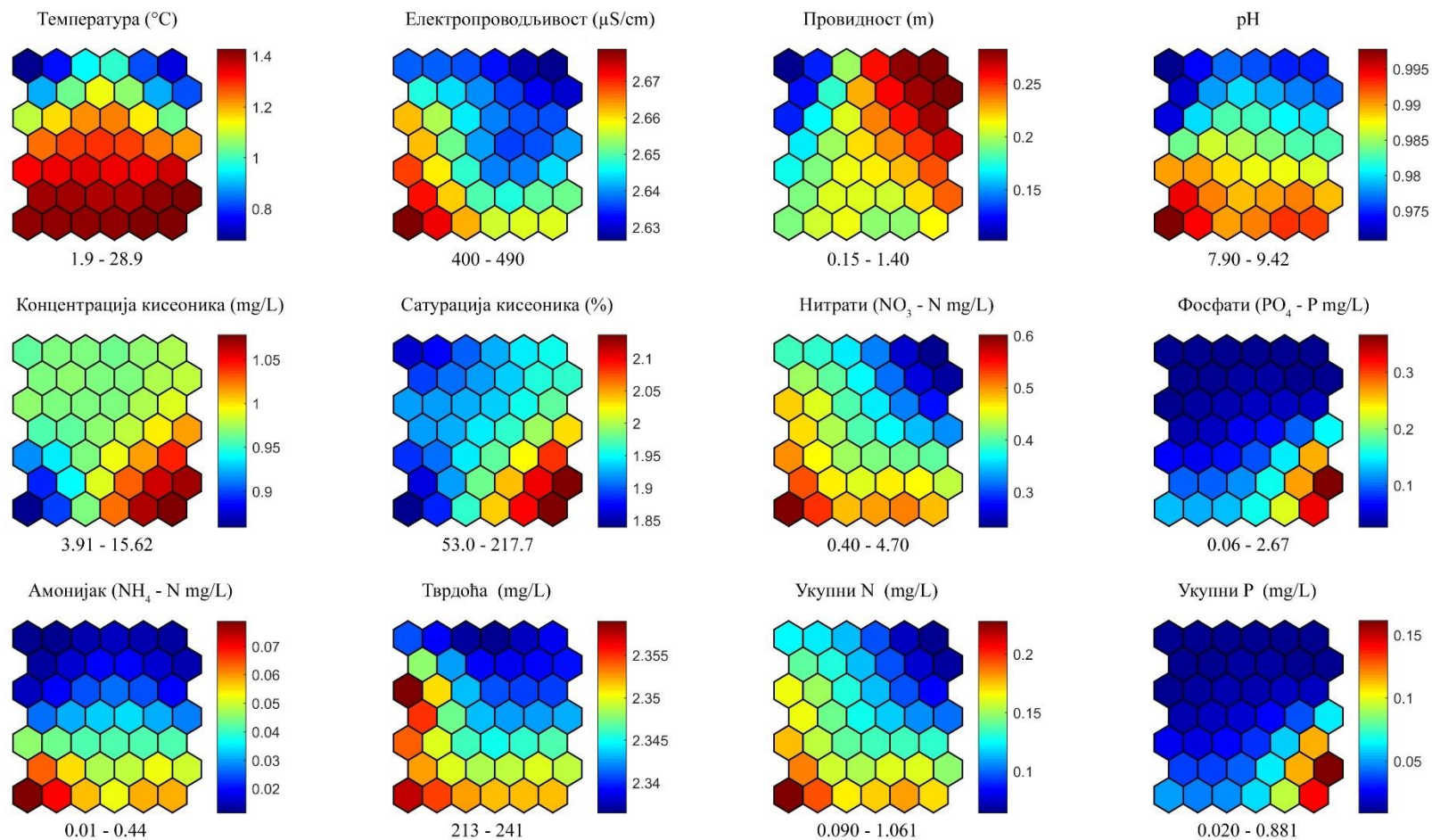
На излазном слоју СОМ мреже, на основу вредности измерених физичких и хемијских параметара, извршена је класификација на три групе узорака: I (зелена), II (плава), III (жута) (Слика 33). На основу броја узорака по кластеру одређен је ниво класификације, довољан за даље статистичке анализе.

Од укупно 42 неурона излазне СОМ матрице (Слика 33) највише њих припада II групи (22), I групи припада њих 12 и III групи припада 8 неурона. Узорци сакупљени приликом истраживања које је спроведено током зимског периода груписани су у горњем делу излазне решетке и формирали су I групу. Већина осталих узорака прикупљених током пролећа, лета и јесени (2012.-2014. година) груписани су у левом делу мреже и формирали су II групу која је јако разнолика. Изузетак су узорци сакупљени током 2012. године у јуну, јулу, августу, септембру (локалитети 1 и 2) и октобру (локалитет 3) који су груписани у доњем десном делу мреже и формирали су III групу. Поред поменутих узорака, у оквиру поменуте групе издвојили су се и неурони који су одговарали локалитету 3, на ком је узорковање спроведено у мају, јуну, јулу 2013. и јуну 2014. године.



Слика 33. Ординација и класификација локалитета базираних на физичким и хемијским параметрима Александровачке акумулације помоћу Самоорганизујућих мапа (COM). Различите боје означавају различите групе. Кодови на сваком неурону означавају различите локалитете акумулације узорковане у различитом периоду (месец/година/локалитет). Локалитет 1. у близини бране; 2. средина акумулације; 3. непосредна близина ушћа акумулације

COM метода је такође визуелизовала и дистрибуцију вредности 12 физичких и хемијских параметара воде Александровачке акумулације (Слика 34). На COM мрежи вредности срединских параметара су се углавном мењале у правцу од горњег дела неурона ка доњем, горњег левог угла ка доњем десном углу и супротно. Температура је била најмања у горњем делу мреже, одакле је опадала према доњем, дуж успостављеног градијента. Дуж истог правца су се кретале и вредности за рН и концентрацију амонијака. Са друге стране, вредности за концентрацију нитрата, фосфата, укупног Р и укупног N су се мењале дуж истог смера, али у супротном правцу, такође формирајући јасан градијент. Остали мерени параметри на COM мрежи нису показали уочљив градијент (Слика 34).



Слика 34. Визуализација дистрибуције 12 физичких и хемијских параметара Александровачке акумулације на претходно тренираној SOM мрежи (где је: NO₃-N – концентрација нитрата, PO₄-P – концентрација фосфата, NH₄-N – концентрација амонијака). Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању

I група је представљена локалитетима са ниском температуром воде, електропроводљивости, ниским минералним саставом и ниском концентрацијом амонијумовог јона, а са друге стране добро аерисаном водом високе провидности (Слика 34). Најнижа забележена температура у I групи је 1.9°C, а ова група има и минималну забележену вредност електропроводљивости (400 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Прву групу карактеришу и ниске вредности $\text{NO}_3\text{-N}$ (0.6 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.06 mg/L), NH_4 (0.01 mg/L), што је и потврђено компонентним графиконима (Слика 34). Концентрација pH за дату групу је била у распону 8.21-8.67. Примећује се пораст садржаја минералних соли у II групи, електропроводљивост (489 $\mu\text{S}/\text{cm}$) је већа, док је концентрација кисеоника у благом паду у односу на прву групу. Насупрот овим двама групама, III групу карактерише висок минерални састав ($\text{NO}_3\text{-N}$ (4.7 mg/L), $\text{PO}_4\text{-P}$ (2.67 mg/L)) и ниска провидност воде (0.2 m). Максимална забележена вредност pH (9.42) припада неурону III групе (Слика 34).

Kruskall-Wallis ANOVA тест показао је да се сви мерени средински фактори статистички значајно разликују по групама осим провидности (Табела 6). За утврђивање између којих група постоји значајна статистичка разлика за сваки средински параметар употребљен је Mann-Whitney тест.

Табела 6. Средње вредности \pm стандардна девијација параметара Александровачке акумулације по групама.

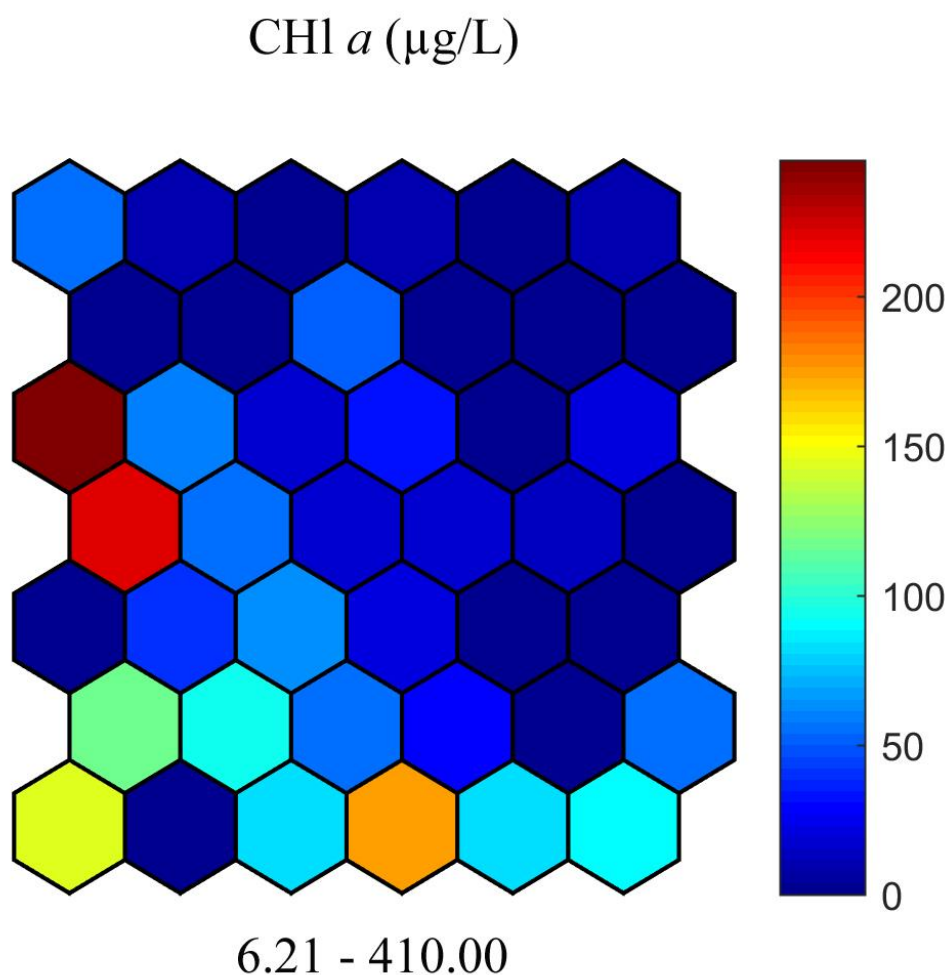
Средински параметри	Група		
	I	II	III
Температура ($^{\circ}\text{C}$)	5.20 \pm 2.94	20.17 \pm 4.72	25.73 \pm 2.86
Електропроводљивост ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	426.37 \pm 10.51	451.88 \pm 23.75 ^a	451.68 \pm 19.88 ^a
Провидност (m)	0.69 \pm 0.372 ^a	0.60 \pm 0.208 ^a	0.63 \pm 0.307 ^a
pH	8.43 \pm 0.148	8.69 \pm 0.282 ^a	8.82 \pm 0.301 ^a
Концентрација кисеоника (mg/L)	8.33 \pm 0.658 ^a	7.94 \pm 1.160 ^a	10.89 \pm 1.910
Сатурација кисеоника%	82.71 \pm 12.766 ^a	83.14 \pm 11.649 ^a	134.21 \pm 28.111
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	0.989 \pm 0.3238	1.948 \pm 0.8095 ^a	2.215 \pm 0.9546 ^a
$\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/L)	0.062 \pm 0.0069	0.202 \pm 0.2224	1.070 \pm 0.6882
$\text{NH}_4\text{-P}$ (mg/L)	0.030 \pm 0.0083	0.105 \pm 0.0845 ^a	0.133 \pm 0.1102 ^a
Тврдоћа (mg/L)	216.5 \pm 2.4137	223.02 \pm 6.813 ^a	223.68 \pm 8.212 ^a
Укупни N (mg/L)	0.223 \pm 0.0730	0.4397 \pm 0.1827	0.500 \pm 0.2155
Укупни P (mg/L)	0.020 \pm 0.0022	0.066 \pm 0.0734	0.353 \pm 0.2271

Вредности које у истом реду не деле исти суперскрипт су статистички различите : ^{a, b} p<0.05

Ако суперскрипт недостаје, све вредности су међусобно статистички различите

4.3.4. Просторна и временска дистрибуција вредности концентрације хлорофила *a* на претходно тренираној SOM мрежи

Дистрибуциони образац вредности концентрације хлорофила *a* Александровачке акумулације приказан је уз помоћ SOM анализе на дводимензионалној мрежи. У виду компонентног графикона извршена је визуелизација дистрибуције вредности концентрације хлорофила *a* Александровачке акумулације који је укључен у анализу појединачно и то по неуронима (Слика 35).



Слика 35. Визуелизација дистрибуције концентрације хлорофила *a* Александровачке акумулације на претходно тренираној SOM мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја индикује највећу вредност а плава најмању

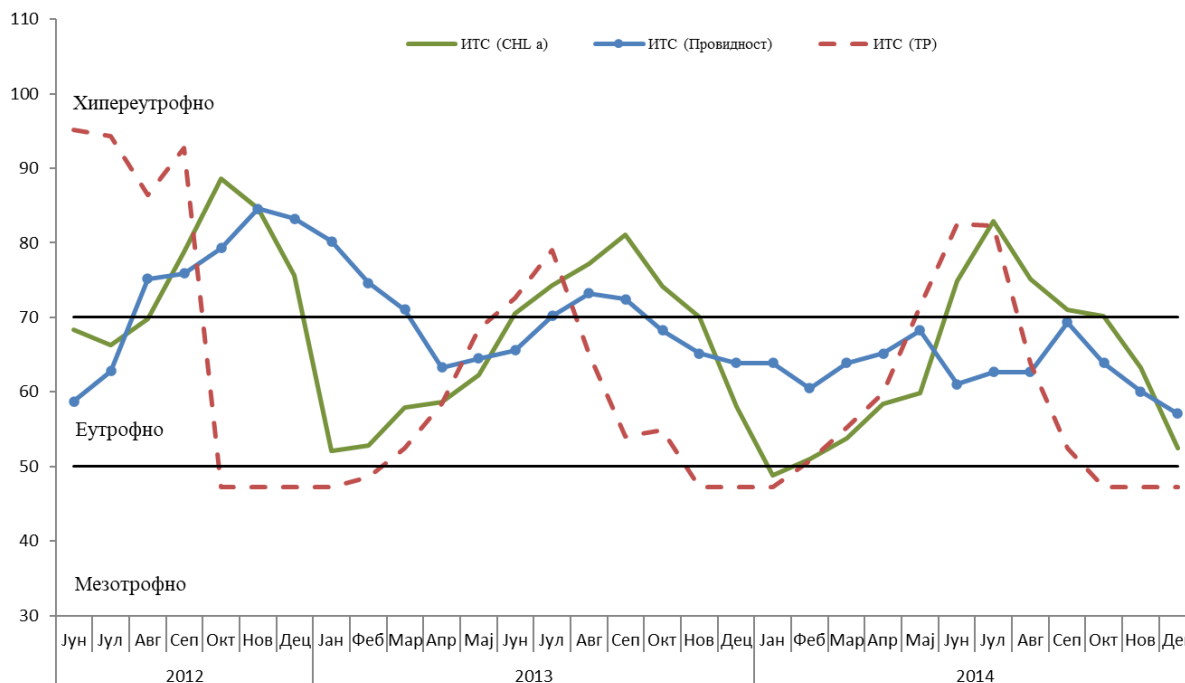
Градијент боја даје приказ интензитета параметра, и на компонентном графикању уочава се издвајање неурона којима одговарају највеће, односно најниже забележене вредности концентрације хлорофила *a* (Слика 35).

Вредности концентрације хлорофила *a* Александровачке акумулације кретале се у распону од 6.21 µg/L у јануару 2014. године (локалитет 1) до 410 µg/L у октобру месецу 2012. године (сви локалитети) (Слика 35).

Поред новембра месеца 2012. године, издвојили су се неурони који бележе, такође, повишене вредности у односу на читав период истраживања, а то су неурони који одговарају узорковању које је спроведено у септембру и октобру месецу 2012. године и јуну 2013 године.

4.3.5. Трофички статус Александровачке акумулације

На основу средњих годишњих вредности индекса трофичног стања, који је израчунат на основу вредности концентрације укупног фосфора и хлорофила *a*, као и провидности воде, Александровачка акумулација је током 2012. имала тенденцију ка хипереуτροφном стању, поготову према вредностима концентрације укупног фосфора. Уочава се да вредност индекса трофичног стања, заснована на вредности концентрације укупног фосфора, пада од октобра 2012. године до фебруара 2013. године, када опет има тенденцију да расте. У 2013. и 2014. години индекс трофичног стања је уједначен и указивао је на еуτροφан статус акумулације током године, изузев летњих месеци где је имао тенденцију ка хипереуτροφном статусу на основу сва 3 параметра (Слика 36).



Слика 36. Месечне вредности индекса трофичног стања (ИТС) Александровачке акумулације израчунате на темељу провидности воде, концентрације укупног фосфора и хлорофила *a*

4.3.6. Квалитативна и квантитативна анализа фитопланктонских цијанобактерија

Анализом узорака фитопланктона током спроведеног истраживања у Александровачкој акумулацији је забележено присуство укупно 20 таксона фитопланктонских цијанобактерија. Комплетан списак идентификованих таксона цијанобактерија обједињен за сва три локалитета је представљен у Табели 7, где је прецизирано у ком периоду је одређени таксон забележен.

У 2012. години у Александровачкој акумулацији у оквиру фитопланктонских цијанобактерија идентификовано је укупно 13 таксона (Табела 7). Највећи број таксона је забележен током летњих месеци (10 таксона), док је број забележених таксона у јесењем и зимском периоду знатно смањен (2-1 таксона). Најфреквентније врсте у 2012. години су *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera et al. и *Pseudanabaena limnetica*.

Анализом узорака из 2013. године у Александровачкој акумулацији је идентификовано 20 таксона фитопланктонских цијанобактерија (Табела 7). Оне показују повећање броја забележених таксона од пролећних (6-10) ка летњим месецима (10-14), док је број детектованих таксона у јесењим (7-8) и зимским (4) месецима смањен. Врста *Raphidiopsis raciborskii* је била присутна у свим месецима. Поред поменутог таксона и врста *Pseudanabaena limnetica* је била забележена у свим узорцима, изузев у узорку из јануара месеца. Највеће богатство врста је било у септембру месецу када су поред наведених таксона биле присутне и следеће врсте: *Anabaenopsis elenkinii* V. V. Miller, *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, *Chrysochloridium bergii*, *Cylindrospermum stagnale* Bornet et Flahault, *Glaucospira laxissima* (G. S. West) Simic, Komárek & Dordevic, *Lyngbya aestuarii* Liebman ex Gomont, *Merismopedia glauca* (Ehrenberg) Kützing, *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktolyngbya limnetica* (Lemmermann) Komárková-Legnerová & Cronberg и *Synechococcus lividus* J. J. Copeland (Табела 7).

Током 2014. године фитопланктонске цијанобактерије су биле представљене са 19 таксона (Табела 7). Нису детектоване само у јануару месецу. У летњем и јесењем периоду њихова разноврсност је била највећа. У марту месецу је идентификовано 11 таксона, у септембру и октобру по 14 таксона, док се у мају месецу бележи пад у броју забележених таксона (5). Најфреквентније врсте у 2014. години су биле: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktolyngbya limnetica*, *Pseudanabaena limnetica*, *Raphidiopsis raciborskii* и *Synechococcus lividus* (Табела 7).

Табела 7. Састав фитопланктонских цијанобактеријау Александровачкој акумулацији у периоду јун 2012. – децембар 2014. године.

Година истраживања		2012/ 2013/ 2014											
Врста	Месец	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> V. V. Miller		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
<i>Aphanocapsa grevillei</i> (Berkeley) Rabenhorst		-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault		-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli		-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli		-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
<i>Chrysoosporum bergii</i> (Ostenfeld) Zapomelova et al		-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+
<i>Cylindrospermum stagnale</i> Bornet et Flahault		-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-
<i>Glaucospira laxissima</i> (G. S. West) Simic, Komárek & Dordevic		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
<i>Limnothrix redekei</i> (Goor) Meffert		-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+
<i>Lynghya aestuarii</i> Liebman ex Gomont		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing		-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann		-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing		-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-

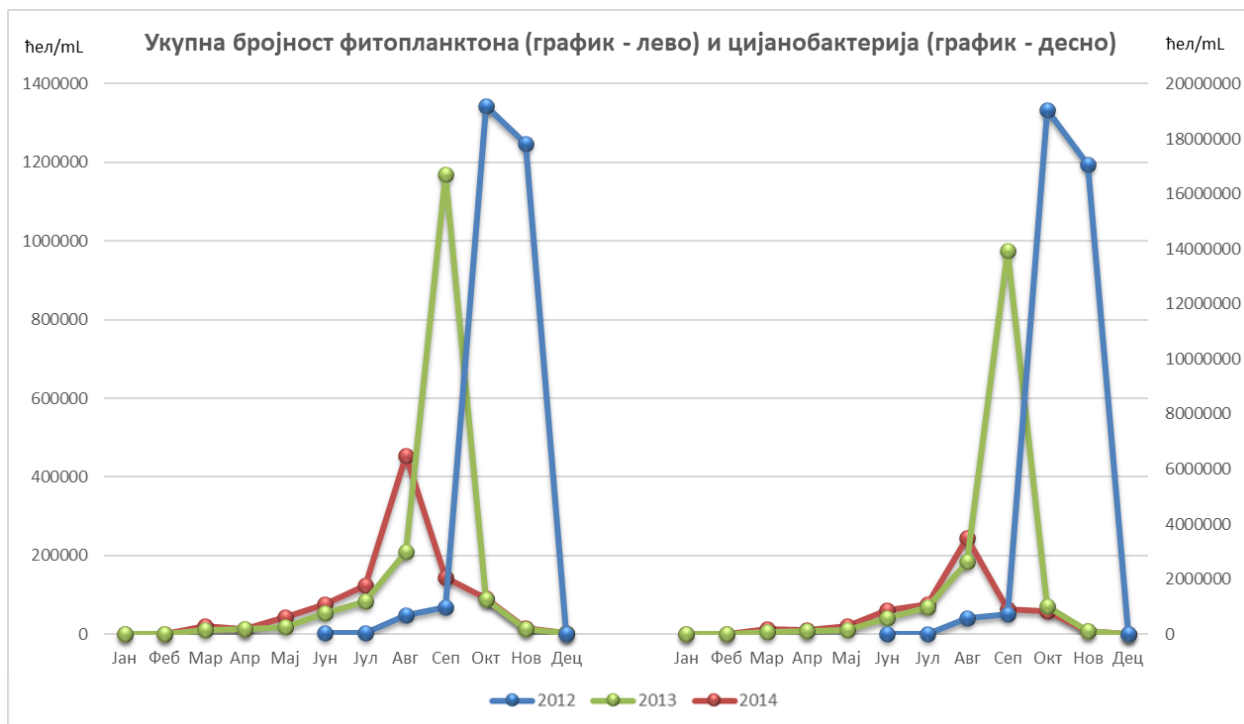
+ таксон присутан у узорку; - таксон није присутан у узорку

Табела 7. Састав фитопланктонских цијанобактерија у Александровачкој акумулацији у периоду јун 2012. – децембар 2014. године – наставак табеле 7.

Година истраживања		2012/ 2013/ 2014											
Врста	Месец	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Oscillatoria limosa</i> C. Agardh ex Gomont		-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/-	+/-	+/-	-/+	-/+	-/-
<i>Oscillatoria</i> sp. Vaucher ex Gomont		-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+
<i>Planktolyngbya limnetica</i> (Lemmermann) Komárková- Legnerová & Cronberg		-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/-	-/+	-/+	-/+	-/+
<i>Planktothrix</i> sp. K. Anagnostidis & J. Komárek		-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+
<i>Pseudanabaena limnetica</i> (Lemmermann) Komárek		-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Aguilera et al.		+/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Synechococcus lividus</i> J. J. Copeland		-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-	+/-	-/+	-/+	-/+	-/-

+ таксон присутан у узорку; - таксон није присутан у узорку

На Слици 37 приказан је однос између укупне бројности фитопланктона (средње месечне вредности за сва три локалитета) и фитопланктонских цијанобактерија (средње месечне вредности за сва три локалитета) Александровачке акумулације. Бројност заједнице фитопланктона током 2012. године је била у распону од 9 300 до 19 200 000 ћел/мL (Слика 37). Од укупне бројности фитопланктона, заједница цијанобактерија представља удео од 43% (јун месец) до 99% (октобар месец).



Слика 37. Сезонска динамика укупне бројности фитопланктона и укупне бројности цијанобактерија током периода истраживања Александровачке акумулације. Примарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) током 2013. и 2014. године. Секундарна у оса даје приказ бројности (ћел/мL) у 2012. години

Од септембра месеца 2012. године бележи се интензиван скок у укупној бројности фитопланктона (995 666 ћел/мL), али и цијанобактеријски удео (72%), да би свој максимум достигао у октобру месецу. Изглед Александровачке акумулације у периоду од августа до септембра 2012. године приказан је на сликама 38-40. У новембру и децембру 2012. године у Александровачкој акумулацији забележено је присуство само једне врсте *Cyanobacteria* – *Raphidiopsis raciborskii* (Слике 41-42). Ова врста је формирала биофилм на површини акумулације маслинасто-браон боје (Слика 40), а апсолутна доминација ове цијанобактеријске врсте у Александровачкој акумулацији довела је до потискивања комплетне фитопланктонске заједнице. У децембру месецу у Александровачкој акумулацији забележен је и масовни помор рибе (Слика 43).

Највећа забележена вредност абунданце фитопланктона у истраживању спроведеном током 2013. године бележи се у септембру и износила је 1 170 000 ћел/мL, са цијанобактеријским уделом 83%. Током 2013. године највећи цијанобактеријски удео (87.7%) у заједници фитопланктона је евидентиран у августу месецу (Слика 37). У 2014. години вредности абунданце фитопланктона варирају од 133 ћел/мL (јануар) до 454 666

ћел/mL (август). У том моменту цијанобактеријски удео био је 54%. Од укупне абунданце фитопланктона заједница цијанобактерија бележи највећи удео током априла месеца (78.9%) (Слика 37).



Слика 38. Александровачка акумулација – август 2012. године (Фото Н. Ђорђевић)



Слика 39. Александровачка акумулација – септембар 2012. године (Фото Н. Ђорђевић)



Слика 40. Цветање врсте *Raphidiopsis raciborskii* у Александровачкој акумулацији – октобар 2012. године (Фото Н. Ђорђевић)



Слика 41. *Raphidiopsis raciborskii* у Александровачкој акумулацији (бар скала 10 μm) (октобар, 2012. год.)



Слика 42. Александровачка акумулација – новембар 2012. године (Фото Н. Ђорђевић)

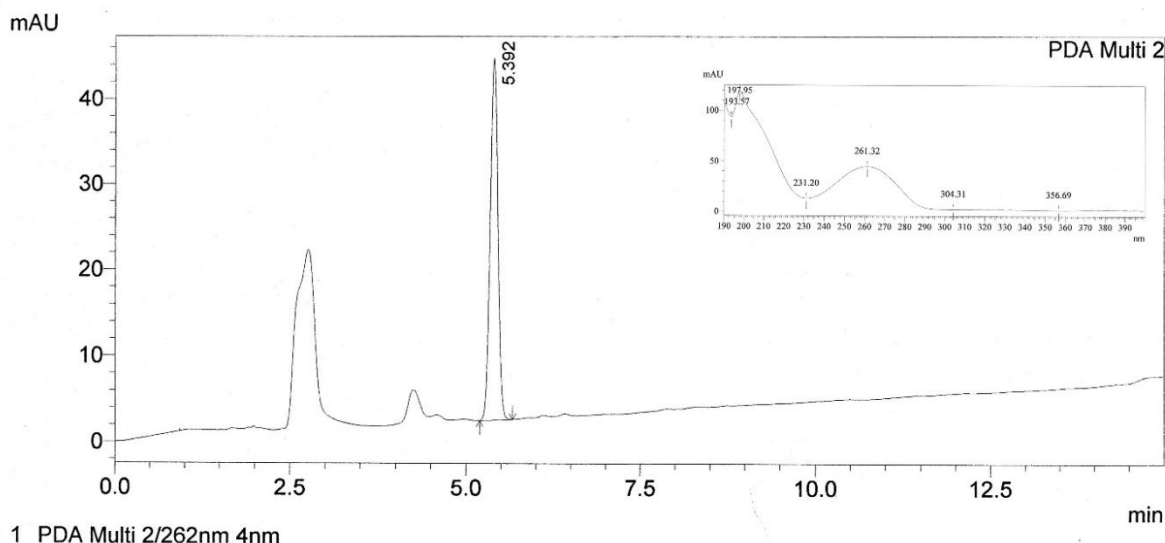


Слика 43. Александровачка акумулација – децембар 2012. године – помор рибе у акумулацији (Фото Н. Ђорђевић)

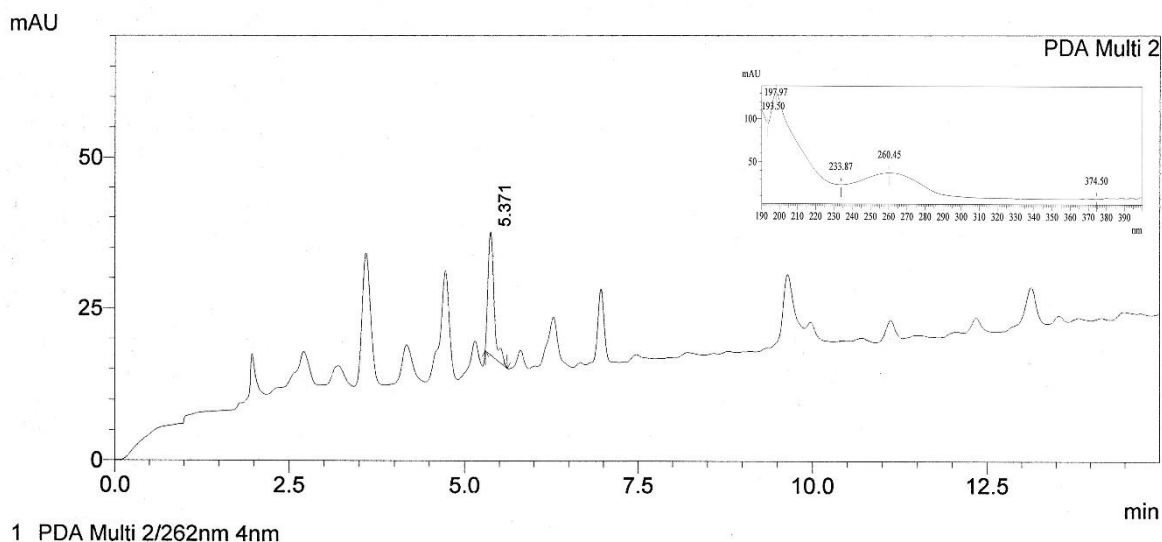
4.3.7. Резултати присуства цијанотоксина у води Александровачке акумулације

Анализама HPLC-PDA воде из Александровачке акумулације током мониторинга спроведеног у периоду од јуна 2012. године до децембра 2014. године, идентификован је и квантификован цилиндроспермопсин (CYN), док други испитивани цијанотоксини микроцистини, анатоксин и сакситоксин нису детектовани.

CYN је идентификован на основу поређења UV-VIS спектра стандарда и узорка, као и поређењем њихових ретенционих времена. Из приказаних хроматограма може се јасно уочити преклапање пика узорка и стандарда (Слике 44 и 45).



Слика 44. Хроматограм стандарда цилиндроспермопсина (5 mg/L) (262 nm, ретенционо време 5.392 минут) и UV спектар стандарда



Слика 45. Хроматограм узорка воде Александровачке акумулације (262 nm, ретенционо време 5.371 минут) и UV спектар узорка (ретенционо време 5.371 минут)

Валидацијом методе доказана је линеарност методе са коефицијентом колерације $r = 0.9998$ и одговарајућом једначином $y = 2621x - 306.1$. За границу детекције (LOD) одређена је вредност 0.188, а за границу квантификације (LOQ) 0.507 $\mu\text{g/L}$.

У Табели 8 дате су концентрације CYN-а измерене у узорцима воде током периода испитивања (средња вредност са узоркованих локалитета). Концентрација CYN-а у 2012. години је била у распону од 1.61 до 24.28 $\mu\text{g/L}$ (Табела 8). Констатовано је повећање садржаја CYN-а у периоду од августа до новембра 2012. године, када достиже максимум (20.47 $\mu\text{g/L}$), да би након тога уследио пад у концентрацији CYN-а. Током 2013. године концентрација CYN-а кретала се од 0.98 $\mu\text{g/L}$ у јулу месецу до 4.01 $\mu\text{g/L}$ у јануару. Анализе спроведене на узорцима из 2013. године (март-јун; новембар-децембар) и 2014. године показују да овај токсин није био присутан у води, вредности CYN-а су биле испод границе детекције.

Табела 8. Вредности концентрације цилиндроспермопсина – CYN у води Александровачке акумулације у периоду јун 2012. – децембар 2014. године.

		CYN ($\mu\text{g/L}$)											
Година	Месец	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	2012		-	-	-	-	-	-	-	1.61	8.22	9.02	20.47
2013		4.01	3.56	-	-	-	-	0.98	1.21	3.47	2.34	-	-
2014		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- није детектован токсин

Квалитативном HPLC анализом метанолског екстракта цветајуће врсте *Raphidiopsis raciborskii* детектовано је присуство CYN-а и квантификацијом овог једињења у екстракту је забележено 6.65 μg CYN-а/ mg суве масе (с.м.).

4.4. Упоредни приказ сличности и различитости испитиваних акумулација на основу састава фитопланктонских цијанобактерија

На основу квалитативног састава фитопланктонских цијанобактерија у Табелама 9 и 10 приказани су коефицијенти квалитативне сличности/различитости између испитиваних акумулација Шумарице, Бубањ и Александровачке.

Табела 9. Индекс сличности и различитости фитопланктонских цијанобактерија испитиваних акумулација по Соренсену.

Акумулација	Акумулација Шумарице	Акумулација Бубањ
Александровачка акумулација	30.30%	34.28%
Акумулација Бубањ	42.85%	

Најмања квалитативна сличност фитопланктонских цијанобактерија забележена је између Александровачке и акумулације Шумарице (30.30%), затим између Александровачке и акумулације Бубањ (34.28%). Највећи проценат квалитативне сличности је забележен између акумулације Шумарице и Бубањ (42.85%).

Према Жакардовом коефицијенту сличности потврђен је резултат различитости истраживаних акумулација (Табела 10).

Табела 10. Индекс сличности и различитости фитопланктонских цијанобактерија испитиваних акумулација по Жакарду.

Акумулација	Акумулација Шумарице	Акумулација Бубањ
Александровачка акумулација	0.17	0.20
Акумулација Бубањ	0.27	

Различитост испитиваних акумулација се огледа по малом броју заједничких таксона (5-6), али и по таксонима који су били најфреквентнији и цветајући у испитиваним акумулацијама: акумулација Шумарице (*Aphanizomenon flos-aquae*), акумулација Бубањ (*Microcystis aeruginosa*) и Александровачка акумулација (*Raphidiopsis raciborskii*).

4.5. Упоредни приказ биотичких параметара у истраживаним акумулацијама

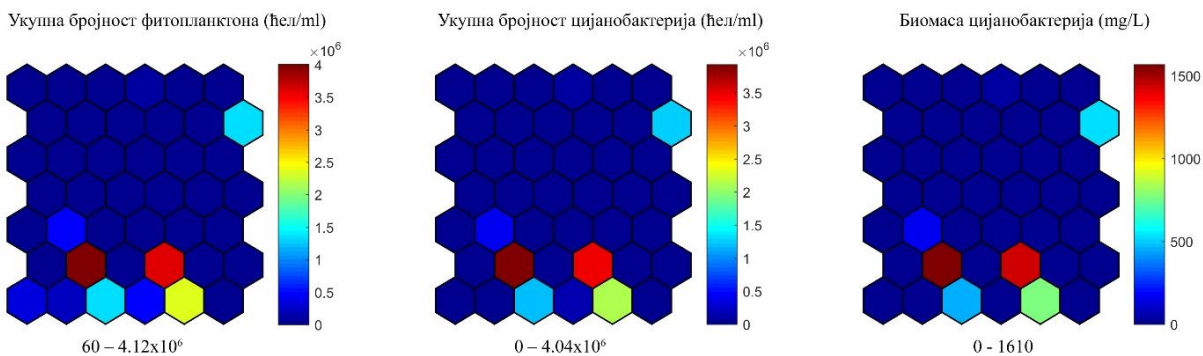
СОМ анализа је искоришћена као могућност да прикаже и упоредни дистрибуциони образац три биотичка параметра на дводимензионалној мрежи (укупну бројност фитопланктона, бројност и биомасу цијанобактерија) акумулације Шумарице, Бубањ и Александровачке акумулације. Оваква визуелизација дистрибуције биотичких параметара по неуронима представљена је у виду компонентних графикана за сваки параметар, који су укључени у анализу појединачно (Слика 46). Ови графикони дају податке и о вредностима, што је представљено градијентом боја који приказују интензитет параметара. На основу ових графикана, јасно се види издвајање неурона којима одговарају и највеће забележене вредности биотичких параметара (Слика 46).

Укупна бројност фитопланктона акумулације Шумарице је била у распону од 60 ћел/мL у јануару месецу 2013. на локалитету 2 до 4.12×10^6 ћел/мL у октобру 2014. на локалитету 1. Максималне вредности бројности цијанобактерија (4.04×10^6 ћел/мL) и биомасе (1610 mg/L) биле су на локалитету 3 у октобру 2014. године (Слика 46).

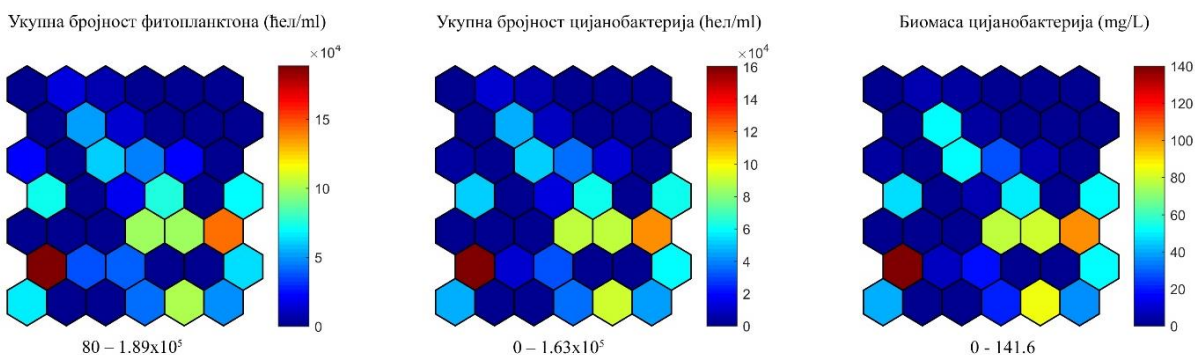
У случају акумулације Бубањ најнижа вредност абунданце фитопланктона је евидентирана у јануару 2013. године на локалитету 2 (80 ћел/мL), а максимална у августу 2012. године на локалитету 3 (1.89×10^5 ћел/мL). Абунданца цијанобактерија (1.63×10^5 ћел/мL) и биомаса цијанобактерија (141.6 mg/L) су на локалитету 3 током августа 2012. године достигле свој максимум (Слика 46).

Вредност абунданце фитопланктона Александровачке акумулације кретала се у распону од 1.1×10^2 ћел/мL у јануару 2013. и 2014. године (локалитет 1) до 19.24×10^6 ћел/мL у октобру месецу 2012. године (локалитет 1) (Слика 46). Максимална забележена вредност бројности цијанобактерија (19.06×10^6 ћел/мL) и биомасе цијанобактерија (2344 mg/L) је такође била у октобру 2012. године, али на локалитету 3.

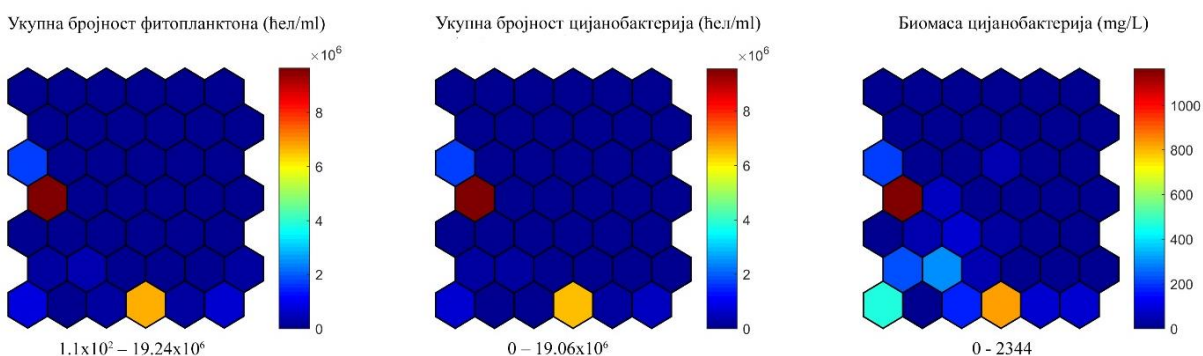
Акумулација Шумарице



Акумулација Бубањ



Александровачка акумулација



Слика 46. Визуализација упоредног приказа дистрибуције три биотичка параметра (укупна бројност фитопланктона, бројност и биомаса цијанобактерија) акумулације Шумарице, акумулације Бубањ и Александровачке акумулације на претходно тренираној SOM мрежи. Градијент боја приказује интензитет параметара, где црвена боја одговара највећој вредности, а плава најмањој

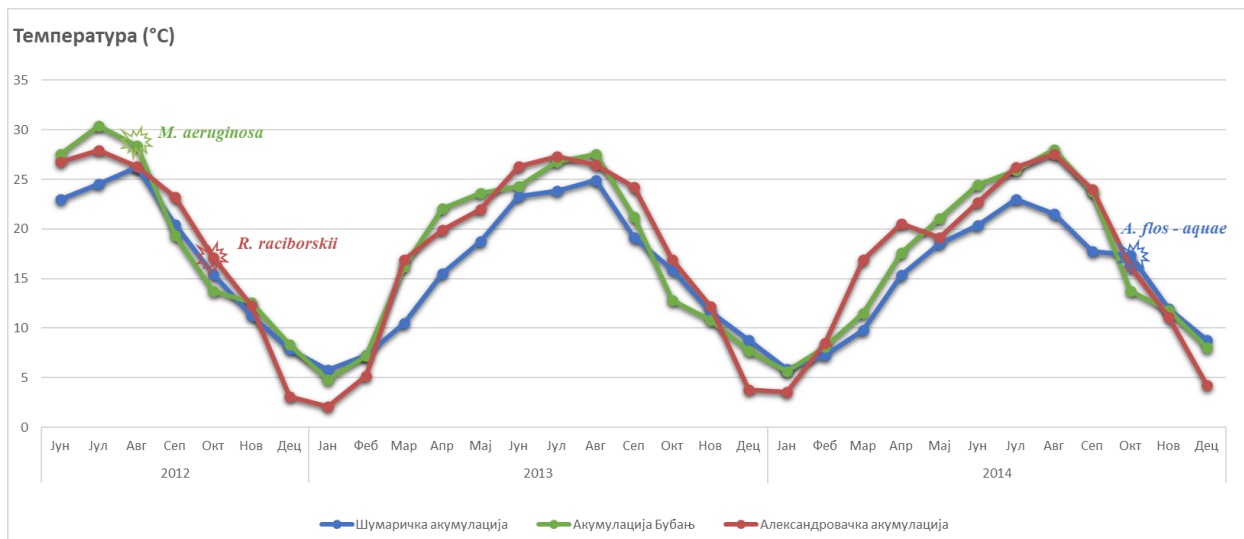
4.6. Утицај одабраних еколошких фактора на цветајуће таксоне у истраживаним акумулацијама

За прецизнији приказ повезаности појаве цветања фитопланктонских цијанобактерија са еколошким факторима издвојени су следећи средински параметри: температура воде, рН, концентрација амонијака, укупног N, укупног P као и однос укупног азота и фосфора (TN:TP) . На Сликама 47-51 дат је упоредни приказ просечних месечних вредности срединских параметара и појава цветајућих таксона у истраживаним акумулацијама током мониторинга спроведеног у периоду од јуна 2012. године до децембра 2014. године.

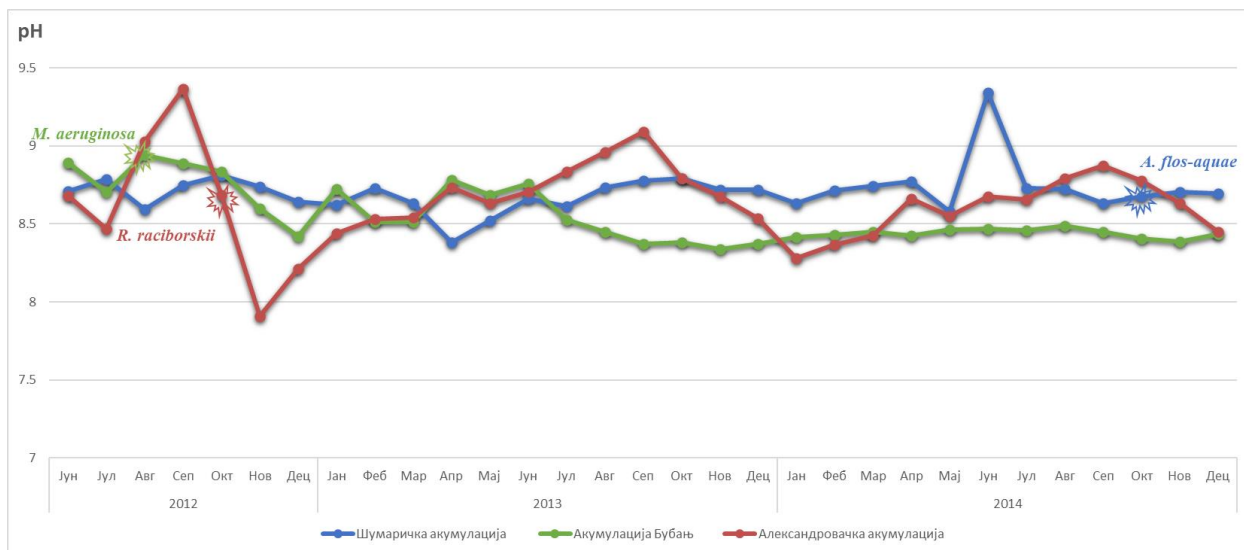
Током периода истраживања у акумулацији Шумарице интензивна појава цветања врсте *Aphanizomenon flos-aquae* је била присутна у октобру 2014. године. У периоду интензивног цветања у акумулацији су измерене следеће вредности срединских параметара: температура воде – 17.38°C и рН воде – 8.673, количина измерених нутријената је била следећа: концентрација амонијака – 0.091 mg/L, укупног азота - 0.665 mg/L и укупног фосфора - 0.123 mg/L. У акумулацији Шумарице у моменту цветања врсте *A. flos-aquae* однос укупног азота и фосфора (TN:TP) износио је 5.4.

Врста *Microcystis aeruginosa* је цветала у акумулацији Бубањ током 2012. године у августу месецу. Када се посматрају вредности свих представљених параметара на Сликама 47-51, просечна температура воде у поменутом периоду износила је 28.4 °C, а вредност рН износила је 8.94. Средња вредност концентрације амонијака је била 0.086 mg/L, вредност концентрације укупног азота је била 0.489 mg/L, док је вредност концентрације укупног фосфора износила 0.112 mg/L. Однос укупног азота и фосфора (TN:TP) у моменту цветања *M. aeruginosa* је био 4.4.

