



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I  
EKOLOGIJU



MSc Dijana Pantelić

**POTENCIJAL SEKUNDARNIH  
METABOLITA CIJANOBAKTERIJA  
KAO BIOMARKERA U  
PALEOKLIMATSKOJ  
REKONSTRUKCIJI**

**-DOKTORSKA DISERTACIJA-**

Novi Sad, 2017. godine

## Zahvalnica



Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru Prof. dr Zorici Svirčev, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, na nesebičnoj pomoći, savetima i ogromnom razumevanju tokom naše saradnje. Hvala kao mentoru, naučniku i kao čoveku. Takođe veliku zahvalnost dugujem predsedniku komisije Prof. dr Jelici Simeunović na nesebičnoj pomoći, izvrsnom poznavanju stručne literature, na otvaranju vrata nauke i uvođenje u svet iste. Zahvalnost dugujem i članovima komisije Akademiku Prof. dr Slobodanu Markoviću i Prof. dr Snežani Simić na korisnim sugestijama i komentarima tokom izrade doktorske disertacije.

Hvala kolegama sa Katedre sa fiziologiju biljaka, posebno hvala Milanu Župunskom na pomoći u radu i na odličnom poznavanju literature. Hvala kolegama i profesorima sa Katedre za mikrobiologiju na saradnji i pomoći u radu. Takođe, veliko hvala LAPER timu za sve lepe momente koje smo provele zajedno. Zahvalnost na pregledu doktorske disertacije i na savetima dugujem koleginicama dr Nadi Tokodi i dr Damjani Drobac.

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije, čiji sam stipendista bila u periodu od 2010. do 2014. godine. Doktorska disertacija je rezultat rada na Republičkom projektu: "Transformacija geoprostora Srbije-prošlost, savremeni problemi i predlozi rešenja" (176020), finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Stoga veliku zahvalnost dugujem rukovodiocu projekta Akademiku Prof. dr Slobodanu Markoviću na angažovanju. Najdubju zahvalnost dugujem gospodinu Ministru Jovanu Baziću, veliko hvala na vraćanju vere u iskrenu dobrotu ljudi.

Istraživanja prezentovana u doktorskoj disertaciji prvenstveno su rađena u Laboratoriji za paleoekološku rekonstrukciju (LAPER), Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Jedan deo rezultata doktorske disertacije proizvod je saradnje sa laboratorijom Prof. dr Jussi Meriluoto na Departmanu za Bionauku, Åbo Akademi Univerziteta, Turku, Finska, kome na tome dugujem zahvalnost. Takođe i Tamari Dulić za izvršene analize u Finskoj.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici - mami Milici, tati Mladenu i sestri Jasmini, za neizmernu ljubav, pomoć, podršku, ogromno strpljenje i bezgranično razumevanje. Za inicijativu da upišem i snagu da dovršim ovo značajno poglavlje u životu. Svaki moj uspeh je podjednako i njihov. Neizrecivo i najveće hvala mom putokazu i mojoj steni - mojim kćincima, Nemanji i Jeleni Kantar, jer bez njih ne bih imala želje i elana za savladavanjem svih životnih stranputica i nedaća.

Posebno hvala i mom Vladimiru koji mi je uvek bio oslonac i utočište. Hvala za ljubav, bezgranično razumevanje, neizmernu podršku, smeh i sreću koju mi je pružao, bez čega nijedno moje dostignuće ne bi bilo moguće... hvala jer svemu u mom životu daje smisao.

Hvala i onima koji nisu tu, a znam da su sve vreme bili uz mene.

Zahvalna sam Bogu, jer me usmerava svaki dan i pruža mi dar života koji zaslužujem iznova i iznova.

Hvala vam

*„Neophodno nam je istinsko razumevanje prošlosti da bismo ispravno procenili sadašnjost i da bismo pravilno predvideli budućnost“*

Craig D. Idsoa  
osnivač Centra za izučavanje ugljen-dioksida i globalnih promena

## KRATAK SADRŽAJ

---

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Ciljevi istraživanja.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Materijal i metode.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Rezultati.....</b>	<b>69</b>
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>124</b>
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>160</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>164</b>

---

# PROŠIRENI SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Cijanobakterije - značaj i osnovne karakteristike .....	2
1.2. Sekundarni metaboliti cijanobakterija.....	4
1.2.1. Pigmenti cijanobakterija .....	5
1.2.1.1. Pomoćni fotosintetički pigmenti - fikobilini.....	6
1.2.1.2. UV zaštitni pigmenti - scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline .....	7
1.2.2. Toksini cijanobakterija .....	11
1.2.2.1. Mikrocistini.....	14
1.2.2.2. Cilindrospermopsini.....	15
1.2.2.3. Saksitoksini .....	16
1.3. Biomarkeri.....	17
1.3.1. Cijanobakterije u modelu formiranja lesa - BLOCDUST hipoteza .....	18
1.3.2. Tradicionalno korišćeni biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji.....	24
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>33</b>
3.1. Prikaz ispitivanih cijanobakterija Novosadske kolekcije kultura .....	34
3.2. Kultivacija cijanobakterijskih kultura .....	38
3.3. Uzorkovanje sedimenta i bioloških lesnih pokorica poreklom iz lesnih depoa Srbije.....	39
3.4. Analiza produkcije i procena stabilnosti pigmenata cijanobakterija.....	42
3.4.1. Analitička preciznost dobijenih rezultata .....	42
3.4.2. Analiza produkcije i procena stabilnosti metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance vodenih i zemljišnih cijanobakterija .....	43
3.4.2.1. Analiza uticaja abiotičkih faktora na produkciju MOSA i MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija .....	43
3.4.2.2. Procena uticaja abiotičkih faktora na stabilnost MOSA i MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija .....	44
3.4.3. Analiza produkcije i procena stabilnosti fikobilina, metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance lesnih cijanobakterija .....	45
3.4.3.1. Analiza produkcije fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija.....	45
3.4.3.2. Procena uticaja biotičkih faktora na stabilnost fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija.....	45
3.4.4. Metode određivanja koncentracije fikobilina, metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance cijanobakterija.....	47
3.4.4.1. Metoda određivanja koncentracije fikobilina .....	47
3.4.4.2. Metoda određivanja koncentracije MOSA .....	49
3.4.4.2.1. LC-MS(/MS) analiza scitonemina ekstrahovanog iz cijanobakterija .....	50
3.4.4.3. Metoda određivanja koncentracije MOMA .....	51

3.5. Analiza toksičnosti i produkcije cijanotoksina lesnih cijanobakterija i procena stabilnosti mikrocinina.....	53
3.5.1. Metoda određivanja toksičnosti - <i>Artemia salina</i> bioesej .....	54
3.5.2. Metoda određivanja koncentracije cijanotoksina - enzimski imuno-vezujući (ELISA) test.....	56
3.5.3. Metode određivanja koncentracije cijanotoksina - LC-MS(/MS) i HPLC.....	60
3.5.4. Procena stabilnosti mikrocinina cijanobakterijskog soja <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 biodegradacijom .....	66
3.6. Statistička obrada podataka.....	67
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>69</b>
4.1. Produkcija i stabilnost pigmenata cijanobakterija iz Novosadske kolekcije kultura .....	70
4.1.1. Produkcija i stabilnost metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance vodenih i zemljišnih cijanobakterija .....	70
4.1.1.1. Uticaj abiotičkih faktora na produkciju MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija.....	70
4.1.1.1.1. Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOSA .....	70
4.1.1.1.2. Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOSA .....	72
4.1.1.1.3. Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOSA .....	73
4.1.1.1.4. Uticaj sadržaja azota u podlozi na produkciju MOSA .....	74
4.1.1.1.5. Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti na produkciju MOSA .....	77
4.1.1.2. Uticaj abiotičkih faktora na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija.....	79
4.1.1.2.1. Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOMA.....	79
4.1.1.2.2. Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOMA .....	80
4.1.1.2.3. Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOMA .....	81
4.1.1.2.4. Uticaj sadržaja azota u podlozi na produkciju MOMA .....	82
4.1.1.2.5. Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti na produkciju MOMA .....	86
4.1.1.3. Uticaj abiotičkih faktora na stabilnost MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija.....	87
4.1.1.3.1. Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOSA.....	87
4.1.1.3.2. Uticaj temperaturnih vrednosti podloge na stabilnost MOSA.....	88
4.1.1.3.3. Uticaj vremenskog perioda izlaganja UV svetlosti na stabilnost MOSA .....	89
4.1.1.4. Uticaj abiotičkih faktora na stabilnost MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija.....	90
4.1.1.4.1. Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOMA .....	91
4.1.1.4.2. Uticaj temperaturnih vrednosti podloge na stabilnost MOMA .....	91
4.1.1.4.3. Uticaj vremenskog perioda izlaganja UV svetlosti na stabilnost MOMA .....	92
4.1.2. Produkcija i stabilnost fikobilina, metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance lesnih cijanobakterija .....	94
4.1.2.1. Produkcija fikobilina kod lesnih cijanobakterija .....	95

4.1.2.2. Produkcija MOSA kod lesnih cijanobakterija .....	96
4.1.2.3. Produkcija MOMA kod lesnih cijanobakterija .....	97
4.1.2.4. Uticaj biotičkih faktora na stabilnost fikobilina kod lesnih cijanobakterija .....	98
4.1.2.5. Uticaj biotičkih faktora na stabilnost MOSA kod lesnih cijanobakterija .....	102
4.1.2.6. Uticaj biotičkih faktora na stabilnost MOMA kod lesnih cijanobakterija .....	104
4.1.3. Prisustvo metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama.....	106
4.1.3.1. Prisustvo MOSA u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama.....	106
4.1.3.2. Prisustvo MOMA u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama.....	107
4.1.4. LC-MS(/MS) analiza scitonemina analiziranih cijanobakterija NSCCC .....	109
4.1.5. Statistička analiza interakcije sredinskih faktora na produkciju pigmenata.....	115
4.1.5.1. AMMI model interakcije sredinskih faktora na produkciju MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC .....	115
4.1.5.2. AMMI model interakcije sredinskih faktora na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC .....	117
4.1.5.3. Komparativna analiza produkcije MOSA i MOMA korišćenjem AMMI modela .....	119
4.1.5.4. Produkcija fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC.....	120
4.2. Toksičnost i produkcija cijanotoksina lesnih cijanobakterija i procena stabilnosti mikrocistina.....	121
4.2.1. Toksičnost određena u <i>Artemia salina</i> bioeseju .....	121
4.2.2. Koncentracije cijanotoksina određene ELISA testom.....	122
4.2.3. Koncentracije cijanotoksina određene LC-MS(/MS) i HPLC metodom.....	122
4.2.4. Stabilnost mikrocistina nakon testa biodegradabilnosti .....	122
<b>5. D I S K U S I J A .....</b>	<b>124</b>
5.1. Fikobilini kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji .....	125
5.2. Zaštitni pigmenti cijanobakterija kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji.....	127
5.2.1. Komparativna analiza sadržaja metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance u vodenim, zemljišnim i lesnim cijanobakterijama.....	127
5.2.2. Komparativna analiza sadržaja metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama .....	132
5.2.3. Mogućnost primene metabolita u opsegu scitonemin apsorbance kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji .....	133
5.2.4. Mogućnost primene metabolita u opsegu mikosporin apsorbance kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji .....	136
5.3. Cijanotoksini kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji .....	140
5.3.1. Produkcija cijanotoksina u biološkim pokoricama.....	140
5.3.2. Stabilnost toksina cijanobakterija .....	143

5.3.3. Potencijalni putevi ekspozicije cijanotoksinima u lesnim sredinama .....	146
5.3.4. Mogućnost primene cijanotoksina kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji .....	148
5.4. Paleoklimatska rekonstrukcija na bazi biomarkera cijanobakterija .....	149
5.5. Predlozi za poboljšanje istraživanja u budućnosti.....	157
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>160</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>164</b>

---



## LISTA ILUSTRACIJA I GRAFIKONA U TEKSTU

---

<b>Slika 1.</b> Struktura cijanotoksina mikrocistina-LR	14
<b>Slika 2.</b> Struktura cijanotoksina cilindrospermopsina	15
<b>Slika 3.</b> Struktura cijanotoksina saksitoksina	17
<b>Slika 4.</b> Biološke lesne pokorice u Vojvodini (ciglana u Rumi)	20
<b>Slika 5.</b> Sloj polisaharida izlučen od strane cijanobakterija biološke lesne pokorice	21
<b>Slika 6.</b> Izolovane cijanobakterije iz BLC sa različitih lokaliteta Vojvodine - suvi uzorci BLC (a, c, e) sa odgovarajućim vlažnim fazama (b, d, f)	22
<b>Slika 7.</b> Model uticaja biološke lesne pokorice na proces formiranja lesa (BLOCDUST model - <i>Biological LOess Crusts DUS</i> t Trapping model)	23
<b>Slika 8.</b> Deo Novosadske kolekcije kulture cijanobakterija (NSCCC)	34
<b>Grafikon 1.</b> Analizirani rodovi cijanobakterija NSCCC	38
<b>Slika 9.</b> Analizirani uzorci lesa i bioloških lesnih pokorica: A-lesni uzorci (LES T1-T25, redom); B-biološke lesne pokorice: a) BLC 1; b) BLC 2; c) BLC 3; d) BLC 4	40
<b>Slika 10.</b> Bakterijski sojevi korišćeni u testu biodegradabilnosti	46
<b>Slika 11.</b> Postupak iscrpljivanja	46
<b>Slika 12.</b> Ekstrakcija fikobilina zemljišnih cijanobakterija NSCCC	48
<b>Šema 1.</b> Šematski prikaz sprovedenih metoda za detekciju toksičnosti i produkciju cijanotoksina	53
<b>Slika 13.</b> Kultivacija <i>A. salina</i> u termostatu na 28 °C i <i>A. salina</i> u kontroli: ASW + račići	55
<b>Slika 14.</b> Očitavanje apsorbance na 450 nm pomoću čitača mikrotitar ploča	57
<b>Grafikon 2.</b> Standardna kriva za mikrocistin u ELISA testu	58
<b>Slika 15.</b> Dodavanje stop rastvora u velove mikrotitar ploče	59
<b>Grafikon 3.</b> Standardna kriva za cilindrospermopsin u ELISA testu	59
<b>Grafikon 4.</b> Standardna kriva za saksitoksin u ELISA testu	60
<b>Grafikon 5.</b> Standardna kriva za mikrocistin dobijena u ELISA testu	67
<b>Grafikon 6.</b> Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija	71
<b>Grafikon 7.</b> Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija	72

<b>Grafikon 8.</b> Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija	<b>73</b>
<b>Grafikon 9.</b> Uticaj sastava podloge i pH vrednosti na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija	<b>75</b>
<b>Grafikon 10.</b> Uticaj sastava podloge i temperaturnih vrednosti gajenja na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija	<b>76</b>
<b>Grafikon 11.</b> Uticaj sastava podloge i izvora svetlosti na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija	<b>77</b>
<b>Grafikon 12.</b> Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na produkciju MOSA	<b>78</b>
<b>Grafikon 13.</b> Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija	<b>79</b>
<b>Grafikon 14.</b> Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija	<b>80</b>
<b>Grafikon 15.</b> Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija	<b>82</b>
<b>Grafikon 16.</b> Uticaj sastava podloge i pH vrednosti podloge na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija	<b>83</b>
<b>Grafikon 17.</b> Uticaj sastava podloge i temperaturnih vrednosti gajenja na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija	<b>84</b>
<b>Grafikon 18.</b> Uticaj sastava podloge i izvora svetlosti na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija	<b>85</b>
<b>Grafikon 19.</b> Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na produkciju MOMA	<b>86</b>
<b>Grafikon 20.</b> Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOSA	<b>87</b>
<b>Grafikon 21.</b> Uticaj temperature podloge na stabilnost MOSA	<b>88</b>
<b>Grafikon 22.</b> Stabilnost MOSA u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h)	<b>89</b>
<b>Grafikon 23.</b> Uticaj razlicitog perioda izlaganja UV zracenju (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na stabilnost MOSA	<b>90</b>
<b>Grafikon 24.</b> Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOMA	<b>91</b>
<b>Grafikon 25.</b> Uticaj temperature podloge na stabilnost MOMA	<b>92</b>
<b>Grafikon 26.</b> Stabilnost MOMA u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24	<b>93</b>

h, 36 h, 60 h)

<b>Grafikon 27.</b> Uticaj različitog perioda izlaganja UV zračenju (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na stabilnost MOMA	<b>94</b>
<b>Grafikon 28.</b> Produkcija fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC	<b>95</b>
<b>Grafikon 29.</b> Produkcija MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC	<b>96</b>
<b>Grafikon 30.</b> Produkcija MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC	<b>97</b>
<b>Grafikon 31.</b> Sadržaj fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h)	<b>98</b>
<b>Grafikon 32.</b> Biodegradacija fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) bakterijama: A) bakterijski soj 1, B) bakterijski soj 2 i C) bakterijski soj 3	<b>99</b>
<b>Grafikon 33.</b> Biodegradacija fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda (24 h, 36 h, 60 h) u kontrolnim uslovima i nakon ekspozicije bakterijskim sojevima	<b>101</b>
<b>Grafikon 34.</b> Apsorbanca MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h)	<b>102</b>
<b>Grafikon 35.</b> Biodegradacija MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) bakterijama: A) bakterijski soj 1, B) bakterijski soj 2 i C) bakterijski soj 3	<b>103</b>
<b>Grafikon 36.</b> Sadržaj MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h)	<b>104</b>
<b>Grafikon 37.</b> Biodegradacija MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) bakterijama: A) bakterijski soj 1, B) bakterijski soj 2 i C) bakterijski soj 3	<b>105</b>
<b>Grafikon 38.</b> Sadržaj MOSA u uzorcima lesa	<b>106</b>
<b>Grafikon 39.</b> Sadržaj MOSA u BLC	<b>107</b>
<b>Grafikon 40.</b> Sadržaj MOMA u uzorcima lesa	<b>108</b>
<b>Grafikon 41.</b> Sadržaj MOMA u BLC	<b>108</b>
<b>Grafikon 42.</b> LC-MS(/MS) hromatogram standarda scitonemina	<b>109</b>
<b>Grafikon 43.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz zemljišnog soja cijanobakterija NSCCC T4 ( <i>Nostoc</i> sp.)	<b>110</b>
<b>Grafikon 44.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L2 ( <i>Tolypothrix</i> sp., <i>Oculatella</i> sp.)	<b>110</b>

<b>Grafikon 45.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L3 ( <i>Chroococcus</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp., <i>Synechococcus</i> sp.)	<b>111</b>
<b>Grafikon 46.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L4 ( <i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.)	<b>111</b>
<b>Grafikon 47.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L6 ( <i>Nostoc</i> sp., <i>Anathece</i> sp.)	<b>112</b>
<b>Grafikon 48.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L12 ( <i>Nostoc</i> sp.)	<b>112</b>
<b>Grafikon 49.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L15 ( <i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.)	<b>113</b>
<b>Grafikon 50.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L16 ( <i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.)	<b>113</b>
<b>Grafikon 51.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L18 ( <i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.)	<b>114</b>
<b>Grafikon 52.</b> LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L19 ( <i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp., <i>Lyngbya</i> sp.)	<b>114</b>
<b>Grafikon 53.</b> AMMI1 grafikon sadržaja MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kultivacijom u različitim sredinskim uslovima, zavisno od sadržaja azota	<b>116</b>
<b>Grafikon 54.</b> AMMI2 biplot vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kroz različite sredinske uslove u produkciji MOSA	<b>117</b>
<b>Grafikon 55.</b> AMMI1 grafikon sadržaja MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kultivacijom u različitim sredinskim uslovima, zavisno od sadržaja azota	<b>118</b>
<b>Grafikon 56.</b> AMMI2 biplot vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kroz različite sredinske uslove u produkciji MOMA	<b>119</b>
<b>Grafikon 57.</b> Produkcija MOSA i MOMA kod posmatranih vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC zavisno od tretmana	<b>120</b>
<b>Grafikon 58.</b> PCA analiza produkcije fikobilina, MOSA i MOMA kod analiziranih lesnih cijanobakterija NSCCC	<b>121</b>
<b>Grafikon 59.</b> Biodegradacija mikrocistina izolovanog iz <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h) bakterijskim sojevima 1, 2 i 3	<b>123</b>
<b>Grafikon 60.</b> a) Rodovi cijanobakterija unutar sojeva sa sposobnošću produkcije MOSA, b) Rodovi cijanobakterija unutar mešanih kultura sa sposobnošću produkcije MOSA	<b>128</b>

**Grafikon 61.** a) Rodovi cijanobakterija unutar sojeva sa sposobnošću produkcije MOMA, b) Rodovi cijanobakterija unutar mešanih kultura sa sposobnošću produkcije MOMA

---

**128**

## LISTA TABELA U TEKSTU

---

<b>Tabela 1.</b> Glavne strukturne i toksikološke karakteristike cijanotoksina.....	<b>12</b>
<b>Tabela 2.</b> Šifre svih analiziranih cijanobakterija NSCCC sa poreklom i morfološkom pripadnošću.....	<b>35</b>
<b>Tabela 3.</b> Sastav podloge BG11-N.....	<b>39</b>
<b>Tabela 4.</b> Šifre analiziranih uzoraka lesa i bioloških lesnih pokorica sa poreklom.....	<b>40</b>
<b>Tabela 5.</b> Sastav podloge ASW za gajenje račića <i>Artemia salina</i> .....	<b>55</b>
<b>Tabela 6.</b> Joni prekursori i tranzicija u jon.....	<b>65</b>

---

## LISTA SKRAĆENICA

---

<b>AEG</b>	N-(2-amino-etil) glicin
<b>ALS</b>	Amiotrofična lateralna skleroza
<b>AMMI model</b>	Aditivni glavni efekti i multiplikativni interakcija (eng. <i>Additive main effects and multiplicative interaction</i> )
<b>ANOVA</b>	One-way analysis of variance
<b>APC</b>	Alofikocijanin
<b>ASW</b>	Veštačka morska voda (eng. <i>Artificial Sea Water</i> )
<b>BCS</b>	Površine sa biološkom pokoricom (eng. <i>Biologically Crusted Surfaces</i> )
<b>BLC</b>	Biološke lesne pokorice
<b>BLOCDUST model</b>	<i>Biological Loess Crusts Dust Trapping</i> model
<b>BMAA</b>	$\beta$ -metilamino-L-alanin
<b>BSC</b>	Biološke zemljišne pokorice (eng. <i>Biological Soil Crusts</i> )
<b>CYN</b>	Cilindropermopsin
<b>DAB</b>	2,4-diaminobuterna kiselina
<b>DNK</b>	Dezoksi-ribonukleinska kiselina
<b>DTD</b>	Dunav-Tisa-Dunav
<b>ELISA</b>	Enzimski imuno-vezujući test (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>HPLC</b>	Tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>LC-MS(MS)</b>	Tečna hromatografija-masena spektrometrija (eng. <i>Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection methods</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisaharidni endotoksini
<b>MC-LR</b>	Mikrocistin-LR (leucin arginin)
<b>MC</b>	Microcistini
<b>MOMA</b>	Metaboli u Opsegu Mikosporin Apsorbance
<b>MOSA</b>	Metaboli u Opsegu Scitonemin Apsorbance
<b>NSCCC</b>	Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija
<b>PC</b>	Fikocijanin
<b>PCA analiza</b>	Analiza glavnih komponenti (eng. <i>Principal Components Analysis</i> )
<b>PCC</b>	Pasterova kolekcija kultura (Pasteur Culture Collection)
<b>PE</b>	Fikoeritrin
<b>PP1; PP2A</b>	Protein fosfataza 1; protein fosfataza 2A
<b>s.t.</b>	Suve težine
<b>STX</b>	Saksitoksini
<b>SZO</b>	Svetska zdravstvena organizacija
<b>UV</b>	Ultraljubičasto zračenje

---

## **Predgovor**

*Cijanobakterije su kosmopolitski organizmi lako prilagodljivi svim uslovima koje pruža okolina. Prisutne su svuda, u vodi, zemljištu, vazduhu. Njihovom primarnom sredinom se smatra voda i većina sprovedenih studija i studija koje se sprovode uključuju analize vodenih ekosistema. Značaj cijanobakterija u terestričnim sredinama je od nedavno prepoznat.*

*Tokom nekoliko poslednjih decenija, naučnici su sakupili veliki broj fosilnih primeraka koji ukazuju na postojanje cijanobakterija nekoliko milijardi godina unazad. Takvi podaci govore da cijanobakterije imaju dobre fiziološke mehanizme i izuzetnu sposobnost adaptacije, jer su se uspešno oduprle intenzivnim klimatskim promenama tokom geološke istorije uključujući UV svetlost, visoku solarnu radijaciju i visoke temperature, sušu, nedostatak i višak nutrijenata. Cijanobakterije sintetisu sekundarne metabolite kao odgovor na oštre faktore životne sredine, a takođe i u suprotstavljanju drugim organizmima. Zahvaljujući sposobnosti da prelaze između dva osnovna stanja metabolizma, primarnog i sekundarnog, cijanobakterije karakteriše ogroman broj metabolita koji funkcionišu unutar ili van ćelije, s ciljem opstanka same ćelije. Usled specifičnosti sekundarnog metabolizma, u velikoj meri uslovljenom varijabilnim faktorima životne sredine, cijanobakterije predstavljaju značajne proizvođače biološki aktivnih jedinjenja, koji ukoliko su stabilni, mogu služiti kao njihovi biomarkeri. Metaboliti kojima treba posvetiti poseban značaj su pigmenti i cijanotoksini.*

*Cijanobakterije se smatraju pionirskim organizmima u nepristupačnim, pogoršanim i novoformiranim ogođenim sredinama. U ovim okruženjima formiraju specifične zajednice nazvane biološke pokorice. Biološke pokorice se formiraju na samom površinskom sloju zemljišta. Pored živih organizama, biološke pokorice čine i mineralne čestice, čime se formira jaka i stabilna zaštita koja sprečava eolsku i pluvijalnu eroziju. Cijanobakterije unutar bioloških pokorica značajno utiču na proces formiranja sedimentih formacija. Sam mehanizam hvatanja i akumulacije čestica predstavljen je unutar BLOCDUST hipoteze o biogenom poreklu lesnog sedimenta u polu-sušnim sredinama. Usled nedostataka tradicionalno korišćenih metoda kao indikatora u paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa postoji neophodnost uvođenja novog pristupa u analizama lesa i za otkrićem novih indikator-organizama/organskih molekula koji ostaju očuvani u uslovima jakog sunčevog i UV zračenja, isušivanja, rehidratacije ili jakih vazdušnih strujanja. Potencijal cijanobakterijskih sekundarnih metabolita i terestričnih cijanobakterija do sada nije u potpunosti procenjen. Rezultati doktorske disertacije ukazuju na veliki potencijal cijanobakterija i njihovih sekundarnih metabolita kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Razvoj novih, kvalitativnih paleoklimatskih pokazatelja može inicirati novu eru lesnih istraživanja u narednoj deceniji. Istraživanje terestričnih sedimentnih arhiva prošlosti je imperativ u razumevanju budućeg uticaja klimatskih i ekoloških promena.*

*U Novom Sadu, 2017.*

*Dijana Pantelić*



# **1. U V O D**

## 1.1. Cijanobakterije - značaj i osnovne karakteristike

Od svih do sada poznatih oblika života, najzastupljeniji organizmi su prokarioti kako u vremenu tako i u prostoru. Prokarioti su bili prvi organizmi koji su se pojavili na Zemlji. Ova grupa organizama ima najšire granice tolerancije faktora životne sredine i najširu varijabilnost metaboličkih strategija, što im obezbeđuje mogućnost zauzimanja svih poznatih ekoloških niša. Osim toga, oni su bili dominantan oblik života u skoro 70% celokupnog geološkog vremena, o čemu svedoče brojni biozapisi u vidu stromatolita, onkolita, mikrofosila i biomolekula (Herrero i Flores, 2008). Zbog toga se smatra da su prokarioti vrlo bitni za izučavanje celokupnog života, odnosno svih bioloških procesa na Zemlji.

Među prokariotima posebno su specifične cijanobakterije (*Cyanobacteria*, *Cyanophyta*). Cijanobakterije se smatraju pionirima na Zemlji (Brock, 1973; Schopf, 1996), čiji nađeni fosilni ostaci (stromatoliti) datiraju iz vremena prekambrijuma. Pretpostavlja se da su stromatoliti, a time i cijanobakterije, u to doba zauzimale veoma značajno mesto u vodenim ekosistemima. Cijanobakterije upadljivo slične današnjim predstavnicima su pronađene fosilizovane u sedimentnim stenama starim 3,5 milijardi godina (Schopf i Walter, 1982). Stromatoliti fosilizovanih cijanobakterija svedoče da su cijanobakterije transformisale atmosferu u ranoj istoriji Zemlje pre 2,8 milijardi godina (Olson, 2006) i omogućile razvoj aerobnih organizama (Rasmussen i sar., 2008). Proterozoik, period od pre 2,5 do 2 milijarde godina, se naziva još i doba *Cyanobacteria*, jer su upravo u tom periodu pokazale najveću dominaciju (Schopf i Walter, 1982). Cijanobakterije se smatraju evolutivno najuspešnijim mikroorganizmima na Zemlji (Hedges i sar., 2001). Zahvaljujući sposobnosti da vrše proces azotofiksacije cijanobakterije se mogu razvijati i u uslovima siromašnim azotom (Bergman i sar., 1997; Chorus i Bartram, 1999).

Cijanobakterije predstavljaju najvažnije činioce mikrobijalne zajednice u vodenim ekosistemima, kolonizuju terestrične (zemljišne, pustinjske, lesne, stenovite, itd.) ekosisteme i osvajaju nova staništa nastala vulkanskim aktivnostima kao pionirski organizmi (Gomez-Alvarez i sar., 2007). Održanje mikrofitnih zajednica u gornjoj površini tla obezbeđuje početni materijal za proizvodnju ostalih komponenti tla (Shields i Drouet, 1962). Cijanobakterije takođe formiraju simbiotski odnos sa gljivama u lišajevima nakon što, kao prvi kolonizatori, stabilizuju površinu zemljišta i omoguće integrisanje ostalih članova mikrobiološke zajednice (Ferran i sar., 2001).

Iako na Zemlji postoje više od tri milijarde godina, posmatrano kroz prizmu evolucije, cijanobakterije su do danas zadržale niz primitivnih karakteristika, kao što su morfološka i citološka građa, tip ćelijske organizacije i odsustvo polnog načina razmnožavanja, što ih svrstava u prokariote (Fogg i sar., 1973; Wolk, 1980). Brojni su nazivi u upotrebi, kao što su *Cyanobacteria* (Holt i sar., 2001), *Cyanophyta* (Lewin, 1979), *Cyanobacteriophyta* (Blaženčić, 1997), *Cyanoprocaryota* (Komarek i Anagnostidis, 1998). Grupisane su kao pripadnici algi zbog prisustva oksigene fotosinteze (*Cyanophyta*) (Vaccari i sar., 2005), ali posedovanje tipične bakterijske građe ih svrstava u grupu prokariotskog carstva (*Cyanobacteria*) (Stanier i sar., 1978). U Berdževom ključu iz 1994. godine klasifikovane su u XI bakterijsku grupu nazvanu oksigene fototrofne bakterije (Holt i sar., 1994), a po trenutno važećoj klasifikaciji prema Berdžeu iz 2015. godine (Castenholz, 2015), pripadaju X razdelu *Eubacteria* pod nazivom *Cyanobacteria*. Razdeo *Cyanobacteria* obuhvata oko 150 rodova sa preko 2000 poznatih vrsta.

U pogledu morfološke organizacije, među cijanobakterijama se nalaze predstavnici na jednoćelijskom, kolonijalnom i trihalnom (filamentoznom) stupnju (Chorus i Bartram, 1999; Blaženčić, 2000). Neke filamentozne cijanobakterije pokazuju sposobnost diferencijacije u tri različita ćelijska tipa: vegetativne ćelije - fotosintetske ćelije formirane u optimalnim uslovima rasta; rezistentne spore - formiraju se promenom uslova sredine sa funkcijom preživljavanja nepovoljnih uslova sredine; i heterociste - mesta enzimske aktivnosti nitrogenaze, koja katališe prelazak azota u amonijak (Lee, 1999; Simeunović, 2005; Svirčev, 2005).

Ćelijski zid cijanobakterija je sličan ćelijskom zidu Gram negativnih bakterija koja se sastoji iz tri sloja: spoljašnje membrane, peptidoglikanskog sloja i citoplazmatske membrane (Whitton i Potts, 2000), ali je peptidoglikanski sloj kod cijanobakterija znatno deblji nego kod većine Gram negativnih bakterija (Hoiczuk i Hansel, 2000). Cijanobakterije su fotoautotrofni organizmi, ali poseduju i sposobnost da se hrane i ftoheterotrofno, autoheterotrofno, heteroautotrofno i heterotrofno (Metcalf i Codd, 2004). Jednoćelijske, filamentozne i kolonijalne cijanobakterije se razmnožavaju prostom deobom ćelije. Posle ćelijske deobe, kćerke ćelije se kod kolonijalnih oblika ne rastavljaju nego ostaju spojene gradeći grupacije ćelija različitog oblika. Filamentozne cijanobakterije mogu da se razmnožavaju i hormogonijama, koje nastaju razdeljivanjem končastog talusa na fragmente (Blaženčić, 2007). Kod cijanobakterija nije poznat polni proces niti bespolno razmnožavanje zoosporama (Blaženčić, 2007).

Cijanobakterije predstavljaju ekološki veoma raznovrsnu grupu prokariotskih fotosintetskih mikroorganizama (Schopf i Walter, 1982). To su eurivalentni kosmopolitski organizmi, sa širokom valencom prostiranja i mogu se naći na najrazličitijim mestima koja se odlikuju velikim fluktuacijama temperature, pH vrednosti, inteziteta i kvaliteta svetlosti (Karnieli i sar., 1999) što im obezbeđuje kompetativnu prednost (Chorus i Bartram, 1999; Funari i Testai, 2008). Naseljavaju skoro sve tipove staništa od vodenih, terestričnih, pa do sredina u kojima vladaju ekstremni uslovi, od Arktičkih i Antarktičkih (-83 °C) regiona do tropskih (Ressom i sar., 1994; Garcia-Pichel i sar., 1998; Papke i sar., 2003; Comte i sar., 2007). Takođe ih ima u mračnim pećinama, dubokim vodama i vulkanskom zemljištu (Whitton, 1973; Dor i Danin, 1996; Gerasimenko i sar., 2013). Preživljavanje u sredinama u kojima vladaju ekstremni uslovi najcesce se objašnjava karakteristikom njihove citoplazme da izuzetno sporo koaguliše (Madigan i Martinko, 2006), a sluzavi omotač, koji većina vrsta poseduje, štiti ih od isušivanja i od jakog sunčevog zračenja (Metcalf i Codd, 2004; Petrović i sar., 2007).

Cijanobakterije predstavljaju genetički raznoliku grupu mikroorganizama i samim tim odlikuju se mnoštvom specifičnih ekoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika, što im omogućava da prirodnim putem produkuju širok spektar sekundarnih metabolita (Richmond, 1985; Gantar, 1985; Ciferri i sar., 1989; Borowitzka, 1999; Del Campo i sar., 2002; Singh i sar., 2003). Iz tih razloga izuzetno su perspektivni organizmi za biotehnologiju (farmacija, medicina, prehrambena industrija, kozmetička industrija, fluorescentna mikroskopija, itd.). Iako nedovoljno istražene u terestričnim ekosistemima, cijanobakterije kao producenti sekundarnih metabolita - biomarkera sve više postaju fokus i u paleoklimatskoj rekonstrukciji.

## 1.2. Sekundarni metaboliti cijanobakterija

Primarni metaboliti direktno učestvuju u optimalnom rastu, razvoju i reprodukciji ćelije (Oliver i sar., 1998; Griffin i Vidal-Puig, 2008) i bez njih je nemoguće odvijanje životnih funkcija. Sekundarni metabolizam obuhvata raznovrsne procese kojima se energija troši za sintezu jedinjenja čija je funkcija u većini slučajeva nedovoljno razjašnjena, ali se pretpostavlja da igraju važnu ulogu u obezbeđivanju odbrambenog mehanizma protiv stresa, u hemijskoj odbrani i komunikaciji, kao i u regulaciji razvića organizma. Prisustvo regulatornog mehanizma povezanog sa proizvodnjom sekundarnih metabolita ukazuje da je razvoj ovih supstanci baziran

na njihovoj sposobnosti da doprinose opstanku ćelije (Vining, 1992), omogućavajući organizmima koji ih produkuju kompetitivnu prednost u odnosu na druge vrste.

U sekundarne metabolite cijanobakterija spadaju pigmenti, cijanotoksini, antioksidativna jedinjenja i drugi važni produkti metabolizma koji mogu imati široku komercijalnu primenu. Sinteza sekundarnih metabolita nije povezana sa fazama rasta, već se sintetišu u nepovoljnim uslovima, a karakterišu se visokom kompleksnošću biosintetskih puteva koji su višefazni i uključuju velik broj multienzimskih sistema i regulatora istih (Mandal i Rath, 2014). Koordinisana ekspresija gena ovih jedinjenja determinisana je brojnim unutrašnjim faktorima, u korelaciji sa faktorima spoljašnje sredine, a varira u zavisnosti od stadijuma razvića određenog organizma. Za razliku od primarnih metabolita, odsustvo sekundarnih metabolita ne dovodi do trenutne smrti, nego do dugotrajnog pogoršanja sposobnosti preživljavanja organizma. Zahvaljujući produkciji specifičnih sekundarnih metabolita, cijanobakterije zauzimaju ekološke niše okarakterisane ekstremnim uslovima, koje su nepristupačne većini drugih organizama (Karnieli i sar., 1999; Rastogi i Sinha, 2009; Ferroni i sar., 2010; Yadav i sar., 2011).

Postoje značajni dokazi da neki odgovori na stres dovode do ekspresije gena za sintezu sekundarnih metabolita (Mandal i Rath, 2014). Menjajući parametre tokom kultivacije, uvođenjem stresnih sredinskih faktora i izazivanjem odgovora na stres moguće je istraživati potencijal sekundarnih metabolita različitih sojeva cijanobakterija. Eksploatacija ovako biološki bogate grupe mikroorganizama je važna za dobijanje odgovora u biotehnološkim istraživanjima, u polju medicine, farmacije i geoloških istraživanja. U cilju pružanja novog pristupa u paleoklimatskoj rekonstrukciji vrši se procena potencijalne upotrebe sekundarnih metabolita cijanobakterija - specifičnih pigmenata i cijanotoksina kao biomarkera.

### **1.2.1. Pigmenti cijanobakterija**

Pigmentni sastav cijanobakterija čine tri klase fotosintetskih pigmenata: hlorofil *a*, karotenoidi i fikobilini, kao i zaštitni pigmenti: scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline (Michaelian, 2012; Michaelian i Simeonov, 2015). Poslednjih godina posebna pažnja se posvećuje pigmentima cijanobakterija nastalim tokom sekundarnog metabolizma, sekretovanih unutar ćelija ili izlučenih u okolnu sredinu, jer se smatra da imaju bitnu ulogu u opstanku cijanobakterija tokom geološke istorije.

Kako su fikobilini, scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline karakteristični za cijanobakterije, mogu se smatrati njihovim grupnim taksonomskim ključem (Komarek i sar., 1999; Palinska i sar., 2011; Rastogi i sar., 2014).

### 1.2.1.1. Pomoćni fotosintetički pigmenti - fikobilini

Cijanobakterije vrše proces oksigene fotosinteze koristeći fotosisteme I i II. Hlorofil *a* je zajedno sa karotenoidima smešten u membranama tilakoida (Blaženčić, 2000), dok se na njihovoj površini nalaze veliki hidrofilni proteinski kompleksi - fikobilizomi (Jensen, 1993; Lee, 1999; Patel i sar., 2004). Fikobilizomi u sebi sadrže fikobilinske pigmente vezane za proteine i služe za prikupljanje svetlosti potrebne za normalno funkcionisanje ćelija cijanobakterija (Glazer, 1988; Sidler, 1994; Whitton i Potts, 2002). Fikobilini su važna grupa cijanobakterijskih metabolita koji su jedinstveni među fotosintetičkim pigmentima jer su kovalentno vezani za fikobiliproteine (Cohen-Bazire i Bryant, 1982). Javljaju se kod samo tri grupe algi: cijanobakterija, *Rhodophyta* i *Cryptophyceae* (Grossman i sar., 1994). U vodi su rastvorljivi fluorescirajući proteini koji imaju ulogu pomoćnih - antena pigmenata, čija je uloga u apsorbovanju onog dela svetlosne energije (500-600 nm) koju ne apsorbuju hlorofili (Suter i Holzwarth, 1987; Grossman i sar., 1994). Ovo je njihova najvažnija uloga jer u uslovima manje ili veće zasenjenosti (na staništima van vode) ili u uslovima smanjenog intenziteta i kvalitativno izmenjene svetlosti (npr. dublji slojevi vode) organizmi koji ih poseduju uspešno opstaju (Suter i Holzwarth, 1987; MacColl, 1998).

Fikobiline čine tri glavne grupe: fikoeritrin, alofikocijanin i fikocijanin. Svaki fikobilizom se sastoji od jezgra u kom je alofikocijanin i od nekoliko spoljno orijentisanih nizova sačinjenih od mnoštva diskova fikocijanina i fikoeritrina. Fikobilini imaju specifični apsorpcioni i emisioni maksimum fluorescencije u okviru vidljivog dela spektra svetlosti. Stoga, njihovo prisustvo i određeni raspored unutar fikobilizoma omogućava apsorpciju i jednosmerni transfer svetlosne energije do hlorofila *a*. Sve cijanobakterije i crvene alge sadrže alofikocijanin i fikocijanin, dok neke vrste ovih grupa sadrže i fikoeritrin (Hoffmann i sar., 1990). Iako je fikocijanin glavni fikobilin kod većine cijanobakterija, fikoeritrin i alofikocijanin se takođe mogu nalaziti u značajnim količinama.

### 1.2.1.2. UV zaštitni pigmenti - scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline

Usled antropogenih emisija gasova u atmosferu nivo oštećenja ozonskog omotača se povećava, što će u budućnosti biti još intenzivnije usled globalnog zagrevanja. Na taj način su organizmi na Zemlji izloženi povećanom nivou UV zračenja što ima za posledicu mnogobrojne direktne i indirektno negativne efekte. Na nivou cijanobakterijske ćelije javljaju se oštećenja proteina, DNK i enzima uključenih u metabolizam azota i CO<sub>2</sub> fiksaciju, promene u rastu, pigmentaciji, diferencijaciji, foto-orijentaciji i pokretljivosti ćelija, a dolazi i do produkcije većeg broja reaktivnih kiseoničnih grupa (Donkor i Häder, 1996, 1997; Ehling-Shulz i Scherer, 1999; He i Häder, 2002; Balskus i Walsh, 2008). U cilju „popravke“ nastalih oštećenja, ćelija troši puno energije što opterećuje metabolizam cijanobakterija, te se pokazalo da one u takvim uslovima rastu sporije i ređe se dele u odnosu na organizme koji su pod manjim UV stresom (Garcia-Pichel i sar., 1993; Ehling-Shulz i sar., 1997). U popravci DNK oštećenja izazvanih UV zračenjem (Levine i Thiel, 1987; Sinha i Häder, 2002; Häder i Sinha, 2005) cijanobakterije imaju metaboličke strategije koje podrazumevaju akumulaciju karotenoida, prisustvo antioksidanata i enzima za detoksikaciju (Mittler i Tel-Or, 1991), kretanje od svetlosti (Richardson i Castenholz, 1987; Quesada i Vincent, 1997; Ehling-Shulz i Scherer, 1999) i sintezu UV zaštitnih supstanci (Scherer i sar., 1988; Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Sinha i sar., 1998; Oren i Gunde-Cimerman, 2007). Jedan tip ovih UV zaštitnih supstanci je ekstracelularni pigment scitonemin (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Castenholz, 1997; Sinha i sar., 1998; Oren i Gunde-Cimerman, 2007; Sinha i sar., 2008), a drugi tip jedinjenja uključuje mikosporinu slične aminokiseline (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Häder i sar., 2007; Singh i sar., 2008a). Kod nekih cijanobakterija se pojačan intenzitet svetlosti izbegava promenom nivoa u vodenom stubu (Garcia-Pichel i sar., 1994; Ehling-Shulz i Scherer, 1999), dok druge vrste mogu da odgovore na dugoročne promene svetlosnog intenziteta samo produkcijom scitonemina i mikosporina.

Biosinteza scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina je nedavno razjašnjena, pružajući detaljnije primere o fascinantnim prirodnim biohemijskim produktima cijanobakterija. Oni pripadaju familiji stresom indukovanih metabolita, čija se uloga ogleda pre svega u obezbeđivanju rasta cijanobakterija i omogućavanju opstanka u sredinama izloženim jakim zračenju. Smatra se da su upravo ove supstance zaslužne za preživljavanje cijanobakterija tokom razvoja naše planete (Michaelian, 2012).

### ➤ *Scytonemin*

Godine 1849. kod terestričnih cijanobakterija je prvi put pronađen UV apsorbujući pigment, kasnije nazvan scytonemin (Balskus i Walsh, 2008). Njegova struktura je ostala nejasna do 1993. godine (Proteau i sar., 1993). Stukturno je dimer indolne i fenolne subjedinice, molekularne težine 544 Da. Scytonemin je egzopolisaharidni pigment karakterističan za cijanobakterije (Proteau i sar., 1993; Ehling-Schulz i sar., 1997; Leavitt i sar., 1997; Garcia-Pichel, 1998; Dillon i Castenholz, 1999; Ehling-Schulz i Scherer, 1999; Wynn-Williams i sar., 1999). Pigment može predstavljati i do 5% suve materije cijanobakterija u kultivisanim organizmima, a može se akumulirati u visokim koncentracijama i u prirodnim sredinama (Karsten i sar., 1998). Zbog velike količine scytonemina u ćelijama, smatra se da je ovaj pigment evoluirao rano u istoriji cijanobakterija. Ova adaptacija je dozvolila cijanobakterijama da se rasprostiru i naseljavaju plitke vode i terestrična staništa gde je izloženost UV zracima intenzivnija (Sinha i sar., 2001).

Scytonemin se akumulira unutar ekstracelularnog omotača ili sluzi koju stvara organizam, formirajući stabilan, zaštitni sloj koji apsorbuje čak 90% štetnog zračenja ( $\lambda=384$  nm) (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Sinha i sar., 1998).

Nakon izloženosti cijanobakterijske ćelije UV-A zračenju dolazi do produkcije monomera triptofana i hidroksi-fenil-piruvata. Triptofan konverzijom prelazi u 3-indol piruvat koji se spaja sa hidroksi-fenil-piruvatom i nastaje međuprodukt - trociklični keton. Ovi početni stadijumi u biosintezi scytonemina se dešavaju u citoplazmi uz obavezno prisustvo enzima ScyA, ScyB, ScyC i NpR1259 (Babu i sar., 2014). Pomoću periplazmatičnih enzima ScyD, ScyE, ScyF, DsbA i TyrP nastaje redukovana forma scytonemina (Babu i sar., 2014). Tokom sekrecije redukovane forme scytonemina u ekstracelularni matriks dolazi do autooksidacije scytonemina čime on poprima žuto-braon boju, odnosno nastaje krajnji produkt - pigment scytonemin (Ehling-Schulz i Scherer, 1999). Kada se na površini ćelije akumuliraju dovoljne količine scytonemina to predstavlja signal ćeliji da stopira njegovu dalju sintezu. UV-apsorbujuća sposobnost ovog pigmenta je bazirana na njegovoj hemijskoj strukturi, jer je scytonemin simetričan indol alkaloid koji se sastoji od spojenih heterocikličnih jedinica (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991).

Do sada je poznato da oko 300 vrsta cijanobakterija proizvodi scytonemin, uključujući vrste rodova *Nostoc*, *Calothrix*, *Chlorogloeopsis*, *Lyngbya*, *Chroococcidiopsis*, itd. (Garcia-



Pichel i Castenholz, 1991; Lange i sar., 1992; Büdel i sar., 1997; Sinha i sar., 1998; Oren i Gunde-Cimerman, 2007; Sinha i Häder, 2008). Ovaj broj se progresivno menja, usled intenzivnijih naučnih studija. Utvrđeno je da je sadržaj scitonemina veći kod cijanobakterija koje žive u biotopima izloženim direktnom sunčevom zračenju (Dillon i Castenholz, 2003; Sinha i Häder, 2008; Balskus i sar., 2011), kao što su npr. *Asterocapsa*, koja raste na krovovima ili spomenicima, *Gloeocapsa* i *Porphyrosiphon*, koje rastu na stablima ili *Petalonema*, koja raste na izloženim vlažnim stenama, itd. (Mishra i sar., 2015). Uglavnom, visoka koncentracija scitonemina je karakteristika gornjih slojeva mulja i pokorica (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Balskus i sar., 2011). Sposobnost produkcije scitonemina se takođe može uočiti kod predstavnika cijanobakterija koji rastu na vlažnom zemljištu ili u plitkim vodenim ekosistemima koji bivaju izloženi suncu tokom većeg dela dana, kao što je slučaj sa *Aphanothece* i *Gloeotrichia* (Mishra i sar., 2015).

➤ ***Mikosporinu slične aminokiseline***

Pored scitonemina cijanobakterije poseduju i drugu grupu foto zaštitnih pigmenta - mikosporinu slične aminokiseline koji imaju sposobnost apsorpcije određenog dela UV zraka. Naučnik Shibata (Shibata, 1969) je 1969. godine prvi put detektovao akumulaciju velike koncentracije mikosporinu sličnih aminokiselina kod cijanobakterija. Mikosporinu slične aminokiseline su mali (<400 Da), intracelularni, bezbojni i u vodi rastvorljivi molekuli (Häder i sar., 2007; Singh i sar., 2008a). Ovi molekuli su grupa sekundarnih metabolita cijanobakterija koji apsorbuju svetlosno zračenje i štite ćelije izložene intenzivnom UV zračenju (Häder i sar., 2007). Sposobni su da efikasno rasipaju apsorbovanu svetlost u vidu toplote (više od 90% apsorbovane svetlosne energije) bez produkovanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Conde i sar., 2000). Mikosporinu slične aminokiseline koje se nalaze u citoplazmi apsorbuju 10-26% UV-B zračenja, dok mikosporinu slične aminokiseline koje su smeštene u ekstracelularnom glikanu apsorbuju oko 67% ovog zračenja (Garcia-Pichel i sar., 1993; Ehling-Shulz i Scherer, 1999). Molekuli mikosporinu sličnih aminokiselina se sintetišu u prvom delu šikiminskog puta sinteze aromatičnih jedinjenja (aromatičnih aminokiselina, npr. tirozin, triptofan i fenil-alanin). Enzimi i intermedijerna jedinjenja ovog metaboličkog puta koriste se za sintezu molekula mikosporinu sličnih aminokiselina. Šikiminski put je karakterističan za biljke i mikroorganizme, dok kod

životinja nije prisutan. Intermedijerno jedinjenje 3-dehidrokinat predstavlja prekursor za sintezu primarnog oblika mikosporinu sličnih aminokiselina (mikosporin-glicin), čijom hemijskom ili biohemijskom konverzijom nastaju sekundarni molekuli mikosporinu sličnih aminokiselina (Shick i Dunlap, 2002). Inkorporacijom različitih amino-kiselina i amino-alkohola u strukturu molekula mikosporinu sličnih aminokiselina dobija se oko 20 različitih vrsta molekula mikosporinu sličnih aminokiselina (Pinell, 2003). Tako, na primer, razlikujemo mikosporin-aurin, mikosporin-glicin, mikosporin-glutaminska kiselina (glicin), mikosporin-metilamin-serin, mikosporin-glicin-valin, itd. (Shick i Dunlap, 2002). Molekul mikosporinu sličnih aminokiselina je po hemijskoj strukturi cikloheksanonski ili cikloheksaminski prsten konjugovan sa azotom koji je supstituent neke amino-kiseline ili amino-alkohola (Shick i Dunlap, 2002). Prsten u većini slučajeva sadrži aminokiselinu glicin na trećem ugljenikovom atomu, mada mogu sadržati i sulfatne estre.

Utvrđeno je da mikosporinu slične aminokiseline pružaju zaštitu od UV zračenja ne samo svojim producentima, već i sekundarnim korisnicima kroz lance ishrane (Helbling i sar., 2002). Sposobnost apsorpcije UV zračenja između 310 i 362 nm (sa apsorpcionim maksimumom od 326 nm) (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993), visok molarni koeficijent ekstinkcije ( $\epsilon=28,100\text{--}50,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) i foto-stabilnost u vodi podržava ideju da mikosporinu slične aminokiseline imaju ulogu zaštite od zračenja (Whitehead i Hedges, 2005). Oyamada i sar. (2008) su pokazali da mikosporinu slične aminokiseline imaju zaštitni efekat od UV svetlosti na ljudske ćelije. Takođe su dokazali pozitivan efekat mikosporinu sličnih aminokiselina na proliferaciju humanih ćelija kože. Otuda široka primena ovog pigmenta u kozmetici i sredstvima za higijenu kao UV zaštitnoj komponenti i aktivatoru ćelijske proliferacije (Bandaranayake, 1998).

Cijanobakterije su najprimitivniji organizmi sposobni da sintetišu mikosporinu slične aminokiseline (Häder i sar., 2007; Singh i sar., 2008a). Osim kod cijanobakterija, ove supstance se mogu naći u nekim taksonomski različitim organizmima izloženih jakom intenzitetu UV zračenja (Arai i sar., 1992; Häder i sar., 1998; Sommaruga, 2001; Sinha i Häder, 2002), prisutnih u svim sredinama, od tropskih do polarnih regiona (Sinha i sar., 2007), uključujući marinske grupe heterotrofnih bakterija (Arai i sar., 1992; Takayuki i sar., 1992), gljive i mikroalge (Okaichi i Tokumura, 1980) i makroalge (Rezanka i sar., 2004). Mikosporin produkujuće cijanobakterije su česte u slanijim terestričnim ekosistemima (Oren, 1997; Palinska i sar., 2011),

kao i drugim staništima različitih specifikacija (npr. pirinčana polja, kore drveta...) (Sinha i sar., 2006; Singh i sar., 2008a).

### 1.2.2. Toksini cijanobakterija

S obzirom da štetno utiču na zdravlje ljudi i životinja, posebno bitna i najviše istraživana je grupa toksičnih sekundarnih metabolita cijanobakterija - cijanotoksina (Sivonen i Jones, 1999). Pretpostavlja se da je evolutivna uloga cijanotoksina odbrambeni mehanizam jer je dokazano da se proizvode u cilju zaštite od predatora, u odgovoru na stres ili prilikom kompeticije za resurse (Holland i Kinnear, 2013). Veruje se da se toksini sintetiziraju kao adaptacija u uslovima ograničene količine nutrijenata koja im pruža kompetitivnu prednost u odnosu na druge fototrofe jer inhibiraju njihov rast (Arnold, 1971; Smayda, 1974; Gross i sar., 1991), kao i rast bakterija (Flores i Wolk, 1986) i gljiva (Patterson i Bolis, 1997). Pored kompetitivne nadmoći, cijanotoksini mogu igrati važnu ulogu u poboljšanju fizioloških aktivnosti (npr. pomoć pri unošenju hranljivih materija, zaštita od oksidativnog stresa i/ili uspostavljanje homeostaze metabolizma ugljenik-azota, korišćenje gvožđa, itd.) (Holland i Kinnear, 2013).

Cijanotoksini predstavljaju veliku heterogenu grupu jedinjenja izazivajući različite toksične efekte. Da li će određeni soj cijanobakterija biti toksičan ili ne zavisi isključivo od prisutnosti genskog klastera koji kodira sintezu toksičnog jedinjenja (Zurawell i sar., 2005; Christiansen i sar., 2008). Neke vrste cijanobakterija imaju sposobnost da proizvedu više od jedne vrste cijanotoksina. Njihova toksičnost, kao i ukupna biološka aktivnost varira u zavisnosti od soja, starosti kulture, količine vezanog azota, prisustva zooplanktonskih predatora, a u najvećoj meri od prisustva stresogenih faktora koji mogu da se manifestuju kao nagla promena pH vrednosti, temperature, svetlosti, nutrijenata i sl. (Svirčev, 2005). Cijanobakterije koje imaju najveću sposobnost produkcije toksina su predstavnici rodova *Microcystis*, *Dolichospermum* (ex *Anabaena*), *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Phormidium*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* i *Nodularia* (Metcalf i Codd, 2004).

Zavisno od organa ili ćelija na koji primarno deluju, cijanotoksini se dele na (Tabela 1): hepatotoksine (mikrocistini, nodularin), citotoksine (cilindrospermopsin), neurotoksine (anatoksin-a, homoanatoksin-a, anatoksin-a(S), saksitoksini i BMAA), dermatotoksine

(apliziatoksin, debromoapliziatoksin, lingbiatoksin), lipopolisaharidne endotoksine i iritante kože i gastrointestinalnog trakta (Kaebernick i Neilan, 2001; Briand i sar., 2003; Falconer, 2008).

**Tabela 1.** Glavne strukturne i toksikološke karakteristike cijanotoksina

Toksin/Struktura (broj varijanti)		Target organ i mehanizam delovanja	Producenti toksina	Reference
HEPATOTOKSINI	Mikrocistini/ Ciklični heptapeptidi (~250)	Ireverzibilna inhibicija protein fosfataze (PP1 i PP2A), integriteta membrane i narušavanje provodljivosti; <i>primarno mesto delovanja</i> : jetra (takode utiče na druge organe-bubrege, reproduktivne organe, debelo crevo, mozak)	<i>Anabaenopsis, Aphanocapsa, Aphanizomenon, Arthrospira, Dolichospermum (Anabaena), Fischerella, Gloeotrichia, Nostoc, Hapalosiphon, Microcystis, Merismopedia, Snowella, Oscillatoria, Phormidium, Planktothrix, Pleurocapsalean, Radiocystis, Synechococcus, Woronichinia</i>	Rinehart i sar., 1988; Sivonen i sar., 1992b; Fawell i sar., 1994; Yoshida i sar., 1997; Mahakhant i sar., 1998; dos Viera i sar., 2003; Ballot, 2004; Botha i sar., 2004; Ballot i sar., 2005; Carey i sar., 2007; Fiore i sar., 2009; Chen i sar., 2015; Spooft i Catherine, 2017.
	Nodularini/ Ciklični pentapeptidi (10)	Inhibicija protein fosfataze (PP1 i PP2A); <i>primarno mesto delovanja</i> : jetra	<i>Nodularia, Nostoc</i>	Sivonen i sar., 1989; Ressom i sar., 1994; Carmichael i Boyer, 2016; Spooft i Catherine, 2017.
CITOTOKSINI	Cilindrospermopsini/ Guanidin alkaloidi (3)	Ireverzibilna inhibicija proteinske biosinteze; <i>primarno mesto delovanja</i> : jetra (takode i bubrezi, slezina, pluća, srce, crevo, grudna žlezda, koža)	<i>Aphanizomenon, Chryso sporum, Cyndrospermopsis, Dolichospermum (Anabaena), Lyngbya, Oscillatoria, Umezakia, Raphidiopsis, Sphaerospermopsis</i>	Ohtani i sar., 1992; Li i sar., 2001; Schembri i sar., 2001; Svrcek i Smith, 2004; Spooft i sar., 2006; Seifert i sar., 2007.
NEUROTOKSINI	Anatoksin-a/ Alkaloidi (8)	Postsinaptički, depolarizujući neuro-mišićni blokatori, vezuje se ireverzibilno za nikotinske acetilholinske receptore; <i>primarno mesto delovanja</i> : nervna sinapsa	<i>Aphanizomenon, Arthrospira, Cyndrospermum, Dolichospermum (Anabaena), Microcystis, Oscillatoria, Planktothrix, Raphidiopsis, Tychonema</i>	Devlin i sar., 1977; Carmichael i Gorham, 1978; Sivonen i sar., 1989; Fawell i James, 1994; Fitzgeorge i sar., 1994; Ressom i sar., 1994; Sivonen i Jones, 1999; Ballot, 2004; Ballot i sar., 2005; Van Apeldoorn i sar., 2007; Shams i sar., 2015; Carmichael i Boyer, 2016.
	Homoanatoksin-a/ Alkaloidi (1)	Slično anatoksinu-a, izaziva neuro-mišićnu blokadu; <i>primarno mesto delovanja</i> : nervna sinapsa	<i>Phormidium (Oscillatoria), Raphidiopsis</i>	Skulberg i sar., 1992; Ressom i sar., 1994; Codd i sar., 1997; Namikoshi i sar., 2003.
	Anatoksin-a(S)/ Guanidin methyl fosfatni estar (1)	Ireverzibilno inhibiše acetilholinesterazu; <i>primarno mesto delovanja</i> : periferni nervni sistem	<i>Dolichospermum (Anabaena)</i>	Mahmood i Carmichael, 1987; Matsunaga i sar., 1989; Carmichael i sar., 1990; Stewart, 2004; Van Apeldoorn i sar., 2007; Araöz i sar., 2010.
	Saksitoksini/ Karbamatni alkaloidi (56)	Vezuje i blokira natrijumove kanale inhibišući provođenje kroz nervne aksone; <i>primarno mesto delovanja</i> : nervni aksioni	<i>Aphanizomenon, Lyngbya, Dolichospermum, Planktothrix, Phormidium, Scytonema, Geitlerinema, Raphidiopsis, Cuspidothrix, Cyndrospermopsis</i>	Carmichael, 1992; Humpage i sar., 1994; Mons i sar., 1998; Beltran i Neilan, 2000; Pearson i sar., 2010; SZO, 2003; Wiese i sar., 2010; Borges i sar., 2015; Cirés i Ballot, 2016.
	BMAA/Amino kiselina (2)	Alkaloidni prekursori; <i>primarno mesto delovanja</i> : motorni neuroni	<i>Aphanizomemon, Microcystis, Cyndrospermopsis, Nodularia, Dolichospermum, Planktothrix (Oscillatoria), Synechococcus, Synechocystis</i>	Cox i sar., 2005; Carmichael i Boyer, 2016.

DERMATOTOKSINI (IRITANTI)	Lingbiatoksini/ modifikovani ciklični dipeptidi (3)	Protein kinaza C aktivatori; <i>primarno mesto delovanja</i> : koža, gastrointestinalni trakt	<i>Lyngbya, Schizotrix, Oscillatoria</i>	Fujiki i sar., 1983; Moore, 1984, 1996; Ito i sar., 2002; Jiang i sar., 2014; Carmichael i Boyer, 2016.
	Aplisiatoksini/ Fenolni bislaktoni (>2)	Protein kinaza C aktivatori; <i>primarno mesto delovanja</i> : koža	<i>Lyngbya, Schizotrix, Oscillatoria</i>	Fujiki i sar., 1983; Moore, 1984; Ito i sar., 2002.
	Debromoaplisiatoksin/ Fenolni bislaktoni	Inflamatorni toksini deluju kroz mehanizme slične onima kod forbol estara; <i>primarno mesto delovanja</i> : koža	<i>Lyngbya, Schizotrix, Oscillatoria</i>	Moore i sar., 1984; Carmichael i Boyer, 2016.
ENDOTOKSINI (IRITANTI)	Lipopolisaharidi/ Lipopolisaharidi (3)	LPS formiraju komplekse sa proteinima i fosfolipidima; <i>primarno mesto delovanja</i> : utiču na sve izložene organe (koža i sluzokoža)	Skoro sve cijanobakterije	Weise i sar., 1970; Chorus i Bartram, 1999; Stewart i sar., 2006.

Skraćenice: BMAA- $\beta$ -metilamino-L-alanin; PP1-protein fosfataza 1; PP2A-protein fosfataza 2A; LPS-Lipopolisaharidni endotoksini.

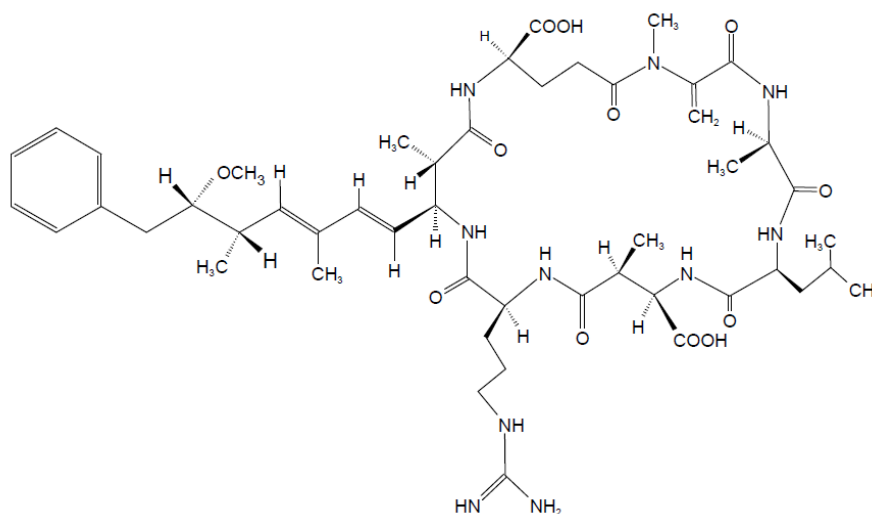
Mehanizmi delovanja cijanobakterijskih toksina (Tabela 1) su veoma raznovrsni i za procenu specifične opasnosti cijanobakterijskih toksina neophodno je razumeti njihove hemijske i fizičke osobine, njihovu pojavu, regulisanje produkcije, a samim tim i njihov uticaj na živi svet (Metcalf i Codd, 2004). Brojni toksični metaboliti cijanobakterija dovode do ekotoksikoloških problema i štetno deluju na zdravlje ljudi i životinja (Metcalf i Codd, 2012).

Pored velike zastupljenosti u vodenim sredinama gde često izazivaju "cvetanje voda" (Codd i sar., 2005; Bláhová i sar., 2008; Bláha i sar., 2009; Paerl i Huisman, 2009), dobro je poznato prisustvo cijanobakterija u terestričnim ekosistemima (Svirčev i sar., 2013; Richer i sar., 2015; Dulić i sar., 2017). Cijanotoksini su od nedavno poznati i u terestričnim biotopima (Metcalf i sar., 2012; Dulić i sar., 2017). S obzirom na novootkrivenu produkciju cijanotoksina u terestričnim ekosistemima značajna je identifikacija prisustva cijanotoksina i posledica koje mogu imati u terestričnim ekosistemima. Međutim vrlo je malo podataka o toksikološkim karakteristikama cijanobakterija prisutnih u terestričnim ekosistemima. Vlažno zemljište i zemljište okarakterisano visokim salinitetom su prirodna staništa cijanobakterija u kojima one pokazuju višestruku ulogu (Svirčev, 1992; Simeunović, 2005). Vrlo je značajno i njihovo prisustvo u biološkim pokoricama koje zauzimaju velike površine širom sveta (Belnap i sar., 2001; Belnap, 2003; Tirkey i Adhikary, 2005; Zhang i sar., 2009; Hu i sar., 2012a). Iako cijanobakterije čine bitnu komponentu u sušnim i polu-sušnim sredinama ograničen je broj istraživanja koji se bave pojavom i sudbinom njihovih toksičnih metabolita u ovim sredinama. U

pustinjskim pokoricama Katara, detektovani su mikrocistini, anatoksin-a(S) i BMAA (Cox i sar., 2009; Metcalf i sar., 2012; Richer i sar., 2015). Trenutno jedini zabeleženi slučaj trovanja je kod četiri psa kod kojih su se ispoljili znaci neurotoksičnosti nakon ingestije zaostale kišnice u pukotinama pokorica u pustinji u Kataru. Kao mogući uzrok smrti dva psa se navodi trovanje anatoksinom-a(S) (Chatziefthimiou i sar., 2014) čije je prisustvo prethodno dokumentovano u pustinjskim pokoricama Katara (Cox i sar., 2009; Metcalf i sar., 2012).

### 1.2.2.1. Mikrocistini

Hepatotoksini su najčešći tipovi toksina koje proizvode cijanobakterije i koji su doveli do trovanja u skoro svim delovima sveta (Haider i sar., 2003). Po hemijskom sastavu su ciklični peptidi koji ispoljavaju svoj toksični efekat inhibišući enzime protein fosfataze. Najznačajniji peptidni cijanotoksini su mikrocistin i nodularin. Mikrocistini su najzastupljeniji i najviše proučavani cijanotoksini, pri čemu je konstatovano da je mikrocistin-LR (MC-LR) najčešće prisutna forma mikrocistina (Chorus i Bartram, 1999; Metcalf i Codd, 2004). Strukturno, mikrocistini su monociklični heptapeptidni, mali molekuli sa molekularnom težinom između 800 i 1100 Da (Botes i sar., 1982a,b; Westrick i sar., 2010). Najčešći producenti mikrocistina su *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc* i *Anabaena* (Metcalf i Codd, 2004; Christiansen i sar., 2008).

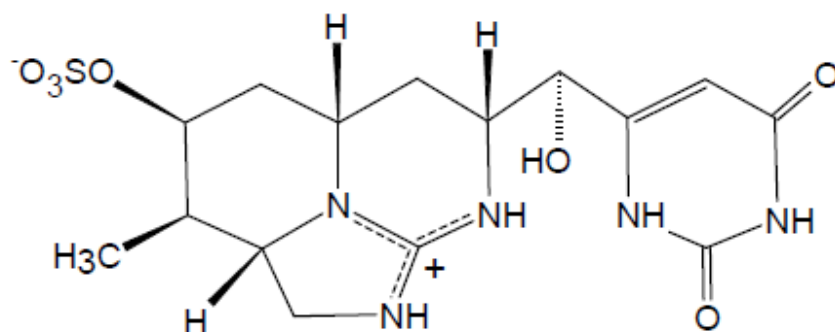


Slika 1. Struktura cijanotoksina mikrocistina-LR (originalno pravljena hemijska struktura)

Mikrocistini mogu biti vezani za membranu ili se mogu nalaziti slobodni u ćeliji, a otpuštaju se prirodnim ciklusom starenja ćelije i smrću ili tokom stresa. Ekstremno su stabilni u vodi, ne mogu se inhibisati visokim temperaturama ( $>300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Gagala i Mankiewicz-Boczek, 2012) ili naglim promenama pH vrednosti. Rezistentni su na najčešće korišćene hemijske tretmane, s obzirom da ih ciklična struktura i prisustvo novih aminokiselina čine rezistentim na toplotu, hidrolizu i oksidaciju (de la Cruz i sar., 2011). Podležu vrlo slaboj degradaciji na temperaturama iznad  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , u izrazito kiseljoj sredini ( $\text{pH} < 1$ ), alkalnoj ( $\text{pH} > 9$ ) (Harada i sar., 1996; SZO, 1999), biološkim tretmanima (Sivonen, 1990; Lehtimaki i sar., 1994, 1997; Cousins i sar., 1996; Rapala i sar., 1997; Orr i Jones, 1998), kao i pri jakom sunčevom zračenju, pogotovo u prisustvu pigmenata rastvorljivih u vodi (Tsuji i sar., 1995). Neke bakterijske proteaze (Rapala i sar., 2005) i nekoliko vodenih biljaka i životinja mogu razgraditi mikrocistine (Zurawell i sar., 2005).

#### 1.2.2.2. Cilindrospermopsini

Cilindrospermopsin ( $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ ,  $M=415.43$ ) je ciklični alkaloid izolovan iz cijanobakterijske vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani i sar., 1992; Li i sar., 2001) koji se sastoji od tricikličnog guanidina u kombinaciji sa hidrosimetiluracilom (Slika 2) (Ohtani i sar., 1992). Trenutno, izolovana su i opisana samo tri deoksi izomera cilindrospermopsina, ali postoji mogućnost da postoji još njegovih izomernih varijanti (Ohtani i sar., 1992; Li i sar., 2001).



Slika 2. Struktura cijanotoksina cilindrospermopsina (originalno pravljeni struktura)

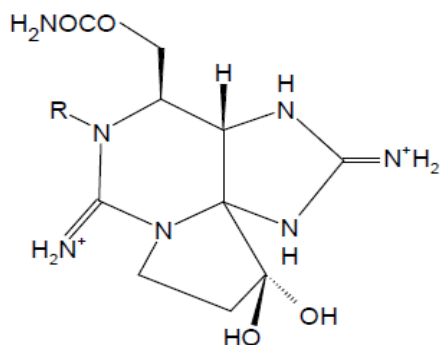
Cilindrospermopsin mogu proizvoditi sledeće cijanobakterije: *Umezakia natans* (Harada i sar., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aph. flos-aquae*, *Rhaphdiopsis curvata*, *Anabaena bergii*, *A. lapponica* i *Lyngbya wollei* (Falconer, 2005; Seifert i sar., 2007). Cilindrospermopsin-prodružujuće vrste se pojavljuju obično u tropskim ili suptropskim regionima (Carmichael i Falconer, 1993; Hawkins i sar., 1997; Duy i sar., 2000), sa optimalnim rastom na temperaturi 25 °C i višoj (Vinogradska, 1974; Hawkins i sar., 1997) i na pH 8.4–9.0 (Fabbro i Duivenvoorden, 2000), sa tendencijom širenja na nove areale usled globalnog zagrevanja (Kinnear, 2010).

Cilindrospermopsin je izuzetno polarno jedinjenje čija cviterjonska struktura ga čini rastvornim u vodi (Chiswell i sar., 1999). Stabilan je u uslovima delovanja ekstremnih temperatura, sunčevog zračenja (Chiswell i sar., 1999) i u neutralnim i kiselim uslovima sredine, dok u alkalnoj sredini lako degradira (17% za 6 nedelja) (Adamski i sar., 2016). Stabilan je u opsegu temperature od 4–50 °C nakon 5 nedelja u mraku; nakon 4 nedelje na 50 °C, 83% od početne koncentracije toksina (1 mg l<sup>-1</sup>) je ostalo očuvano (Chiswell i sar., 1999). Toksin je pokazao stabilnost nakon 4 h izlaganja temperaturi od 40 °C, u podlozi različitih pH vrednosti (Adamski i sar., 2016). Chiswell i sar. (1999) su pokazali da cilindrospermopsin u vodi visoke čistoće ima polu-život veći od 10 dana i otporan je na degradaciju izazvanu promenama u temperaturi. Međutim, 90% degradacije se dešava unutar 3 dana kada su izloženi sunčevoj svetlosti. Kuvanje ne dovodi do destrukcije molekula cilindrospermopsina inkubacijom u kiseloj i neutralnoj sredini, dok kuvanje pod uslovima bazne sredine dovodi do brže degradacije (18% nakon 4 h) (Adamski i sar., 2016).

### 1.2.2.3. Saksitoksini

Brojni rodovi cijanobakterija proizvode neurotoksine od kojih su najčešći anatoksini i saksitoksini. Neurotoksini se još nazivaju i brzo delujućim toksinima, jer se letalni efekat može ispoljiti već za nekoliko minuta, odnosno sati nakon unošenja u organizam (Rodrigue i sar., 1990). Deluju na nervni sistem, zaustavljajući prenos signala na neuronima i nadražujući mišićne ćelije sve do prestanka njihovog rada.





saxitoxin: R = H  
neosaxitoxin: R = OH

Saksitoksini (C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>, M=299) su triciklični molekuli sa 1,2,3-i 7,8,9-guanidin grupama (Slika 3). Spadaju u grupu karbamatnih alkaloida koji su ili ne-sulfatni (saksitoksini), jednostruko sulfatni (goniautoksini) ili duplo sulfatni (C-toksini).

*Slika 3. Struktura cijanotoksina saksitoksina (originalno pravljeni hemijska struktura)*

U slatkovodnim ekosistemima, saksitoksini su uglavnom produkovani od strane *Dolichosprenum circinalis* i *Aphanizomenon flos-aquae* (Kuiper-Goodman i sar., 1999), *Cyl. raciborskii* i *Lyngbya wollei* (Mahmood i Carmichael, 1986; Humpage i sar., 1994; Negri i Jones, 1995). Saksitoksini su stabilni toksini, sposobni da prežive preko 90 dana u vodi (Jones i Negri, 1997). Postepeno degradiraju u još toksičnije varijante na visokim temperaturama, tako da kuvanje vode koja sadrži saksitoksine može dovesti do povećanja toksičnosti (Sivonen i Jones, 1999).

### 1.3. Biomarkeri

Biomarkeri su fosilizovani organski molekuli (npr. lipidi i pigmenti) koji pružaju arhivu informacija o drevnim zajednicama očuvanih u sedimentnim slojevima (Coolen i sar., 2004; Miller i sar., 2009; Summons i sar., 2011). Biomarkeri u geološkim istraživanjima su korisni jer predstavljaju zapise organskih molekula produkovanih biološkom aktivnošću organizama koji ne ostavljaju vidljive ostatke, kao što su grupe algi, bakterija i cijanobakterija (Fritz, 1989; Lotter, 2001; Reuss, 2005). Oni ukazuju da li su prisutni živi organizmi ili da li su bili prisutni u uzorku. Njihova zastupljenost je jednaka zastupljenosti organizama koji ostavljaju za sobom vidljive zapise u sedimentu (Smol i sar., 2001). Ukoliko su jedinjenja dovoljno otporna na degradaciju i mineralizaciju, ona ostaju očuvana u sedimentu i u funkciji biomarkera mogu biti ekstrahovana i analizirana iz uzorka kako bi se rekonstruisale promene vegetacije ili bakterijske zajednice tokom prošlosti (Zech i sar., 2011). Biomarkeri se tada mogu smatrati molekularnim fosilima (Eganhouse, 1997; Eglinton i Eglinton, 2008). Pružaju mogućnost da se utvrdi mikrobijalno

poreklo organske materije, informacije o metabolizmu, fiziologiji i taksonomiji organizama prisutnih u periodu taloženja (Miller i sar., 2009), kao i informacije o očuvanju ovih zapisa tokom geološkog vremena (Mahowald i sar., 1999; Castaneda i Schouten, 2011). Ukoliko se dovoljno zna o biologiji i ekološkoj toleranciji nekog taksona, taj takson se može koristiti kao indikator-vrsta u rekonstrukciji predašnjeg staništa, zajednice i okoline, uključujući i klime (Birks i Birks, 1980). Kada su molekularna struktura i izotopski sastav identifikovani, izvor biomarkera, njihov kompozicioni karakter i raspodela bi se mogli proučiti čak i do nivoa roda ili vrste (Svirčev i sar., 2013). Ukoliko su ova jedinjenja specifična i hemijski stabilna, tako da ostaju nepromenjena u prirodi ili se u dužem vremenskom periodu izmene u predvidive oblike, možemo ih smatrati dobrim biomarkerima sa aplikativnim značajem u rekonstrukciji paleoklimatskih uslova (Coolen, 2004; Barbosa, 2009; Smalley i sar., 2010).

### **1.3.1. Cijanobakterije u modelu formiranja lesa - BLOCDUST hipoteza**

Les je rasprostranjen širom sveta kao jedan homogeni, tipično bez slojeva, trošan, blago koherentan, fino-granuliran, bleđožut ili uglačani, vetrom nošeni (eolski) sediment. To je sedimentna, lako porozna, laporovita ili glinovita stena, sačinjena uglavnom od kvarcnih čestica (10–50  $\mu\text{m}$ ), koja se relativno dobro sortira i blago prelazi u sedimentnu formaciju (Pecsi, 1995). Les se uglavnom sastoji iz kvarcnih čestica (Pecsi, 1990; Smalley, 1995; Smalley i sar., 2011), potom od feldspata, kalcita i dolomita u manjim količinama. Po suvom vremenu, čak i strmi lesni zidovi su stabilni. Lako erodira usled površinskih vodotokova i sklon je stvaranju podzemnih šupljina (Pecsi, 1995).

Pokrivajući 10% Zemljine površine les je najšire rasprostranjena sedimentna formacija u kvartaru (Pecsi, 1990; Smalley i sar., 2011). Prevažodno je starosti iz kvartara, međutim u Kini les i lesu-slične sekvence datiraju iz vremena miocena (Guo i sar., 2002). Razvija se u predelima umereno-kontinentalne klime, sa vlažnim prolećima, suvim letima i oštrijim zimama. Većina ovog vetrom nošenog depozita je koncentrisana u polu-sušnim regionima unutrašnje Evroazije (Smalley i sar., 2011) i stepskim predelima Evrope. Prostire se najviše u Srbiji, Mađarskoj, Ukrajini i Rusiji, kao i u Kini.

I pored značajne distribucije lesa i brojnih literaturnih navoda posvećenih tumačenju njegovog rasprostranjenja, znanje o procesima transformacije akumulirane prašine putem

stabilizacije u formaciju zrelog lesnog sedimenta je i dalje nedovoljno. Stvaranje naslaga lesa predstavlja jedan složeni proces ili čak i niz složenih procesa. U okviru niza procesa postoji jedan ključan, karakterističan događaj koji les čini lesom. To je eolski prenos lesnog materijala koji stavlja svoj krajnji pečat na proces formiranja lesa (Smalley i sar., 2011). Najznačajniji momenat u istoriji istraživanja lesa je spoznaja da eolska faza ima centralnu ulogu u stvaranju lesa (Smalley i sar., 2011). U prethodnim tumačenjima, biotički aspekt u formiranju lesa nije opisivani i proces je objašnjavan kao kompleks pretežno abiotičkih procesa (Berg, 1916; Ambrož, 1947; Ložek, 1965; Pecs, 1990; Cilek, 2001). Međutim, Pecs (1990) je istakao da je formiranje lesnih naslaga relativno složen proces i da u stvaranju lesa ima još nečega pored akumulacija eolske prašine. Proces taloženja uključuje interakciju između abiotičke i biotičke komponente. Pojam lesifikacije kao proces formiranja lesa integrisao je čitav niz događaja nakon taloženja koji se odnose na pretvaranje vetrom nošenog materijala u dobro sortiranu otvorenu strukturu sa klasičnim svojstvima lesa (Smalley i sar., 2011). Osnovne komponente za taloženje lesa su: materijal (prašina), atmosferska cirkulacija (vetar) i odgovarajući površinski uslovi koji obezbeđuju pretvaranje nataloženog eolskog materijala u strukturu naslaga lesa. Tradicionalno, specifični tipovi vegetacije su smatrani ključnim u hvatanju prašine i preduslov za taloženje lesa u sušnim i polu-sušnim regionima, gde je deponovanje vodom zanemarljivo, a snaga vetra i dalje jaka (Tsoar i Pye, 1987). Međutim, vetar takođe može biti glavna erozivna sila i izazvati probleme oko stabilnosti. Zanimljivo je da je upravo u vreme kada je vegetacija bila najslabije razvijena očuvan najdeblji evropski lesni depozit prošlog glacijala u severnoj Srbiji (Svirčev i sar., 2013), ukazujući da neki drugi faktor ima ključnu ulogu u deponovanju vetrom nošene prašine. U Vojvodini, ovaj lesni sloj može preći 4 m debljine (Antoine i sar., 2009; Bokhorst i sar., 2011).

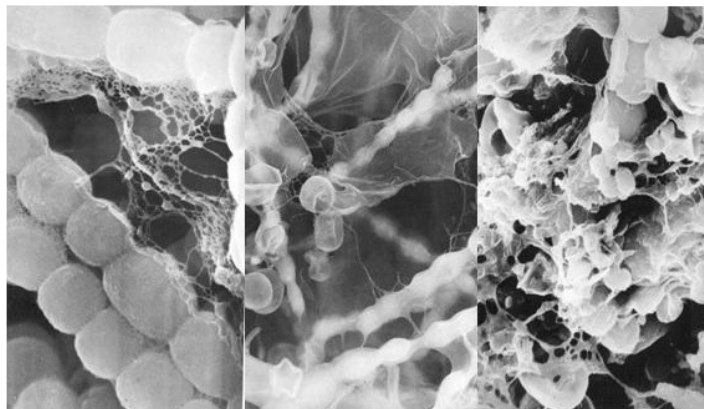
Površine sa biološkom pokoricom (eng. *biologically crusted surfaces* - BCS) su veoma specifični biotopi sa različitim zajednicama i razvijaju se redovno na lesnim površinama i ekspozicijama. Najslabije ovim biocenozama su biološke zemljišne pokorice (eng. *biological soil crusts* - BSC), koje su veoma dobro poznate i opisane (Wynn-Williams, 2000; Belnap i Lange, 2001; Belnap, 2006). Biološke pokorice na lesnim površinama su nazvane biološke lesne pokorice (eng. *biological loess crusts* - BLC) (Slika 4) (Smalley i sar., 2011). One se formiraju aktivnošću i produkovanjem metabolitima živih organizama, koji formiraju pokorice od čestica supstrata povezanih u celinu organskim materijalom (Belnap i sar., 2001). Ove zajednice su

visoko specijalizovane zajednice cijanobakterija, zelenih algi, lišajeva, mahovina, gljiva i bakterija (Svirčev i sar., 2013).



*Slika 4. Biološke lesne pokorice u Vojvodini (ciglana u Rumi) (Svirčev i sar., 2013)*

Xu i Chen (2008) i Smalley i sar. (2011) predložili su da stabilizacija nataložene, vetrom nanesene prašine u les može biti postignuta učestvovanjem visoko specijalizovane ekstremofilne mikrobiološke zajednice koja naseljava površinu lesa, odnosno ekofiziološkom aktivnošću mikroorganizama. U radu Belnap i Lange (2001) su sumirani rezultati mnogobrojnih studija o biološkim pokoricama i ustanovljeno je da vazduhom nošene čestice prašine mogu biti sakupljene lepljivim cijanobakterijskim omotačem, u površinama koje su nastale bubrenjem tla tokom smrzavanja i na ispupčenim stabljikama mahovina i talusima lišajeva. I filamentozne i jednoćelijske cijanobakterijske vrste koje formiraju pokorice proizvode omotač ili kapsulu od ekstracelularnih polisaharida (Potts, 1996, 1999; Qiu i sar., 2004). Ovi ugljeno-hidrati doprinose formiranju agregacija slepljivajući čestice u kompaktnu celinu (Slika 5) (Van den Ancker i sar., 1985; Danin i sar., 1989; Chartes, 1992; Belnap i Gardner, 1993; Wynn-Williams i sar., 2000; Belnap, 2003; Belnap i sar., 2003).



*Slika 5. Sloj polisaharida izlučen od strane cijanobakterija biološke lesne pokorice (Smalley i sar., 2010)*

Kako se nagomilane čestice uvećavaju, one postaju teže, imaju relativno manju površinu i teže ih pomeraju vetar ili voda (Danin i Yaalon, 1980; Danin i sar., 1989). Cijanobakterijske komponente biološke pokorice brzo nabreknu, do 13 puta više u odnosu na svoju suhu zapreminu (Shields i Durrell, 1964; Campbell, 1977) zatvarajući protok vode kroz površinu zemljišta.

Na slici 6 su prikazani različiti tipovi suvih uzoraka (Slika 6 a, c, e) BLC poreklom sa različitih lokaliteta Vojvodine sa odgovarajućim vlažnim fazama (Slika 6 b, d, f). Proces transformacije iz suve u vlažnu fazu je relativno brz proces kako u laboratorijskim tako i u prirodnim uslovima (Svirčev i sar., 2013).

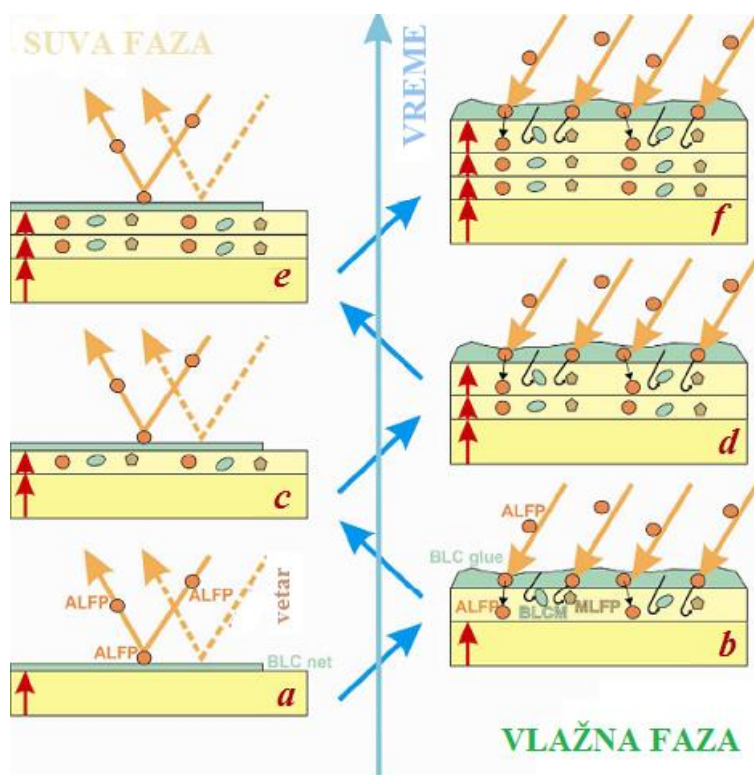


*Slika 6. Izolovane cijanobakterije iz BLC sa različitih lokaliteta Vojvodine - suvi uzorci BLC (a, c, e) sa odgovarajućim vlažnim fazama (b, d, f) (Svirčev i sar., 2013)*

Svirčev i sar. (2013) su sva ova znanja i pretpostavke objedinili i razvili nov konceptualni pristup koji objašnjava biogenu osnovu procesa formiranja lesa kroz BLOCDUST model (Slika 7). Ovaj model pokazuje da je proces stvaranja i prezervacije lesa pod velikim uticajem metaboličke aktivnosti mikroorganizama biološke lesne pokorice, uglavnom preko izlučenih polisaharida. Prikupljanje čestica prašine iz vazduha predstavlja deo životne strategije organizama biološke pokorice. Lepljivi polisaharidni materijal na površini, koji uglavnom luče cijanobakterije, može da zarobi čestice koje se nalaze suspendovane u atmosferi u vidu prašine (Slika 7 b, d, f - BLC lepak). Ovo sakupljanje čestica iz vazduha (ALFP) je deo životne strategije mikroorganizama u pokoricama kojom se povećava kapacitet zadržavanja vode i obezbeđuju neophodni minerali za dalji rast biološke lesne pokorice. Istovremeno, polisaharidi koje izlučuju organizmi u pokoricama vezuju čestice unutar zone biološke lesne pokorice, formirajući kohezivnu pokoricu koja je otporna na eroziju vetra i vode tokom sušnih perioda (Slika 7 a, c, e - BLC mreža). Time pokorice sprečavaju deflaciju deponovane prašine formirajući zaštitu od



erozije na površini. Metabolisane čestice (Slika 7 - MLFP), zajedno sa metabolitima (Slika 7 - BLCM) i neiskorišćenim česticama iz vazduha (Slika 7 - ALFP) postaju gornji lesni sediment prekriven biološkom lesnom pokoricom (Slika 7 c, e). Svake godine, tokom vlažnih perioda, nagomilavanje prašine i čestica koje formiraju les veoma je intenzivno (Slika 7 b, d, f). Tokom sušnih faza, biološka lesna pokorica postaje veoma stabilna i razvija otpornu površinu koja sprečava eroziju izazvanu vetrom i vodom (Slika 7 a, c, e). Period isušivanja podstiče stvaranje polisaharida cijanobakterija, koji služe kao zaštitni molekuli tokom stresa izazvanog nedostatkom vode. U prisustvu vode tokom vlažne faze, polisaharidi proizvedeni u tranziciji od vlažne do suve faze i akumulirani tokom suve faze postaju novi lepljivi sloj za akumulaciju prašine i pokreću novi ciklus stvaranja lesa (Slika 7 b, d, f).