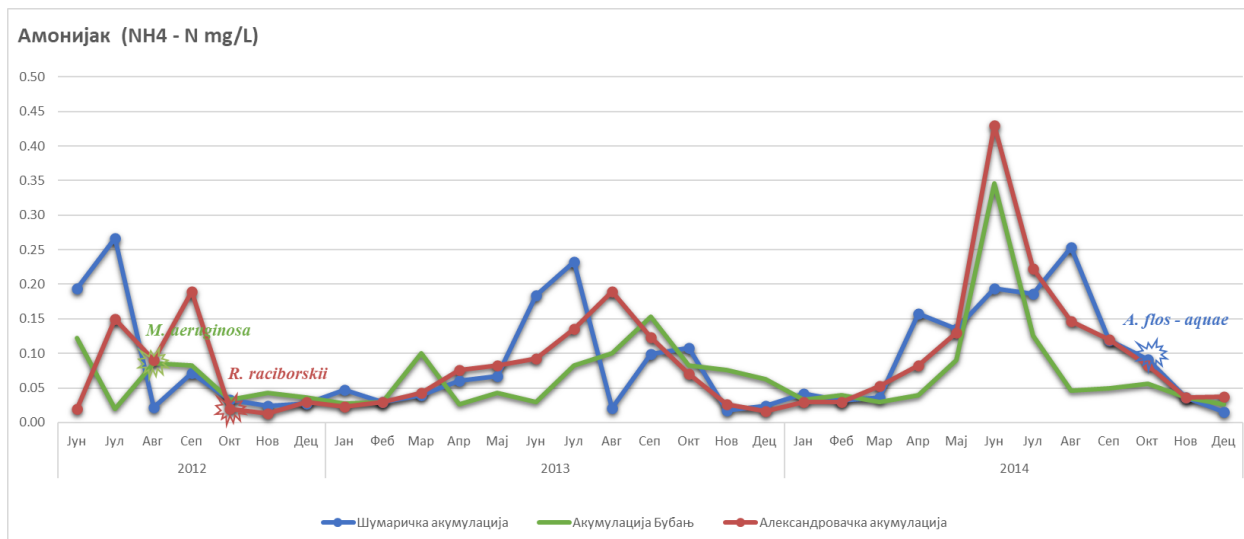
Са друге стране, у Александровачкој акумулацији је цветала врста *Raphidiopsis raciborskii* од септембра 2012. године. Интензивна појава цветања је била у октобру 2012. године када су у води владали следећи физички и хемијски средински услови: температура – 17.17°C, рН – 8.68, концентрација амонијака – 0.02 mg/L, укупног азота – 0.685 mg/L и укупног фосфора – 0.02 mg/L. У Александровачкој акумулацији у периоду цветања врсте *R. raciborskii* однос укупног азота и фосфора (TN:TP) износио је 34.3.



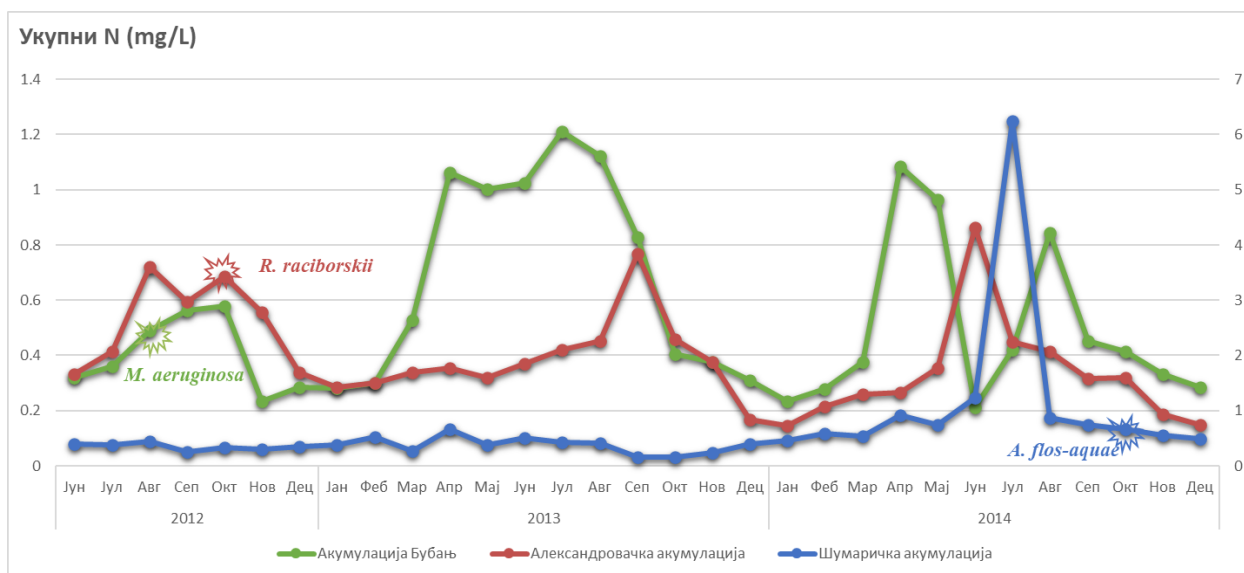
Слика 47. Упоредни приказ температуре воде испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија



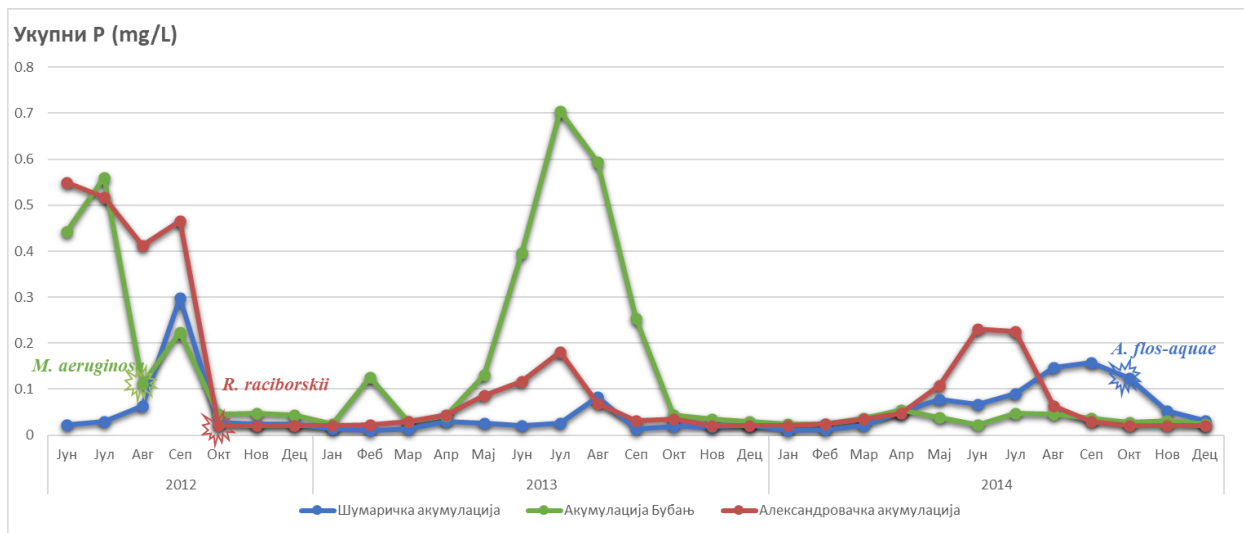
Слика 48. Упоредни приказ рН воде испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија



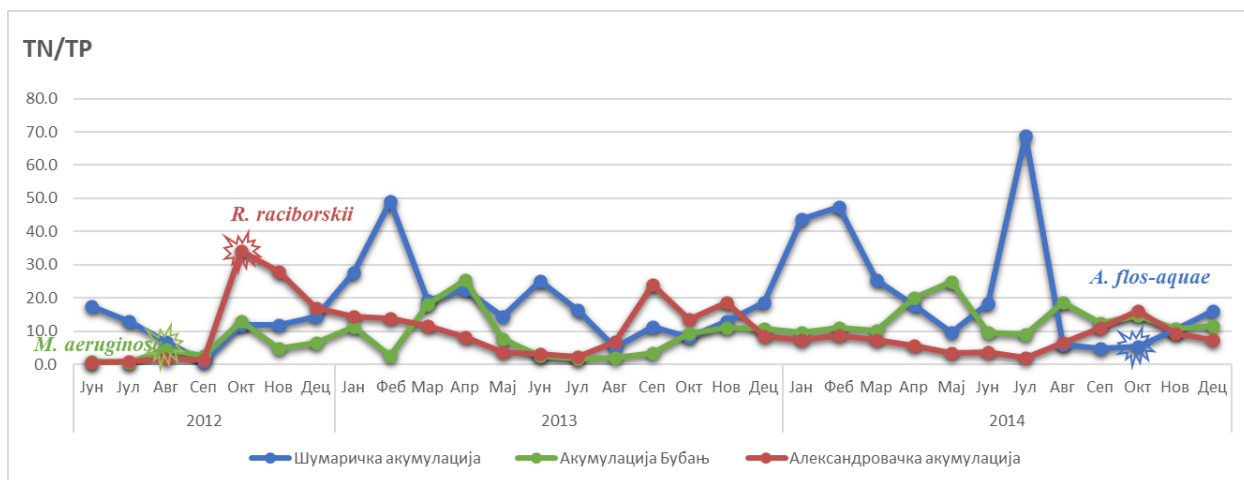
Слика 49. Упоредни приказ концентрације амонијака воде испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија



Слика 50. Упоредни приказ концентрације укупног N у води испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија. Примарна у оса даје приказ концентрације укупног N у води акумулације Бубањ и Александровачке акумулације. Секундарна у оса даје приказ концентрације укупног N у води акумулације Шумарице



Слика 51. Упоредни приказ концентрације укупног Р у води испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија



Слика 522. Упоредни приказ односа концентрације укупног N и P (TN:TP) у води испитиваних акумулација са истакнутим периодом цветања одређених цијанобактерија

4.7. Ефекат метанолског екстракта цијанобактерије *R. raciborskii* на јетру пацова соја Wistar

С обзиром на то да је анализа детекције цијанотоксина у истраживању које је спроведено на 3 мале акумулације, утврђено присуство само цилиндроспермопсина у узорку воде и биомаси Александровачке акумулације, управо је то и био разлог за одабир врсте *R. raciborskii* и испитивање утицаја метанолског екстракта ове цијанобактерије на функцију генетичког материјала, активност биохемијских параметара крвног серума, антиоксидативних ензима, као и на хистопатолошке промене код пацова.

4.7.1. Генотоксични ефекат метанолског екстракта цијанобактерије *R. raciborskii* у јетри пацова соја Wistar

Метанолски екстракт је процењиван на основу четири различите дозе: 1 500, 3 000, 6 000 и 12 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м., које кореспондирају са 9.97, 19.95, 39.90 и 79.80 μg CYN/kg т.м., на основу HPLC-одређеног садржаја CYN-а од 6.65 μg CYN/mg екстракта. Сваки пацов у трећој експерименталној групи је примио интраперитонеалну ињекцију од 79.80 μg CYN/kg т.м. (98% чистоћа, каталогски бр. 143545-90-8 обезбеђен од стране NRC CRM, Канада) растворене у физиолошком раствору (Shen и сар., 2002; Vazin и сар., 2012). Ова доза је еквивалентна количини CYN-а присутној у највећој дози екстракта. Алкална верзија Комет теста је у широкој употреби при процени генотоксичног потенцијала хемикалија и загађивача околине који могу да изазову оксидативни стрес који проузрокује оштећење јетре. У овој студији, метанолски екстракт *R. raciborskii* је тестиран по питању његовог капацитета да индукује генотоксични ефекат у јетри пацова. Мерени су просечан репни моменат репа, његова дужина и % ДНК у репу. Табела 11 приказује резултате Комет теста у јетри Wistar пацова који су били изложени дејству метанолског екстракта *R. raciborskii* током 24 и 72 сата. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са етидијум бромидом приказана је на Слици 52.

Екстракт је апликован интраперитонелно пацовима као појединачна доза од 1 500, 3 000, 6 000 и 12 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м., уз негативну (0.9% NaCl) и позитивну контролу (300 mg/kg т.м. ЕМС и 79.80 μg CYN/kg т.м.). ЕМС је проузроковао статистички значајно повећање оштећења ДНК, што се огледало повећањем дужине репа комете, момента репа и процента ДНК у репу, у поређењу са негативном контролном групом. ЕМС коришћен као позитивна контрола је демонстрирао осетљивост Комет теста и произвео јасан позитиван одговор за коришћену концентрацију. У јетрама пацова третираних са CYN-ом, дужина репа, % ДНК у репу и моменат репа су били 24 часа након третмана 2.3, 2.56 и 9.8 пута, односно 2.7, 2.8 и 10.2 пута 72 часа након третмана, изнад основне вредности измерених у негативној контроли. Иако је CYN у концентрацији од 79.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м. проузроковао статистички значајно повећање у оштећењу ДНК, ово оштећење је било мање од оног изазваног применом екстракта у највећој дози.

Табела 11. Генотоксични ефекат метанолског екстракта цијанобактерије *R. raciborskii* у јетри пацова соја Wistar 24 и 72 сата након третмана применом Комет есеја у *in vivo* условима.

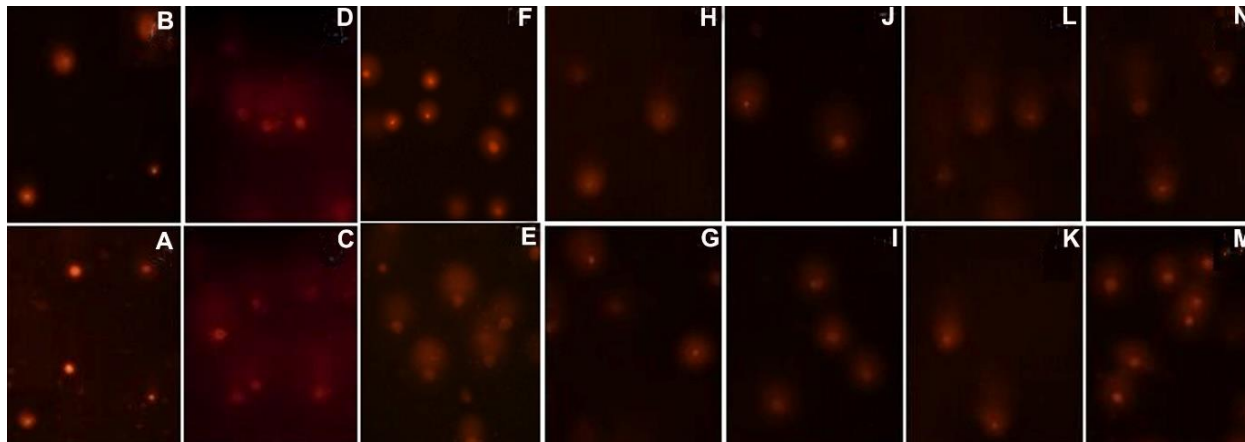
Третман	Дужина репа	% ДНК у репу	Репни моменат
24 сата			
Негативна контрола	18.5 ± 0.5	11.91 ± 0.84	2.93 ± 0.10
ЕМС	97.2 ± 2.08 ^{*†}	57.4 ± 2.02 ^{*†}	69.1 ± 0.86 ^{*†}
СУН	41.9 ± 0.45 ^{*‡}	30.5 ± 0.17 ^{*‡}	28.7 ± 0.93 ^{*‡}
1500 µg/kg	34 ± 0.67 ^{*‡}	19.15 ± 1.27 ^{*†‡}	9.53 ± 0.50 ^{*†‡}
3000 µg/kg	37.16 ± 0.7 ^{*‡}	28.04 ± 0.48 ^{*‡}	32.25 ± 0.61 ^{*‡}
6000 µg/kg	59.46 ± 1.36 ^{*†‡}	43.55 ± 1.4 ^{*†‡}	17.31 ± 0.68 ^{*‡}
12000 µg/kg	94.41 ± 2.02 ^{*†}	58.54 ± 1.10 ^{*†}	80.72 ± 0.82 ^{*†‡}
72 сата			
Негативна контрола	14.4 ± 0.55	9.01 ± 0.78	1.32 ± 0.19
ЕМС	77.4 ± 0.77 ^{*†}	47.2 ± 0.96 ^{*†}	82.4 ± 5.26 ^{*†}
СУН	38.6 ± 0.64 ^{*‡}	25.6 ± 1.04 ^{*‡}	13.4 ± 0.72 ^{*‡}
1500 µg/kg	29.90 ± 1.02 ^{*‡}	28.49 ± 0.87 ^{*‡}	16.45 ± 1.1 ^{*‡}
3000 µg/kg	48.60 ± 1.5 ^{*‡}	41.48 ± 2.61 ^{*†}	39.83 ± 1.02 ^{*†‡}
6000 µg/kg	59.13 ± 0.95 ^{*†‡}	38.25 ± 1.16 ^{*†‡}	34.38 ± 1.10 ^{*†‡}
12000 µg/kg	104.81 ± 2.9 ^{*†‡}	58.89 ± 1.26 ^{*†‡}	61.80 ± 1.83 ^{*†‡}

Резултати представљају средњу вредност ± С.Д. из три независна експеримента; n=5 животиња у групи; ЕМС: етил метаносулфонат; СУН: цилиндроспермопсин
^{*}p < 0.05 у поређењу са негативном контролом
[†]p < 0.05 у поређењу са групом животиња третираних са СУН-ом
[‡]p < 0.05 у поређењу са ЕМС-ом

Као што се може видети у Табели 11, метанолски екстракт је показао генотоксични потенцијал у свим тестираним концентрацијама у поређењу са негативном контролном групом (p < 0.05).

Након 24 сата није уочена значајна разлика између група изложених метанолском екстракту у дози од 12 000 µg/kg и ЕМС ни по питању дужине репа, нити % ДНК у репу. У групама третираним екстрактом три параметра су се повећала у зависности од дозе, 12 000 µg/kg т.м. са дужином репа од 5.1, % ДНК у репу од 4.9, и средњим моментом репа од 27.5 пута изнад вредности негативне контроле. Приликом третмана вишим концентрацијама екстракта, примећено је повећање у моменту репа од приближно 1.17 пута више од вредности групе животиња третираних ЕМС-ом. Након 72-часовног излагања није било значајне разлике у % ДНК у репу између узорка третираних са 3 000

$\mu\text{g/kg}$ екстракта и ЕМС-ом. Третман највишом концентрацијом је значајно повећао фреквенцију дужине репа у поређењу са негативним и позитивним контролним групама (приближно 7.3 и 1.4 пута).



Слика 53. Микрофотографије дистрибуције "комета" у различите класе на основу степена оштећења након бојења са етидијум бромидом; Негативна контрола (А и В, 24 и 72 сата после третмана), ЕМС-ом третирани пацови (С и D, 24 и 72 сата после третмана), СУN-ом третирани пацови (Е и F, 24 и 72 сата после третмана), 1 500 $\mu\text{g/kg}$ т.м. (G и H, 24 и 72 сата после третмана), 3 000 $\mu\text{g/kg}$ т.м. (I и J, 24 и 72 сата после третмана), 6 000 $\mu\text{g/kg}$ т.м. (K и L, 24 и 72 сата после третмана) и 12 000 $\mu\text{g/kg}$ т.м. (M и N, 24 и 72 сата после третмана)

4.7.2. Утицај екстракта *R. raciborskii* на биохемијске параметре у серуму пацова соја Wistar

У циљу утврђивања степена оштећења јетре експерименталних животиња третираних метанолским екстрактом цијанобактерије *R. raciborskii*, испитан је ниво биохемијских параметара у серуму чија се неуобичајена активност или концентрација повезује са стањима токсичности и поремећаја у раду јетре. На основу резултата биохемијских параметара у серумима експерименталних животиња може се одредити ниво смањења функције и дијагностификовати степен промена. Биохемијским маркерима нормалног функционисања јетре испитана је ензимска активност аланин трансминазе (ALT), аспартат трансминазе (AST), алкалне фосфатазе (ALP) и гама глутамил трансферазе (GGT). Поред тога, у серумима је квантификована и количина укупних протеина (TP), укупни билирубини (TB), укупни албумини (ALB). Проучавани су ефекти различитих доза метанолског екстракта *R. raciborskii* и CYN-а у серуму код експерименталних група пацова. Активност AST, ALT, ALP и GGT ензима и нивои TP, TB и ALB мерени су након 24 и 72 часа и приказани у Табели 12. Анализа биохемијских параметара у серуму након 24 часа, показује да активност AST статистички значајно ($p < 0.05$) расте код група третираних са 1 500 и 12 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м, у односу на нетретирану групу. Поред тога, примећена је значајно смањена активност ALT и ALP ($p < 0.05$) у свим експерименталним групама 24 сата након третмана екстрактом, у односу на активност ових ензима у серуму нетретираних животиња. Код третмана са CYN-ом (79.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м.), активност AST и ALT ензима у серуму се значајно повећала ($p < 0.05$) у поређењу са нетретираном групом. Међутим, није било могуће открити значајније промене ($p > 0.05$) у серумској активности AST и ALT ензимских маркера у групама третираним екстрактом и CYN-ом након 72 сата, у поређењу са нетретираном групом. Активност ALP се смањила само када је екстракт примењен у дозама од 1 500 и 6 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м., а повећала се у серуму пацова у групи третираној са 79.80 μg CYN/kg т.м., након 72 h у поређењу са нетретираним животињама. Промене у активности AST и ALT су биле израженије 24 сата након интоксикације екстрактом или чистим токсином у односу на активност ових ензима 72 сата након интоксикације. Такође, чист токсин је проузроковао веће промене у активности AST и ALT у серуму него метанолски екстракт *R. raciborskii* након 24 сата. Ниједна од доза цијанобактеријског екстракта CYN-а није показала значајне промене ($p > 0.05$) у серумској активности GGT након 24 или 72 сата. Такође, у поређењу са контролном групом, нивои TP, TB и ALB су остали непромењени ($p > 0.05$) у свим експерименталним условима.

Табела 12. Утицај екстракта *R. raciborskii* на биохемијске параметре у серуму пацова соја Wistar.

Концентрација (mg/kg т.м.)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	TP (g/L)	TB ($\mu\text{mol/L}$)	ALB (g/L)
24 сата							
Контрола	142.58 \pm 7.87	55.66 \pm 2.73	659.5 \pm 46.51	4.38 \pm 0.64	65.61 \pm 1.35	2.42 \pm 0.28	27.29 \pm 1.09
CYN	483.20 \pm 68.55*	152.35 \pm 37.96*	536.30 \pm 23.07	2.50 \pm 0.28	69.85 \pm 1.15	0.81 \pm 0.01	24.70 \pm 1.81
1 500 $\mu\text{g/kg}$	176.97 \pm 13.60*	46.03 \pm 2.34*	438.63 \pm 63.01*	6.50 \pm 1.04	70.33 \pm 1.27	2.50 \pm 0.40	27.77 \pm 0.73
3 000 $\mu\text{g/kg}$	147.93 \pm 10.80	42.47 \pm 2.72*	402.23 \pm 55.88*	6.40 \pm 1.33	65.33 \pm 2.67	2.80 \pm 0.20	26.83 \pm 0.46
6 000 $\mu\text{g/kg}$	152.97 \pm 9.82	42.27 \pm 2.48*	419.71 \pm 41.44*	2.67 \pm 0.76	63.03 \pm 2.60	2.10 \pm 0.21	25.83 \pm 0.48
12 000 $\mu\text{g/kg}$	181.90 \pm 19.99*	44.63 \pm 1.77*	432.47 \pm 33.66*	4.47 \pm 0.84	67.86 \pm 2.61	2.30 \pm 0.10	27.34 \pm 0.77
72 сата							
Контрола	137.02 \pm 12.56	56.94 \pm 2.30	668.72 \pm 33.94	4.46 \pm 0.76	64.63 \pm 2.95	2.18 \pm 0.22	29.17 \pm 1.69
CYN	144.30 \pm 8.32	61.40 \pm 6.42	736.75 \pm 40.07*	2.90 \pm 0.36	60.85 \pm 0.65	0.87 \pm 0.06	17.50 \pm 0.40*
1 500 $\mu\text{g/kg}$	147.60 \pm 9.50	56.47 \pm 4.10	425.40 \pm 23.90*	2.37 \pm 0.52	67.20 \pm 2.00	2.90 \pm 0.64	26.76 \pm 0.93
3 000 $\mu\text{g/kg}$	141.37 \pm 14.00	57.07 \pm 2.30	616.13 \pm 9.25	3.77 \pm 0.38	65.03 \pm 1.14	2.37 \pm 0.40	27.48 \pm 0.54
6 000 $\mu\text{g/kg}$	158.90 \pm 15.27	49.83 \pm 4.24	413.50 \pm 39.30*	4.13 \pm 0.50	69.56 \pm 4.91	2.27 \pm 0.52	28.17 \pm 1.80
12 000 $\mu\text{g/kg}$	147.77 \pm 13.54	58.43 \pm 4.52	650.53 \pm 32.49	4.63 \pm 1.33	66.40 \pm 0.85	2.13 \pm 0.32	28.50 \pm 0.70

Резултати представљају средњу вредност \pm С.Д. из три независна експеримента; $n = 5$ животиња у групи; ALT: аланин трансаминазе; AST: аспартат трансаминазе; ALP: алкалне фосфатазе; GGT: гама глутамил трансферазе; TP: укупни протеини; TB: укупни билирубини; ALB: укупни албумини.

* $p < 0.05$ у поређењу са негативном контролом.

4.7.3. Ефекат екстракта *R. raciborskii* на активност антиоксидативних ензима у јетри пацова соја Wistar

Ефекти екстракта *R. raciborskii* на параметре оксидативног стреса (CAT, SOD, GSH и TBARS) у ткивима јетре експерименталних животиња представљени су у Табели 13.

У узорцима јетре код групе третиране екстрактом у концентрацији од 3 000 µg/kg т.м. (након 24 часа) уочено је највеће оксидативно оштећење, док се каталитичка активност CAT смањила на 53.6% вредности у односу на вредности измерене у контролној групи. При поређењу узорака третираних са CYN-ом и негативне контроле, каталитичка активност CAT се смањила на 56.4% у односу на негативну контролу. У узорцима животиња након 72 h, највеће оксидативно оштећење је забележено за екстракт у концентрацији од 6 000 µg/kg т.м., пошто се каталитичка активност CAT смањила на 50.5% у поређењу са вредношћу негативне контроле. CYN је изазвао мање оксидативно оштећење у поређењу са екстрактом у концентрацији од 6 000 µg/kg т.м., пошто се активност CAT смањила на 68.2% у односу на негативну контролу. Каталитичка активност SOD у узорцима животиња третираних екстрактом (3 000, 6 000 и 12 000 µg/kg т.м. након 24 часа), се значајно смањила ($p < 0.05$) у поређењу са нетретираним животињама. Највеће смањење је забележено код животиња третираних екстрактом у концентрацији од 3 000 µg/kg т.м. након 24 часа, док је после 72 часа екстракт у концентрацији од 6 000 µg/kg т.м. показао најизраженије смањење SOD (56.9%) у односу на вредност негативне контроле. У узорцима третираним са CYN-ом каталитичка активност SOD се смањила у односу на негативну контролу, показујући 65.9% (након 24 ч) и 76.6% (након 72 ч) активности кореспондирајућег ензима у контроли. Такође, највеће смањење концентрације GSH је код примене екстракта у концентрацији од 3 000 µg/kg т.м. након 24 h. Слични резултатима за примену екстракта у концентрацији од 3 000 µg/kg т.м. су били резултати анализе узорака третираних са CYN-ом. У јетри животиња третираних екстрактом у концентрацији од 6 000 µg/kg т.м. забележено је смањење концентрације редукованог глутатиона 65.4% у третману након 72 ч. Оштећење изазвано CYN-ом је било ниже у односу на узорке екстракта са концентрацијом од 6 000 µg/kg т.м.

На крају, ефекат администрације метанолског екстракта цијанобактерије *R. raciborskii* процењен је и мерењем нивоа TBARS као општим индикатором оксидативног стреса у хомогенату јетре и изражена је као pmol малондиалдехида (MDA)/mg протеина. Највиша концентрација је забележена у узорцима крви животиња третираним екстрактом у концентрацији од 1 500 µg/kg т.м., након 24 ч, тако што је концентрација TBARS била 1.69 пута изнад базалне вредности у негативној контроли. Такође, и након 72 ч екстракт у концентрацији од 1 500 µg/kg т.м. је проузроковао значајно оксидативно оштећење, 1.59 пута изнад вредности измерене у негативној контролној групи. Оксидативни стрес који је изазвао CYN је био нижи у односу на узорке животиња третираних са екстрактом у концентрацији 1 500 µg/kg т.м. (након 24 и 72 ч), пошто су концентрације TBARS биле 1.30 и 1.23 пута изнад вредности измерене у негативној контроли.

Табела 13. Ефекат метанолског екстракта *R. raciborskii* на активност антиоксидативних ензима у јетри пацова соја Wistar.

Концентрација mg/kg т.м.	CAT U/mg протеина	SOD U/mg протеина	GSH mg/g протеина	TBARS nmol MDA/mg протеина
24 h				
Контрола	61.14 ± 2.38	26.5 ± 1.35	51.86 ± 1.74	3.24 ± 0.31
CYN	34.41 ± 1.88*	17.45 ± 0.95*	31.97 ± 1.18*	4.22 ± 0.12*
1 500 µg/kg	54.59 ± 3.28	24.42 ± 1.26	56.03 ± 0.22	5.48 ± 0.26*
3 000 µg/kg	32.75 ± 3.22*	15.53 ± 1.73*	31.33 ± 1.47*	3.80 ± 0.09
6 000 µg/kg	39.48 ± 2.60*	18.25 ± 1.30*	41.72 ± 1.24*	4.61 ± 0.36*
12 000 µg/kg	40.20 ± 1.40*	18.73 ± 0.17*	37.67 ± 0.81*	4.74 ± 0.17*
72 h				
Контрола	59.96 ± 2.82	25.75 ± 1.51	54.91 ± 2.47	3.27 ± 0.30
CYN	40.88 ± 1.66*	19.22 ± 0.48*	44.08 ± 1.12	4.01 ± 0.09
1 500 µg/kg	48.71 ± 2.82*	23.12 ± 2.76	53.97 ± 1.82	5.20 ± 0.50*
3 000 µg/kg	45.17 ± 2.05*	22.85 ± 0.80	54.57 ± 1.43	4.04 ± 0.02*
6 000 µg/kg	30.20 ± 2.31*	14.65 ± 0.54*	35.92 ± 2.10*	3.41 ± 0.31
12 000 µg/kg	49.73 ± 1.75*	19.31 ± 0.33*	39.48 ± 1.91*	3.71 ± 0.40

Резултати представљају средњу вредност ± С.Д. из три независна експеримента; n = 5 животиња у групи; CYN: цилиндропермопсин; каталаза (CAT); супероксид дисмутаза (SOD); редуковани глутатион (GSH); параметри липидне пероксидације (TBARS). *p < 0.05 у односу на контролу,

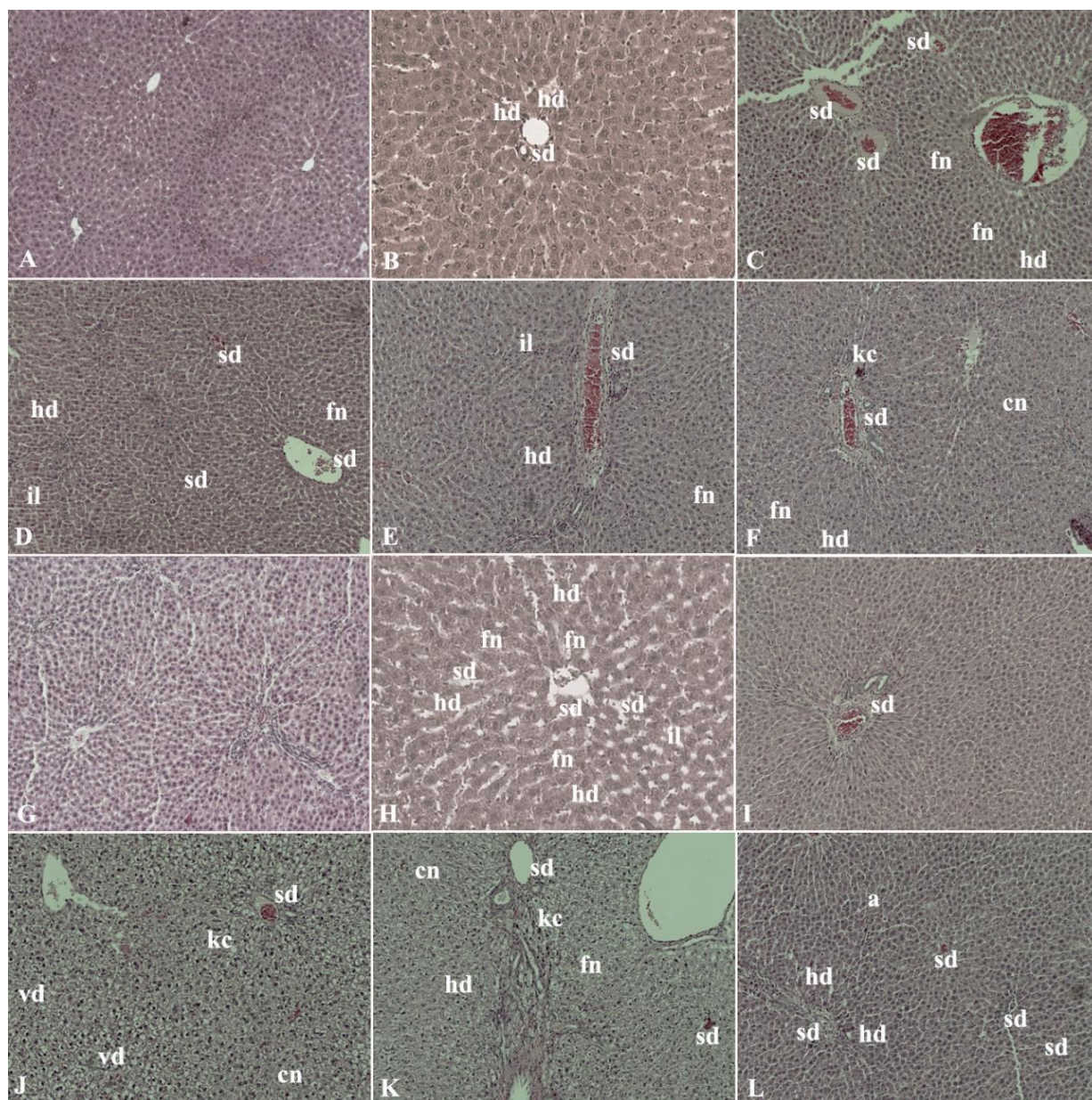
4.7.4. Ефекти метанолског екстракта *R. raciborskii* на морфолошке параметре у јетри пацова соја Wistar

Као што је показано у Табели 14 и на Слици 53, ткиво јетре пацова из контролне групе је показивало нормалну ћелијску структуру са јасно уочљивим ћелијама јетре и синусоидном просторном структуром (Слика 53А, 53Г). Код животиња третираних са CYN-ом, препарати јетре су показивали већа оштећења након 72 ч него након 24 ч. Ово оштећење се углавном огледало кроз: синусоидну дилатацију централне вене, хидропсну дегенерацију и интралобуларну инфилтрацију лимфоцита (Слика 53В, 53Н). Фокална некроза јетре пацова третираних са CYN-ом након 72 ч је била центрилобуларна и локализована око централних вена. Препарати јетре група третираних екстрактом су показали синусоидну дилатацију, хидропсну дегенерацију, интралобуларну инфилтрацију лимфоцита и фокалну литичку некрозу (Слика 53С-53Л). Такође је дошло и до вакуоларне дегенерације, апоптозе и хипертрофије Купферових ћелија (Слика 53Ј-53К). Међутим, најозбиљније оштећење ткива јетре је примећено након 72 ч у групи којој је дат екстракт у концентрацијама од 3 000 и 6 000 µg/kg т.м. Препарати јетре пацова из групе којој је дат екстракт у концентрацији од 1 500 µg/kg т.м. су показали мање патоморфолошке промене, сличније оним из контролне групе након 72 ч.

Табела 14. Ефекти метанолског екстракта *R. raciborskii* на морфолошке параметре у јетри пацова.

Хистопатолошки параметри јетре								
Концентрација mg/kg т.м.	Синусоидна дилатација централне вене	Хидропсна дегенерација	Вакуоларна дегенерација	Интралобуларна инфилтрација лимфоцита	Фокална некроза	Конфлуентна некроза	Апоптоза	Хипертрофија Купферових ћелија
24 сата								
Контрола	-	-	-	-	-	-	-	-
CYN	++	+	-	-	-	-	-	-
1 500 µg/kg	++	+	-	-	+	-	-	-
3 000 µg/kg	+	+	-	++	+	-	+	-
6 000 µg/kg	+	+	-	+	++		-	-
12 000 µg/kg	++	+	-	-	++	++	-	+
72 сата								
Контрола	-	-	-	-	-	-	-	-
CYN	+++	++	-	+	++	-	-	+
1 500 µg/kg	+	-	-	-	-	-	-	-
3 000 µg/kg	++	-	+++	+	+	++	+	+
6 000 µg/kg	++	++	+	-	++	+	-	+
12 000 µg/kg	+	+	-	-	+	-	+	-

^a Промене: (-), одсуство; (+), благе; (++) , средње; (+++) , изражене; CYN: цилиндропермопсин.



Слика 54. Репрезентативне микрофотографије ткивних препарата јетре пацова: А – контрола, 24 сата после третмана; В – CYN-ом третирани пацови, 24 сата после третмана; С – 1500 µg/kg т.м., 24 сата после третмана; D – 3000 µg/kg т.м, 24 сата после третмана; Е – 6000 µg/kg т.м, 24 сата после третмана; F – 12000 µg/kg т.м, 24 сата после третмана; G – контролна група, 72 сата после третмана; H – CYN-ом третирани пацови, 72 сата после третмана; I – 1500 µg/kg т.м, 72 сата после третмана; J – 3000 µg/kg т.м, 72 сата после третмана; K – 6000 µg/kg т.м, 72 сата после третмана; L – 12000 µg/kg т.м, 72 сата после третмана. Увећање, 100x и 200x. Ознаке: sd – синусоидна дилатација централне вене; hd – хидропсна дегенерација; vd – вакуоларна дегенерација; il – интралобуларна инфилтрација лимфоцита; fn – фокална некроза; cn – конфлуентна некроза; а – апоптоза; kc – хипертрофија Купферових ћелија

5. Дискусија

Познавање дејства еколошких фактора који утичу на састав и динамику фитопланктонских цијанобактерија од кључне је важности како би се спровело адекватно управљање и праћење водних ресурса у циљу контроле ризика (Humbert и Fastner 2017). Велики број досадашњих студија сведочи о постојању јаког утицаја срединских параметара на фитопланктонске цијанобактерије (Znachor и сар., 2008; Zohary и сар., 2010; Wojsiechowski и Radial, 2015). Механизми дејства срединских фактора нису још увек потпуно јасни, иако су спроведена многа истраживања (Zohary и сар., 2010). Последњих деценија спроведена су бројна истраживања цијанобактерија и у Србији. Истраживања на акумулацијама за водоснабдевање била су бројна и континуирана (Karadžić и сар., 2010; Sedmak и Svirčev, 2011; Kostić и сар., 2016; Svirčev и сар., 2017; Blagojević Ponjavić и сар., 2019; Trbojević и сар., 2019a, 2019b), а мале акумулације праћене су спорадично, у различитим периодима или једнократно у летњим месецима (Jovanović и сар., 2017; Jovanović, 2020). Са друге стране, велики је број доступних података и о барама, рибњацима и акумулацијама на територији Војводине (Drobac и сар., 2016; Tokodi и сар., 2018; Tokodi и сар., 2020). Управо су све учесталија појава цветања цијанобактерија, али и учесталији налази алохтоних врста, последњих година довели у фокус цијанобактерије и у Србији, па се осим присуства и бројности прате и фактори који доводе до њихове појаве и пренамножавања (Karadžić и сар., 2013; Đorđević и Simić, 2014; Jovanović и сар., 2017; Predojević, 2017; Simić и сар., 2017; Jovanović, 2020).

Нарочито се прате промене еколошких услова изазване екстремним климатским појавама које су све чешће последњих година. Међународна комисија о климатским променама донела је резолуцију о утицају климатских промена на водене ресурсе (IPCC, 2014). На основу праћења климатских параметара у свету, али и у Србији, уочавају се одређене промене, уочава се неправилност у смењивању екстремно сушних, са екстремно влажним периодима, праћеним поплавама (RHMZ, 2015). Анализом статистичких података до 2012. године уочен је пораст температуре на годишњем нивоу, и просечно смањење падавина (RHMZ, 2013). Слично је било и са мереним параметрима на територији Крагујевца и Врања, на чијој се територији налазе акумулације које су биле предмет истраживања у оквиру ове дисертације. Током три године, од 2012. до 2014. године, смењивали су се различити метеоролошки услови. Лето 2012. године је било екстремно топло и најсушније од 1951. године, а уједно је то била и седма најтоплија година од кад се врше мерења (RHMZ, 2013). Након екстремно топле 2013. године, 2014. је најкишовитија година од 1951. године (RHMZ, 2014; 2015). 2014. је била година са и даље високим температурама и изузетно великом количином падавина, праћеном екстремним поплавама на територији читаве Србије и региона (RHMZ, 2015). Промене климатских фактора могу да имају јак утицај на структуру и динамику фитопланктонских цијанобактерија малих акумулација (Yang и сар., 2016). Као последица промене климатских фактора долази често до варијације и промена и срединских фактора. Углавном су велике падавине у малим акумулацијама доводиле до смањења бројности фитопланктона (Stević, 2011; Wood и сар., 2017; Jovanović, 2020) или пак до појаве цветања одређених врста фитопланктонских цијанобактерија (Yang и сар., 2016; Simić и сар., 2017).

Истовремено истраживање три мале акумулације, три узастопне године сваког месеца, допринела су да се потврди да нису добри уопштени закључци о томе како долази до цијанобактеријских цветања и који су то услови који га детерминишу, већ да су свака акумулација, и свака појава цветања различитих цијанобактеријских врста, биле

детерминисане одређеним еколошким параметрима или, чешће, комбинацијом тих параметара.

Упоредним мониторингом акумулација Шумарице, Бубањ и Александровачке акумулације утврђено је да су се у истим климатским и метеоролошким условима развијале различите фитопланктонске цијанобактерије и да је појава одређених врста била условљена специфичним еколошким факторима.

У акумулацији Шумарице констатовано је 13 таксона фитопланктонских цијанобактерија. Појава таксона, а посебно њихова бројност и динамика, су били јасно условљени променама физичких и хемијских параметара, што може да се уочи када се анализирају резултати добијени СОМ анализом. Овом анализом су сви прикупљени узорци на основу сличности/различитости физичких и хемијских параметара сврстани у три групе (I, II и III). Услови који су карактеристични за узорке сврстане у одређене групе су погодовали појави и развоју одређених цијанобактеријских таксона.

У акумулацији Шумарице I групу су формирали неурони који одговарају узорцима где је измерена ниска температура воде (5.6-16.1°C), електропроводљивост (302-350 $\mu\text{S}/\text{cm}$), ниске вредности минералног састава и то концентрације укупног N (0.102-0.688 mg/L), укупног P (0.003-0.083 mg/L), амонијумовог јона (0.03-0.3 mg/L) и највећа провидност воде (1-3 m). Анализом СОМ мреже уочава се да су узорци који су распоређени у оквиру I групе прикупљени током зимских месеци, изузев неурона који одговарају узорцима који су прикупљени у новембру 2012, 2013. и 2014., али и априлу 2014. године. Упоредном анализом дводимензионалне СОМ мреже класификованих узорака и биотичких параметара I групе уочава се да су се у том периоду вредности концентрације хлорофила *a* кретале од 2.31 до 69.3 $\mu\text{g}/\text{L}$, укупна бројност фитопланктона је била најмања 60 до 447 000 ћел/ mL , као и бројност (0-430 000 ћел/ mL) и биомаса цијанобактерија (0-176.4 mg/L). Цијанобактерије нису евидентирани у јануару и фебруару током трогодишњег мониторинга акумулације Шумарице. Услови који су карактеристични за узорке који су груписани у оквиру I групе су погодовали развоју пет цијанобактеријских таксона: *Aphanizomenon flos aquae*, *Chrysochloris minus*, *Oscillatoria* sp., *Oscillatoria tenuis* и *Limnococcus limneticus*.

Највећи број неурона је распоређен у оквиру II групе. Уколико издвојимо неуроне који су претходно дефинисани у оквиру I и III групе, коју чини само 5 неурона (углавном летњи период 2014. године), сви остали неурони су груписани у оквиру II групе. Ова група је изузетно разнолика и формирали су је узорци код којих је измерена температура у распону од 13.6 до 30.25°C, концентрације укупног N у распону од 0.09 до 0.551 mg/L, укупног P од 0.003 до 0.310 mg/L, ниске концентрације амонијумовог јона (0.01-0.6 mg/L) и провидност воде у опсегу од 0.3 до 2.8 m. Електропроводљивост воде у овом периоду није била значајно промењена у односу на прву групу (335-443 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Анализом издвојених неурона II групе и биотичких параметара, показано је да се вредност концентрације хлорофила *a* кретала од 5.41 до 117 $\mu\text{g}/\text{L}$, да је укупна бројност фитопланктона знатно већа него у групи I (400-4 120 000 ћел/ mL), исто као и бројност цијанобактерија (920-4 040 000 ћел/ mL). Биомаса цијанобактерија је, такође, повећана (0.13-1 610 mg/L). Осим евидентног пораста у бројности фитопланктона и цијанобактерија у односу на I групу неурона, повећан је и број присутних таксона (12). Упоредном анализом издвојених узорака на СОМ мрежи и присутних таксона цијанобактерија уочава

се да су у свим узорцима II групе цијанобактерије биле присутне. Најчесталији таксони били су: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* и *Limnococcus limneticus*.

Трећу групу неурона, издвојену СОМ анализом, карактеришу повећане вредности следећих срединских параметара: температуре (16-27°C), вредности минералног састава и то концентрације укупног N (0.767-6.828 mg/L), укупног P (0.059-0.252 mg/L) и амонијумовог јона (0.01-0.504 mg/L). Провидност воде је значајно мања (0.3-1.2 m). Електропроводљивост воде у овом периоду није била значајно промењена у односу на прву и другу групу (327-430 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Упоредном анализом дводимензионалне СОМ мреже класификованих узорака на основу срединских параметара и биотичких параметара III групе уочава се да су се повећале вредности: концентрације хлорофила *a* у распону од 29.7 до 118.5 $\mu\text{g}/\text{L}$, укупне бројности фитопланктона од 123 400 ћел/ mL до 4 010 000 ћел/ mL , бројности цијанобактерија (19 850-3 930 000 ћел/ mL) и биомасе цијанобактерија (1.23-1567.8 mg/L). Број таксона цијанобактерија је мањи у односу на II групу. Забележено је присуство: *Chrysoosporum minus*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Limnococcus limneticus*, *Merismopedia* sp., *Oscillatoria tenuis* и *Snowella lacustris*. Најдоминантнији таксон је *Aphanizomenon flos-aquae*. Од септембра до децембра 2014. године у акумулацији Шумарице забележено је присуство само једне врсте цијанобактерија – *Aphanizomenon flos-aquae*. Ова врста је изазвала цветање воде. То је била прва појава цијанобактеријског цветања у акумулацији Шумарице забележена од формирања акумулације (Ranković и сар., 2006).