**Slika 7.** Model uticaja biološke lesne pokorice na proces formiranja lesa (BLOCDUST model - Biological LOess Crusts DUST Trapping model): a) Početna sušna sezona: mreža biološke lesne pokorice sprečava akumulaciju (puna linija) i deflaciju (isprekidana linija); b) Početna vlažna sezona: polisaharidni lepak hvata prašinu iz vazduha; c i e) Sledeće sušne sezone: očuvanje nagomilanih slojeva iz ranijih vlažnih sezona, d i f) Sledeće vlažne sezone: formiranje novog polisaharidnog lepka povezanog sa nagomilavanjem prašine iz vazduha i transformacijom starijih slojeva akumulirane prašine na protolesne naslage. BLC - biološka lesna pokorica; BLC lepak - lepljivi

*polisaharidi produkovani od strane BLC mikroorganizama; ALFP - čestice iz vazduha koje formiraju les; MLFP - metabolisane čestice koje formiraju les; BLCM - metaboliti, biomarkeri (Svirčev i sar., 2013)*

Cijanobakterije u pokoricama izlučuju pigmente za zaštitu od zračenja, a koji se mogu registrovati u fosilnim tragovima (Cockell, 1998; Cockell i Knowland, 1999; Brocks i sar., 2003; Simoneit, 2004; Edwards i sar., 2005). Takođe, kako je pokazano u studijama o pokoricama iz Katara (Metcalf i sar., 2012, 2015; Richer i sar., 2015) i iz Irana (Dulić i sar., 2017) postoji potencijal za produkciju cijanotoksina kod lesnih cijanobakterija. Ukoliko su pigmenti i toksini cijanobakterija prisutni u biološkim lesnim pokoricama stabilna jedinjenja, oni mogu predstavljati potencijalne biomarkere cijanobakterija i imati veoma značajnu ulogu u paleoklimatskoj rekonstrukciji.

### **1.3.2. Tradicionalno korišćeni biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji**

Istraživanja prošlosti Zemlje u smislu evolucije živog sveta i razumevanja promena ekoloških faktora su oduvek privlačila pažnju naučnika širom sveta iz različitih oblasti. Paleoklimatska rekonstrukcija je naučna disciplina koja kombinuje analitičke metode iz nekoliko različitih polja uključujući geohemijska i biohemijska istraživanja, paleontologiju, sedimentologiju, mineralogiju itd. u svrhu istraživanja klimatskih uslova koji su vladali u prošlosti. Razumevanje dugoročnih klimatskih promena zahteva razmatranje prostornog i vremenskog aspekta klimatske dinamike (Rousseau i Kukla, 2000; Ding i sar., 2002). Kako bi interpretirali klimatske uslove iz prošlosti naučnici koriste razne indikatore koji sadrže očuvane fizičke karakteristike sredine, a čiji nastanak zavisi od preovlađujućih klimatskih uslova. Ledeni slojevi mogu se koristiti radi analize vazdušnih mehurića u ledu, za određivanje odnosa stabilnih izotopa i polena zarobljenog unutar slojeva, pružajući informacije o temperaturi, padavinama, atmosferskoj kompoziciji, vulkanskoj aktivnosti i vazdušnim strujanjima (Christy i sar., 2001; Strom, 2007). Pravilnosti i promene u debljini godova, gustini i izotopskom sastavu organskog ugljenika odražavaju varijacije u klimi, te se mogu koristiti kako bi se odredio stepen ekoloških promena. Slično godovima drveća koriste se i fosilni ostaci koralala, gde se posmatra odnos izotopa kiseonika koji sugerise o temperaturi vode u kojoj koralali rastu. Sve cvetajuće biljke stvaraju polen, koji je još jedan pokazatelj paleoklimatskih uslova, gde se prema obliku polena



može vršiti identifikacija vrste biljaka od kojih potiču, a njihova gustina opisuje kratkoročne klimatske uslove i promene (Bradley i Jones, 1992). Takođe se u novije vreme sve češće koristi smola drveća kao pokazatelj zapisa drevne vegetacije, koje mogu ukazati i na hidrološke karakteristike perioda rasta biljaka (Schefuss i sar., 2005; Tierney i sar., 2008; Kahmen i sar., 2013). Dugoročni organski materijali uključuju i etarski-vezane lipide, hopanoide i mikosporinu slične aminokiseline (National Research Council, 2002).

Paleoklimatologija analizira slojeve jezerskih i marinskih sedimenata na različite načine (Sachs i sar., 2007) pružajući važne informacije o prirodnim oscilacijama i dugoročnim promenama, kao i o odgovoru mikrobijalne zajednice na klimatske promene. Zapisi su očuvani u vidu fosilizovanih organskih materija koji uključuju analize dijatoma, foraminifera, cijanobakterija, polena itd. koji se nalaze unutar sedimenta, kao i samog sedimenta (Eglinton i Eglinton, 2008). Bušenjem jezgra sedimenata ispituje se njihov sadržaj, koji uključuje razne sitne fosile i organske materije. Milijarde tona sedimenata se akumuliraju u jezerima i okeanima svake godine, obezbeđujući veliku količinu informacija o uslovima životne sredine u njima. Analiziraju se izotopi kiseonika ili mere slojevi gline ili mulja unutar jezerskih i/ili marinskih sedimenata. Ostaci fosilizovanih organizama unutar sedimentnih slojeva mogu ukazati na promene klime u prošlosti, s obzirom da svaka vrsta ima ograničen raspon uslova u kojima joj je favorizovan rast. Hemijski sastav njihovih ljuštura reflektuje hemijske karakteristike vode u periodu kada su ljuštire formirane.

Pored dijatoma, kao najčešće korišćenih indikator organizama (Bigler i sar., 2003; Quinlan i sar., 2005; Smol i sar., 2005), analize jezerskih sedimenata korišćenjem pigmenata cijanobakterija su takođe od interesa prilikom rekonstrukcije evolucije životne sredine. Sedimentni fotosintetički pigmenti mogu pružiti pouzdane podatke o promenama u primarnoj produkciji i sastava algalne zajednice u jezeru (Romero-Viana i sar., 2010), kao i o biotičkim i abiotičkim promenama u sredini (Verleyen i sar., 2005). Iako je do nedavno bila slabo zastupljena upotreba fosilnih pigmenata iz jezerskih sedimenata (Pienitz i sar., 2000; Korhola i sar., 2002; McGowan i sar., 2008) oni su obećavajući parametri pri proceni ekološkog odgovora mikrobijalne zajednice jezera na klimatske i ekološke promene (Leavitt i Hodgson, 2001), stoga im se u novije vreme posvećuje posebna pažnja. Sedimentni pigmenti objedinjuju odgovor cele fototrofne zajednice jezera s obzirom da ih produkuju sve alge i ostali fotosintetski organizmi, a nekada su specifični za samo određenu grupu (Leavitt i Hodgson, 2001). Pigmenti očuvani u

sedimentnim slojevima služe kao biomarkeri promena ekoloških faktora jezera kao i biomarkeri klimatskih promena (Reuss, 2005).

Prisustvo mikosporinu sličnih aminokiselina u sedimentima ukazuje na mogućnost korišćenja ovih pigmenata kao indikatora intenziteta sunčevog zračenja u prošlosti (Ingalls i sar., 2009). S obzirom na stabilnost mikosporinu sličnih aminokiselina, a podrazumevajući vezu između zračenja i koncentracije mikosporinu sličnih aminokiselina, bilo bi moguće koristiti ih u studijama biogeohemije eufotične zone (Ingalls i sar., 2009). U marinskim sedimentima, mikosporinu slične aminokiseline takođe predstavljaju supstance na osnovu kojih je moguće izvršiti analizu promena ekoloških uslova u prošlosti (Ingalls i sar., 2004). Produkcija UV zaštitnih komponenti koji ostaju očuvani tokom vremena nude mogućnost rekonstrukcije solarne UV radijacije tokom Zemljine prošlosti (Rozema i sar., 2002). Prema scenarijima sa očekivanim porastom temperature vode i nutrijenata, promena klime će najverovatnije dovesti do promena u zajednicama fitoplanktona, u pravcu dominacije cijanobakterija. Očigledno je da će potreba za analizom biomarkera cijanobakterija rasti u budućnosti.

Najveći broj primera o paleoklimatskoj rekonstrukciji je vezan za akvatične sedimente. Terestrični biomarkeri teško ostaju očuvani, bilo da je u pitanju vlaga koja doprinosi mikrobiološkoj razgradnji biomarkera u zemljištu ili je u pitanju prirodno nizak potencijal fosilizacije terestričnih organizama (Fulton i Van Mooy, 2014). Pustinje su kritični krajnji članovi bioma tokom rekonstrukcije prošlosti koji se koriste kako bi se proširilo razumevanje paleoklimatskih promena, gde se istraživanja paleoklimatske rekonstrukcije svode uglavnom na fizičke nalaze. Lesni sedimenti predstavljaju jedinstvene terestrične arhive, koji su stekli veliki značaj u rekonstrukciji klime u prošlosti nakon pionirskog istraživanja Kukla (1977) i Heller i Liu (1982). Iako često nije moguće postići istu vremensku rezoluciju kao pri korišćenju jezerskih i marinskih sedimenata u paleoklimatskoj rekonstrukciji, indikatori poreklom iz lesa su potencijalno još direktniji način izrade paleoklimatske rekonstrukcije, jer je les u direktnom kontaktu sa atmosferskim i klimatskim uslovima u periodu njegovog formiranja (Sheldon i Tabor, 2009). Nakon početnih istraživanja, les se pokazao kao pouzdan arhiv paleoklimatskih i paleoekoloških uslova tokom kvartara i danas je značajan deo geoloških istraživanja (Vasiljević i sar., 2014). Veoma važne paleoekološke informacije se mogu dobiti iz lesnog depozita, posebno zbog činjenice da les pokriva oko 10% Zemljine površine (Pye, 1995; Muhs, 2013; Muhs i sar., 2014b). Spadaju među najbolje očuvane, najdetaljnije, jedinstvene, kontinuirane terestrične

arhive lokalnih paleoklimatskih uslova i ekoloških promena tokom kvartara (Liu, 1985; Liu i sar., 1987; Kukla i sar., 1988, 1990; Hovan i sar., 1989; Petit i sar., 1990; Pye, 1995; Tanga i sar., 2003; Bush i sar., 2004; Lu i sar., 2007; Zech i sar., 2011; Muhs, 2013; Vasiljević i sar., 2014), koji dopiru do 2.5 miliona godina u prošlost, stoga često nose naziv “lesni klimatski registar” (Goudie, 2013).

Les je važan arhiv klimatskih promena zbog toga što, nasuprot mnogim drugim kvartarnim terestričnim depozitima, pruža zapise o neprekidnom deponovanju (Jones i sar., 2017). Potencijal lesnog depozita kao paleoekološkog arhiva odavno je prepoznat i napravljene su korelacije između pojedinačnih profila širom istočne Evrope i Kine (Fitzsimmons i sar., 2012). Les i lesni sedimenti pokrivaju petinu ukupne površine Evrope i tako čine dominantan tip sedimenta (Haase i sar., 2007). U poređenju sa svim ostalim lesnim sekvencama formiranim tokom kasnijeg pleistocena i okarakterisanih sa manjom debljinom (Vandenberghe i sar., 1998; Antoine i sar., 2001; Rousseau i sar., 2001; Shi i sar., 2003), lesne sekvence u Vojvodini spadaju među najstarije i najkompletnije lesne depozite u Evropi (Marković i sar., 2007, 2009, 2011). Lesne sekvence u Vojvodini pokrivaju 60% površine u vidu lesnih platoa: Srem, južnoistočni Banat, Tamiš i Titelski lesni plato (Marković i sar., 2008a).

Lesni zapisi na severu Kine su među najznačajnijim, najpotpunijim i najdebljim prirodnim arhivima ekoloških promena u kontinentalnim toplim umerenim i polu-sušnim oblastima (Ding i sar., 2002a, 2005; Lu i sar., 2007). Euroazijski lesni depo se može smatrati jednim od najznačajnijih kvartarnih terestričnih zapisa klimatskih i ekoloških promena na globalnom nivou (Vasiljević i sar., 2014).

Dobro razvijene lesne sekvence odražavaju promene u akumulaciji lesnih sedimenata i stoga se koriste kao merilo za određivanje geološke prošlosti, što je važan parametar pri klimatskom modelovanju (Tegen, 2003). Naučnici bušenjem lesnog sedimenta skupljaju uzorke sa različitih dubina koji predstavljaju različite vremenske slojeve lesa formirane zavisno od vladajućih klimatskih faktora. Ovi slojevi sadrže prašinu, izotope kiseonika i različite organske molekule, koji se razlikuju tokom vremena u zavisnosti od okolne sredine. Zbog toga se elementi ovih sedimenata mogu koristiti za tumačenje klime u prošlosti. Posebna prednost lesa u odnosu na ostale kvartarne sedimente je to što može da se direktno odredi starost, korišćenjem metode luminescencije (Muhs, 2013). Brojne metode se mogu koristiti pri analizi sedimentnih arhiva, što pruža mogućnost identifikovanja specifičnog perioda slabijih ili intenzivnijih nanošenja prašine.

Moguće je determinisati veličinu i sastav eolskih sedimentnih čestica tako da se može utvrditi oblast porekla prašine i rekonstruisati putevi transporta prašine (Muhs, 2013). Eolsko poreklo lesa pruža izvođenje direktnih zaključaka o atmosferskim cirkulacijama. Morfologija i hemijske karakteristike lesa takođe pružaju važne informacije o paleoklimi (Lu i sar., 1999; Terhorst i sar., 2014), pogotovo o vlažnim/sušnim uslovima tokom perioda stvaranja lesnog sedimenta (Ruhe, 1969; Grimley i sar., 2003; Muhs i sar., 2008). Paleoklimatske analize obuhvataju proučavanja magnetne osetljivosti, granulometrije, minerologije, geochemije, mikromorfologije, fosila i sadržaja neorganskog i organskog ugljenika lesnog depozita (Derbyshire i sar., 1997; Marković i sar., 2007). Najčešće korišćeni metod u paleoklimatskim studijama je merenje magnetne osetljivosti i mineralnih magnetnih karakteristika lesa (Kukla i An, 1989; Verosub i sar., 1993; Lu i sar., 1994; Maher i sar., 1994; Liu i sar., 1995; Maher i Thompson, 1995; Porter, 2001; Porter i sar., 2001; Singer i Verosub, 2007). He i sar. (2015) su koristili kalcijumove čvoriće („lutkice“) unutar lesnog sedimenta u Kini kao alternativne pokazatelje kvartarnih paleoklimatskih promena. Ovim analizama se obezbeđuje kvantitativna rekonstrukcija temperature, zemljišnog mineralnog sastava i efekta vremenskih uslova i spiranja (He i sar., 2015).

Dodatni izvor paleoekoloških i paleoklimatskih informacija predstavljaju organske geochemijske analize biomarkera i stabilnih izotopa (Zech i sar., 2007, 2010; Schatz i sar., 2011). Molekularni organski pokazatelji bazirani na n-alkanima i n-alkanolima, dobijeni iz smole biljaka, se sve više koriste kao pokazatelj promena relativne brojnosti različitih tipova vegetacije (Xie i sar., 2002; Zhang i sar., 2006; Zech i sar., 2011; Häggi i sar., 2014; Jones i sar., 2017). Stabilne izotopske analize ugljenika pružaju važne informacije o paleoklimi (Liu i Huang, 2005; Zech i sar., 2011a, 2013), analize amino kiselina se koriste za rekonstrukciju paleotemperature, a analize monosaharida za detekciju sušnih uslova (Zech i sar., 2011). Među brojnim indikatorima prisutnim u lesu, sedimentni zapisi fitolita (poreklom iz trave i nekih biljaka) predstavljaju obećavajući izvor informacija za kvantifikaciju klimatskih promena u prošlosti (Wu i sar., 1995b; Liu i sar., 1996; Lu i sar., 1996; Madella, 1997; Blinnikov i sar., 2002). Fitoliti su tvorevine jasne morfološke građe, imaju visok stepen očuvanja u lesu u prirodnim uslovima i mogu biti identifikovani do nivoa vrste (Piperno, 1988; Carter, 2000). Fosili zemljišnih puževa koji su često dobro očuvani u lesu Kine, Evrope i Severne Amerike pružaju informacije o klimi i vegetaciji koja je bila prisutna u prošlosti (Muhs, 2013; Muhs i sar., 2014a).

Za dobijanje kompletnijih i preciznijih podataka najbolje je kombinovati informacije dobijene različitim pristupima. Multidisciplinarnim pristupom koji se sastoji od detaljnih istraživanja litostratigrafije i pedografije, magnetnih i paleomagnetnih karakteristika, varijacije u veličini čestica, geohemijskih analiza, merenja sadržaja aminokiselina u fosilnim ljušturama mekušaca kao i merenjem luminiscencije, dobijeno je da je lesni depozit u Vojvodini među najstarijim i najkompletnijim lesnim sekvencama u Evropi (Marković i sar., 2009, 2011; Stevens i sar., 2011).

Brojni aspekti lesnih depozita čine ih moćnim alatima u interpretaciji paleoekoloških promena. Međutim, za razliku od jezerskog ili marinskog sedimenta, organske materije (primarna struktura) u lesnom depozitu su često potpuno odsutne ili veoma degradirane (kao što su fosili sisara, polen, dijatome, radiolarije, ili foraminifere, itd.) (Guthrie, 1990; Pewe i sar., 1997; Carter, 2000; Muhs i sar., 2014a). To znači da je rekonstrukcija dinamike promena živog sveta (biota) nastalih pod uticajem klimatskih faktora veoma teška iz uzoraka lesnog sedimenta (Wells i Stewart, 1987; Rousseau i Kukla, 1994; Rousseau i sar., 2000; Rossignol i sar., 2004; Muhs, 2013; Jones i sar., 2017). Najčešće korišćeni organski pokazatelji paleoklime iz uzoraka vodenih ekosistema se ne mogu koristiti u paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa. Polen se u lesu ne može ekstrahovati u dovoljnim količinama, stoga palinologija daje neznatan doprinos rekonstrukciji vegetacije i paleoklime lesnog platoa (Sun i sar., 1997). Korišćenje radioaktivnog izotopa ugljenika mekušaca imao je kontraverznu istoriju, ali u novoj studiji Pigati i sar. (2010) su pokazali da određene vrste puževa ne ostavljaju dovoljnu količinu ugljenika u krečnjačkoj ljušturi. Isto tako je utvrđena kontradiktornost rezultata postignutih analizama n-alkana iz smole drveća i polena poreklom iz lesnog platoa Kine (Li i sar., 2016) i predložena je upotreba n-alkana samo kao pokazatelja promene u kompoziciji vrsta lokalne vegetacije. Takođe, pojedini naučnici su naveli nedoslednosti u podacima dobijenim analizom magnetne osetljivosti u različitim lesnim regionima (Begét i sar., 1990; Guo i sar., 2001; Bloemendal i Liu, 2005), stoga je predloženo da se informacije dobijene korišćenjem magnetne osetljivosti uzimaju s oprezom (Porter i sar., 2001). Usled nedostataka tradicionalno korišćenih metoda neophodno je uvođenje novog pristupa u analizama lesa i otkriće novih indikatora - organizama/organskih molekula koji ostaju očuvani u uslovima jakog sunčevog i UV zračenja, jakih suša, nedostatka vode i jakih vetrova.

S obzirom da je mineralni i organski sastav BLC pod veoma velikim uticajem lokalnih promena, biomasa organizama prisutnih u biološkoj lesnoj pokorici odražava klimatske uslove

datog područja (Smalley i sar., 2010). Cijanobakterije su prvi kolonizatori i najvažnije komponente BLC u kojima formiraju velike populacije (Belnap, 2006). Svirčev i sar. (2013) su prepoznali značaj cijanobakterija i njihovu potencijalnu važnu ulogu u procesima formiranja lesa i time postavili BLOCDUST hipotezu.

Kako su cijanobakterije po BLOCDUST hipotezi ključni činilac prilikom formiranja lesa odlični su kandidati za korišćenje u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Cijanobakterije su veoma osetljive na promene u sredini, stoga se intenzivno koriste kao pokazatelji promena ekoloških uslova (Pienitz i sar., 2000; Reuss, 2005; Reuss i sar., 2010; Funkey i sar., 2014; Florian i sar., 2015; Jiménez i sar., 2015; Cook i sar., 2016; Szymczak-Żyła i sar., 2017), a ukoliko ostavljaju za sobom fosilne zapise, njihovi biomarkeri mogu biti veoma korisni u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Upotrebom sekundarnih metabolita cijanobakterija kao biomarkera pružiće se mogućnost interpretacije klimatskih uslova koji su vladali u prošlosti u relativnoj skali. To znači da količina nekog biomarkera ne definiše apsolutne vrednosti paleoekoloških i paleoklimatskih elemenata i faktora, nego omogućava poređenje ispitivanog parametra iz različitih vremenskih zona. Otkrićem velike koncentracije određenog metabolita moglo bi se govoriti da li su u određenoj vremenskoj eri vladali uslovi visoke temperature ili je sredina bila baznija, sa izraženijim sunčevim i UV zračenjem ili sa većom količinom organskih materija u poređenju sa istim tim faktorima iz drugih vremenskih intervala. Izuzetno visoka zastupljenost određenog metabolita može ukazati na postojanje naglih stresnih promena u ekološkim uslovima. Analize novih potencijalnih biomarkera cijanobakterija, pre svega zaštitnih pigmentata i cijanotoksina, se mogu smatrati značajnim pomakom u paleoklimatskoj rekonstrukciji i paleoekološkoj interpretaciji „zapisa“ iz lesnih sedimenata.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Cilj doktorske disertacije je da se ispita potencijal sekundarnih metabolita vodenih i terestričnih (zemljišnih i lesnih) cijanobakterija Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija (NSCCC - Novi Sad Cyanobacterial Culture Collection) kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Analizama će biti obuhvaćeni pomoćni fotosintetički pigmenti (fikobilini), UV zaštitni pigmenti (scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline) i cijanotoksini (mikrocistini, cilindropermopsin i saksitoksin).

Glavni ciljevi istraživanja će biti ostvareni na sledeći način:

1. analizom produkcije pigmenata vodenih i terestričnih cijanobakterija NSCCC delovanjem abiotičkih faktora (pH, temperatura, izvor svetlosti, sadržaj azota u podlozi);
2. procenom stabilnosti pigmenata vodenih i terestričnih cijanobakterija NSCCC delovanjem stresnih abiotičkih (pH, temperatura, UV svetlost) i biotičkih faktora (delovanjem bakterijskih sojeva izolovanih iz bioloških lesnih pokorica);
3. analizom prisustva pigmenata u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama;
4. analizom toksičnosti i produkcije cijanotoksina lesnih cijanobakterija NSCCC;
5. procenom stabilnosti mikrocistina, izolovanog iz referentnog soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, delovanjem biotičkih faktora (bakterijskih sojeva izolovanih iz bioloških lesnih pokorica).



### **3. M A T E R I J A L I M E T O D E**

### 3.1. Prikaz ispitivanih cijanobakterija Novosadske kolekcije kultura

Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija (eng. Novi Sad Cyanobacterial Culture Collection - NSCCC) Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu sadrži preko 500 vodenih i terestričnih cijanobakterijskih sojeva (Slika 8) koji su izolovani u poslednjih 30 godina.



*Slika 8. Deo Novosadske kolekcije kulture cijanobakterija (NSCCC)*

Veliki broj korisnih podataka o karakteristikama sojeva NSCCC je dobijen prethodnim istraživanjima Svirčev (1992), Simeunović (2005), Svirčev i sar. (2008), Simeunović (2009), Pjevač (2010), Marković (2011), Babić i sar. (2013), Simeunović i sar. (2013), Svirčev i sar. (2013a,b), Tokodi (2016), itd.

U cilju dobijanja uvida u potencijalnu primenu sekundarnih metabolita cijanobakterija kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji, eksperimentalnim delom doktorske disertacije je u periodu od 2010. do 2016. godine analizirano ukupno 34 vodenih i terestričnih kultura

cijanobakterija NSCCC: 10 vodenih i 4 zemljišnih, 19 lesnih kultura cijanobakterija i jedan referentni soj (Tabela 2). Istraživanja su obuhvatala i analize lesnih uzoraka (6) i BLC (4).

Vodeni sojevi NSCCC obuhvaćeni analizama sprovedenim u okviru doktorske disertacije su poreklom iz različitih tipova vodenih ekosistema Srbije: reka (Tamiš, Krivaja), jezera (Palić, Mrtva Tisa), akumulacija (Tavankut, Zobnatica) i kanalske mreže Dunav-Tisa-Dunav (Bečej, Bačko Gradište). Analizirani zemljišni sojevi NSCCC su poreklom sa četiri lokaliteta u Vojvodini i to jedan sa zemljišta tipa černoze, a tri uzorka sa solonjeca. Lesni uzorci su uzeti sa različitih lokaliteta severnog Irana: Gorgan, sa područja Neka i Toshan, i sa lesnog platoa oko Agh Band; sa različitih lokaliteta lesne zaravni Vojvodine: Rume (45° 00' 43,8" N; 0,19° 51' 28,8" E), Starog Slankamena (45° 08' 20" N; 20° 15' 16" E), Titelskog brega (45° 16,51" N; 20° 14,53" E) i Batajnice (44° 54' N; 20° 17' E), i sa tri regiona Kine: Luochuan (N35°42.561', E109°23.952'), Xifeng (35°50'N, 107°40'E) i Zhangjiachuan regiona (100°–114°E, 34°–41°N).

Posebne šifre su pridodate kulturama u doktoratu radi preglednosti i lakše interpretacije rezultata, zajedno sa determinisanim rodovima (Tabela 2). Pored oznake NSCCC, kulture karakteriše broj i oznaka vezana za poreklo, tako da sve vodene cijanobakterije nose oznaku W, zemljišne oznaku T, a lesne oznaku L. Soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 dobijen iz Pasterove kolekcije kultura cijanobakterija (PCC-Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria) iz Pariza, poznat je kao proizvođač mikrocistina i zato predstavlja referentni soj (WR) odnosno kontrolu u eksperimentima.

**Tabela 2.** Šifre svih analiziranih cijanobakterija NSCCC sa poreklom i morfološkom pripadnošću

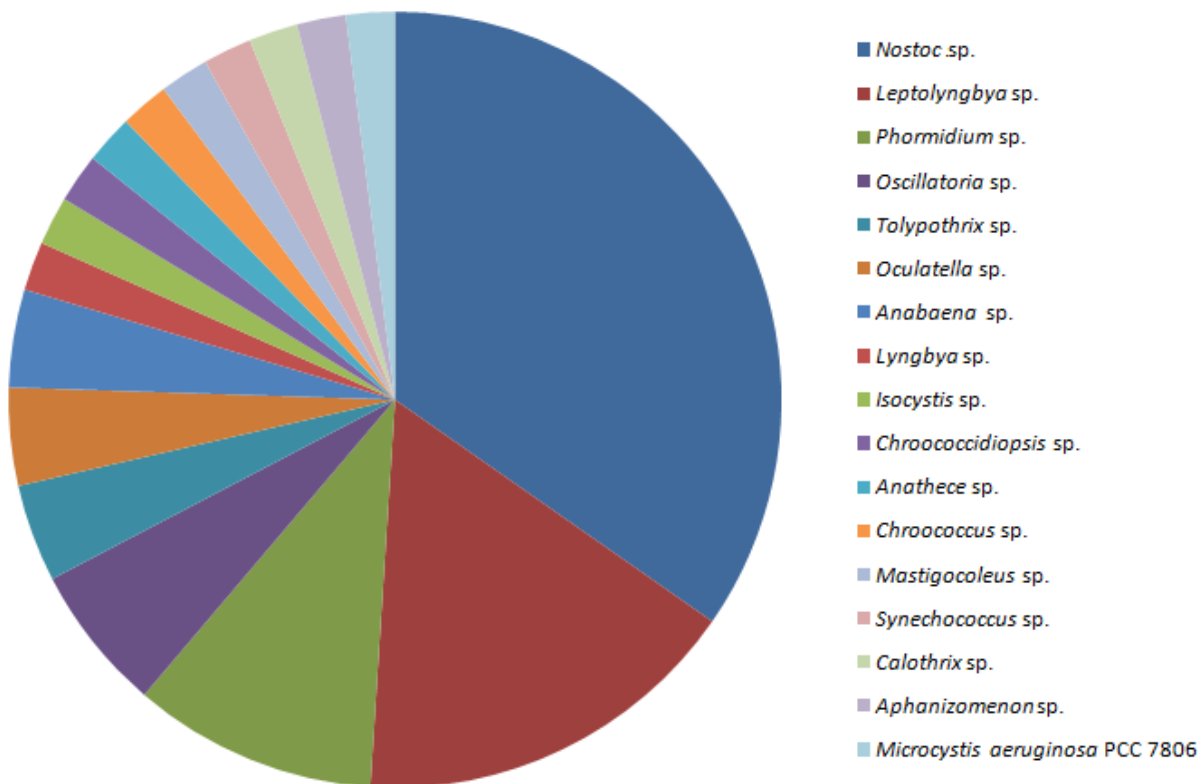
Redni broj	Šifre cijanobakterija	Cijanobakterijski rodovi	Poreklo	Heterocistni/neheterocistni
1.	NSCCC W1	<i>Anabaena</i> sp.	Mrtva Tisa	Heterocistni
2.	NSCCC W2	<i>Aphanizomenon</i> sp.	Krivaja	Heterocistni
3.	NSCCC W3	<i>Nostoc</i> sp.	Zobnatica	Heterocistni
4.	NSCCC W4	<i>Nostoc</i> sp.	DTD Bačko Gradište	Heterocistni
5.	NSCCC W5	<i>Nostoc</i> sp.	Tamiš	Heterocistni
6.	NSCCC W6	<i>Phormidium</i> sp.	Palić	Neheterocistni

7.	NSCCC W7	<i>Phormidium</i> sp.	Zobnatica	Neheterocistni
8.	NSCCC W8	<i>Oscillatoria</i> sp.	Krivaja	Neheterocistni
9.	NSCCC W9	<i>Oscillatoria</i> sp.	Tavankut	Neheterocistni
10.	NSCCC W10	<i>Oscillatoria</i> sp.	DTD Bečej	Neheterocistni
11.	NSCCC T1	<i>Calothrix</i> sp.	Solonjec	Heterocistni
12.	NSCCC T2	<i>Anabaena</i> sp.	Černozem	Heterocistni
13.	NSCCC T3	<i>Nostoc</i> sp.	Solonjec	Heterocistni
14.	NSCCC T4	<i>Nostoc</i> sp.	Solonjec	Heterocistni
15.	NSCCC L1	<i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Iran	Heterocistni, neheterocistni
16.	NSCCC L2	<i>Tolypothrix</i> sp., <i>Oculatella</i> sp.	Les-Iran	Heterocistni, neheterocistni
17.	NSCCC L3	<i>Chroococcus</i> sp., <i>Synechococcus</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Iran	Neheterocistni, heterocistni, neheterocistni
18.	NSCCC L4	<i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Iran	Heterocistni, neheterocistni
19.	NSCCC L5	cf. <i>Isocystis</i> sp., <i>Oculatella</i> sp.	Les-Iran	Neheterocistni, neheterocistni
20.	NSCCC L6	<i>Nostoc</i> sp., <i>Anathece</i> sp.	Les-Iran	Heterocistni, neheterocistni
21.	NSCCC L7	<i>Chroococidiopsis</i> sp.	Les-Srbija	Neheterocistni
22.	NSCCC L8	<i>Mastigocoleus</i> sp.	Les-Srbija	Heterocistni
23.	NSCCC L9	<i>Tolypothrix</i> sp., <i>Phormidium</i> sp.	Les-Srbija	Heterocistni, neheterocistni
24.	NSCCC L10	<i>Phormidium</i> sp.	Les-Srbija	Neheterocistni
25.	NSCCC L11	<i>Phormidium</i> sp., <i>Nostoc</i> sp.	Les-Kina, Luochuan	Neheterocistni, heterocistni
26.	NSCCC L12	<i>Nostoc</i> sp.	Les-Kina, Luochuan	Heterocistni
27.	NSCCC L13	<i>Nostoc</i> sp.	Les-Kina, Luochuan	Heterocistni
28.	NSCCC L14	<i>Nostoc</i> sp.,	Les-Kina, Luochuan	Heterocistni,

		<i>Leptolyngbya</i> sp.		neheterocistni
29.	NSCCC L15	<i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Kina, Luochuan	Heterocistni, neheterocistni
30.	NSCCC L16	<i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Kina, Luochuan	Heterocistni, neheterocistni
31.	NSCCC L17	<i>Nostoc</i> sp.	Les-Kina, Xiefeng	Heterocistni
32.	NSCCC L18	<i>Nostoc</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Kina, Xiefeng	Heterocistni, neheterocistni
33.	NSCCC L19	<i>Nostoc</i> sp., <i>Lyngbya</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.	Les-Kina, Zhangjiachuan	Heterocistni, neheterocistni, neheterocistni
34.	NSCCC WR	<i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i> PCC 7806	Referentni soj	Neheterocistni

\* BLC - biološke lesne pokorice.

U okviru doktorske disertacije analizirano je 17 različitih rodova: *Nostoc*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Tolypothrix*, *Oscillatoria*, *Oculatella*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Isocystis*, *Chroococcidiopsis*, *Anathece*, *Chroococcus*, *Mastigocoleus*, *Synechococcus*, *Calothrix*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* (Grafikon 1). Neheterocistni predstavnici čine 51% ispitivanih cijanobakterija NSCCC.



Grafikon 1. Analizirani rodovi cijanobakterija NSCCC

Analize uzoraka sa terena i kultivacija svih analiziranih vodenih i terestričnih cijanobakterija NSCCC su rađene na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

### 3.2. Kultivacija cijanobakterijskih kultura

Cijanobakterije su izolovane i gajene u tečnoj, mineralnoj podlozi BG11 (Tabela 3) sa azotom i bez azota (Rippka i sar., 1979). Bezazotna podloga korišćena je za gajenje svih heterocistnih azotofiksirajućih cijanobakterija, dok je azotna podloga bila pogodnija za rast neheterocistnih sojeva kod kojih svojstvo azotofiksacije nije izraženo. Soj *M. aeruginosa* PCC 7806 je gajen u tečnoj BG11 +/-N (modifikovanoj) podlozi. Kulture su u laboratoriji gajene u erlenmajer posudama od 250 ml pod kontrolisanim uslovima svetlosti i temperature.

Tabela 3. Sastav podloge BG11-N (Rippka i sar., 1979)

Sastojci podloge	Količina (g l <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub> *	1.500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0.040
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.036
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.020
Limunska kiselina	0.006
Fe amonijum citrat	0.006
EDTA	0.001
A5 (rastvor oligoelemenata)**	1 ml l <sup>-1</sup>

\* Modifikovana podloga BG11 +/- N sadrži 0.9 g l<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>;

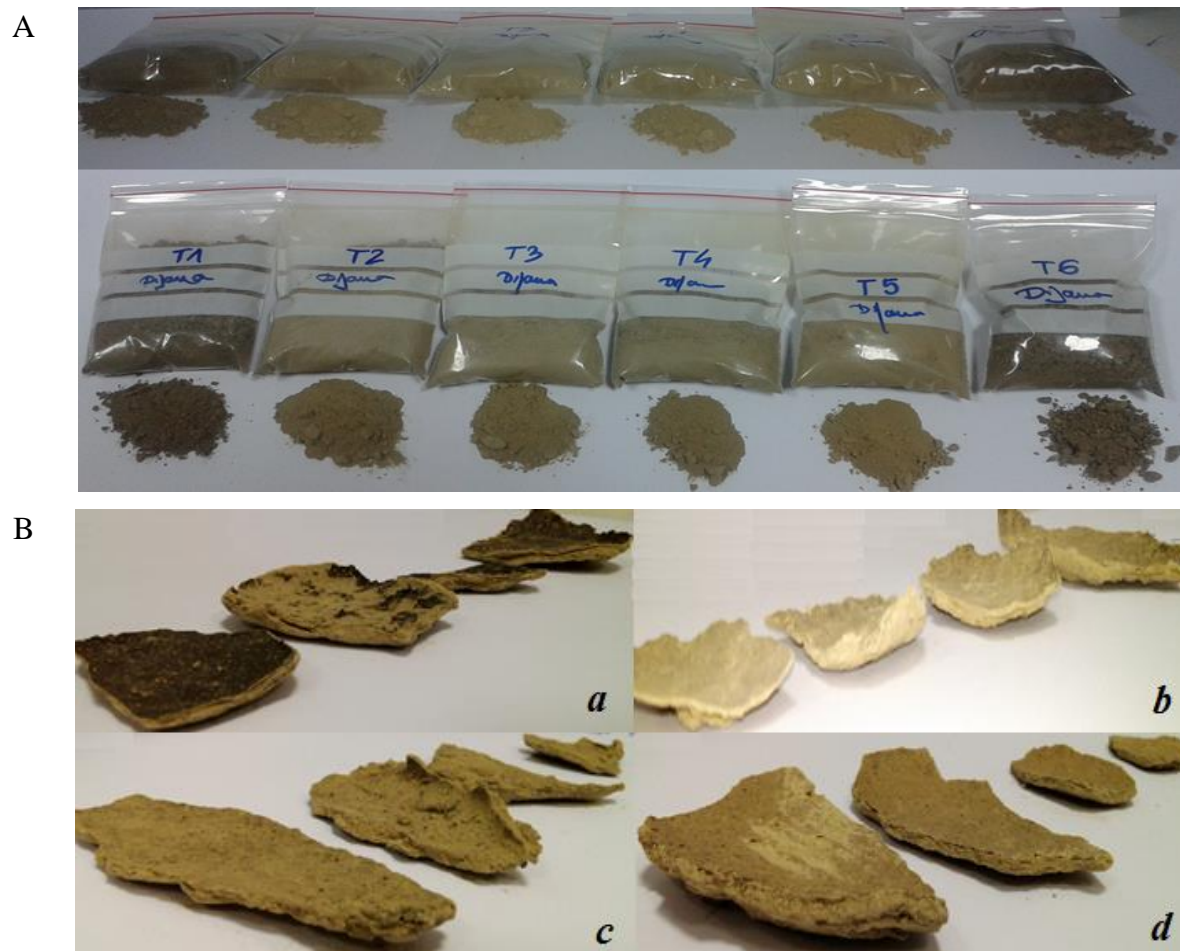
\*\*A5-mešavina oligoelemenata (A5 rastvor) sadrži (g l<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2.860); MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O (1.810); ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0.222); MoO<sub>3</sub> x 2H<sub>2</sub>O (0.390); CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (0.079); Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0.0494).

U pogledu trajanja perioda osvetljenosti i tame korišćen je režim 12 časova svetlosti i 12 časova tame. Temperatura kultivacije je bila u opsegu od 22-24 °C. Podloga je podešena na pH 7.6-7.7, a potom je sterilisana i ohlađena pre zasejavanja sojeva. U podlogama je pH nakon sterilizacije i hlađenja iznosila optimalnih 7.5.

Cijanobakterije su determinisane posmatranjem pod mikroskopom Olympus BX 51. Identifikacija vrsta cijanobakterija do nivoa roda rađena je prema standardnim ključevima (Komarek i Anagnostidis, 1998; Komarek i Anagnostidis, 2005; Komarek, 2013).

### 3.3. Uzorkovanje sedimenta i bioloških lesnih pokorica poreklom iz lesnih depoa Srbije

U okviru eksperimentalnog dela doktorske disertacije analizirano je prisustvo MOSA i MOMA iz 6 lesnih uzoraka sa Titelskog lesnog platoa (45° 16,51" N; 20° 14,53" E) i 4 uzorka bioloških lesnih pokorica poreklom iz regiona Rume (45° 00' 43,8" N; 0,19° 51' 28,8" E) (Slika 9).



*Slika 9. Analizirani uzorci lesa i bioloških lesnih pokorica: A-lesni uzorci (LES T1-T25, redom); B-biološke lesne pokorice: a) BLC 1; b) BLC 2; c) BLC 3; d) BLC 4*

Posebne šifre su date u doktoratu radi preglednosti i lakše interpretacije rezultata (Tabela 4). Pored oznaka vezanih za poreklo: LES-za lesne uzorke, odnosno BLC-za biološke lesne pokorice, karakteriše ih i odgovarajući broj.

*Tabela 4. Šifre analiziranih uzoraka lesa i bioloških lesnih pokorica sa poreklom*

Redni broj	Šifre	Poreklo	Opis
1.	LES T1	Les-Srbija (Titel)	Na površini ili neposredno ispod
2.	LES T5	Les-Srbija (Titel)	25 cm dubine



3.	LES T10	Les-Srbija (Titel)	50 cm dubine
4.	LES T15	Les-Srbija (Titel)	75 cm dubine
5.	LES T20	Les-Srbija (Titel)	100 cm dubine
6.	LES T25	Les-Srbija (Titel)	125 cm dubine
7.	BLC 1	BLC-Srbija (Ruma)	
8.	BLC 2	BLC-Srbija (Ruma)	
9.	BLC 3	BLC-Srbija (Ruma)	
10.	BLC 4	BLC-Srbija (Ruma)	

Sremska lesna zaravan na prostoru Vojvodine okružuje planinski predeo Fruške gore. Brojni lesni profili u Sremu detaljno su istraženi i dokazano je da oni predstavljaju pravo naučno bogatstvo za rekonstrukciju paleoklimatskih i paleoekoloških promena ovog područja (npr. Ruma). Lesni profil ciglane u Rumi nalazi se u okviru površinskog kopa „IGM Ruma“, na istočnom obodu naselja Ruma. Lesno-paleo-zemljišne sekvence ovog područja sadrže detaljne paleogeografske podatke o dešavanjima tokom mlađeg dela srednjeg i gornjeg pleistocena (Vasiljević, 2015).

Titelski lesni plato (Titelski breg) smešten je na krajnjem jugoistoku Bačke, između Titela, Vilova, Mošorina i reke Tise. Sa maksimalnom dužinom 16 km i maksimalnom širinom 7.2 km nosi naziv “lesno ostrvo” (Bokhorst i sar., 2009). U ovom području primetne su moćne naslage lesnog sedimenta debljine 35-55 m, razdvojene sa pet pedokompleksa deponovanih tokom poslednjih pet glacijalnih/interglacijalnih ciklusa (Marković i sar., 2005a).

Uzorci lesa i bioloških lesnih pokorica sakupljani su sa lesnih lokaliteta nakon vizuelnog pregleda. Uzorci su uzimani sa vertikalnog profila, tako što se prvo ukloni oko 10-20 cm materijala kako bi se uzimao materijal koji nije bio pod uticajem recentnih spoljašnjih faktora. Zatim se na tom očišćenom profilu uzimaju uzorci na svakih 5 cm. Uzorkovanje je vršeno špatulom i lopaticom, a uzorci su odloženi u propisno obeležene kesice. Po povratku u laboratoriju čuvani su u suvim i mračnim uslovima.

### 3.4. Analiza produkcije i procena stabilnosti pigmenata cijanobakterija

Analiza produkcije zavisno od uticaja sredinskih faktora i procena stabilnosti pigmenata cijanobakterija NSCCC delovanjem abiotičkih i biotičkih faktora rađena je na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

#### 3.4.1. Analitička preciznost dobijenih rezultata

Uobičajen metod analize pigmentnog sastava uključujući i UV zaštitnih pigmenata - scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina je spektrofotometrijska analiza. Primenjena metoda je korišćena u velikom broju studija u kojima je referisano prisustvo scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina (npr. Garcia-Pichel i Castenholz, 1992; 1993; Garcia-Pichel i sar., 1993; Brenowitz i Castenholz, 1997; Dillon i Castenholz, 1999; Dillon i sar., 2002). S obzirom na problem nabavke standarda scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina na tržištu javljaju se značajne poteškoće prilikom potvrde HPLC ili LC-MS(/MS) metodama da su ekstrahovani metaboliti upravo scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline. S obzirom da je zbog kompleksnosti molekula scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina teško sa velikom sigurnošću govoriti da su spektrofotometrijski analizirani molekuli scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline, u doktorskoj disertaciji su uvedene nove skraćenice. Pod oznakom **MOSA** biće predstavljeni Metaboliti u Opsegu Scitonemin Apsorbance, a pod oznakom **MOMA** - Metaboliti u Opsegu Mikosporin Apsorbance. Procedura pripreme uzoraka, ekstrakcija i kvantifikacija MOSA i MOMA će biti rađena po postupcima prethodno utvrđenim za scitonemin, odnosno mikosporinu slične aminokiseline (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993; Dillon i Castenholz, 1999). Stoga, mi pretpostavljamo da su prisustvo i funkcija metabolita MOSA i MOMA usko povezani sa prisustvom i funkcijama scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina. Potencijal MOSA i MOMA kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji smatra se jednako korisnim kao i potencijal scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina, i dalje se o njima diskutuje na taj način.

### 3.4.2. Analiza produkcije i procena stabilnosti metabolita u opsegu scitonemin apsorbanca i metabolita u opsegu mikosporin apsorbanca vodenih i zemljišnih cijanobakterija

#### 3.4.2.1. Analiza uticaja abiotičkih faktora na produkciju MOSA i MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija

U svrhu određivanja uticaja različitih faktora sredine na produkciju MOSA i MOMA, kulture su izlagane tretmanima: delovanja različitih pH vrednosti podloge, različitih temperatura kultivacije, različitog izvora svetlosti i delovanja sadržaja nutrijenata (azota) u podlozi.

Sprovedeno je utvrđivanje **uticaja pH vrednosti podloge** na produkciju MOSA i MOMA kultivacijom cijanobakterija u podlogama sa pH 6.0, 7.5 i 9.0. pH vrednost podloge je podešavana korišćenjem hlorovodonične kiseline i natrijum-hidroksida. Svi uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi od  $23 \pm 2$  °C, na prirodnoj dnevnoj svetlosti. Tokom kultivacije (21 dan) kulture su mešane tri puta na dan.

Uticaj temperature gajenja na produkciju MOSA i MOMA analiziran je kultivacijom **u uslovima delovanja različitih temperatura**: 10-15 °C, 20-25 °C i 30-35 °C. Sve kulture su rasle u podlozi sa pH 7.5, na prirodnoj dnevnoj svetlosti. Tokom kultivacije (21 dan) kulture su mešane tri puta na dan.

U svrhu analize produkcije MOSA i MOMA **zavisno od različitih izvora svetlosti** kulture su gajene na sobnoj temperaturi od  $23 \pm 2$  °C, u podlozi sa pH 7.5, pod prirodnim osvetljenjem tokom 21 dan. Sve kulture su tokom kultivacionog perioda mešane tri puta na dan, kako bi se izbegao efekat taloženja i senčenja. Nakon perioda kultivacije, kulture su izlagane osvetljenju bele fluorescentne svetlosti, prirodne dnevne svetlosti i UV svetlosti u trajanju od 60 h. Eksperiment analiziranja produkcije MOSA i MOMA pod uticajem bele fluorescentne svetlosti ( $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; 12:12 svetlo/mrak) i prirodne dnevne svetlosti je sproveden u erlenmajer posudama. Za tretman delovanja UV svetlosti, kulture su uzgajane u otvorenim staklenim petri posudama (prečnika=9 cm, dubine=1.5 cm), u specijalno dizajniranom UV laminaru opremljenom lampama za emitovanje bele fluorescentne svetlosti i UV svetlosti.

U cilju utvrđivanja **uticaja sadržaja azota** u podlozi na produkciju MOSA i MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC, kulture su uzgajane u podlozi BG11-N (Rippka i

sar., 1979) obogaćenoj azotom (+N) i u podlozi siromašnoj azotom (-N). Podloga sa azotom je sadržala  $1.5 \text{ g l}^{-1} \text{ NaNO}_3$  (u obliku nitrata) kao izvor azota, dok je podloga siromašna azotom sadržala kao izvor azota  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0.0494 \text{ g l}^{-1}$ ) (u obliku nitrata) i Fe amonijum citrat ( $0.006 \text{ g l}^{-1}$ ) (u obliku amonijum jona).

Uticaj azota na sintezu MOSA i MOMA posmatrao se tokom gajenja kultura u podlozi različitih pH vrednosti (6.0, 7.5, 9.0), pod uticajem različitih temperatura gajenja ( $10\text{-}15 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $30\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i pod uticajem različitih izvora svetlosti (bela fluorescentna svetlost, prirodna dnevna svetlost i UV svetlost).

U cilju utvrđivanja produkcije MOSA i MOMA **zavisno od dužine izlaganja UV svetlosti** kulture su izlagane UV svetlosti u različitom vremenskom periodu. Kulture su uzgajane u specijalno dizajniranom UV laminaru opremljenom lampama za emitovanje bele fluorescentne svetlosti i UV lampama, u otvorenim staklenim petri posudama (prečnika=9 cm, dubine=1.5 cm) na sobnoj temperaturi od  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , u podlozi sa pH 7.5. Posle određenog perioda kontinuiranog izlaganja UV svetlosti (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) analizirana je produkcija MOSA i MOMA.

### **3.4.2.2. Procena uticaja abiotičkih faktora na stabilnost MOSA i MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija**

Nakon prethodno opisanog eksperimenta produkcije MOSA i MOMA delovanjem UV svetlosti analizirana je stabilnost ekstrahovanih pigmenata. Ekstrakti iz tretmana sa najvećom produkcijom MOSA i MOMA su korišćeni za utvrđivanje njihove stabilnosti delovanjem abiotičkih faktora. Posmatran je uticaj različite pH vrednosti i različite temperature, kao i prolongirane ekspozicije UV svetlosti.

Ekstrahovani MOSA i MOMA su tretirani **različitim pH vrednostima** podloge (6.0, 7.5 i 9.0) u trajanju od jednog dana, tri i šest dana. Za tretman utvrđivanja uticaja pH na stabilnost MOSA i MOMA, ekstrakti su razblaženi na pH od 6.0, 7.5 i 9.0. pH vrednost je podešena hlorovodoničnom kiselinom i natrijum-hidroksidom. Nakon određenog vremenskog perioda su izmerene apsorbanse svih uzoraka na spektrofotometru.

Ekstrahovani MOSA i MOMA su izlagani tretmanu uticaja **različitim temperaturnih vrednosti** podloge ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u trajanju od jednog dana, tri i šest dana. Uticaj

različitih temperatura na MOSA i MOMA je testiran inkubacijum u vodenom kupatilu. Nakon određenog vremena su spektrofotometrijski izmerene apsorbance svih uzoraka.

Ekstrahovan MOSA i MOMA su izlagani **UV svetlosti u različitom vremenskom periodu** (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) unutar UV laminara. Uporedo sa eksperimentom stabilnosti pod UV svetlom, sprovedeno je i utvrđivanje stabilnosti u kontrolnim uslovima (na sobnoj temperaturi, u uslovima dnevnog osvetljenja) u vremenskoj zavisnosti (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Nakon određenog vremenskog perioda, merena je vrednost apsorbance na spektrofotometru.

### **3.4.3. Analiza produkcije i procena stabilnosti fikobilina, metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance lesnih cijanobakterija**

#### **3.4.3.1. Analiza produkcije fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija**

Pre početka sprovođenja eksperimenta produkcije i stabilnosti fikobilina, MOSA i MOMA, lesne cijanobakterije su kultivisane po prethodno opisanoj proceduri (Poglavlje 3.2.) u podlozi BG11 (Rippka i sar., 1979), na pH 7.5 i na temperaturi od  $23 \pm 2$  °C. Nakon kultivacije (21 dan), merene su vrednosti apsorbance fikobilina na spektrofotometru i pristupilo se sprovođenju procedure testa biodegradabilnosti tokom 0 h, 24 h, 36 h i 60 h.

Za tretman analize sposobnosti produkcije MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC, nakon perioda kultivacije (Poglavlje 3.2.), kulture su gajene pod UV svetlom u trajanju od 60 h u specijalno dizajniranom UV-laminaru na sobnoj temperaturi od  $23 \pm 2$  °C. Potom su merene vrednosti apsorbance MOSA i MOMA na spektrofotometru i pristupilo se sprovođenju testa biodegradabilnosti tokom 0 h, 24 h, 36 h i 60 h.

#### **3.4.3.2. Procena uticaja biotičkih faktora na stabilnost fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija**

S ciljem utvrđivanja stabilnosti fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC rađen je test biodegradabilnosti odnosno utvrđivanja stepena njihove razgradnje u prisustvu tri različita soja bakterija izolovanih iz lesnih uzoraka (Slika 10).



*Slika 10. Bakterijski sojevi korišćeni u testu biodegradabilnosti*

U sterilnim uslovima odmereno je 5 g lesnog uzorka (što je približno 2.5 ml) i stavljeno u erlenmajer posudu sa 47.5 ml rastvora Na-pirofosfata (1:10 tj.  $10^{-1}$ ) i promešano kružnim potezima. 1 ml tog rastvora je dodat u 9 ml Na-pirofosfata ( $10^{-2}$ ). Isti postupak je ponavljan do dobijanja finalnih razblaženja od  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Inkubacioni period je trajao 7 dana na  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Iz epruvete sa određenim razblaženjem, sterilnom pipetom uzeto je 0.1 ml inokuluma i zasejano u petri ploču sa agarizovanom podlogom (UBB podloga-za ukupnu brojnost bakterija). Inkubacija je trajala 7 dana na  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Radi dobijanja čiste kulture bakterija, nakon inkubacije, pristupilo se postupku iščišćavanja (Slika 11). Ezom, zagrejanom do usijanja, pojedinačne kolonije su postupkom iscrpljivanja zasejavane na svežu agarizovanu podlogu (UBB). Inkubacija je vršena u trajanju od 24 h. Izrastanjem uniformnih kolonija, dobijene su čiste kulture.

*Slika 11. Postupak iscrpljivanja*

Merenje bakterijske ćelijske koncentracije u suspenziji je urađeno metodom određivanja optičke gustine (Turbidometrijski metod po McFarland-u). Apsorbanca suspenzije bakterija u fiziološkom rastvoru je očitavana na 600 nm na denzitometru i dodavanjem fiziološkog rastvora/bakterijske suspenzije podešavana je vrednost 0.5 na denzitometru ( $10^8$  ćelija  $\text{ml}^{-1}$  po McFarlandovoj skali). Prenosom 1 ml bakterijske suspenzije u 99 ml uzorka cijanobakterija dobijena je startna brojnost bakterija od  $10^6$  ćelija  $\text{ml}^{-1}$ .

Pre početka sprovođenja testa biodegradabilnosti, pristupalo se uzastopnom zamrzavanju i odmrzavanju kultura i sonifikaciji (3x 10 minuta, 30 sek/30 sek). Kada su ćelije cijanobakterija lizirane, u epruvete sa 6 ml uzorka cijanobakterija dodato je 60  $\mu$ l inokuluma bakterija  $10^8$  ćelija  $\text{ml}^{-1}$ . Inkubacija je vršena u termostatu na 28 °C u određenom vremenskom periodu (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Nakon određenog perioda inkubacije, radi ekstrakcije pigmenata, uzorci su resuspendovani u odgovarajućem rastvaraču-za fikobiline 0.001 M natrijum fosfatni pufer; za MOSA-90% aceton i za MOMA-20% metanol. Potom je usledila sonifikacija u trajanju od 10 minuta u ciklusima od 30 sek/30 sek, a nakon toga centrifugiranje na 12.000 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Supernatant je odliven u odgovarajuće epruvete. Kvantifikacija degradacije pigmenata vršena je merenjem apsorbanci na spektrofotometru (Beckman DU-65 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Instruments). Uporedo sa sprovođenjem testa biodegradabilnosti, rađen je i eksperiment u normalnim uslovima rasta bez dodavanja bakterija zavisno od vremenskog intervala (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) (kontrola).

### **3.4.4. Metode određivanja koncentracije fikobilina, metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance cijanobakterija**

#### **3.4.4.1. Metoda određivanja koncentracije fikobilina**

Kako bi se odredio sadržaj fikobilina, nakon filtracije kulture kroz GF/C (Whatman) filtere, vršeno je resuspendovanje filtera sa 0,001 M natrijum fosfatnim puferom (pH=7.0). Uzorci su ostavljeni u mraku 24 h, na sobnoj temperaturi. Nakon toga je rađeno uzastopno zamrzavanje na -20 °C i odmrzavanje na 4 °C, i sonifikacija uzoraka (10 minuta, 30 sek/30 sek) radi cepanja ćelijskog zida i ekstrakcije pigmenata. Potom su uzorci centrifugirani na 12.000 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Supernatant je odvojen (Slika 12) i apsorbance su očitane na spektrofotometru (Beckman DU-65 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Instruments) na talasnim dužinama od 562 nm za fikoeritrin (PE), 615 nm za fikocijanin (PC) i na 652 nm za alofikocijanin (APC), uz upotrebu pufera kao slepe probe (Bennett i Bogorad, 1973).



Slika 12. Ekstrakcija fikobilina zemljišnih cijanobakterija NSCCC

Koncentracije pigmenata ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) su određene korišćenjem očitanih apsorbanci i sledećih formula (Bennett i Bogorad, 1973):

$$\text{PE}[\text{mg/ml}] = \frac{(\text{A562} - 2.41 \times \text{PC} - 0.849 \times \text{APC})}{9.62}$$

$$\text{PC}[\text{mg/ml}] = \frac{(\text{A615} - 0.474 \times \text{A652})}{5.34}$$

$$\text{APC}[\text{mg/ml}] = \frac{(\text{A652} - 0.208 \times \text{A615})}{5.09}$$

Vrednosti su dobijene kao srednja vrednost tri ponavljanja.

Koncentracija ukupnih fikobilina u kulturi je determinisana na osnovu jednačine:

$$\text{FIKOBILINI (mg/ml)} = \frac{C \times V_e}{V_c}$$

C-Vrednost PC, APC i PE dobijena iz navedenih jednačina;

$V_e$ -Zapremina ekstrakta (ml);

$V_c$ -Zapremina kulture (ml).

Sadržaj ukupnih fikobilina izražava se koncentracijom ukupnih fikobilina po suvoj biomasi ( $\text{mg mg}^{-1}$ ).



### 3.4.4.2. Metoda određivanja koncentracije MOSA

Ekstrakcija MOSA rađena je po proceduri Dillon i Castenholz (1999) sa modifikacijama radi bolje ekstrakcije. Za ekstrakciju MOSA, kulture su filtrirane kroz GF/C filtere (Whatman filters) i macerirane 30 sekundi, nakon čega su zamrznute na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Potom je usledila liofilizacija na  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 2 sata. Nakon toga uzorci su resuspendovani u 90% acetonu i ostavljeni 24 h na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Potom se pristupilo uzastopnom zamrzavanju i odmrzavanju. Zatim su uzorci sonifikovani (10 minuta, u ciklusima od 30 sek/30 sek) i centrifugirani na 12.000 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Supernatant je odličen u epruvete i apsorbance pigmenata su određene za svaki uzorak.

Apsorbance ekstrakata su očitane na spektrofotometru Beckman (DU-65 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Instruments) na 384 nm (scitonemin maksimum), 490 nm (karotenoidi), 663 nm (hlorofil *a*). Vrednost apsorbance na 750 nm je oduzeta od svih izmerenih apsorbanci.

Sadržaj MOSA izražen je kroz trihromatsku jednačinu (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991) za određivanje sadržaja scitonemina:

$$A_{\lambda} = 1.04 A_{384} - 0.79 A_{663} - 0.27 A_{490}$$

$A_{\lambda}$ -izmerena apsorbance na  $\lambda$ ;

$A_{384}$ -apsorbance na 384 nm;

$A_{663}$ -apsorbance na 663 nm;

$A_{490}$ -apsorbance na 490 nm.

Jedinica predstavlja apsorbancu 1 mg suve mase materijala ekstrahovanog u 1 ml acetona u kivetu sa 1 cm dužinom svetlosnog puta. Specifičan sadržaj je izražen kao  $A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991).

Za ekstrakciju MOSA iz lesnih uzoraka i iz BLC, ista količina uzoraka je odmerena, macerirana i rastvorena u 90% acetonu. Uzorci su inkubirani tokom noći na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , potom sonifikovani u trajanju od 10 minuta (sa ciklusima 30 sek/30 sek). Nakon centrifugiranja (12,000g tokom 10 min), supernatant je filtriran kroz GF/C filtere (Whatman) i apsorbance su izmerene na UV-Vis spektrofotometru (DU-65 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Instruments) po prethodno objašnjenoj proceduri.

Kao što je rečeno u Poglavlju 3.4.1. o kvalitativnoj strukturi ekstrahovanih metabolita može se govoriti sa sigurnošću samo upotrebom specifičnijih metoda (poput HPLC ili LC-MS(/MS)) uz korišćenje odgovarajućih standarda. Kako je kupovina standarda scitonemina neizvodljiva, pristupilo se kvalitativnom određivanju ekstrahovanih metabolita kod ispitivanih sojeva korišćenjem LC-MS(/MS) metode, poređenjem retencionog vremena sa podacima za scitonemin dostupnim u literaturi. Kao standard je korišćen ekstrakt scitonemina dobijen iz BLC, prečišćen kolonskom i tankoslojnom hromatografijom. Ovom metodom je urađena analiza produkcije scitonemina kod sojeva korišćenih tokom izrade doktorske disertacije, ali samo da se utvrdi da li je scitonemin nađen spektrofotometrijski kao MOSA prilikom stimulisanja kultura UV svetlošću. Nakon analiza produkcije i degradacije MOSA pod različitim faktorima, ove analize nisu rađene zbog malih količina izolovanog standarda scitonemina.

#### ***3.4.4.2.1. LC-MS(/MS) analiza scitonemina ekstrahovanog iz cijanobakterija***

Radi kvalitativnog određivanja ekstrahovanih MOSA, analizirane vodene i terestrične cijanobakterije NSCCC su podvrgnute kontinuiranom izlaganju UV svetlosti u periodu od 5 dana, nakon čega je sledio postupak ekstrakcije MOSA (Poglavlje 3.4.4.2.). Kvalitativne analize scitonemina iz navedenih ekstrahovanih uzoraka vršene su metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS(/MS)). Tečni hromatograf Agilent 1200 (Agilent technologies) umrežen je sa masenim spektrometrom (Bruker HCT Ion Trap Mass Spectrometer).

Za razdvajanje je korištena kolona Supelco Discovery C18 5 cm x 21 mm column. Mobilne faze činile su A: 1% aceto-nitril, 99% H<sub>2</sub>O i 0.1% metanska (mravlja) kiselina, B: 100% aceto-nitril, 0.1% metanska (mravlja) kiselina. Analize su vršene pod sledećim uslovima:

➤ LC metoda:

Vreme: 25 minuta; Brzina toka mobilne faze: 0.3 ml/min; Odnos mobilnih faza: 70% A/30% B; Gradijent toka mobilnih faza: 0.00 min 70% A/30% B; 15.00 min 10% A/90% B; 18.00 min 10% A/90% B; 18.10min 90% A/10% B.

➤ MS metoda:

Temperatura grejača: 40 °C.

Metod skeniranja: standardan/unapređen (opseg: 450-560 m/z; brzina: 8.100 m/z/sec); Polarnost: pozitivna; Pritisak: 30.0 psi; Dinamika gasa: 8.0 l/min; Temperatura: 350 °C; Masa target jona: 545 m/z.

➤ ***Priprema standarda***

Priprema standarda scitonemina vršena je na sledeći način:

a) Ekstrakcija

1g biološke pokorice ekstrahovan je sa 20 ml kombinacije rastvarača aceton:etil-acetat (v/v 1:1) tokom perioda od 24 h. Ekstrakt je centrifugiran 15 minuta na 3000 rpm, nakon čega je odvojen supernatant.

b) Prečišćavanje –korak 1 – kolonska hromatografija

Korištena je metoda kolonske (niskopritisne) hromatografije u staklenoj koloni sa silika česticama. Ekstrakt je apliciran na kolonu i eluiran gradijentnom aplikacijom rastvarača: heksan i etil-acet. Scitonemin je eluiran pri sledećem odnosu rastvarača: 20% heksan 80% etil-acetat, pa sve do 100% etil-acetat.

c) Prečišćavanje – korak 2 – tankoslojna hromatografija

Oko 10 mg suve mase scitonemina rastvoreno je u 1 ml acetona. 500 µl rastvora aplicirano je na bazu ploče za preparativnu tankoslojnu hromatografiju (20 x 20 cm). Pigment je eluiran kombinacijom rastvarača – hloroform:metanol 9:1 (v/v). Na ploči je došlo do izdvajanja smeđe-zelene trake koja predstavlja scitonemin.

### **3.4.4.3. Metoda određivanja koncentracije MOMA**

Ekstrakcija MOMA rađena je po proceduri Garcia-Pichel i Castenholz (1993) za ekstrakciju i kvantifikaciju mikosporinu sličnih aminokiselina sa modifikacijama radi bolje ekstrakcije i determinacije sadržaja MOMA. Za ekstrakciju MOMA, kulture su filtrirane

korišćenjem GF/C filtera (Whatman filters) i vršena je maceracija 30 sekundi, potom su zaleđeni tokom noći na -20 °C. Usledila je liofilizacija u trajanju od 2 sata na -85 °C. Liofilizirani uzorci su resuspendovani u 20% rastvoru metanola i homogenizovani na 45 °C u vodenom kupatilu na 2 sata, a nakon toga su ostavljeni u frižideru 24 h. Potom je usledio postupak sonifikacije (10 minuta u ciklusu od 30 sek/30 sek) i centrifugiranja na 12.000 obrtaja tokom 10 minuta. Supernatant je odliven u epruvete i apsorbancija je određivana spektrofotometrijski.

Specifični sadržaj MOMA određen je spektrofotometrijski na spektrofotometru Beckman (DU-65 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Instruments) iz metanolskih ekstrakata merenjem apsorbance ekstrakta na talasnoj dužini maksimuma apsorbance mikosporinu sličnih aminokiselina i korekcije su urađene prema jednačini (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993):

$$A_{\lambda}^* = A_{\lambda} - A_{260} (1.85 - 0.005\lambda)$$

$A_{\lambda}^*$ -korigovana vrednost apsorbance na maksimumu;

$A_{260}$ -apsorbancija na 260 nm;

$A_{\lambda}$ -izmerena vrednost apsorbance na maksimumu;

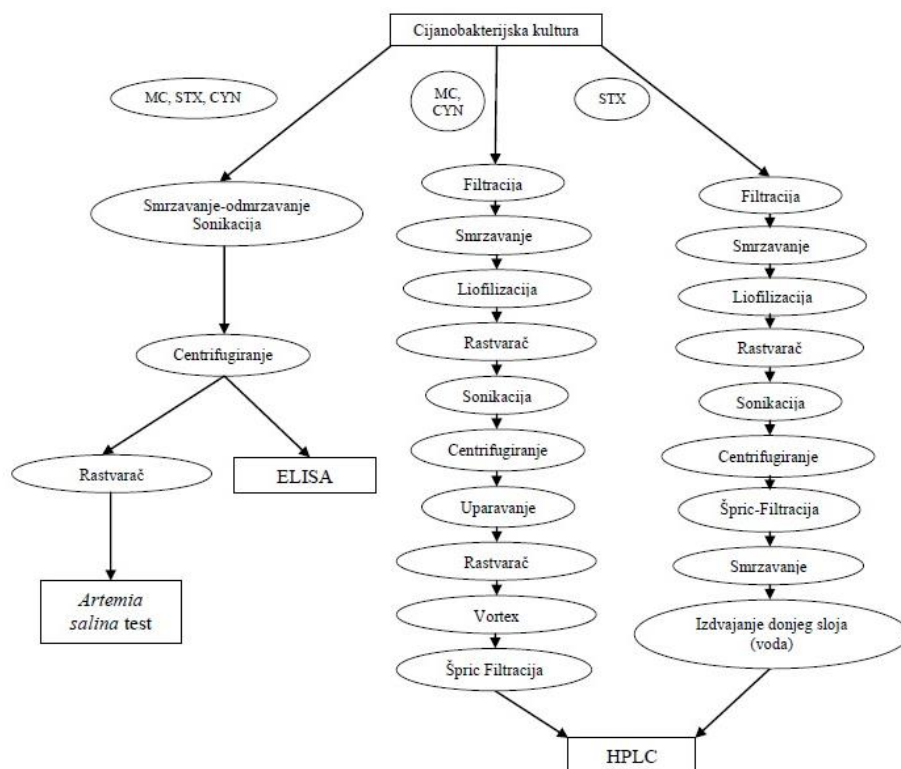
$\lambda$ -talasna dužina (nm) maksimalne apsorbance.

U nedostatku apsorpcionog koeficijenta, koncentracija se izražava kao A (apsorbancija ili optička gustina). Jedan A jednak je vrednosti apsorbance kada je supstanca rastvorena u 1 ml rastvarača i izmerena u kiveti sa 1 cm dužinom svetlosne staze. Specifični sadržaj se izražava kao  $A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993).

Za ekstrakciju MOMA iz lesnih uzoraka i iz BLC, ista količina uzoraka je odmerena, macerirana i rastvorena u 20% rastvoru metanola. Uzorci su inkubirani tokom noći na +4 °C, potom sonifikovani u trajanju od 10 minuta (sa ciklusima 30 sek/30 sek). Nakon centrifugiranja (12,000g tokom 10 min), supernatant je filtriran kroz GF/C filtere (Whatman filters), a apsorbancije su izmerene na UV-Vis spektrofotometru (DU-65 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Instruments) po prethodno objašnjenoj proceduri.

### 3.5. Analiza toksičnosti i produkcije cijanotoksina lesnih cijanobakterija i procena stabilnosti mikrocistina

Doktorskom disertacijom obuhvaćena su istraživanja utvrđivanja toksičnosti i sposobnosti produkcije cijanotoksina 19 lesnih cijanobakterijskih kultura i jednog referentnog soja (*M. aeruginosa* PCC 7806). S ciljem utvrđivanja toksičnosti lesnih cijanobakterija NSCCC i sposobnosti produkcije cijanotoksina (mikrocistina (MCs), cilindrospermopsina (CYN) i saksitoksina (STX)), sprovedene su tri metode: biološka metoda - *Artemia salina* bioesej, biohemijska metoda - ELISA test i fizičko-hemijske metode - LC-MS(/MS) i HPLC (Šema 1).



Šema 1. Šematski prikaz sprovedenih metoda za detekciju toksičnosti i produkciju cijanotoksina

Priprema uzoraka, analiza toksičnosti korišćenjem *A. salina* bioeseja, detekcija cijanotoksina lesnih cijanobakterija NSCCC, kao i postupci bakterijske kultivacije i izolacije, priprema kulture *M. aeruginosa* PCC 7806 i test biodegradabilnosti mikrocistina korišćenjem ELISA testa su rađene na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta

Univerziteta u Novom Sadu. Detekcija cijanotoksina lesnih cijanobakterija NSCCC metodom HPLC i LC-MS(/MS) je rađena u Laboratoriji Departmana za biohemiju, Turku, Finska (Åbo Akademi University).

### 3.5.1. Metoda određivanja toksičnosti - *Artemia salina* bioesej

U cilju detekcije toksičnosti lesnih cijanobakterija NSCCC primenjen je bioesej u kom su indikator organizmi larve račića *A. salina* (Kiviranta i sar., 1991).

#### ➤ *Priprema uzoraka za Artemia salina bioesej*

Kako bi se obezbedilo oslobađanje cijanobakterijskog intracelularnog sadržaja, uključujući i cijanotoksina ukoliko su prisutni, vršeno je razaranje ćelijskog zida postupkom trostrukog uzastopnog zamrzavanja i odmrzavanja 2 ml svakog soja. Potom su uzorci sonifikovani u trajanju od 10 min u ciklusima 30 sek/30 sek na sonifikatoru (250, Branson). Usledilo je centrifugiranje na 10.000 obrtaja u trajanju od 15 minuta (Multi-Spin MSC 6000). Dobijeni supernatant je odliven i korišćen u daljim analizama. Bioesej je rađen u mikrotitar pločama koje su prethodno sterilisane UV svetlošću i dobro isprane destilovanom vodom.

#### ➤ *Postupak Artemia salina bioeseja*

Račići *A. salina* su gajeni u podlozi ASW (slana voda, eng. *Artificial sea water*) čiji je sastav prikazan u Tabeli 5. U 100 ml podloge dodato je 0,6 g suvih jajašaca larvi račića *A. salina* (Artemia-mix, SERA, SAD). Inkubacija je trajala 24-36 h u uslovima stalne aeracije i osvetljenosti na temperaturi od 24-28 °C (Slika 13). Račići koji su se izlegli koristili su se za testiranje toksičnosti pripremljenih uzoraka. Toksičnost korišćenjem larvi račića procenjivana je po autorima Kiviranta i sar. (1991).

Tabela 5. Sastav podloge ASW za gajenje račića *Artemia salina*

Sastojci	Količina u g l <sup>-1</sup>
NaCl	24.0
KCl	0.6
MgSO <sub>4</sub>	6.0
CaCl <sub>2</sub>	0.7
MgCl <sub>2</sub>	4.5

Slika 13. Kultivacija *A. salina* u termostatu na 28 °C i *A. salina* u kontroli: ASW + račići (foto: D. Pantelić)

U svaki vel mikrotitar ploče dodato je 100  $\mu$ l ASW sa 10-20 larvi račića i 50  $\mu$ l uzorka i pristupljeno je sprovođenju testa toksičnosti. Mikrotitar ploča je inkubirana 24 h na 30 °C uz osvetljenje u termostatu.

Nakon 24 h očitani su rezultati prebrojavanjem uginulih jedinki pod lupom odnosno evidentirana je nepokretnost larvi. Preživjele jedinke su žrtvovane dodavanjem 100  $\mu$ l 100% metanola u svaki vel. Nakon 15 minuta je prebrojan ukupan broj jedinki u svakom velu, a broj uginulih larvi koristi se za izračunavanje mortaliteta. Test je rađen u tri ponavljanja pri čemu su rezultati toksičnosti izraženi kao srednja vrednost u procentima, a kao kontrola je korišćena ASW podloga sa račićima bez uzoraka, pri čemu se očekuje da smrtnost ne bude veća od 5% za 24 časa. Toksičnost se određuje kao razlika mortaliteta dobijenog u tretmanima i kontroli.

Nivo toksičnosti kultura je određivan prema sledećim kriterijumima (Simeunović, 2009):

- Vrlo visoka toksičnost-mortalitet veći od 90%;
- Značajan nivo toksičnosti-mortalitet veći od 50%, a manji od 90%;
- Niska toksičnost-mortalitet ispod 50%.

### 3.5.2. Metoda određivanja koncentracije cijanotoksina - enzimski imuno-vezujući (ELISA) test

Analiza prisustva cijanotoksina mikrocistina, cilindropermopsina i saksitoksina u lesnim cijanobakterijama NSCCC određivana je ELISA testom i to korišćenjem tri kita: Mikrocistin Plate Kit, Cilindropermopsin Plate Kit i Saksitoksin Plate Kit (Beacon Analytical Systems, INC., Saco, ME, USA). Prema proizvođaču, opseg detekcije mikrocistina i cilindropermopsina je od 0.1-2.0 ppb ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), dok je opseg detekcije toksičnosti saksitoksina od 0.02-0.32 ppb ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Rastvarači ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) korišćeni u pripremi uzoraka su takođe testirani kako bi služili kao kontrola za eliminaciju potencijalnih lažno pozitivnih rezultata. Soj *M. aeruginosa* PCC 7806 je korišćen kao pozitivna kontrola. Rezultati dobijeni ELISA testom su očitani na čitaču za mikrotitarploče (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Nemačka). Intenzitet obojenosti obrnuto je proporcionalan koncentraciji prisutnih toksina u uzorku. Uzorci koji sadrže male koncentracije cijanotoksina dopuštaju da antitelo veže više cijanotoksin-enzim konjugata. Rezultat je tamno plavo obojenje rastvora (tamnija boja=manja koncentracija toksina, i obrnuto). Beacon ELISA kitovi preporučuju se za skrining cijanotoksina i poželjno je proveriti rezultate alternativnim metodama.

#### ➤ *Priprema uzoraka za ELISA test*

ELISA kitovi su dizajnirani u svrhu skrininga cijanotoksina i nije potrebna posebna priprema uzoraka, samo procedura koja obezbeđuje liziranje ćelijskog zida. U cilju razaranja ćelije i oslobađanja unutarćelijskog sadržaja uključujući potencijalno prisutne cijanotoksine, od svakog soja je uzeto 2 ml i potom se pristupilo postupku uzastopnog zamrzavanja i odmrzavanja, u tri ponavljanja, a zatim je vršena sonikacija u trajanju od 10 min u ciklusima 30 sek/30 sek (sonifikator 250 Branson). Nakon toga su uzorci centrifugirani 15 min na 10.000 obrtaja/min (Multi-Spin MSC 6000). Dobijeni supernatant je korišćen za ELISA test radi detekcije prisustva cijanotoksina mikrocistina, cilindropermopsina i saksitoksina.



➤ **Postupak ELISA testa za detekciju mikrocistina**

Prema protokolu, procedura ELISA testa za detekciju mikrocistina je bila sledeća:

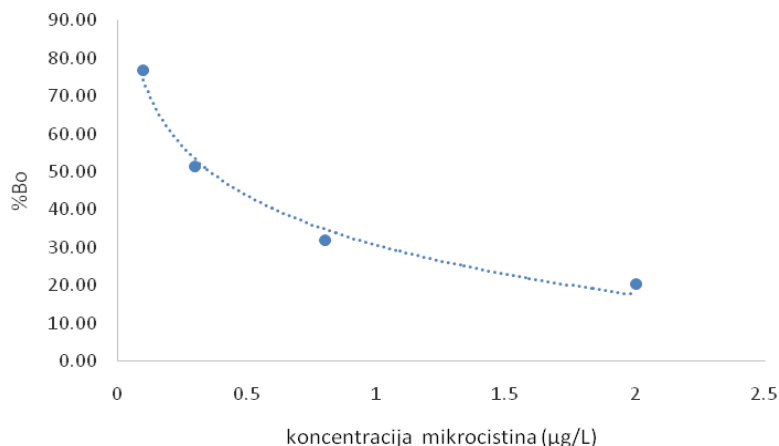
- a) Ubačeno je 50  $\mu$ l enzim konjugata u velove mikrotitar ploče;
- b) Dodato je 50  $\mu$ l rastvora standarda, kontrole ili uzorka u odgovarajuće velove mikrotitar ploče;
- c) Dodato je 50  $\mu$ l rastvora antitela u pojedinačne velove pomoću multikanalne pipete. Potom su velovi prekriveni parafilmom i sadržaj svakog vela je pažljivo mešan kružnim pomeranjem ploče po podlozi 30 sekundi. Inkubacija je rađena u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi;
- d) Nakon perioda inkubacije sadržaj mikrotitar ploče je prosut. Velovi su ispirani četiri puta sa 250  $\mu$ l pufera za ispiranje (pufer za ispiranje je koncentrovan i treba se razblažiti dejonizovanim vodom, tako što se u posudi od 1 l napravi rastvor odnosa 1:5, npr. 100 ml rastvora i 400 ml dejonizovane vode). Ostatak rastvora je uklonjen tapkanjem ploče po papirnim ubrusima i mikrotitar ploča je osušena;
- e) Dodato je 100  $\mu$ l supstrata za bojenje u svaki vel pomoću multikanalne pipete. Velovi su prekriveni parafilmom i promešani po prethodno objašnjenom postupku. Inkubacija je rađena na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta;
- f) Dodato je 100  $\mu$ l stop rastvora (rastvora kojim je zaustavljena reakcija bojenja uzorka) u svaki vel pomoću multikanalne pipete (Pažljivo rukovoditi procedurom jer je stop rastvor 1 M hlorovodonična kiselina);



g) 15 minuta nakon dodavanja stop rastvora vršeno je očitavanje absorbance na 450 nm pomoću ELISA čitača (Slika 14) (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Nemačka; Software: specrostarNano).

*Slika 14. Očitavanje apsorbance na 450 nm pomoću čitača mikrotitar ploča*

Standardna kriva se pravi nakon svakog novog merenja, a koncentracije toksina u uzorku određuju se interpolacijom. Za svaki uzorak lesnih sojeva cijanobakterija rezultat predstavlja srednju vrednost tri merenja dobijenih interpolacijom iz standardne krive (Grafikon 2).



**Grafikon 2.** Standardna kriva za mikrocistin u ELISA testu

➤ **Postupak ELISA testa za detekciju cilindrospermopsina**

Procedura za detekciju cilindrospermopsina korišćenjem ELISA testa sastojala se iz sledećih koraka:

- a) Korišćenjem multikanalne pipete dodato je 50 µl rastvora enzim konjugata u svaki vel mikrotitar ploče;
- b) Dodato je 50 µl rastvora standarda, kontrole ili uzorka u svaki vel korišćenjem multikanalne pipete;
- c) Dodato je 50 µl rastvora antitela u svaki vel mikrotitar ploče. Mikrotitar ploča je prekrivena parafilmom, a sadržaj svakog vela je promešan na prethodno objašnjen način oko 30 sekundi;
- d) Inkubacija se vrši u trajanju od 45 minuta;
- e) Sadržaj mikrotitar ploče je bačen i pristupilo se postupku pranja u tri ponavljanja (sa po 300 µl pufera za ispiranje). Tapkajući mikrotitar ploče po ubrusu uklonjen je zaostatak sadržaja, a potom su ploče ostavljene na ubrusu u obrnutom položaju;
- f) Dodato je 100 µl rastvora supstrata za bojenje u svaki vel mikrotitar ploče;
- g) Inkubacija u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku;

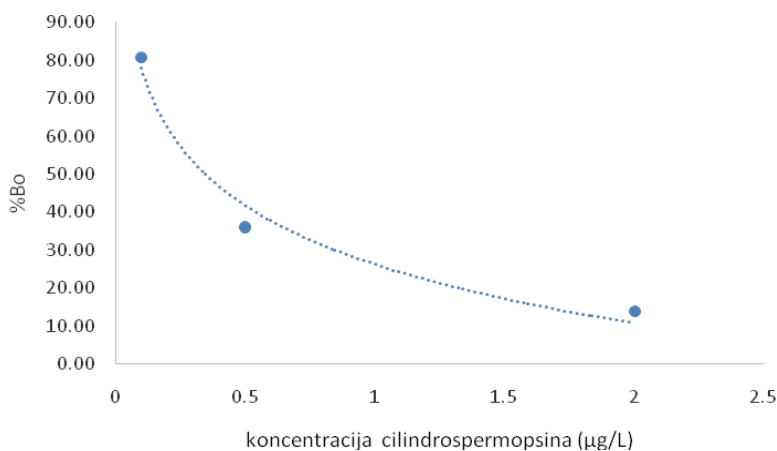


h) Dodato je 100  $\mu\text{l}$  stop rastvora u svaki pojedinačni vel mikrotitar ploče (Slika 15);

*Slika 15. Dodavanje stop rastvora u velove mikrotitar ploče*

i) Nakon 15 minuta, očitavana je apsorbancu na 450 nm korišćenjem ELISA čitača (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Nemačka; Software: specrostarNano).

Standardna kriva se pravi nakon svakog merenja, a koncentracija toksina predstavlja srednju vrednost tri merenja određenu interpolacijom iz standardne krive (Grafikon 3).



*Grafikon 3. Standardna kriva za cilindrospermopsin u ELISA testu*

#### ➤ *Postupak ELISA testa za detekciju saksitoksina*

Priprema uzoraka za detekciju saksitoksina se sastojala iz sledećih koraka:

a) Multikanalnom pipetom dodato je 50  $\mu\text{l}$  rastvora enzim konjugata u svaki pojedinačni vel;

b) Dodato je 50  $\mu\text{l}$  rastvora standarda, kontrole ili uzoraka u velove mikrotitar ploče;

c) Dodato je 50  $\mu\text{l}$  rastvora sa antitelima u svaki vel pomoću multikanalne pipete. Mikrotitar ploča je prekrivena parafilmom, a sadržaj svakog vela je promešan na prethodno objašnjen način oko 30 sekundi i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi;

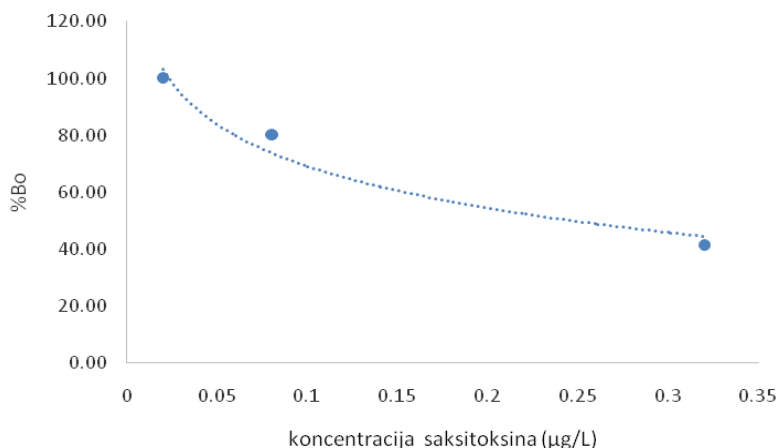
d) Sadržaj velova je dekantovan, ispiran četiri puta sa po 300  $\mu\text{l}$  pufera za ispiranje, potom su mikrotitar ploče osušene tapkanjem ploče o ubruse;

e) Dodato je 100  $\mu\text{l}$  rastvora supstrata za bojenje u velove. Inkubacija je rađena na sobnoj temperaturi u mraku u trajanju od 30 minuta;

f) Dodato je 100  $\mu\text{l}$  stop rastvora u svaki vel pomoću multikanalne pipete;

g) Nakon 15 min od dodavanja stop rastvora očitana je absorbanca na 450 nm pomoću ELISA čitača (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Nemačka; Software: specrostarNano).

Za svaki uzorak lesnih cijanobakterija koncentracije toksina predstavljaju srednju vrednost tri merenja dobijenih interpolacijom iz standardne krive (Grafikon 4).



**Grafikon 4.** Standardna kriva za saksitoksin u ELISA testu

### 3.5.3. Metode određivanja koncentracije cijanotoksina - LC-MS(MS) i HPLC

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i tečna hromatografija - masena spektrometrija (LC-MS(MS)) su analitičke hemijske metode korišćene za kvantitativnu i kvalitativnu detekciju cijanotoksina u uzorcima. Primena ovih metoda omogućava mnogo precizniju kvantitativnu analizu uzoraka u odnosu na *A. salina* bioesej i ELISA test. Lesne cijanobakterije NSCCC su analizirane na LC-MS(MS) i HPLC u cilju detekcije mikrocistina

(Spoof i sar., 2003; Hautala i sar., 2012), cilindropermopsina (Spoof i sar., 2006; Kokocinski i sar., 2013) i saksitoksina (Sayfritz i sar., 2008).

➤ **Priprema uzoraka za detekciju mikrocistina LC-MS(/MS) metodom**

Priprema uzoraka lesnih cijanobakterija NSCCC za detekciju mikrocistina LC-MS(/MS) metodom je tekla po sledećoj proceduri:

a) određena količina lesnih cijanobakterija je filtrirana kroz filtere (MUNKTELL GF/C filtere (*glass microfiber filters*) ( $\varnothing$  47 mm));

b) filteri su osušeni na sobnoj temperaturi;

c) filteri su stavljeni u plastične kivetice i ostavljeni u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na nekoliko sati, do potpunog smrzavanja;

d) filteri su tokom noći liofilizirani korišćenjem liofilizatora (CHRIST ALPHA 1-4 LSC (temperatura  $\sim -54\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; pritisak  $\sim 0.520\text{ mbar}$ ));

e) 3 ml 75% metanola je dodato u kivetice sa filterima;

f) uzorci su zajedno sonifikovani u ultrazvučnom sonifikatoru u trajanju od 15 minuta;

g) svaki uzorak je pojedinačno tretiran ultrasonikator sandom (BANDELIN SONOPLUS HD 2070) u trajanju od jedne minute;

h) 1.5 ml svakog uzorka je prebačen u endorfice;

i) endorfice su centrifugirane na 10.000 obrtaja u trajanju od 10 minuta;

j) uzeto je 1 ml supernatanta i prebačeno u vialu;

k) uzorci su potom uparavani na temperaturi od  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  na struji azota (Thermo Scientific, Pierce, Reacti-Therm #18824/Heating mode);

l) upareni uzorci su rastvoreni sa  $300\text{ }\mu\text{l}$  75% metanolom;

m) uzorci su vorteksirani 30 sekundi (VORTEX-GENE 2);

n) uzorci su propušteni kroz špric filtere (GHP ACRODISC  $\varnothing$ 13 mm sa  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  GHP membranama (PALL)). Finalna zapremina je korišćena za detekciju mikrocistina LC-MS(/MS) metodom.