Aphanizomenon flos-aquae је један од најчешће идентификованих таксона цијанобактерија у водама Србије. Најчешће се јавља у барама, акумулацијама за снабдевање водом за пиће и наводњавање, али и каналима, рибањацима, језерима и рекама Републике Србије (Јовановић, 2020).

Многи аутори сугеришу да је развој популације *Aphanizomenon flos-aquae* у јакој вези са температуром воде и малим односом TN/TP (Smith и сар., 1995; Teubner и сар., 1999; Laamanen и Kuosa, 2005). Макронутријенти, фосфор и азот, су по многим ауторима пресудни за развој фитопланктонских цијанобактерија у воденим екосистемима (Rhee и Gotham, 1981; Laamanen и Kuosa, 2005; Zohary и сар., 2010). Сматра се да је за појаву цветања цијанобактерија доступност фосфора основни лимитирајући фактор, али и то да повишен фосфор у односу на азот погодује и фаворизује формирање цијанобактеријског цветања (Downing и сар., 2001; Paerl и Paul, 2012). У појединим интензивно еутрофним водама, количина фосфора може бити толико велика да количина доступног азота постаје фактор који контролише примарну продукцију. У таквим случајевима, после извесног периода мировања појавиће се нека врста цијанобактерија која је азотофиксатор (Denić и сар., 2015). Важно је поменути да чак и код акумулација код којих је алгални раст лимитиран количином азота, редукција унетог фосфора може унапредити квалитет воде, уколико је извршена у тој мери да фосфор постане ограничавајући елемент (Jones и Lee, 1982). Многе студије (Smith и сар., 1995; Havens, 1995a; Havens, 1995b; Havens и сар., 2003; Ekholm, 2008) на основу резултата биотест експеримената сугеришу да масени однос TN:TP изнад 17 указује да је фосфор лимитирајући фактор развоја фитопланктона, однос испод 10 указује да је азот лимитирајући фактор, а вредности између 10 и 17 указују на коограничења азотом и фосфором (Denić и сар., 2015). Одговарајући односи за које се наводи да не погодују развоју цијанобактерија су >38, односно <22 и 22-38. Низак однос TN:TP у акумулацијама води ка доминацији цијанобактерија. Према Smith и сар., (1995)

однос TN:TP у води језера испод 22:1 фаворизује доминацију азотофиксаторских цијанобактерија (Denić и сар., 2015).

У акумулацији Шумарице пре почетка појаве цветања однос TN:TP био је изузетно висок (68:1) као последица повишених вредности укупног азота. Управо ово је потврђено и СОМ анализом. Еколошки услови који су претходили појави интензивног цветања врсте *Aphanizomenon flos-aquae* издвојени су као посебни неурони у оквиру III групе. У акумулацији Шумарице у моменту цветања однос TN:TP је био у распону од 4.7:1 до 15:1. Висок однос TN:TP у јулу месецу 2014. године може се објаснити порастом нивоа септичких јама и изливањем канализације која се због позиције саме акумулације улила заједно са падавинама у акумулацију након велике количине киша. У случају акумулације Шумарице екстремне падавине у 2014. години су довеле до епизодног повећања концентрације хранљивих материја, а самим тим и до промене у заједници цијанобактерија. На основу индекса трофичности можемо уочити погоршање трофичког статуса акумулације након поплава у 2014. години, и прелазак из једне мезотрофне и еутрофне у хипереутрофну акумулацију. Након поплава долази до повећања концентрације хранљивих материја услед испирања и акумулације органских материја из околине обрасле вегетацијом. Тако поплавно подручје служи као „зона складиштења и промета органске материје“ (Keckeis и сар., 2003; Pithart и сар., 2007). Хипереутрофикација, мала провидност и цветање *Aphanizomenon flos-aquae* у акумулацији Шумарице појавили су се након периода обилних киша, када је дошло до успостављања одговарајућих физичких и хемијских услова: максимална забележена температура воде 27-30°C и максимална концентрације нутријената TP - 0.310 mg/L, TN - 6.828 mg/L. У свим претходно наведеним истраживањима веза између цијанобактеријског цветања и срединских параметара утврђена је након истовременог узорковања. Међутим, Wojsiechowski и Radial (2015) наводе да то није одговарајући приступ, јер фитопланктон реагује на претходно стање екосистема и стога наглашавају важност праћења корелације цијанобактерија са факторима животне средине који су постојали у периоду пре појаве цветања. Управо је то потврђено и у овој студији где постоји висока повезаност свих фактора пре и током појаве цветања. Из свега наведеног, евидентно је да су почетак развоја и цветање цијанобактерија у Шумаричком језеру током 2014. године, као и трајање цветања, били уско повезани са појавом и интензитетом поплава. Ово је у складу са истраживањима Reynolds и Petersen (2000) који су утврдили да су физички фактори најважнији за развој цијанобактерија и тек када се успоставе одговарајући физички услови, хемијски фактори играју пресудну улогу, посебно количина и однос хранљивих материја. Наши резултати указују да је акцидентни пораст нутријената у акумулацији проузроковао убрзани развој и цветање врсте *Aphanizomenon flos-aquae*. Ове тврдње су видљиве и у резултатима ове студије, где је постојање зависности потврђено СОМ анализом.

Када говоримо о нивоима ризика и здравственој угрожености која је у вези са абунданцом цијанобактерија, најчешће се користе препоруке СЗО за рекреативне воде, на основу којих постоје три нивоа ризика (WHO, 2003). Низак ниво ризика је дефинисан када је бројност цијанобактерија испод 20 000 ћел/мL, средњи ниво ризика је дефинисан за бројности цијанобактерија у распону од 20 000 до 100 000 ћел/мL, док се за висок ниво ризика сматра када бројност цијанобактерија пређе 100 000 ћел/мL. У периоду ниског водостаја током 2012. и 2013. године, бројност цијанобактерија акумулације Шумарице није прелазила 6 400 ћел/мL и била је у складу са препорукама СЗО за управљање водама

за рекреацију указујући на низак степен ризика (Chorus и Bartman, 1999; WHO, 2003; Chorus, 2012). Међутим, концентрација хелија цијанобактерија, пре свега врсте *Aphanizomenon flos-aquae*, допринела је да укупна бројност током 2014. године пређе 100 000 ћел/мL, односно указивала је на велику здравствену угроженост, тј. висок ниво ризика према препорукама СЗО.

Иако подаци указују да је чак 70% слатководних цветања глобално токсично (Scholz и сар., 2017), нису сви сојеви цијанобактерија токсични и цветање није увек повезано са појавом токсина (Merel и сар., 2013). СЗО препоручује да је опрез неопходан и да сваку популацију цијанобактерија треба нужно третирати као потенцијално токсичну (WHO, 2003). Познато је да су цијанобактерије из рода *Aphanizomenon* потенцијално токсичне и да продукују микроцистин, анатоксин (Cirés и Ballot 2016), сакситоксин (Ferreira и сар., 2001; Liu и сар., 2006) и цилиндроспермопсин (Preussel и сар., 2006; Vlahova и сар., 2009). Анализама HPLC-PDA воде из акумулације Шумарице у периоду цветања врсте *Aphanizomenon flos-aquae* нису детектовани испитивани цијанотоксини (микроцистини, цилиндроспермопсин, анатоксин и сакситоксин). Појава нетоксичних сојева ове врсте је, такође, више пута детектована у свету (Ballot и сар., 2010). Цијанотоксини се продукују уколико постоји ген за њихову синтезу у оквиру одређеног соја. Дешава се чак и да токсични сојеви не продукују токсине, и сматра се да способност активације одређених гена зависи и од еколошких услова (Merel и сар., 2013).

Испитивање акумулације Бубањ, која се, такође, налази на територији града Крагујевца у истим метеоролошким и климатским условима као акумулација Шумарице, у периоду од 2012. до 2014. године изнедрило је потпуно другачије резултате у односу на поменути акумулацију. И овде се СОМ анализом на основу сличности физичких и хемијских параметара издвајају три групе неурона, које одговарају одређеним параметрима који карактеришу заједницу фитопланктона, а посебно појаву, бројност и биомасу фитопланктонских цијанобактерија.

Анализом СОМ мреже акумулације Бубањ уочава се да су узорци који су распоређени у оквиру I групе прикупљени током зимских месеци, изузев неурона који одговарају узорцима који су прикупљени у новембру 2014. године. Најмањи број неурона је распоређен у оквиру I групе. У акумулацији Бубањ I групу су формирали неурони који одговарају узорцима где су измерене најниже вредности за температуру воде (4.2-12.6°C), концентрацију укупног N (0.203-0.406 mg/L), укупног P (0.02-0.297 mg/L), амонијумовог јона (0.02-0.09 mg/L). Електропроводљивост је била у распону од 580 до 690 $\mu\text{S}/\text{cm}$, док је провидност воде била највиша, од 1.1 до 1.8 m. Анализом издвојених неурона I групе и биотичких параметара, вредност концентрације хлорофила *a* кретала се од 4.40 $\mu\text{g}/\text{L}$ до 28.99 $\mu\text{g}/\text{L}$, укупна бројност фитопланктона од 80 ћел/мL до 21 430 ћел/мL, бројност цијанобактерија од 0 до 12 300 ћел/мL и биомасе цијанобактерија од 0 до 4.7 mg/L. Упоредном анализом издвојених узорка на СОМ мрежи и присутних таксона цијанобактерија уочава се да у јануару месецу током све три године испитивања није забележен ни један цијанобактеријски таксон, док је за остале издвојене узорке I групе карактеристично присуство: *Lyngbya* sp., *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis wesenbergii*, *Oscillatoria tenuis*, *Pseudoanabaena* sp. и *Woronichinia compacta*.

Друга група код акумулације Бубањ је изузетно разнолика и формирали су је узорци где су у односу на неуроне I групе измерене повећане вредности температуре воде (12.3-26.3°C), минералног састава и то концентрације укупног N (0.181-0.564 mg/L),

укупног Р (0.02-0.056 mg/L) и амонијумовог јона (0.02-0.42 mg/L). Дошло је до промене електропроводљивости, бележе се благо повишене вредности у односу на претходну групу (360-820 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Провидност воде се смањивала и до 0.8 m. Упоредном анализом дводимензионалне СОМ мреже класификованих узорака и биотичких параметара II групе уочава се да су се вредности концентрације хлорофила *a* повећале и кретале су се од 7.04 $\mu\text{g}/\text{L}$ до 34.6 $\mu\text{g}/\text{L}$. Значајно је увећана и укупна бројност фитопланктона, од 7 300 ћел/мL до 98 400 ћел/мL, као и бројност (3 670-71 200 ћел/мL) и биомаса цијанобактерија (2.90-62.6 mg/L). Услови који су карактеристични за узорке који су груписани у оквиру II групе су погодовали развоју девет цијанобактеријских таксона: *Gloeocapsa* sp., *Lyngbya* sp., *Merismopedia tenuissima*, *Merismopedia tranquilla*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria tenuis*, *Pseudoanabaena limnetica*, *Pseudoanabaena* sp. и *Woronichinia compacta*.

У III групу СОМ анализом је издвојен највећи број узорака из језера Бубањ. Ова анализа је повезала неуроне III групе са највишим мереним вредности срединских параметара у овом воденом екосистему, па је овде температура у распону 13.3-30.6°C, концентрација укупног N у распону од 0.316 до 1.242 mg/L, укупног Р од 0.036 до 0.759 mg/L, а концентрација амонијумовог јона у опсегу од 0.02 до 0.310 mg/L). Електропроводљивост није значајно измењена у односу на претходну групу (440-835 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Провидност воде је од 1.8 до 0.4 m, што је уједно најмања провидност измерена у овом воденом екосистему. Упоредном анализом дводимензионалне СОМ мреже класификованих узорака на основу срединских параметара и биотичких параметара III групе уочава се да су се у овој групи и вредности биотичких параметара значајно увећавале. Вредности концентрације хлорофила *a* су биле од 5.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ до 46.8 $\mu\text{g}/\text{L}$, укупна бројност фитопланктона од 30 500 ћел/мL до 189 900 ћел/мL, бројност од 9 540 до 163 200 ћел/мL и биомаса цијанобактерија од 8.2 до 141.6 mg/L. Повећан је и број забележених таксона цијанобактерија: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chroococcus turgidus*, *Chrysochloris bergii*, *Lyngbya* sp., *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Oscillatoria limosa*, *O. tenuis*, *Phormidium* sp., *Pseudoanabaena limnetica* и *Woronichinia compacta*.

Microcystis aeruginosa је врста која се јављала у свим месецима истраживања од 2012. до 2014. године, изузев јануара (2013. и 2014. године) и фебруара (2014. године). У августу 2012. године у акумулацији Бубањ евидентирана је појава цветања ове врсте (163 200 ћел/мL). Појава цветања *M. aeruginosa* (Simić и сар., 1994; Ostojić и сар., 1995) и доминација поменутог таксона (Ranković и сар., 2006) је бележена и при ранијим истраживањима овог воденог екосистема. Врста *Microcystis aeruginosa* је поред врсте *Aphanizomenon flos-aquae* у водама Србије један од најчешће идентификованих таксона Цианобактерија. То је врста са далеко највећим бројем налаза у многим акумулацијама и језерима (Јовановић, 2020).

Кокоидне цијанобактерије, а посебно представници рода *Microcystis*, услед физиолошких адаптација успевају да доминирају у акумулацијама умерене зоне са ниским концентрацијама раствореног фосфора, и у тим условима бољи су компетитори у односу на остале цијанобактерије и еукариотске алге (Suthers и Rissik, 2009; Gobler и сар., 2016;). Врста *M. aeruginosa* је цветала у августу 2012. године када је просечна температура воде износила 28.4°C, средња вредност концентрације амонијака била 0.086 mg/L, вредност концентрације укупног азота била 0.489 mg/L, док је вредност концентрације укупног фосфора износила 0.112 mg/L. У периоду интензивног цветања врсте *M. aeruginosa* однос

укупног азота и фосфора (TN:TP) износио је 5.4. Пре појаве цветања врсте *M. aeruginosa* температура воде је била повишена (30.4°C), средња вредност концентрације амонијака је била у распону од 0.122 до 0.02 mg/L, вредност концентрације укупног азота је била 0.36 mg/L, док је вредност концентрације укупног фосфора износила 0.562 mg/L.

За разлику од акумулације Шумарице, када је до цветања цијанобактерија дошло 2014. године након обилних пролећних падавина, у језеру Бубањ су у том периоду забележене најниже вредности бројности фитопланктонских цијанобактерија. После интензивних мајских киша забележене су најниже вредности бројности фитопланктонских цијанобактерија у јуну (3 843 ћел/mL) и јулу (4 510 ћел/mL) и имале су удела од 18.7 до 19.24% у укупној абунданци фитопланктона. То су и најниже забележене бројности цијанобактерија у акумулацији Бубањ у летњем периоду. Након поплава у 2014. години у акумулацији Бубањ дошло је до смањење нивоа трофије (прелазак из хипереутрофне у еутрофну акумулацију). Мihaljević и Stević (2011) и Stević (2011), такође, указују да екстремне падавине могу побољшати услове водених екосистема, уз напомену да летње поплаве узрокују смањење укупне биомасе фитопланктона. Wood и сар., (2017) и Jovanović (2020) такође сугеришу да су повећана замућеност и разблажење узроковано падавинама такви метеоролошки феномени који могу довести до смањења биомасе цијанобактерија, па чак и потпуног урушавања „цвета“.

Када је реч о препорукама СЗО за управљање водама за рекреацију, бројност цијанобактерија акумулације Бубањ у периоду ниског водостаја, током 2012. и 2013. године је прелазила 100 000 ћел/mL и указивала на висок степен ризика поготово у периоду доминације и цветања врсте *M. aeruginosa* (163 200 ћел/mL) (Chorus и Bartman, 1999; WHO, 2003; Chorus, 2012). Након интензивних падавина у 2014. години први пут су бројности цијанобактерија (3 843-4 510 ћел/mL) у акумулацији Бубањ према препорукама СЗО указивале на низак ниво здравственог ризика.

Врста *Microcystis aeruginosa* је потенцијални продуцент цијанотоксина и то најчешће микроцистина. Истраживања су потврдила да поред микроцистина овај род може да продукује и анатоксин (Meriluoto и сар., 2017). Висок ниво фосфора потенцијално може да утиче на концентрацију микроцистина по ћелији појединих цијанобактерија (Davis и сар., 2009). Истраживања која су спроведена у лабораторијским условима показују да на фаворизовање токсичних сојева у односу на нетоксичне важну улогу игра повећање концентрације азота, али у случају природних популација то није доказано (Davis и сар., 2009). СЗО је дефинисала да је максимално дозвољена концентрација микроцистина за воду која се користи за пиће 1 µg/l (WHO, 2003). Анализама HPLC-PDA воде из акумулација Бубањ нису потврђени испитивани цијанотоксини (микроцистини, цилиндроспермопсин, анатоксин и сакситоксин).

Акумулације Шумарице и Бубањ по Ilies-у (Ilies, 1978) припадају екорегиону 5 и карактерише их појава и цветање често налажених цијанобактерија у Србији и акумулацијама сличних морфометријских еколошких услова. За разлику од акумулација Шумарице и Бубањ, Александровачка акумулације припада екорегиону 7 и значајно се разликује по многим еколошким параметрима, а то је условило развој потпуно специфичних таксона цијанобактерија. Применом СОМ анализе и овде су на основу физичких и хемијских параметара узорци разврстани у три групе неурона, које се преклапају са специфичним вредностима биотичких параметара.

Анализом резултата Александровачке акумулације утврђено је да су на СОМ мрежи I групу формирали неурони који одговарају узорцима где је измерена ниска температура воде (1.9-11.3°C), електропроводљивост (400-449 $\mu\text{S}/\text{cm}$), ниске вредности минералног састава и то концентрације укупног N (0.135-0.339 mg/L), укупног P (0.02-0.026 mg/L), амонијумовог јона (0.01-0.05 mg/L) и провидности воде (0.2-1.4 m). Анализом СОМ мреже уочава се да су узорци који су распоређени у оквиру I групе прикупљени током зимских месеци, изузев неурона који одговарају узорцима који су прикупљени у новембру 2014. године. Упоредном анализом дводимензионалне СОМ мреже класификованих узорака и биотичких параметара I групе уочава се да су се вредности концентрације хлорофила *a* кретале од 6.21 до 110.0 $\mu\text{g}/\text{L}$, укупна бројност фитопланктона је била најмања, у распону од 110 ћел/ mL до 16 900 ћел/ mL , као и бројност (0-9 800 ћел/ mL) и биомаса цијанобактерија (0-12.1 mg/L). Цијанобактерије нису евидентирани у јануару 2014. године. Услови који су карактеристични за узорке који су груписани у оквиру I групе су погодовали развоју следећих цијанобактеријских таксона: *Chrysochloris bergii*, *Limnothrix redekei*, *Oscillatoria limosa*, *Planktolyngbya limnetica*, *Pseudanabaena limnetica*, *Planktothrix* sp. и *Raphidiopsis raciborskii*.

Највећи број неурона је распоређен у оквиру II групе. Уколико издвојимо неуроне који су претходно дефинисани у оквиру I групе и III групе коју чини само 8 неурона (углавном летњи период 2012. и 2013. године) сви остали неурони су груписани у оквиру II групе. Ова група је изузетно разнолика и формирали су је узорци где је измерена температура у распону од 12 до 28.6°C, непромењене вредности електропроводљивости (400-489 $\mu\text{S}/\text{cm}$) у односу на прву групу, повишене вредности минералног састава и то концентрације укупног N (0.203-1.061 mg/L), укупног P (0.020-0.396 mg/L), амонијумовог јона (0.01-0.43 mg/L) и провидности воде (0.15-1 m). Анализом издвојених неурона II групе и биотичких параметара, вредности концентрације хлорофила *a* су знатно веће и кретале се од 10.11 до 356.0 $\mu\text{g}/\text{L}$, али веће су и укупна бројност фитопланктона (9 800 -19 240 000 ћел/ mL), као и бројност (5 240-19 040 000 ћел/ mL) и биомаса цијанобактерија (6.5-2 339 mg/L). Евидентан је пораст у бројности и биомаси фитопланктона и цијанобактерија у односу на I групу неурона, али и број присутних таксона цијанобактерија (20). Услови који су карактеристични за узорке који су груписани у оквиру II групе су одговарали развоју следећих цијанобактеријских таксона: *Anabaenopsis elenkinii*, *Aphanocapsa grevillei*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chroococcus minutus*, *Chroococcus turgidus*, *Chrysochloris bergii*, *Cylindrospermum stagnale*, *Glaucospira laxissima*, *Limnothrix redekei*, *Lyngbya aestuarii*, *Merismopedia glauca*, *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria limosa*, *Planktolyngbya limnetica*, *Pseudanabaena limnetica*, *Planktothrix* sp., *Raphidiopsis raciborskii* и *Synechococcus lividus*. Упоредном анализом издвојених узорака на СОМ мрежи и присутних таксона цијанобактерија уочава се да су у свим узорцима II групе цијанобактерије биле присутне.

Насупрот I групе, СОМ анализа је потврдила да се високе вредности срединских параметара поред II преклапају и са неуронима III групе: температура у распону од 17.8 до 28.9°C), електропроводљивост од 424 до 490 $\mu\text{S}/\text{cm}$, концентрације укупног N од 0.090 до 0.926 mg/L, укупног P од 0.020 до 0.881 mg/L, амонијумовог јона од 0.020 до 0.440 mg/L и провидност воде од 0.2 до 1.3 m. Упоредном анализом дводимензионалне СОМ мреже класификованих узорака на основу срединских параметара и биотичких параметара III групе Александровачке акумулације уочава се да су се вредности концентрације хлорофила *a* кретале од 30.0 до 410.0 $\mu\text{g}/\text{L}$, укупна бројност фитопланктона од 17 600 до

19 210 000 ћел/mL, бројност цијанобактерија од 11 320 до 19 060 000 ћел/mL и биомасе цијанобактерија од 2.20 до 2 344 mg/L. Број таксона цијанобактерија је мањи у односу на II групу, а најдоминантнији таксон је *Raphidiopsis raciborskii*. Забележено је присуство и следећих цијанобактеријских таксона: *Aphanocapsa grevillei*, *Chrysoosporum bergii*, *Cylindrospermum stagnale*, *Glaucospira laxissima*, *Limnothrix redekei*, *Lyngbya aestuarii*, *Merismopedia glauca*, *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria limosa*, *Planktolingbya limnetica*, *Pseudanabaena limnetica* и *Synechococcus lividus*. Уочава се да су максималне вредности параметара карактеристичне и за II и III групу, и то због издвајања узорка који одговара узорковању које је спроведено у септембру 2012. године на локалитету 3. Анализом је утврђено да је издвајање овог узорка и његово придруживање узорцима који карактеришу II групу због повишених вредности сатурације и концентрације кисеоника.

Александровачка акумулација се и по таксонима, и по бројности значајно разликује од осталих испитиваних акумулација. Нарочито је значајна појава алохтоне (инвазивне) врсте *R. raciborskii* током целог периода истраживања. Током 2012. године забележено је њено временски и просторно константно присуство са бројностима од 10 800 до 19 060 000 ћел/mL. У периоду када је цветала и формирала биофилм на површини акумулације маслинасто-браон боје, довела је до потискивања осталих чланова фитопланктонске заједнице, тако да је у новембру и децембру 2012. године у Александровачкој акумулацији забележено присуство само једне врсте Цианобактерија – *R. raciborskii*. *R. raciborskii*, до скоро позната као тропска врста, шири свој ареал у регионе са умереном климом и дефинисана је као инвазивна алга, која може да продукује токсине (Sinha и сар., 2012; Engstrom-Ost и сар., 2015; Kokociński и Soinen, 2019). У овој студији масовни развој *R. raciborskii* је примећен током и после периода у ком су владале високе температуре (преко 26°C). Висока температура је један од најважнијих фактора за масовни развој *R. raciborskii*. Ова врста преферира окружење са температурама у распону од 20 до 35°C (Padisák, 1997). Високе вредности рН такође фаворизују развој *R. raciborskii*, па су истраживања показала да се *R. raciborskii* јавља у воденим екосистемима са рН вредностима од 8.0 до 8.7 (Padisák, 1997). Са друге стране, Sinha и сар., (2012) наводе да, када је реч о концентрацији нутријената, је то врста која се може наћи у широком спектру услова, чак и у водним телима нижег трофичког ступња. Према Padisák (1997), садржај неорганског фосфора, као и концентрације укупног фосфора, могу варирати у широком опсегу у акумулацијама у којима се *R. raciborskii* јавља у бројним популацијама. Корелација између концентрације фосфора и промене абунданце ове врсте је уочена и у Александровачкој акумулацији. Примећено је да је постепен пораст абунданце био у корелацији са постепеним опадањем концентрације фосфора која је почела од касног пролећа (јуна) и трајала до јесени. Након достизања максималне вредности абунданце у октобру (19 060 000 ћел/mL), дошло је до великог смањења концентрације фосфора, које је могуће узроковано управо порастом популације *R. raciborskii*. *R. raciborskii* има висок афинитет и капацитет складиштења фосфора у поређењу са другим цијанобактеријама (Istvánovics и сар., 2000). Ове адаптације омогућавају *R. raciborskii* да расте и у условима ниских вредности фосфора (Briand и сар., 2002). На развој врсте *R. raciborskii* има значајан утицај и провидност воде. Ова врста се јавља углавном у водама са ниском прозирношћу (Padisák и Reynolds, 1998; Briand и сар., 2002; 2004; Karadžić и сар., 2013). У Александровачкој акумулацији *R. raciborskii* је доминирао, такође, у условима ограничене светлости (провидност 0.25 - 0.20 m).

Cvijan и Fužinato (2011; 2012) дају податке о спорадичном налазу ове врсте у Србији у заслањеним мочварама, са високом рН, електропроводљивошћу и температуром воде. *R. raciborskii* је забележен и у рибаку Капетански рит (Ćirić и сар., 2010). Појава масовног развоја ове врсте откривена је у еутрофној низиској реци Поњавици током 2008. године (Karadžić, 2011; Karadžić и сар., 2013). Од момента првог налаза ова инвазивна врста је у Србији проширила свој ареал, па је осим у поменутих екосистемима детектована и у Палићком, Лудашком и Крвавом језеру (Jovanović и сар., 2015), Засавици (Predojević, 2017), Паригузу (Jovanović, 2020), али и у Дунаву и Тиси (Jovanović, 2020). Појединачни трихоми ове врсте детектовани су и у Шумаричкој акумулацији током 2011. године (Simić и сар., 2012). При истраживањима у оквиру ове дисертације у периоду од 2012. до 2014. године у акумулацији Шумарице ова врста није нађена.

Посебне промене у фитопланктону Александровачке акумулације су забележене у 2014. години. Најниже вредности абунданце фитопланктона су детектоване током 2014. године и варирале су од 133 ћел/мL (јануар) до 454 666 ћел/мL (август). Од укупне абунданце фитопланктона заједница цијанобактерија бележи највећи удео током априла (78.9%), док је касније тај удео мањи (у августу је цијанобактеријски удео био 54%). То је и период који карактерише смањење концентрације нутријената у односу на претходна два летња периода која су праћена у овој акумулацији. До смањене концентрације нутријената, слично као и у акумулацији Бубањ, дошло је после периода обилних падавина у пролеће 2014. години. По подацима РХМЗ и на територији Врања је највећа вредност просечне годишње количине падавина (898.1 L/m²) евидентирана током 2014. године. Посебно велика количина падавина је забележена у мају (161.8 L/m²). Stević (2011) наводи да приликом истраживања Копачког Рита (Хрватска) масовни развој инвазивне тропске врсте *Raphidiopsis raciborskii* је забележен након екстремних хидролошких услова, док су поплаве малог интензитета довољан поремећај за одсуство његовог развоја. У случају Александровачке акумулације након интензивних падавина, иако је дошло до смањења бројности цијанобактерија, врста *R. raciborskii* је и даље била присутна.

Осим по доминантном присуству врсте *Raphidiopsis raciborskii*, Александровачка акумулација се разликује и по присуству осталих врста фитопланктонских цијанобактерија. На основу израчунатог коефицијента квалитативне сличности/различитости по Sørensen-у (1948) између испитиваних акумулација Шумарице, Бубањ и Александровачке установљено да је највећи проценат квалитативне сличности забележен између акумулације Шумарице и Бубањ (42.85%), док је најмања квалитативна сличност фитопланктонских цијанобактерија забележена између Александровачке и акумулације Шумарице (30.30%), затим између Александровачке и акумулације Бубањ (34.28%). У Александровачкој акумулацији је утврђено присуство врста *Cylindrospermum stagnale*, *Glaucospira laxissima*, *Anabaenopsis elenkinii*, *Lyngbya aestuarii*. То су врсте које су карактеристичне за тропска подручја, слане и еутрофне воде. Њихово присуство у периоду истраживања, а и раније, указује да је ово веома специфичан екосистем. Поменута мала сличност Александровачке са остале две акумулације може да се објасни специфичним еколошким условима који карактеришу ову акумулацију.

Александровачка акумулација је формирана још 1965. години, на заслањеном земљишту (сланишту). Морфолошке карактеристике акумулације (просечна дубина 2 m) и мали доток свеже воде, физичке и хемијске карактеристике саме воде (повећан садржај биогених соли, висока температура, рН и електропроводљивост), су утицале током

неколико деценија на формирање специфичне заједнице цијанобактерија како у погледу присуства одређених врста, тако и у начину њиховог удруживања и образовања „цвета“, понекад у виду компакне желатинозне масе на површини воде (Simić и сар., 2011; Đorđević и Simić, 2014). Резултати физичких и хемијских анализа, као и присуство и бројност цијанобактерија и других еукариотских алги приликом првог истраживања ове акумулације у јуну 2008. године, указивали су да је језеро након 45 година свог постојања достигло висок степен хипереутрофије. На површини воде је био присутан компактан биофилм кога су чиниле густо испреплетане и слепљене, како бентосне, тако и планктонске кончасте, једноћелијске и колонијске цијанобактерије, заједно са кончастим зеленим (*Cladophora* и *Oedogonium*) и планктонским једноћелијским и колонијским алгама реда Desmidiaceae и Chlorococcales. У биофилму су доминирали хетероцитни трихоми *Cylindrospermum stagnale*, али и друге цианобактерије са израженим слузавим омотачем (*Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Gloeotrichia*, *Nostoc*, *Limnothrix*). У скрама, али у планктону, при провидности од 0.1 m биле су доминанте појединачне или у паровима ћелије *Synechococcus lividus* (Simić и сар., 2011; Đorđević и Simić, 2014). Овакав биофилм, са сличним саставом цијанобактерија, углавном је карактеристичан за алкална језера, са вредностима електропроводљивости преко 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Kawabata и сар., 1997; Manchada и Kaushik 2000; López-Archilla и сар., 2004). У Србији је тада први пут забележена оваква комбинација цветајућих цијанобактерија и биофилм оваквог изгледа и састава (Sedmak и Svirčev, 2011; Jovanović, 2020). *Synechococcus* је често бројан у плитким, мутним и алкалним језерима (Felföldi и сар., 2009). У условима хиперсатурације (146% сатурација), ова скрама се због мехурића ваздуха који су се формирали у њој, подигла и задржала на површини. Формирана скрама је онемогућавала продор светлости, што је додатно условило подизање свих осталих алги и задржавање у поменутој скрама на самој површини воде. Скрама је онемогућавала и хлађење језера, тако да је температура у јуну 2008. године од 34.4°C погодовала опстанку и масовном развоју цијанобактерија. Услови који су владали крајем лета у језеру (низак интензитет светлости, и висока електропроводљивости) омогућили су појаву бентосне *Lyngbya aestuarii* у муљу у приобалној зони акумулације, где је од трихома у сари, формирала дебелу скраму зелене боје, али и у планктону, где је био присутан велики број трихома који су изашли из саре. Трихоми *L. aestuarii* су заједно са *Chrysochloris bergii* и *Anabenaopsis elenkinii* бојили воду у тамно зелено. Поменути таксони су, такође, ретко налажени у Србији (Cvijan и Blaženčić, 1996; Đorđević и Simić, 2014; Jovanović, 2020).

Будући да је све већи проценат малих акумулација изложен антропогеном утицају услед чега временом долази до промене нивоа трофије акумулација и пренамножавања цијанобактерија, приступа се процесима санације како би се побољшао капацитет њихових екосистемских услуга којим би се одговорило на друштвене потребе (Fontanarrosa и сар., 2019.). Основни циљ ревитализације акумулација је да се побољша квалитет воде, што укључује смањење нивоа нутријената, биомасе фитопланктона, али и повећање провидности (Fontanarrosa и сар., 2019.). Управо због стања Александровачке акумулације и високог нивоа трофије у периоду од 2009. до 2010. године спроведене су мере на комплетној реконструкцији акумулације (Prokić и сар., 2008).

Резултати истраживања физичких и хемијских параметара и диверзитета цијанобактерија и алги у Александровачкој акумулацији пет месеци након пуњења водом из реке (септембар 2010. године) показују да је дошло до промена само неких параметара. Електропроводљивост воде је била знатно мања 345 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (пре санације је износила 1234

$\mu\text{S}/\text{cm}$), али рН вредност, а посебно концентрације фосфата, указују да су овде и даље били присутни услови за убрзану природну еутрофикацију (Simić и сар., 2011). Пет месеци након пуњења језера смањен је диверзитет и бројност једноћелијских и колонијских кокалних алги, донекле и хомоцитних трихалног талуса, док су и даље биле присутне трихалне, хетероцитне врсте (*Cylindrospermum stagnale*, *Chrysochloris bergii*, *Anabaenopsis elenkinii*). Њихова појава одмах после санације била је могућа и због акинета помоћу којих су се задржале у муљу који није потпуно уклоњен приликом санације. Оно што је било потпуно ново, и неочекивано у овим условима, је појава врсте *Raphidiopsis raciborskii*. Ова врста није била присутна у језеру пре санације (Simić и сар., 2011).

У периоду од априла до јула 2011. године у акумулацији поменутих потенцијално токсичних алги није било, бројност *Cyanobacteria* била је процентуално мала у односу на доминацију осталих група (у априлу је доминирао раздео *Bacillariophyta*, у јуну *Chlorophyta*, а у јулу *Dinophyta*). У јуну је, на температури од 24°C , дошло до појаве цветања *Chlorophyta* и видљиве жуто-зелене скраме на површини језера формиране од конача *Pithophora* sp., *Cladophora* sp., *Oedogonium* sp., *Mougeotia* sp., *Spirogyra* sp. (Simić и Ђорђевић, 2016). Такво цветање и скрама су били присутни и пре санације (Ђорђевић и Simić, 2014). Формирана скрама је утицала на естетски изглед овог акватичног екосистема и умањила могућност да се ова акумулација користи у сврхе за које је планирана (купање). У овом периоду су и даље биле одсутне једноћелијске и колонијске цијанобактерије, док су се хомоцитне и хетероцитне форме цијанобактерије јављале са малим бројем врста и у малим бројностима. Кончасте зелене алге, заједно са макрофитском вегетацијом, су механичким путем (косилицом) уклоњене из акумулације, почетком јула месеца (Ђорђевић и Simić, 2014).

У септембру 2011. године се ситуација у акумулацији променила (електропроводљивост је благо повећана, провидност воде је смањена, укупна абунданца фитопланктона била је $1\,187\,848$ инд/L, с тим да су цијанобактерије чиниле 87%) (Ђорђевић и Simić 2014). У заједници цијанобактерија била је доминантна *Glaucospira laxissima* (74%), док је субдоминантан таксон био *Raphidiopsis raciborskii* (23%), а присутне су биле *Chrysochloris bergii* и *Anabaenopsis elenkinii* (Ђорђевић и Simić, 2014; Simić и сар., 2014). Ово је био и први налаз врсте *Glaucospira laxissima* у водама Србије (Simić и сар., 2014). *Glaucospira* је недовољно познат род, ретко налажен у планктону језера, обично у тропским крајевима (Komárek и Anagnostidis, 2005; Simić и сар., 2014). Сprovedена истраживања у којима је детектована поменута врста говоре о сличности водених екосистема и еколошких услова. У сланом језеру Бразила (*Salina de Meio*) са екстремним еколошким условима ($\text{pH}>10$; електропроводљивост већа од $3\,800\ \mu\text{S}/\text{cm}$; температура 28.2°C) забележено је присуство рода *Glaucospira* и *Anabaenopsis elenkinii* (Santos и Sent'Anna, 2010). Nogueira и сар., (2011) су идентификовали *Glaucospira* sp. у рибњаку (језеро Јао – плитко вештачко језеро) у планктонској заједници са 31 таксоном цијанобактерија. *Raphidiopsis raciborskii* је такође био присутан у фитопланктонској заједници. Језеро Јао је плитко алкално језеро ($\text{pH}\ 7.5\text{-}9.1$; електропроводљивост од 110.8 до $137.4\ \mu\text{S}/\text{cm}$, температура већа од 25°C).

Узимајући у обзир све напред наведено, очигледно је да у првој години након пуњења акумулације формиране на сланишту, примењени поступак санације није дао резултате. Приликом санације уз инжењерско пројектовање и радове било је неопходно комплетно сагледавање специфичности овог екосистема, пре свега типа подлоге и

присутва сланишта у приобалном подручју, као и њиховог утицаја на физичке ихемијске карактеристике воде ове акумулације. Спирањем сланишта и даље је долазило до повећања количине соли у води и до повећања електропроводљивости. Појас вегетације који је у процесу санације био засађен на обали ради ублажавања ерозије и спирања, није успео да се развије у овом периоду, и дошло је до потпуног сушења (Ђорђевић и Simić, 2014). Мала дубина, велика осунчаност воденог екосистема, висока температура воде и висока рН вредност су били параметри који су карактерисали акумулацију и након санације, што је и пре санације, а и после, довело до појаве и пренамножавања специфичних цијанобактеријских врста за које је познато да могу да луче цијанотоксине и да негативно утичу на живи свет у води.

Пре санације, у септембру 2008. године до масовног угинућа белог толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), алохтоне планктиворне врсте рибе, дошло је у периоду цветања врсте *Lyngbya aestuarii*, *Chrysoosporum bergii* и *Anabaenopsis elenkinii*. На основу литературних података (Meriluoto и сар., 2017), поменуте цветајуће врсте могу такође продуковати цијанотоксине: *Lyngbya aestuarii* (сакситоксин, цилиндроспермопсин, лингбиатоксин, аплизиатоксин), *Chrysoosporum bergii* (цилиндроспермопсин) и *Anabaenopsis elenkinii* (микроцистин). Потенцијални узроци угинућа толстолобика су могли бити токсини ових алги, ослобођени приликом њихове разградње у условима ниске температуре која је мерена у овом периоду (15.6°C), нагло смањење количине кисеоника у води (3.6 mg/L), као и нагли пад рН вредности на 6.8 (Ђорђевић и Simić, 2014). Толстолобик је алохтона врста рибе, унета у ову акумулацију 2003. године у циљу смањења примарне продукције и цветања цијанобактерија (Ђорђевић и Simić, 2014).). Бели толстолобик је познат као врста погодна за гајење у аквакултури, али и за сузбијање бројности алги. Порибљавање белим толстолобиком као биоманипулаторна мера са циљем смањења биомасе фитопланктона у језерима је изазивало полемике и спроведена истраживања су показала да то није прави начин (Gorphen, 1990; Xia и сар., 2006). Фитопланктиворни бели толстолобик може евентуално бити ефикасна риба за редукацију цветања цијанобактерија и то у еутрофним језерима у којима недостаје крупни зоопланктон (Xia и сар., 2006). Нека експериментална истраживања показују да је присуство ове врсте у истим условима довело до смањења раста неких врста (*Anabaena*, *Aphanizomenon*), али са друге стране до стимулације раста поједних цијанобактерија, нпр. *Microcystis aeruginosa* (Kolmakov и сар., 2006). Друге студије показују да у условима цветања цијанобактерија (*A. flos-aquae* и *M. aeruginosa*) долази често до угинућа белог толстолобика (Jewel и сар., 2003). Очигледно је да и у овој акумулацији покушај смањења продукције уношењем толстолобика није дао жељене резултате, а да је акумулација постала неупотребљива за жељене спортско-рекреативне сврхе (пливање и риболов), па се након овог догађаја приступило комплетној санацији акумулације која се огледала у пражњењу, измуљивању и поновном пуњењу језера свежом речном водом.

Две године после санације, у децембру месецу 2012. године у Александровачкој акумулацији забележен је и поновни масовни помор рибе након вишемесечног цветања врсте *R. raciborskii* (Ђорђевић и сар., 2015). Више од 3 t ципринидне рибе је угинуло у једном дану. Анализом узорака угинутих риба види се доминантно присуство риба које нису биле планиране порибљавањем, а ни у складу са Програмом управљања рибарским подручјем "Србија-исток део" (Лесковац). Посебно је значајно присуство риба алохтоног порекла, као што су азијске врсте: амур, сиви толстолобик и сребрни караш. Процент алохтоних врста износио је 89.2% од укупне масе угинутих риба. Уношење алохтоних

врста риба у риболовне воде забрањено је Законом о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда (Службени гласник РС бр. 128/14; Ђорђевић и сар., 2015).

Када је реч о препорукама СЗО, бројност цијанобактерија Александровачке акумулације у летњем и јесењем периоду током трогодишњег мониторинга од 2012. до 2014. годне је прелазила 100 000 ћел/mL и указивала је на висок степен здравственог ризика, поготово у периоду доминације и цветања врсте *R. raciborskii* (19.06×10^6 ћел/mL) (Chorus и Bartman, 1999; WHO, 2003; Chorus, 2012). Након интензивних падавина у 2014. години први пут су бројности цијанобактерија у мају и јуну (21 283-59 766 ћел/mL) у Александровачкој акумулацији према препорукама СЗО указивале на средњи ниво здравственог ризика. Након периода цветања врсте *R. raciborskii* и масовног помора рибе у децембру 2012. године Александровачка акумулација је забрањена за употребу у спортско-рекреативне сврхе и та забрана је још увек на снази.

Многобројне студије показују да различити сојеви врсте *R. raciborskii* продукују различите токсине. Утврђено је да сојеви *R. raciborskii* из Аустралије (Hawkins и сар., 1985; Ohtani и сар., 1992), поједини азијски (Li и сар., 2001) и са Новог Зеланда (Wood и Stirling, 2003) производе цилиндроспермопсин (CYN). Аустралијски сојеви *R. raciborskii* производе CYN и CYN-аналог, деокси-цилиндроспермопсин (Norris и сар., 1999). Бразилски сојеви *R. raciborskii* производе неуротоксин и сакситоксин (Lagos и сар., 1999). Неке студије су показују да неки европски и азијски сојеви *R. raciborskii* не садрже ниједан од познатих цијанотоксина, али да могу бити токсични за експерименталне животиње (Fastner и сар., 2003; Saker и сар., 2003). Да би продуковали CYN и били токсични, сојеви *R. raciborskii* морају да садрже ген биосинтезе CYN (*cyrA* – *cyrO*) (Mihali и сар., 2008). Иако се *R. raciborskii* може наћи на готово свим континентима, на основу доступне литературе се види да способност производње токсина CYN-а није универзална.

Анализама воде из Александровачке акумулације током мониторинга спроведеног у периоду од јуна 2012. до децембра 2014. године, методом течне хроматографије високе резолуције (HPLC-PDA) идентификован је и квантификован токсин цилиндроспермопсин (CYN). Други испитивани цијанотоксини микроцистини, анатоксин и сакситоксин нису детектовани. Овим истраживањем у Србији је први пут откривен и квантификован CYN (Ђорђевић и сар., 2015). Физичко-хемијска метода (HPLC) једна је од најмоћнијих метода у аналитичкој хемији и представља веома ефикасан начин за анализу и идентификацију цијанотоксина (Rapala и Lahti, 2002). Спада у сепарационе методе и примењује се за раздвајање, квалитативну и квантитативну анализу смеше активних и неактивних супстанци које могу бити присутне у траговима (милионити, билионити део) и самим тим има примену – у фармацеутској, прехранбеној индустрији, форензици, екологији. Концентрација CYN-а у 2012. години је била у распону 1.61-20.47 µg/L. Констатовано је повећање садржаја CYN-а у периоду од августа до новембра 2012. године, када достиже максимум (20.47 µg/L), да би након тога уследио пад у концентрацији CYN-а.

Помор рибе у децембру 2012. године се догодио након периода када је у акумулацији била присутна максимална вредност токсина. У истом периоду акумулација је била залеђена и концентрација кисеоника смањена. Потенцијални узрок угинућа риба може бити CYN у комбинацији са другим еколошким факторима (Sotton и сар., 2014). Слична ситуација догодила се у Бразилу (Rio Pequeno) када је токсичност врсте *R. raciborskii* довела до масовног помора рибе (De Souza и сар., 1998). Berry и сар., (2009) проучавали су утицај CYN-а, као и екстракта *R. raciborskii*, на ембрионима зебра рибице

(*Danio rerio*). Закључили су да је чисти CYN токсичан само када је убризган директно у ембрионе. Насупрот томе, директно потапање ембриона у свим екстрактима резултирало је и повећаним морталитетом и развојним дисфункцијама. Појава токсичног цветања или велика густина цијанобактерија је повезана са угинућем риба, других животиња, али и са болестима човека (Cruz и сар., 2013). Постоје студије о различитим ефектима које CYN може да изазове у рибама (акумулација CYN-а у риби, оксидативни параметри и хистолошки параметри), али подаци о леталној дози (LD₅₀) CYN-а нису пријављени за рибе (Sotton и сар., 2014). Фактор који је свакако допринео масовном угинућу је присуство велике количине рибе која премашује капацитете овог екосистема. Наиме, у лошим условима екосистема, а који су били присутни у акумулацији, присуство великог броја риба које својим активностима прекомерно троше животне ресурсе (пре свега кисеоник) је фактор који додатно, али критично повећава ризик од угинућа, поготово у комбинацији еколошких фактора који су владали тада у акумулацији и присуством CYN-а

Током 2013. године концентрације CYN-а биле су ниже него претходне године истраживања и кретале су се од 0.98 µg/L у јулу до 4.01 µg/L у јануару. Анализе спроведене на узорцима воде из 2014. године показују да токсин (CYN) није био присутан у води, а вредности CYN-а су биле испод границе детекције.

Будући да је у спроведеном истраживању у оквиру ове дисертације детектован само цилиндроспермопсин (CYN) у узорку воде и биомаси Александровачке акумулације, за испитивање утицаја метанолског екстракта на функцију генетичког материјала, активност биохемијских параметара серума, антиоксидативних ензима, као и хистопатолошких промена искоришћен је екстракт врсте *R. raciborskii*. Управо због свеобухватних истраживања различитих сојева *R. raciborskii* са различитих географских локалитета и везе њихове токсичности и дистрибуције, испитивање токсичности српских сојева чинило се неопходним. Концентрације CYN-а у екстракту *R. raciborskii* из Србије (6.65 µg CYN/mg екстракта) сличне су концентрацијама које су детектовали Falconer и сар., (1999) и Hawkins и сар., (1997). Falconer и сар., (1999) детектовали су CYN у екстрактима ћелија *R. raciborskii* у четири различите концентрације (1.3, 2.0, 3.2 и 5.4 µg/mg). Битно је напоменути да су поменуте студије користиле екстракт заснован на масовним културама соја *R. raciborskii* (Falconer и сар., 1999; Seawright и сар., 1999), за разлику од екстракта у нашем истраживању који је направљен прикупљањем узорака воде и биомасе из Александровачке акумулације у периоду цветања *R. raciborskii*. Такође, токсични сој *R. raciborskii* је изолован из језера у Сиднеју у Аустралији и HPLC анализом доказано да садржи око 5.5 µg CYN/mg суве масе екстракта (Hawkins и сар., 1997), што је слично нашим резултатима.