➤ **Priprema uzoraka za detekciju cilindrospermopsina LC-MS(/MS) metodom**

Pripreme uzoraka lesnih cijanobakterija NSCCC za detekciju cilindrospermopsina LC-MS(/MS) metodom je išla po koracima:

a) određena količina lesnih cijanobakterija je filtrirana kroz filtere (MUNKTELL GF/C filtere (*glass microfiber filters*) ( $\varnothing$  47 mm));

b) filteri su osušeni na sobnoj temperaturi;

c) filteri su stavljeni u plastične kivetice i ostavljeni u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na nekoliko sati, do potpunog zamrzavanja;

d) filteri su tokom noći liofilizirani korišćenjem liofilizatora (CHRIST ALPHA 1-4 LSC (temperatura  $\sim -54\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; pritisak  $\sim 0.520\text{ mbar}$ ));

e) 3 ml 75% metanola je dodato u kivetice sa filterima;

f) uzorci su zajedno sonifikovani u ultrazvučnom sonifikatoru tokom 15 minuta;

g) svaki uzorak je pojedinačno tretiran ultrasonikator sandom (BANDELIN SONOPLUS HD 2070) u trajanju od jedne minute;

h) 1.5 ml svakog uzorka je prebačen u ependorfice;

i) ependorfice su centrifugirane na 10.000 obrtaja u trajanju od 10 minuta;

j) 1 ml supernatanta je prebačen u viala;

k) uzorci su potom uparavani na temperaturi od  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  na struji azota (Thermo Scientific, Pierce, Reacti-Therm #18824/Heating mode);

l) upareni uzorci su rastvoreni sa 300  $\mu\text{l}$  50% metanola;

m) uzorci su vorteksirani 30 sekundi (VORTEX-GENE 2);

n) uzorci su propušteni kroz špric filtere (GHP ACRODISC  $\varnothing$ 13 mm sa  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  GHP membranama (PALL)) i finalna zapremina uzoraka korišćena je za detekciju cilindrospermopsina metodom LC-MS(/MS).

➤ **Priprema uzoraka za detekciju saksitoksina HPLC metodom**

Za detekciju saksitoksina uzorci lesnih cijanobakterija NSCCC, koji su analizirani metodom HPLC, pripremljeni su po sledećoj proceduri:

- a) određena količina uzoraka je filtrirana kroz filter (MUNKTELL GF/C filtere (*glass microfiber filters*) (ø 47 mm));
- b) filteri su osušeni na sobnoj temperaturi;
- c) filteri su stavljeni u plastične kivetice i ostavljeni u zamrzivaču na -20 °C na nekoliko sati, do potpunog zamrzavanja;
- d) filteri su tokom noći liofilizirani korišćenjem liofilizatora (CHRIST ALPHA 1-4 LSC (temperatura ~ -54 °C; pritisak ~ 0.520 mbar));
- e) liofilizirani filteri su ekstrahovani sa 1.5 ml (polovina filtera) i 3 ml (ceo filter) 80% acetonitril koji sadrži 0.1% mravlje kiseline;
- f) ekstrakti su sonifikovani u ultrazvučnom sonifikatoru u trajanju od 15 minuta;
- g) svaki uzorak je dalje tretiran ultrasonikator sondom (BANDELIN SONOPLUS HD2070);
- h) 1-1.5 ml uzorka je prebačeno u ependorvice i centrifugirano na 10.000 obrtaja 10 minuta;
- i) 1 ml supernatanta je odvojeno i propušteno kroz špric filtere (GHP ACRODISC ø13 mm sa 0.2 µm GHP membranom (PALL));
- j) filtrirani ekstrakti su stavljeni u zamrzivač na -20 °C na kratko vreme, nakon čega su formirana dva sloja-gornji sloj je bio acetonitril, a donji voda;
- k) donji (vodeni) sloj je izdvojen u viala i finalna zapremina uzoraka korišćena je za detekciju saksitoksina HPLC metodom.

Za interpretaciju i validaciju rezultata (procena povezanosti signala i koncentracije) neophodno je vršiti proveru tačnosti metode. Standardi 8 varijanti mikrocistina (MC-LR, dm MC-LR, MC-RR, dm MC-RR, MC-LY, MC-LW, MC-LF i MC-YR), cilindrospermopsina i saksitoksina su korišćeni za proveru **recovery** tokom detekcije cijanotoksina u analiziranim uzorcima. Na samom početku vršeno je kontrolno prskanje svakog uzorka toksinima poznate koncentracije i njihova dalja priprema je tekla po prethodno opisanoj proceduri. U prirodnim

uzorcima je potrebno ispitati efekat matriksa i proceniti *recovery* nakon ekstrakcije. *Recovery* predstavlja odgovor detektora dobijen posle ekstrakcije određene količine analita iz biološkog materijala, u odnosu na odgovor dobijen određivanjem iste količine čistog standarda (bez postupka ekstrakcije). *Recovery* je procenat izračunat na osnovu koncentracija toksina u prskanom prirodnom uzorku koji je bio negativan (ukoliko je bio pozitivan samo se od vrednosti ovog kontrolnog prskanog uzorka oduzme vrednost istog uzorka koji nije prskan) koja se pomnoži sa masom uzorka i zatim podeli prskanim volumenom toksina i pomnoži sa 100.

### ➤ *Postupak LC-MS(/MS) i HPLC metode*

Pri analiziranju hromatograma dobijenih LC-MS(/MS) i HPLC metodom potrebni su **standardi cijanotoksina**. Referentni materijal za mikrocistine je dobijen iz cijanobakterija *Microcystis wesenbergii* NIES-107 (National Institute of Environmental Studies, Tsukuba, Japan) i *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 (Institut Pasteur, Pariz, Francuska). Ekstrakt cijanobakterije *Microcystis wesenbergii* NIES-107 korišćen je za pripremu standarda sledećih toksina: MC-RR, dm-MC-RR, MC-YR, MC-LR i dm-MC-LR. Standardi pripremljeni pomoću ekstrakta soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 uključuju MC-LR, MC-LY, MC-LW i MC-LF. Ekstrakcija i purifikacija mikrocistina rađena je po metodi Meriluoto i Spooft (2005a,b). Ekstrakti su rastvoreni u 75% metanolu i razblaženi do odgovarajuće koncentracije za analizu.

Lesne kulture cijanobakterija NSCCC su testirane i na prisustvo cilindropermopsina metodom LC-MS(/MS) (Spooft i sar., 2006; Kokocinski i sar., 2013) u laboratoriji u Finskoj (Biosciences/Åbo Akademi). Referentni uzorak za identifikaciju izabranih cilindropermopsina bio je ekstrakt *Microcystis wesenbergii* NIES-107. Ekstrakti su rastvoreni u 50% metanolu (zbog jače polarnosti) i razblaženi do odgovarajuće koncentracije za analizu.

Lesne cijanobakterije NSCCC su pored mikrocistina i cilindropermopsina analiziranih metodom LC-MS(/MS) analizirani i na prisustvo saksitoksina, korišćenjem Merck Hitachi LaChrom HPLC-sistema (Tokijo, Japan). Referentni materijal za saksitoksin je dobijen iz NRC-IMB, Halifax, Kanada.

**Uredaj za detektovanje** mikrocistina, koji se nalazi na Katedri za biohemiju, Biosciences/Åbo Akademi Univerziteta u Finskoj, koristi Agilent Technologies (Waldbronn, Nemačka) 1200 Rapid Rezolucija (RR) LC povezane sa Bruker Daltonics HCT Ultra Ion trap



MS (Bremen, Nemačka) sa elektosprej izvorom (ESI). Za razdvajanje je korišćena Ascentis C18 kolona (Supelco, Bellefonte, PA, SAD) dimenzija 50 mm × 3 mm I.D. sa 3 μm česticama, zaštićena C8 kolonom 4 mm × 2 mm i tempirana na 40 °C. Komponente su eluirane u gradijentnom modu: 0 min 25% B, 5-6 min 70% B, gde su komponente mobilne faze: A=voda sa 1% acetonitrilom i 0.1% mravljom kiselinom, a B=acetonitril sa 0.1 % mravljom kiselinom (Fluka, Buchs, Švajcarska). Protok mobilne faze bio je 0.5 ml/min, injekcioni interval bio je 10 min, zapremina injekcije 5 μl, a temperatura kolone je održavana na 40 °C. Parametri jonskog izvora bili su: temperatura gasa za sušenje 225 °C, protok gasa za sušenje 11 l/min, pritisak nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4,0 kV, pozitivni polaritet. Komponente su detektovane u MRM modu, pri čemu je za sve mikrocistine praćena tranzicija u jon m/z 135, pri kolizionoj energiji od 36 V za MC-YR, 40 V za dm-MC-RR i MC-RR, i 60 V za preostale varijante mikrocistina. Joni prekursori dati su u Tabeli 6.

*Tabela 6. Joni prekursori i tranzicija u jon*

<b>Jon</b>	<b>m/z</b>
[dmMC-RR+2H] <sup>2+</sup>	512.8
[MC-RR+2H] <sup>2+</sup>	519.8
[MC-YR+2H] <sup>2+</sup>	523.3
[dmMC-LR+H] <sup>+</sup>	981.5
[MC-LF+H] <sup>+</sup>	986.5
[MC-LR+H] <sup>+</sup>	995.5
[MC-LY+H] <sup>+</sup>	1002.5
[MC-LW+H] <sup>+</sup>	1025.5

Za analize cilindrospermopsina koristili su se isti LC-MS(/MS) instrumenti kao i za analize mikrocistina.

Obrada podataka za mikrocistine i cilindrospermopsin je urađena softverom DataAnalysis (Bruker).

**Uređaj za detektovanje** saksitoksina je HPLC-sistem koji se sastoji od kvaternarne pumpe (L-7100), autosamplera (L-7200) i termostatiranog odeljka za kolonu (L-7360). Za odvajanje saksitoksina korišćena je Waters Xbridge C18, 3,5 μm, 150 mm × 3 mm I.D. kolona

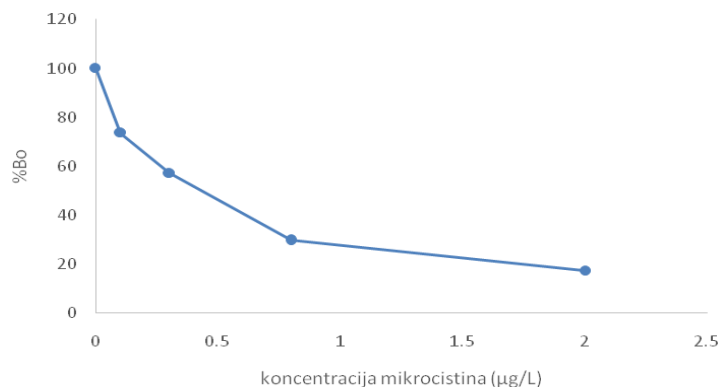
(Milford, MA, USA) na 40 °C. Mobilna faza se sastojala od rastvarača A (6 mM oktansulfonske kiseline, 6 mM heptansulfonske kiseline, 40 mM amonijum-fosfata, 20% fosforne kiseline, 1% tetrahidrofurana, pH 7.0) i B (7 mM oktansulfonske kiseline, 7 mM heptansulfonske kiseline, 48 mM amonijum-fosfata, 20% fosforne kiseline, 10% acetonitrila, 1% tetrahidrofurana). Analiti su eluirani u sledećem režimu: od 0 do 6 min 100 % A, od 7,5 do 32 min 100 % B, od 33 min do 45 min 100 % A, sa protokom 0,55 ml/min. Post-kolonska oksidacija je rađena na PTFE reakcionoj petlji (15 m x 0,3 mm I.D.), na 60 °C, sa 5 mM perjodne kiseline i 275 mM amonijaka u vodi, sa protokom 0,3 ml/min. pH je redukovana do kisele upotrebom 0.38 mM azotne kiseline, sa protokom 0.4 ml/min i oksidovani derivati su detektovani fluorescentnim detektorom na  $\lambda_{Ex}$  330 nm,  $\lambda_{Em}$  395 nm.

Obrada podataka za saksitoksin je urađena softverom Empower™ 2 software (Waters).

### **3.5.4. Procena stabilnosti mikrocistina cijanobakterijskog soja *M. aeruginosa* PCC 7806 biodegradacijom**

Kako bi se utvrdila stabilnost cijanotoksina, rađen je test biodegradabilnosti mikrocistina, izolovanog iz referentnog soja-*M. aeruginosa* PCC 7806. Test biodegradabilnosti mikrocistina podrazumevao je analizu stabilnosti delovanjem tri različita soja bakterija izolovanih iz lesnih uzoraka, a koncentracije mikrocistina nakon testa biodegradabilnosti određivane su ELISA testom. Postupci *Izolacija bakterija* i *Merenje bakterijske ćelijske koncentracije u suspenziji metodom određivanja optičke gustine* su rađeni po proceduri koja je objašnjena u okviru Poglavlja 3.4.3.2..

Odmereno je 6 ml kulture *M. aeruginosa* PCC 7806, nakon čega se pristupilo postupku trostrukog, uzastopnog zamrzavanja i odmrzavanja i sonikacije (10 min, 30 sek/30 sek). Kada su ćelije cijanobakterija lizirane, u epruvete je dodato 60  $\mu$ l inokuluma bakterija  $10^8$  ćelija  $\text{ml}^{-1}$ . Na isti način je pripremljena i kontrola, samo bez dodavanja bakterija. Inkubacija je rađena u termostatu na 28 °C. U određenim vremenskim razmacima (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) uzorci i kontrola su zaleđeni do očitavanja na ELISA testu. Kvantifikacija degradacije mikrocistina vršena je pomoću ELISA testa, a priprema uzoraka i sam postupak je tekao po proceduri koja je prethodno objašnjena (Poglavlje 3.5.2.). Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja dobijenih interpolacijom iz standardne krive (Grafikon 5).



**Grafikon 5.** Standardna kriva za mikrocistin dobijena u ELISA testu

### 3.6. Statistička obrada podataka

U cilju utvrđivanja zavisnosti između ispitivanih parametara vršena je statistička obrada podataka. Svi rezultati i grafici obrađeni su u programu Microsoft Office Excel.

Statistička analiza produkcije i specifičnog sadržaja fikobilina, MOSA, MOMA i cijanotoksina je određena analizom varijanse (eng. *one-way analysis of variance*, ANOVA) (DSAASAT version 1.101.). Za utvrđivanje statistički značajne razlike korišćen je Fišerov test višestrukog poređenja (eng. *Fisher's multiple comparison test*) sa nivoom značajnosti od  $p < 0.01$ .

Za otkrivanje sojeva sa najboljom produkcijom pigmenata u uslovima određenih sredinskih faktora, kao i za otkrivanje da li je određeni pigment dobar biomarker u paleoklimi i za koje uslove koristio se model multiplikativne interakcije (eng. *Additive main effect and multiplicative interaction-AMMI model analyses*) (Gauch i Zobel, 1996). AMMI model je obrađen u programu GenStat 9th Edition VSN International Ltd ([www.vsn-intl.com](http://www.vsn-intl.com)) 2009. Podaci su prvo urađeni klasičnom dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), a nakon toga su se, na osnovu podele  $G \times E$  (Genotype (soj)  $\times$  Environment (sredina)) interakcijskog efekta, AMMI modelom identifikovali ciljni sojevi za ciljne sredine, odnosno sredine za dominantnu produkciju određene grupe pigmenata. Prihvaćeni su stepeni slobode određeni po Gollob-ovom metodu (Gauch, 1992).

Podaci dobijeni LC-MS(/MS) metodom za scitonemin analizirani su softverskim programom Bruker Data Analysis i prikazani odgovarajućim hromatogramima izolovanog scitonemina.

Rezultati dobijeni *A. salina* bioesejem su obrađeni u programu Microsoft Excel. Za obradu podataka dobijenih ELISA testom upotrebljen je softver SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Nemačka). Podaci dobijeni LC-MS(/MS) metodom za mikrocistine i cilindrospermopsin analizirani su softverskim programom DataAnalysis (Bruker). Podaci dobijeni HPLC metodom za saksitoksine analizirani su softverom Empower™ 2 software (Waters).

## **4. R E Z U L T A T I**

## **4.1. Produkcija i stabilnost pigmenata cijanobakterija iz Novosadske kolekcije kultura**

Analizirana je sposobnost produkcije veoma bitne grupe sekundarnih metabolita cijanobakterija - pigmenata: fikobilina, metaboliti u opsegu scitonemin apsorbance (MOSA) i metaboliti u opsegu mikosporin apsorbance (MOMA) vodenih, zemljišnih i lesnih cijanobakterija NSCCC, kao i njihova stabilnost nakon delovanja različitih abiotičkih i biotičkih faktora.

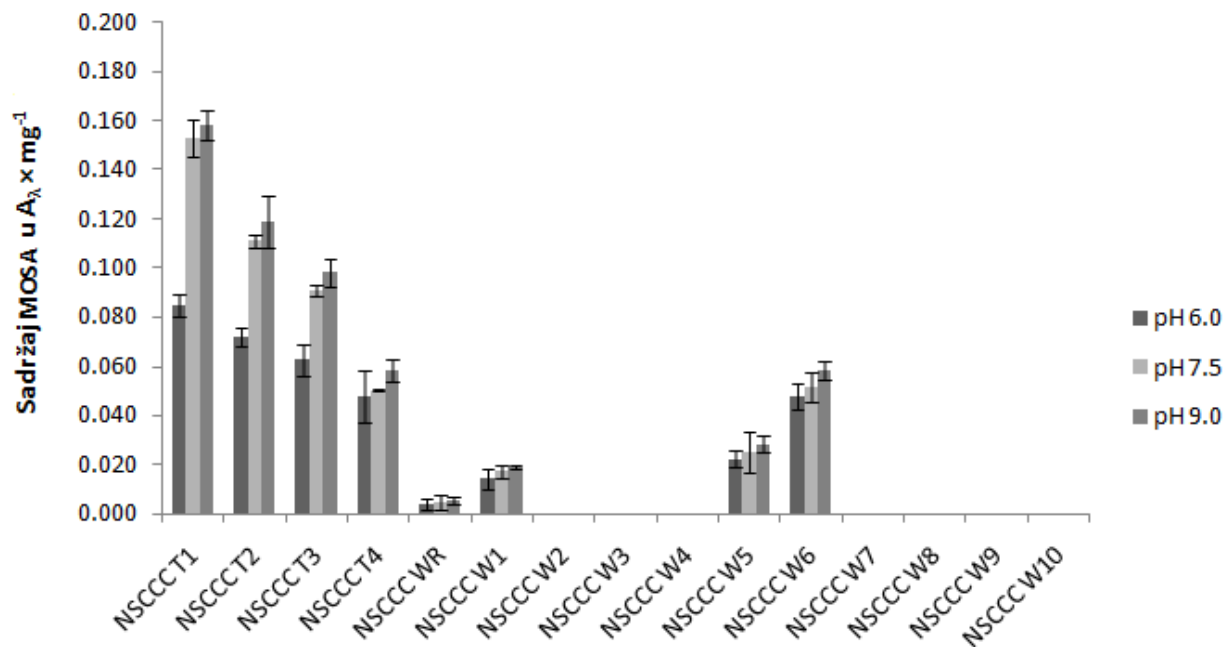
### **4.1.1. Produkcija i stabilnost metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance vodenih i zemljišnih cijanobakterija**

#### **4.1.1.1. Uticaj abiotičkih faktora na produkciju MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija**

Analiziran je uticaj abiotičkih faktora (pH, temperature, izvora svetlosti i sastava podloge) na produkciju MOSA kod 15 vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija NSCCC.

##### ***4.1.1.1.1. Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOSA***

Tokom eksperimenta analiziranja uticaja pH vrednosti podloge na produkciju MOSA, uočeno je da nisu svi sojevi pokazali sposobnost produkcije MOSA (Grafikon 6).

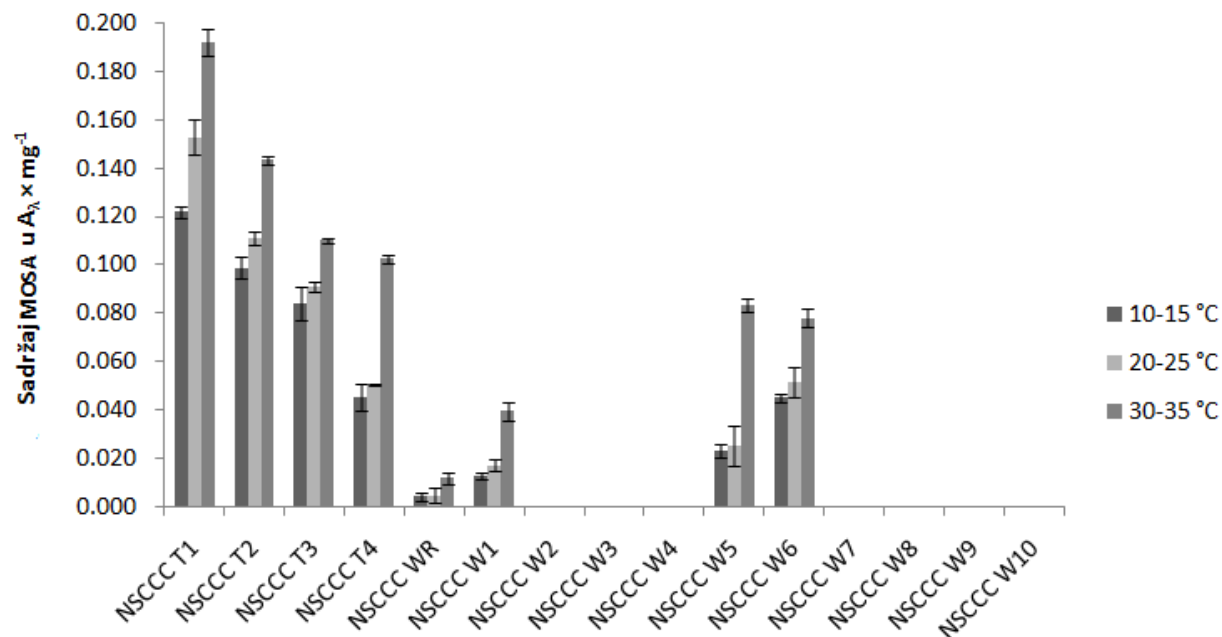


**Grafikon 6.** Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Utvrđena je sposobnost produkcije MOSA kod 8 od ukupno 15 analiziranih sojeva. U tretmanu kultivacije vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija u podlozi različite pH vrednosti uočeno je da je produkcija MOSA bila najmanja u podlozi sa pH 6.0, povećana kultivacijom u podlozi sa pH 7.5 sa najizraženijom produkcijom u podlozi sa pH 9.0. Zemljišni sojevi su pokazali izraženiju produkciju MOSA u svim analiziranim pH tretmanima. Soj T1 se pokazao kao soj sa najizraženijom sposobnošću produkcije MOSA kultivacijom u podlozi različitih pH vrednosti ( $0.0847 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u podlozi sa pH 6.0,  $0.1579 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u podlozi sa pH 9.0). Potom su po produkciji sledili sojevi T2, T3 i T4. Produkcija MOSA je registrovana samo kod 4 vodena soja i to znatno nižih koncentracija. Primetno je da kod vodenih sojeva promena pH vrednosti idući od kisele ka baznoj nije dovela do značajnijeg uticaja na produkciju MOSA.

#### 4.1.1.1.2. Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOSA

Eksperimentalnim analiziranjem uticaja temperature gajenja na sintezu MOSA utvrđeno je da je 8 sojeva cijanobakterija pokazalo sposobnost produkcije MOSA (Grafikon 7).



**Grafikon 7.** Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija.

Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

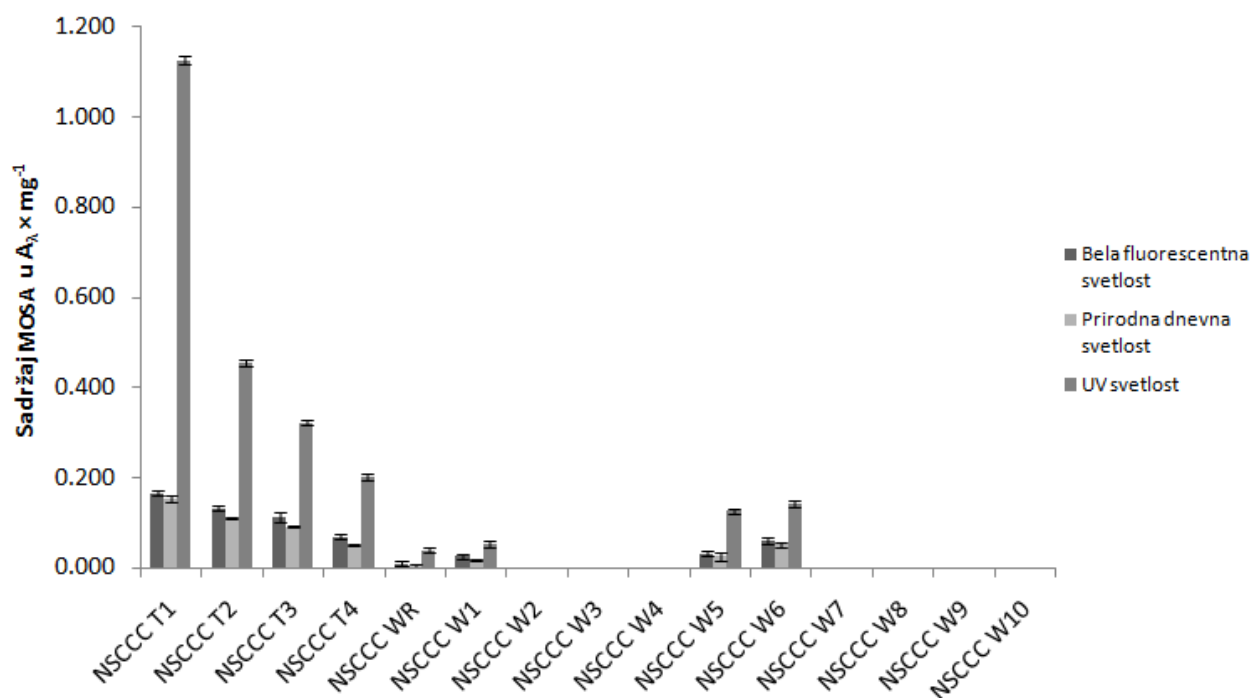
Tokom tretmana kultivacije vodenih i zemljišnih cijanobakterijskih sojeva pod različitim temperaturnim uslovima utvrđeno je da je produkcija MOSA bila najslabije izražena na temperaturi od 10-15 °C. Povećanjem temperature gajenja (20-25 °C) uočeno je neznatno povećanje u produkciji MOSA. Gajenjem na temperaturi od 30-35 °C produkcija je bila znatno izraženija u odnosu na kultivaciju na nižim temperaturama. U poređenju sa produkcijom u uslovima temperaturnih vrednosti od 20-25 °C kod sojeva T4 se uočava dva puta veća produkcija (sa  $0.0503 A_{\lambda} \times mg^{-1}$  na  $0.1025 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ) i W5 tri puta veća (sa  $0.0252 A_{\lambda} \times mg^{-1}$  na  $0.0833 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ). Najveći producent MOSA u svim temperaturnim uslovima je bio zemljišni soj T1 (od  $0.1220 A_{\lambda} \times mg^{-1}$  na temperaturi 10-15 °C do  $0.1923 A_{\lambda} \times mg^{-1}$  na 30-35 °C). Vodeni



sojevi su se pokazali kao slabiji producenti MOSA tokom analiziranog tretmana, ali se uočava znatno intenziviranje produkcije kultivacijom na temperaturi od 30-35 °C.

#### 4.1.1.1.3. Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOSA

Kao i u prethodno analiziranim tretmanima, produkcija MOSA nije uočena kod svih analiziranih cijanobakterijskih sojeva ni tokom kultivacije pod različitim izvorom svetlosti (Grafikon 8).



**Grafikon 8.** Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Najslabija produkcija MOSA detektovana je nakon kultivacije pod prirodnom dnevnom svetlošću. Kultivacijom vodenih i zemljišnih cijanobakterijskih sojeva pod belom fluorescentnom svetlošću su dobijene neznatno više vrednosti sadržaja MOSA u odnosu na kultivaciju pod prirodnom dnevnom svetlošću i to nešto izraženije kod zemljišnih sojeva, kao što je slučaj sa sojevima T2 ( $0.1319 A_{\lambda} \times mg^{-1}$  pod belom fluorescentnom svetlošću i  $0.1109 A_{\lambda} \times$

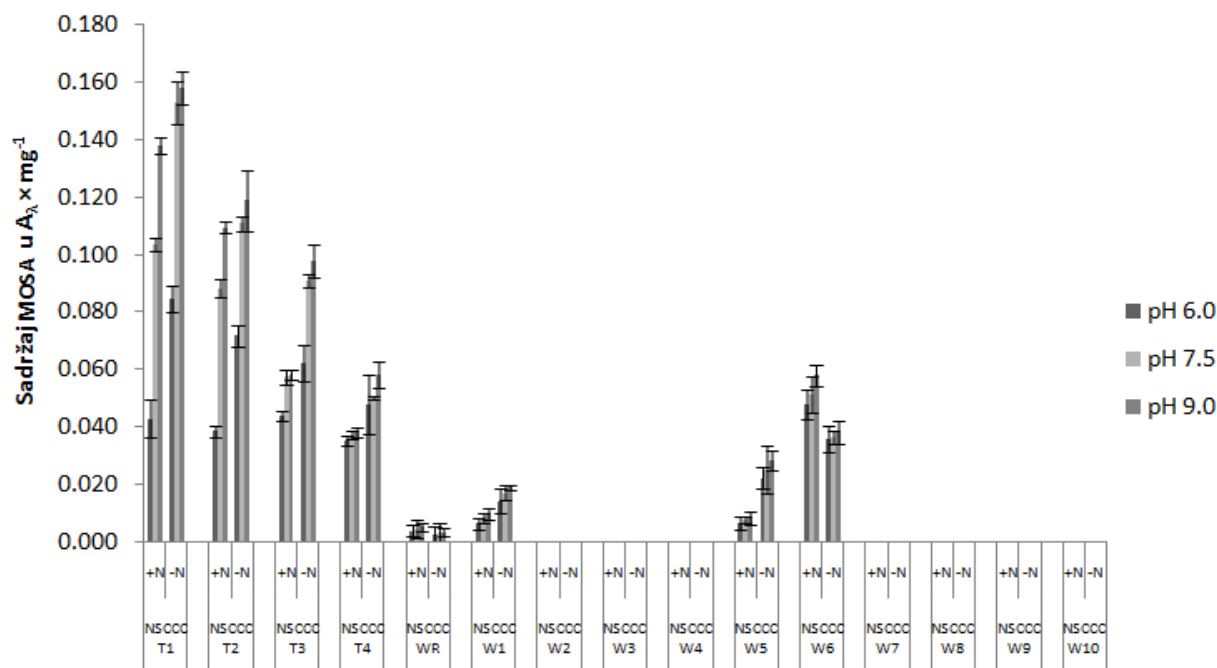
mg<sup>-1</sup> gajenjem pod prirodnom svetlošću) i T3 (0.1130 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> pod belom fluorescentnom svetlošću i 0.0909 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> pod prirodnom dnevnom svetlošću). Utvrđeno je da je kultivacija sojeva u uslovima UV svetlosti dovela do znatnog povećanja produkcije MOSA kod svih analiziranih sojeva. Najveća produkcija MOSA je postignuta kod zemljišnog soja T1 gde je zabeleženo povećanje koncentracije od sedam puta, sa 0.1529 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> (pod prirodnom dnevnom svetlošću) na 1.1267 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> (pod UV svetlošću). Među zemljišnim sojevima najniži sadržaj MOSA je detektovan kod soja T4 (0.2008 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup>). Veliki porast u intenzitetu produkcije MOSA kultivacijom pod UV svetlošću uočen je i kod vodenih sojeva, kod W6 tri puta veća (sa 0.0515 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> pod prirodnom dnevnom svetlošću na 0.1408 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> pod UV svetlošću), a kod W5 pet puta veća produkcija (sa 0.0252 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> pod prirodnom dnevnom svetlošću na 0.1259 A<sub>λ</sub> × mg<sup>-1</sup> pod UV svetlošću).

#### ***4.1.1.1.4. Uticaj sadržaja azota u podlozi na produkciju MOSA***

Kako je azot bitan nutrijent za fiziološke procese cijanobakterija, posmatran je uticaj sadržaja azota u podlozi na sintezu MOSA. Vodeni i zemljišni cijanobakterijski sojevi su kultivisani u podlozi obogaćenoj azotom (sa oznakom +N) i u podlozi siromašnoj azotom (sa oznakom -N), različitih pH vrednosti, u uslovima različitih temperaturnih vrednosti i različitog izvora svetlosti.

#### ***➤ produkcija u različitim pH vrednostima podloge zavisno od sadržaja azota***

Tokom eksperimentalnog tretmana utvrđivanja uticaja azota pri različitim pH vrednostima podloge na produkciju MOSA uočena je niža produkcija kod većine analiziranih sojeva u uslovima rasta u podlozi +N (Grafikon 9).



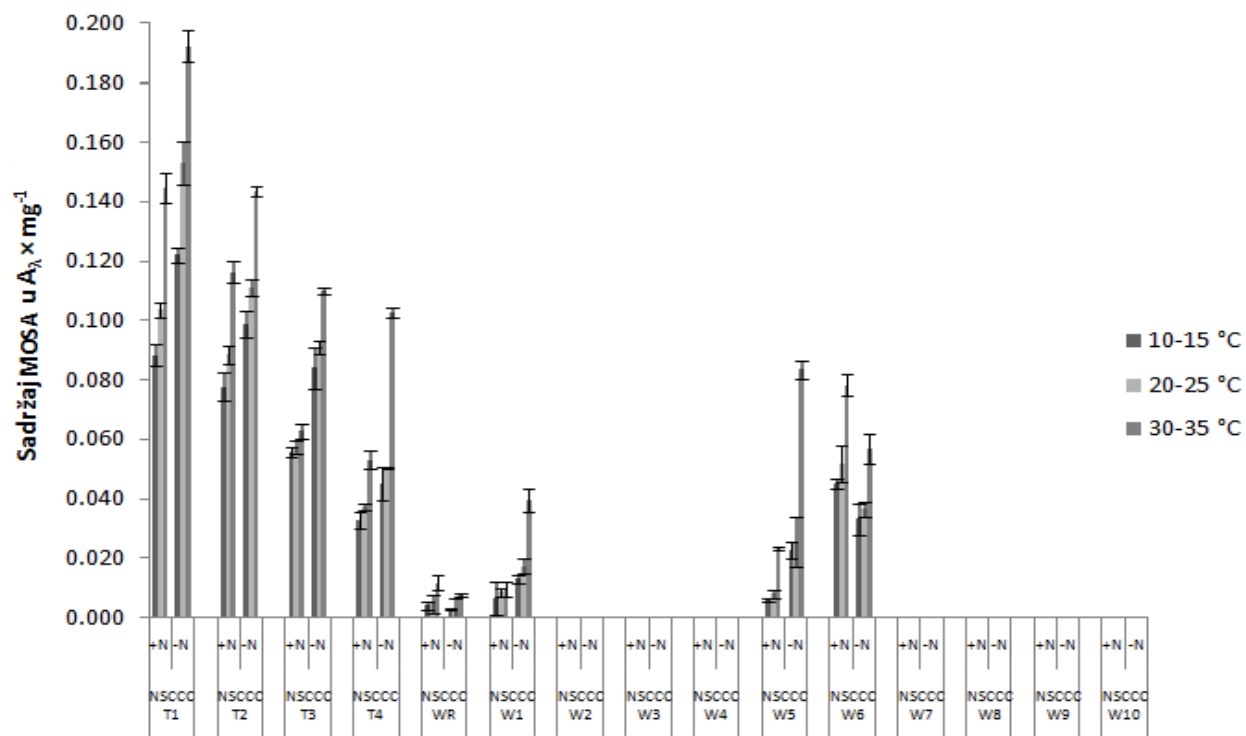
**Grafikon 9.** Uticaj sastava podloge i pH vrednosti na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija.

Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Najizraženiju sposobnost produkcije MOSA u uslovima rasta u podlozi +N i -N je ostvario soj T1 (u podlozi +N od  $0.0429 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  do  $0.1389 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  i u podlozi -N od  $0.0847 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  do  $0.1579 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Primetno je da su zemljišni sojevi pokazali znatno nižu produkciju rastom u podlozi +N na svim testiranim pH vrednostima podloge.

➤ **produkcija u različitim temperaturnim uslovima zavisno od sadržaja azota**

Tokom tretmana utvrđivanja uticaja azota na produkciju MOSA kultivacijom u različitim temperaturnim uslovima uočena je niža produkcija MOSA kod većine analiziranih sojeva u podlozi +N (Grafikon 10).

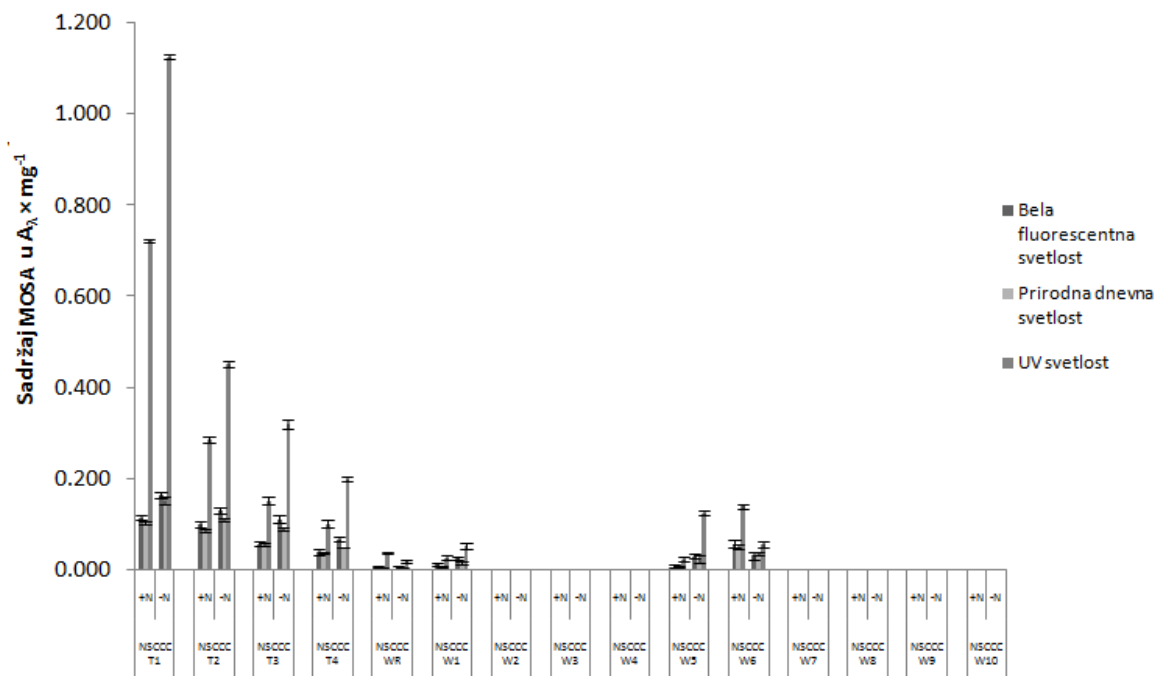


**Grafikon 10.** Uticaj sastava podloge i temperaturnih vrednosti gajenja na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Soj sa najvećom sposobnošću produkcije MOSA u svim analiziranim temperaturnim uslovima je bio zemljišni soj T1 (od  $0.0882 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  do  $0.1447 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u podlozi +N i u podlozi -N od  $0.1220 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  do  $0.1923 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Kod zemljišnog soja T4 je uočena neznatno veća produkcija MOSA kultivacijom u podlozi -N, dok je posebno izražena produkcija uočena u podlozi -N rastom na temperaturi od 30-35 °C ( $0.1025 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Kod svih zemljišnih sojeva je uočena znatno izraženija produkcija MOSA u podlozi -N, najviše izražena kultivacijom na temperaturi 30-35 °C.

➤ **produkcija delovanjem različitih izvora svetlosti zavisno od sadržaja azota**

Tokom eksperimentalnog istraživanja uticaja azota na sintezu MOSA u uslovima kultivacije pod različitim izvorom svetlosti produkcija je bila slabija u uslovima rasta u podlozi +N kod većine analiziranih sojeva NSCCC (Grafikon 11).



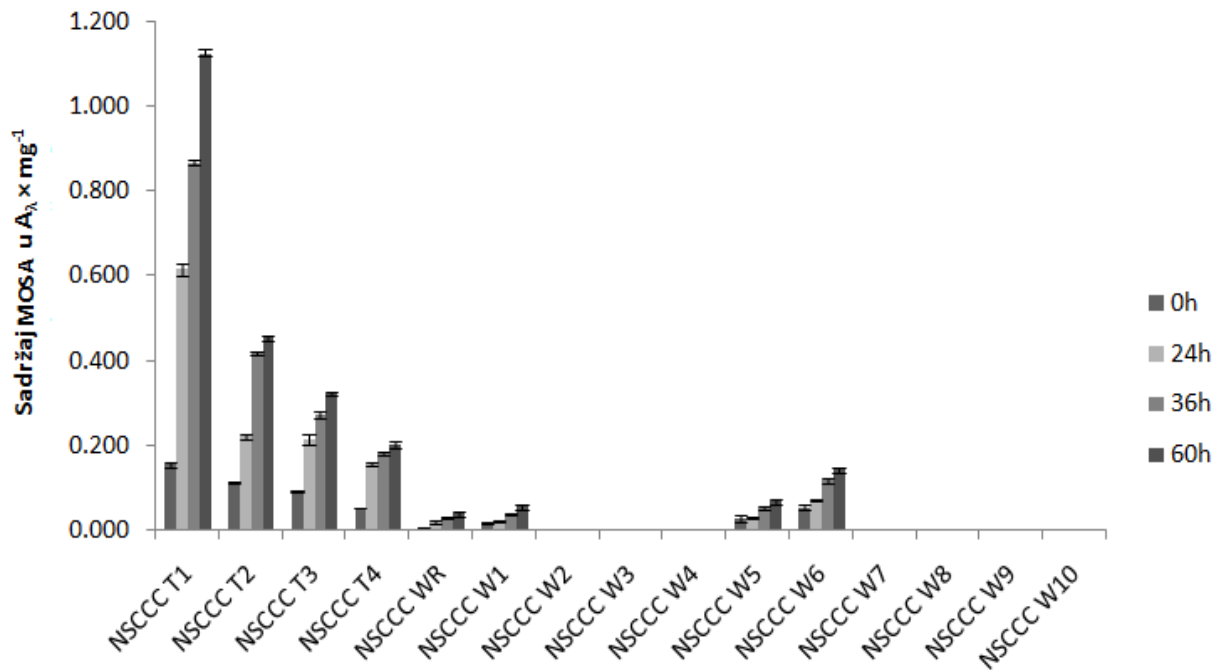
**Grafikon 11.** Uticaj sastava podloge i izvora svetlosti na produkciju MOSA kod posmatranih cijanobakterija.

Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Najizrazitiji porast produkcije MOSA je postignut delovanjem UV svetlosti kod svih analiziranih sojeva u obe podloge. Tokom svih tretmana, zemljišni sojevi su pokazali izraženiju produkciju MOSA, posebno izraženu u uslovima delovanja UV svetlosti, kultivacijom u podlozi -N. Zemljišni soj T1 je imao najveću produkciju MOSA i u podlozi +N i -N delovanjem sva tri izvora svetlosti. U poređenju sa rastom pod prirodnom dnevnom svetlošću kod soja T1 porast u sadržaju MOSA je bio veći za više od sedam i po puta u podlozi -N, odnosno sedam puta u podlozi +N rastom pod UV svetlosti.

#### 4.1.1.1.5. Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti na produkciju MOSA

Posmatrana je produkcija MOSA zavisno od vremenskog perioda kontinuirane ekspozicije UV svetlosti (Grafikon 12).



**Grafikon 12.** Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na produkciju MOSA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Značajno povećanje produkcije MOSA primećeno je nakon 24 h kontinuiranog izlaganja UV svetlosti i ovo povećanje u koncentraciji MOSA je nastavljeno tokom dužeg izlaganja. Uočava se da je dužim periodom izlaganja znatno povećanje produkcije MOSA detektovano kod zemljišnih sojeva u poređenju sa vodenim sojevima. Najuočljivije povećanje sadržaja MOSA je detektovano kod soja T1, kod kog je na početku merenja (0 h) koncentracija MOSA iznosila  $0.1529 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ , a nakon 24 h izlaganja UV svetlosti koncentracija je bila četiri puta veća ( $0.6151 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ), dok je nakon 60 h to povećanje bilo sedam i po puta ( $1.1267 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ). Kod soja T3 i T4 se takođe uočava znatno intenzivnija produkcija nakon 24 h izlaganja UV svetlosti, a taj porast je ujednačeno nastavljen daljim izlaganjem. Poredeći sa ostalim zemljišnim sojevima, kod soja T2 se beleži intenzivniji porast u produkciji MOSA nakon 36 h izlaganja UV svetlosti ( $0.4166 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ), sa neznatnim povećanjem nakon 60 h izlaganja ( $0.4531 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ). Kod vodenih sojeva je detektovan umereniji trend u povećanju produkcije MOSA s povećanjem vremena kontinuiranog izlaganja UV svetlosti. U odnosu na početno merenje (0 h) uočava se blaži porast produkcije MOSA nakon 24 h ekspozicije UV svetlosti, da bi taj porast bio jače

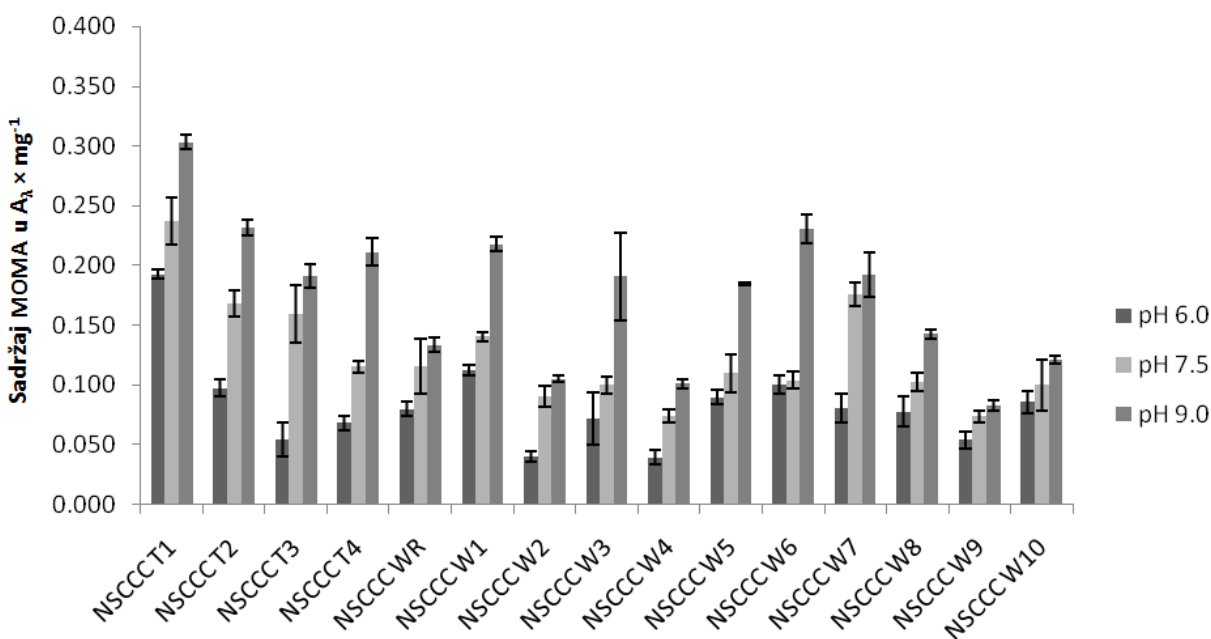
izražen nakon 36 h izlaganja. Vrednosti sadržaja MOSA kod posmatranih vodenih sojeva su bile u neznatnom porastu nakon 60 h kontinuirane ekspozicije UV svetlosti.

#### 4.1.1.2. Uticaj abiotičkih faktora na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija

Produkcija MOMA vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija NSCCC je analizirana kultivacijom u različitim pH vrednostima podloge i temperaturnim uslovima gajenja, pod različitim izvorima svetlosti i u podlozi različitog sadržaja nutrijenata (podloga obogaćena azotom (+N) i podloga siromašna azotom (-N)).

##### 4.1.1.2.1. Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOMA

Prilikom analize uticaja pH vrednosti podloge na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija uočeno je da su svi analizirani sojevi produkovali MOMA (Grafikon 13).

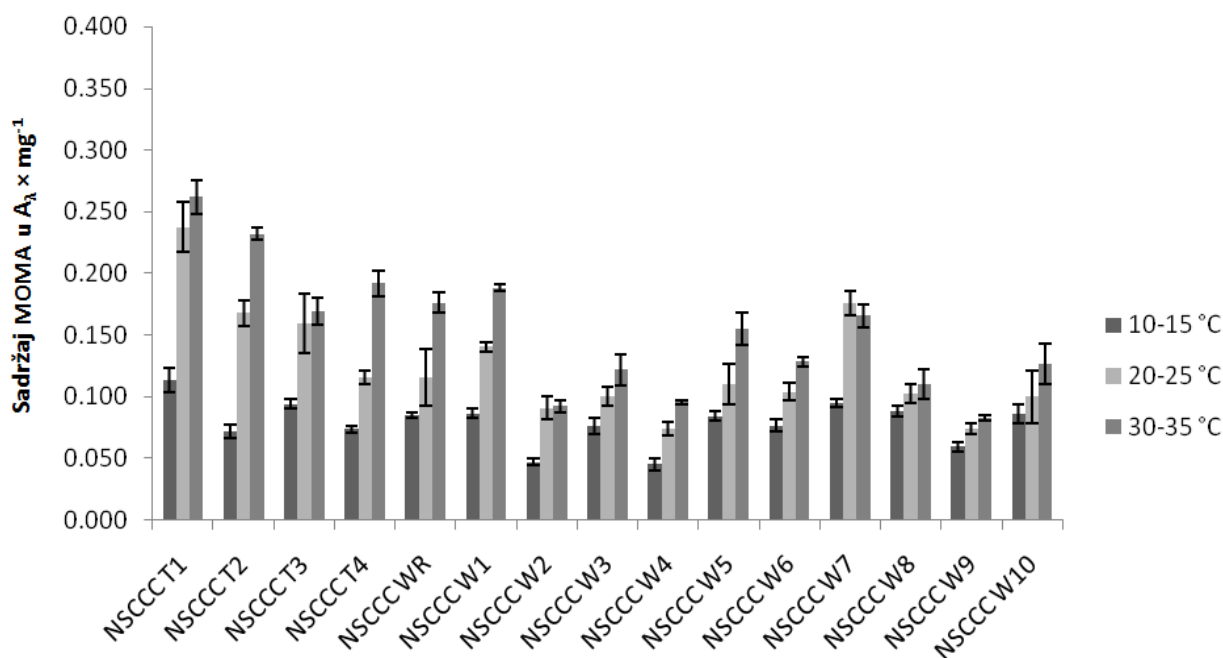


**Grafikon 13.** Uticaj pH vrednosti podloge na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Zabeleženo je da je sadržaj MOMA bio najmanji kultivacijom u podlozi sa pH 6.0, povećan rastom u podlozi sa pH 7.5, a potom znatno povećan rastom u podlozi sa pH 9.0 kod svih analiziranih vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija NSCCC. Najproduktivniji soj je bio T1 u svim testiranim pH vrednostima ( $0.1925 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u pH 6.0,  $0.2372 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u pH 7.5 i  $0.3031 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u pH 9.0). Dva puta veća produkcija MOMA je uočljiva sa povećanjem pH vrednosti kod nekih cijanobakterijskih sojeva (T4 i W6). Izuzev izražene produkcije MOMA kod zemljišnih sojeva rastom u podlozi sa pH 9.0, istakli su se i vodeni sojevi W6 ( $0.2299 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), W1 ( $0.2178 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ) i W7 ( $0.1921 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Najnižu vrednost sadržaja MOMA kultivacijom u podlozi sa pH 6.0 je pokazao soj W4 ( $0.0389 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ).

#### 4.1.1.2.2. Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOMA

Kod tretmana gde je ispitivan temperaturni uticaj gajenja na produkciju MOMA postignuta je produkcija MOMA kod svih vodenih i zemljišnih sojeva NSCCC (Grafikon 14).



Grafikon 14. Uticaj temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija.

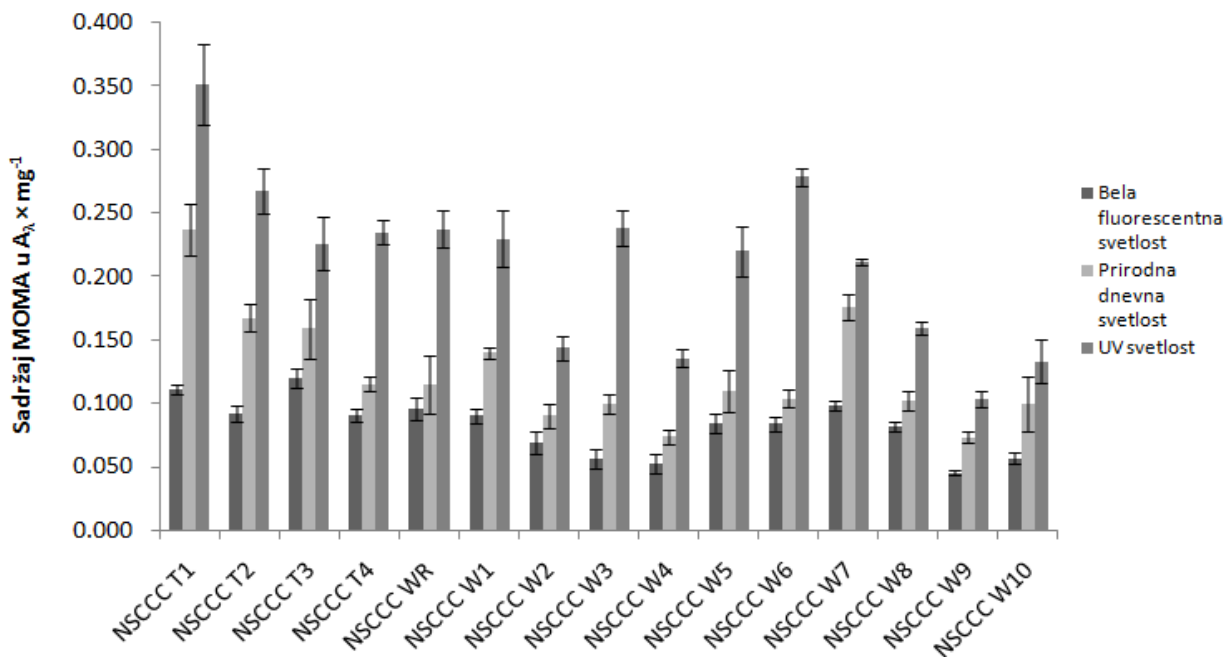
Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )



Kultivacija na temperaturi od 10-15 °C je rezultovala u najmanjoj produkciji MOMA kod svih analiziranih sojeva. Najveću sintezu MOMA je pokazao soj T1 ( $0.1135 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), koji je imao sposobnost produkcije najveće koncentracije MOMA na svim temperaturama. U datim uslovima najniže vrednosti su detektovane kod soja W4 ( $0.0448 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Uočeno je da je produkcija MOMA direktno proporcionalna povećanju temperature i kultivacijom na temperaturi od 30-35 °C produkcija MOMA je bila izrazito veća. Izuzetak je jedino soj W7 gde se primećuje znatan skok u koncentraciji MOMA kultivacijom na temperaturi od 20-25 °C ( $0.1760 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), a potom blagi pad koncentracije na temperaturi 30-35 °C ( $0.1655 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Najveći sadržaj MOMA detektovan je kultivacijom na temperaturi 30-35 °C kod zemljišnog soja T1 ( $0.3994 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), zatim sojeva T2 ( $0.3720 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ) i T4 ( $0.1917 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Zemljišni sojevi su se pokazali kao bolji producenti MOMA posmatrano u svim temperaturnim uslovima kultivacije, sa najvećim vrednostima MOMA detektovanim na višim temperaturama (30-35 °C). Vodeni sojevi W8, W9 i W10 su pokazivali prosečno ujednačene vrednosti MOMA na svim temperaturama.

#### ***4.1.1.2.3. Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOMA***

MOMA su detektovani kod svih analiziranih vodenih i zemljišnih sojeva NSCCC, kod kojih je zabeleženo znatno povećanje produkcije delovanjem UV svetlosti (Grafikon 15).



**Grafikon 15.** Uticaj izvora svetlosti na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Uočeno je da je bela fluorescentna svetlost dovela do produkcije najveće biomase, ali je dobijena najmanja koncentracija MOMA u odnosu na posmatrane svetlosne uslove. U tim uslovima, sadržaj MOMA bio je dva puta manji nego u uslovima rasta pod prirodnom dnevnom svetlošću, i to kod T1 ( $0.1113 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$  i  $0.2372 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ), W7 ( $0.0982 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$  i  $0.1760 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ) i T2 ( $0.0923 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$  i  $0.1676 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ). Kultivacijom u uslovima delovanja UV svetlosti postignuto je znatno povećanje u produkciji MOMA kod svih analiziranih cijanobakterijskih sojeva. Najveći sadržaj MOMA je detektovan kod T1 ( $0.3514 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ) u uslovima kultivacije pod UV svetlom.

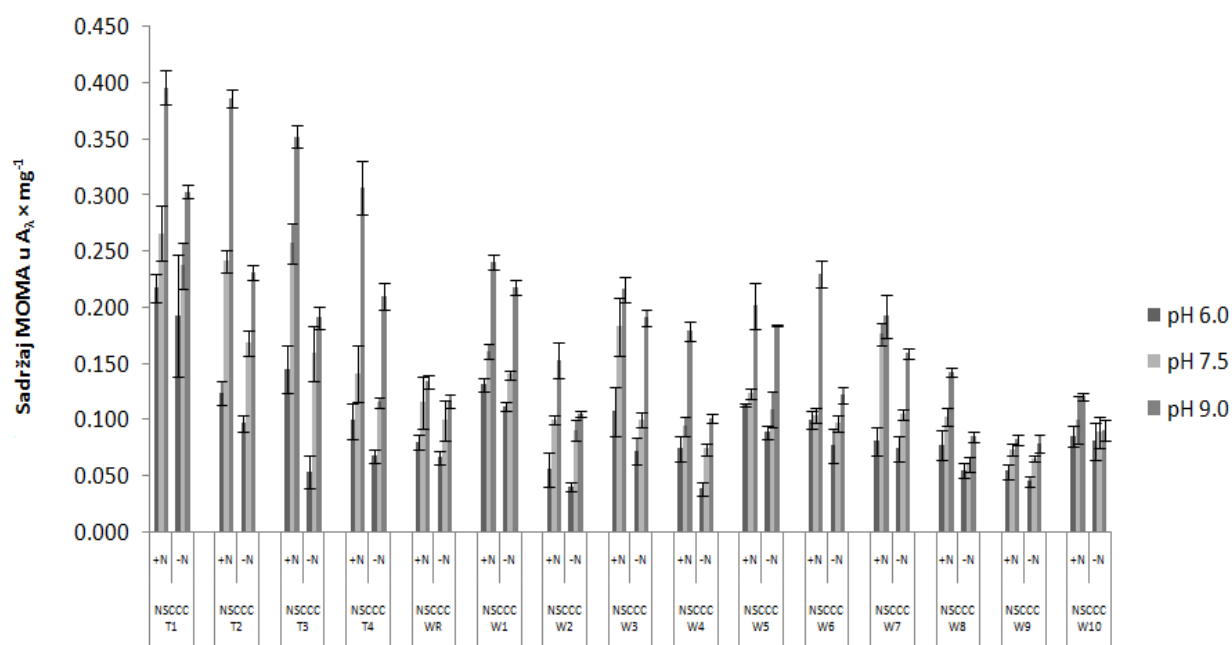
#### 4.1.1.2.4. Uticaj sadržaja azota u podlozi na produkciju MOMA

Posmatran je uticaj azota na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u podlozi obogaćenoj azotom (sa oznakom +N) i u podlozi siromašnoj

azotom (sa oznakom -N), u podlozi različite pH vrednosti, pod različitim temperaturnim vrednostima i pod uticajem različitog izvora svetlosti.

➤ *produkcija u različitim pH vrednostima podloge zavisno od sadržaja azota*

U tretmanu analiziranja uticaja azota kultivacijom pri različitim pH vrednostima podloge na produkciju MOMA uočeno je da je kod svih sojeva došlo do povećane produkcije MOMA u uslovima rasta u podlozi +N (Grafikon 16).



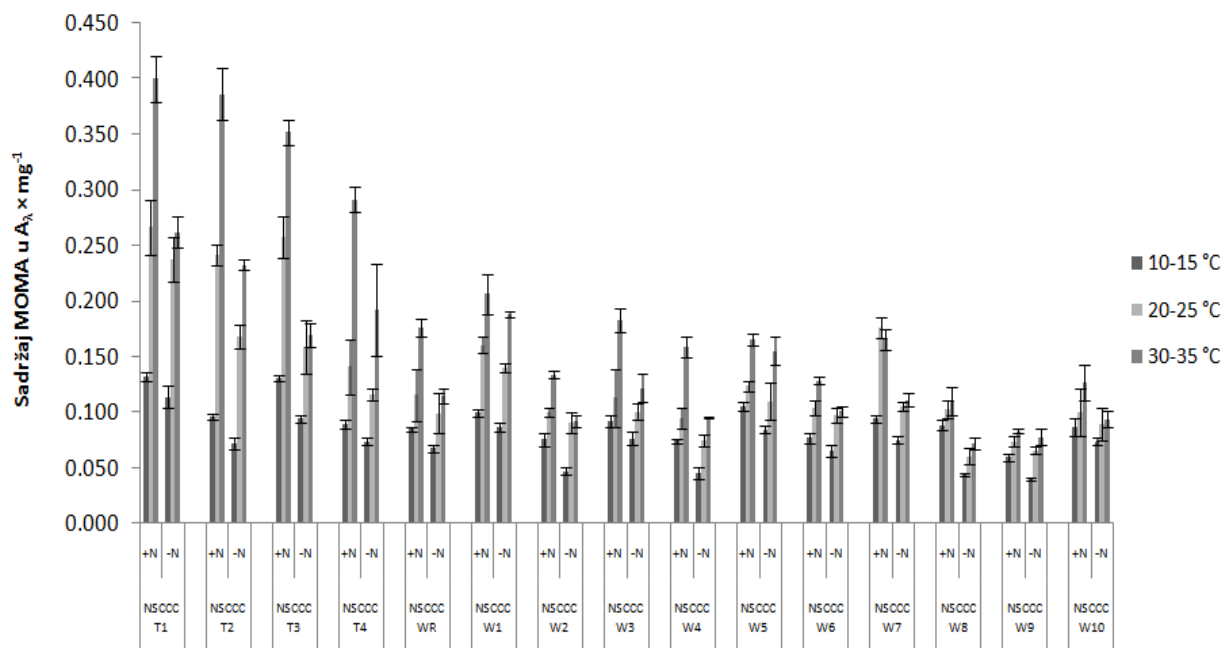
**Grafikon 16.** Uticaj sastava podloge i pH vrednosti podloge na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Svi analizirani zemljišni sojevi su pokazali znatno izraženiju produkciju MOMA u podlozi +N, najviše izraženu kultivacijom u podlozi pH 9.0. U obe podloge, na svim pH vrednostima zemljišni soj T1 je pokazao izrazitu produkciju MOMA (u podlozi pH 9.0:  $0.3031 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u podlozi -N i  $0.3957 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  u podlozi +N). Izražen porast produkcije (tri puta veće) u podlozi +N sa povećanjem baznosti sredine se beleži kod zemljišnih sojeva T2 (sa

0.1241  $A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$  na 0.3866  $A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ) i T4 (sa 0.0992  $A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$  na 0.3069  $A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ). Izuzev sojeva W4 i W6, kod vodenih sojeva se uočava neznatno povećanje produkcije MOMA u podlozi +N.

➤ **produkcija u različitim temperaturnim uslovima zavisno od sadržaja azota**

Prilikom analize sastava podloge i različitih temperaturnih uslova gajenja na produkciju MOMA uočeno je povećanje produkcije MOMA kod svih analiziranih sojeva u podlozi +N (Grafikon 17).



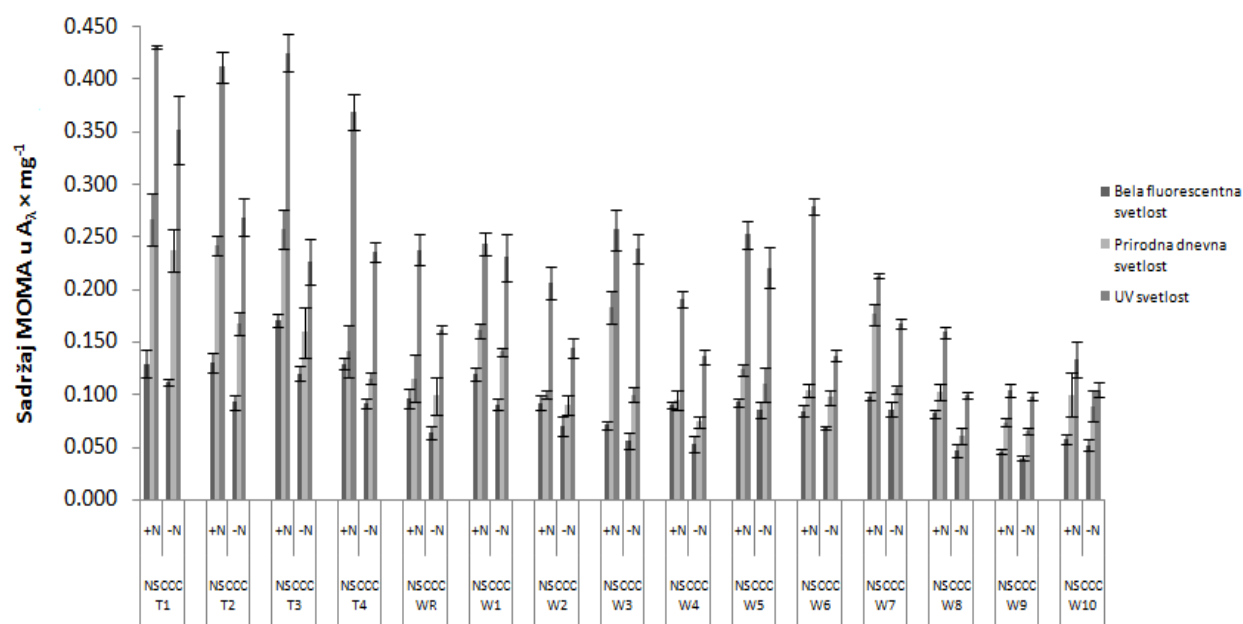
**Grafikon 17.** Uticaj sastava podloge i temperaturnih vrednosti gajenja na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Kod svih posmatranih vodenih i zemljišnih sojeva NSCCC, u obe podloge, najniža produkcija MOMA se beleži kultivacijom na temperaturi od 10-15 °C. Znatno povećanje u produkciji MOMA je primetno na višim temperaturama rastom u podlozi +N, posebno izraženo kod svih zemljišnih sojeva. Kod soja T3 je to povećanje bilo dva i po puta veće na temperaturi od 20-25 °C (sa 0.1304  $A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$  na 0.2569  $A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ), odnosno kod sojeva T1 i T2 tri i četiri

puta veće na temperaturi 30-35 °C (sa  $0.1318 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  na  $0.3994 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ; i sa  $0.0957 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  na  $0.3858 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Kod svih analiziranih vodenih sojeva uočen je manji uticaj azota na produkciju MOMA.

➤ **produkcija delovanjem različitih izvora svetlosti zavisno od sadržaja azota**

U eksperimentu posmatranja uticaja azota na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija tokom kultivisanja pod različitim izvorom svetlosti primetan je drastičan porast delovanjem UV svetlosti rastom u podlozi +N (Grafikon 18).



**Grafikon 18.** Uticaj sastava podloge i izvora svetlosti na produkciju MOMA kod posmatranih cijanobakterija.

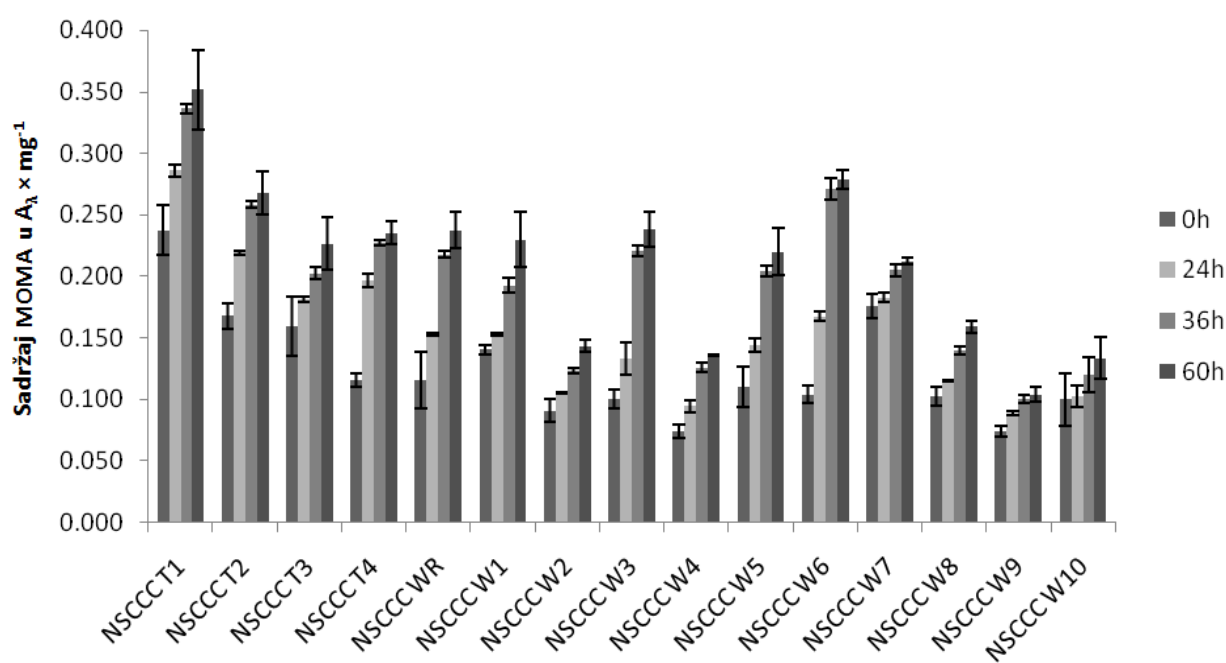
Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Zemljišni soj T3 je pokazao skoro dva puta veći porast produkcije u uslovima kultivacije pod UV svetlošću u podlozi +N (u podlozi -N  $0.2263 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  i u podlozi +N  $0.4243 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). U podlozi +N soj T1 je pokazao najintenzivniju produkciju rastom na prirodnoj dnevnoj svetlosti i pod UV svetlošću, dok je u uslovima delovanja bele fluorescentne svetlosti dominantna produkcija uočena kod soja T3 (u podlozi +N  $0.1703 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  i u podlozi -N

$0.1197 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). U odnosu na belu fluorescentnu svetlost, delovanjem UV svetlosti, u podlozi +N, detektovana je dva i po (T3), odnosno više od tri puta veća (T2) produkcija MOMA. Kod vodenih sojeva neznatan je uticaj azota na sintezu MOMA u uslovima sva tri tipa svetlosti.

#### 4.1.1.2.5. Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti na produkciju MOMA

Posmatrana je produkcija MOMA zavisno od vremenskog perioda izlaganja UV svetlosti (Grafikon 19).



**Grafikon 19.** Uticaj vremena izlaganja UV svetlosti (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na produkciju MOMA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Značajno povećanje produkcije MOMA uočeno je nakon 24 h kontinuiranog izlaganja UV svetlosti i ovo povećanje u koncentraciji MOMA je nastavljeno tokom daljeg izlaganja. Kod zemljišnog soja T4 je detektovana dva puta veća produkcija MOMA već nakon 24 h kontinuirane ekspozicije (sa  $0.1153 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$  na  $0.2350 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ). Kod vodenih sojeva WR,

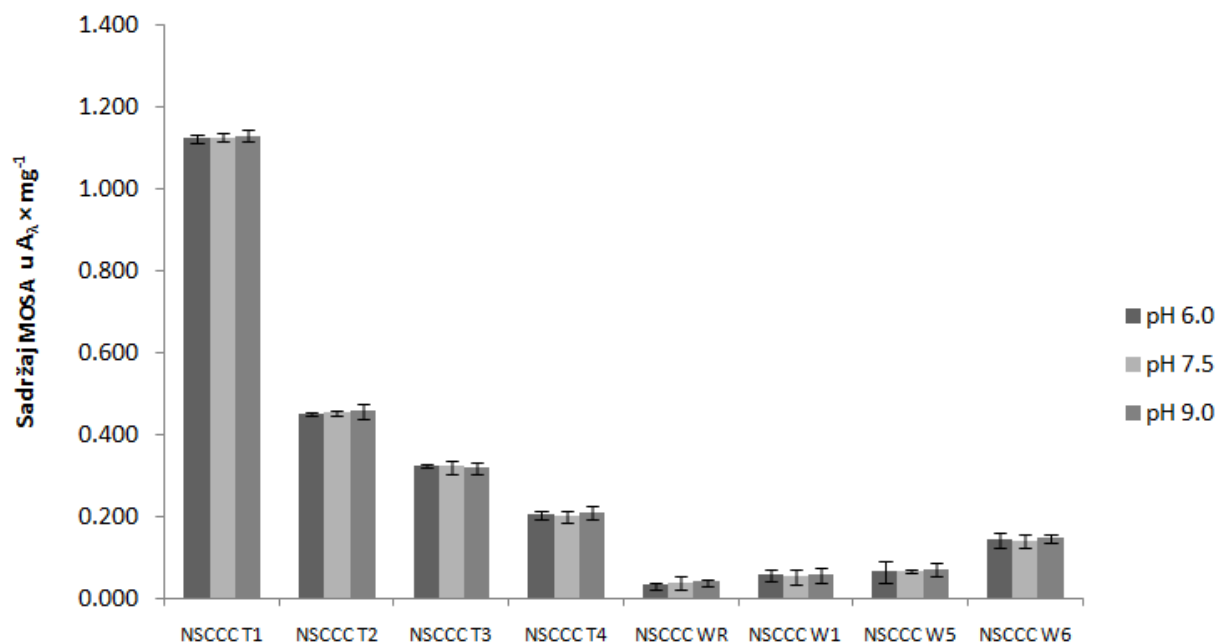
W3, W5 i W6 se beleži izrazitiji uticaj UV svetlosti, kod kojih je uočeno znatno povećanje produkcije MOMA nakon 36 h ekspozicije u odnosu na period od 24 h izlaganja UV svetlosti.

#### 4.1.1.3. Uticaj abiotičkih faktora na stabilnost MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija

Nakon analiziranog vremenskog perioda tretmana stimulacije produkcije MOSA UV svetlošću postignuta je najveća produkcija nakon 60 h kontinuiranog izlaganja. Kako bi se utvrdilo da li je MOSA dovoljno stabilan da bi se mogao smatrati pouzdanim biomarkerom cijanobakterija u paleoklimatskoj rekonstrukciji, ekstrakti iz pomenutog tretmana su dalje korišćeni za analiziranje njegove stabilnosti nakon delovanja različitih abiotičkih faktora- različite vrednosti pH podloge, temperature podloge i različitog perioda izlaganja UV svetlosti.

##### 4.1.1.3.1. Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOSA

Posmatrana je stabilnost ekstrahovanog MOSA delovanjem različitih pH vrednosti kod 8 vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC (Grafikon 20).

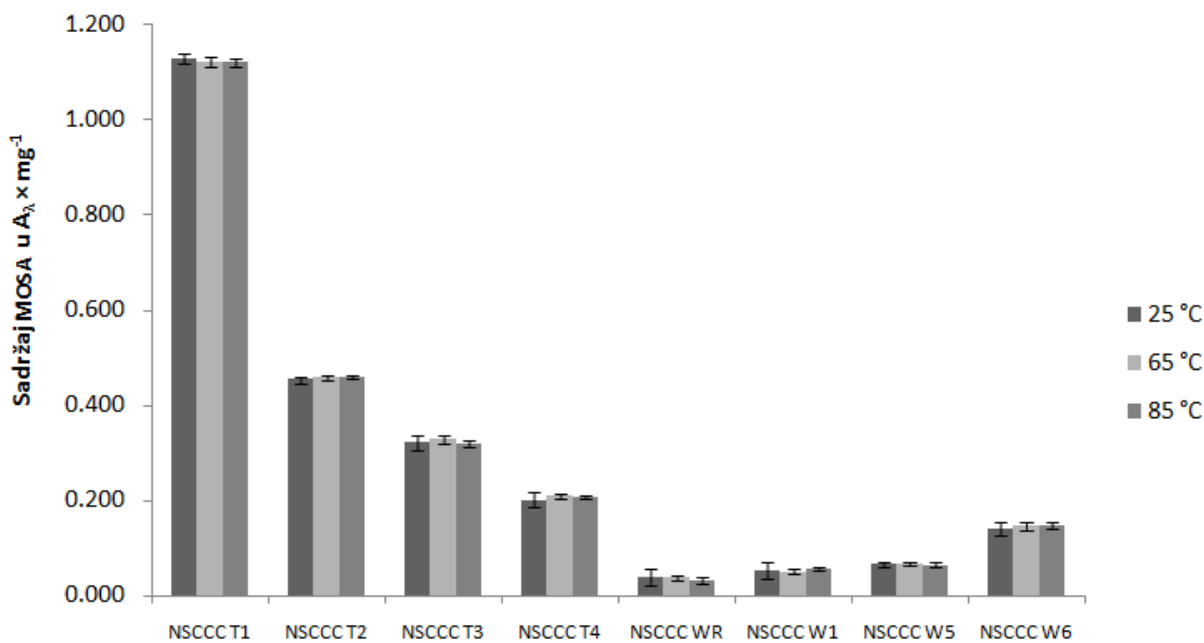


**Grafikon 20.** Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOSA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Prilikom analize stabilnosti MOSA, primećeno je da promene pH vrednosti podloge od 6.0, 7.5 i 9.0 tokom 24 h nisu dovele do degradacije MOSA. MOSA je pokazao izrazitu stabilnost, sa postojanom strukturom koja nije razorena delovanjem različitih pH vrednosti podloge kod svih ispitivanih sojeva. Ni nakon tri i šest dana nije uočena degradacija MOSA (podaci nisu prikazani).

#### 4.1.1.3.2. Uticaj temperaturnih vrednosti podloge na stabilnost MOSA

Analizirana je stabilnost MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija delovanjem različitih temperatura podloge (Grafikon 21).



**Grafikon 21.** Uticaj temperature podloge na stabilnost MOSA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

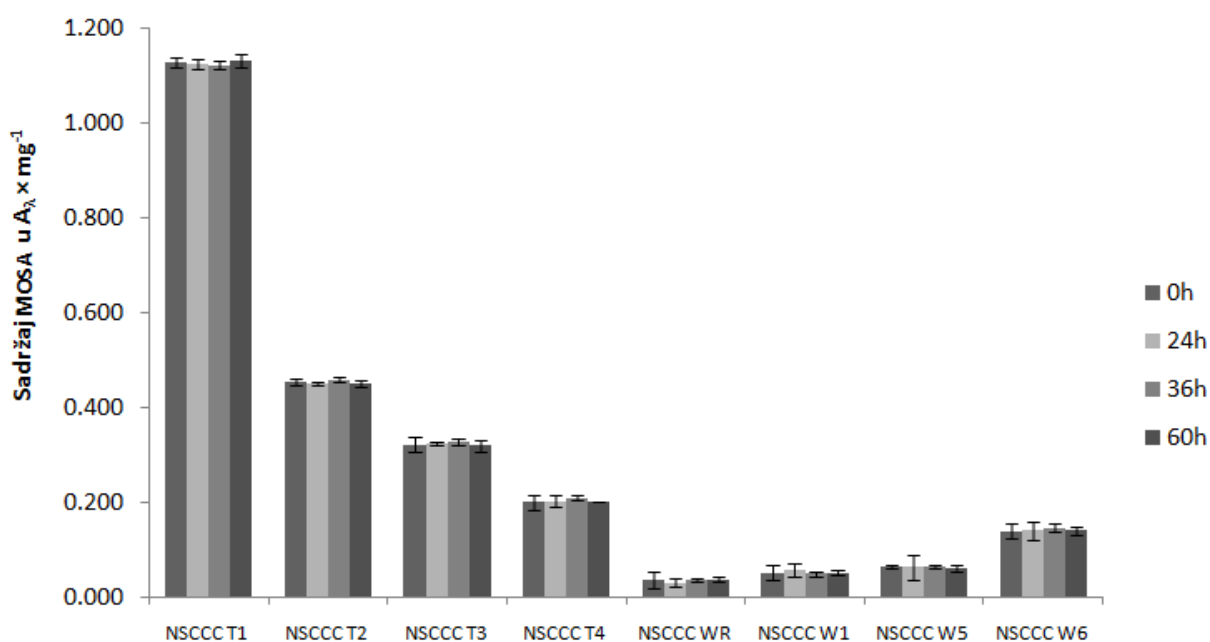
U tretmanu utvrđivanja uticaja različitih temperaturnih vrednosti podloge na stabilnost ekstrahovanog MOSA tokom 24 h nije uočena njegova degradacija. I izlaganje ekstremno



visokim temperaturama (85 °C) nije dovelo do degradacije MOSA. Degradacija MOSA nije uočena ni izlaganjem temperaturi od 85 °C nakon tri i šest dana (podaci nisu prikazani).

#### 4.1.1.3.3. Uticaj vremenskog perioda izlaganja UV svetlosti na stabilnost MOSA

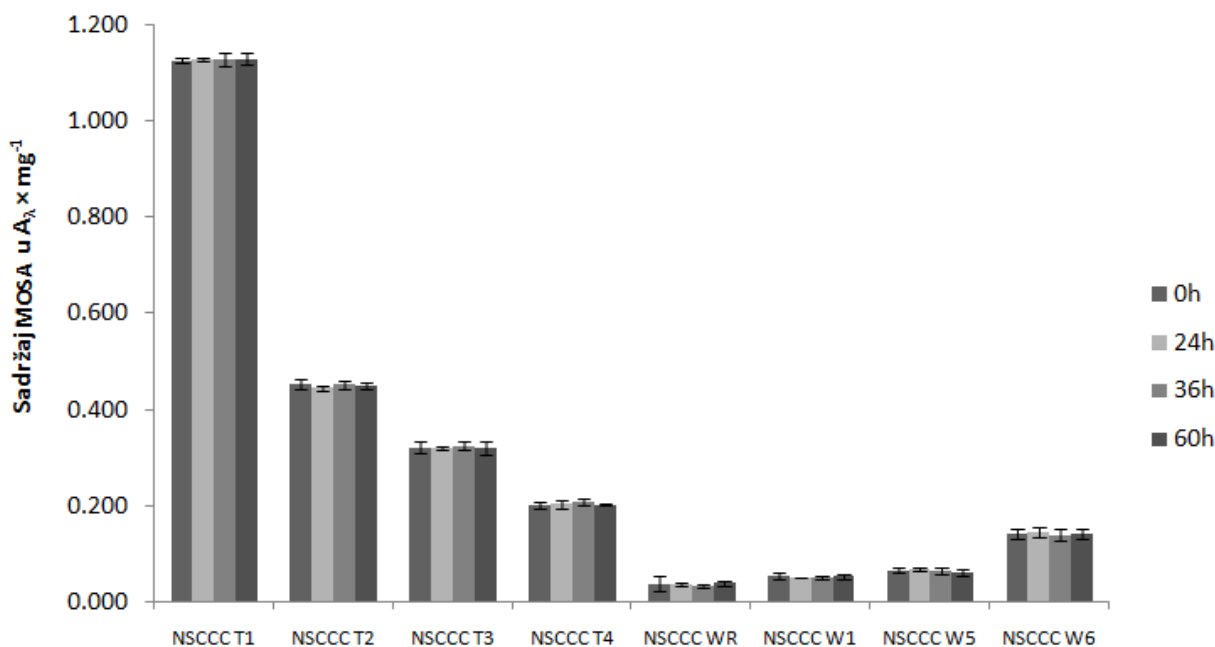
Uporedo sa posmatranjem uticaja prolongiranog UV zračenja na stabilnost ekstrahovanog MOSA, analizirana je i stabilnost u normalnim (kontrolnim) uslovima zavisno od vremenskog intervala (Grafikon 22).



**Grafikon 22.** Stabilnost MOSA u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D., n=3)

U kontrolnim uslovima, tokom posmatranog vremenskog perioda, nije detektovana degradacija sadržaja MOSA.

Analizom uticaja različitog perioda izlaganja UV svetlosti na ekstrahovan MOSA nije utvrđena degradacija MOSA (Grafikon 23).



**Grafikon 23.** Uticaj različitog perioda izlaganja UV zračenju (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na stabilnost MOSA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

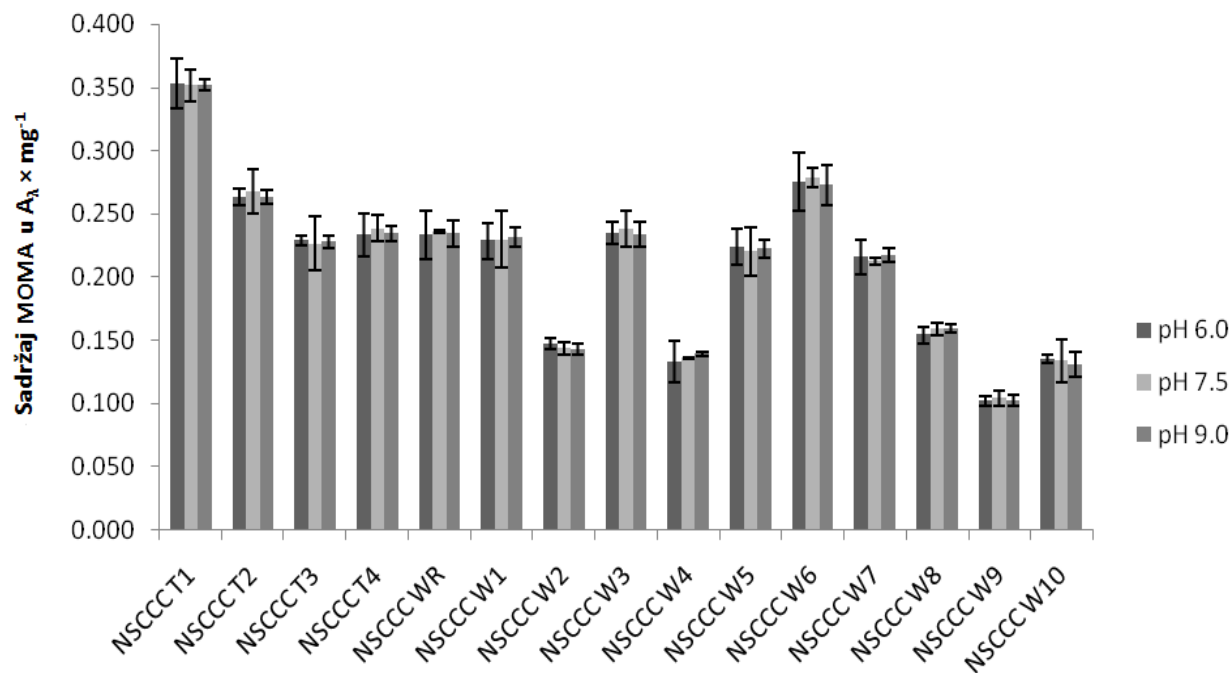
U uslovima kontinuiranog izlaganja UV svetlosti nije zabeležena degradacija MOSA kod analiziranih sojeva ni nakon vremenskog perioda od 60 h.

#### 4.1.1.4. Uticaj abiotičkih faktora na stabilnost MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija

Radi utvrđivanja mogućnosti potencijalnog korišćenja MOMA kao biomarkera cijanobakterija u studijama paleoklimatske rekonstrukcije i geoloških istraživanja, ekstrakti iz tretmana stimulacije produkcije UV svetlošću su dalje korišćeni za analiziranje stabilnosti prilikom izlaganja abiotičkim faktorima, uključujući različite pH i temperaturne vrednosti podloge, kao i različito vreme izlaganja UV svetlosti.

#### 4.1.1.4.1. Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOMA

U eksperimentu analize stabilnosti ekstrahovanih MOMA utvrđeno je da promena pH vrednosti podloge nije dovela do razaranja njihove strukture i degradacije MOMA (Grafikon 24).

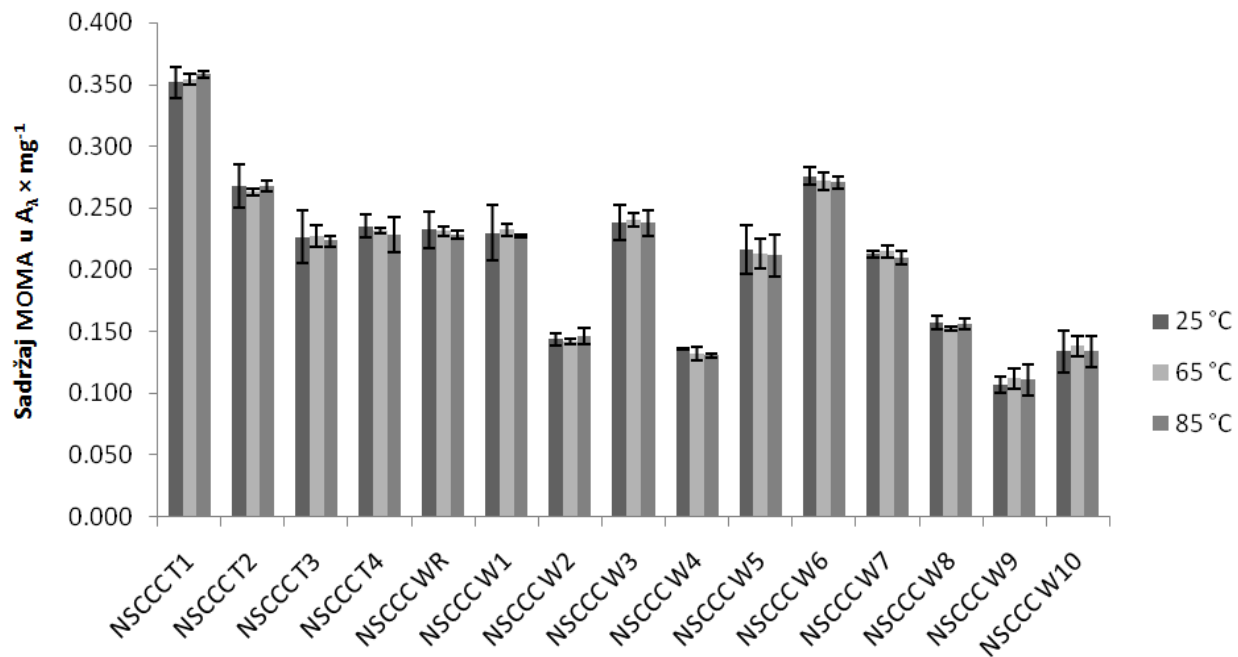


**Grafikon 24.** Uticaj pH vrednosti podloge na stabilnost MOMA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

MOMA su pokazali stabilnu strukturu koja nije razorena ni u kiseloj (pH 6.0), ni u baznoj sredini (pH 9.0) tokom 24 h posmatranja. Degradacija MOMA nije detektovana ni nakon tri i šest dana (podaci nisu prikazani).