Због излагања људи и домаћих животиња токсинима цијанобактерија путем воде за пиће која се користи у различите сврхе, у досадашњим студијама токсичности коришћени су водени екстракти или суспензије култура *R. raciborskii* или чисти CYN и најчешће су примењени оралним путем (Falconer и Humpage, 2001). Генотоксични ефекат екстракта *R. raciborskii* утврђен је применом Комет теста користећи као модел организме пацове соја Wistar у *in vivo* условима. Комет тест се не користи за откривање мутација, већ геномских лезија које би могле да доведу до мутација. Током последњих деценија Комет тест, поред широке примене у разним областима, представља и средство за утврђивање генотоксичног ефекта, како природних, тако и вештачких агенаса (Sharma и сар., 2007; Carvalho и сар., 2011).

Различите концентрације метанолског екстракта *R. raciborskii* (1 500, 3 000, 6 000 и 12 000 µg/kg т.м.) и CYN (79.80 µg/kg т.м.) интраперитонеално су аплициране пацовима. Ниво оштећења ДНК-а у јетри животиња третираних високим концентрацијама екстракта *R. raciborskii* (тј. 12 000 µg/kg т.м.) био је сличан ономе код животиња третираних ЕМС-ом након 24 сата. Такође, код тестирања већом концентрацијом, екстракт је проузроковао значајно повећање дужине репа у поређењу са ЕМС-ом (1.4 пута) и негативном контролом (7.3 пута), 72 сата после третмана, што указује на генотоксични ефекат. Иако је CYN у концентрацијама од 79.80 µg/kg т.м. изазвао статистички значајан пораст оштећења ДНК, посматрано кроз повећање дужине репа комете, момента репа и % ДНК у репу, и даље су оштећења мања од оштећења која су настала применом екстракта у највишој испитиваној дози. Најинтензивнији токсични ефекат највеће дозе екстракта у односу на еквивалентну дозу чистог CYN-а указује на синергистички ефекат и евентуално присуство и других једињења у екстракту која су имала токсични ефекат. Овај резултат је у сагласности са резултатима добијеним у студијама Falconer и сар., (1999), Hawkins и сар., (2001) и Metcalf и сар., (2002). Поменута истраживања су показала, као и у нашем експерименту, да су екстракти *R. raciborskii* токсичнији од чистог CYN-а.

Цијанобактерије могу имати генотоксичне ефекте на различитим модел организмима, што зависи од различитих једињења која су присутна у екстрактима (Bouaïcha и сар., 2005; Lankoff и сар., 2006; Palíková и сар., 2007; Wu и сар., 2011; Žegura и сар., 2011; Laughinghouse и сар., 2012). Хемијска анализа цијанобактеријског метанолског екстракта потврдила је присуство CYN-а. Као токсин, CYN има и цитотоксично и хепатотоксично деловање, што првенствено произилази из моћне инхибиције синтезе протеина која настаје након ковалентног везивања CYN-а са ДНК или РНК (Shaw и сар., 2000) које прати значајно кидање ланца ДНК (Shen и сар., 2002). Нуклеотидна структура CYN-а (Narada и сар., 1994; Banker и сар., 1997), а делом и присуство потенцијално реактивних гванидинских и сулфатних група, утиче на могућност мешања у синтезу ДНК-а и индукцију мутација.

Хепатотоксичност метанолског екстракта *R. raciborskii* и CYN-а је испитивана праћењем серумских маркера функције јетре, параметара оксидативног стреса у ткиву јетре и хистопатолошким испитивањем ткива. Повишене активности ALP, ALT, AST и GGT приписују се оштећењу функција јетре. Ови ензими су нормално локализовани у цитоплазми и улазе у крвоток након што је дошло до оштећења ћелије. Према доступним подацима, примарно место токсичности изазвано CYN-ом је јетра (Hawkins и сар., 1985; Narada и сар., 1994; Bernard и сар., 2003; Griffiths и Saker, 2003; Terao и сар., 1994). Резултати који су добијени у оквиру ове докторске дисертације указују да није дошло до ослобађања ензима индикатора оштећења јетре (ALP, ALT, AST и GGT) у крвоток услед примене *R. raciborskii* екстракта на начин на који се очекује после излагања хепатотоксину.

Чисти CYN, примењен у дози од 79.80 µg/kg т.м., што одговара количини токсина у највишој испитиваној дози метанолног екстракта *R. raciborskii*, узроковао је већу активност ензима AST и ALT у крвотоку након 24 сата него екстракт. Серумски биохемијски параметри оштећења јетре враћени су у нормалу након 72 сата код већине животиња. Статистички значајне промене у AST и ALT активности није показао ни водени екстракт културе *R. raciborskii* (216-687 µg/kg CYN дневно током 10 недеља) у поређењу са дејством пречишћеног токсина CYN (30-240 µg/kg CYN дневно током 11

недеља) код орално третираних животиња (мушких албино пацова) убацивањем екстракта у воду за пиће (Humpage и Falconer, 2003).

Chernoff и сар., (2011) су током различитих сегмента гестационог периода пацова пратили дејство токсина током пет дана (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CYN) све до 7 недеља након дозирања. Приметили су да се вредности биохемијских параметара у серуму (AST и ALT) повећавају 24 сата након финалне дозе, а недељу дана након дозирања биохемијски показатељи оштећења јетре се враћају у нормалу. Слични резултати су примећени у нашем истраживању када су пацови примили једну дозу CYN од 79.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м. Узимајући у обзир биохемијске параметре јетре, чисти токсин је проузроковао веће оштећење јетре у односу на метанолски екстракт *R. raciborskii*.

Пацови који су били изложени дејству метанолског екстракта *R. raciborskii* који садржи 6.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ CYN (1 500 до 12 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м.) нису показали значајне промене у серуму које су повезане са функцијом јетре. Ови подаци пружају додатну подршку хипотези Chernoff и сар., (2011) да јетра није примарно место токсичности изазване CYN-ом. Такође, ови ефекти се могу објаснити тако да концентрације коришћеног екстракта, које су садржавале 6.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ CYN, нису биле довољне да узрокују озбиљно оштећење јетре.

Сличне промене у хистопатологији јетре, минималне до умерене лезије, су забележене у групама које су третиране екстрактом и у групама третираним CYN-ом 24 и 72 сата након интоксикације. Ове промене, укључујући некрозу, апоптозу, инфилтрацију инфламаторних ћелија и цитоплазматску вакуолизацију у јетри пацова изложених екстракту који садржи CYN, су у складу са претходном студијом изведеном на тилапији и на мишевима који су изложени CYN-у или култури *R. raciborskii* (Seawright и сар., 1999; Chernoff и сар., 2011; Gutiérrez-Praena и сар., 2012). За разлику од серумских биохемијских показатеља оштећења јетре, главне патолошке промене примећене у јетри испитиване у овој студији биле су врло сличне између пацова који су еутаназирани након 72 сата и пацова еутаназираних после 24 часа; према томе, није примећено опорављање хистолошких промена изазваних екстрактом *R. raciborskii* код пацова. Неке од ових патолошких промена описане су и код тилапије и биле су израженије у 5. дану него 24 сата након излагања чистим CYN -ом (Gutiérrez-Praena и сар., 2012).

6. Закључци

На темељу добијених резултата спроведеног истраживања могу се извести следећи закључци:

- ❖ Мале акумулације су специфични водени екосистеми са аспекта биодиверзитета. Током година у малим акумулацијама долази до процеса еутрофикације, који је праћен пренамножавањем и цветањем цијанобактерија, међу којима се јављају и алохтоне и потенцијално инвазивне и токсичне врсте.
- ❖ Током истраживања у акумулацији Шумарице је идентификовано 13, у акумулацији Бубањ 15, а у Александровачкој акумулацији 20 таксона фитопланктонских цијанобактерија. Три поменути водна тела значајно се разликују по општим карактеристикама, хемијском саставу воде и динамици фитопланктонских цијанобактерија. Различитост испитиваних акумулација се огледа по малом броју заједничких таксона (5-6), али и по таксонима који су били најфреквентији и цветајући у испитиваним акумулацијама: акумулација Шумарице (*Aphanizomenon flos-aquae*), акумулација Бубањ (*Microcystis aeruginosa*) и Александровачка акумулација (*Raphidiopsis raciborskii*).
- ❖ Применом методе самоорганизујућих мапа (COM) омогућена је ефикасна класификација узорака на основу физичких и хемијских параметара, као и визуализација просторне дистрибуције свих биотичких параметара. Анализа повезаности вредности срединских параметара, као и промена вредности биотичких параметара, омогућена је захваљујући могућности COM-а да истовремено визуализује активне и пасивно увежене променљиве. Имајући у виду прегледност презентованих резултата, али и количину информација које пружа, закључује се да је овај мултиваријантни приступ веома погодан за моделовање података у различитим аспектима истраживања акватичних екосистема, поготово када се ради великим скуповима података.
- ❖ Најзначајнији средински параметри који утичу на заједницу фитопланктонских цијанобактерија, према нашим резултатима, су концентрације укупног фосфора и азота, при чему је највећи утицај укупног азота идентификован у акумулацији Шумарице, а укупног фосфора у акумулацији Бубањ. У Александровачкој акумулацији ови еколошки фактори нису имали пресудан утицај.
- ❖ Нагле промене хидролошких услова могу да доведу до значајних последица на састав и динамику фитопланктонских цијанобактерија у малим акумулацијама. У случају акумулације Шумарице екстремне поплаве биле су довољно јак стресор за промену трофичког статуса акумулације из мезотрофног у хипереутрофно стање. Након екстремних хидролошких услова у акумулацији Шумарице долази до потискивања свих осталих врста и апсолутне доминације врсте *Aphanizomenon flos-aquae*. Наша студија показује да екстремне падавине могу да доведу до повећања концентрације хранљивих материја у резервоарима, и узрокују значајан еколошки поремећај заједнице у воденим екосистемама (цветање потенцијалних токсичних цијанобактерија), што за последицу може имати и потенцијалне економске губитке.
- ❖ Са друге стране, падавине су у акумулацији Бубањ и Александровачкој акумулацији довеле до смањења абунданце фитопланктона и цијанобактерија.

- ❖ Упоредним мониторингом акумулације Шумарице, Бубањ и Александровачке акумулације утврђено је да су се у истим климатским и метеоролошким условима развијале различите фитопланктонске цијанобактерије и да је појава одређених врста била условљена специфичним еколошким факторима или чешће комбинацијом тих параметара.
- ❖ Услед повезаности свих фактора пре и током појаве цветања, закључује се да је неопходно праћење корелације цијанобактерија са факторима животне средине који су постојали у периоду пре појаве цветања.
- ❖ Појава и доминација инвазивне врсте *R. raciborskii* у Александровачкој акумулацији показује да ова врста шири свој ареал распрострањења и представља опасност за сва водна тела, а посебно за она која се користе за водоснабдевање и у спортско-рекреативне сврхе.
- ❖ Прва детекција токсина CYN-а помоћу HPLC/PDA у Србији указује да је неопходан мониторинг фитопланктонских цијанобактерија са посебним аспектом на потенцијално токсичне, како у нашој земљи тако и шире, како би се спречили могући штетни ефекти на здравље људи и животну средину.
- ❖ Услед све чешће појаве инвазивних и потенцијално токсичних врста цијанобактерија, али и негативних последица које се у тим случајевима јављају, намеће се потреба детекције токсина и евалуација њихове активности. У Србији параметар „концентрација цијанотоксина“ још увек није прихваћен при обавезном мониторингу водених екосистема и, у том смислу, неопходно је увођење нових прописа и адекватног мониторинга акумулација.
- ❖ Приликом планирања формирања и санације малих акумулација неопходно је разматрање свих потенцијалних фактора у редовним и ванредним околностима који могу да утичу на стање тог воденог екосистема. Резултати у оквиру ове дисертације су потврдили да санација Александровачке акумулације није дала добар резултат, и да је и након ње у акумулацији долазило до масовног помора рибе, али и до цветања фитопланктонских цијанобактерија.
- ❖ Ова студија је показала да је екстракт врсте *R. raciborskii* испољио значајну генотоксичност, чак и у ниским концентрацијама и повећао оксидативни стрес у јетри пацова након једног излагања.
- ❖ Примењене дозе метанолског екстракта *R. raciborskii* нису биле довољно високе да изазову значајно оштећење јетре код пацова. Све промене које су указивале на хепатотоксичност могле би се сматрати реверзibilним, јер би се организми опорављали ако не би више били у контакту са екстрактом *R. raciborskii* или чистим CYN-ом.
- ❖ Услед свеобухватног присуства *R. raciborskii* у слатководним екосистемима, неопходно је истраживање о продукцији токсина, токсичности, генетици, екологији и здравственим ризицима проузрокованим присуством CYN-а у водама широм света, како би се предузеле мере и спречили штетни ефекти по људско здравље и животну средину. Стога, резултати овог истраживања могу имати здравствено-апликативни значај.

7. Литература

- Abbasi A., Ohene Annob OF., van de Giesenb N. (2017): A framework to simulate small shallow inland water bodies in semi-arid regions. *Adv. Water Resour.* (110): 77-96.
- Adams D. G., Duggan P. S. (2008): Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *J. Exp. Bot.* (59): 1047-1058.
- American Public Health Association (APHA) (2005): *Standard Methods (Standard methods for examination of water and wastewater. 21st Edn.)*. American Public Health Association; Washington DC USA.
- Anagnostidis K., Komárek J. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud. Suppl.* (50-53): 327-472.
- Ballot A., Fastner J., Wiedner C. (2010): Paralytic shellfish poisoning toxin producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(4): 1173-1180.
- Banker R., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R., Sukenik A. (1997): Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret. *Israel J. Phycol.* 33: 613-616.
- Bazin E., Huet S., Jarry G., Hégarat L. L., Munday J. S., Humpage A. R., Fessard V. (2012): Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection. *Environ. Toxicol.* (27): 277-284.
- Bernard C., Harvey M., Briand J. F., Bire R., Krysz S., Fontaine J. J. (2003): Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18: 176-186.
- Berry J. P., Gibbs P. D. L., Schmale M. C., Saker M. L. (2009): Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicon* 53: 289-299.
- Blagojević Ponjavić A., Kostić D., Marjanović P., Trbojević I., Popović S., Predojević D., Subakov Simić G. (2019): Bloom of the potentially toxic cyanobacterium *P. rubescens*: seasonal distribution and possible drivers of its proliferation in the Vrutci reservoir (Serbia). *Oceanol. Hydrobiol. St.* 48(4): 316-327.
- Bláhová L., Babica P., Adamovský O., Kohoutek J., Maršálek B., Bláha L. (2008): Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. *Environ. Chem. Lett.* (6): 223-227.
- Blahova L., Oravec M., Marsalek B. et al. (2009): The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon* 53(5): 519-524.

- Blaženčić J. (1986): Review of development of algology in Serbia from 1883. to 1983. Glasnik instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu, (20): 99-108.
- Blaženčić J. (2000): Sistematika algi, IV izdanje. NNK Internacional, Beograd, 298 str.
- Botha N., Gehringer M. M., Downing T. G., van der Venter M., Shephard E. G. (2004): The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCO₂ cells. *Toxicon* (43): 85-92.
- Bouaïcha N, Maatouk I, Plesis M. J., Périn F. (2005): Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Environ. Toxicol.* 20:341-347.
- Briand J. F., Leboulanger C., Humbert J. F. (2004): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40: 231-238.
- Briand J. F., Robillot C., Quiblier-Lloberas C., Humbert J. F., Coute A. (2002): Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Res.* 36: 3183-3192.
- Carlson R. E. (1977): A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* (22): 361-368.
- Carvalho I. M., Melo Cavalcante A. A., Dantas A. F., Pereira D. L., Costa Rocha F. C., Andrade T. J., Da Silva J. (2011): Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 28:58-61.
- Castenholz R. W. (2001): Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria, in *Bergey's manual of Systematic Bacteriology: Volume One, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, 2nd ed., Springer, New York, 473-487.
- Chernoff N., Rogers E. H., Zehr R. D., Gage M. I., Malarkey D. E., Bradfield C. A., Liu Y., Schmid J. E., Jaskot R. H, Richards J. H., Wood C. R., Rosen M. B. (2011): Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *J. Appl. Toxicol.* 31: 242-254.
- Chorus I. (2012): Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt – UBA), Dessau-Roßlau, Germany, 151 pp.
- Chorus I., Bartram J. (1999): Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management (WHO). The World Health Organization, E. and F.N. Spon, London, 416 pp.
- Cirés S., Ballot A. (2016): A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria). *Harmful Algae* 54: 21-43.

- Ćirić M., Marković Z., Dulić Z., Subakov-Simić G. (2010): First report of cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from carp ponds in Serbia. The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8). Istanbul, Turkey. Abstract book, 14 pp.
- Ćirić M., Gavrilović B., Simić G. S., Krizmanić J., Vidović M., Zebić G. (2015): Driving factors affecting spatial and temporal variations in the structure of phytoplankton functional groups in a temperate reservoir. *Oceanol. Hydrobiol. St.* 44(4): 431-444.
- Codd G. A. (2000): Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 16: 51-60.
- Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Stetina R. (2008): The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23:143-151.
- Cruz A. A., Hiskia A., Kaloudis T., Chernoff N., Hill D., Antoniou G. M., He X., Loftin K., O'Shea K., Zhao C., Pelaez M., Han C., Lynch J. T., Dionysios D. D. (2013): A review on cylindrospermopsin; the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ. Sci. Processes. Impacts.* 15: 1979-2003.
- Cvijan M. (2013): *Algologija* Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Beograd: Alta Nova. 196 str.
- Cvijan M., Blaženčić J. (1996): Cyanophyta. Tom 1. Flora algi Srbije. Blaženčić, J. (editor). Naučna knjiga, Beograd. 290 str.
- Cvijan M., Fužinato S. (2011): The first finding of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju (Cyanoprokaryota) in Serbia. *Arch. Biol. Sci.* 63: 507-510.
- Cvijan M., Fužinato S. (2012): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota) – potential invasive and toxic species in Serbia. *Bot. Serb.* 36: 3-8.
- 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.
- De Souza C. R., Carvalho M. C., Truzzi A. C. (1998): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings Reservoir, Brazil. *Environ. Toxic. Water.* 13: 73-81.
- Denić Lj., Stojanović Z., Dopuđa-Glišić T., Čađo S., Đurković A., Novaković B. (2015): Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2014.godinu. Agencija za zaštitu životne sredine, Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Beograd, 370 str.
- Ding W. X., Ong Ch. N. (2003): Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* (220): 1-7.

- Dolman A. M., Rücker J., Pick F. R. et al. (2012): Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* 7 (6): e38757.
- Dorđević N., Simić S. (2014): Cyanobacterial blooms in oligosaline and alkaline microaccumulation before and after rehabilitation. *Pol. J. Environ. Stud.* 23 (6): 1975-1982.
- Dorđević N., Simić S., Ćirić A. (2015): First identification of the cylindrospermopsin (CYN) - producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya & Subba Raju in Serbia. *Fresen. Environ. Bull.* 24 (11a): 3736-3742.
- Dorđević N.B., Matić S.L., Simić S.B., Stanić S.M., Mihailović V.B., Stanković N.M., Stanković V.D., Ćirić A.R. (2017): Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats in vivo. *Environ. Sci. Pollut. R.* 24(16): 14259-14272.
- Dos Santos M. D., Guaratini T., Lopes J. L. C., Colepicolo P. Lopes N. P. (2005): Plant cell and microalgae culture. In: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Research Singpost, Kerala, India.
- Downing J.A., Watson S.B., McCauley E. (2001): Predicting cyanobacteria dominance in lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58(10): 1905-1908.
- Drobac D, Tokodi N, Simeunović J, Baltić V, Stanić D, Svirčev Z. (2013): Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* (64): 305-316.
- Drobac D. (2015): Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima i njihov uticaj na zdravlje. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-Matematički Fakultet, 256 str.
- Drobac D., Tokodi N., Lujčić J., Marinović Z., Subakov-Simić G., Dulić T., Važić T., Nybom S., Meriluoto J., Codd G. A., Svirčev Z. (2016): Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae* 55: 66-76.
- Đukić D. A., Gajin S., Matavulj M., Mandić L. (2000): *Mikrobiologija voda*. Prosveta-Beograd.
- Ekholm P. (2008): N:P ratios in estimating nutrient limitation in aquatic systems, Finnish Environment Institute. Helsingfors, Finland, 11-14.
- Ellman G. L. (1959): Tissue sulphhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* (82): 70-77.
- Engstrom-Ost J., Savatijević Rašić I., Brutemark A., Rancken R., Subakov Simić G., Laugen T. A. (2015): Can *Cylindrospermopsis raciborskii* invade the Baltic sea? *Environ. Rev.* 23: 161-169.
- Falconer I. R. (1998): Algal toxins and human health. In: *The handbook of environmental chemistry 5. Part C Quality and treatment of drinking water II*. Hrubec, J. (editor). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 53-82.

- Falconer I. R. (1999): An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicol.* 14: 5-12.
- Falconer I. R., Hardy S. J., Humpage A. R., Froscio S. M., Tozer G. J., Hawkins P. R. (1999): Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* (14): 143-150.
- Falconer I. R., Humpage A. R. (2001): Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16:192-195.
- Fastner J., Heinze R., Humpage A. R., Mischke U., Eaglesham G. K., Chorus I. (2003): *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42: 313-321.
- Felföldi T., Somogyi B., Márialigeti K., Vörös, L. (2009): Characterization of photoautotrophic assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Central Europe). *J. Limnol.* 68: 385-395.
- Ferreira F. M. B., Soler J. M. F., Fidalgo M. L., Fernández-Vila P. (2001): PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon* 39(6): 757-761.
- Flores E., Herrero A. (2010): Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* (8): 39-50.
- Fontanarrosa M. S., Allende L., Rennella A. M., Boveri M. B., Sinistro R. (2019): A novel device with macrophytes and bio balls as a rehabilitation tool for small eutrophic urban ponds: a mesocosm approximation. *Limnologica* 74: 61-72.
- Gobler C. J., Burkholder J. M., Davis T. W., Harke M. J., Johengen T., Stow C. A., Van de Waal D. B. (2016): The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 54: 87-97.
- Gophen M. (1990): Biomanipulation: retrospective and future development. *Hydrobiologia* 200: 1-11.
- Góth L. (1991): A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.* (196): 143-152.
- Graham J. L., Loftin K. A., Ziegler A. C., Meyer M. T. (2008): Cyanobacteria in lakes and reservoirs: Toxin and taste-and-odor sampling guidelines (ver. 1.0), in U.S. Geological Survey Techniques of Water- Resources Investigations.
- Graham L. E., Wilcox L. W. (2000): *Algae* – Prentice Hall. USA, 640 pp.
- Griffiths D. J., Saker M. L. (2003): The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 18: 78-93.

- Guiry M. (2012): How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48: 1057-1063.
- Gulson B., Korsch M., Dickson B., Cohen D., Mizon K., Davis J. M. (2007): Comparison of lead isotopes with source apportionment models, including SOM, for air particulates. *Sci. Total Environ.* (381): 169-179.
- Gutiérrez-Praena D., Josa Á., Pichardoa S., Moyanob R., Blancoc A., Monterdec J. G., Cameán A. M. (2012): Time-dependent histopathological changes induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotox. Environ. Safe.* 76: 102-113.
- Harada K, Kondo F, Lawton L. (1999): Laboratory analysis of cyanotoxins, chapter 13. In: Chorus I, Bartram J (eds) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management* (WHO). The World Health Organization, E. and F.N. Spon, London, 369-405.
- Harada K. I., Ohtani I., Iwamoto K., Suzuki M., Watanabe M. F., Watanabe M., Terao K. (1994): Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32: 73-84.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R. (2003): Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* (18): 45-51.
- Hartmann A., Speit G. (1997): The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90:183-188.
- Havens K.E. (1995a): Particulate light attenuation in a large subtropical lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1803–1811.
- Havens K.E. (1995b): Secondary nitrogen limitation in a subtropical lake impacted by non-point source agricultural pollution. *Environ. Pollut.* 89: 241–246.
- Havens K. E., James R. T., East T. L. Smith V. H. (2003): N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environ. Pollut.* 122: 379-390.
- Hawkins P. R., Runnegar M. T. C., Jackson A. R. B., Falconer I. R. (1985): Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1292-1295.
- Hawkins P. R., Chandrasena N. R., Jones G. J., Humpage A. R., Falconer I. R. (1997): Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35:341-346.
- Hawkins P. R., Putt E., Falconer I., Humpage A. (2001): Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. *Environ. Toxicol.* 16(6): 460-467.

- Hillebrand H., Dürselen C. D., Kirschtel D., Pollinger D., Zohary T. (1999): Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* (35): 403-424.
- Hindák F. (2001): Fotografický atlas mikroskopických siníc. Veda, Bratislava, 128 pp.
- Holt J. G. (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (2001): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Maryland, USA.
- Hrouzek P. 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.
- Humpage A. R., Falconer I. R. (2003): Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.* 18: 94-103.
- Illies J. (1978): *Limnofauna Europaea*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 532 pp.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014): *Climate Change, 2014: Synthesis Report*. In: Core Writing Team, Pachauri R. K., Meyer L. A. (eds): *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Switzerland, Geneva, 1-151 pp.
- ISO 10260 (1992): *Water quality: Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll *a* concentration*.
- Istvánovics V., Shafik H. M., Presing M., Juhos S. (2000): Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biol.* 43: 257-275.
- Jaccard P. (1928): Die statistisch-floristische methode als grund-lage der pflanzensozioologie. In: Abderhalden, Ed., *Handbuch Biologischer Arbeitsmethoden*, 11, 165-202.
- Jain A. K., Dubes R. C. (1988): *Algorithms for clustering data*. Prentice-Hall New Jersey, 320 pp.
- Jankowski D., Amanowicz M. (2015): Intrusion Detection in Software Defined Networks with Self-organized Maps. *Journ. Telecomm. Inf. Tech.* (4): 3-9.
- Jewel M. A., Affan M. A., Khan S. (2003): Fish mortality due to cyanobacterial blooms in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan J. Biol. Sci.* (6): 1046-1050.
- 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 embryo assays. *Chemosphere* (120): 321-327.

- Jones R.A., Lee G.F. (1982): Recent advances in assessing impact of phosphorus loads on eutrophication-related water quality. *Water Res.* 16: 503-515.
- Jovanović J., Predojević D., Trbojević I., Popović S., Blagojević A., Karadžić V., Subakov Simić G. (2015): Ekspanzija vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* u stajaćim vodama severne Vojvodine. Zbornik 44. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštiti voda „Voda 2015“. Kopaonik, 107-114.
- Jovanović J., Trbojević I., Simić G. S., Popović S., Predojević D., Blagojević A., Karadžić V. (2017): The effect of meteorological and chemical parameters on summer phytoplankton assemblages in an urban recreational lake. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.* 418, 48.
- Jovanović J. (2020): Rasprostranjenje cijanobakterija u površinskim vodama namenjenim za vodosnabdevanje i rekreaciju u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet u Beogradu, 311 str.
- Karadžić V., Subakov Simić G., Krizmanić J., Natić D. (2010): Phytoplankton and eutrophication development in the water supply reservoirs Garaši and Bukulja (Serbia). *Desalination*, 255(1-3): 91-96.
- Karadžić V. (2011): Eutrofikacija i njene posledice na primeru reke Ponjavice (opština Pančevo). Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd. Doktorska disertacija, 292 str.
- Karadžić V., Subakov-Simić G., Natić D., Ržaničanin A., Ćirić M., Gačić Z. (2013): Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia* (711): 43-60.
- Kawabata Y., Nakahara H., Katayama Y., Ishida N. (1997): The phytoplankton of some saline lakes in Central Asia. *Int. J. Salt Lake Res.* 6: 5-16.
- Keckeis S., Baranyi C., Hein T., Holarek C., Riedler P., Schiemer F. (2003): The significance of zooplankton grazing in a floodplain system of the River Danube. *J. Plankton. Res.* 25: 243-253.
- Kiang M. Y. (2001): Extending the Kohonen self-organizing map networks for clustering analysis. *Comput. Stat. Data. An.* (38): 161-180.
- Kohonen T. (1982): Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biol. Cybern.* (41): 59-69.
- Kokociński M., Soininen J. (2019): New insights into the distribution of alien cyanobacterium *Chrysochloris bergii* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycol. Res.* Online doi:10.1111/pre.12373.

- Kolmakov V. I., Gladyshev M. I., Kravchuk E. S., Chuprov S. M., Anishchenko O. V., Ivanova E. A., Trusova M. Y. (2006): Species-Specific Stimulation of Cyanobacteria by Silver Carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.). Dokl. Biol. Sci. (408): 223-225.
- Komárek J., Anagnostidis K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes. Nostocales 4. Algol. Stud. (56): 247-345.
- Komárek J., Anagnostidis K. (1998): Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales - In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D., (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 548 pp.
- Komárek J., Anagnostidis K. (2005): Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In: Budel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. & Schagerl, M., (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 759 pp.
- Komárek J. (2013): Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera. In: Budel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M., (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Springer Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, 1130 pp.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J. R. (2014): Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia 86: 295-335.
- Kostić D., Blagojević A., Subakov Simić G., Ivetić M., Naunović Z. (2014): Jesenje cvetanje potencijalno toksične cijanobakterije *Planktoniella rubescens* u višenamenskoj akumulaciji Vrutci. Voda i sanitarna tehnika 44(1): 5-12.
- Kostić D., Blagojević A., Subakov Simić G., Predojević D., Naunović Z., Jaćimović N., Grašić S. (2015): "Blooming" Reservoir Response to a High Inflow Event - Case Study: the Vrutci Reservoir (Western Serbia). U: 7th Eastern European Young Water Professionals Conference, Belgrade, 97-104.
- Kostić D., Marjanović P., Marjanović M., Blagojević A., Trbojević I., Predojević D., Subakov Simić G., Vulić D., Obradović V., Naunović Z. (2016): Drivers of phytoplankton blooms in the Vrutci Reservoir during 2014–2015 and implications for water supply and management. Water Research and Management 6(3): 3-12.
- Kumar K. et al. (2010): Cyanobacterial heterocysts. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2: a000315.
- Laamanen M., Kuosa H. (2005): Annual variability of biomass and heterocysts of the N₂-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in the Baltic Sea with reference to *Anabaena* sp. and *Nodularia spumigena*. Boreal. Environ. Res. 10(1): 19-30.
- Lagos N., Onodera H., Zagatto P. A., Andrinolo D., Azevedo S. M. F. Q., Oshima Y. (1999): The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. Toxicon 37: 1359-1373.

- Lankoff A., Wojcik A., Fesard V., Meriluoto J. (2006): Nodularin-induced genotoxicity following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells. *Toxicol. Lett.* 164: 239-248.
- Lapage S., Sneath P., Lessel E. et al. (eds.) (1992): International Code of Nomenclature of Bacteria, American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington (DC).
- Laughinghouse H. D.4th, Prá D., Silva-Stenico M. E., Rieger A., Frescura V. D., Fiore M. F., Tedesco S. B. (2012): Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Sci. Total. Environ.* 432: 180-188.
- Lee J. W. (2007): Numerical Modelling of Temperature-Induced Circulation in Shallow Water Bodies and Application to Torrens Lake, South Australia. The University of Adelaide Applied Mathematics Thesis (PhD). 10.1093/sp/2.2.123.
- Li R. H., Carmichael W. W., Brittain S., Eaglesham G. K., Shaw G. R., Mahakhant A., Noparatnaraporn N., Yongmanitchai W., Kaya K., Watanabe M. M. (2001): Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Toxicon* 39: 973-980.
- Liu Y., Chen W., Li D. et al. (2006): Analysis of paralytic shellfish toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China. *Environ. Toxicol.* 21(3): 289-95.
- López-Archilla A. I., Moreira D., López-García P., Guerrero C. (2004): Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH. *Extremophiles* 8: 109-115.
- Lowry O. H., Rosebrough N. L., Farr A. L., Randall R. I. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (193): 265-275.
- Manchada H., Kaushik A. (2000): Algal flora of the aridisols of Rohtak and salt-tolerance of the indigenous cyanobacteria. *Trop. Ecol.* 41(2): 217-223.
- Mateo-Sagasta J., Marjani Zadeh S., Turrall H., Burke J. (2017): Water pollution from agriculture: a global review - Executive summary. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy; International Water Management Institute (IWMI), Colombo, Sri Lanka. 31 pp.
- McNeill J., Barrie F. R., Buck W. R. et al. (eds.) (2012): International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne code): adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011, *Regnum Vegetabile*, 154, Koeltz Scientific Books.
- Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baurès E., Thomas O. (2013): State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* 59: 303-327.

- Meriluoto J., Codd G. A. (2005): Toxic; Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Åbo Akademi University Press, Finland 149 pp.
- Meriluoto J., Spoof L., Codd G. A. (2017): Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Wiley, Chichester, UK 548 pp.
- Metcalf J. S., Lindsay J., Beattie K. A., Birmingham S., Saker M. L., Torokne A. K., Codd G. A. (2002): Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40: 1115-1120.
- Mihali T. K., Kellmann R., Muenchhoff J., Barrow K. D., Neilan B. A. (2008): Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 716-722.
- Mihaljević M., Stević F. (2011): Cyanobacterial blooms in a temperate river-floodplain ecosystem: the importance of hydrological extremes. *Aquat. Ecol.* 45: 335-349.
- Milošević Dj., 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.
- Milovanović D. (1949): Bibliografski pregled algoloških istraživanja u Srbiji do 1947. godine. *Glasnik Prirodnjačkog muzeja u Beogradu. Serija B: Biološke nauke B 1–2*: 323-329.
- Misra H. P., Fridovich I. (1972): The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* (247): 3170-3175.
- Msagati T. A. M., Siame B. A., Shushu D. D. (2006): Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.* (78): 382-397.
- Natić D., Jovanović D., Knežević T., Karadžić V., Bulat Z., Matović V. (2012): Mikrocistin – LR u površinskim vodama reke Ponjavice. *Vojnosanit. Pregl.* 69 (9): 753-758.
- Newcombe G. (2009): International guidance manual for the management of toxic cyanobacteria, Global Water Research Coalition, <http://www.waterra.com.au/cyanobacteria-manual/>.
- Nogueira I. S., Gama Junior W. A., Alessandro E. B. (2011): Planktonic cyanobacteria from an artificial urban lake in the city of Goiânia, Goiás State. *Braz. J. Bot.* 34: 575-592.
- Norris R. L., Eaglesham G. K., Pierens G., Shaw G. R., Smith M. J., Chiswell R. K., Seawright A. A., Moore M. R. (1999): Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 14: 163-165.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* (95): 351-358.

- Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC (1992) *Cylindrospermopsin*: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114: 7941-7942.
- Ostojčić A., Simić S., Simić V., Pešić S., Savić G., Ilić G., Milošević S. (1995): Zajednice planktona i bentosa kao pokazatelj stanja ekosistema jezera Bujanj. Konferencije "Zaštita voda 95" Tara-Beograd. Zbornik radova, 223-227.
- Oren A., Garrity G. M. (2014): Proposal to change General Consideration 5 and Principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 1): 309-310.
- Padisák J. (1997): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Monogr. Beitr.* 107(4): 563-593.
- Padisák J. Reynolds C. S. (1998): Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. *Hydrobiologia* 384: 41–53.
- Paerl H. W., Paul V. J. (2012): Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46(5): 1349-1363.
- Palíková M., Rábová M., Krejčí R., Navrátil S., Bláha L. (2007): Chromosomal aberrations in early embryos of weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.) exposed to crude cyanobacterial extract and semipurified compound of microcystins—a pilot study. *Acta Vet. Brno.* 76: 55-60.
- Pantelić D., Svirčev Z., Simeunović J., Vidović M., Trajković I. (2013): Cyanotoxins: Characteristics, production, and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere* 91(4): 421-441.
- Park Y. S., Céréghino R., Compin A., Lek S. (2003): Applications of artificial neural networks for patterning and predicting aquatic insect species richness in running waters. *Ecol. Model.* (160): 265-280.
- Patterson G. M. L., Carmeli S. (1992): Biological effect of tolytoxin (6-hydroxy-7-o-methyl-scytopyhycin b) a potent bioactive metabolite from cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* (157): 406-410.
- Patterson G. M. L., Baker K. K., Baldwin C. L., Bolis C. M., Caplan F. R., Larsen L. K., Levine I. A., Moore R. E., Nelson C. S., Tschappat K. D., Tuang G. D., Boyd M. R., Cardellina J. H., Collins R. P., Gustafson K. R., Snader K. M., Weislow O. S., Lewin R. A. (1993): Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *J. Phycol.* (29): 125-130.
- Penczak T., Głowacki Ł., Kruk A., Galicka W. (2012): Implementation of a self-organizing map for investigation of impoundment impact on fish assemblages in a large, lowland river: long-term study. *Ecol. Model.* (227): 64-71.

- Perendija B., Despotović S., Radovanović T., Gavrić J., Borković-Mitić S., Pavlović S., Ognjanović B., Simić S., Pajović S., Saičić Z. (2011): Biochemical and ultrastructural changes in the liver of European perch (*Perca fluviatilis* L.) in response to cyanobacterial bloom in the Gruža reservoir. Arch. Biol. Sci. 63: 979-989.
- Pithart D., Pichlová R., Bílý M., Hrbáček J., Novotná K., Pechar L. (2007): Spatial and temporal diversity of small shallow waters in river Lužnice floodplain. Hydrobiologia 584: 265-275.
- Predojević D., Popović S., Kljajić Ž., Subakov-Simić G., Blagojević A., Jovanović J., Lazić M. (2015): Diversity of Cyanobacteria in the Zasavica river, Serbia. Arch. Biol. Sci. 67(2): 355-366.
- Predojević (2017): Procena ekološkog statusa reke Zasavice na osnovu algoloških parametara. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet, 328 str.
- Preussel K., Stüken A., Wiedner C. et al. (2006): First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon 47(2): 156-62.
- Prokić S., Popović N., Trebješanin B., Simić Z., Babić P. (2008): Rehabilitation of Lake Aleksandrovac – main projekt. Jaroslav Černi Institute for the Development of Water Resources, Belgrade.
- Ranković B., Simić S., Bogdanović D. (2006): Phytoplankton as indicator of water quality of lakes Bubanj and Šumarice during autumn. Kragujevac. J. Sci. (28): 107-114.
- Rapala J., Lahti K. (2002): Methods for Detection of Cyanobacterial Toxins. In: Detection Methods for Algae, Protozoa and Helminths in Fresh and Drinking Water, F. Palumbo, G. Ziglio, A. Van der Beken (eds) J. Wiley and Sons, Chapter 7, 107-132.
- Rastogi R., Sinha R.P. (2009): Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 27(4): 521-539.
- Republički hidrometeorološki zavod Srbije - RHMZ (2013). Meteorološki godišnjak - klimatološki podaci za Srbiju, godina 2012. Beograd: Odeljenje za klimatske prognoze informisanje i obuku Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ), 216 str.
- Republički hidrometeorološki zavod Srbije - RHMZ (2014). Meteorološki godišnjak - klimatološki podaci za Srbiju, godina 2013. Beograd: Odeljenje za klimatske prognoze informisanje i obuku Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ), 214 str.
- Republički hidrometeorološki zavod Srbije - RHMZ (2015). Meteorološki godišnjak - klimatološki podaci za Srbiju, godina 2014. Beograd: Odeljenje za klimatske prognoze informisanje i obuku Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ), 212 str.
- Reynolds C. S., Petersen A. C. (2000): The distribution of planktonic Cyanobacteria in Irish lakes in relation to their trophic states. Hydrobiologia 424: 91-99.

- Rhee G.Y., Gotham I.J. (1981): The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26(4): 635-648.
- Rippka R. (1988): Recognition and identification of cyanobacteria. *Method. Enzymol.* (167): 28-67.
- Saker M. L., Nogueira I. R., Vasconcelos V. M., Neilan B. A., Eaglesham G. K., Pereira P (2003): First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 243-250.
- Santos K. R. S., Sant'anna C. L. (2010): Cyanobacteria from different types of lakes ("salina," "salitrada" and "baía") representative of the Pantanal da Nhecolândia, MS, Brazil. *Braz. J. Bot.* 33: 61-83.
- Scharschmidt (1883): *Fragmenta phycologiae Bosniaco-Serbicae*. Magyar novenytani lapok. Budapest 7(75): 33-39.
- Scheffer M., Carpenter S., Foley A. F., Folke C., Walker B. (2001): Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* 413: 591-596.
- Scheffer M., van Nes E. H. (2007): Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. *Hydrobiologia* 584: 455-466.
- Scholz S. N., Esterhuizen-Londt M., Pflugmacher S. (2017): Rise of toxic cyanobacterial blooms in temperate freshwater lakes: Causes, correlations and possible countermeasures. *Toxicol. Environ. Chem.* 99(4): 543-577.
- Seawright A. A., Nolan C. C., Shaw G. R., Chiswell R. K., Norris R. L., Moore M. R., Smith M. J. (1999): The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynka). *Environ. Toxicol.* 14: 135-142.
- Sedmak B., Svirčev Z. (2011): Cijanobakterije i njihovi toksini-ekološki i toksikološki rizici i cvetanje cijanobakterija u Srbiji. *Visoka škola za varstvo okolja, Velenje, Slovenija*.
- Sharma S., Nagpure N. S., Kumar R., Pandey S., Srivastava S. K., Singh P. J., Mathur P. K. (2007): Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53:617-623.
- Shaw G., Seawright A. A., Moore M. R., Lam P. K. S. (2000): Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Ther. Drug. Monit.* 22: 89-92.
- Shen X, Lam P.K., Shaw G.R., Wickramasinghe W. (2002): Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* (40): 1499-1501.
- Simeunović J., Svirčev Z., Krstić S., Lazić L. (2005): Occurrence of cyanobacterial blooms in Vojvodina water ecosystems. *Geog. Pann.* (9): 13-19.

- Simeunović J., Svirčev Z., Karaman M., Knežević P., Melar M. (2010): Cyanobacterial blooms and first observation of microcystin occurrences in freshwater ecosystems in Vojvodina region (Serbia). *Fresenius. Environ. Bull.* (19): 198-207.
- Simić S., Simić V. (2009): *Ekologija kopnenih voda. (Hidrobiologija I)*. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Kragujevacu. Zemun. Alta Nova. 295 str.
- Simić S., Mišćević M., Đorđević N., Popović N. (2011): Cijanobakterije u Aleksandrovačkom jezeru - pre i posle sanacije. 16. Studenička akademija. Zbornik abstrakata. Novi Sad. 17-18.
- Simić i sar. (2012): Izveštaj o realizaciji projekta "Istraživanje i promocija biodiverziteta jezera u Šumaricama radi njegovog očuvanja i održivog razvoja". (Projekat finansiran od strane Grada Kragujevca ugovor br. 400-1070/11-V od 29. 07. 2011).
- Simić S., Komárek J., Đorđević N. (2014): The Confirmation of the genus *Glaucospira* (Cyanobacteria) and the occurrence of *Glaucospira laxissima* (G. S. West) comb. nova in Serbia. *Cryptogamie algol.* 35 (3): 259-267.
- Simić S., Đorđević N. (2016): First record of *Pithophora oedogonia* (Montagne) Wittrock (Pithophoraceae) in Aleksandrovac Lake. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions. Kopaonik Mt. 16th -19th June. Book of Abstracts, 60 pp.
- Simić S., Đorđević N., Milošević Dj. (2017): The relationship between the dominance of Cyanobacteria species and environmental variables in different seasons and extreme precipitation. *Fundam. Appl. Limnol.* 190 (1): 1-11.
- Simić V., Janković D., Karaman S., Ostojić A., Simić S., Pavlović D., Ranković B., Pešić S., Stojanović M., Savić G., Ilić G., Milošević S. (1994): Ecological characteristics of lake Bubanj in Kragujevac and possibilities for its reclamation, revitalisation and protection (Ecoengineering). *Ichthyologia* 26(1): 5- 42.
- Singh N.P., Mc Coy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* (175): 184-191.
- Singh S.S., Montgomery B.L. (2011): Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends. Microbiol.* 19 (6): 278-285.
- Sinha R., Pearson L. A., Davis T. W., Burford M. A., Orr P. T., Neilan B. A. (2012): Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones—is climate change responsible? *Water Res.* 46(5): 1408-1419.

- Smith C.D., Zhang X.Q., Moorbery S.L., Patterson G.M.L., Moore R.E. (1994): Cryptophycin-A new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Res.* (54): 3779-3784.
- Smith V. H., Bierman V. J., Jones B. L., Havens K. E. (1995): Historical trends in the Lake Okeechobee ecosystem. Nitrogen: phosphorus ratios, cyanobacterial dominance, and nitrogen fixation potential. *Arch. Hydrobiol. Monogr. Beitr.* 107: 71-88.
- Sörensen K. (1948): A method of establishing groups of equal amplitude in plant society based on similarity of species content. *K. danske Vidensk. Selsk.* (5) 1-34.
- Sotton B., Domaizon I., Anneville O., Cattaneo F., Guillard J. (2015): Nodularin and cylindrospermopsin: a review of their effects on fish. *Rev. Fish. Biol. Fisheries.* 25: 1-19.
- SRPS EN 15204:2008: Kvalitet vode - Uputstvo za prebrojavanje fitoplanktona pomoću invertne mikroskopije (postupak po Utermolu).
- SRPS EN 16695:2016: Kvalitet vode - Uputstvo za procenu biovolumena fitoplanktona.
- SRPS EN 16698:2016 (2016): Kvalitet vode – Uputstvo za kvantitativno i kvalitativno uzorkovanje fitoplanktona iz kopnenih voda. Institut za standardizaciju Srbije (Standard je identičan sa: EN 16698:2015), 35 str.
- SRPS EN ISO 5667-14:2017 (2017): Kvalitet vode – Uzimanje uzoraka – Deo 14: Uputstvo za obezbeđenje kvaliteta i kontrolu kvaliteta pri uzimanju i rukovanju uzorcima vode iz životne sredine. Institut za standardizaciju Srbije (Standard je identičan sa: EN ISO 5667-14:2016), 45 str.
- Stević F. (2011): The complexity of the impact of floods on the structure and dynamics of phytoplankton in the floodplain. Dissertation, University of Osijek, Croatia., 1-157 pp.
- Stević F. (2011): The complexity of the impact of floods on the structure and dynamics of phytoplankton in the floodplain. – Dissertation, University of Osijek, Croatia, 1-157 pp.
- Sun J., Liu D. (2003): Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.* 25 (11): 1331-1346.
- Suthers M. I., Rissik D. (2009): *Plankton – A guide to their ecology and monitoring for water quality*, CSIRO Publishing, 256 pp.
- Svirčev Z., Simeunović J., Subakov-Simić G., Krstić S., Vidović M. (2007): Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. *Geogr. Pann.* (11):12-21
- Svirčev Z., Marković S., Krstić S., Plavša J. (2008b): Surface freshwater quality state in Vojvodina and proposal for the WFD monitoring system based on some biological elements. Faculty of Sciences, University of Novi Sad.