#### 4.1.1.4.2. Uticaj temperaturnih vrednosti podloge na stabilnost MOMA

Tokom eksperimenta utvrđivanja uticaja temperaturnih vrednosti podloge na stabilnost ekstrahovanih MOMA nije uočena degradacija MOMA (Grafikon 25).

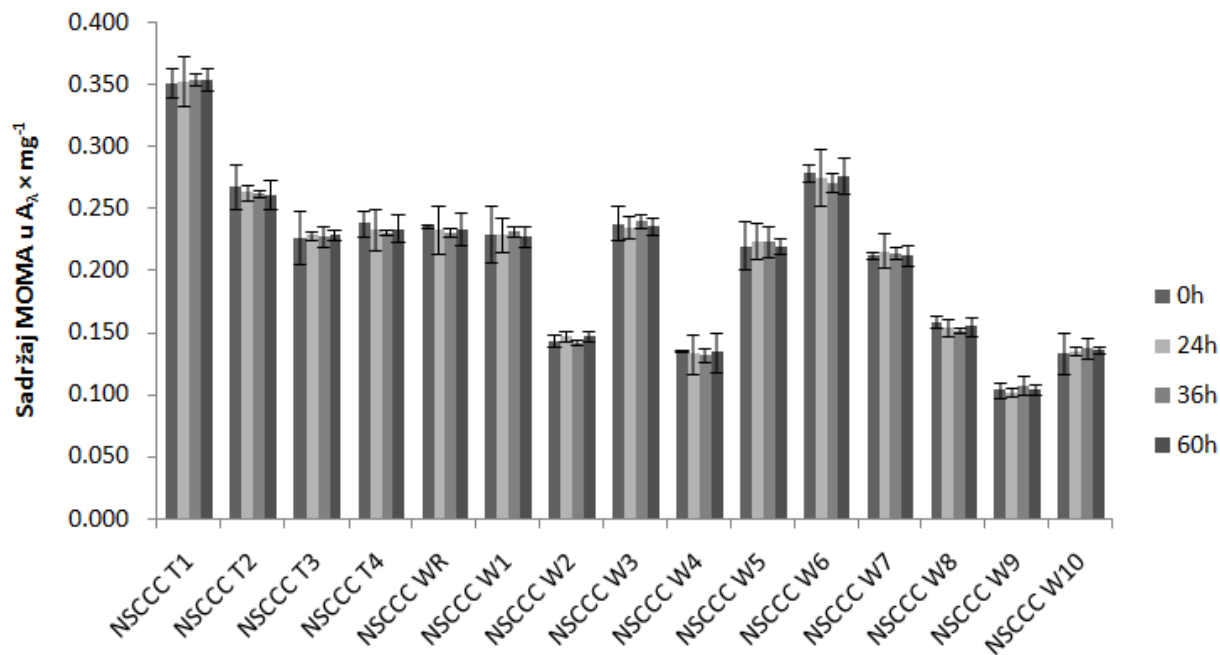


**Grafikon 25.** Uticaj temperature podloge na stabilnost MOMA. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Degradacija MOMA nije uočena ni nakon izlaganja delovanju temperature od 85 °C u toku 24 h. Degradacija MOMA nije detektovana ni izlaganjem visokoj temperaturi nakon tri i šest dana (podaci nisu prikazani).

#### 4.1.1.4.3. Uticaj vremenskog perioda izlaganja UV svetlosti na stabilnost MOMA

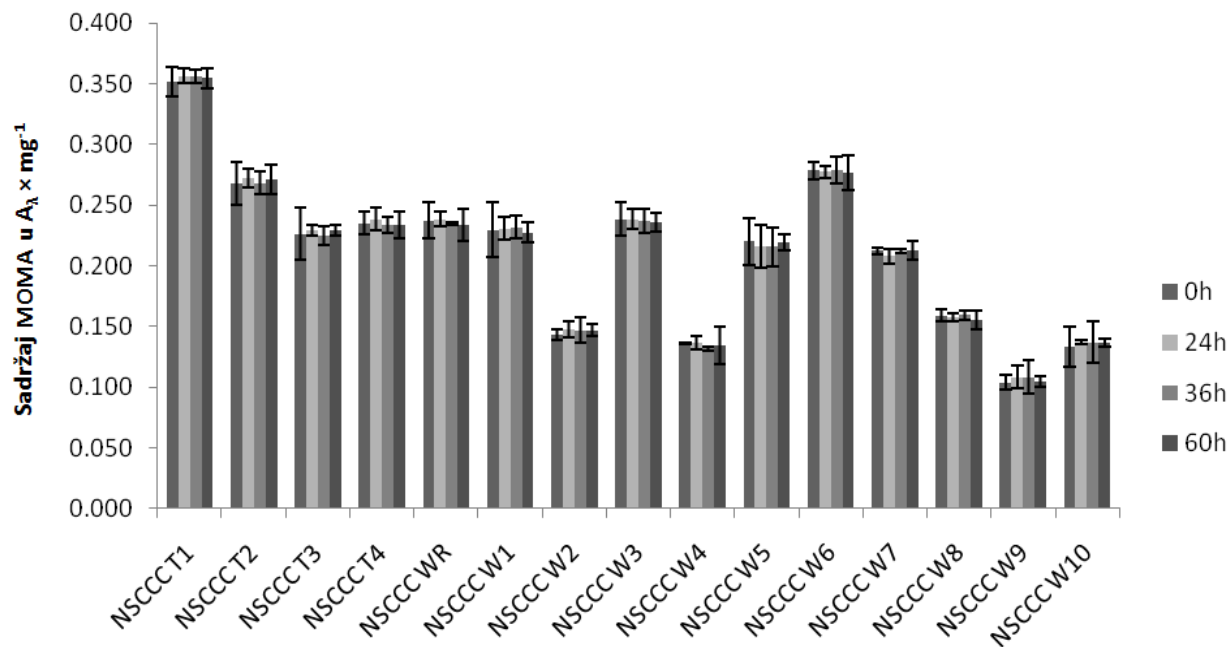
Uporedo sa eksperimentom stabilnosti ekstrahovanog MOMA delovanjem UV svetlosti posmatrana je i stabilnost MOMA u optimalnim (kontrolnim) uslovima zavisno od vremenskog perioda (Grafikon 26).



**Grafikon 26.** Stabilnost MOMA u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Tokom posmatranog vremenskog perioda, u kontrolnim uslovima nije detektovana degradacija MOMA kod svih analiziranih sojeva.

Prilikom analize uticaja UV svetlosti na ekstrahovane MOMA, ekspozicija UV svetlosti tokom dužeg vremenskog perioda nije dovela do promene u koncentraciji MOMA (Grafikon 27).



**Grafikon 27.** Uticaj različitog perioda izlaganja UV zračenju (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) na stabilnost MOMA.

Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D., n=3)

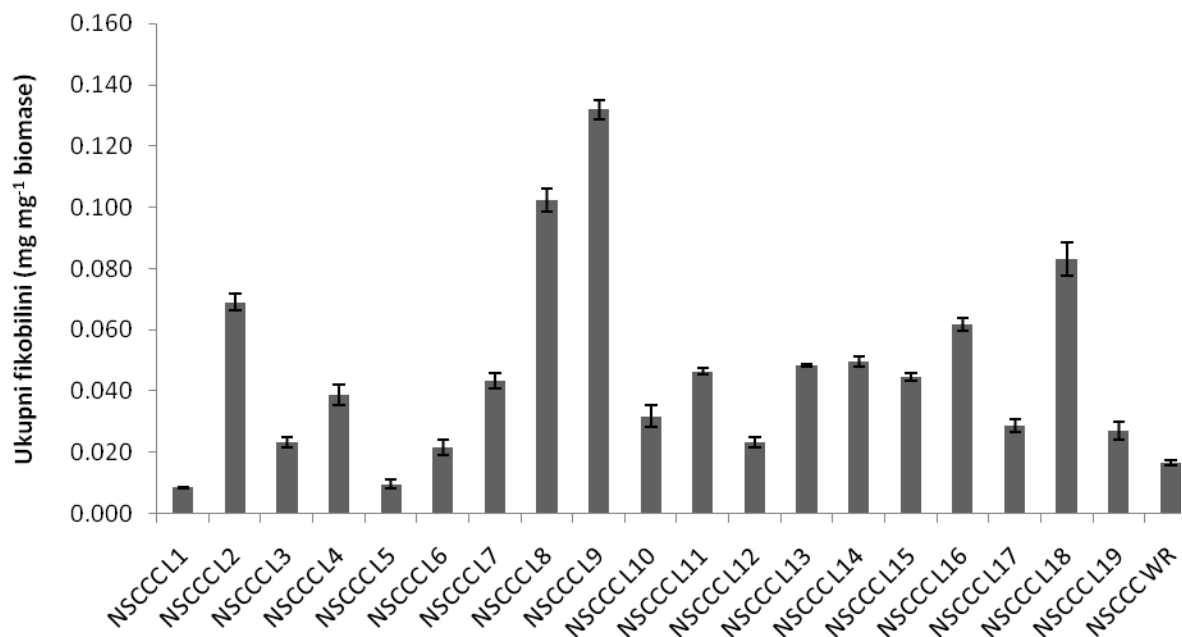
Nije uočena degradacija MOMA ni nakon perioda od 60 h kontinuiranog izlaganja UV svetlosti kod svih analiziranih sojeva.

#### 4.1.2. Produkcija i stabilnost fikobilina, metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance lesnih cijanobakterija

U istraživanjima obuhvaćenim doktorskom disertacijom, cijanobakterijske kulture poreklom iz lesnih regiona Irana, Srbije i Kine gajene su u okviru NSCCC i analizirane su na produkciju fikobilina, MOSA i MOMA. Takođe, posmatrana je stabilnost produkovanih pigmenata zavisno od delovanja tri bakterijska soja.

#### 4.1.2.1. Produkcija fikobilina kod lesnih cijanobakterija

Prilikom analiziranja produkcije fikobilina, prisustvo fikobilina je uočeno kod svih analiziranih lesnih cijanobakterija NSCCC (Grafikon 28).

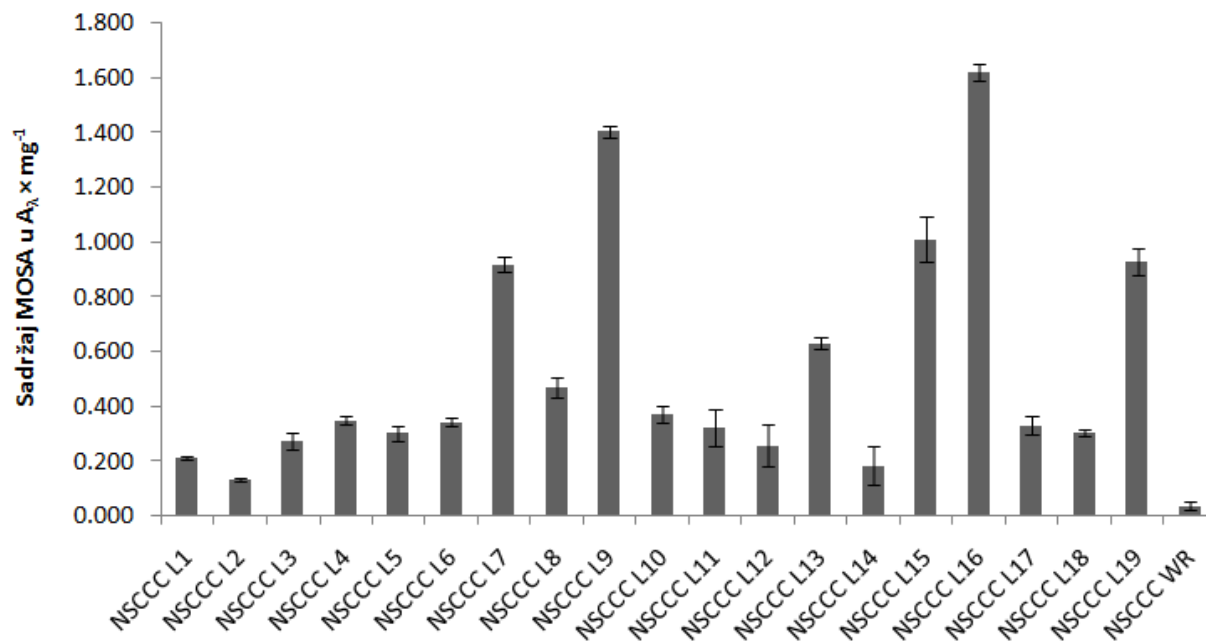


**Grafikon 28.** Produkcija fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Najveće vrednosti ukupnih fikobilina su detektovane kod L9 (0.1319 mg mg<sup>-1</sup>) i L8 (0.1023 mg mg<sup>-1</sup>). Kod cijanobakterijskih kultura L18, L2 i L16 su detektovane vrednosti ukupnih fikobilina između 0.1000 i 0.0500 mg mg<sup>-1</sup> (0.0830 mg mg<sup>-1</sup>, 0.0690 mg mg<sup>-1</sup> i 0.0618 mg mg<sup>-1</sup>, redom). Kod najvećeg broja analiziranih sojeva (65%) je detektovana vrednost ukupnih fikobilina u rangu od 0.0500 do 0.0100 mg mg<sup>-1</sup>. Kod kultura L1 i L5 su uočene najniže vrednosti ukupnih fikobilina, ispod 0.0100 mg mg<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2.2. Produkcija MOSA kod lesnih cijanobakterija

Analiziranjem sposobnosti produkcije MOSA, MOSA je detektovan kod svih lesnih cijanobakterija NSCCC (Grafikon 29).



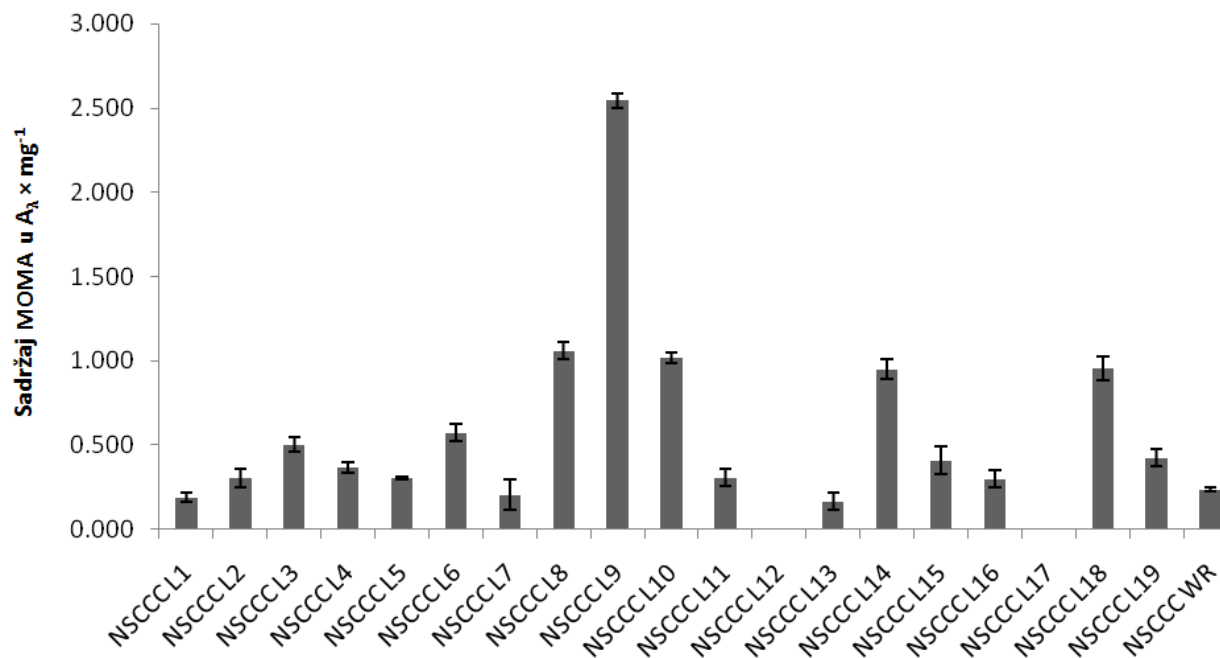
**Grafikon 29.** Produkcija MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Kulture L16 ( $1.6223 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ), L9 ( $1.4056 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ) i L15 ( $1.0104 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ) su pokazale najizraženiju produkciju MOSA. Sa visokom sposobnošću produkcije MOSA su se istakli i L19 ( $0.9292 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ), L7 ( $0.9206 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ) i L13 ( $0.6323 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ ). Kod većine analiziranih lesnih cijanobakterija NSCCC (65%) je detektovana koncentracija MOSA u opsegu od  $0.5000$  do  $0.1000 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ . Kod soja WR su detektovane najniže vrednosti sadržaja MOSA, ispod  $0.0500 A_{\lambda} \times mg^{-1}$ .



#### 4.1.2.3. Produkcija MOMA kod lesnih cijanobakterija

U eksperimentu analize produkcije MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC, dva soja poreklom iz Kine, L12 i L17, nisu pokazala sposobnost produkcije MOMA (Grafikon 30).

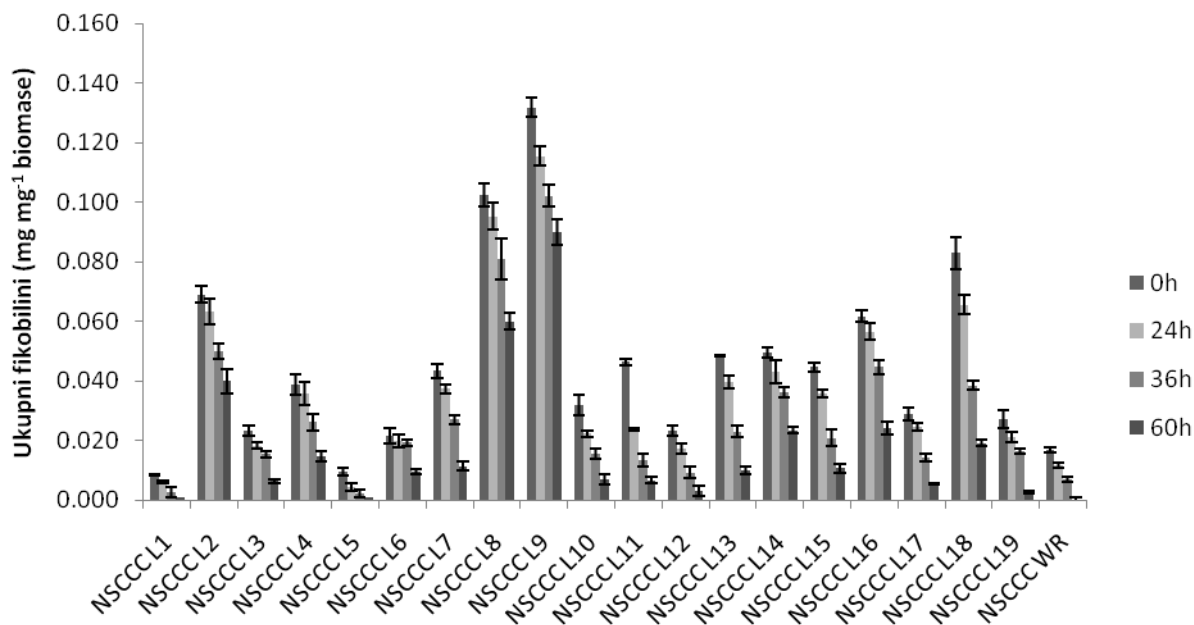


**Grafikon 30.** Produkcija MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

U kulturi L9 je uočena najveća koncentracija MOMA ( $2.5422 A_\lambda \times mg^{-1}$ ) znatno viša od vrednosti detektovanih kod ostalih analiziranih lesnih cijanobakterija NSCCC. Takođe su se sa izraženom sposobnošću produkcije MOMA izdvojili i L8 ( $1.0618 A_\lambda \times mg^{-1}$ ), L10 ( $1.0188 A_\lambda \times mg^{-1}$ ), L18 ( $0.9582 A_\lambda \times mg^{-1}$ ) i L14 ( $0.9515 A_\lambda \times mg^{-1}$ ). U kulturama L3 i L6 su detektovani MOMA koncentracije od  $0.5003$  i  $0.5757 A_\lambda \times mg^{-1}$ . Kod ostalih analiziranih lesnih cijanobakterija (55%) su detektovane vrednosti MOMA u opsegu od  $0.5000$  do  $0.1000 A_\lambda \times mg^{-1}$ .

#### 4.1.2.4. Uticaj biotičkih faktora na stabilnost fikobilina kod lesnih cijanobakterija

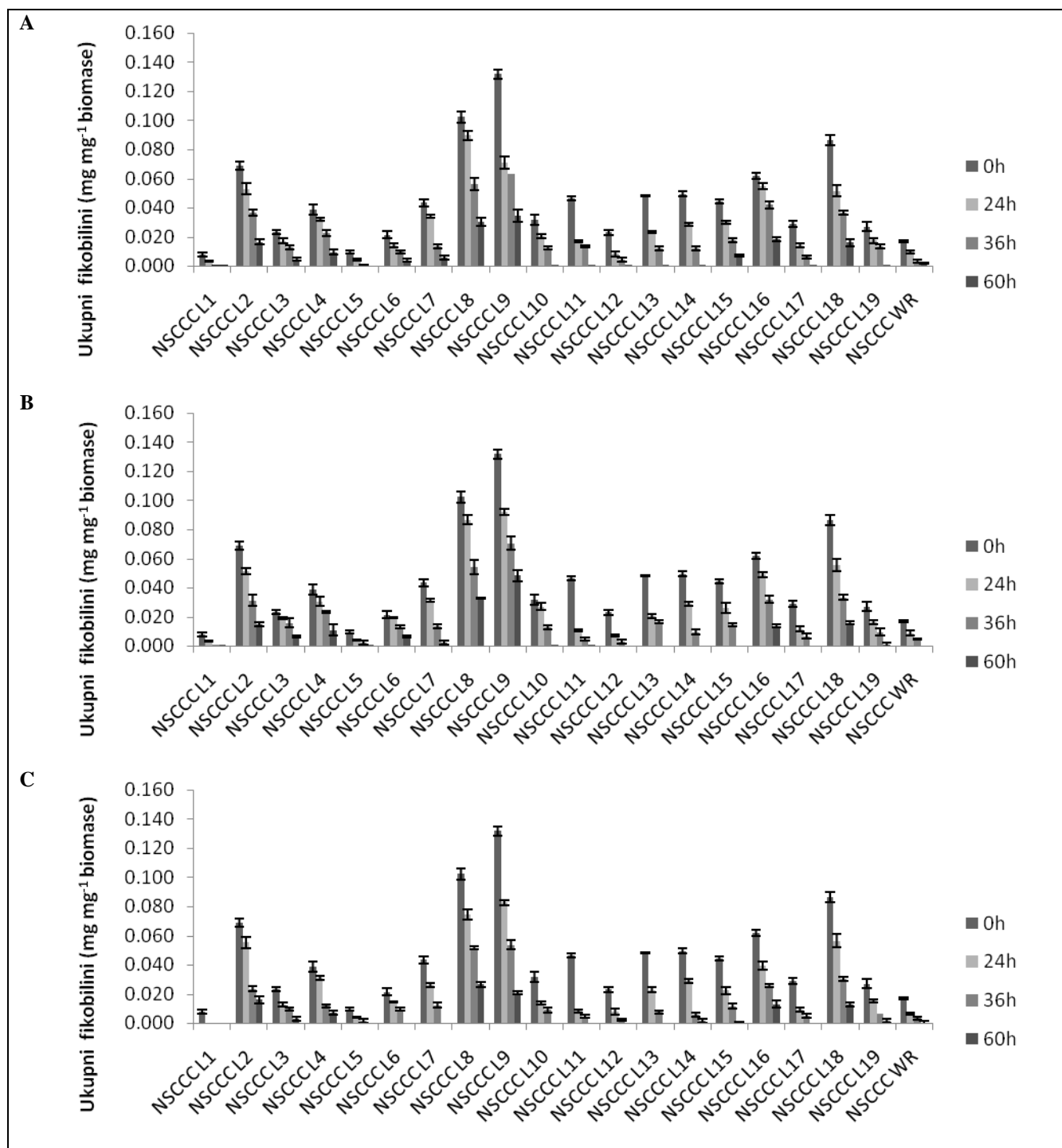
Analizom stabilnosti fikobilina u kontrolnim uslovima, rezultati su pokazali da je sadržaj fikobilina opadao s vremenom (Grafikon 31).



**Grafikon 31.** Sadržaj fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D., n=3)

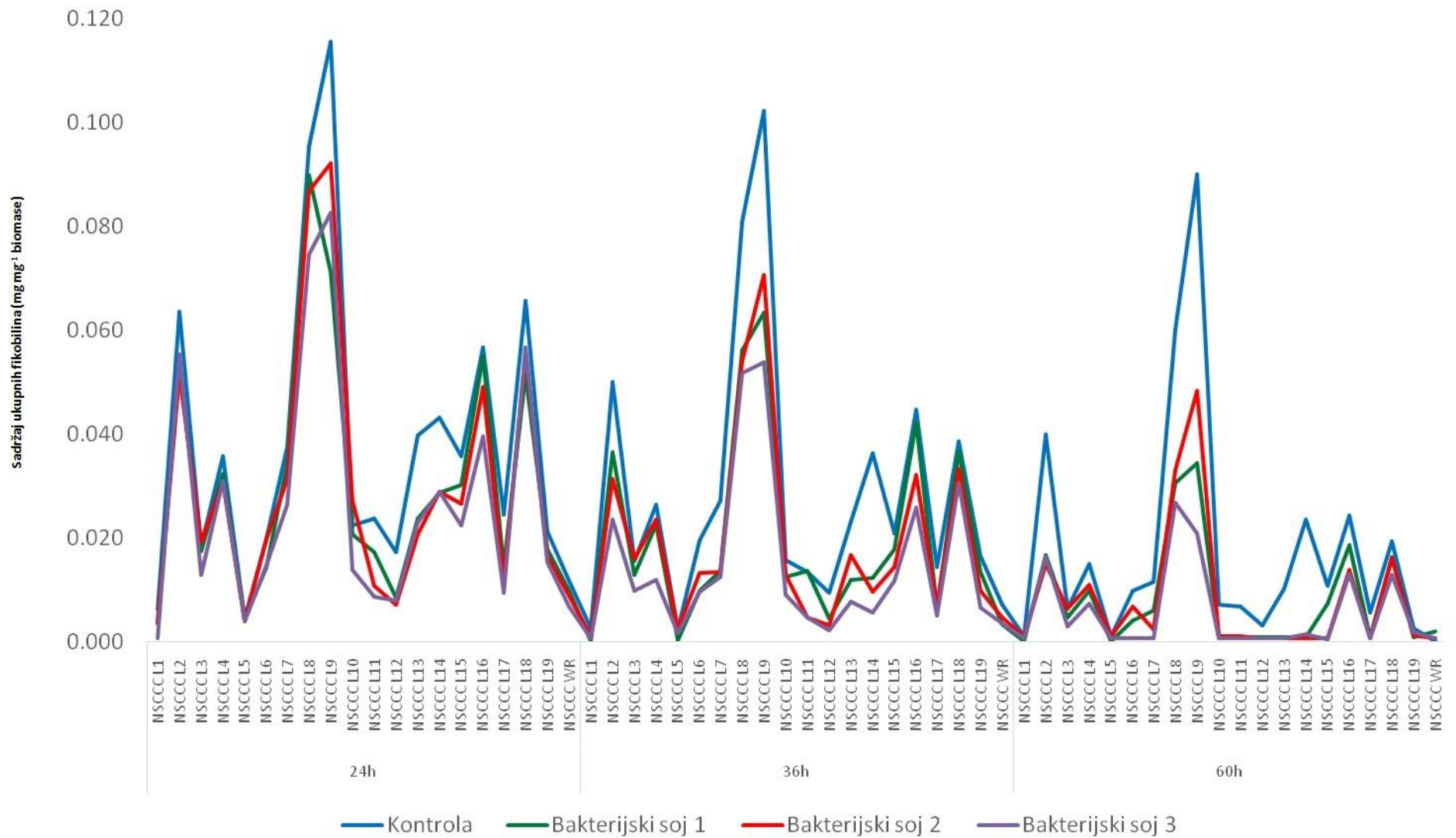
U kulturama L5 i L11 se beleži intenzivnija degradacija sadržaja ukupnih fikobilina, već nakon 24 h (L5 sa  $0.0097 \text{ mg mg}^{-1}$  na  $0.0045 \text{ mg mg}^{-1}$ , L11 sa  $0.0830 \text{ mg mg}^{-1}$  na  $0.0656 \text{ mg mg}^{-1}$ ). Iako evidentirani sa većom koncentracijom fikobilina, intenzivnija degradacija uočena je i kod L9 i L18. U kulturama L1, L5 i WR se beleži potpuna razgradnja fikobilina nakon 60 h.

U testu biodegradabilnosti fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC analiziran je uticaj tri različita soja bakterija izolovanih iz lesnih uzoraka. Tokom testa biodegradabilnosti, uočava se degradacija sadržaja ukupnih fikobilina u prisustvu sva tri soja bakterija (Grafikon 32).



**Grafikon 32.** Biodegradacija fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) bakterijama: A) bakterijski soj 1, B) bakterijski soj 2 i C) bakterijski soj 3. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

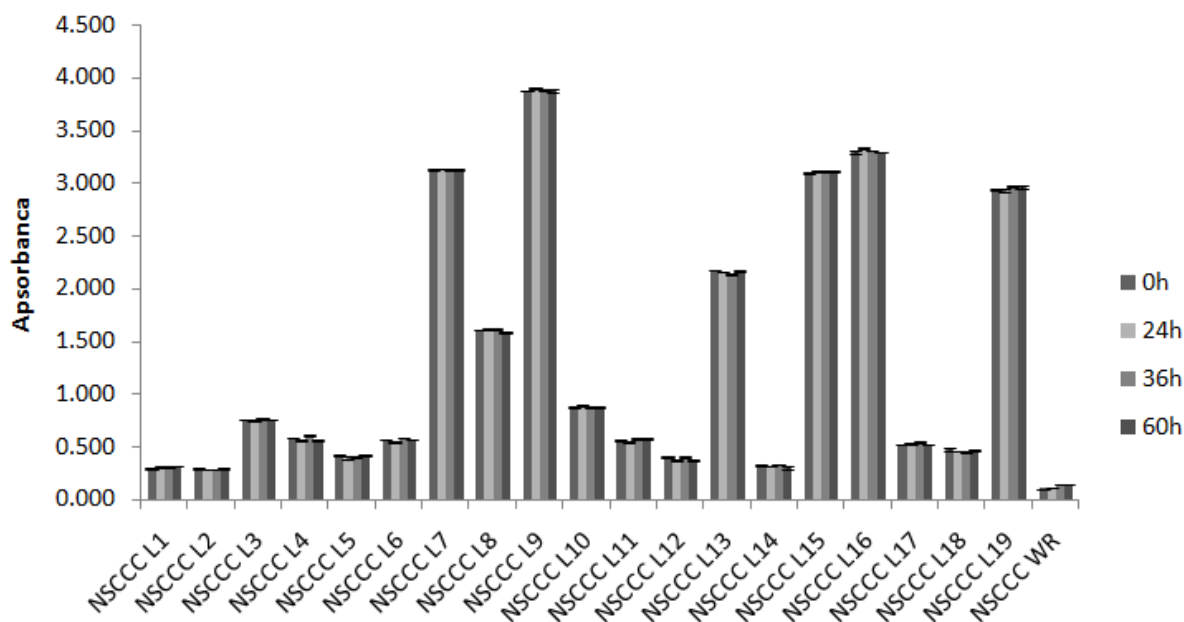
Kod većine lesnih cijanobakterija NSCCC zabeleženo je primetno opadanje u koncentraciji fikobilina nakon 36 h, koje je nastavljeno zajedno sa periodom izlaganja bakterijskim sojevima (Grafikon 33). Nakon 60 h kontinuiranog izlaganja, kod pojedinih analiziranih lesnih cijanobakterija beleži se potpuna degradacija fikobilina. U poređenju sa kontrolnim uslovima, primećeno je da je intenzitet degradacije povećan u prisustvu bakterija. Kod većine lesnih cijanobakterija uočen je veći stepen degradacije fikobilina delovanjem bakterijskog soja 3 tokom analiziranog vremenskog perioda.



**Grafikon 33.** Biodegradacija fikobilina lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda (24 h, 36 h, 60 h) u kontrolnim uslovima i nakon ekspozicije bakterijskim sojevima (0 h (nulto očitavanje) nije prikazano s obzirom da je isto u svim tretmanima)

#### 4.1.2.5. Uticaj biotičkih faktora na stabilnost MOSA kod lesnih cijanobakterija

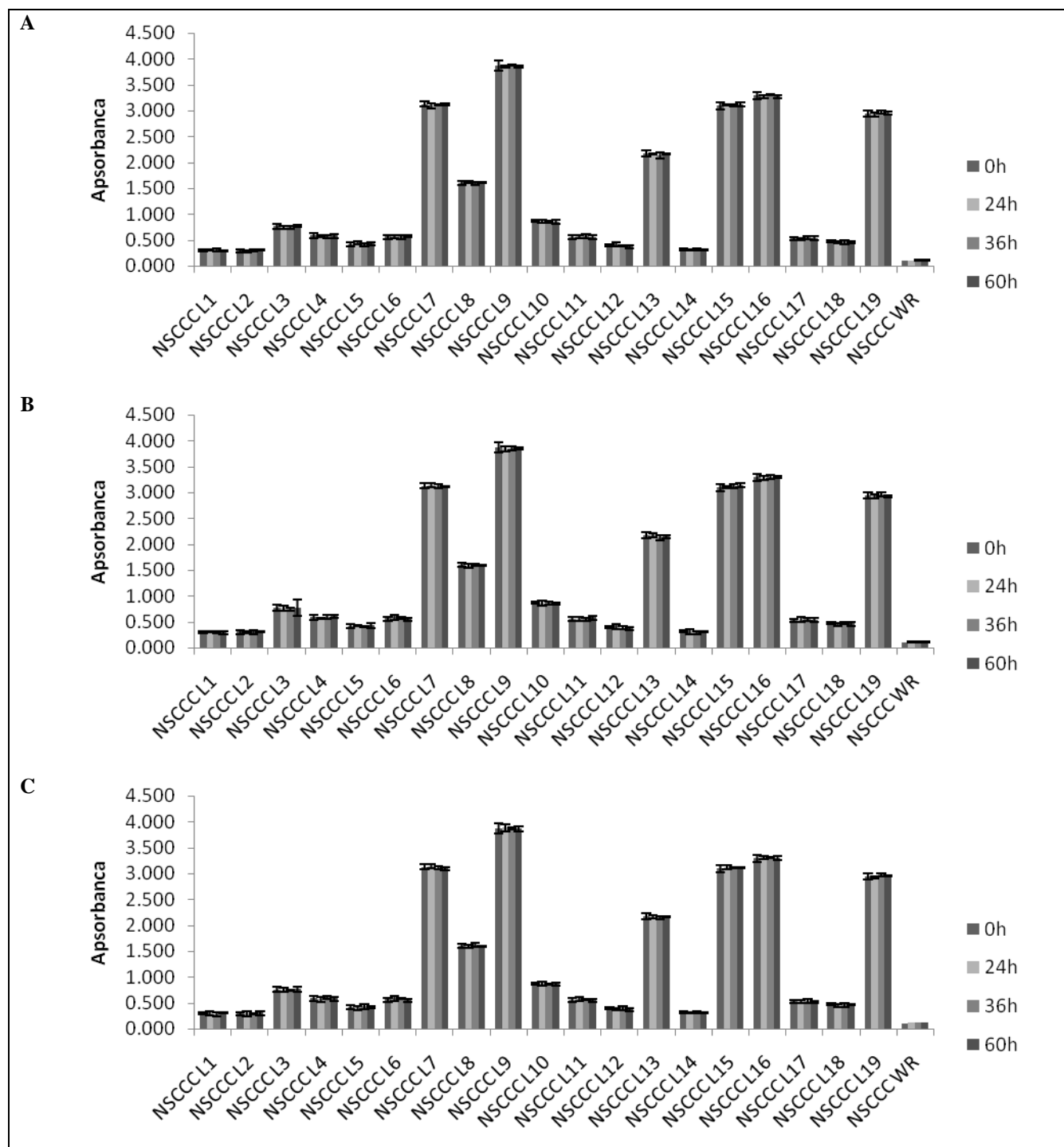
Analizirana je stabilnost MOSA u kontrolnim uslovima zavisno od vremenskog perioda (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) (Grafikon 34). Kako se sadržaj scitonemina izračunava preko trostruke formule (Poglavlje 3.4.4.2.) koju čine vrednosti apsorbance za scitonemin, karotenoide i hlorofil *a*, a kako je poznato da su karotenodi i hlorofil *a* podložni degradaciji bakterijama, u testu biodegradabilnosti MOSA analiziran je uticaj bakterija na vrednost apsorbance MOSA.



**Grafikon 34.** Apsorbanca MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Tokom trajanja eksperimenta degradacija MOSA nije detektovana ni nakon perioda od 60 h.

Tokom testa biodegradabilnosti MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC analiziran je uticaj tri različita soja bakterija izolovanih iz lesnih uzoraka (Grafikon 35).

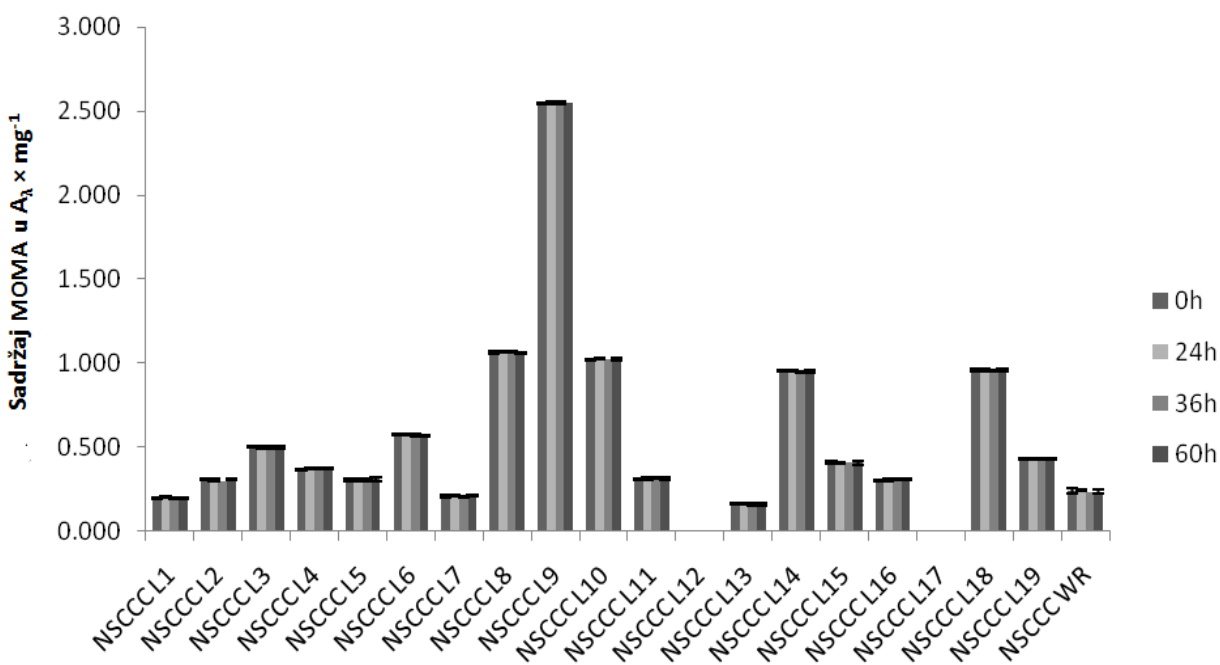


**Grafikon 35.** Biodegradacija MOSA lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) bakterijama: A) bakterijski soj 1, B) bakterijski soj 2 i C) bakterijski soj 3. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Prilikom testa biodegradabilnosti tokom analiziranog vremenskog perioda nije uočena promena u vrednosti apsorbance MOSA delovanjem sva tri soja bakterija.

#### 4.1.2.6. Uticaj biotičkih faktora na stabilnost MOMA kod lesnih cijanobakterija

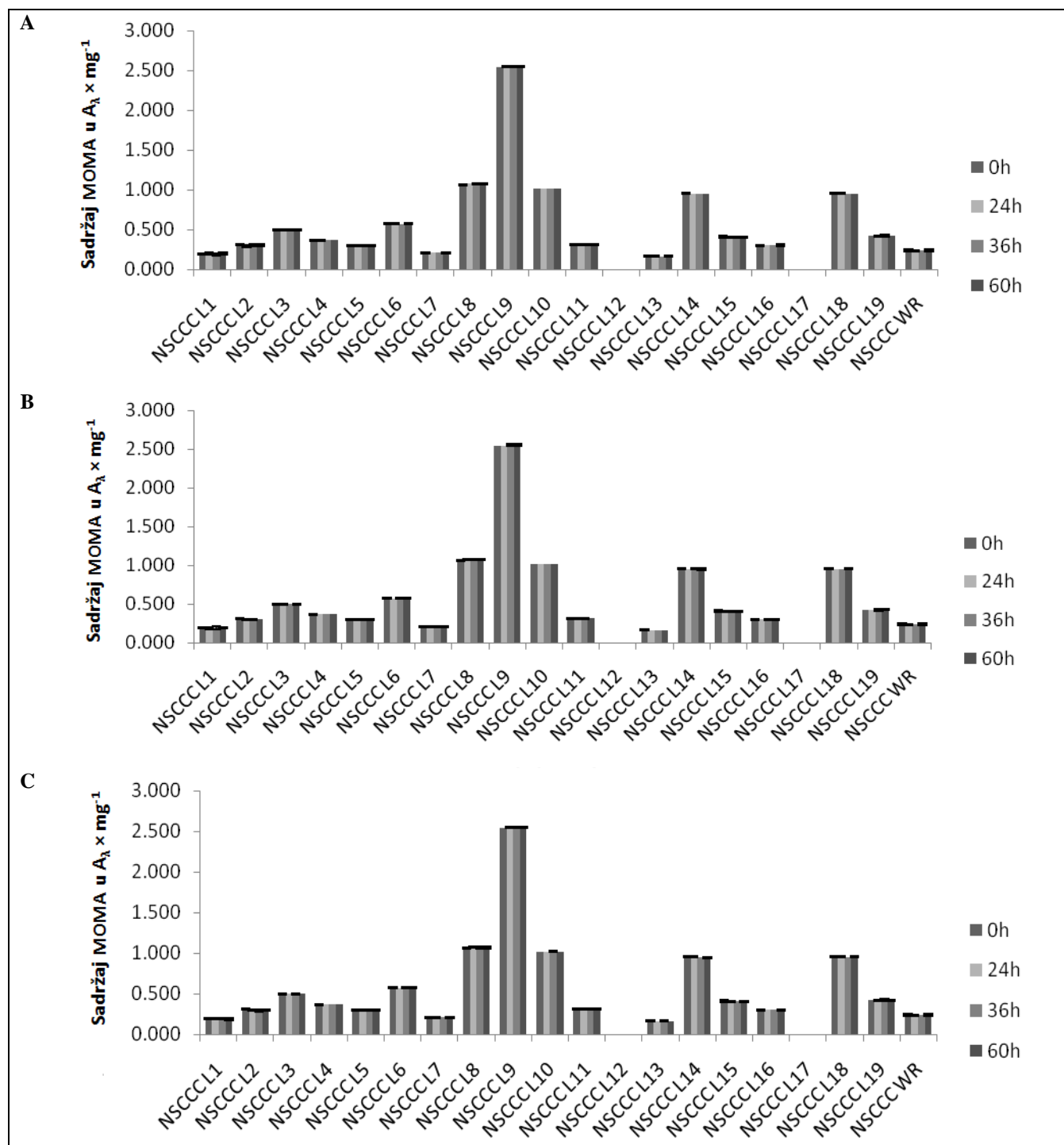
U eksperimentu analize stabilnosti MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima nije došlo do razgradnje MOMA tokom analiziranog vremenskog perioda (Grafikon 36).