- Svirčev Z., Krstić S., Miladinov-Mikov M., Baltić V., Vidović M. (2009): Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* (27): 36-55.
- Svirčev Z., Simeunović J., Subakov-Simić G., Krstić S., Pantelić D., Dulić T. (2013): Cyanobacterial blooms and their toxicity in Vojvodina lakes, Serbia. *Int. J. Environ. Heal. R.* (7): 745-758.
- Svirčev Z., Tokod N., Drobac D., Codd G.A. (2014): Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. *Syst. Biodivers.* 12 (3): 261-270.
- Svirčev Z., Tokodi N., Drobac D. (2017). Review of 130 years of research on cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia presented in a Serbian Cyanobacterial Database. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 8(1): 153-160.
- Svirčev Z., Lalić D., Bojadžija Savić G., Tokodi N., Drobac Backović D., Chen L., Meriluoto J., Codd G.A. (2019): Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch. Toxicol.* (93): 2429-2481.
- Teneva I., Asparuhova D., Dzambazov B., MLadenov R., Schirmer K. (2003): The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aeruginocoerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environ. Toxicol.* (18): 9-20.
- Terao K., Ohmori S., Igarashi K., Ohtani I., Watanabe M. F., Harada K. I., Ito E., Watanabe M. (1994): Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32(7): 833-843.
- Teubner K., Feyerabend R., Henning M., Nicklisch A., Woitke P., Kohl J.G. (1999): Alternative blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* or *Planktothrix agardhii* induced by the timing of the critical nitrogen-phosphorus-ratio in hypertrophic riverine lakes. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol.* 54: 325-344.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. (2000): The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* (35): 206-221.
- Tokodi N. (2016): Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-Matematički Fakultet, 253 str.
- Tokodi N., Drobac D., Meriluoto J., Lujčić J., Marinović Z., Važić T., Nybom S., Simeunović J., Dulić T., Lazić G. et al. (2018): Cyanobacterial effects in Lake Ludoš, Serbia—Is preservation of a degraded aquatic ecosystem justified? *Sci. Total. Environ.* (635): 1047-1062.
- Tokodi N., Drobac Backović D., Lujčić J. Šćekić I., Simić S., Đorđević N., Dulić T., Miljanović B., Kitanović N., Marinović Z., Savela H., Meriluoto J., Svirčev Z. (2020): Protected

- Freshwater Ecosystem with Incessant Cyanobacterial Blooming Awaiting a Resolution, *Water* (12): 129.
- Trbojević I., Predojević D., Subakov Simić G., Krizmanić J. (2019a): Periphytic diatoms in the presence of a cyanobacterial bloom: a case study of the Vrutci Reservoir in Serbia. *Arch. Biol. Sci.* 71 (2): 215-223.
- Trbojević I., Blagojević A., Kostić D., Marjanović P., Krizmanić J., Popović S., Subakov Simić G., (2019b): Periphyton development during summer stratification in the presence of a metalimnetic bloom of *Planktothrix rubescens*. *Limnologica* (78): 125709.
- Utermöhl H. (1958): Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* (9): 1-38.
- van Apeldoorn M.E., van Egmond H.P., Speijers G.J.A., Bakker G.J.I. (2007): Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food. Res.* (51): 7-60.
- Vesanto J., Himberg J., Alhoniemi E., Parhankangas J. (2000): Som toolbox for matlab 5. Technical Report A57. – Neural Network Research Centre, Helsinki University of Technology, Helsinki, 59 pp.
- Water Framework Directive (WFD) (2000): Directive of European Parliament and of the Council 2000/60/EC – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. European Union, the European Parliament and Council, Luxembourg.
- Welker M., Bickel H., Fastner J. (2002): HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin—opportunities and limits. *Water. Res.* (36): 4659-4663.
- Wetzel G. R. (2001): *Limnology: Lake and River Ecosystems*, 3rd Edn., 816 p. Academic Press, San Diego.
- Whitton B.A. (e.d.) (2012): *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, Springer, Dordrecht/Heidelberg/New York/London.
- Wojciechowski J., Padiá A. A. (2015): Monitoring studies should consider temporal variability to reveal relations between cyanobacterial abundance and environmental variables. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87(3): 1717-1726.
- Wolk C.P. (1980): Cyanobacteria (Blue-green algae). *Biochem Plants* (1): 659-687.
- Wong F.C.Y., Meeks J.C. (2002): Establishment of a functional symbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation. *Microbiology* (148): 315-323.
- Wood S. A., Stirling D. J. (2003): First identification of the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshwater. Res.* 37: 821-828.

- Wood S. A., Borges H., Puddick J., Biessy L., Atalah J., Hawes I., Dietrich D. R., Hamilton D. P. (2017): Contrasting cyanobacterial communities and microcystin concentrations in summers with extreme weather events: insights into potential effects of climate change. *Hydrobiologia* 785(1): 71-89.
- World Health Organization (WHO) (2003): Guidelines for Safe Recreational Water Environments: Coastal and fresh waters, Vol.1. World Health Organization, 219 pp.
- Wu Q, Li M, Gao X, Giesy J. P., Cui Y., Yang L., Kong Z. (2011): Genotoxicity of crude extracts of cyanobacteria from Taihu Lake on carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 20: 1010-1017.
- Xia Z., Ping X., Le H., Nichun G., Yingan G., Xiulin H. Jun C., Gaodao L. (2006): Effects of the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) on plankton and the hepatotoxic microcystins in an enclosure experiment in a eutrophic lake, Lake Shichahai in Beijing. *Aquaculture* 257: 173-186.
- Yang Z, Zhang M, Shi X, Kong F, Ma R, Yu Y. (2016): Nutrient reduction magnifies the impact of extreme weather on cyanobacterial bloom formation in large shallow Lake Taihu (China). *Water Res.* 103: 302–310.
- Zapomělová E., Jezberová J., Hrouzek P., et al. (2010): Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). *J. Phycol.* 46 (2): 415-415.
- Žegura B., Gajski G., Štraser A., Garaj-Vrhovac V. (2011): Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicon* 58: 471-479.
- Znachor P., Zapomělova E., Reháková K., Nedoma J., Šimek K. (2008): The effect of extreme rainfall on summer succession and vertical distribution of phytoplankton in a lacustrine part of a eutrophic reservoir. *Aquat. Sci.* 70 (1): 77-86.
- Zohary T., Padisák J., Naselli-Flores L. (2010): Phytoplankton in the physical environment: beyond nutrients, at the end, there is some light. *Hydrobiologia* 639(1): 261-269.
- Службени гласник Републике Србије 128/2014 (2014): Закон о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда.
- Службени гласник Републике Србије 30/2010 (2010): Закон о водама.
- Службени гласник Републике Србије 74/2011 (2011): Правилник о параметрима еколошког и хемијског статуса површинских вода и параметрима хемијског и квантитативног статуса подземних вода.

Коришћене интернет странице:

<https://www.algaebase.org/>

<http://www.cis.hut.fi/projects/som-toolbox>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria>

<https://sr.wikipedia.org>

<https://www.google.com/maps/>

8. Прилози

Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats in vivo

Nevena B. Đorđević¹ · Sanja LJ. Matić¹ · Snežana B. Simić¹ · Snežana M. Stanić¹ · Vladimir B. Mihailović² · Nevena M. Stanković² · Vesna D. Stanković³ · Andrija R. Ćirić²

Received: 30 November 2015 / Accepted: 27 March 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract In vivo laboratory studies of toxicity were performed on Wistar rats using a methanol extract produced by the natural population of *Cylindrospermopsis raciborskii* (abundance of 2.13×10^5 trichomes mL^{-1}) collected at Aleksandrovac Lake (Serbia). HPLC analysis showed that the extract contains $6.65 \mu\text{g}$ cylindrospermopsin (CYN) mg^{-1} . The rats were killed 24 or 72 h after a single intraperitoneal injection of *C. raciborskii* extract in concentrations of 1500, 3000, 6000 and 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight (bw) and an equivalent amount of CYN as present in the highest dose of the extract ($79.80 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$ bw). The genotoxic effect on the livers treated with *C. raciborskii* was evaluated using comet assay and potential induction of oxidative stress as the toxicity mechanism associated with the presence of CYN in extract. The results from the analyses of DNA damage in the comet tail length, tail moment and percentage of DNA in the tail in the liver indicated that administration of extract and CYN present statistically significant difference when compared with the negative control group. Although an increase in the frequency of selected parameters induced by the CYN was observed in the liver, this damage was less than the damage resulting from the administration of the highest dose of

extract. The changes in the biochemical parameters of the hepatic damage showed that the application of single doses of the extract and CYN did not cause serious liver damage in rats. The extract and CYN significantly increased oxidative stress in rats' liver after a single exposure.

Keywords *Cylindrospermopsis raciborskii* · Cylindrospermopsin · Toxicity · DNA damage · Histopathology · Serbia

Introduction

Cyanobacteria are a common and natural component of most aquatic ecosystems; they are the most important primary producers but can cause numerous problems should their massive development, namely water blooming, occur. During their secondary metabolism, cyanobacteria create different compounds, including cyanotoxins. Cyanotoxins have been thoroughly researched in the last decades, as a result of which numerous mechanisms of toxicity have been identified, such as hepatotoxicity, neurotoxicity or acute contact toxicity (Chorus and Cavalieri 2000). Studies from many countries show that the cyanobacterial species *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya & Subba Raju produces the cylindrospermopsin (CYN) toxin (Antunes et al. 2015): Australia (Hawkins et al. 1985); Florida, USA (Chapman and Schelske 1997); Brazil (Bouvy et al. 2000); New Zealand (Stirling and Quilliam 2001) and Serbia (Đorđević et al. 2015). Since *C. raciborskii* produces this toxin, this species ranks very high on the watch list of toxic cyanobacteria for water managers (Chorus and Bartram 1999). CYN is cytotoxic, dermatotoxic, genotoxic, hepatotoxic and developmentally toxic and may also be carcinogenic (Cruz et al. 2013). CYN

Responsible editor: Vitor Manuel Oliveira Vasconcelos

✉ Snežana B. Simić
snezasi@kg.ac.rs

¹ Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34 000, Serbia

² Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34 000, Serbia

³ Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34 000, Serbia

has been found to be genotoxic in a number of in vivo studies (Bazin et al. 2010a; Shen et al. 2002) and in vitro studies (Bazin et al. 2010b; Humpage et al. 2000, 2005; Shen et al. 2002; Saker et al. 2003a). Žegura et al. (2011) found that CYN is genotoxic not only in the liver and colon cells, but lymphocytes can also be a target of CYN-induced genotoxicity. Also, some studies show that this compound causes severe liver damage in mouse bioassay (Hawkins et al. 1985; Hawkins et al. 1997; Ohtani et al. 1992; Bernard et al. 2003).

There is considerable variability in the toxicity of *C. raciborskii* and CYN between different animal models and between CYN-producing cyanobacteria from different localities (Kinnear 2010; Guzmán-Guillén et al. 2013).

In the territory of Serbia, *C. raciborskii* has been detected in fish ponds (Čirić et al. 2010; Cvijan and Fužinato 2012), salt marshes (Cvijan and Fužinato 2011), a river (Karadžić et al. 2013) and the alkaline lake (Đorđević and Simić 2014; Simić et al. 2014). Previous studies in Serbia regarding toxicity have focused on the presence of CYN from *C. raciborskii* (Đorđević et al. 2015) and on the presence of microcystin from *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, as well as an overview of potential risk factors in the carcinogenesis of primary liver cancer in Serbia and the possible link with cyanobacteria blooms (Simeunović et al. 2010; Drobac et al. 2013; Natić et al. 2012; Svirčev et al. 2013). However, there have been no in vivo laboratory studies of the toxicity of *C. raciborskii* from Serbia. Taking all these data into account, the aim of this study was to investigate the alterations in serum parameters as indicators for liver injury and histopathological alterations in the livers of Wistar rats, 24 and 72 h after being exposed to 1500, 3000, 6000 and 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight (bw) of methanol extract from the natural population of *C. raciborskii* from Aleksandrovac Lake (Serbia) and an amount of CYN equivalent to the highest dose of the extract (79.80 $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ bw). In addition, we also evaluated the genotoxic effects in the liver cells of rats treated intraperitoneally with *C. raciborskii* using comet assay and the potential induction of oxidative stress as a toxicity mechanism associated with the presence of CYN in the extract.

Materials and methods

Sampling

Water bloom biomass samples of *C. raciborskii* were collected from Aleksandrovac Lake. This is a shallow lake (maximum depth of 4 m) in the southernmost part of Serbia (N 42° 29' 22", E 21° 53' 54"). This reservoir was originally used for irrigating agricultural areas and later for sports and recreational purposes, above all fishing. The water mass of the lake covers most of the so-called Aleksandrovac salines. The lake covers about two thirds of the salines, while one third is

outside the lake (Đorđević and Simić 2014; Simić et al. 2014; Đorđević et al. 2015).

Sampling of phytoplankton from Aleksandrovac Lake was conducted monthly from June 2012 to February 2013 (Đorđević et al. 2015). Phytoplankton samples were taken using a standard method—phytoplankton net (net frame 25 cm, mesh net, e.g. 22 μm) and a Rutner bottle (2 L). Quantitative analysis of the phytoplankton was carried out using the Utermöhl method (Utermöhl 1958) with a Carl Zeiss inverted microscope, and it is expressed as the number of trichomes per millilitre. The phytoplankton individuals were sedimented first and then quantified in the chamber (i.e. transects). Microscopic identification of *C. raciborskii* was carried using the following literature (Komárek 2013) out on the basis of its morphological characteristics as seen using a Nikon Eclipse E100 microscope with magnification up to $\times 100$ – $\times 400$ (Đorđević et al. 2015).

Sampling of the biomass of *C. raciborskii* was carried out on November 1, 2012 in the Aleksandrovac Lake when blooming observed. Samples of water bloom were collected horizontally with dark glass bottles of 1 L on five sites and 0.5-m depth. The samples were transported to the laboratory in refrigerator and after that prepared for extraction.

Sample preparation for determining cyanotoxins and for the bioassays

Cyanotoxin extraction from *C. raciborskii* cells for cyanotoxin analysis and bioassays was performed according to the World Health Organization protocol (Harada et al. 1999). For cyanotoxin extraction, the samples of water bloom were mixed. A 5 L sample of water was filtered through preweighed glass fibre filters of 70 mm, GF/C, 1.2 μm under a vacuum. The filter papers were dried in an oven, at a temperature of below 50 °C until their weight was constant. For cyanotoxin detection and in order to carry out bioassays, the dry samples on filter papers (0.699 g) were extracted with a ten times higher volume of methanol than the weight of the cells. The cells in methanol were sonicated for 3 min at 100 Hz and then allowed to extract for 1 h in the dark at room temperature. The suspension was then filtered through glass fibre filters, and the solvent was removed under a vacuum in a rotary evaporator, yielding 0.093 g of the dry crude extract.

Cylindrospermopsin analyses

The samples were analysed according to protocol of Welker et al. (2002) and Bláhová et al. (2008). Chemicals with the appropriate degree of purity were used in the work (HPLC grade). Chemicals of appropriate purity were used in the investigation (HPLC grade). The CYN standard was adopted from Enzo Life Sciences (Lausen, Switzerland). Trifluoroacetic acid (99.0%) was purchased from Sigma-

Aldrich (St. Louis, USA). Methanol (HPLC grade) was from J.T. Baker, Deventer, Holland, and Millipore Milli-Q system was from Watford, UK. The extract was suspended in Milli-Q water (Watford, UK) and dissolved by sonication for 5 min. Trifluoroacetic acid (TFA), 0.1% v/v (Sigma-Aldrich St. Louis, USA), was added after centrifugation. The samples were mixed for 1 h and decanted at room temperature for 3 h, according to Welker et al. (2002). The extracts were analysed by HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisted of a DGU-20A3 degasser, LC-20AT analytical pumps, a 7125 injector, a SPD-M20A diode array detector and a CBM-20A system controller on a Supelcosil ABZ Plus, 150 × 4.6 mm, 5- μ m column (Supelco) at 30 °C. The binary gradient of the mobile phase consisted of (a) H₂O + 0.05% TFA and (b) methanol + 0.05% TFA (linear increase from 0% B at 0 min to 50% B at 20 min); the flow rate was 1 mL min⁻¹. Chromatograms at 262 nm were recorded with the SPD-M20A diode array detector. The chromatographic data were processed using LC solution computer software (Shimadzu). CYN was identified by comparing the UV spectra (200–300 nm) and retention times with the standards of CYN (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) and quantified using external calibrations 1–60 mg L⁻¹ (LOD = 0.188, LOQ = 0.572 mg L⁻¹), with an injection volume of 20 μ L.

Test animals

The male albino Wistar rats (2–2.5 months old and weighing 220–250 g) used in this study were obtained from the Animal House of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. The animals were caged at 24 °C, with a 12-h light-dark cycle, and allowed free access to food and water. All of the experiments were performed in accordance with the relevant Serbian guidelines, including the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. The University Committee of the Ethics of Animal Experimentation approved the experiments.

DNA damage-inducing agent

As recommended by the International Workshop on genotoxicity test procedures (Tice et al. 2000), the alkylating agent ethyl methanesulfonate (EMS, CAS no. M0880, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dissolved in saline solution was used as the positive control. The EMS dose (300 mg kg⁻¹ bw) was selected based on its effectiveness in inducing DNA damage (Hartmann et al. 2004).

Experimental design

The methanolic extract of *C. raciborskii* was assessed using four different doses, i.e. 1500, 3000, 6000 and 12,000 μ g kg⁻¹ bw, corresponding to 9.97, 19.95, 39.90 and 79.80 μ g CYN kg⁻¹ bw, respectively, based on the HPLC-determined

CYN content of 6.65 μ g CYN mg⁻¹ extract. The rats were divided into seven main groups. The first group served as the negative control group and received an intraperitoneal injection of saline solution (0.9% NaCl). Following the methodology of Falconer et al. (1999), depending upon the intended route of administration, the test substances were diluted to the required concentration with either distilled water for oral investigations or 0.9% NaCl for intraperitoneal investigations. Intraperitoneal injection was chosen instead of oral administration to ensure that each animal received an accurate dose. To evaluate the genotoxicity using comet assay, the second experimental group received 300 mg kg⁻¹ bw of EMS intraperitoneally and was the reference positive control. The rats in the third experimental group each received an intraperitoneal injection of 79.80 μ g CYN kg⁻¹ bw (98% purity, CAS no. 143545-90-8 supplied by NRC CRM, Canada) dissolved in physiological saline (Shen et al. 2002; Bazin et al. 2012). This dose is equivalent to the amount of CYN present in the highest dose of the extract. The remaining four groups of animals received a single intraperitoneal dose of 1500, 3000, 6000 and 12,000 μ g kg⁻¹ bw, respectively, of the *C. raciborskii* extract. The animals (ten in each group; five for each time point) were killed by decapitation at 24 or 72 h after treatment. The blood and the liver were obtained from each group of animals. Three totally independent experiments were performed.

Determination of DNA damage by alkaline comet assay

DNA damage was measured using comet assay under alkaline conditions and dim indirect light according to the procedure by Singh et al. (1988). Liver samples were excised, and a small fragment transferred on ice. The fragments were washed, minced and suspended into 1 mL of ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS; 0.14 g L⁻¹ CaCl₂, 0.4 g L⁻¹ KCl, 0.06 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.1 g L⁻¹ MgCl₂·6H₂O, 0.1 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 8.0 g L⁻¹ NaCl, 0.35 g L⁻¹ NaHCO₃, 0.09 g L⁻¹ Na₂HPO₄·7H₂O, 1.0 g L⁻¹ D-glucose) containing 20 mM EDTA and 10% dimethylsulphoxide (DMSO). The fragment was cut into smaller pieces using a disposable microtome razor blade, and the solution was aspirated. A fresh mincing solution was added, and the liver samples were minced again into finer pieces. The suspension containing isolated cells was transferred to a tube maintained on ice until preparation of the slides. Ten microlitres of the liver cell suspension was removed and mixed with 75 μ L of 1% low melting point agarose (in Ca⁺² and Mg⁺²-free PBS, pH 7.4) to prepare the final cell-agarose suspension. Eighty-five microlitres of the final cell-agarose suspension was spread over a microscope slide precoated with 1.5% normal melting point agarose in PBS buffer and covered with cover glass. After complete solidification (10 min), the cover glass was removed and the third protective layer of 100 μ L 1% LMPA

was pipetted onto the slide. As before, the cover slips were placed and removed after solidification. The microscope slides were immersed in cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10.0) and incubated for 2 h at 4 °C. After lysis, the slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and the DNA was allowed to unwind for 30 min at 4 °C in alkaline solution containing 300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13. The DNA was electrophoresed for 30 min at 300 mA and 30 V. The slides were then neutralized with 0.4 M Tris-HCL, pH 7.4, three times for 5 min and fixed in absolute alcohol, air-dried and stored at room temperature. Immediately before analysis, the slides were stained with 80 µL of ethidium bromide (20 µg mL⁻¹) and covered with cover slips. The comets were visualized and captured with the ×40 objective lens of a Nikon (Ti-Eclipse) fluorescence microscope attached to a CCD camera. One hundred comet images per slide were randomly captured and analysed. Comets without heads and those with almost all the DNA in the tail or with a very wide tail were excluded from the analysis, since they could be dead cells. Only cells that did not overlap and had a clear margin surrounding them were scored (Hartmann and Speit 1997).

To assess the genotoxic activity, three parameters were adopted as indicators of DNA damage: Tail moment (expressed in arbitrary units) was selected as parameter for estimation of the extent of DNA degradation, % of DNA in the comet tail (the percentage of DNA in the tail) as the preferred parameter and tail length (Collins et al. 2008).

Measurement of serum biochemical parameters

The serum was separated by centrifugation at 2500 rpm for 15 min and used for biochemical estimations. The activity of serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), γ-glutamyl transferase (GGT), total bilirubin (TB), total protein (TP) and total albumin (ALB) was determined using BioSystems commercial kits and an automatic analyser (Roche/Cobas Mira).

Antioxidant enzyme assays in liver homogenate

The liver samples were prepared in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) to give a 10% (w/v) liver homogenate. The homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatants were used for the assays of antioxidant parameters. The biochemical parameters of, for example, glutathione (GSH) (Ellman 1959), superoxide dismutase (SOD) (Misra and Fridovich 1972), catalase (CAT) (Góth 1991) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (Ohkawa et al. 1979) were analysed according to the standard methods. Protein concentrations were determined according to the

method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as the standard.

Histopathological studies

The liver slices were fixed with 4% formalin in phosphate-buffered saline for 24 h and embedded in paraffin. Sections of 5-µm thickness were made using a microtome and then stained with haematoxylin-eosin and observed under a microscope to observe any histopathological changes in the liver. Photographs of each of the slides were taken at ×100 and ×200 magnification on a Carl Zeiss (Axio Scope) microscope.

Statistical analysis

The data obtained were statistically analysed using the SPSS statistical software package (version 13.0). The hypothesis testing methods used included one-way analysis of variance (ANOVA). Variance homogeneity and data distribution were determined by means of Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Post hoc comparison between the control and treated groups was performed with the T3 Dunnett test or with the Bonferroni test when the variance was not homogeneous. The results were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Abundance of the species and concentration of CYN

The abundance of the *C. raciborskii* at Aleksandrovac Lake was 2.13×10^5 trichomes mL⁻¹, during the sampling period in November 2012; blooming of *C. raciborskii* was observed. The representation of the species *C. raciborskii* was 98% in relation to the entire phytoplankton of Aleksandrovac Lake, and eukaryotic algae accounted for the remaining 2%. Because of the absolute dominance of this species, it was possible to collect material for making the extract. The HPLC-determined CYN content was 6.65 µg CYN mg⁻¹ of the extract.

Genotoxicity of the extract

The alkaline version of the comet assay is widely used to evaluate the genotoxic potential of chemicals and environmental contaminants that can induce oxidative stress leading to hepatic injury. In the present study, the methanolic extract of *C. raciborskii* was tested regarding its capacity to induce genotoxic effect in the rat liver. The average tail moment, tail length and % of DNA in the tail were measured. Table 1 shows the results of the alkaline comet assay in the liver of Wistar rats for 24 and 72-h exposure to *C. raciborskii*

Table 1 The effects of 24 and 72-h *C. raciborskii* methanol extract treatment on the liver of Wistar rats obtained by means of comet assay

Treatments	Tail length	% DNA in tail	Tail moment
24 h			
Negative control	18.5 ± 0.5	11.91 ± 0.84	2.93 ± 0.10
EMS	97.2 ± 2.08***	57.4 ± 2.02***	69.1 ± 0.86***
CYN	41.9 ± 0.45*****	30.5 ± 0.17*****	28.7 ± 0.93*****
1500 µg kg ⁻¹	34 ± 0.67*****	19.15 ± 1.27*****	9.53 ± 0.50*****
3000 µg kg ⁻¹	37.16 ± 0.7*****	28.04 ± 0.48*****	32.25 ± 0.61*****
6000 µg kg ⁻¹	59.46 ± 1.36*****	43.55 ± 1.4*****	17.31 ± 0.68*****
12,000 µg kg ⁻¹	94.41 ± 2.02***	58.54 ± 1.10***	80.72 ± 0.82*****
72 h			
Negative control	14.4 ± 0.55	9.01 ± 0.78	1.32 ± 0.19
EMS	77.4 ± 0.77***	47.2 ± 0.96***	82.4 ± 5.26***
CYN	38.6 ± 0.64*****	25.6 ± 1.04*****	13.4 ± 0.72*****
1500 µg kg ⁻¹	29.90 ± 1.02*****	28.49 ± 0.87*****	16.45 ± 1.1*****
3000 µg kg ⁻¹	48.60 ± 1.5*****	41.48 ± 2.61***	39.83 ± 1.02*****
6000 µg kg ⁻¹	59.13 ± 0.95*****	38.25 ± 1.16*****	34.38 ± 1.10*****
12,000 µg kg ⁻¹	104.81 ± 2.9*****	58.89 ± 1.26*****	61.80 ± 1.83*****

The values are mean ± SEM from three independent experiments; n = 5 rats per group

EMS ethyl methanesulfonate, CYN cylindrospermopsin

*p < 0.05 when compared with the negative control group; **p < 0.05 when compared with the CYN-treated group; ***p < 0.05 when compared with the EMS-treated group

methanol extract. In addition, photomicrographs of different DNA migration profiles in the liver were obtained (Fig. 1). The extract was administered as a single dose of 1500, 3000, 6000 or 12,000 µg kg⁻¹ bw to Wistar rats by intraperitoneal injection, accompanied by negative (0.9% saline) and positive (300 mg kg⁻¹ bw of EMS and 79.80 µg CYN kg⁻¹ bw) controls. EMS caused a statistically significant rise in DNA damage, observed as an increase in comet tail length, tail moment and percentage of DNA in the tail, compared with the negative control group. EMS used as a positive control demonstrated the sensitivity of the comet assay and yielded a clear positive response at the concentration used. In the liver of the CYN-treated rats, the tail length, % DNA in the tail and tail moment 24 h after treatment were 2.3-, 2.56- and 9.8-fold, respectively, and were 2.7-, 2.8- and 10.2-fold, respectively, 72 h after treatment, over the basal value measured in the negative control. Although CYN in concentrations of 79.80 µg kg⁻¹ bw caused a statistically significant rise in DNA damage, this damage was less than that resulting from administration of the extract in the highest dose. As can be seen from Table 1, the methanol extract showed genotoxic potential at all tested concentrations when compared with the negative control group (p < 0.05). After 24-h exposure, the ANOVA test did not show significant differences between the group exposed to methanol extract at a dose of 12,000 µg kg⁻¹ and EMS either in the tail length or % of DNA in the tail. In the extract-treated groups, the three parameters increased dose-dependently up to 12,000 µg kg⁻¹ bw with a tail length of 5.1-fold, % of DNA in the tail of 4.9-fold and a mean tail moment of 27.5-fold above

the negative control values. In the treatment with the higher concentration of extract, approximately a 1.17-fold increase in the tail moment above the value in the EMS was observed. After 72-h exposure, there was no significant difference in the % of DNA in the tail between the samples treated with 3000 µg kg⁻¹ of extract and the EMS. Treatment with the highest concentration significantly increased the frequency of tail length when compared to the negative and positive control groups (about 7.3- and 1.4-fold, respectively).

Effects of the extracts on blood biochemical markers

The effects of various doses of the methanol extract of *C. raciborskii* and CYN on serum biochemical markers in rats were studied. The activity of AST, ALT, ALP and GGT enzymes and levels of TP, TB and ALB were measured in rats exposed to the extract after 24 and 72 h (Table 2). Twenty-four hours after a single injection of extract, the AST level only increased significantly (p < 0.05) in groups treated with 1500 and 12,000 µg kg⁻¹ bw. Additionally, a significant reduction in the activity of ALT and ALP (p < 0.05) was observed in all experimental groups 24 h after treatment with the extract. Twenty-four hours after the CYN injection (79.80 µg kg⁻¹ bw), the serum activity of AST and ALT enzymes significantly increased (p < 0.05). However, no significant alterations (p > 0.05) were detectable in the serum activity of AST and ALT enzyme markers in the extract and CYN-treated groups after 72 h compared with the untreated group. Seventy-two hours after injection of the extract, ALP activity decreased

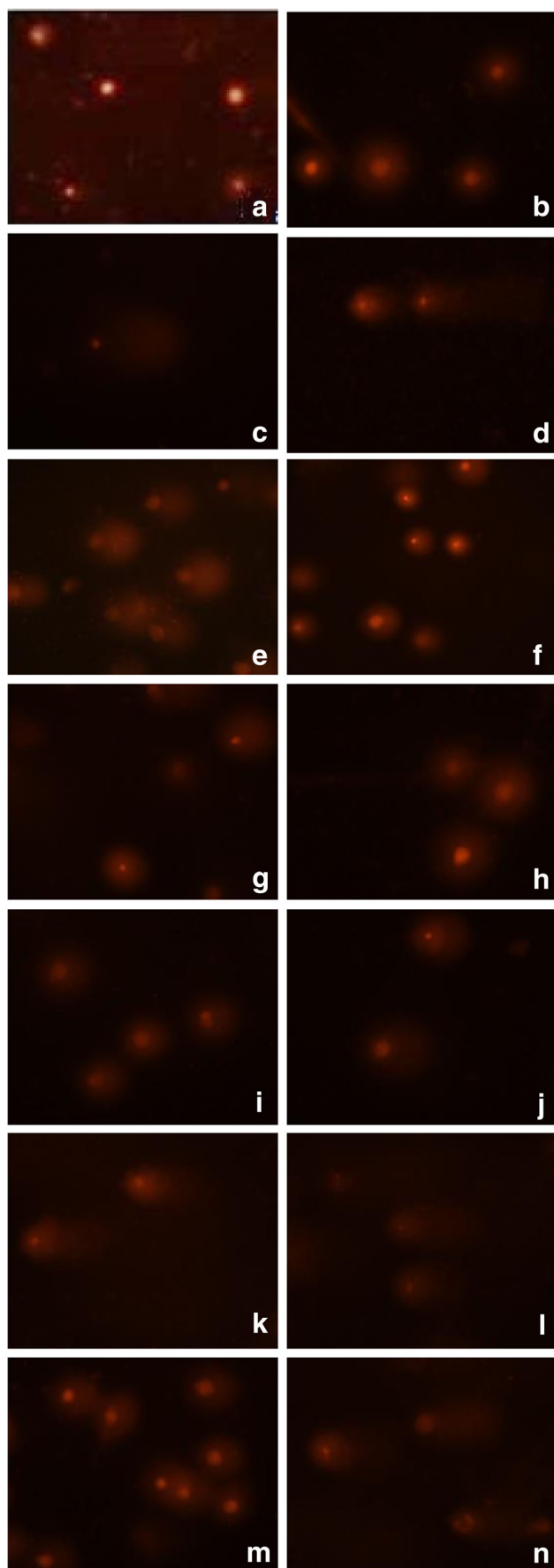


Fig. 1 Representative photomicrographs of the comet assay showing the DNA migration pattern in liver cells stained with ethidium bromide. Negative control (**a, b**, 24 and 72 h after treatment, respectively), EMS-treated rats (**c, d**, 24 and 72 h after treatment, respectively), CYN-treated rats (**e, f**, 24 and 72 h after treatment, respectively), 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw (**g, h**, 24 and 72 h after treatment, respectively), 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw (**i, j**, 24 and 72 h after treatment, respectively), 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw (**k, l**, 24 and 72 h after treatment, respectively) and 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw (**m, n**, 24 and 72 h after treatment, respectively)

only when the extract had been received at dosages of 1500 and 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw and increased in the serum of rats in the group treated with 79.80 $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ bw. Changes in AST and ALT activity were more pronounced 24 h after intoxication with the extract or pure toxin compared with the activity of these enzymes 72 h after intoxication. Also, the pure toxin caused greater changes in the AST and ALT activity in the serum than the methanol extract of *C. raciborskii* after 24 h. None of the doses of cyanobacterial extract or of CYN showed significant changes ($p > 0.05$) in the serum GGT activity after 24 or 72 h. Also, compared to the control group, the TP, TB and ALB levels remained unaltered ($p > 0.05$) for all of the experimental conditions.

Hepatic antioxidant enzyme activity and GSH and TBARS levels

The oxidative damage induced by application of the extract and CYN was estimated by determining the catalytic activity of CAT and SOD and the concentrations of GSH and TBARS. The results are presented in Table 3 as equivalents of the total protein concentration. In the liver samples of the animals killed after 24 h, it was noted that extract at a concentration of 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw induced the highest oxidative damage, whereby the catalytic activity of CAT decreased by 53.56% of the value measured in the control group. When comparing the samples treated with CYN and the negative control, the catalytic activity of CAT decreased by 56.28% of the negative control value. In the samples of animals killed after 72 h, the largest oxidative damage was noted for the extract at a concentration of 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, since the catalytic activity of CAT decreased by 50.37% in comparison with the value of the negative control. CYN induced lower oxidative damage in comparison with the extract at a concentration of 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, since the CAT activity decreased by 68.18% of the negative control value. The catalytic activity of SOD in the samples of animals treated with the extract (3000, 6000 and 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw), and killed after 24 h, significantly decreased ($p < 0.05$) in comparison with the untreated animals. The highest decrease was noted in animals treated with the extract at a concentration of 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw after 24 h, while after 72 h, the extract at a concentration of 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw showed the most pronounced decrease of SOD (56.89%) in relation to the negative control value. In the

Table 2 Effects of *C. raciborskii* extract on the serum biochemical parameters of rats

Concentration (mg kg ⁻¹ bw)	AST (U L ⁻¹)	ALT (U L ⁻¹)	ALP (U L ⁻¹)	GGT (U L ⁻¹)	TP (g L ⁻¹)	TB (μmol L ⁻¹)	ALB (g L ⁻¹)
24 h							
Control	142.58 ± 7.87	55.66 ± 2.73	659.5 ± 46.51	4.38 ± 0.64	65.61 ± 1.35	2.42 ± 0.28	27.29 ± 1.09
CYN	483.20 ± 68.55*	152.35 ± 37.96*	536.30 ± 23.07	2.50 ± 0.28	69.85 ± 1.15	0.81 ± 0.01	24.70 ± 1.81
1500 μg kg ⁻¹	176.97 ± 13.60*	46.03 ± 2.34*	438.63 ± 63.01*	6.50 ± 1.04	70.33 ± 1.27	2.50 ± 0.40	27.77 ± 0.73
3000 μg kg ⁻¹	147.93 ± 10.80	42.47 ± 2.72*	402.23 ± 55.88*	6.40 ± 1.33	65.33 ± 2.67	2.80 ± 0.20	26.83 ± 0.46
6000 μg kg ⁻¹	152.97 ± 9.82	42.27 ± 2.48*	419.71 ± 41.44*	2.67 ± 0.76	63.03 ± 2.60	2.10 ± 0.21	25.83 ± 0.48
12,000 μg kg ⁻¹	181.90 ± 19.99*	44.63 ± 1.77*	432.47 ± 33.66*	4.47 ± 0.84	67.86 ± 2.61	2.30 ± 0.10	27.34 ± 0.77
72 h							
Control	137.02 ± 12.56	56.94 ± 2.30	668.72 ± 33.94	4.46 ± 0.76	64.63 ± 2.95	2.18 ± 0.22	29.17 ± 1.69
CYN	144.30 ± 8.32	61.40 ± 6.42	736.75 ± 40.07*	2.90 ± 0.36	60.85 ± 0.65	0.87 ± 0.06	17.50 ± 0.40*
1500 μg kg ⁻¹	147.60 ± 9.50	56.47 ± 4.10	425.40 ± 23.90*	2.37 ± 0.52	67.20 ± 2.00	2.90 ± 0.64	26.76 ± 0.93
3000 μg kg ⁻¹	141.37 ± 14.00	57.07 ± 2.30	616.13 ± 9.25	3.77 ± 0.38	65.03 ± 1.14	2.37 ± 0.40	27.48 ± 0.54
6000 μg kg ⁻¹	158.90 ± 15.27	49.83 ± 4.24	413.50 ± 39.30*	4.13 ± 0.50	69.56 ± 4.91	2.27 ± 0.52	28.17 ± 1.80
12,000 μg kg ⁻¹	147.77 ± 13.54	58.43 ± 4.52	650.53 ± 32.49	4.63 ± 1.33	66.40 ± 0.85	2.13 ± 0.32	28.50 ± 0.70

The values are mean ± SEM, n = 5 rats in each group

*p < 0.05 compared to control group

samples treated with CYN, the catalytic activity of SOD decreased in relation to the negative control, showing 65.85% (animals killed after 24 h) and 76.64% (animals killed after 72 h) of the activity of the corresponding enzyme in control. Also, after 24 h, the extract concentration of 3000 μg kg⁻¹ bw induced the highest decrease in GSH concentration. Similar results to that of the extract with a concentration of 3000 μg kg⁻¹ were obtained when analysing the samples treated with CYN. In the liver of the animals treated with the

extract concentration of 6000 μg kg⁻¹ bw, and killed after 72 h, it was noted that the decrease in the concentration of reduced glutathione was 65.42% of the negative control value, which indicates significant generation of oxidative species in the organism. The damage induced by CYN was lower in comparison with the extract samples with a concentration of 6000 μg kg⁻¹ bw. And finally, the evaluation of oxidative damage was performed by measuring the level of TBARS in the liver homogenates and expressed as nanomole MDA per

Table 3 Effects of *C. raciborskii* extract on the levels of hepatic antioxidant enzyme activity, GSH and TBARS

Concentration (mg kg ⁻¹ bw)	CAT (U mg ⁻¹ protein)	SOD (U mg ⁻¹ protein)	GSH (mg g ⁻¹ protein)	TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein)
24 h				
Control	61.14 ± 2.38	26.5 ± 1.35	51.86 ± 1.74	3.24 ± 0.31
CYN	34.41 ± 1.88*	17.45 ± 0.95*	31.97 ± 1.18*	4.22 ± 0.12*
1500 μg kg ⁻¹	54.59 ± 3.28	24.42 ± 1.26	56.03 ± 0.22	5.48 ± 0.26*
3000 μg kg ⁻¹	32.75 ± 3.22*	15.53 ± 1.73*	31.33 ± 1.47*	3.80 ± 0.09
6000 μg kg ⁻¹	39.48 ± 2.60*	18.25 ± 1.30*	41.72 ± 1.24*	4.61 ± 0.36*
12,000 μg kg ⁻¹	40.20 ± 1.40*	18.73 ± 0.17*	37.67 ± 0.81*	4.74 ± 0.17*
72 h				
Control	59.96 ± 2.82	25.75 ± 1.51	54.91 ± 2.47	3.27 ± 0.30
CYN	40.88 ± 1.66*	19.22 ± 0.48*	44.08 ± 1.12	4.01 ± 0.09
1500 μg kg ⁻¹	48.71 ± 2.82*	23.12 ± 2.76	53.97 ± 1.82	5.20 ± 0.50*
3000 μg kg ⁻¹	45.17 ± 2.05*	22.85 ± 0.80	54.57 ± 1.43	4.04 ± 0.02*
6000 μg kg ⁻¹	30.20 ± 2.31*	14.65 ± 0.54*	35.92 ± 2.10*	3.41 ± 0.31
12,000 μg kg ⁻¹	49.73 ± 1.75*	19.31 ± 0.33*	39.48 ± 1.91*	3.71 ± 0.40

Values are mean ± SEM, n = 5 rats in each group

CYN cylindrospermopsin

*p < 0.05 compared to control group

milligram proteins. The highest concentration of TBARS was noted in the samples of animals treated with the extract concentration 1500 µg kg⁻¹ bw, after 24 h, inasmuch as the concentration of TBARS was 1.69-fold above the basal value in the negative control. Likewise, after 72 h, the extract concentration of 1500 µg kg⁻¹ bw induced significant oxidative damage, 1.59-fold above the value measured in the negative control group. The oxidative stress induced by CYN was lower in relation to the samples of animals treated with the extract concentration of 1500 µg kg⁻¹ bw (killed after 24 and 72 h), since the concentrations of TBARS were 1.30- and 1.23-fold above the value measured in the negative control, for both samples of CYN killed after 24 and 72 h, respectively.

Histopathological and morphological examination of the liver

As shown in Table 4 and Fig. 2, the hepatic tissues in rats from the control group exhibited the normal cellular structure with distinct hepatic cells and sinusoidal space structure (Fig. 2a, g). In the liver of the CYN-treated rats, the liver sections showed greater damage after 72 h than after 24 h. This damage was mainly sinusoidal dilatation of the central vein, hydropic degeneration and intralobular infiltration of lymphocytes (Fig. 2b, h). Focal lytic necrosis in the liver of the CYN-treated rats after 72 h was centrilobular and localized around the central veins. The liver sections of extract-treated groups showed sinusoidal dilatation, hydropic degeneration, intralobular infiltration of lymphocytes and focal lytic necrosis (Fig. 2c–l). There was also vacuolar degeneration, apoptosis

and Kupfer cell hypertrophy (Fig. 2j–k). However, the most severe damage of hepatic tissue was seen after 72 h in the group given the extract concentration of 3000 and 6000 µg kg⁻¹ bw. The liver sections of the rats from the group given the extract concentration of 1500 µg kg⁻¹ bw showed minor pathomorphological changes that were more similar to the control group after 72 h.

Discussion

C. raciborskii is widely distributed around the world and is known to be a potential toxin producer. Although, *C. raciborskii* can be found on almost every continent, the ability to produce CYN is not universal. Previous studies have found that European and Asian *C. raciborskii* strains do not contain any of the known cyanotoxins but can be toxic to mice (Fastner et al. 2003; Saker et al. 2003b). On the other hand, only Australian (Hawkins et al. 1985; Ohtani et al. 1992), some Asian (Li et al. 2001), New Zealand (Wood and Stirling 2003) and Serbian (Đorđević et al. 2015) strains of *C. raciborskii* have been found to produce CYN. Australian strains of *C. raciborskii* produce the CYN and the CYN analogue, deoxycylindrospermopsin (Norris et al. 1999).

Brazilian *C. raciborskii* strains do produce the neurotoxin saxitoxin although some strains do not produce CYN (Lagos et al. 1999). In order to produce CYN, strains of *C. raciborskii* must contain the CYN biosynthesis gene cluster (cyrA–cyrO; Mihali et al. 2008).

An investigation of the toxicity of Serbian strains seemed necessary both for health risk assessment and as a part of a

Table 4 Effects of *C. raciborskii* extract on the morphological parameters of rat liver

Histopathological parameters								
Concentration (µg kg ⁻¹ bw)	Sinusoidal dilatation of central vein	Hydropic degeneration	Vacuolar degeneration	Intralobular infiltration of lymphocytes	Focal lytic necrosis	Confluent necrosis	Apoptosis	Kupffer cell hypertrophy
24 h								
Control	–	–	–	–	–	–	–	–
CYN	++	+	–	–	–	–	–	–
1500 µg kg ⁻¹	++	+	–	–	+	–	–	–
3000 µg kg ⁻¹	+	+	–	++	+	–	+	–
6000 µg kg ⁻¹	+	+	–	+	++	–	–	–
12,000 µg kg ⁻¹	++	+	–	–	++	++	–	+
72 h								
Control	–	–	–	–	–	–	–	–
CYN	+++	++	–	+	++	–	–	+
1500 µg kg ⁻¹	+	–	–	–	–	–	–	–
3000 µg kg ⁻¹	++	–	+++	+	+	++	+	+
6000 µg kg ⁻¹	++	++	+	–	++	+	–	+
12,000 µg kg ⁻¹	+	+	–	–	+	–	+	–

– absent, + mild, ++ moderate, +++ intense

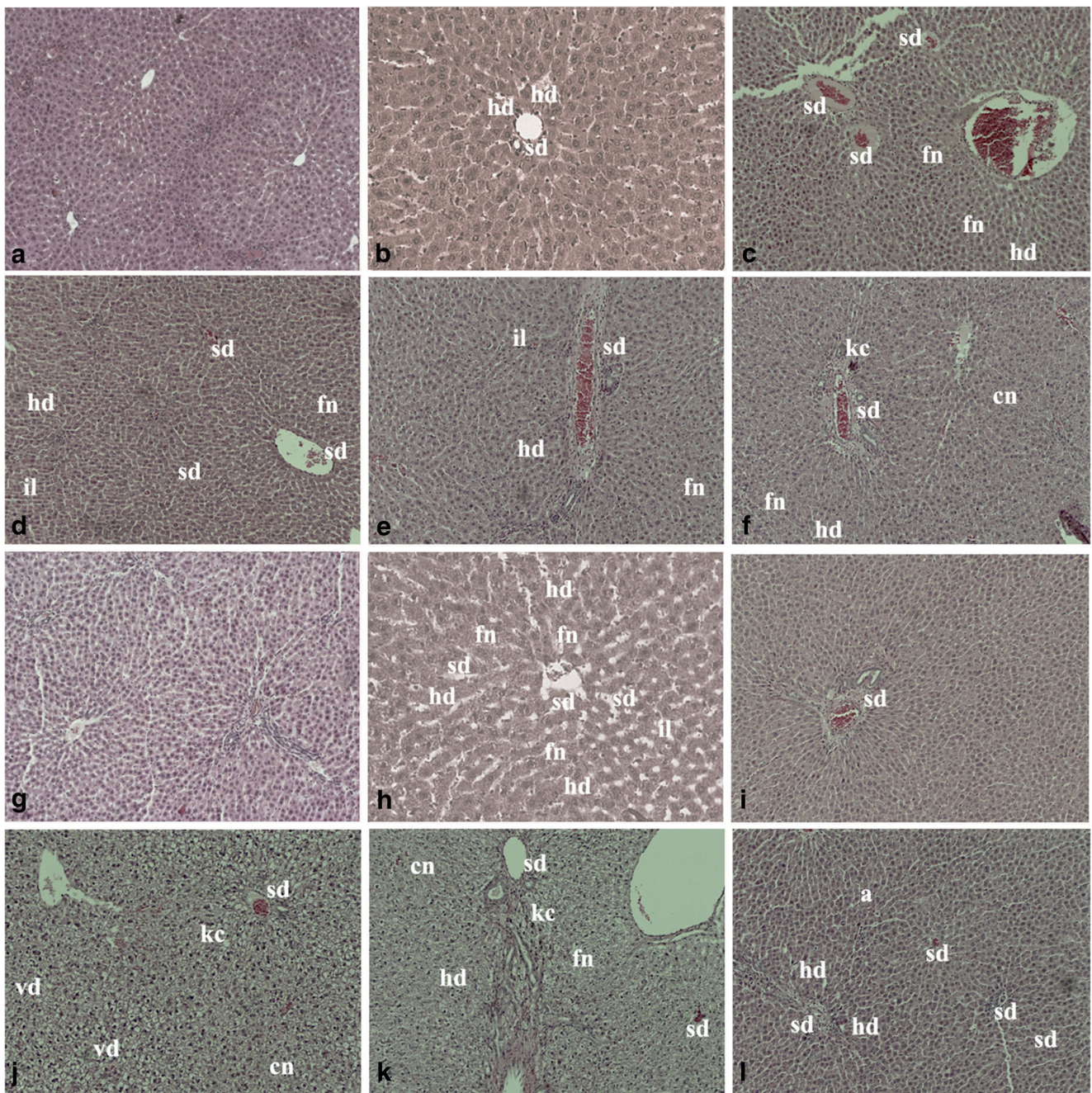


Fig. 2 Photomicrographs of liver sections from **a** control group, 24 h after treatment; **b** CYN-treated rats, 24 h after treatment; **c** 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 24 h after treatment; **d** 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 24 h after treatment; **e** 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 24 h after treatment; **f** 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 24 h after treatment; **g** control group, 72 h after treatment; **h** CYN-treated rats, 72 h after treatment; **i** 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 72 h after treatment; **j** 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$

bw, 72 h after treatment; **k** 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 72 h after treatment; **l** 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw, 72 h after treatment. Magnification, $\times 100$ and $\times 200$. *sd* sinusoidal dilatation, *hd* hydropic degeneration, *vd* vacuolar degeneration, *il* intralobular infiltration of lymphocytes, *fn* focal lytic necrosis, *cn* confluent necrosis, *a* apoptosis, *kc* Kupffer cell hypertrophy

comprehensive study of different *C. raciborskii* strains from diverse geographical sources. The CYN concentrations of the *C. raciborskii* extract in our study (6.65 $\mu\text{g CYN mg}^{-1}$ extract) are similar to concentrations found by Falconer et al. (1999) and Hawkins et al. (1997). Falconer et al. (1999) detected CYN in *C. raciborskii* cell extracts in four different concentrations (1.3, 2.0, 3.2 and 5.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$). It should be

noted that the studies mentioned used the extract based on mass cultures of the *C. raciborskii* strain (Falconer et al. 1999; Seawright et al. 1999), unlike the extract in our study that was made by collecting samples of water and biomass from Aleksandrovac Lake in the period of *C. raciborskii* blooming. Also, a toxic strain of *C. raciborskii* was isolated from a lake in Sydney, Australia, and shown by HPLC

analysis to contain about $5.5 \mu\text{g CYN mg}^{-1}$ of dried cells (Hawkins et al. 1997).

Exposure of humans and domestic animals to *C. raciborskii* and its associated toxin, CYN, in their drinking water will normally be by ingestion. Although in the toxicity studies reported so far, aqueous extracts or suspensions of *C. raciborskii* cultures or pure CYN were most frequently administered by the oral route (Falconer and Humpage 2001), the purpose of the present study was to examine the toxicity of the *C. raciborskii* methanol extract from its natural population when given intraperitoneally. As the liver is the preeminent organ in metabolism, analysis of its cells is recommended (Tice et al. 2000; Hartmann et al. 2003). Also, Lukas et al. (1971) demonstrate that compounds administered intraperitoneally are absorbed primarily through the portal circulation and, therefore, must pass through the liver before reaching other organs. To evaluate the damage caused by the *C. raciborskii* methanol extract, the extent of DNA damage was analysed by means of comet assay under alkaline conditions. This assay makes it possible to investigate primary DNA damage, detecting DNA single and double strand breaks, alkali-labile lesions, as well as DNA strand breaks arising during the repair of DNA lesions in cells isolated from various tissues (Sharma et al. 2007; Carvalho et al. 2011). Also, this assay has found widespread acceptance both as a screening tool for genotoxic compounds and for monitoring human exposure to environmental chemicals (Møller 2006; Costa et al. 2011). Different concentrations of *C. raciborskii* methanol extract (1500, 3000, 6000 and $12,000 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$) and CYN ($79.80 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$) were intraperitoneally injected into Wistar rats. The extent of DNA damage in livers treated with high concentrations of *C. raciborskii* methanol extract (i.e. $12,000 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$) was similar to those of the EMS 24 h after treatment. Also, at the higher concentration tested, the extract caused a significant increase in the tail length when compared with the EMS (1.4-fold above) and negative (7.3-fold above) control 72 h after treatment, thus indicating a genotoxic effect. Although CYN in concentrations of $79.80 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$ caused a statistically significant rise in DNA damage, observed as an increase in comet tail length, tail moment and percentage of DNA in the tail 24 and 72 h after administration, it was still less than the damage resulting from the administration of the extract in the highest tested dose. A higher toxic effect of highest dose of extract than equivalent amount of pure CYN indicates the presence of further toxins in extract or synergistic effects. This result is in agreement with the results obtained in studies by Falconer et al. (1999), Hawkins et al. (2001) and Metcalf et al. (2002). These authors demonstrated that *C. raciborskii* lyophilate extracts with CYN are more toxic than the administration of CYN alone. Previous studies have also reported that some Cyanobacteria may have genotoxic effects in different models depending on various compounds present in the extracts

(Bouaïcha et al. 2005; Lankoff et al. 2006; Palíková et al. 2007; Wu et al. 2011; Žegura et al. 2011; Laughinghouse et al. 2012). Chemical analysis of the cyanobacterial methanol extract confirmed the presence of CYN. As a toxin, CYN has both cytotoxic and hepatotoxic action, which primarily results from the potent protein synthesis inhibition that occurs after covalent bonding of CYN with DNA or RNA (Shaw et al. 2000) with the accompanying significant DNA strand breakage (Shen et al. 2002). The nucleotide structure of CYN as a sulfated-guanidinium alkaloid with 5-substituted-2,4-dioxypyrimidine (uracil) moiety (Banker et al. 1997; Harada et al. 1994) and the presence of potentially reactive guanidine and sulphate groups suggest the possibility of interference with DNA synthesis and induction of mutations.

The hepatic toxicity of the methanol extract of *C. raciborskii* and CYN was indicated by serum markers of liver function and histopathology. The elevation of ALP, ALT, AST and GGT activity was attributed to hepatic structural damage because these enzymes are normally localized to the cytoplasm and released into the circulation after cellular damage has occurred. The regulation of serum enzyme activity is not a function of the liver, which is more accurately assessed according to the levels of total bilirubin and protein synthesis, seen in the albumin concentration (Navarro and Senior 2006). According to data available from other studies, the liver has been described as a primary site of CYN-induced toxicity (Hawkins et al. 1985; Harada et al. 1994; Bernard et al. 2003; Griffiths and Saker 2003; Terao et al. 1994). In our study, the clinical indicator enzymes for liver injury (AST, ALT, ALP and GGT) do not appear to have been released into the serum by the *C. raciborskii* extract in the manner expected after exposure to a hepatotoxin. After 24 h, the activity of ALT and ALP showed a statistically significant decrease in doses of between 1500 and $12,000 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$, and AST activity significantly increased at 1500 and $12,000 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$ of extract, which was low in comparison with changes seen in hepatobiliary disease. Pure CYN administered at $79.80 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}$, which corresponds to the amount of toxins in the highest studied dose of the methanol extract of *C. raciborskii*, caused higher elevation of AST and ALT in the circulation after 24 h than the extract. Biochemical indicators of hepatic damage showed greater differences from the control values in the groups 1 day after the doses of the extract or CYN, while the serum biochemical parameters of hepatic damage returned to normal after 72 h in most animals. In previous studies, the crude aqueous extract of cultured *C. raciborskii* supplied at dilutions of 43 – $135 \text{ mg freeze-dried material kg}^{-1} \text{day}^{-1}$ (calculated toxin dose of CYN 216 – $687 \mu\text{g kg}^{-1} \text{per day}$) in the animals' drinking water for 10 weeks and purified CYN dosed orally at concentration of 30 to $240 \mu\text{g kg}^{-1} \text{per day}$ for 11 weeks in male Swiss albino mice did not show statistically significant changes in the AST and ALT activity compared with an untreated group (Humpage and Falconer 2003). Chernoff et al. (2011) administered

50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of CYN for 5 days to pregnant mice exposed during different segments of gestation and monitored them up to 7 weeks post-dosing. They observed that the values for the serum's biochemical parameters (AST and ALT) increased 24 h after the final dose, and 1 week after dosing, the biochemical indicators of hepatic damage returned to normal. Similar results were observed in our study when the rats received a single dose of 79.80 $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ bw. Taking into account the liver-related biochemical parameters, the pure toxin caused greater liver damage than the *C. raciborskii* methanol extract. A single dose exposure using rats injected i.p. with 1500 to 12,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw *C. raciborskii* methanol extract containing 6.65 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of CYN did not show any significant serum chemistry changes related to liver function. These data provide additional support to the hypothesis of Chernoff et al. (2011) that the liver is not the primary site of CYN-induced toxicity. Also, these effects could be explained by saying that the concentrations of the extract used, which contained 6.65 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of CYN, were not sufficient to cause serious liver damage.

Minimal to moderate liver lesions were noted in the extract and CYN-treated groups, with similar changes in hepatic histopathology in the groups after 24 and 72 h of intoxication. These changes, including necrosis, apoptosis, infiltration of inflammatory cells and cytoplasmic vacuolization in the liver of rats exposed to CYN-containing extract, are in accordance with a previous study performed in tilapia and in mice exposed orally to or by i.p. administration of CYN or the *C. raciborskii* culture (Gutiérrez-Praena et al. 2012; Seawright et al. 1999; Chernoff et al. 2011). In contrast to serum biochemical indicators of hepatic damage, the major pathological changes observed in the livers examined in this work were very similar between rats euthanized after 72 h and rats euthanized after 24 h; consequently, no recovery of the histological effects induced by *C. raciborskii* extract in the rats was observed. Some of these pathological changes were also described in tilapia exposed i.p. by pure CYN which were more severe at 5 days than at 24 h (Gutiérrez-Praena et al. 2012).

The metabolism of chemicals takes place largely in the liver. Catalytic activity of hepatic enzymes controls these toxic chemicals, and of the body's estimated one million enzymes, the great majority for oxidative/detoxification purposes are in the liver. These metabolic processes disturb normal cell function, and the result could be oxidative stress, i.e. the imbalance between prooxidants and antioxidants, whereby cellular macromolecules may be damaged by uninhibited, reactive free radicals with a short lifespan and relative nonspecific activity (Navarro and Senior 2006; Stehbens 2003). To minimize the effect of ROS and free radicals, cells produce enzymatic antioxidants (SOD, CAT, etc.) and nonenzymatic oxidants (GSH), which are pivotal in intracellular antioxidant defence in aerobic organisms (Carocho and Ferreira 2013). The results obtained in the present work confirm the oxidative damage induced by *C. raciborskii* extract in rats under laboratory conditions, as

the GSH, CAT and SOD levels decreased and MDA increased after the exposure to mild and high doses of extract. We found that the indicators of oxidative stress were more pronounced after 24 h of intoxication than after 72 h. The oxidative damage induced by CYN was lower in comparison with the samples of animals treated with the extract at a concentration of 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and killed after 24 h, which caused the highest damage. In animals killed after 72 h, the damage was also lower in comparison with the extract samples at a concentration of 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The samples of CYN caused higher oxidative damage than the highest applied dose of the methanol extract of *C. raciborskii*. When comparing the samples of animals killed after 24 and 72 h, the oxidative damage was higher in samples killed after 24 h. Oxidative stress induced by CYN is considered to be involved in the development of CYN toxicity in several experimental models, but in the case of *C. raciborskii* extract, there are limited data. Puerto et al. (2014) found that single doses of CYN pure standard (200 or 400 $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ fish bw) by the oral route (gavage) generated changes in the oxidative stress biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by increasing the oxidation of protein and NADPH oxidase activity and decreasing the GSH contents in the liver and kidney of the intoxicated fish. Considering previous studies, the concentrations of CYN applied in our study (9.97 to 79.80 $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ bw) were lower, and the results showed that these concentrations induced changes in oxidative stress biomarkers in the liver.

This study showed that *C. raciborskii* extract showed significant genotoxicity even in low concentrations and increased oxidative stress in rat liver after a single exposure. The doses of *C. raciborskii* methanol extracts and CYN applied were not high enough to induce meaningful liver damage in rats. All of the changes which indicated hepatotoxicity could be considered as reversible if the organisms are no longer in contact with the *C. raciborskii* samples or pure CYN. Due to the ubiquitous presence of *C. raciborskii* in freshwater systems, research regarding toxin production, toxicity, genetics, ecology and health risks caused by the presence of CYN in waters worldwide is necessary in order to take measures and prevent any harmful effects on human health and the environment. Therefore, these results can have implications for public health.

Acknowledgements This work was supported by the Ministry of Education and Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. TR 31011, III 43002, III 43004 and III 41010).

References

- Antunes JT, Leão PN, Vasconcelos VM (2015) *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecology of a global invasive species. *Front Microbiol* 6:1–13
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A (1997) Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon*

- ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret. Israel J Phycol 33:613–616
- Bazin E, Huet S, Jarry G, Hegarat LL, Munday JS, Humpage AR, Fessard V (2010a) Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection. Environ Toxicol 27:277–284
- Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V (2010b) Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. Environ Mol Mutagenesis 51:251–259
- Bazin E, Huet S, Jarry G, Hégarat LL, Munday JS, Humpage AR, Fessard V (2012) Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection. Environ Toxicol 27:277–284
- Bernard C, Harvey M, Briand JF, Bire R, Krysz S, Fontaine JJ (2003) Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by French *C. raciborskii* strain. Environ Toxicol 18:176–186
- Bláhová L, Babica P, Adamovský O, Kohoutek J, Maršálek B, Bláha L (2008) Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. Environ Chem Lett 6:223–227
- Bouaïcha N, Maatouk I, Plesis MJ, Périn F (2005) Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. Environ Toxicol 20:341–347
- Bouvy M, Falcão D, Marinho M, Pagano P, Moura A (2000) Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. Aquat Microb Ecol 23:13–27
- Carocho I, Ferreira IC (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem Toxicol 51:15–25
- Carvalho IM, Melo Cavalcante AA, Dantas AF, Pereira DL, Costa Rocha FC, Andrade TJ, Da Silva J (2011) Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. Mutat Res 28:58–61
- Chapman AD, Schelske CL (1997) Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. J Phycol 33:191–195
- Chernoff N, Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Malarkey DE, Bradfield CA, Liu Y, Schmid JE, Jaskot RH, Richards JH, Wood CR, Rosen MB (2011) Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. J Appl Toxicol 31:242–254
- Chorus I, Bartram J (1999) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management (WHO). The World Health Organization, E. and F.N. Spon, London, p 416
- Chorus I, Cavalieri M (2000) Cyanobacteria and algae, chapter 10. In: Bartram J, Rees G (eds) Monitoring bathing waters - A practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes. The World Health Organization, E. and F.N. Spon, London
- Čirić M, Marković Z, Dulić Z, Subakov-Simić G (2010) First report of cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from carp ponds in Serbia. The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8). Istanbul, Turkey. Abstract book, p 14
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R (2008) The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23:143–151
- Costa S, Pina C, Coelho P, Costa C, Silva S, Porto B, Laffon B, Teixeira JP (2011) Occupational exposure to formaldehyde: genotoxic risk evaluation by comet assay and micronucleus test using human peripheral lymphocytes. J Toxicol Environ Health A 74:1040–1051
- Cruz AA, Hiskia A, Kaloudis T, Chernoff N, Hill D, Antoniou GM, He X, Loftin K, O'Shea K, Zhao C, Pelaez M, Han C, Lynch JT, Dionysios DD (2013) A review on cylindrospermopsin; the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. Environ Sci Processes Impacts 15:1979–2003
- Cvijan M, Fužinato S (2011) The first finding of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju (Cyanoprokaryota) in Serbia. Arch Biol Sci 63:507–510
- Cvijan M, Fužinato S (2012) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota)—potential invasive and toxic species in Serbia. Bot Serb 36:3–8
- Dorđević NB, Simić SB (2014) Cyanobacterial blooms in oligosaline and alkaline microaccumulation before and after rehabilitation. Pol J Environ Stud 23:1975–1982
- Dorđević NB, Simić SB, Čirić AR (2015) First identification of the cylindrospermopsin (CYN)—producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya & Subba Raju in Serbia. Fresenius Environ Bull 24(11a):3736–3742
- Drobac D, Tokodi N, Simeunović J, Baltić V, Stanić D, Svirčev Z (2013) Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. Arh Hig Rada Toksikol 64:305–316
- Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl group. Arch Biochem Biophys 82:70–77
- Falconer IR, Humpage AR (2001) Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. Environ Toxicol 16:192–195
- Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froschio SM, Tozer GJ, Hawkins PR (1999) Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. Environ Toxicol 14:143–150
- Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I (2003) *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. Toxicon 42:313–321
- Góth L (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 196:143–152
- Griffiths DJ, Saker ML (2003) The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. Environ Toxicol 18:78–93
- Gutiérrez-Praena D, Josa Á, Pichardo S, Moyanob R, Blancoc A, Monterdec JG, Cameán AM (2012) Time-dependent histopathological changes induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. Ecotox Environ Safe 76:102–113
- Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Vasconcelos VM, Cameán AM (2013) Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). Chemosphere 90:1184–1194
- Harada KI, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K (1994) Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32:73–84
- Harada K, Kondo F, Lawton L (1999) Laboratory analysis of cyanotoxins, chapter 13. In: Chorus I, Bartram J (eds) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management (WHO). The World Health Organization, E. and F.N. Spon, London, pp 369–405
- Hartmann A, Speit G (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay). Toxicol Lett 90:183–188
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. Mutagenesis 18:45–51

- Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L (2004) Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 19(1):51–59
- Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol* 50:1292–1295
- Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer IR (1997) Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35:341–346
- Hawkins PR, Putt E, Falconer I, Humpage A (2001) Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankton, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture. *Environ Toxicol* 16(6):460–467
- Humpage AR, Falconer IR (2003) Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol* 18:94–103
- Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR (2000) Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutagenesis* 472:155–161
- Humpage A, Fontaine F, Froschio S, Burcham P, Falconer I (2005) Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health Part A* 68:739–753
- Karadžić V, Subakov-Simić G, Natić D, Ržaničanin A, Čirić M, Gačić Z (2013) Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia* 711:43–60
- Kinnear S (2010) Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Mar Drugs* 8:542–564
- Komárek J (2013) Cyanoprokaryota. 3. Teil Heterocytous Genera. In: Büdel B, Gärtner G, Krienitz L Schagerl M (eds) *Freshwater Flora of Central Europe*. Springer Spektrum. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, pp 1–1130
- Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo SMFQ, Oshima Y (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37:1359–1373
- Lankoff A, Wojcik A, Fesard V, Meriluoto J (2006) Nodularin-induced genotoxicity following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells. *Toxicol Lett* 164:239–248
- Laughinghouse HD 4th, Prá D, Silva-Stenico ME, Rieger A, Frescura VD, Fiore MF, Tedesco SB (2012) Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Sci Total Environ* 432:180–188
- Li RH, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, Noparatnaraporn N, Yongmanitchai W, Kaya K, Watanabe MM (2001) Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Toxicon* 39:973–980
- Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RI (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lukas G, Brindle SD, Greengard P (1971) The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 178:562–564
- Metcalf JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker ML, Torokne AK, Codd GA (2002) Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40:1115–1120
- Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J, Barrow KD, Neilan BA (2008) Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 74:716–722
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175
- Møller P (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of dna damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:336–345
- Natić D, Jovanović D, Knežević T, Karadžić V, Bulat Z, Matović V (2012) Microcystin-LR in surface water of Ponjavica River. *Vojnosanit Pregl* 69:753–758
- Navarro VJ, Senior JR (2006) Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 354:731–739
- Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Seawright AA, Moore MR (1999) Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 14:163–165
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC (1992) Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114:7942–7944
- Palíková M, Rábová M, Krejčí R, Navrátil S, Bláha L (2007) Chromosomal aberrations in early embryos of weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.) exposed to crude cyanobacterial extract and semipurified compound of microcystins—a pilot study. *Acta Vet Brno* 76:55–60
- Puerto M, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, Camean A (2014) Acute exposure to pure cylindrospermopsin results in oxidative stress and pathological alterations in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol* 29:371–385
- Saker ML, Nogueira ICG, Vasconcelos VM (2003a) Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in Portuguese freshwaters. *Limnetica* 22:129–136
- Saker ML, Nogueira IR, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, Pereira P (2003b) First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:243–250
- Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, Smith MJ (1999) The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynka). *Environ Toxicol* 14:135–142
- Sharma S, Nagpure NS, Kumar R, Pandey S, Srivastava SK, Singh PJ, Mathur PK (2007) Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:617–623
- Shaw G, Seawright AA, Moore MR, Lam PKS (2000) Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Ther Drug Monit* 22:89–92
- Shen X, Lam PK, Shaw GR, Wickramasinghe W (2002) Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40:1499–1501
- Simeunović J, Svirčev Z, Karaman M, Knežević P, Melar M (2010) Cyanobacterial blooms and first observation of microcystin occurrences in freshwater ecosystems in Vojvodina region (Serbia). *Fresenius Environ Bull* 19:198–207
- Simić SB, Komárek J, Đorđević NB (2014) The confirmation of the genus *Glaucospira* (Cyanobacteria) and the occurrence of *Glaucospira laxissima* (G. S. West) comb. nova in Serbia. *Cryptogamie Algol* 35(3):259–267
- Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191
- Stehbens WE (2003) Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol* 75:265–276

- Stirling DJ, Quilliam MA (2001) First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* 39:1219–1222
- Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Vidović M, Simeunović J, Miladinov-Mikov M, Baltić V (2013) Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 31:181–200
- Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, Ito E, Watanabe M (1994) Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32(7):833–843
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221
- Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton – Methodik. *Mitt Int Ver Limnol* 9:1–38
- Welker M, Bickel H, Fastner J (2002) HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin—opportunities and limits. *Water Res* 36:4659–4663
- Wood SA, Stirling DJ (2003) First identification of the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zeal J Mar Freshwater Res* 37:821–828
- Wu Q, Li M, Gao X, Giesy JP, Cui Y, Yang L, Kong Z (2011) Genotoxicity of crude extracts of cyanobacteria from Taihu Lake on carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 20:1010–1017
- Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V (2011) Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicon* 58:471–479



The relationship between the dominance of Cyanobacteria species and environmental variables in different seasons and after extreme precipitation

Snežana B. Simić^{1, *}, Nevena B. Đorđević^{1, **} and Djuradj Milošević²

With 7 figures and 1 table

Abstract: The impact of climate change in Serbia, as found throughout the world, is reflected in the rapid changes in drought and heavy rain periods. We show the influence of high rainfall levels on the water quality, composition and seasonal succession of Cyanobacteria in the Šumarice reservoir, Serbia (44° 01' 49" N, 20° 52' 28" E). The changes in physical and chemical parameters of water, Chl-*a*, Cyanobacteria biomass, abundance of phytoplankton and Cyanobacteria along a temporal gradient are visualized using a self-organizing map (SOM). Data was collected monthly during 2013 and 2014. During 2013, the reservoir was characterized as mesotrophic and eutrophic, with a low level of nutrients (the maximum value of total phosphorus was 0.068 mg L⁻¹ and total nitrogen was 0.764 mg L⁻¹ in August), while the maximum values of Cyanobacteria biomass (12.7 mg L⁻¹) and abundance (1.36 × 10⁶ ind L⁻¹) were in September, when Cyanobacteria represented 21 % of the whole phytoplankton. In the following year (2014), after the extreme precipitation (227 L m⁻² in May and 138 L m⁻² in July), the concentration of nutrients in the reservoir increased. In September, the maximum value of total phosphorus was 0.310 mg L⁻¹, and the maximum value of total nitrogen was 6.828 mg L⁻¹. In October, the maximum values of Cyanobacteria biomass (1567.28 mg L⁻¹) and abundance (2.36 × 10⁸ ind L⁻¹) were recorded when the bloom of *Aphanizomenon flos-aquae* was observed, representing 98 % of the whole phytoplankton. This blooming is strongly positively correlated with the increase of total phosphorus and nitrogen. The extreme and long-term precipitation was significant enough to change the state of the reservoir from eutrophic to hypereutrophic.

Keywords: Cyanobacteria; extreme precipitation; reservoir; total P; total N

Introduction

Based on the worldwide monitoring of climate parameters, primarily noticeable are temperature changes, as well as changes in the amount and distribution of rainfall and the increasing frequency of extreme meteorological conditions (Bates et al. 2008). Extreme hydrological conditions, such as high-rainfall levels and

drought can have a major impact on all types of freshwater ecosystems, such as changing the water level, the mixing of the water, the concentration of biogenic materials, the degree of transparency, as well as the concentration of suspended solids. The impact of extremely dry periods, as well as periods accompanied by heavy rainfall and flooding, on the phytoplankton and Cyanobacteria communities has been monitored

Authors' addresses:

¹ University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

* Corresponding author: snezasi@kg.ac.rs

** nevenapantovic@kg.ac.rs

² University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Biology and Ecology, Višegradska 33, 18000 Niš, Serbia

by a large number of researchers who have highlighted the importance of monitoring (Coelho et al. 2001; Huisman et al. 2005; Scheffer & van Nes 2007; Mihaljević et al. 2013; Paerl & Otten 2013).

The flooding and high levels of rainfall may affect the phytoplankton community differently. Mihaljević & Stević (2011) and Stević (2011) indicated that extreme and long-term floods were strong enough to change the state of the shallow floodplain lake (the Lake Sakadaš in the middle section of the Danube River) from “turbid water” to a state of “clear water”. Early spring floods can stimulate the development of phytoplankton, whereas floods in late spring and summer cause disturbances in the seasonal development of phytoplankton, leading to the reduction in the total biomass of phytoplankton (Stević 2011). Floods can also lead to episodic algal pollution, which produce toxic or harmful effects (HABs – Harmful Algal Blooms) due to their exponential growth (Huisman et al. 2005, Paerl & Otten 2013). Some blooming occurs rapidly with the dominance of one or more species (Chorus & Bartram 1999). The summary of the directives given by the World Health Organization (WHO) for the management of water used for recreation indicates a health threat if the Cyanobacterial bloom formation is recorded, and a secondary health threat if more than 100,000 cyanobacterial cells mL⁻¹ or a 50 µg L⁻¹ chlorophyll-*a* concentration dominated by Cyanobacteria are recorded (Chorus & Bartram 1999).

While the presence and the bloom of Cyanobacteria in Serbian water bodies have been studied for many years (Karadžić et al. 2013, Svirčev et al. 2014, Đorđević et al. 2015), research concerning the impact of extreme meteorological conditions (large precipitation) on the Cyanobacteria community has been lacking. Around 70 species of Cyanobacteria have been detected in Serbian water ecosystems, with *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Oscillatoria* and *Cylindrospermopsis* the most frequent genera found blooming in eutrophic reservoirs in Serbia (Karadžić et al. 2013, Svirčev et al. 2014, Đorđević et al. 2015). Our aim here is to show the impact of extreme hydrological conditions caused by heavy precipitation on both the change in the Cyanobacteria community, and the physico-chemical parameters of the mesotrophic reservoir.

Material and methods

Study area

The Šumarice reservoir is located in Central Serbia on the outskirts of the city of Kragujevac (44° 01' 49" N, 20° 52' 28" E)

(Fig. 1) at an altitude of 185 m. The reservoir was created by damming of the Sušica creek in 1967. The length of the reservoir is 1300 m, with an average width of 175 m. The reservoir volume is 0.95 × 10⁶ m³, and the area is 20 ha. The largest recorded depth of the reservoir is 20 m, with an average depth of 8–9 m. During the summer, the water temperature rises to 26–29 °C, and freezes during the winter (Ranković et al. 2006).

For the most part, the reservoir obtains its water from the casting and the precipitation of the Sušica stream. In the basin of the Sušica stream, there are forests, meadows, agricultural lands, as well as settlements with a partially landscaped sewer network. One side of the reservoir is well arranged, consisting of anthropogenic developed land for sporting purposes. There is a settlement above one side of the reservoir, while on the other side are mature elements of meadow vegetation extending almost to the water, and associated forest remnants *Quercetum confertae-ceris* Rudski 1949 (Ranković et al. 2006). The Šumarice reservoir is a part of the October in Kragujevac memorial park. During the summer, it is used as a recreational location for sports such as fishing and swimming.

Meteorological data

The meteorological data consisting of monthly averages of precipitation in the city of Kragujevac during 2013 and 2014 are sourced from the Republic Hydrometeorological Service of Serbia (<http://www.hidmet.gov.rs>).

Sampling

The samples for physical, chemical and phytoplankton analyses of water were collected monthly from three sites (M – the Mouth of the stream, C – the Center, D – the Dam) during 2013 and 2014 (Fig. 1). The samples were collected from different depths (0.5–1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 m – depending on the maximum depth of the reservoir in the sampling period) and the total number of samples collected during these two years is 324. The mean values of all parameters are used here to present the situation in the reservoir clearly, and to compare the data from 2013 with those from 2014.

Physical and chemical parameters are analyzed according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA 2005). The samples for the physical and chemical parameters, such as water temperature (°C), pH, dissolved oxygen (DO, mg L⁻¹), dissolved oxygen saturation (DO, %), conductivity (µs cm⁻¹), hardness (mg L⁻¹) and water transparency (Secchi disc, m) were measured *in situ*, whereas phosphate (PO₄-P, mg L⁻¹), nitrate (NO₃-N, mg L⁻¹), ammonia (NH₄-N, mg L⁻¹), total phosphorus (Total P, mg L⁻¹), total nitrogen (Total N, mg L⁻¹) and chlorophyll-*a* concentrations (Chl-*a*, mg m⁻³) were measured at the Hydrobiological laboratory at the Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, Kragujevac. The chlorophyll-*a* concentration is determined by using a spectrophotometric method according to ISO 10260:1992 (E).

The samples for the phytoplankton qualitative analysis were collected by sweeping a plankton net (netframe 25 cm ø, mesh net e.g. 22 µm). All samples were immediately preserved in a 4% solution of formaldehyde. Taxonomic identifications of Cyanobacteria are made according to Komárek & Anagnostidis (1998), Hindák (2001), Komárek & Anagnostidis (2005) and Komárek (2013). The phytoplankton samples for the quantitative analysis were collected by using a Ruttner's bottle (2 L). The quantitative analysis of phytoplankton (abun-

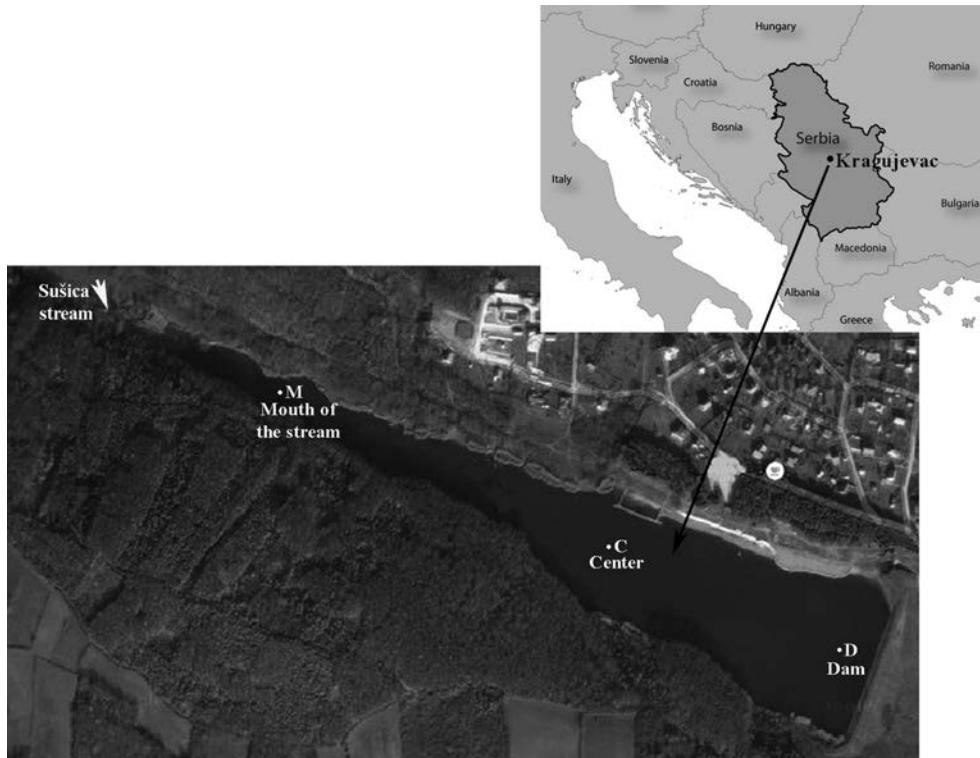


Fig. 1. Map of the study area. Location of the Šumarice reservoir, Central Serbia. The three sampling sites on the Šumarice reservoir.

dance – number of individuals per L) was conducted using the Utermöhl method (1958) with a Carl Zeiss inverted microscope. The phytoplankton individuals were first sedimented and then quantified in the chamber (i.e., transects) with an inverted microscope at different magnifications depending on their size (100×, 400×). The Cyanobacterial biomass (mg L^{-1}) was calculated based on geometric approximations using the standard formula (Hillebrand et al. 1999; Sun & Liu 2003). The average cell dimensions were obtained by measuring at least 25 representatives of each taxon present.

Data analysis

To visualize temporal changes in physical and chemical parameters of water (active variable), the abundance of Cyanobacteria and phytoplankton, Cyanobacteria biomass and Chl-*a* concentration (passive variable) across three sampling sites, the Kohonen unsupervised artificial neural networks (i.e., self-organizing map – SOM, Kohonen 1982) are used. The SOM method is widely used in ecology for data ordination (Chon et al. 1996; Chon et al. 2000; Chon 2011; Park et al. 2003; Park et al. 2004; Lencioni et al. 2007; Tang et al. 2010; Milošević et al. 2013; Milošević et al. 2014) as it is a powerful tool for the clustering and visualization of large data sets (Park et al. 2005), and is thus the most appropriate tool for our study. This method is also applied for modelling variability of community structure along a water quality gradient. The output of the self-organizing map is a two-dimensional grid, i.e. a trained SOM map composed of output neurons. Each neuron carries a specific model of the data (sampling sites with a similar model of water quality). The increase in a mutual distance between neurons in an output grid

is in accordance with the differences in the models carried by the neurons (Milošević et al. 2013).

The SOM method ordines and classifies the sampling sites during the training process, modeling nonlinear relationships between parameters. The input data matrix is composed of 72 sampling sites (rows) and 12 measured parameters (columns). The size of the network 7×6 (map resolution) was determined using the two most recommended methods (Vesanto et al. 2000; Park et al. 2003) and trying to avoid a large number of empty output neurons (Penczak et al. 2012). For the first method, Vesanto et al. (2000) calculated the optimal number of neurons in the SOM as $5\sqrt{n}$, where n is the number of training samples. In addition, the map resolution could also be determined by considering the local minimum values of quantization error (QE) and topographic error (TE) (Park et al. 2003). During the training process, all vectors (sampling sites) are introduced in the SOM. To obtain the subsets of neurons with similar models, the k-means method (Jain & Dubes 1988) is implemented. The number of neuron groups is determined following the distributional pattern of selected biotic factors. In addition, the non-parametric ANOVA test (the Kruskal-Wallis test) is used to test whether active variables varied between groups of neurons. The Mann-Whitney post hoc test is used for pair-wise comparisons.

To visually present the abundance of Cyanobacteria on the temporal gradient of water quality, the component-planes technique is applied. After the SOM is trained, the biotic information is passively introduced in the SOM, so as to not influence the previous ordination based on the abiotic data (physical and chemical parameters of water). During this process, the mean values of biotic parameters are calculated in each neuron of the

SOM map occupied by at least one sample (Park et al. 2003). The component plane represents a distributional pattern of biotic parameters on the trained SOM, enabling visual correlation between abiotic and biotic parameters. If a passive parameter shows a clear gradient on the map, it means that this biotic parameter is significantly influenced by the variation in physical and chemical parameters. The visual presentation of each active variable using the component plane provides additional information about the relationship between the biomass and abundance of Cyanobacteria, and each physico-chemical parameter of water.

The trophic state of the reservoir is determined by Carlson's Trophic State Index — TSI (Carlson 1977), with three equations used for the index calculation: Secchi disk TSI (SD), chlorophyll-*a* TSI (CHL) and total phosphorus TSI (TP).

Results

During 2013, the mean annual rainfall amounted to 715.6 L m^{-2} ; the highest values of rainfall were measured in March -101.9 L m^{-2} , and the lowest values were in December -6.4 L m^{-2} . During 2014, the mean annual rainfall amounted to 978.9 L m^{-2} , which is the heaviest rainfall measured by the Republic Hydrometeorological Service of Serbia since 1951; the highest rainfall was measured in May -227 L m^{-2} , and the lowest in February -14.4 L m^{-2} (Fig. 2). The abundant and prolonged rainfall from May to July 2014 (Fig. 2) led to flooding and erosion, which contributed to the leaching of agricultural land, the rise in the level of septic tanks, the spillage of cesspools and damage to sewage collectors within the catchment area of the Šumarice reservoir, especially in the vicinity of the Sušica stream, which supplies water to the lake.

Based on the temporal variation of water quality, the SOM analysis ordinates and classifies the sampled sites into three groups (Fig. 3). The maximum and minimum values of all physical and chemical param-

eters are shown in Fig. 4. The non-parametric ANOVA test reveals which active variables vary significantly between the obtained groups of neurons (Table 1).

Group A is composed of sites sampled during the winter seasons of 2013 and 2014 (Fig. 3). These samples are characterized by low values of temperature, conductivity, pH and nutrient concentrations ($\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$, Total N and Total P) (Fig. 4). The high concentrations of oxygen content (DO mg L^{-1} and $\text{DO}\%$) and transparency were recorded in the same group (Fig. 4). More precisely, the minimum recorded value of water temperature was 5.6°C in January during 2013 and 2014, as shown on the component plane where the upper neurons of the SOM are brighter (Figs 3, 4). Group A also has a minimal value for the conductivity ($302 \mu\text{s cm}^{-1}$) (upper left side of the SOM map) with the maximum water transparency detected in February (group A, upper left side of the SOM map). The low values of nutrient concentration ($\text{PO}_4\text{-P } 0.012 \text{ mg L}^{-1}$ and $\text{NH}_4\text{-N } 0.010 \text{ mg L}^{-1}$) were detected during February 2013, as clearly shown in the SOM map (Figs 3, 4).

In group B, the sites sampled during the remaining three seasons of 2013 are clustered together (spring, summer and autumn months) (Fig. 3). The component planes of active parameters reveal that during 2013, the measured temperature, conductivity, transparency, pH and DO varied, with high hardness and low nutrient concentrations (Fig. 4). A high temperature was recorded in August 2013 as shown on the component plane, where the lower neurons of the SOM are colored dark gray (B group) (Figs 3, 4).

Finally, group C contains samples from 2014 (dominant summer and autumn months) (Fig. 3). This period of the year was characterized by high water temperature and nutrient concentrations while the transpar-

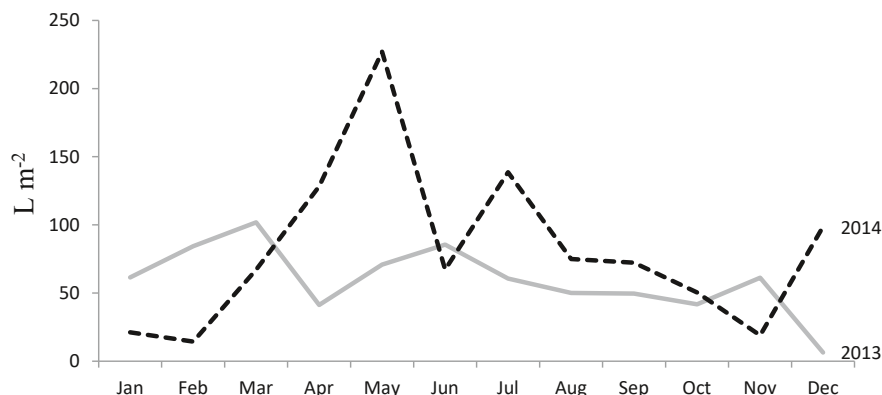


Fig. 2. The average amount of precipitation on the territory of Kragujevac during 2013–2014 (data taken from Hydrometeorological Service of the Republic of Serbia).

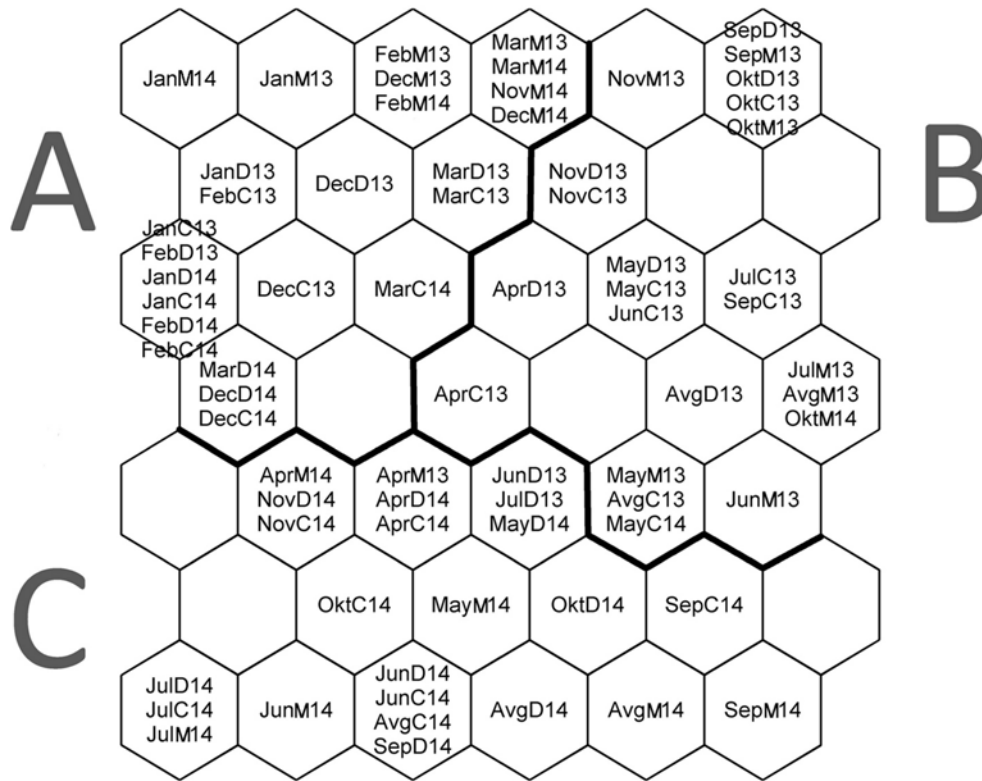


Fig. 3. The SOM map presenting water quality of the sampling sites. Neurons are clustered using the k-means method. Distinct groups are marked by capital letters (A, B and C). The labels indicate different sites (M – the Mouth of the stream, C – the Center, D – the Dam) sampled monthly during 2013 and 2014.

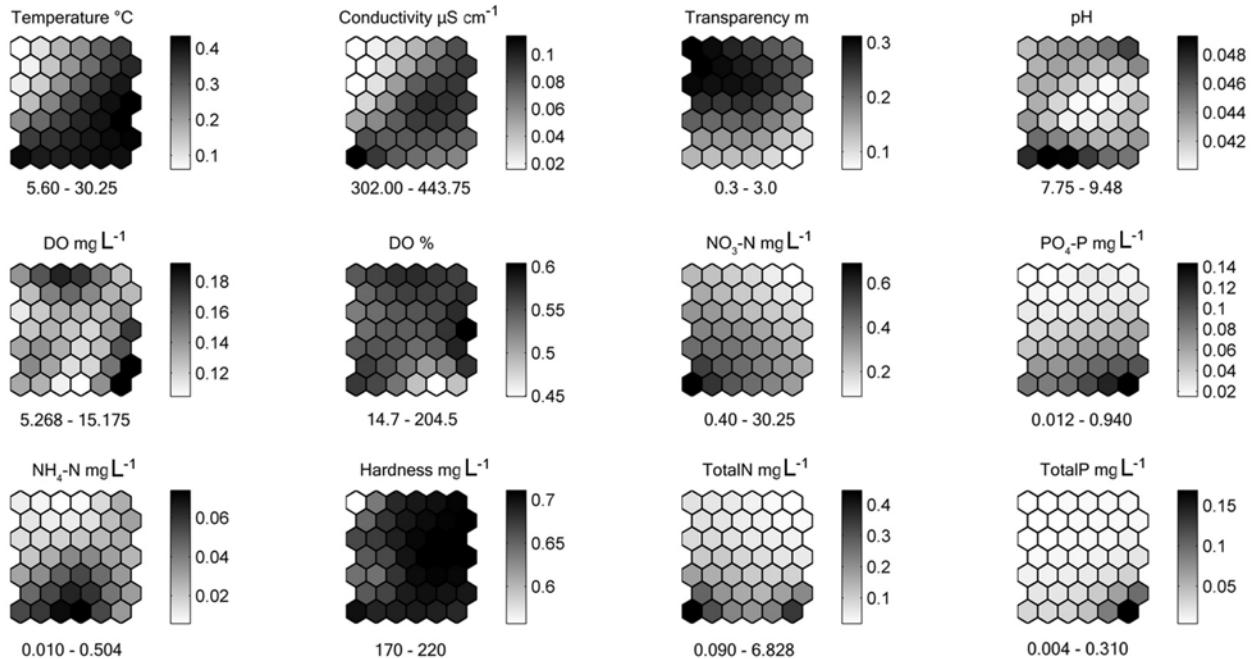


Fig. 4. Component planes visualizing the distributional pattern of 12 water quality parameters (DO (mg L^{-1}) – dissolved oxygen, DO (%) – dissolved oxygen saturation, $\text{NO}_3\text{-N}$ – nitrate, $\text{PO}_4\text{-P}$ – orthophosphate, $\text{NH}_4\text{-N}$ – ammonium) together with the presentation of variability ranges. The shade of black for each parameter is highly correlated with its maximum value.

Table 1. Mean values \pm standard deviation for environmental parameters per SOM group. Values within the same row not sharing a common superscript letter are significantly different: $^{a,b} p < 0.05$. If superscript letters are missing, all the values are significantly different.

Env. parameter	Group		
	A	B	C
Water temperature ($^{\circ}\text{C}$)	8.14 ± 1.88	18.99 ± 5.26^a	18.25 ± 4.21^a
Conductivity ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	318.67 ± 13.16	380.07 ± 30.77^a	366.29 ± 33.12^a
Transparency (m)	1.86 ± 0.56	1.38 ± 0.66	0.99 ± 0.49
pH	8.68 ± 0.59^a	8.69 ± 0.19^a	8.72 ± 0.32^a
DO (mg L^{-1})	8.12 ± 1.34^a	8.07 ± 2.19^a	7.98 ± 1.97^a
DO%	86.36 ± 12.89^a	95.43 ± 29.77^a	84.59 ± 26.28^a
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg L^{-1})	2.00337 ± 0.85035	1.37821 ± 0.65241	6.65702 ± 8.02749
$\text{PO}_4\text{-P}$ (mg L^{-1})	0.07119 ± 0.73666^a	0.10823 ± 0.11314^a	0.26448 ± 0.22839
$\text{NH}_4\text{-P}$ (mg L^{-1})	0.03272 ± 0.023332	0.07228 ± 0.05988	0.16915 ± 0.14421
Hardness (mg L^{-1})	171.23 ± 33.78^a	193.87 ± 12.61^b	181.61 ± 38.07^{ab}
Total N (mg L^{-1})	0.29047 ± 0.12709	0.20226 ± 0.09228	2.39762 ± 5.44424
Total P (mg L^{-1})	0.01936 ± 0.05773^a	0.02850 ± 0.03261^a	0.21189 ± 0.72708

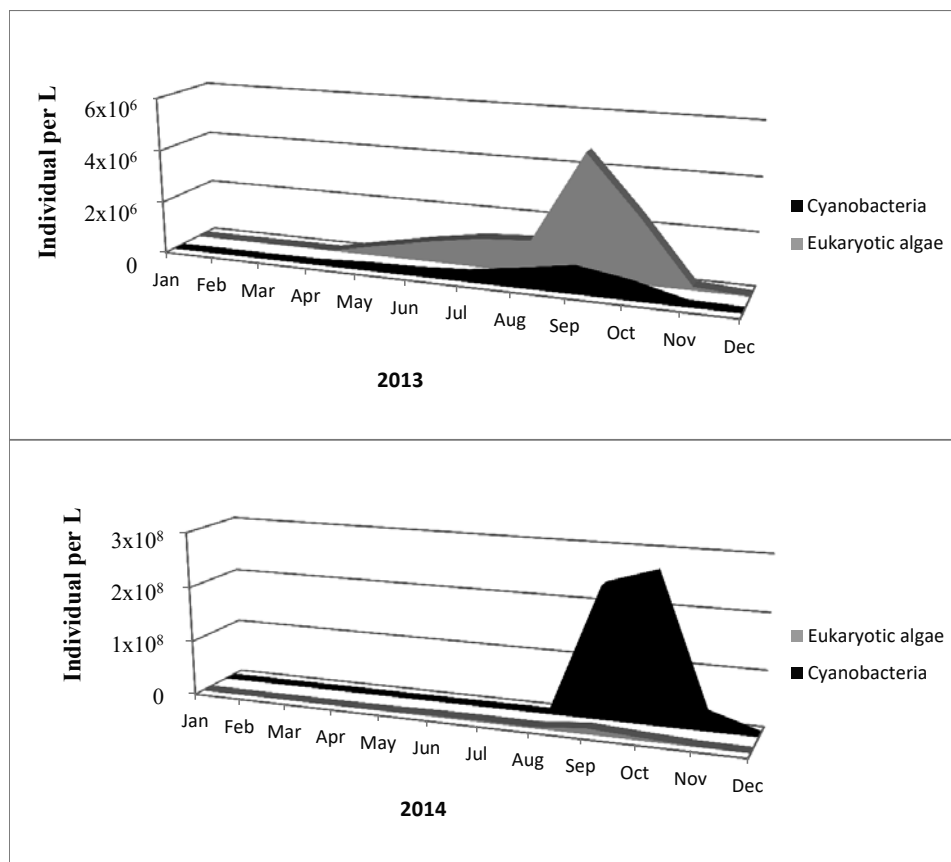


Fig. 5. The abundance of Cyanobacteria and eukaryotic algae in the Šumarice reservoir during the study period.

ency was low (Fig. 4). The remaining factors measured in this group are variable. The highest value of conductivity was recorded in group C ($443.75 \mu\text{s cm}^{-1}$; lower part of the component plane). The water transparency was low during the summer of 2014 (lower

part of the SOM map) with the lowest value measured in June (group C). The maximum pH value of 9.48 was also measured in June 2014 (group C, lower left side of the SOM map). The highest values of the total nitrogen (6.828 mg L^{-1}) and the total phosphorus (0.310 mg

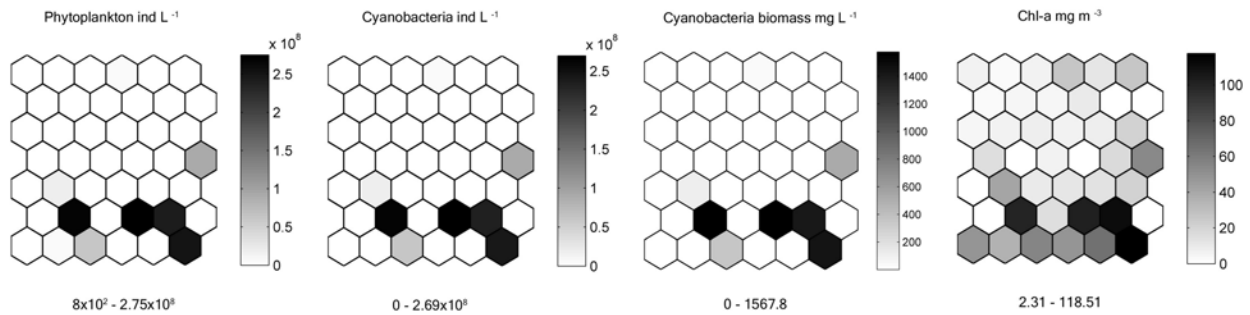


Fig. 6. Component planes visualizing the distributional pattern of four parameters (abundance of phytoplankton and Cyanobacteria, Cyanobacterial biomass and chlorophyll-*a*) in the previously trained SOM. The shade of black for each parameter is highly correlated with its maximum value.

L^{-1}) were detected during September 2014 as clearly shown on the SOM map (Figs 3, 4).

In 2013, Cyanobacteria were represented by 11 taxa in the Šumarice reservoir. Cyanobacteria were not detected in January, February and March 2013 while the abundance of Cyanobacteria in April was lower compared with other months, amounting to 9×10^3 ind L^{-1} (Fig. 5). *Chrysochloris bergii* (Ostenfeld) E. Zapomelová, O. Skácelová, P. Pumann, R. Kopp & E. Janecek and *Oscillatoria* sp. appeared beginning in April 2013. The largest richness of Cyanobacteria was recorded during the summer and late summer months 2013: *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet and Flahault, *Chroococcus limneticus* Lemmermann, *C. minutus* (Kützing) Nägeli, *Chrysochloris minor* (Kiselev) Komárek, *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usachev) P. Rajaniemi, Komárek, R. Willame, P. Hrouzek, K. Kastovská, L. Hoffmann & K. Sivonen, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, *Snowella lacustris* (Chodat) Komárek & Hindák. The Cyanobacteria biomass increased from April ($0.23 \text{ mg } L^{-1}$). During 2013, the highest value of abundance (1.36×10^6 ind L^{-1}) (Fig. 5) and biomass of Cyanobacteria ($12.7 \text{ mg } L^{-1}$) was recorded in September. The phytoplankton abundance in 2013 ranged from 8×10^2 ind L^{-1} (January) to 6.42×10^6 ind L^{-1} (September). The maximum representation of Cyanobacteria in the whole phytoplankton (21%) was in September. The relation between the abundance of Cyanobacteria and eukaryotic algae from the phytoplankton of the Šumarice reservoir during 2013 is displayed in Fig. 5.

In 2014, the Cyanobacteria were represented by 10 taxa in the Šumarice reservoir. During January and February 2014, no Cyanobacteria were detected. The abundance of Cyanobacteria in March 2014 was 8×10^2 ind L^{-1} , while the Cyanobacterial biomass in the same period was $0.015 \text{ mg } L^{-1}$. In the spring and summer months, the presence of *Chroococcus lim-*

neticus, *Chrysochloris minor*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Microcystis aeruginosa*, *Merismopedia* sp., *Pseudanabaena* sp., *Snowella lacustris*, *Oscillatoria tenuis* C. Agardh ex Gomont were recorded. After the intense precipitation in spring/summer, the suppression of all eukaryotic algae led to the domination of Cyanobacteria (Fig. 5). Only one species of Cyanobacteria (*Aphanizomenon flos-aquae*) was found from September 2014 (2.36×10^8 ind L^{-1}) until December 2014 (5.89×10^4 ind L^{-1}). The maximum abundance (2.69×10^8 ind L^{-1}) and biomass ($1567.28 \text{ mg } L^{-1}$) of this species occurred in October (Fig. 5, Fig. 6). During 2014, the abundance of phytoplankton ranged from 9×10^2 ind L^{-1} (January) to 2.75×10^8 ind L^{-1} (October). *Aphanizomenon flos-aquae* (blooming species) accounted for more than 98% of the total phytoplankton in October 2014. The relation between the abundance of Cyanobacteria and eukaryotic algae from phytoplankton of the Šumarice reservoir during 2014 is displayed in Fig. 5.

The component planes of passive variables reveal that the distributional patterns of abundance of total phytoplankton and Chl-*a* on the SOM are concordant with the distributional pattern of Cyanobacteria abundance and biomass (Fig. 6). The highest recorded values are distributed in the lowest part of the map (group C), while the intermediate abundance appears in one neuron of group B (Figs 3, 6), corresponding to July and August 2013 (Fig. 3). The minimum concentration values of Chl-*a* ($2.31 \text{ mg } m^{-3}$) were recorded in January 2013 and 2014 (upper left neuron on the SOM map). The maximum values of Chl-*a* were recorded in September 2014 ($118.51 \text{ mg } m^{-3}$) (lower right neuron on the SOM map) and the two neurons of group B correspond to August and September 2013 (Figs 3, 6).

Based on Carlson's reservoir classification regarding the trophic condition range (Carlson 1977), the trophic state of the Šumarice reservoir is represented

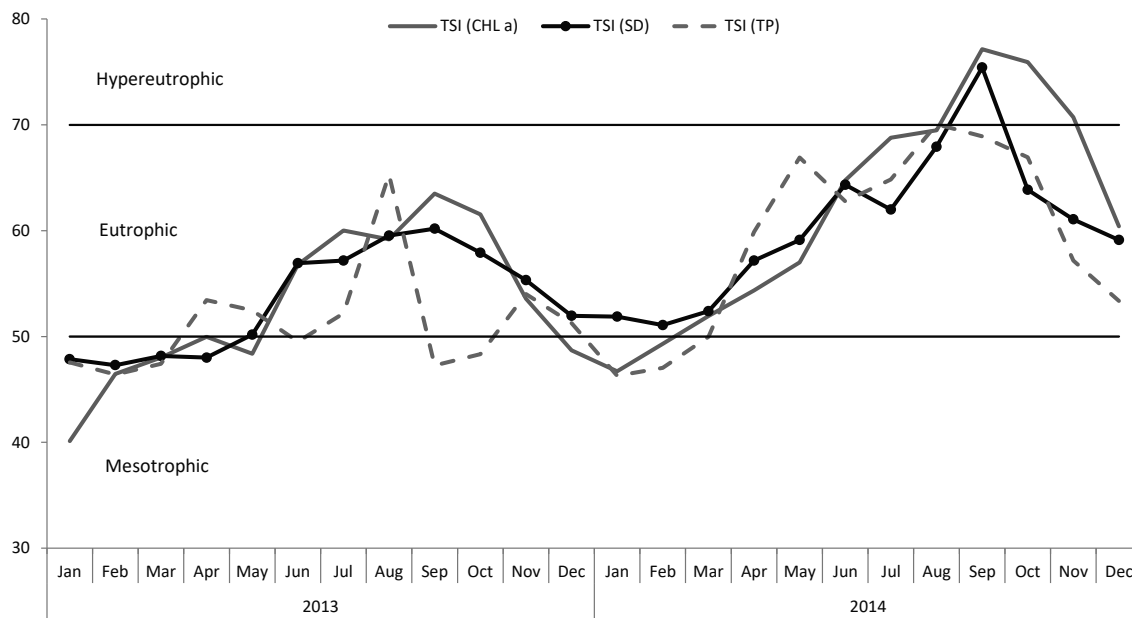


Fig. 7. Monthly values of the Trophic state index (TSI) calculated on the basis of water transparency (TSI SD), the concentration of total phosphorus (TSI TP) and chlorophyll-*a* (TSI Chl *a*).

in Fig. 7. The reservoir is classified as mesotrophic and eutrophic during 2013, and eutrophic and hypereutrophic in 2014.

Discussion

The recent resolutions of the IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) expert group highlight the climate change impacts on freshwater resources (IPCC 2014). Flooding and drought are becoming more pronounced in some areas, resulting in the move to more intense and catastrophic events. A change of climatic factors can modify the phytoplankton structure in a freshwater ecosystem. The presence of Cyanobacteria especially may be strongly influenced by physical factors such as local weather conditions (Karadžić et al. 2013). After the extreme precipitation in 2014, an increase in the nutrient concentration of the Šumarice reservoir was detected, leading to an episodic increase in nutrient concentration of the reservoir and, therefore, a change in the Cyanobacteria community. From August to November 2014, there was a complete change in the phytoplankton community composition dominated by Cyanobacteria. The suppression of all other species led to the domination of *Aphanizomenon flos-aquae*. This was the first occurrence of the blooming in the Šumarice reservoir. *Aphanizomenon flos-aquae* is the most regularly blooming species in eutrophic

waters, being one of the most common blooming species in Serbia, and very common in the ecosystems of the Kragujevac vicinity, especially the Gruža reservoir (Ranković & Simić 2005, Perendija et al. 2011). The WHO Guidelines for Drinking Water Quality note that anatoxin-*a*, saxitoxins and cylindrospermopsins may be produced by the *Aphanizomenon* genus (Chorus & Bartram 1999). The abundance of *A. flos-aquae* and the concentration of chlorophyll-*a* in the Šumarice reservoir during the blooming were not in accordance with the required values of these parameters for the correct management of recreational water (Chorus & Bartram 1999). According to the WHO (Chorus & Bartram 1999), the detected abundance and blooming indicates a major health threat, and for that reason, the use of the reservoir was prohibited by the Institute for Health Protection. Previous researches have shown that the water in the reservoir belongs to the II class of water (Ranković et al. 2006), corresponding to the quality of water used for sport and recreation (Official Gazette of RS no. 74/2011).

Mihaljević & Stević (2011) and Stević (2011) suggest that extreme precipitation may improve the conditions of the lake, noting furthermore that summer floods cause lead reduction in the total biomass of phytoplankton. Unlike with previous research, hypereutrophication, the blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* and low transparency occurred after extreme rainfall in the Šumarice reservoir. The massive

development and “blooming” of *A. flos-aquae* in the Šumarice reservoir started in 2014 after the period of extreme precipitation, when the temperature stratification of the reservoir was established together with appropriate physical and chemical conditions. The maximum recorded water temperature (27–30 °C) and maximum concentration of nutrients (total phosphorus over 0.310 mg L⁻¹; total nitrogen over 6.828 mg L⁻¹) were also established.

Phosphorus and nitrogen concentrations support the massive development of Cyanobacteria (Chorus & Bartram 1999; Laamanen & Kuosa 2005). Many authors suggest that the development of the *Aphanizomenon flos-aquae* population is strongly associated with water temperature and a low TN/TP ratio (Smith et al. 1995; Teubner et al. 1999; Laamanen & Kuosa 2005). The TN/TP ratio (7:1) in which the development of Cyanobacteria is limited by nitrogen concentration, and not by phosphorus, is the so-called Redfield ratio (Redfield 1958; Falkowski & Davis 2004). High concentrations of total phosphorus and low TN/TP favor the development of Cyanobacteria (Schindler 1977). The dominance of *A. flos-aquae* in lower TN/TP has been connected to the more successful competition of these Cyanobacteria for nitrogen compared with the other algae (Huisman & Hulot 2005), especially because of their ability to fixate atmospheric nitrogen. Teubner et al. (1999) also report that TN/TP less than 7:1 is critical and may favor the dominance of *Aphanizomenon* species. However, the critical TN/TP mass ratios at which Cyanobacteria tend to dominate in lakes are found to range from 5 to 10 (Schindler 1977; Seip 1994; Michard et al. 1996; Bulgakov & Levich 1999). Smith et al. (1995) show that the TN/TP mass ratio of 22:1 provides a boundary between lakes dominated by N₂-fixing Cyanobacteria, and those with only a few of these algae present.

In previous research, the linking relationship between cyanobacterial abundance and environmental variables was established by simultaneous sampling. However, Wojciechowski & Padiál (2015) state that this was not a suitable approach since algae react to the previous state of the ecosystem, and, therefore, emphasize the importance of monitoring the correlation of Cyanobacteria with environmental factors existing in the period prior to sampling. As Cyanobacteria abundance is promoted by environmental conditions previously present at the site, our study also confirms the high correlation of environmental variables before and during blooming.

The maximum values of Cyanobacteria biomass (12.7 mg L⁻¹) were recorded in September 2013 in the

Šumarice reservoir when the TN/TP ratio was 10.9 and the total phosphorus concentration was 0.008 mg L⁻¹. In the prior summer months (June–August), the mean temperature was 21.6 °C and the mean concentration of total phosphorus was 0.047 mg L⁻¹. There was no massive development of Cyanobacteria in 2013 during and after this condition. The blooming of Cyanobacterial species *Aphanizomenon flos-aquae* began in September 2014 when the TN/TP ratio was 7.9 and the total phosphorus concentration was 0.310 mg L⁻¹. The maximum values of Cyanobacteria biomass (1567.28 mg L⁻¹) in the Šumarice reservoir during 2014 were detected in October. In the summer months before the blooming (June–August), the mean temperature was 22.8 °C and the mean concentration of total phosphorus was 0.131 mg L⁻¹. The TN/TP ratio in both years was low enough (less than 22) to favor the bloom in accordance with Smith et al. (1995). Temperatures were similar during both 2013 and 2014. The levels of nutrients were completely different (the total phosphorus and nitrogen concentration increased after the heavy precipitation in May and July 2014). The TN/TP ratio was very high in July 2014 (75.8) during the period of extreme precipitation. The high TN/TP ratio in July can be explained by the rise in the level of septic tanks and sewage spills which deliver larger amounts of nitrogen into the reservoir, after which the blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* was observed.

Conclusion

Our case study shows that extreme precipitation can lead to an increase in nutrient concentrations in reservoirs, and cause a significant ecological disturbance to the community in water ecosystems (the blooming of potentially toxic Cyanobacteria), leading to potential economic losses from the unavailability of the ecosystem for its planned purpose (irrigation, sport and recreation, water supplies). The future assessment of environmental impacts on reservoirs and the raising of new dams should account for flooding as a means for anticipating predictive measures and remediation plans. Our research also justifies the proposed approach in the monitoring of Cyanobacteria blooming. Instead of the simultaneous monitoring of physical and chemical parameters with the occurrence of Cyanobacteria, we also propose the monitoring of the dominant correlations between Cyanobacteria blooming and the environmental variables prior to the blooming period. The dominance and blooming of Cyanobacteria in the Šumarice reservoir is more closely linked to the changes in the concentration of total phosphorus and nitrogen than to the changes in the TN/TP ratio.

Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Projects No. III 43002 and TP 31011) and by the European Communities 7th Framework Programme Funding under Grant agreement no. 603629-ENV-2013-6.2.1-Globaqua.

References

- American Public Health Association (APHA), 2005: Standard Methods (Standard methods for examination of water and wastewater. 21st edn.). – American Public Health Association; Washington DC, USA.
- Bates, B. C., Kundzewicz, Z. W., Wu, S. & Palutikof, J. P., 2008: Climate Change and Water. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC Secretariat. – IPCC Technical Paper, Geneva, pp. 1–202.
- Bulgakov, N. G. & Levich, A. P., 1999: The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. – Arch. Hydrobiol. **146**: 3–22.
- Carlson, R. E., 1977: A trophic state index for lakes. – Limnol. Oceanogr. **22**: 361–368.
- Chon, T. S., 2011: Self-organizing maps applied to ecological sciences. – Ecol. Inform. **6**: 50–61.
- Chon, T. S., Park, Y. S., Moon, K. H. & Cha, E. Y., 1996: Patternizing communities by using an artificial neural network. – Ecol. Model. **90**: 69–78.
- Chon, T. S., Park, Y. S., Park, J. H., 2000: Determining temporal pattern of community dynamics by using unsupervised learning algorithms. – Ecol. Model. **132**: 151–166.
- Chorus, I. & Bartram, J., 1999: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. – Routledge, WHO, Spon Press, New York, pp. 1–400.
- Coelho, H., Silva, A., Chambel Leitão, P. & Obermann, M., 2001: On the origin of cyanobacteria blooms in the Enxóe reservoir. – In: Proceedings of the 13th IWRA World 750 Water Congress.
- Đorđević, N., Simić, S. & Ćirić, A., 2015: First identification of the cylindrospermopsin (CYN) – producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya & Subba Raju in Serbia. – Fresen. Environ. Bull. **24** (11): 3736–3742.
- Falkowski, P. G. & Davis, C. S., 2004: Natural proportions. Redfield ratios, the uniformity of elemental ratios in the oceans and the life they contain underpins our understanding of marine biogeochemistry. – Nature **431**: 131.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, D. & Zohary, T., 1999: Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. – J. Phycol. **35**: 403–424.
- Hindák, F., 2001: Fotografický atlas mikroskopických siníc. – Veda, Bratislava, pp. 1–128.
- Huisman, J. & Hulot, F., 2005: Population dynamics of harmful cyanobacteria. Factors affecting species composition. – In: Huisman, J., Matthijs, H. C. P. & Visser, P. M. (eds): Harmful Cyanobacteria. Aquatic ecology series 3. – Springer-Verlag, Dordrecht, pp. 143–176.
- Huisman, J., Matthijs, H. C. P. & Visser, P. M., 2005: Harmful Cyanobacteria. Aquatic ecology series 3. – Springer-Verlag, Dordrecht, pp. 1–241.
- Hydrometeorological Service of Republic Serbia (2013–2014): <http://www.hidmet.gov.rs>
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2014: Climate Change, 2014: Synthesis Report. – In: Core Writing Team, Pachauri R. K. & Meyer L. A. (eds): Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. – IPCC, Switzerland, Geneva, pp. 1–151.
- Jain, A. K. & Dubes, R. C., 1988: Algorithms for clustering data. – Prentice-Hall New Jersey, pp. 1–320.
- Karadžić, V., Subakov-Simić, G., Natić, D., Ržaničanin, A., Ćirić, M. & Gačić, Z., 2013: Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). – Hydrobiologia **711**: 43–60.
- Kohonen, T., 1982: Self-organized formation of topologically correct feature maps. – Biol. Cybern. **41**: 59–69.
- Komárek, J., 2013: Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera. – In: Budel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. – Springer Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 1–1130.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K., 1998: Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. – In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. – Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 1–548.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K., 2005: Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. – In: Budel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. & Schagerl, M. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. – Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 1–759.
- Laamanen, M. & Kuosa, H., 2005: Annual variability of biomass and heterocysts of the N₂-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in the Baltic Sea with reference to *Anabaena* sp. and *Nodularia spumigena*. – Boreal. Environ. Res. **10** (1): 19–30.
- Lencioni, V., Maiolini, B., Marziali, L., Lek, S. & Rossaro, B., 2007: Macroinvertebrate assemblages in glacial stream systems: a comparison of linear multivariate methods with artificial neural networks. – Ecol. Model. **203**: 119–131.
- Michard, M., Aleya, L. & Verneaux, J., 1996: Mass occurrence of the Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* in the hypereutrophic Villerest Reservoir (Roanne, France): Usefulness of the biyearly examination of N/P (nitrogen phosphorus) and P/C (protein/carbohydrate) couplings. – Arch. Hydrobiol. **135**: 337–359.
- Mihaljević, M. & Stević, F., 2011: Cyanobacterial blooms in a temperate river-floodplain ecosystem: the importance of hydrological extremes. – Aquat. Ecol. **45**: 335–349.
- Mihaljević, M., Špoljarić, D., Stević, F. & Žuna Pfeiffer, T., 2013: Assessment of flood-induced changes of phytoplankton along a river-floodplain system using the morpho-functional approach. – Environ. Monit. Assess. **185**: 8601–8619.
- 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.
- Milošević, D., Stojković, M., Čerba, D., Petrović, A., Paunović, M. & Simić, V., 2014: Different aggregation approaches in the chironomid community and the threshold of acceptable information loss. – Hydrobiologia **727**: 35–50.
- Official Gazette of the Republic of Serbia, 2011: The parameters of ecological and chemical status of surface waters and parameters of the chemical and quantitative status of groundwaters. 74/2011.

- Paerl, H. W. & Otten, T. G., 2013: Harmful Cyanobacterial Blooms: causes, consequences and controls. – *Microb. Ecol.* **65** (4): 995–1010.
- Park, Y. S., Céréghino, R., Compin, A. & Lek, S., 2003: Applications of artificial neural networks for patterning and predicting aquatic insect species richness in running waters. – *Ecol. Model.* **160**: 265–280.
- Park, Y. S., Chon, T. S., Kwak, I. S. & Lek, S., 2004: Hierarchical community classification and assessment of aquatic ecosystems using artificial neural networks. – *Sci. Total. Environ.* **327**: 105–122.
- Park, Y. S., Gevrey, M., Lek, S. & Giraudel, J. L., 2005: Evaluation of relevant species in communities: Development of structuring indices for the classification of communities using a self-organizing map. – In: Lek, S., Scardi, M., Verdonchot, P., Descy, J. P. & Park, Y. S. (eds): *Modelling Community Structure in Freshwater Ecosystems*. – Springer, Berlin, pp. 369–380.
- Penczak, T., Glowacki, Ł., Kruk, A. & Galicka, W., 2012: Implementation of a self-organizing map for investigation of impoundment impact on fish assemblages in a large, lowland river: long-term study. – *Ecol. Model.* **227**: 64–71.
- Perendija, B., Despotović, S., Radovanović, T., Gavrić, J., Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Ognjanović, B., Simić, S., Pajović, S. & Saičić, Z., 2011: Biochemical and ultrastructural changes in the liver of European perch (*Perca fluviatilis* L.) in response to cyanobacterial bloom in the Gruža reservoir. – *Arch. Biol. Sci.* **63**: 979–989.
- Ranković, B. & Simić, S., 2005: Phytoplankton of Gruža reservoir. – In: Čomić, L. & Ostojić, A. (eds): *Gruža Reservoir-Monography*. – Faculty of Natural Sciences, Kragujevac, pp. 65–78.
- Ranković, B., Simić, S. & Bogdanović, D., 2006: Phytoplankton as indicator of water quality of lakes Bubanj and Šumarice during autumn. – *Kragujevac J. Sci.* **28**: 107–114.
- Redfield, A. S., 1958: The biological control of chemical factors in the environment. – *Am. Sci.* **46**: 205–211.
- Scheffer, M. & Van Nes, E. H., 2007: Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. – *Hydrobiologia* **584**: 455–466.
- Schindler, D. W., 1977: Evolution in phosphorous limitation in lakes. – In: Reynolds, C. S. (ed.): *The ecology of freshwater phytoplankton*. – Cambridge University Press, Cambridge, pp. 260–262.
- Seip, K. L., 1994: Phosphorus and nitrogen limitation of algal biomass across trophic gradients. – *Aquat. Sci.* **56**: 16–28.
- Smith, V. H., Bierman, V. J., Jones, B. L. & Havens, K. E., 1995: Historical trends in the Lake Okeechobee ecosystem. Nitrogen: phosphorus ratios, cyanobacterial dominance, and nitrogen fixation potential. – *Arch. Hydrobiol. Monogr. Beitr.* **107**: 71–88.
- Stević, F., 2011: The complexity of the impact of floods on the structure and dynamics of phytoplankton in the floodplain. – Dissertation, University of Osijek, Croatia, pp. 1–157.
- Sun, J. & Liu, D., 2003: Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. – *J. Plankton Res.* **25** (11): 1331–1346.
- Svirčev, Z., Tokodi, N., Drobac, D. & Codd, G., 2014: Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. – *Syst. Biodivers.* **12** (3): 261–270.
- Tang, H., Song, M. Y., Cho, W. S., Park, Y. S. & Chon, T. S., 2010: Species abundance distribution of benthic chironomids and other macroinvertebrates across different levels of pollution in streams. – *Ann. Limnol. Int. J. Limnol.* **46**: 53–66.
- Teubner, K., Feyerabend, R., Henning, M., Nicklisch, A., Woiwte, P. & Kohl, J. G., 1999: Alternative blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* or *Planktothrix agardhii* induced by the timing of the critical nitrogen-phosphorus-ratio in hypertrophic riverine lakes. – *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol.* **54**: 325–344.
- Utermöhl, H., 1958: Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. – *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* **9**: 1–38.
- Vesanto, J., Himberg, J., Alhoniemi, E. & Parhankangas, J., 2000: Som toolbox for matlab 5. Technical Report A57. – Neural Network Research Centre, Helsinki University of Technology, Helsinki, pp. 1–59.
- Wojciechowski, J. & Padiál, A. A., 2015: Monitoring studies should consider temporal variability to reveal relations between cyanobacterial abundance and environmental variables. – *An. Acad. Bras. Cienc.* **87** (3): 1717–1726.

Manuscript received: 12 September 2016

Revisions required: 05 November 2016

Revised version received: 28 January 2017

Manuscript accepted: 15 February 2017

FIRST IDENTIFICATION OF THE CYLINDROSPERMOPSIN (CYN)-PRODUCING CYANOBACTERIUM *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZYŃSKA) SEENAYYA & SUBBA RAJU IN SERBIA

Nevena B. Đorđević¹, Snežana B. Simić^{1,*} and Andrija R. Ćirić²

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, 34000 Kragujevac, Serbia

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, 34000 Kragujevac, Serbia

ABSTRACT

In this study, is reported the first occurrence of cylindrospermopsin (CYN) in Serbia. CYN is a newly emerging carcinogenic hepatotoxic alkaloid, originally identified in tropical cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju. The research was conducted on a monthly basis from June 2012 to February 2013 in Aleksandrovac Lake, Serbia (42°29'22" N, 21°53'54" E). *C. raciborskii* showed the value of abundance between 0.1×10^2 and 2.38×10^6 trichomes ml⁻¹. According to HPLC-PDA analysis CYN concentration ranged between 1.91 and 24.28 µg l⁻¹. Maximum concentration of CYN was in November 2012, and the fish kill occurred in the following month.

KEYWORDS: Cylindrospermopsin, *Cylindrospermopsis raciborskii*, HPLC, Serbia.

1. INTRODUCTION

The cyanotoxin cylindrospermopsin (CYN) is an alkaloid with hepatotoxic, cytotoxic, dermatotoxic, genotoxic and carcinogenic properties [1]. Because of that the presence of CYN in surface waters and reservoirs is observed as a potential risk for human health [2]. CYN was first isolated from *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju by Ohtani et al. [3]. CYN-producing species of the genera: *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia*, *Raphidiopsis* and *Lyngbya* have been detected worldwide [4, 5].

Kinner [6] showed a map provided with the global distribution of blooms of CYN-producing species, but the territory of Serbia was not marked on the map. Over the last

90 years, the presence and blooming of cyanobacteria has been described for different aquatic ecosystems of Serbia. The research so far has shown that the accumulation blooming most commonly occurs due to the excessive multiplication of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria* and *Planktothrix* [7]. Previous studies of cyanotoxins in Serbia are related to the presence and detection of microcystins [8-11]. In Serbia *C. raciborskii* was detected in a salt marshes and a fish ponds [12, 13] while the occurrence of massive development of this species was detected in an eutrophic lowland river [14] and an alkaline microaccumulation [15-17]. Since *C. raciborskii* produces CYN, it is a highly-ranked species on the Watch List of toxic cyanobacteria for water managers [4].

The massive presence of *C. raciborskii* in Aleksandrovac Lake [16, 17] and the use of the lake (fishing, swimming, sports and recreation activities) guided our choice of the research related to CYN.

The aim of the present study is to describe the first detection and quantification of CYN in Serbia using HPLC/PDA technique and it also demonstrates a potential hazard to the environment (fish kill) due to the presence of CYN.

2. MATERIALS AND METHODS

Aleksandrovac Lake is an oligosaline, shallow lake (maximum depth 4 m) in the southernmost part of Serbia (42°29'22" N, 21°53'54" E). It is an artificial reservoir formed in 1963-1964; the lake was emptied in 2009. The lake was completely restored and refilled in 2010. This reservoir was originally used for the irrigation of agricultural areas and later for sports and recreational purposes and, above all, for fishing [15-17]. Sampling from Aleksandrovac Lake was conducted monthly, from June 2012 to February 2013. Twenty seven samples of phytoplankton were gathered by standard methods - phytoplankton net (net frame 25 cm, mesh net e.g. 22 µm) and Ruttner bottle (2 l) in all

* Corresponding author

aspects. All samples were immediately preserved in 4 % formaldehyde. *C. raciborskii* was identified on morphological grounds on a Nikon Eclipse E100 microscope at 40-100x magnification. The identification was performed by using literature [18].

The quantitative analysis of phytoplankton was made by using Utermöhl method [19] with a Carl Zeiss inverted microscope (No. 724 395) and it is expressed as the number of trichomes per ml.

Simultaneously with gathering phytoplankton samples in the field and samples for CYN detection, the following physical and chemical parameters were measured: water temperature (°C), pH, oxygen concentration (mg l^{-1}), saturation (%), conductivity ($\mu\text{s cm}^{-1}$), phosphorus concentration (mg l^{-1}) and water transparency (Secchi disc) (m) [20]. Physical and chemical parameters, phytoplankton samples and samples for CYN detection were taken from three sites (dam, middle and end of the lake) and at greater depths (surface 0–0.3 m, 2 m and 3.5–4 depending on the depth of the lake at the moment of sampling), but because of both the size of the lake and insignificant deviations mean values are given for all parameters. Samples of water bloom biomass of *C. raciborskii* were collected from Aleksandrovac Lake when blooming observed. Sampling of the biomass was done 1st November, 2012.

For the analysis of CYN, water samples were collected in 1-litre bottles and transported to the laboratory in refrigerators. The samples were stored in the dark at -20°C, until analysis.

Chemicals of appropriate purity were used in the investigation (HPLC grade). The CYN standard was adopted from Enzo Life Sciences (Lausen, Switzerland). Trifluoroacetic acid (> 99.0 %) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Methanol (HPLC grade) was from J.T. Baker, Deventer, Holland), Millipore Milli-Q system (Watford, UK).

Water samples were prepared according to the protocol of Meriluoto and Codd [5], suggesting that solid phase extraction (SPE) is necessary to concentrate the toxin to concentrations capable of being detected by HPLC in order to determine the concentration of CYN in the extracellular fraction of filtered environmental waters. Water samples (1 l) were filtered through GF/C filter. A Supelco (Bellefonte, PA, USA) vacuum tank and Supelco LC-18 (500 mg, 6 ml Superclean) cartridges connected to a PGC cartridge (200 mg, 3 ml for Enviro Clean[®]) (UCT, Bristol, PA) were used for the SPE. The samples were applied to the cartridges onto the conditioned SPE system with 10 ml methanol containing 0.1 % (v/v) TFA followed by 10 ml of water. The cartridges were not allowed to dry during condition and sample application. After that, the PGC cartridge should be air-dried. Cylindrospermopsin eluted with 3 ml 0.1 % (v/v) TFA in methanol. Methanol solution of sample was evaporated under nitrogen and reconstructed in 500 μl of Milli-Q water.

Cyanotoxins extraction from *C. raciborskii* biomass for cyanotoxin analysis were performed according to the protocol

of World Health Organization [21]. Sample of 5 l water filtered through pre-weighed Glass fibre filters 70 mm, GF/C, 1.2 μm under the vacuum. Filter papers were dried using an oven, under the temperature below 50°C until constant weight. For cyanotoxin detection, dry samples on filter papers (0.699 g) extracted with ten times higher volume of methanol then was weight of cells. Cells in methanol were sonicated for 3 min in 100 Hz and then allow cells to extract for 1 h in dark on room temperature. The suspension was then filtered through Glass fibre filters and the solvent was removed under vacuum in a rotary evaporator, yielding 0.093 g of the dry crude extract. Extract suspended in Milli-Q water (Watford, UK) and dissolved by sonication for 5 min. Trifluoroacetic acid (TFA), 0.1% v/v (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) was added after the centrifugation. Samples were mixed for 1 h and decanted at room temperature for 3 h, according to Welker et al. [22].

The prepared samples were analysed according to the protocol of Welker et al. [22] and Bláhová et al. [23]. The samples were analysed by HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of a DGU-20A3 degasser, LC-20AT analytical pumps, 7125 injector and a diode array detector SPD-M20A and a CBM-20A system controller on a Supelcosil ABZ Plus, 150 x 4.6 mm, 5 μm column (Supelco) at 30°C. The binary gradient of the mobile phase consisted of (A) H₂O + 0.05 % TFA and (B) methanol + 0.05 % TFA (linear increase from 0 % B at 0 min to 50 % B at 20 min), the flow rate was 1 ml min^{-1} . The chromatograms at 262 nm were recorded with a SPD-M20A diode array detector. CYN was identified by characteristic UV absorption spectra (200 - 300 nm) and retention time and quantified using external calibrations 1 - 60 mg l^{-1} (LOD = 0.188, LOQ = 0.572 mg l^{-1}), a injection volume 20 μl . The chromatographic data were processed using LC Solution computer software (Shimadzu).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Physical and chemical data for Aleksandrovac Lake during the study period are summarized in Table 1. Maximum water temperature was 27.9°C in July and minimum was 3.1°C in December. High pH levels were recorded with the maximum value of 9.36 in September. Total phosphorus levels varied, the maximum value of 0.69 mg l^{-1} was measured in June, and there was a gradual decrease until September and after that it was uniformly measured at <0.02 mg l^{-1} . Dissolved oxygen values were between 7.7 and 11.6 mg l^{-1} . Water transparency ranged from 1.3 m to 0.2 m and it decreased transitioning from early summer to late autumn.

Cyanobacteria *C. raciborskii* (Figure 1) was present in the phytoplankton in Aleksandrovac Lake over the entire study period (Table 2). The abundance of *C. raciborskii* varied through months; in June and July it was very low if compared to the autumn months, while the highest abundance of *C. raciborskii* was recorded in the month of October (2.38 x 10⁶ trichomes ml^{-1}). In that period of blooming *C. raci-*

TABLE 1 - Mean values of physical and chemical parameters at Aleksandrovac Lake June 2012 - February 2013

Month	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Feb
Water temperature (°C)	26.8	27.9	26.3	23.26	17.16	12.26	3.1	5.1
pH	8.68	8.47	9.02	9.36	8.68	9.05	8.21	8.5
Oxygen (mg l ⁻¹)	9.68	11.60	10.25	8.07	9.04	9.05	7.7	8.1
Saturation (%)	129	157.6	135.4	98.53	100.76	89.9	60.2	65.3
Phosphorus (mg l ⁻¹)	0.69	0.56	0.42	0.46	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Conductivity (µs cm ⁻¹)	434	436	449	473	475	478	428	430
Water transparency (m)	1.3	0.8	0.35	0.3	0.25	0.20	ice	0.3

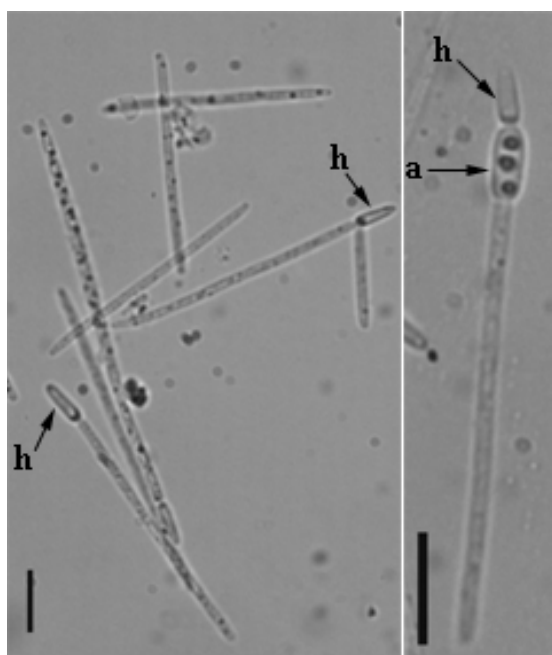


FIGURE 1 - Photomicrographs of *Cylandropermopsis raciborskii* from Aleksandrovac Lake. Scale bar represent 10 µm. Legends: h-heterocyst, a-akinete.

borskii looked like a brown-green mash. The abundance was significantly reduced over winter months (Table 2).

C. raciborskii is an invasive species that has been observed in many tropical, subtropical and, recently, temperate regions [24]. In Serbia *C. raciborskii* was detected in a salt marshes and a carp ponds [12-13] while the occurrence of massive development of this species was detected in an eutrophic river [14]. Simić et al. [15] provided first data on the occurrence of this species in the Aleksandrovac Lake, just three months after the restoration and filling the micro-accumulations with fresh water (September 2010). The abundance of *C. raciborskii* was low (37 trichomes ml⁻¹). Akinetes were observed on trichomes in the Aleksandrovac

Lake both individually and in series (number of 2-4) [15, 17]. It is known that under favourable conditions akinetes have the potential of germination [17, 25]. The conditions in this oligosaline, alkaline, shallow lake, where the water temperature in summer months increased up to 26.2°C, favoured the development of this species, so it reappeared in September 2011 in large populations (2.37 x 10² trichomes ml⁻¹) [17]. Unchanged and still suitable conditions (Table 1) remained favourable so that the species occurred in June of the next year, and its abundance significantly increased each month in 2012 (Table 2).

In this study the massive development of *C. raciborskii* was noticed during the period and after the period of high temperature (over 26°C) (Table 1 and 2). High temperature is one of the most important factor for massive development of *C. raciborskii* [26]. This species prefers environments with temperatures ranging from 20 to 35°C, but it also has a wider temperature tolerance range [27]. At lower temperature values there was a gradual reduction in the abundance of this species in Aleksandrovac Lake (Tables 1 and 2).

High pH values also favoured the development of *C. raciborskii*. It occurs in water ecosystems with high pH values – 8.0-8.7 [26].

Phosphorus also appears to play an important role in the dominance of *C. raciborskii*. According to Padišák [26], inorganic phosphorus content, as well as total phosphorus concentrations, can vary within a wide range in lakes where *C. raciborskii* occurs in abundant populations, as presented in this study. In the waters of Aleksandrovac Lake phosphorus was reduced gradually starting June. It was observed that with increasing abundance, the value of phosphorus started to decline from late spring through autumn. After reaching the maximum value abundance in October, there was a large reduction in phosphorus concentration. *C. raciborskii* has a high affinity and storage capacity for phosphorus if compared to other cyanobacteria [28].

TABLE 2 - Mean values of abundance of *C. raciborskii* and distribution of CYN at Aleksandrovac Lake (Serbia) June 2012 - February 2013

	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Feb
<i>C. raciborskii</i> (trichomes ml ⁻¹)	1.2 x 10 ³	1.7 x 10 ³	6.8 x 10 ⁴	8.7 x 10 ⁴	2.38 x 10 ⁶	2.13 x 10 ⁵	1.1 x 10 ³	0.1 x 10 ³
CYN (µg l ⁻¹)	Not detected	Not detected	1.91	9.75	10.70	24.28	5.25	4.22

These adaptations allow *C. raciborskii* to grow in low levels of phosphate [25] and may provide a competitive advantage to *C. raciborskii*.

After all, recent research has found that the one of the main drivers behind the dominance of the cyanobacterium *C. raciborskii* is also in low light requirements [29]. *C. raciborskii* blooms in Aleksandrovac Lake under low light levels (Table 1 and 2).

In this study, the cyanotoxin CYN was first detected and quantified in Serbia, using HPLC/PDA method (Table 2). CYN was identified by retention time and characteristic UV absorption spectra. The retention time of CYN standard was 5.392 min (Figure 2). The chromatogram of a sample from Aleksandrovac Lake showed that retention time was 5.371 min (Figure 3). The concentrations of CYN ranged between 1.91 - 24.28 $\mu\text{g l}^{-1}$. CYN was not detected only in June and July, while it was found in the water samples taken over the remaining months.

The value of abundance and CYN concentrations increased until November, when the abundance started to decrease. In November the representation of the species *C.*

raciborskii was 98% in relation to the entire phytoplankton of the Aleksandrovac Lake. Because of the absolute dominance of this species, it was possible to collect biomass of *C. raciborskii*. HPLC-determined CYN content was 6.65 $\mu\text{g CYN mg}^{-1}$ dw.

Maximum CYN concentration in the water was in November 24.28 $\mu\text{g l}^{-1}$, while the maximum value of abundance was in the previous month. This was expected because the concentration of cyanotoxins significantly increased as a defence mechanism in stressful conditions (lack of nutrients/light) [30], and especially because of the cell age and after the extinction of cyanobacteria and the release of cell content in the water.

Previous research [31, 32] showed that environmental concentrations of CYN in freshwater habitats can vary considerably. Cellular abundance of CYN-producing cyanobacteria can differ and does not necessarily correlate with CYN concentrations [33].

A high toxin concentration of 589 $\mu\text{g l}^{-1}$ was detected in an aquaculture pond with the abundance up to 3.25×10^5 trichomes ml^{-1} [34]. In Lake Albano (Italy) concentrations

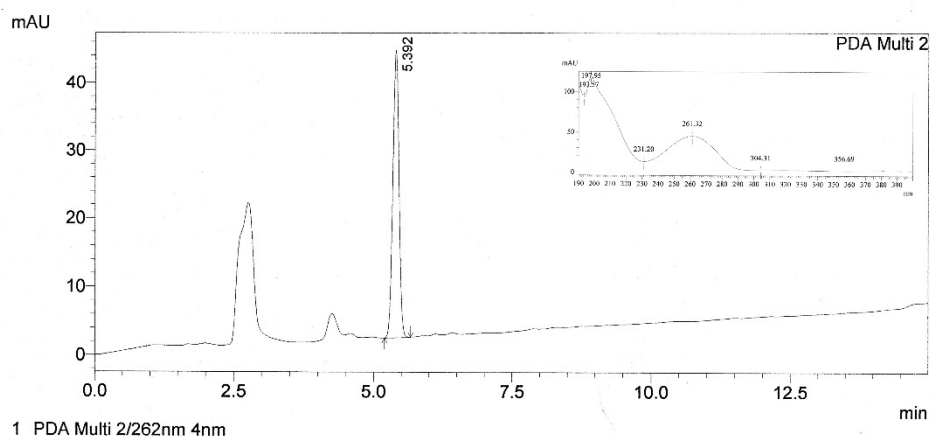


FIGURE 2 - Chromatogram of cylindrospermopsin standard (5 mg l^{-1}) (262 nm, retention time 5.392 min) and UV spectra

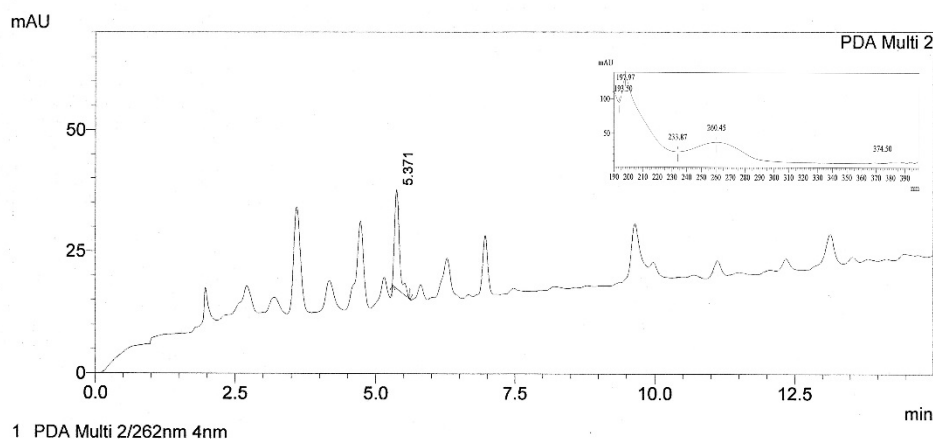


FIGURE 3 - Chromatogram of sample - Aleksandrovac Lake (262 nm, retention time 5.371 min) and UV spectra (retention time 5.371 min)

of CYN was in the range 1.6 - 15 $\mu\text{g l}^{-1}$ while toxic cyanobacteria had abundance between 0.1×10^6 - 30×10^6 trichomes ml^{-1} [35]. Low concentrations of toxin of 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ were reported with the blooms of 9×10^4 trichomes ml^{-1} [36]. McGregor and Fabbro [37] also discussed the correlation between abundance and CYN concentrations. Low densities with an abundance of 2×10^4 trichomes ml^{-1} were associated with 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ CYN. The relationship between cell number and toxin concentration varied in reservoirs and blooms. The majority of the reservoirs had *C. raciborskii* abundance of around 3×10^4 - 10×10^4 with recorded CYN concentrations below 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ [37].

This was exactly the case in this research, suggesting that the relationship (CYN concentrations - abundance) varied through months.

When cyanotoxins are released into the water, they can be absorbed by different aquatic organisms. CYN may adversely affect all food components (phytoplankton, zooplankton and fish) [38, 39]. Human consumption of contaminated fish could therefore lead to significant health hazards. Fish are CYN-exposed directly by feeding on phytoplankton or contaminated organisms and/or passively via their epithelium (gills and skin) when CYN is dissolved in the water [40].

In December 2012 fish kill occurred in Aleksandrovac Lake. The fish kill happened in one day, when 3 tones of cyprinid fish died. It happened after the period when the maximum CYN value was detected in the lake; in the same period the lake was completely frozen and oxygen concentration was reduced (Table 1). Potential causes of fish death could be CYN in combination with other environmental factors [40]. A similar situation indicated that the toxicity of *C. raciborskii* caused the fish kill in 1990 and 1993 in Rio Pequeno in Brazil [41]. Berry et al. [42] studied the developmental toxicity of CYN, as well as extracts from *C. raciborskii* on zebra fish (*Danio rerio*) embryos. They concluded that pure CYN was toxic only when it was injected directly into embryos. In contrast, direct immersion of embryos in all the extracts resulted in both increased mortality and reproducible developmental dysfunctions. The occurrence of toxic blooms or dense growths of cyanobacteria has been related to fish and other animals mortalities and human illness [1]. There are studies on different effects of CYN in fish (accumulation of CYN in fish, oxidative parameters and histological parameters) moreover, LD50 data for CYN has not been reported on fish [40].

It is worth mentioning that CYN occurred at low concentrations in February after the period when the lake was completely frozen (Table 2). This is in accordance with the research indicating the stability of this toxin; CYN is stable when exposed to a range of light intensities, temperatures and pH [30].

4. CONCLUSIONS

The occurrence and dominance of the invasive species *C. raciborskii* in the Aleksandrovac Lake as well as other

locations clearly show that *C. raciborskii* is now a species of concern in recreational, sport and other water bodies in Serbia and it extends its already known geographic distribution. The first detection of CYN by HPLC/PDA provides evidence for the presence of this toxin in Serbia. Further monitoring of toxin-producing cyanobacteria is needed, both worldwide and in Serbia, to minimize possible harmful effects on human health and the environment. Monitoring of water bodies that humans use in agriculture or for entertainment and recreation is necessary by all means.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia – Project Grants TR 31011 and III 43002.

The authors have declared that no conflict of interest exists.

REFERENCES

- [1] Cruz, A.A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, G.M., He, X., Loftin, K., O'Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, J.T., Dionysios, D.D. (2013) A review on cylindrospermopsin; the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ Sci Processes Impacts* 15, 1979-2003.
- [2] Chorus, I., Cavalieri, M. (2000) Monitoring bathing waters. Chapter 10. A practical guide to the desing and implementation of assessments and monitoring programmes. Edited by Jamie Bartram and Gareth Rees, London.
- [3] Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992) Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114, 7941-7942.
- [4] WHO (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Routledge, London, New York.
- [5] Meriluoto, J., Codd, G.A. (2005) Toxic; Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Åbo Akademi University Press, Finland.
- [6] Kinner, S. (2010) Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. *Mar Drugs* 8, 542-564.
- [7] Svirčev, Z., Tokodi N., Drobač, D., Codd, G. (2014) Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. *Syst Biodivers* 12(3), 261-270.
- [8] Simeunović, J., Svirčev, Z., Karaman, M., Knežević, P., Melar, M. (2010) Cyanobacterial blooms and first observation of microcystin occurrences in freshwater ecosystems in Vojvodina region (Serbia). *Fresen Environ Bull* 19(2), 198-207.
- [9] Natić, D., Jovanović, D., Knežević, T., Karadžić, V., Bulat, Z., Matović, V. (2012) Mikrocistin – LR u površinskim vodama reke Ponjavice. *Vojnosanit Pregl* 69(9), 753-758.

- [10] Pantelić, D., Svirčev, Z., Simeunović, J., Vidović, M., Trajković, I. (2013) Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere* 91, 421–441.
- [11] Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Pantelić, D., Dulić, T. (2013) Cyanobacterial Blooms and their Toxicity in Vojvodina Lakes, Serbia. *Int J Environ Res* 7(3), 745–758.
- [12] Cvijan, M., Fužinato, S. (2011) The first finding of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju (Cyanoprokaryota) in Serbia. *Arch Biol Sci* 63, 507–510.
- [13] Cvijan, M., Fužinato, S. (2012) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota) – potential invasive and toxic species in Serbia. *Bot Serb* 36, 3–8.
- [14] Karadžić, V., Subakov-Simić, G., Natić, D., Ržaničanin, A., Čirić, M., Gačić, Z. (2013) Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia* 711, 43–60.
- [15] Simić, S., Mišćević, M., Đorđević, N., Popović, N. (2011). Cyanobacteria in Aleksandrovac Lake, before and after revitalisation. 16th Academy of Studenica: Cyanobacteria and Human Health, Novi Sad, Serbia. Abstract book pp 17-18.
- [16] Simić, S., Komárek, J., Đorđević, N. (2014) The confirmation of the genus *Glaucospira* (Cyanobacteria) and the occurrence of *Glaucospira laxissima* (G. S. West) comb. nova in Serbia. *Cryptogamie Algal* 35(3), 259–267.
- [17] Đorđević, N., Simić, S. (2014) Cyanobacterial blooms in oligosaline and alkaline -microaccumulation before and after rehabilitation. *Pol J Environ Stud* 23(6), 1975–1982.
- [18] Komárek, J. (2013) Cyanoprokaryota. 3. Teil Heterocytous Genera. In: Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M (eds) *Freshwater Flora of Central Europe*. Springer Spektrum, Springer - Verlag Berlin, Heidelberg. pp 1 - 1130.
- [19] Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton – Methodik. *Mitt Int Ver Limnol* 9, 1–38.
- [20] APHA (2005) *Standard Methods (Standard methods for examination of water and wastewater. 21st Edn.)*. Am. Publ. Health Assoc., Washington DC, USA, 2005.
- [21] Harada, K., Kondo, F., Lawton, L., (1999) Laboratory analysis of cyanotoxins, chapter 13. In: Chorus, I., Bartram, J., (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* (WHO). The World Health Organization, E. and F.N. Spon, London, UK. pp. 369–405.
- [22] Welker, M., Bickel, H., Fastner, J. (2002) HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin – opportunities and limits. *Water Res* 36, 4659–4663.
- [23] Bláhová, L., Babica, P., Adamovský, O., Kohoutek, J., Maršálek, B., Bláha, L. (2008) Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. *Environ Chem Lett* 6, 223–227.
- [24] Chapman, A., Schelske, C. (1997) Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. *J Phycol* 33, 191–195.
- [25] Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F., Coute, A. (2002) Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Res* 36, 3183–3192.
- [26] Padišák, J. (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and a review of its ecology. *Arch Hydrobiol – Suppl* 107(4), 563–593.
- [27] Kling, J.H. (2009) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria): a brief historic overview and recent discovery in the Assiniboine River (Canada). *Fottea* 9, 45–47.
- [28] Istvánovics, V., Shafik, H.M., M., Presing, M., Juhas, S. (2000) Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biol* 43, 257–275.
- [29] Burford, M.A. and Davis, T.W. (2011) Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Chinese J Oceanol Limnol* 29, 883–891.
- [30] Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R. (1999) Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environ Toxicol* 14, 155–161.
- [31] Griffiths, D.J., Saker, M.L. (2003) The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 18, 78–93.
- [32] Rucker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C. (2007) Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin (CYN) in 21 *Aphanizomenon* dominated lakes of North East Germany. *Toxicon* 50, 800–809.
- [33] Bittencourt-Oliveira, M.C., Piccin-Santos, V., Moura, A.N., Aragao-Tavares, N.K.C., Cordeiro-Araujo, M.K. (2014) Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An Acad Bras Cienc* 86(1), 297–309.
- [34] Saker, M.L., Eaglesham, G.K. (1999) The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 37, 1065–1077.
- [35] Messineo, V., Melchiorre, S., Di Corcia, A., Gallo, P., Bruno, M. (2010) Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the Volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environ Toxicol* 25(1), 18–27.
- [36] Saker, M.L., Griffiths, D.J. (2001) Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. *Mar Freshwater Res* 52, 907–915.
- [37] McGregor, G.B., Fabbro, L.D. (2000) Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes. Reservoirs. Res Manage* 5, 195–205.
- [38] Leflaive, J., Ten-Hage, L. (2007) Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw Biol* 52, 199–214.
- [39] Ibelings, B., Havens, K. (2008) Cyanobacterial toxins: a qualitative meta-analysis of concentrations, dosage and effects in freshwater, estuarine and marine biota. *Adv Exp Med Biol* 619, 675–732.
- [40] Sotton, B., Domaizon, I., Anneville, O., Cattaneo, F., Guillard, J. (2014) Nodularin and cylindrospermopsin: a review of their effects on fish. *Rev Fish Biol Fisheries* DOI 10.1007/s11160-014-9366-6.

- [41] De Souza, C.R., Carvalho, M.C., Truzzi, A.C. (1998) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings Reservoir, Brazil. *Environ Toxic Water* 13, 73-81.
- [42] Berry, J.P., Gibbs, P.D.L., Schmale, M.C., Saker, M.L. (2009) Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicon* 53, 289–299.

Received: February 09, 2015

Revised: May 12, 2015

Accepted: June 17, 2015

CORRESPONDING AUTHOR

Associate Professor Snežana B. Simić

University of Kragujevac

Faculty of Science

Department of Biology and Ecology

Radoja Domanovića 12

Kragujevac, 34000

SERBIA

Phone: (+381) 34 336223 ex. 248

Fax: (+381) 34 335040

E-mail: snezasi@kg.ac.rs

Cyanobacterial Blooms in Oligosaline and Alkaline Microaccumulation Before and After Rehabilitation

Nevena B. Dorđević, Snežana B. Simić*

Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac,
R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

Received: 18 December 2013

Accepted: 21 May 2014

Abstract

This work describes the occurrence and blooming of some Cyanobacteria in an artificial, oligosaline, alkaline, microaccumulation in Serbia, which was formed on salines in 1963-64, and rehabilitated in 2009-10. The appearance and specific blooming of species common for tropical regions in Aleksandrovac Lake (N 42°29'22", E 21°53'54") before reconstruction (*Cylindrospermum stagnale* (Kützing) ex Bornet et Flahault, *Synechococcus lividus* Copeland, *Chrysochlorum bergii* (Ostenfeld) Zapomělová et al., *Anabaenopsis elenkinii* Miller, *Lyngbya aestuarii* (Mertens) Liebman ex Gomont) and after reconstruction (*Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszińska) Seenayya et Subba Raju, *Chrysochlorum bergii*, *Anabaenopsis elenkinii*, as well as *Glaucospira* sp. Lagerheim) was recorded for the first time in Serbia. The work also demonstrates the potential hazard to the environment (fishkill) due to the presence of specific blooming of Cyanobacteria. Alkaline salt ponds and lakes with extreme ecological conditions are places suitable for the development of alien and potentially invasive species.

Keywords: cyanobacterial bloom, microaccumulation, salines, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Glaucospira* sp.

Introduction

Cyanobacteria is an extensive group of photosynthetic prokaryotes that often plays a key role in the production of organic matter in soda, brackish, and saline lakes, as well as artificial reservoirs formed on salty ground. They are unique ecosystems with extremely high pH values and high mineralization levels (up to saturating concentrations) [1, 2]. Under extremely high pH values (>10.5). Cyanobacteria form up to 99% of overall phytoplankton [2].

During the last 90 years the presence and blooming of Cyanobacteria has been described in about a hundred different lakes, reservoirs, rivers, and canals of Serbia [3-9].

A total of 21 genera with 67 species of Cyanobacteria has been noted. Obvious blooms were in the form of water colour change, foam, and skim of different colors. The research so far has shown that the blooming most commonly occurred due to the excessive multiplication of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, and *Planktothrix* [5]. Recent work has indicated the appearance of certain tropical, potentially invasive species, especially in the salt ponds and lakes of Serbia [10-12]. The two invasive Cyanobacteria *Chrysochlorum bergii* (Ostenfeld) Zapomělová et al. (as *Anabaena bergii* Ostenfeld) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszińska) Seenayya et Subba Raju [10, 12] were first found in Serbia in the salty puddles and marshes near the river Tamiš. Also, in these salt ponds, was first found *Arthrospira fusiformis* (Voronichin)

*e-mail: snezasi@kg.ac.rs

Komárek et Lund, up to now mainly known for salty alkaline lakes from tropical regions in Africa and Asia [11]. In Serbia at the salty alkaline lakes the appearance of the taxa *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* and *Arthrospira* has not caused blooming up to now and there were no negative consequences for the wildlife, the only detected blooming of the *Cylindrospermopsis raciborskii* species in Serbia was in the Ponjavica River [8].

The aim of this work is to indicate the presence and specific blooming of Cyanobacteria in an oligosaline, alkaline microaccumulation in Serbia before and after its rehabilitation, as well as to demonstrate potential hazards to the environment (fishkill) due to the presence of specific blooming of Cyanobacteria. The formed water bloom, as well as the species that created it, are new to Serbia.

Material and Methods

Aleksandrovac Lake is situated in the southernmost part of Serbia (N 42°29'22", E 21°53'54"), at an elevation of

412 m (Fig. 1). It is an artificial reservoir formed by creating an earth-fill dam 8 meters high on the Aleksandrovac River. The lake area is 12 ha, max. volume 250,000 m³, length 580 m, width 300 m, maximum depth of 4 m, and average depth of 2 m. The water mass of the lake covers most of the so-called Aleksandrovac salines. The reservoir covers about 2/3 of the salines, while 1/3 is outside the reservoir. Soda (NaHCO₃) appears on the coast in the form of a white lime powder. This reservoir was originally used for irrigation of agricultural areas, and later for sports and recreational purposes – above all fishing. In the last few years several fish kills have occurred. Complete rehabilitation of the lake was performed from September 2009 to May 2010. The remaining fish were fished out, the water was released from the lake, and a complete rehabilitation [13] was performed. The salines were not considered within the rehabilitation project.

The samples of cyanobacteria were taken before the rehabilitation (June and September 2008) and after the rehabilitation of the lake (April, June, July, and September 2011). Before rehabilitation, the gelatinous mass was col-



Fig. 1. Study area map. Sampling and saline ground location at Aleksandrovac Lake.

lected from the surface (in June and September 2008), as well as from the bottom of the lake (in September 2008). Before and after the rehabilitation, phytoplankton samples were gathered by standard methods – phytoplankton net (net frame 25 cm, mesh net e.g. 22 μm) and Rutner bottle (2 l) in all aspects. All samples were preserved at once in a 4% solution of formaldehyde. Microscopic identification of cyanobacteria was performed, based on morphological characteristics on microscope Amplival-Jena with magnification up to 800 -1000x. Identification was carried out using the following literature [14-21]. Before rehabilitation only the relative abundance of the present taxa was estimated, due to the specificity in the structure of the mats. A 6-grade scale was used: 1 – occasional, 2 – rare, 3 – common, 4 – frequent, 5 – very frequent, and 6 – abundant. After rehabilitation, quantitative analysis of Cyanobacteria was made using the Utermöhl method [22] with a Carl Zeiss inverted microscope and it is expressed as the number of individuals per liter. The colonial or filamentous species were counted as one individual. The relative abundance was determined as well for the sake of comparing the results before and after the rehabilitation of the lake.

Simultaneously with gathering Cyanobacteria samples in the field, the following physical and chemical parameters were measured: water temperature ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxygen concentration ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), saturation (%), conductivity ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$), nitrate, ammonia, and phosphate concentrations ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), and water transparency (Secchi disc) (m) [23].

Results and Discussion

Before Rehabilitation

The results of physical and chemical analysis (Table 1), especially the conductivity values at $1,234 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ and pH at 8.7 to 10.3 of water of Aleksandrovac Lake, indicate that this is an oligosaline [24] and alkaline lake. The ground on which the lake was formed, morphological characteristics of the lake (average depth of 2 m), small flow of fresh water, physical and chemical characteristics of the water itself (increased level of biogenic salts, high temperature to 34°C , pH, and conductivity), had an effect on the formation of a specific cyanobacteria community. This includes both the presence of certain species and the way of their joining and the formation of a compact gelatinous mat on the surface of the water.

Throughout 2008 a specific blooming in the form of gelatinous green-orange mats was formed on the surface of the water of Aleksandrovac Lake, up to 0.5 cm thick. By June the mats had spread, covering about 50% of the lake surface. A gelatinous green-orange mat was made out of densely intertwined and compact cyanobacteria, both benthic and plankton filamentous, unicellular and colonial ones, along with green filaments (*Cladophora* sp. and *Oedogonium* sp.) and plankton unicellular and colonial algae of the order Desmidiiales and Chlorococcales. Twenty-seven Cyanobacteria were found in the biofilm (Table 2): Chroococcales 11, Oscillatoriales 8, and

Table 1. Mean value physical and chemical parameters of Aleksandrovac Lake before and after rehabilitation.

Month	Before rehabilitation		After rehabilitation			
	6	9	4	6	7	9
Year	2008	2008	2011	2011	2011	2011
Water temperature ($^{\circ}\text{C}$)	34.4	15.9	12.9	21.0	26.2	21.6
pH	10.37	6.68	8.78	8.78	9.23	10.21
Oxygen ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	10.15	3.60	10.05	6.02	7.24	7.36
Saturation (%)	146.00	41.20	102.55	71.5	96.4	85.80
Nitrate ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	2.10	-	0.48	2.52	1.88	1.85
Phosphate ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	1.25	0.20	0.08	0.74	0.39	0.33
Ammonia ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.23	0.10	0.4	0.23	0.27	0.14
Conductivity ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)	1238	1234	362	367	377	423
Water transparency (m)	0.1	0.1	1.0	1.2	0.8	0.6

Nostocales 8. In relation to the relative abundance, *Cylindrospermum stagnale* (Kützing) ex Bornet et Flahault (Fig. 2A-C) and *Synechococcus lividus* Copeland (Fig. 2E), dominated, subdominated by *Chroococcus* spp. Nine Cyanobacteria were present in the plankton (Chroococcales 3, Oscillatoriales 3 and Nostocales 3) dominated by *Synechococcus lividus*. Such thick gelatinous green-orange mats formed by a combination of the above-mentioned species of Cyanobacteria was first recorded in Serbia [3-5]. Such a biofilm with similar cyanobacteria structure is mostly characteristic of alkaline waters, with conductivity values over $1,000 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$. *Cylindrospermum stagnale* is a species tolerant of high pH and conductivity in water (and soil), especially in the tropical regions in Asia and Africa [25-27]. In foliose floating mats, *Cylindrospermum stagnale* always had gas bubbles trapped within the mucilaginous matrix, thus helping the buoyancy of the species [25].

In Aleksandrovac Lake, in hyper-saturated conditions (146% of oxygen), mats were elevated due to air bubbles formed within them and remained on the surface of the water. The formed mats obscured the light, which resulted in the elevation of all the other algae and their presence in the above-mentioned mats on the surface of the water. That explains the diversity and mass appearance of a number of primarily plankton forms in the biofilm and their absence or small number in the plankton. In the plankton, under the transparency of 0.1 m at 34°C ae cells of thermophilic species *Synechococcus lividus* dominate (Table 2).

Table 2. Species diversity, relative abundance (1 – occasional, 2 – rare, 3 – common, 4 – frequent, 5 – very frequent, and 6 – abundant) of Cyanobacteria in mats (M) and plankton (P) of Aleksandrovac Lake before and after rehabilitation.

Cyanobacteria	Before rehabilitation				After rehabilitation			
	Year		2008		2011			
	Month		6	9	4	6	7	9
	M	P	M	P	P	P	P	P
Chroococcales								
<i>Aphanocapsa grevillei</i> (Berkeley) Rabenhorst	1		1				1	
<i>Aphanocapsa holsatica</i> (Lemmermann) Cronberg et Komárek	1							
<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli	4	1	4					
<i>Chroococcus bituminosus</i> (Bory) Hansgirg	1							
<i>Chroococcus dispersus</i> (Keissler) Lemmermann	3		5					
<i>Chroococcus minimus</i> (Keissler) Lemmermann	3		4					
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli			1				1	
<i>Gloeocapsa montana</i> Kützing	1							
<i>Gloeocapsa minima</i> f. <i>smithii</i> Hollerbach, Kosinskaja et Poljanskij	1							
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing							1	
<i>Merismopedia punctata</i> Meyen	1							
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing			1	1				
<i>Synechococcus aeruginosus</i> Nägeli	1		1					
<i>Synechococcus elongatus</i> (Nägeli) Nägeli		1	1					
<i>Synechococcus lividus</i> Copeland	6	6	6	6		2	3	2
Oscillatoriales								
<i>Glaucospira</i> sp. Lagerheim								6
<i>Limnothrix redekei</i> (Van Goor) Meffert	2	1			1	1	1	1
<i>Lyngbya aestuarii</i> Liebman ex Gomont	1		6	6			1	1
<i>Lyngbya limnetica</i> Lemmermann	1	1	1	1				3
<i>Oscillatoria</i> sp. Vaucher ex Gomont						1		
<i>Planktothrix</i> sp. Anagnostidis et Komárek						1		
<i>Porphyrosiphon martensianus</i> (Meneghini ex Gomont) Anagnostidis et Komárek	1		1					
<i>Pseudanabaena constricta</i> (Szafer) Lauterborn	1							
<i>Pseudanabaena limnetica</i> (Lemmermann) Komárek	4	4	4	4	2	2	2	2
<i>Spirulina</i> sp. 1 Turpin ex Gomont	1							
<i>Spirulina</i> sp. 2 Turpin ex Gomont	1							
Nostocales								
<i>Anabaena</i> sp. 1 Bory de Saint-Vincent ex Bornet et Flahault	1		1	1	1	1		
<i>Anabaena</i> sp. 2 Bory de Saint-Vincent ex Bornet et Flahault				1	1	1		
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> Miller	1	1	2	5				3
<i>Aphanizomenon</i> sp. Morren ex Bornet et Flahault					1	1		
<i>Calothrix fusca</i> (Kützing) Bornet et Flahault	2							
<i>Calothrix pulvinata</i> (Mertens) C. Agardh	1							
<i>Chrysoosporum bergii</i> (Ostenfeld) Zapomelová et al.		1	2	2	1	1	1	2
<i>Cylindrospermum stagnale</i> (Kützing) ex Bornet et Flahault	6	2	3	1	1	1	1	1
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszińska) Seenayya et Subba Raju								4
<i>Gloeotrichia echinulata</i> (Smith) P. Richter	2							
<i>Gloeotrichia</i> sp. J. Agardh ex Bornet et Flahault	1							
<i>Nostoc paludosum</i> Kützing ex Bornet et Flahault	2		2					

Synechococcus spp. is common and numerous in shallow, turbid soda lakes [28].

In September, apart from existing gelatinous biofilm on the surface, a leathery-like dark-green scum on the sludge was observed. Eighteen Cyanobacteria were present (Table 2): Chroococcales 9, Oscillatoriales 4, and Nostocales 5. In this period dominant species in the mats at the bottom were *Lyngbya aestuarii* Lieberman ex Gomont (Fig. 2D-E), subdominated by *Pseudanabaena limnetica* (Lemmermann) Komárek (Fig. 2F). Ten Cyanobacteria were present in the plankton (Chroococcales 2, Oscillatoriales 3, and Nostocales 5), dominated by *Lyngbya aestuarii*, *Synechococcus lividus*, subdominated by *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Fig. 2G).

The conditions that prevailed in the lake toward the end of the summer (low light intensity and high conductivity) enabled the appearance of benthic *Lyngbya aestuarii* in the sludge in both coastal areas of the lake, where it formed thick green mats out of trichomes in sheath, and the plankton, where a large number of trichomes out from a sheath were present. The trichomes of *Lyngbya aestuarii* (along with the trichomes of *Chrysochlorum bergii*, *Anabaenopsis elenkinii*, *Pseudanabaena limnetica*, and cells of *Synechococcus lividus*) colored the water dark green. The *Lyngbya aestuarii*, *Chrysochlorum bergii* (Fig. 2H), and *Anabaenopsis elenkinii* have rarely been found in Serbia so far [5, 10, 15]. All these algae are known to produce toxins that can lead to the endangerment of aquatic life forms (fishkill), or health problems with people who use such water for recreational purposes (swimming, fishing) [5]. The fish kill at Aleksandrovac Lake happened on September 22, 2008, when 65 specimens of white silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), with a total weight of 1,600 kg, died in one day.

It was in the time of the domination of these algae that the death of white silver carp occurred, an allochthonous planktivore species of fish introduced to the lake. The death of these species occurred at a period of biomass decomposition in conditions of low temperature, measured at 15.6°C in this period, a sudden decrease of oxygen concentration in the water (3.6 mg·l⁻¹), as well as the sudden decrease of the pH value to 6.8. Potential causes for the death of this species could be the toxins of these algae [29]. Silver carp have been introduced worldwide for both aquaculture fish production and algal control. Stocking of silver carp as a biomanipulation tool to reduce phytoplankton biomass in lakes remains controversial [30, 31]. The present study indicates that the phytoplanktivorous silver carp can be an efficient biomanipulation fish, to reduce nuisance blooms of cyanobacteria in eutrophic lakes where large herbivorous zooplankton are lacking [31]. Some experimental research indicate that the presence of this species in the same conditions resulted in the decrease of growth of certain species (*Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp.), but on the other hand it stimulated the growth of certain Cyanobacteria such as *Microcystis aeruginosa* [32]. Other studies indicate that Cyanobacteria blooms (*Aphanizomenon flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*) often result in white silver carp deaths [33].

After Rehabilitation

The results of the research of physical and chemical parameters in Aleksandrovac Lake after rehabilitation indicate that only some parameters changed. Conductivity of the water is significantly lower at 362 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ (before rehabilitation it was 1,234 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$). The pH value and especially phosphate concentration indicate that the conditions for a rapid natural eutrophication are present in the lake (Table 1).

After rehabilitation in April to September 2011, no visible cyanobacteria-induced water blooms was observed. From April to September 2011 the number of Cyanobacteria species present in the phytoplankton was small (7-10) (Table 2). One year after filling the lake the heterocite species of Nostocales (*Cylindrospermum stagnale*, *Chrysochlorum bergii*, *Anabaenopsis elenkinii*) are still present. Their appearance right after rehabilitation was possible due to the akinetes, which helped them to remain in the sludge that had not been completely removed during rehabilitation [13]. The total abundance of Cyanobacteria was 635 ind·l⁻¹ in April, 2,087 ind·l⁻¹ in June, 6,726 ind·l⁻¹ in July, and 1,033,427 ind·l⁻¹ in September. The Cyanobacteria community in September was dominated by *Glaucospira* sp. Lagerheim (74%), and subdominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (23%) (Fig. 2J-K).

According to Komárek and Anagnostidis [20], *Glaucospira* is an insufficiently known genus, rarely found in the plankton of a lake. These cyanobacteria are very rare in Europe and the USA. One species known from Europe (Greece, Hungary, Caspian Sea – estuary of Volga River and one from a thermal spring in Yellowstone Park (USA). Few species are known from plankton of lakes and reservoirs and from metaphyton among water plants in swamps, usually in tropical regions (African lakes), also in Australia, India, Brazil, Cuba, Japan, Equador, Venezuela, Malaysia, Mexico, etc. [20]. Santos and Sent'Anna [1] provide data on the appearance of *Glaucospira* sp. with *Anabaenopsis elenkinii* in a Brazilian salt lake Salina de Meio, with extreme ecological conditions (pH>10, conductivity >3,800 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$, 28.2°C). This is the first record of genus *Glaucospira* in the waters of Serbia [5]. The *Cylindrospermopsis raciborskii*, until recently known as a tropical species, is spreading its areal into moderate climate regions, and is defined as an invasive, harmful algae, that can produce toxins [34, 35]. Akinetes, the resting cells of nostocalen Cyanobacteria, help to withstand unfavorable conditions and play a key role in their invasion [36]. Cvijan and Fužinato [12] were the first to provide data on the findings of this species in 2006 in water of Slatina Pond, Serbia (about 960 trichomes per l), with high pH (8.4), conductivity (1900±100 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$), and temperature (28°C). In Serbia we detected the first blooming of the *Cylindrospermopsis raciborskii* species in 2008 in the Ponjavica River [8]. The presence and blooming of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Aleksandrovac Lake indicates the expansion of this species.

Alkaline salt ponds and lakes with extreme ecological conditions are places suitable for the development of non-native and potentially invasive species. This argument is

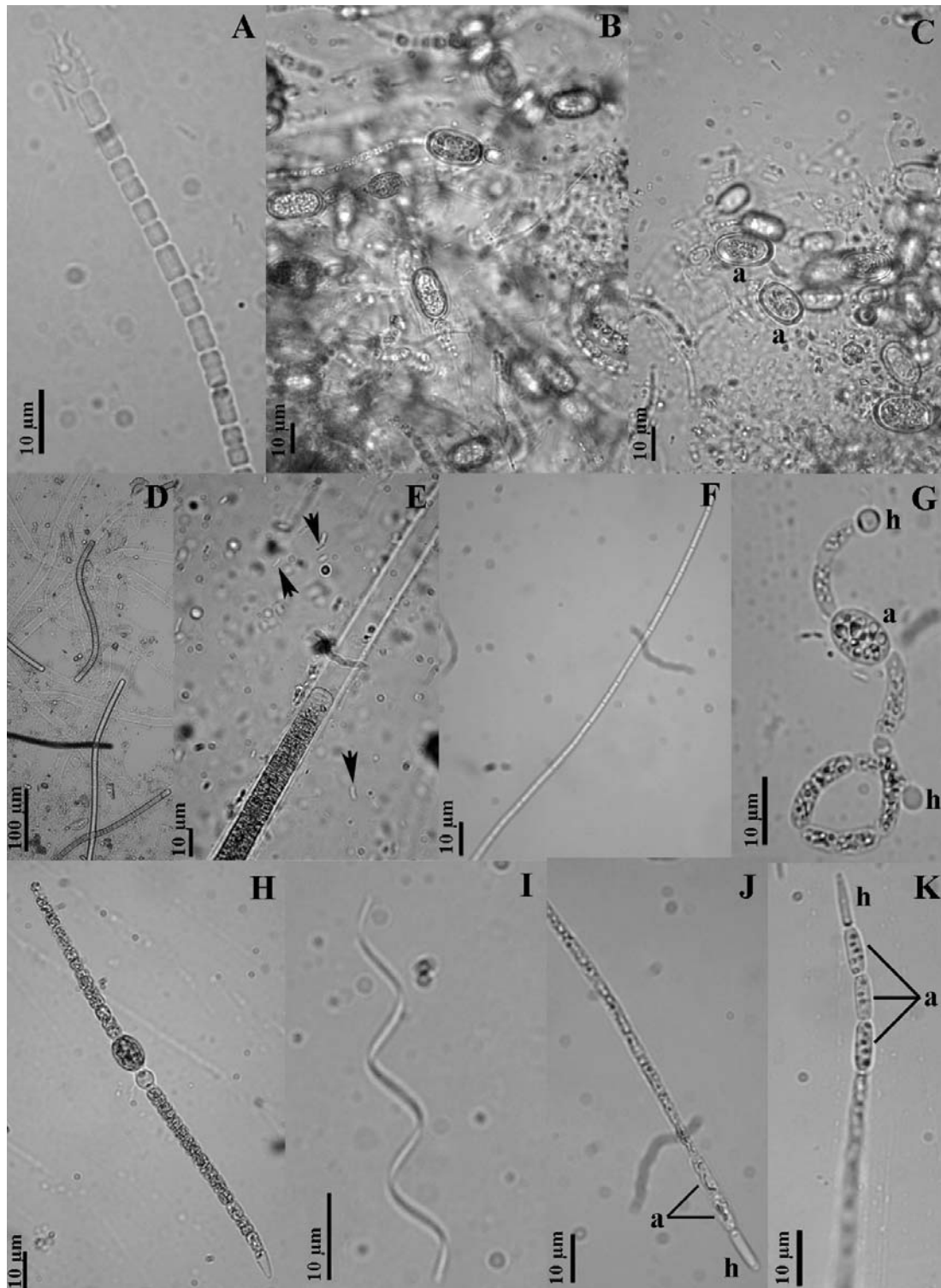


Fig. 2. Micrographs of different Cyanobacteria observed by optical microscope in Aleksandrovac Lake. Panels correspond to: A) *Cylindrospermum stagnale* – symmetric trichom and terminal heterocytes, B) development of akinetes of *Cylindrospermum stagnale*, C) akinetes of *Cylindrospermum stagnale*, D) *Lyngbya aestuarii* in mats with and without sheath, E) *Lyngbya aestuarii* and *Synechococcus lividus* (arrows), F) *Pseudanabena limnetica*, G) *Anabaenopsis elenkinii*, H) *Chrysochlorum bergii*, I) *Glaucospira* sp., J) *Cylindrospermopsis raciborskii* – solitary subsymmetric trichom with terminal heterocytes and development two subapical akinetes; K) *Cylindrospermopsis raciborskii* – trichom with terminal heterocytes and three subapical akinetes. Legend: h – heterocyta, a – akinet.

justified by the fact that the cyanobacteria *Chrysochloris bergii* [10], *Arthrospira fusiformis* [11], and *Cylindrospermopsis raciborskii* [12], previously known as foreign species, have already been found in the waters of similar physical and chemical characteristics.

Conclusion

The occurrence and blooming of *Cylindrospermum stagnale*, *Synechococcus lividus*, *Chrysochloris bergii*, *Anabaenopsis elenkinii*, and *Lyngbya aestuarii* before reconstruction and *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Chrysochloris bergii*, *Anabaenopsis elenkinii*, as well as *Glaucospira* sp. after reconstruction in Aleksandrovac Lake, characteristic and common for tropical regions indicates that the development of these Cyanobacteria, as well as their blooming, are not conditioned merely by latitude, but, above all, by specific conditions ruling in an aquatic ecosystem. In the case of this lake, extreme ecological conditions (high pH values and high mineralization levels, as well as high temperature) can be singled out as important factors for the appearance and blooming of these cyanobacteria. The base on which the lake was formed as well as the salines on the left bank of the lake also affect the specificity of ecological conditions.

Taking into account all of the mentioned facts, it is clear that the process of rehabilitation has not given results. After the filling of the lake, blooming of potentially toxic cyanobacteria occurred. All this indicates the necessity for further monitoring of this lake and a controlled use of these waters provided for sport and recreational purposes (swimming and fishing). Alkaline salt ponds and lakes with extreme ecological conditions are places suitable for the development of alien and potentially invasive species.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Projects No. TR 31011 and III 43002). We want to thank Prof. Dr. Jiří Komárek (Czech Republic) for great support and help with identification of *Glaucospira* genus.

References

- SANTOS K.R.S., SANT'ANNA, C.L. Cyanobacteria from different types of lakes ("salina," "salitrada" and "baía") representative of the Pantanal da Nhecolândia, MS, Brazil. *Braz. J. Bot.* **33**, 61, **2010** [in Brazilian].
- LÓPEZ-ARCHILLA A.I., MOREIRA D., LÓPEZ-GARCÍA P., GUERRERO C. Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH. *Extremophiles*. **8**, 109, **2004**.
- SVIRČEV Z., SIMEUNOVIĆ J., SUBAKOV-SIMIĆ G., KRSTIĆ S., VIDOVIĆ M. Freshwater Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxin Production in Serbia in the Past 25 years. *Geografica Pannonica*. **11**, 32, **2007**.
- SIMEUNOVIĆ, J., SVIRČEV, Z., KARAMAN, M., KNEŽEVIĆ, P., MELAR, M. Cyanobacterial blooms and first observation of microcystin occurrences in freshwater ecosystems in Vojvodina region (Serbia). *Fresen. Environ. Bull.* **19**, (2), 198, **2010**.
- SEDMAK B., SVIRČEV Z. Cyanobacteria and their toxins ecological and toxicological risks and blooming of Cyanobacteria in Serbia. EPC-Environmental Protection College, Velenje, pp 1-134, **2011** [In Serbian].
- PERENDIJA B., DESPOTOVIĆ S., RADOVANOVIĆ T., GAVRIĆ J., BORKOVIĆ-MITIĆ S., PAVLOVIĆ S., OGNJANOVIĆ B., SIMIĆ S., PAJOVIĆ S., SAIČIĆ Z. Biochemical and Ultrastructural Changes in the Liver of European Perch (*Perca Fluviatilis* L.) in Response to Cyanobacterial Bloom in the Gruža Reservoir. *Arch. Biol. Sci.* **63**, (4), 979, **2011**.
- NATIĆ D., JOVANOVIĆ D., KNEŽEVIĆ T., KARADŽIĆ V., BULAT Z., MATOVIĆ V. Microcystin-LR in surface water of Ponjavica River. *Vojnosanit. Pregl.* **69**, (9), 753, **2012** [In Serbian].
- KARADŽIĆ V., SUBAKOV-SIMIĆ G., NATIĆ D., RŽANIČANIN A., ĆIRIĆ M., GAČIĆ Z. Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia*. **711**, 43, **2013**.
- SVIRČEV Z., SIMEUNOVIĆ J., SUBAKOV-SIMIĆ G., KRSTIĆ S., PANTELIĆ D., DULIĆ T. Cyanobacterial Blooms and their Toxicity in Vojvodina Lakes, Serbia. *Int. J. Environ. Res.* **7**, (3), 745, **2013**.
- CVIJAN M., KRIZMANIĆ J. *Anabaena bergii* Ostenf. [f. minor (Kiselev) Kossinsk.] (Cyanoprokaryota) – the first record in Serbia, its taxonomic status and that of the genus *Anabaena* Bory de Saure and Flah. *Arch. Biol. Sci.* **61**, (4), 883, **2009**.
- FUŽINATO S., FODORA, A., SUBAKOV-SIMIĆ G. *Arthrospira fusiformis* (Varonichin) Komárek et Lund (Cyanoprokaryota) – A new species for Europe. *Algol. Stud.* **134**, 17, **2010**.
- CVIJAN M., FUŽINATO S. The first finding of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju (Cyanoprokaryota) in Serbia. *Arch. Biol. Sci.* **63**, (2), 507, **2011**.
- PROKIĆ S., POPOVIĆ N., TREBJEŠANIN B., SIMIĆ Z. AND BABIĆ P. Rehabilitation of Lake Aleksandrovac – main projekt. Jaroslav Černi Institute for the Development of Water Resources, Belgrade. **2008** [In Serbian].
- CVIJAN M., BLAŽENČIĆ J. Flora algae of Serbia. Cyanophyta. Scientific Book, Belgrade, pp. 1-290, **1996** [In Serbian].
- HINDÁK F. Atlas of Freshwater Cyanophytes. VEDA. Bratislava, pp 1-128, **2001** [in Slovakia].
- KOMÁREK J. Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In: *Freshwater Algae of North America*, eds.; PA: Elsevier, Philadelphia, 59-116, **2003**.
- KOMÁREK J. Phenotypic diversity of the heterocystous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*. *Czech Phycol.* **5**, 1-35, **2005**.
- KOMÁREK J., ANAGNOSTIDIS K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes-Nostocales 4. *Algol. Stud.* **56**, 247, **1989**.
- KOMÁREK J., ANAGNOSTIDIS K. Cyanoprokaryota. 1. Part: Chroococcales. In: *Freshwaterflora of Central Europe*, eds.; Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart. pp 1-548, **1999**.

20. KOMÁREK J., ANAGNOSTIDIS K. Cyanoprokaryota 2. Part: Oscillatoriales. In: Freshwaterflora of Central Europe, eds.; Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart 1-759, **2005**.
21. WHITTON B.A. Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria). In: The Freshwater Algal Flora of the British Isles, eds.; University Press. Cambridge. pp. 25-122, **2008**.
22. UTERMÖHL H. Complement of the quantitative analysis of phytoplankton – Methodology. Mitt. Int. Ver. Limnol. **9**, 1, **1958**.
23. APHA. Standard Methods (Standard methods for examination of water and wastewater. 21st Edn.) 2005. Am. Publ. Health Assoc., Washington DC, USA, **2005**.
24. GELL P.A., GASSE F. Relationships between salinity and diatom flora some Australian lakes. In: 11th International Diatom Symposium. Academy of Sciences. San Francisco, CA: California. pp 631-647, **1994**.
25. AL-HOMAIDAN A.A., ARIF I.A. Ecology and bloom-forming algae of a semi-permanent rainfed pool at Al-Kharj, Saudi Arabia. J. Arid Environ. **38**, (1), 15, **1998**.
26. KAWABATA Y., NAKAHARA H., KATAYAMA Y., ISHIDA N. The phytoplankton of some saline lakes in Central Asia. Int. J. Salt Lake Res. **6**, 5, **1997**.
27. MANCHADA H., KAUSHIK A. Algal flora of the aridisols of Rohtak and salt-tolerance of the indigenous cyanobacteria. Trop. Ecol. **41**, (2), 217, **2000**.
28. FELFÖLDI T., SOMOGYI B., MÁRIALIGETI K., VÖRÖS, L. Characterization of photoautotrophic assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Central Europe). J. Limnol. **68**, 385, **2009**.
29. QUESADA A., SANCHIS D., CARRASCO D. Cyanobacteria in Spanish reservoir. How frequently are they toxic? Limnetica. **23**, 109, **2004**.
30. GOPHEN M. Biomanipulation: retrospective and future development. Hydrobiologia. 200/201, 1, **1990**.
31. XIA Z., PING X., LE H., NICHUN G., YINGAN G., XIULIN H. JUN C., GAODAO L. Effects of the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) on plankton and the hepatotoxic microcystins in an enclosure experiment in a eutrophic lake, Lake Shichahai in Beijing. Aquaculture. **257**, 173, **2006**.
32. KOLMAKOV V.I., GLADYSHEV M.I., KRAVCHUK E.S., CHUPROV S.M., ANISHCHENKO O.V., IVANOVA E.A., TRUSOVA M.Y. Species-Specific Stimulation of Cyanobacteria by Silver Carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.). Dokl. Biol. Sci. **408**, 223, **2006**.
33. JEWEL M.A., AFFAN M.A., KHAN S. Fish mortality due to cyanobacterial blooms in an aquaculture pond in Bangladesh. Pakistan J. Biol. Sci. **6**, 1046, **2003**.
34. KAŠTOVSKÝ J., HAUER T., MAREŠ J., KRAUTOVÁ M., BEŠTA T., KOMÁREK J., DESORTOVÁ B., HETEŠA J., HINDÁKOVÁ A., HOUK V., JANEČEK E., KOPP R., MARVAN P., PUMANN P., SKÁCELOVÁ O., ZAPOMĚLOVÁ E. A review of the alien and expansive species of freshwater cyanobacteria and algae, a case study from the Czech Republic. Biol. Invasions. **12**, 3599, **2010**.
35. SINHA R., PEARSON A.L., DAVIS T.W., BURFORD A.M., ORR T.P., NEILAN B.A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones – Is climate change responsible? Water Res. **46**, 1408, **2012**.
36. STÜKEN A., RÜCKER J., ENDRULAT T., PREUSELL K., HEMM M., NOKSDORF B., KARSTEN U., WEINDER C. Distribution of three alien cyanobacterial species (Nostocales) in northeast Germany: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii* and *Aphanizomenon aphanisomenoides*. Phycologia. **45**, (6), 696, **2006**.

БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Невена Б. Ђорђевић
Ментор	Проф. др Снежана Б. Симић
Наслов рада	Утицај промена еколошких фактора на састав и динамику фитопланктонских цијанобактерија (<i>Cyanobacteria</i>) у малим акумулацијама
Језик публикације	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2021.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Радоја Домановића 12 34000 Крагујевац, Србија
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Хидробиологија
Предметна одредница/кључне речи	фитопланктонске цијанобактерије, <i>Cyanobacteria</i> , цијанотоксини, инвазивне врсте, еколошки фактори, мале акумулације
Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
Важна напомена	

Извод

Предмет истраживања ове докторске дисертације су фитопланктонске цијанобактерије (*Cyanobacteria*) у малим акумулацијама и утицаји еколошких фактора на присуство и доминацију различитих врста, са посебним аспектом на

потенцијално инвазивне и токсичне цијанобактерије. Трогодишњи мониторинг је спроведен једном месечно на три акумулације (акумулација Шумарице, акумулација Бубањ и Александровачка акумулација). Применом методе самоорганизујућих мапа (СОМ) омогућена је класификација узорака на основу физичких и хемијских параметара, као и визуализација просторне дистрибуције биотичких параметара. Три поменута водна тела значајно се разликују по општим карактеристикама, хемијском саставу воде и динамици фитопланктонских цијанобактерија. Различитост испитиваних акумулација се огледа у малом броју заједничких таксона и у таксонима који су били најфреквентнији и цветајући: акумулација Шумарице (*Aphanizomenon flos-aquae*), акумулација Бубањ (*Microcystis aeruginosa*) и Александровачка акумулација (*Raphidiopsis raciborskii*). Најзначајнији средински параметри који утичу на заједницу цијанобактерија су концентрације укупног фосфора и азота. Наша студија показује да екстремне падавине могу да доведу до повећања концентрације хранљивих материја у резервоарима, и узрокују значајан еколошки поремећај заједнице (цветање потенцијално токсичних цијанобактерија). Појава и доминација инвазивне врсте *R. raciborskii* у Александровачкој акумулацији показује да ова врста шири свој ареал распрострањења. Приликом спроведеног истраживања у оквиру ове дисертације у Србији први пут је детектован токсин цилиндроспермопсин (CYN). Ова студија је показала да је екстракт врсте *R. raciborskii* испољио генотоксичност чак и у ниским концентрацијама и повећао оксидативни стрес у јетри пацова након једног излагања.

Датум прихватања теме од стране ННВ	25. 04. 2018.
Датум одбране	
Чланови комисије	Проф. др Гордана Субаков - Симић Проф. др Александар Остојић Доц. др Драгана Предојевић



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Nevena B. Đorđević
Mentor	Prof. Dr. Snežana B. Simić
Title	The effect of changes of ecological factors on composition and dynamics of phytoplankton cyanobacteria (Cyanobacteria) in small reservoirs
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2021.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Hydrobiology
Key words	phytoplankton cyanobacteria, Cyanobacteria, cyanotoxins, invasive species, ecological factors, small accumulations
Holding data	In library of Faculty of Science, Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	
Summary	

The research subject of this doctoral dissertation includes phytoplankton cyanobacteria (Cyanobacteria) in the small reservoirs and the effects of ecological factors on the presence and dominance of different species, with particular aspects on invasive and potentially toxic cyanobacteria. Three-year monitoring was conducted (monthly) on

three reservoirs (Šumarice reservoir, Bubanj reservoir, and Aleksandrovac reservoir). The method of self-organizing map (SOM) provided the efficient classification of samples, based on physical and chemical parameters, as well as the visualization of the spatial distribution of biotic parameters. These three water bodies are significantly different according to their general characteristics, chemical water composition, and cyanobacteria dynamics. The dissimilarity of the examined reservoirs is reflected in the small number of common taxa and in the taxa that were the most frequent and blooming: Šumarice reservoir (*Aphanizomenon flos-aquae*), Bubanj reservoir (*Microcystis aeruginosa*) and Aleksandrovac reservoir (*Raphidiopsis raciborskii*). The most important environmental parameters affecting the cyanobacteria community are concentrations of total phosphorus and nitrogen. Our study shows that extreme precipitations can cause an increase in nutrient concentration in reservoirs and significant environmental disturbance to the community (blooming of potentially toxic cyanobacteria). The domination of invasive species *R. raciborskii* in Aleksandrovac reservoir indicates that this species is expanding its areal distribution. The research conducted in this dissertation has detected the toxin cilindrospermopsin (CYN) for the first time in Serbia. This study shows that the extract of *R. raciborskii* exhibited genotoxicity even at low concentrations and increased oxidative stress in rat liver after a single exposure.

Accepted by Scientific Board on	25. 04. 2018.
Defended on	
Commission	Prof. Dr. Gordana Subakov - Simić Prof. Dr. Aleksandar Ostojić Asst. Prof. Dr. Dragana Predojević

Биографија

Невена Ђорђевић је рођена у Крагујевцу 1982. године. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу. Дипломирала је 2009. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на групи за биологију са просечном оценом 8.11 и оценом 10 на дипломском испиту. Исте године је уписала Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу.

У звање истраживач приправник у Институту за биологију и екологију изабрана је 2010. године. У звање истраживач сарадник за научну област Биологија је изабрана 2012. године. Звање асистент за ужу научну област Екологија, биогеографија и заштита животне средине стекла је 2015. године. На Природно-математичком факултету у Крагујевцу ангажована је на извођењу практичне наставе из следећих предмета: Алгологија, Заштита животне средине, Човек и животна средина, Процена утицаја на животну средину, Обнова и унапређење екосистема, Еколошки мониторинг животне средине, Примењена алгологија и Екологија алги.

Резултати научно-истраживачког рада Невене Ђорђевић публиковани су у виду 36 библиографских јединица, од чега су 15 у часописима са SCI листе. Коаутор је једног поглавља у монографији националног значаја. Учествовала је на преко 15 међународних и домаћих конференција. Учесник је на пројектима Министарства просвете од 2011. године.

Невена Ђорђевић је током 2014. године боравила у Чешкој (Универзитет Јужне Бохемије, Чешке Буђевице) где је успешно завршила курс под називом „Determination Course of Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria”, који је био фокусиран на идентификацију слатководних и терестичних цијанобактерија, а у складу са савременим таксономским приступима.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Ђорђевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај промена еколошких фактора на састав и динамику
фитопланктонских цијанобактерија (Cyanobacteria) у малим
акумулацијама

која је одбрањена на Природно-математичком факултету
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 6.5.2021. године,

Невена Ђорђевић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Ђорђевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај промена еколошких фактора на састав и динамику
фитопланктонских цијанобактерија (Cyanobacteria) у малим
акумулацијама

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 6.5.2021. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>