**Grafikon 36.** Sadržaj MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC u kontrolnim uslovima zavisno od vremena (0 h, 24 h, 36 h, 60 h). Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

U testu biodegradabilnosti MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC posmatrao se uticaj tri soja bakterija izolovanih iz lesnih uzoraka (Grafikon 37).





**Grafikon 37.** Biodegradacija MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 60 h) bakterijama: A) bakterijski soj 1, B) bakterijski soj 2 i C) bakterijski soj 3. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

Tokom vremenskog perioda analiziranja uticaja tri bakterijska soja na stabilnost MOMA, nije detektovana redukcija u sadržaju MOMA. Uočeno je da su MOMA pokazali stabilnu strukturu i sadržaj MOMA u analiziranim lesnim sojevima nije degradiran ni nakon perioda izlaganja bakterijama od 60 h.

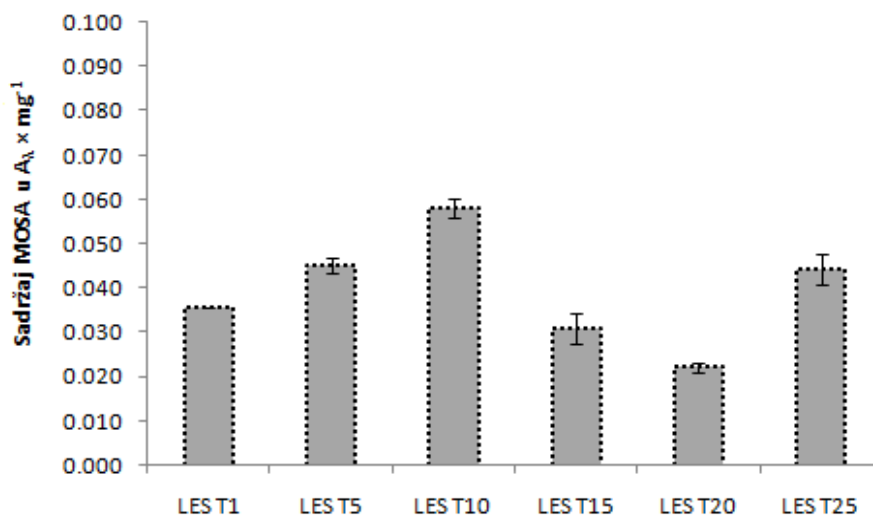
#### 4.1.3. Prisustvo metabolita u opsegu scitonemin apsorbanace i metabolita u opsegu mikosporin apsorbanace u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama

##### 4.1.3.1. Prisustvo MOSA u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama

Sadržaj MOSA je analiziran kod 6 lesnih uzoraka i 4 BLC.

➤ *analiza sadržaja MOSA uzoraka Titelskog lesnog platoa*

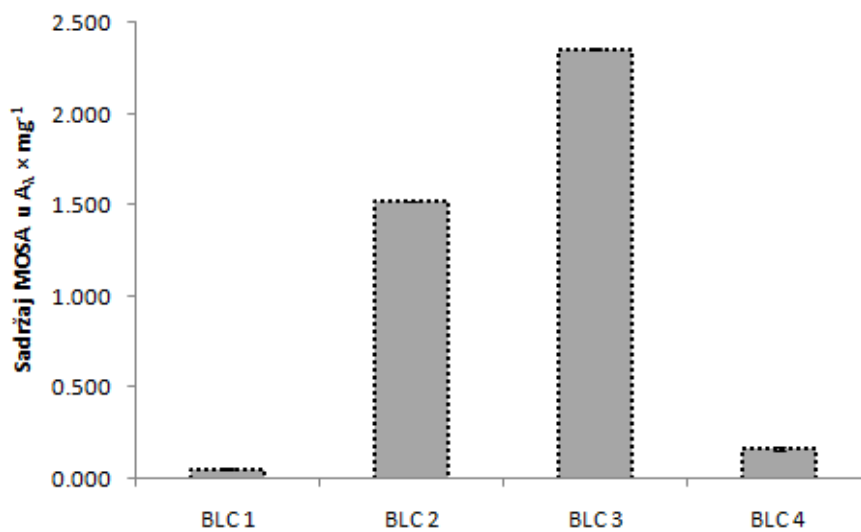
Tokom analize prisustva MOSA u lesnim uzorcima, uočeno je prisustvo MOSA u svim lesnim uzorcima (Grafikon 38). Najveći sadržaj MOSA je detektovan u uzorku LES T10 ( $0.0580 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), a potom kod LES T5, LES T25, LES T1, LES T15, redom. Najniži sadržaj MOSA je detektovan u uzorku LES T20 ( $0.0222 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ).



Grafikon 38. Sadržaj MOSA u uzorcima lesa

➤ *analiza sadržaja MOSA bioloških lesnih pokorica*

Tokom analiza, prisustvo MOSA je detektovano kod svih uzoraka BLC (Grafikon 39). Najveći sadržaj MOSA je uočen kod BLC 3 ( $2.3538 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), a najniži u uzorku BLC 1 ( $0.0573 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ).



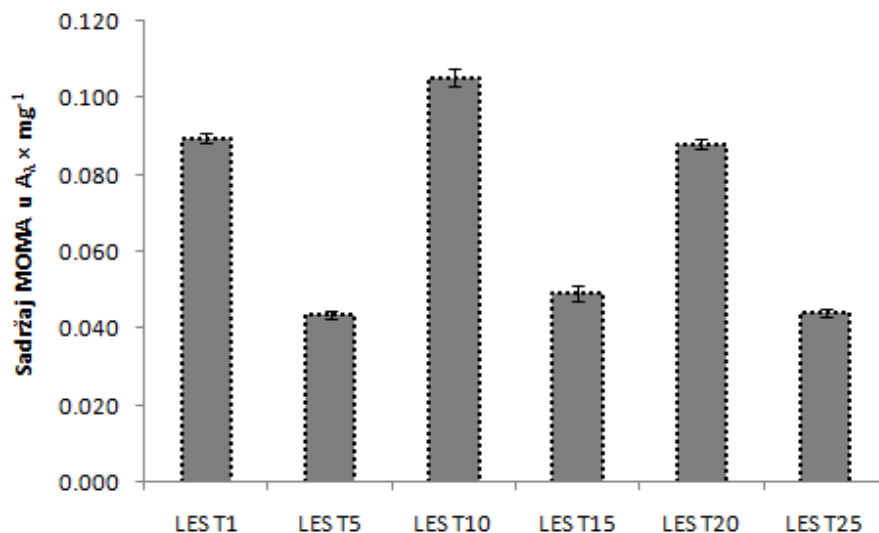
Grafikon 39. Sadržaj MOSA u BLC

#### 4.1.3.2. Prisustvo MOMA u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama

Prisustvo MOMA je analizirano u lesnim uzorcima (6) i BLC (4).

➤ *analiza sadržaja MOMA uzoraka Titelskog lesnog platoa*

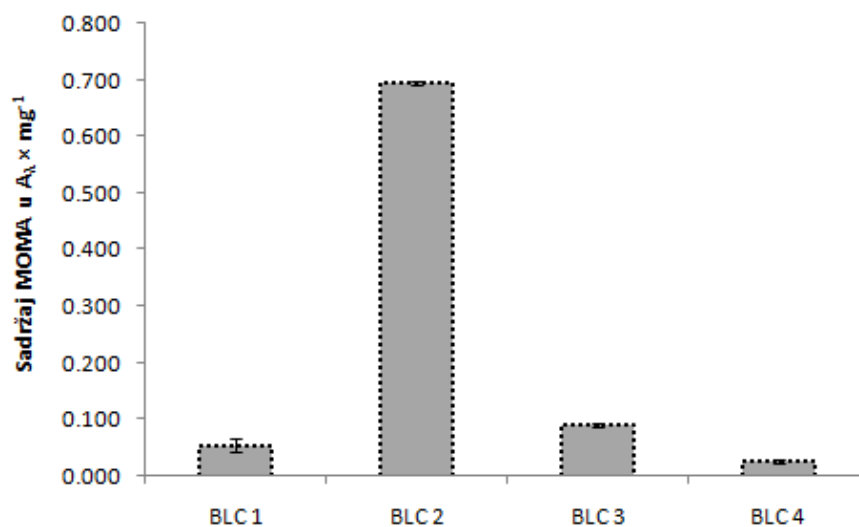
Analizom prisustva MOMA u uzorcima lesa, uočeno je prisustvo MOMA u svim lesnim uzorcima (Grafikon 40). Najveći sadržaj MOMA je uočen u uzorku LES T10 ( $0.1054 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ), a potom su sledili uzorci LES T1 i LES T20 sa približno istim sadržajem MOMA. Preostali lesni uzorci su imali nešto niže, približno iste vrednosti MOMA (ispod  $0.0491 A_{\lambda} \times \text{mg}^{-1}$ ).



Grafikon 40. Sadržaj MOMA u uzorcima lesa

➤ *analiza sadržaja MOMA bioloških lesnih pokorica*

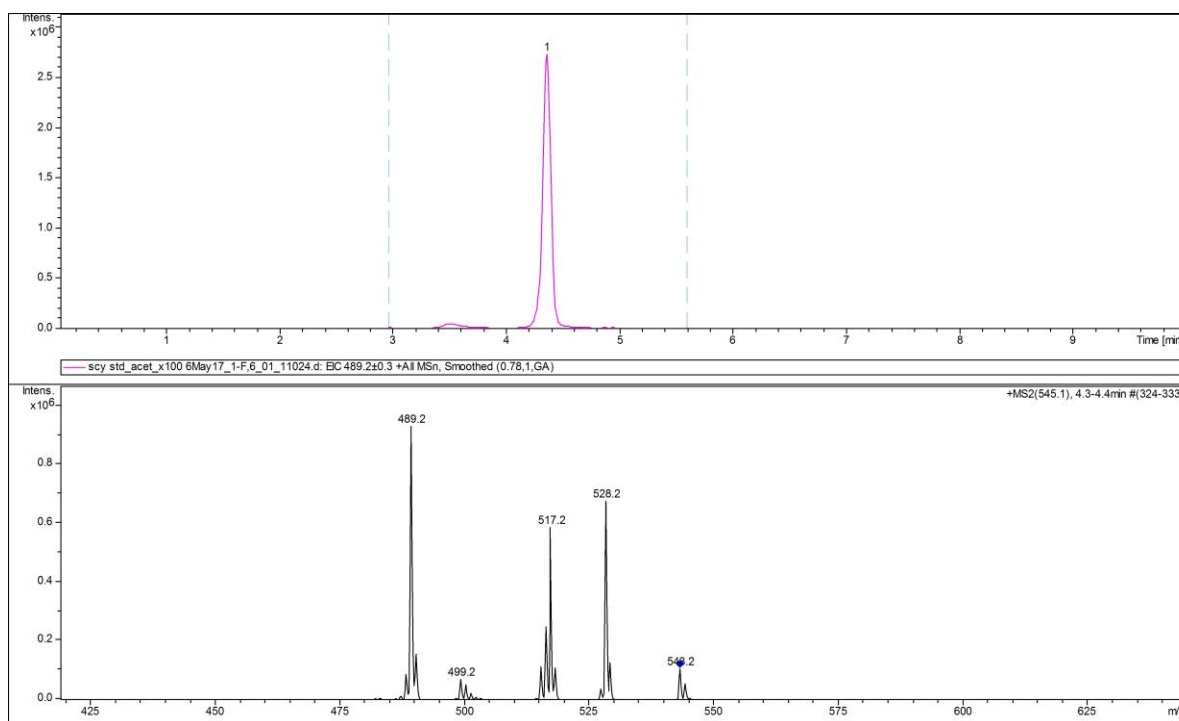
Analiziranjem prisustva MOMA u uzorcima BLC detektovano je prisustvo MOMA u svim uzorcima (Grafikon 41). Najveći sadržaj MOMA je detektovan u uzorku BLC 2 ( $0.6951 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ), potom su sledili uzorci BLC 3 i BLC 1 sa nešto nižim sadržajem, dok je najniži sadržaj MOMA uočen u uzorku BLC 4 ( $0.0255 A_\lambda \times \text{mg}^{-1}$ ).



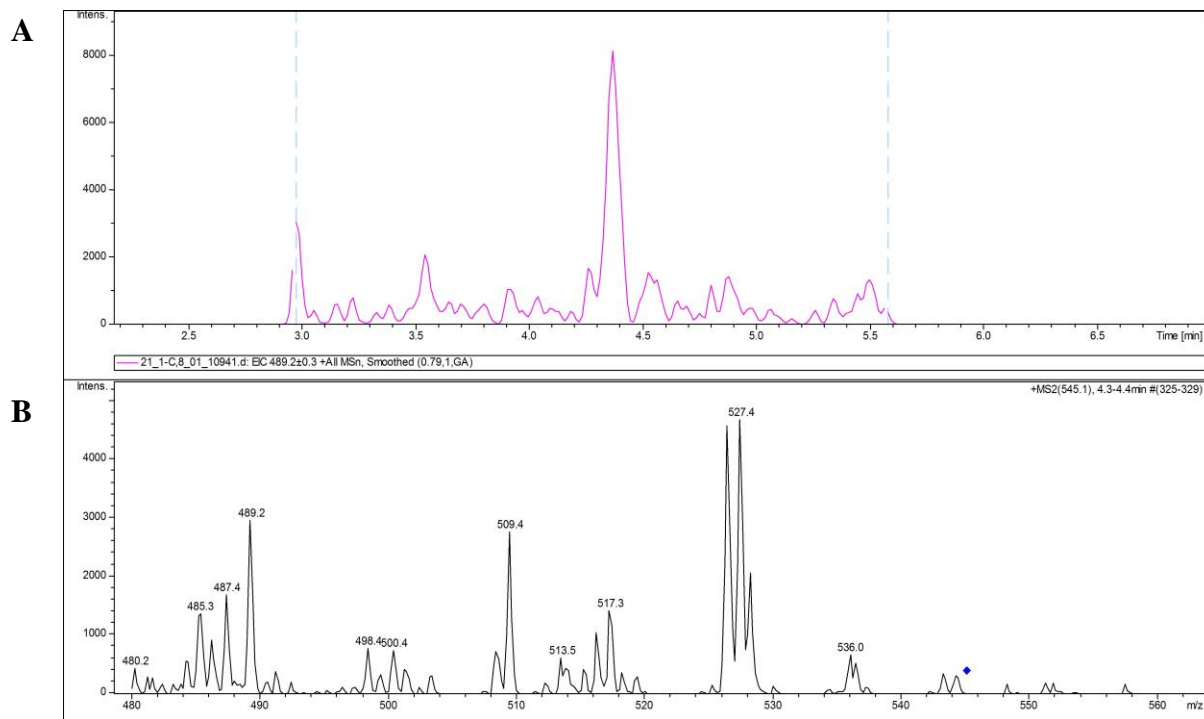
Grafikon 41. Sadržaj MOMA u BLC

#### 4.1.4. LC-MS(/MS) analiza scitonemina analiziranih cijanobakterija NSCCC

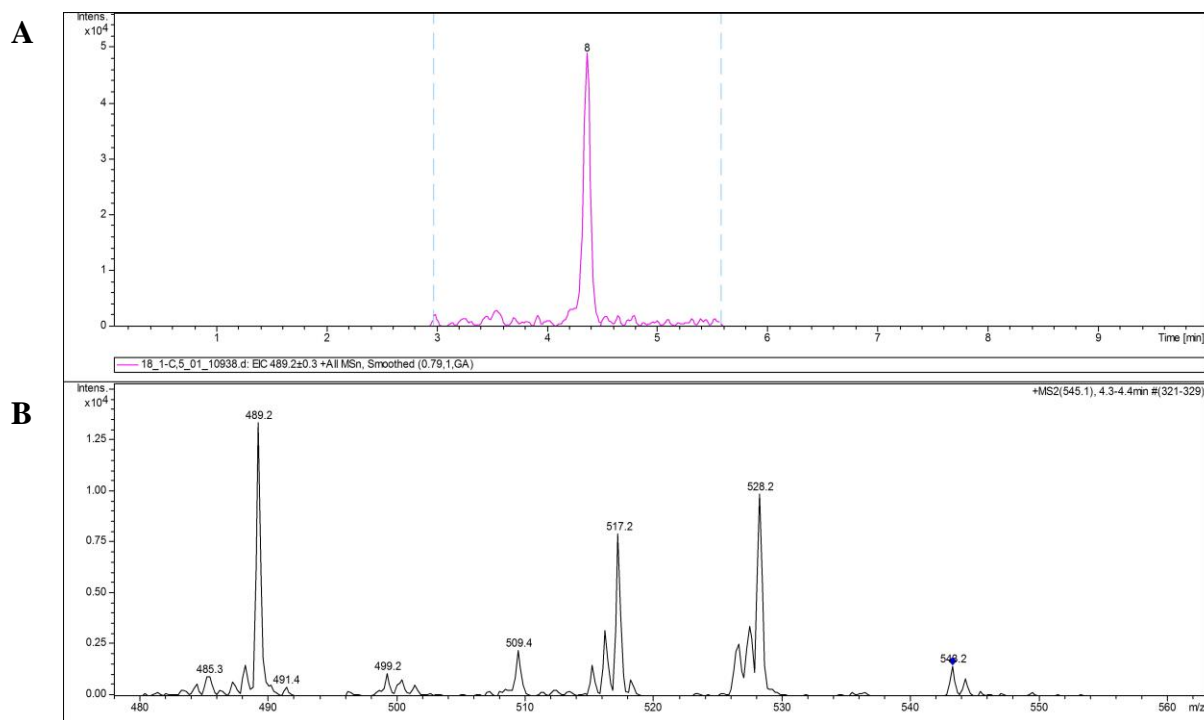
Korišćenjem LC-MS(/MS) metode scitonemin je detektovan kod 13 terestričnih cijanobakterija NSCCC (Grafikoni 43-52). Analize hromatograma ukazuju na istaknut jonski pik protonisanog molekula ( $[M + H]^+$ ) mase 545.1 m/z, karakteristične mase za molekul scitonemin (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Squier i sar., 2004). Dominantni produkt joni dobijeni fragmentacijom ovog jona (528 m/z, 517 m/z i 489 m/z) potvrđuju njegov identitet (Squier i sar., 2004) (Grafikon 42).



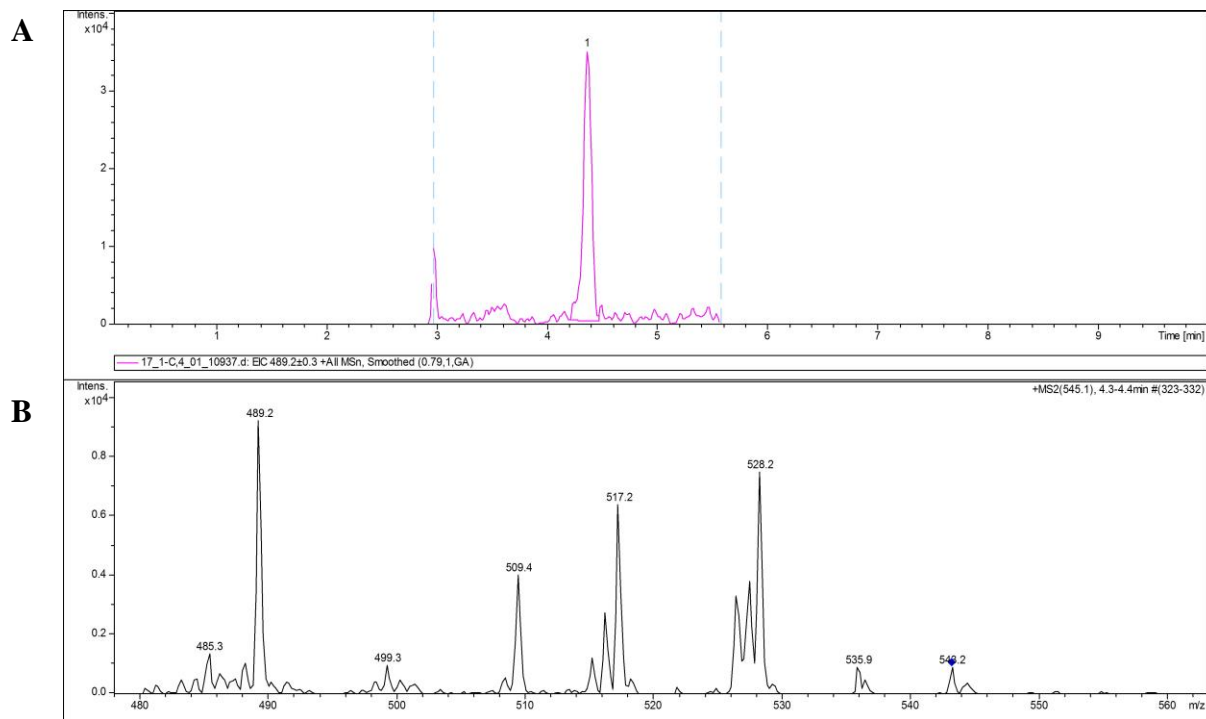
**Grafikon 42.** LC-MS(/MS) hromatogram standarda scitonemina: A-prikazuje tipičan pik scitonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scitonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



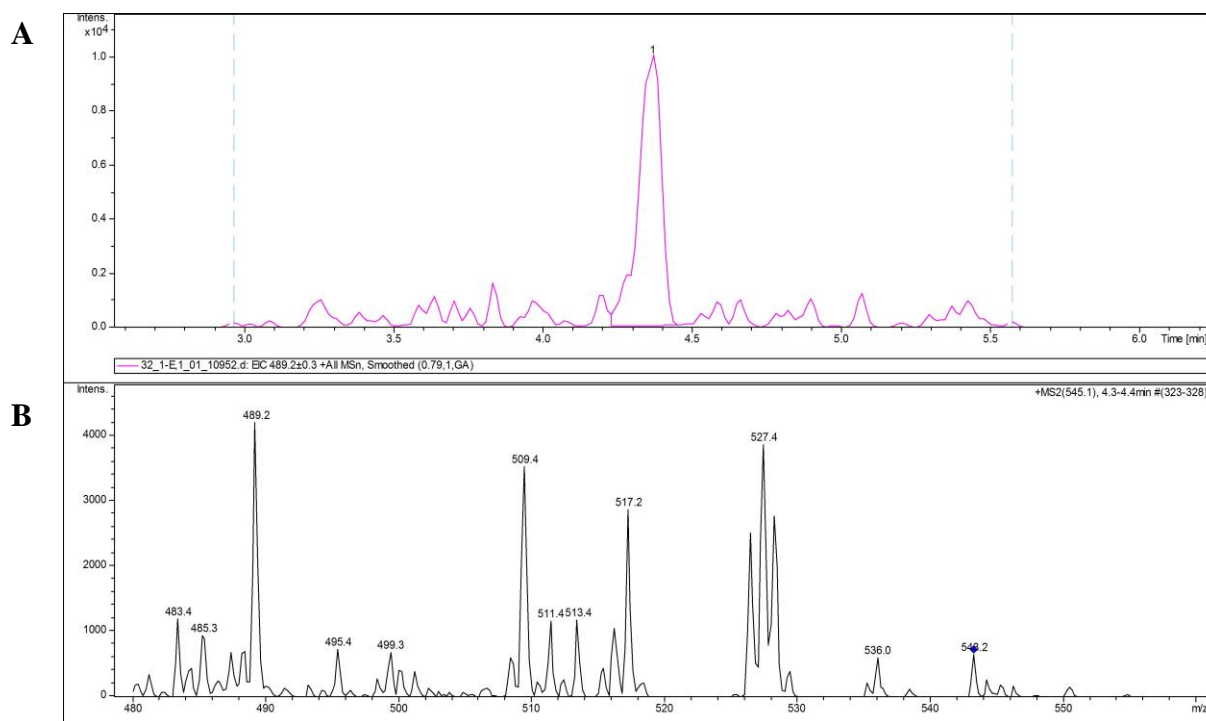
**Grafikon 43.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz zemljišnog soja cijanobakterija NSCCC T4 (*Nostoc* sp.): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



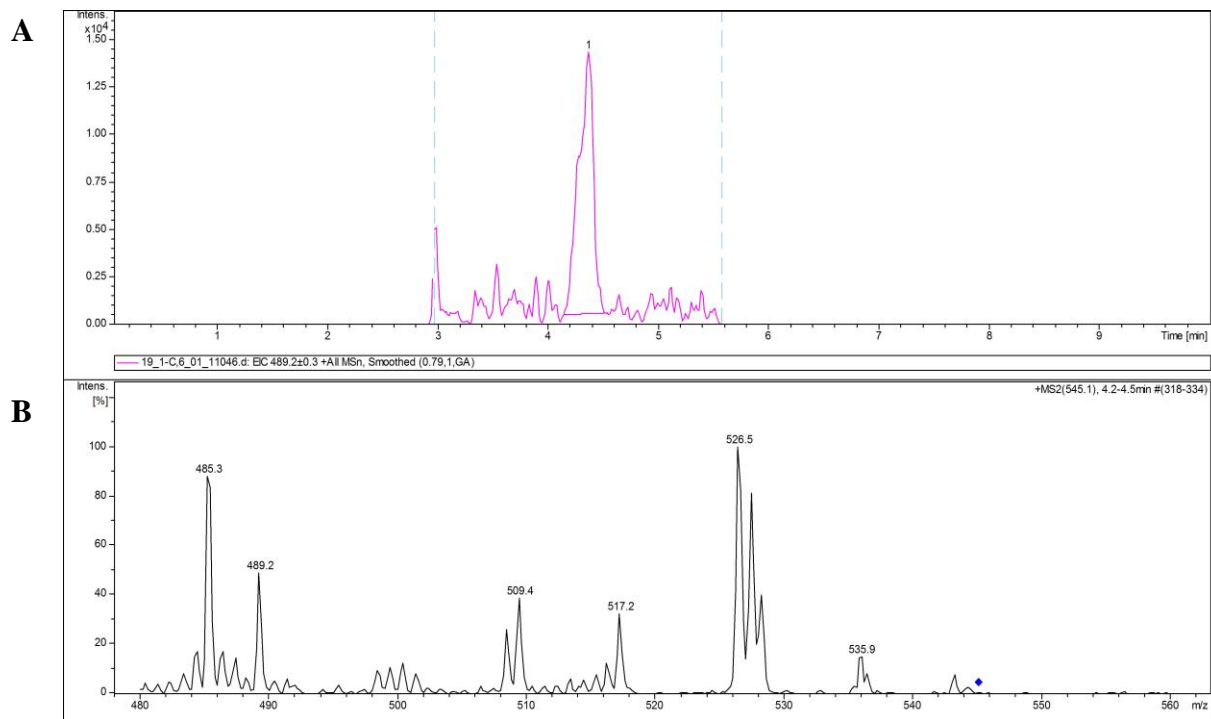
**Grafikon 44.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L2 (*Tolypothrix* sp., *Oculatella* sp.): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



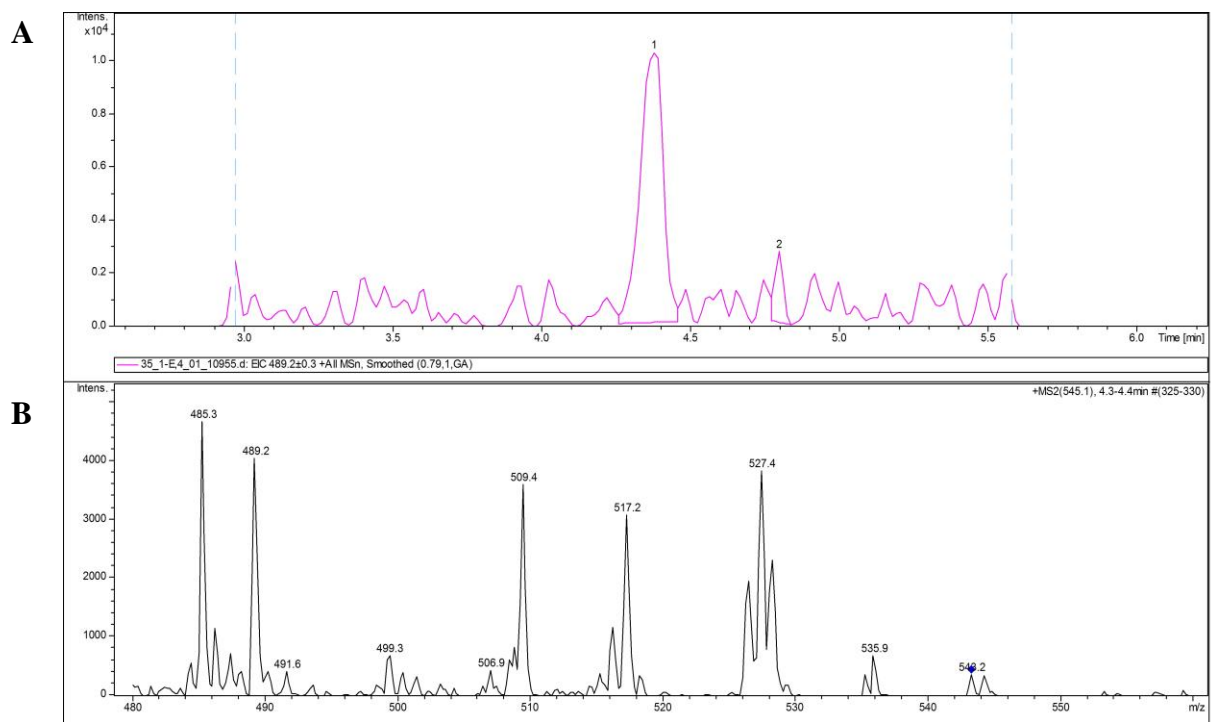
**Grafikon 45.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, N3CCC L3 (*Chroococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., *Synechococcus* sp.): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



**Grafikon 46.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, N3CCC L4 (*Nostoc* sp., *Leptolyngbya* sp.): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z

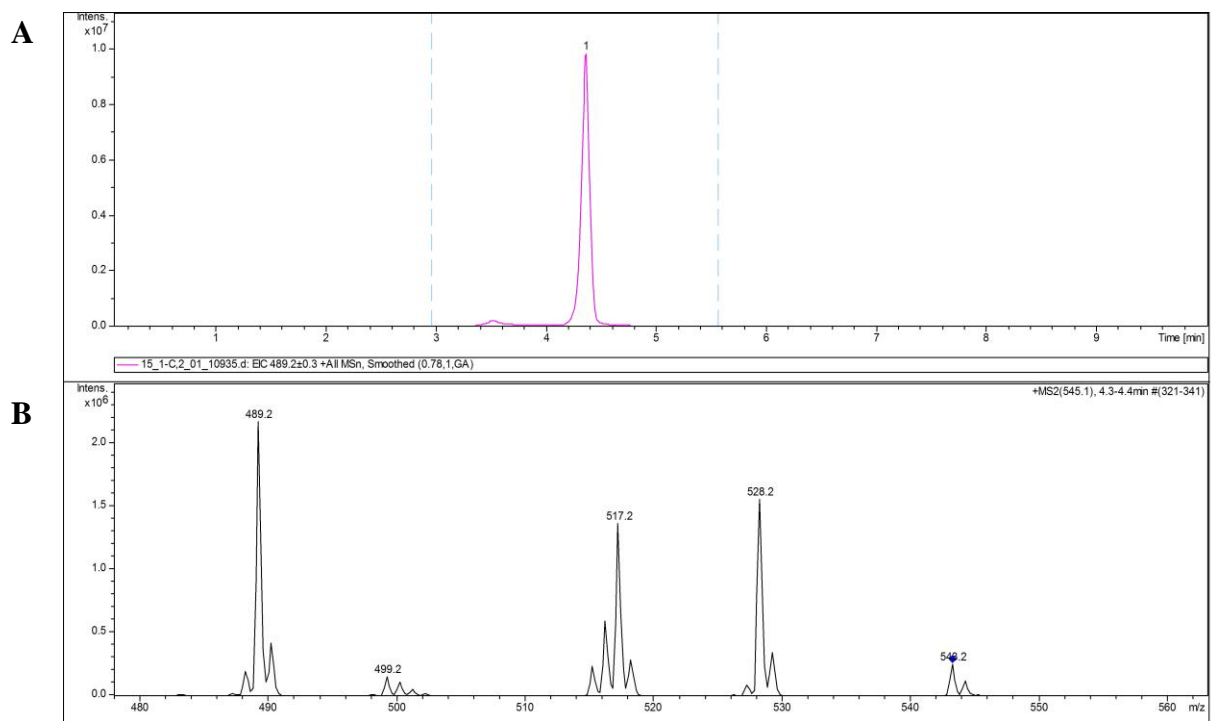


**Grafikon 47.** LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L6 (*Nostoc sp.*, *Anathece sp.*): A-prikazuje tipičan pik scitonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scitonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z

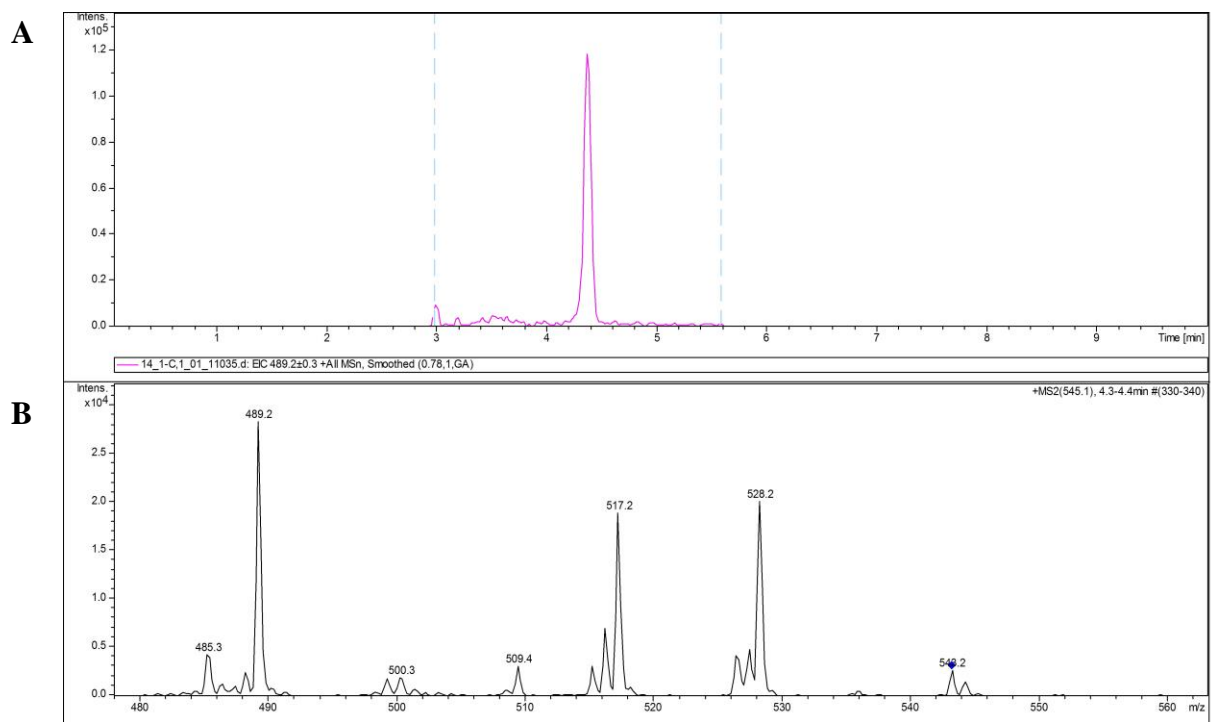


**Grafikon 48.** LC-MS(/MS) hromatogram scitonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L12 (*Nostoc sp.*): A-prikazuje tipičan pik scitonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scitonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z

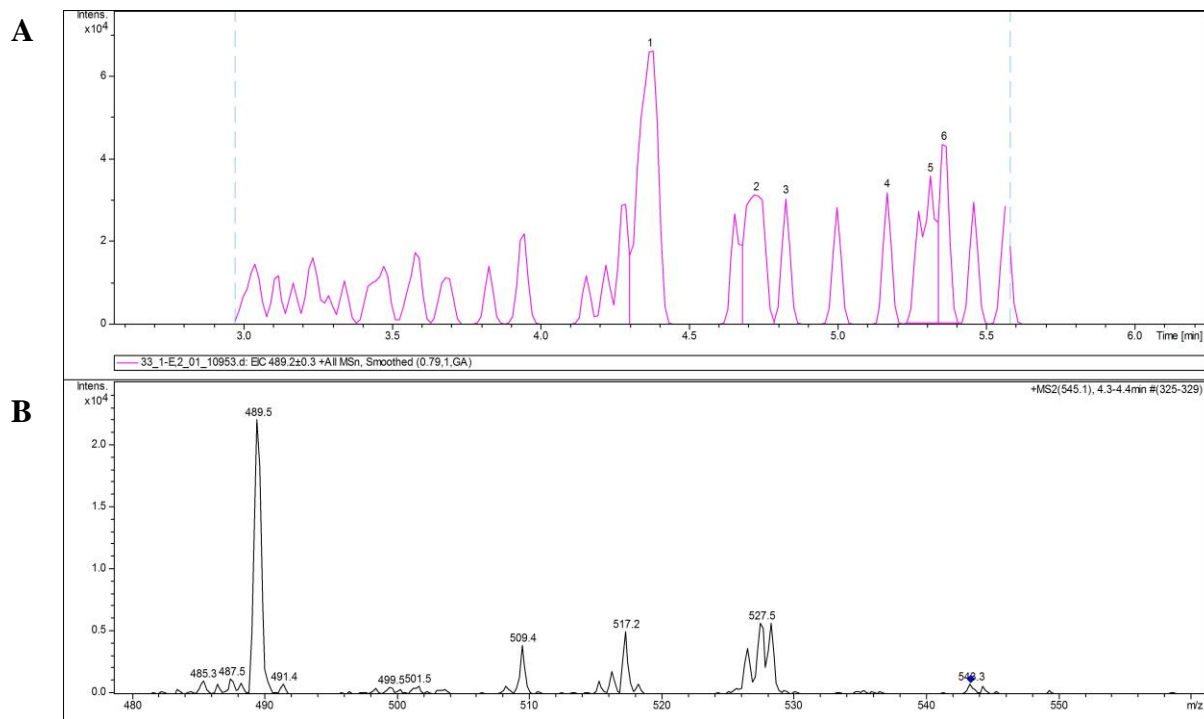




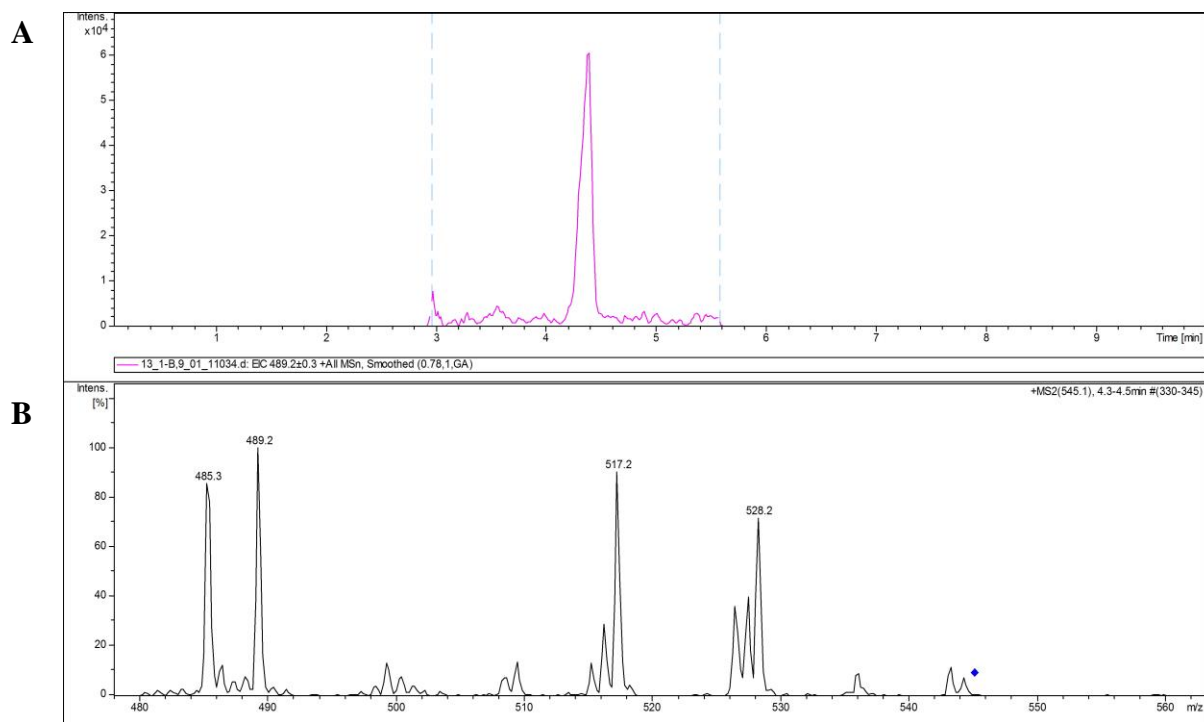
**Grafikon 49.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L15 (*Nostoc sp.*, *Leptolyngbya sp.*): A prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



**Grafikon 50.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L16 (*Nostoc sp.*, *Leptolyngbya sp.*): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



**Grafikon 51.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L18 (*Nostoc sp.*, *Leptolyngbya sp.*): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z



**Grafikon 52.** LC-MS(/MS) hromatogram scytonemina izolovanog iz lesnih cijanobakterija, NSCCC L19 (*Nostoc sp.*, *Leptolyngbya sp.*, *Lyngbya sp.*): A-prikazuje tipičan pik scytonemina na retencionom vremenu 4.4 min; B-maseni spektar scytonemina koji prikazuje istaknuti pik na 545.1 m/z

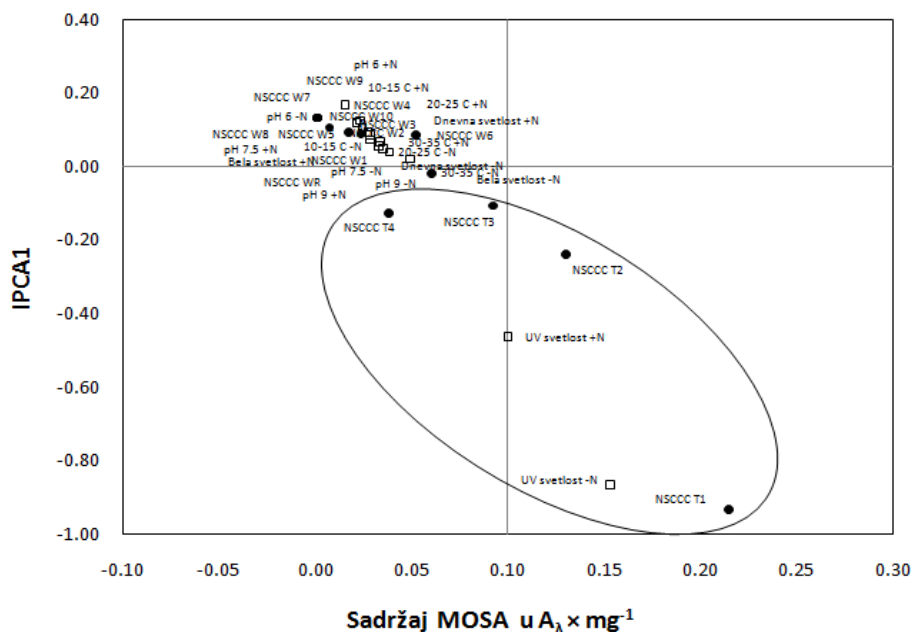
#### 4.1.5. Statistička analiza interakcije sredinskih faktora na produkciju pigmentata

Pomoću AMMI modela interakcije između sojeva i sredina u kojima su sojevi gajeni utvrđuje se koji sojevi imaju najstabilniju produkciju pigmenta i specifične interakcije pojedinih sojeva i sredina. Konkretnije, može se sagledati koji uslovi sredine najstabilnije i najintenzivnije utiču na produkciju biomarkera.

U cilju prikazivanja efekta svake sredine i soja na produkciju MOSA i MOMA, rađeni su AMMI1 (first principal component axis (IPCA1) vs. produkcija pigmenta) i AMMI2 (IPCA2 vs. IPCA1) biplotovi. Biplot grafički prikaz je zasnovan na varijaciji uzrokovanj glavnim efektima sredinskih faktora i cijanobakterija i njihovim međusobnim interakcijama. Na AMMI1 biplotu x-kordinata ukazuje na glavne efekte (produkciju pigmentata), a y-koordinata prikazuje različitu ekspresiju sojeva kroz različite uslove sredine (IPCA1). Što je niža vrednost IPCA1 (apsolutne vrednosti, osa 0.0), niži je doprinos interakcije sojeva i sredine; stoga, soj ili sredina je stabilniji.

##### 4.1.5.1. AMMI model interakcije sredinskih faktora na produkciju MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC

Produkcija MOSA je značajno varirala kod različitih vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija NSCCC zavisno od delovanja abiotičkih faktora (Grafikon 53).

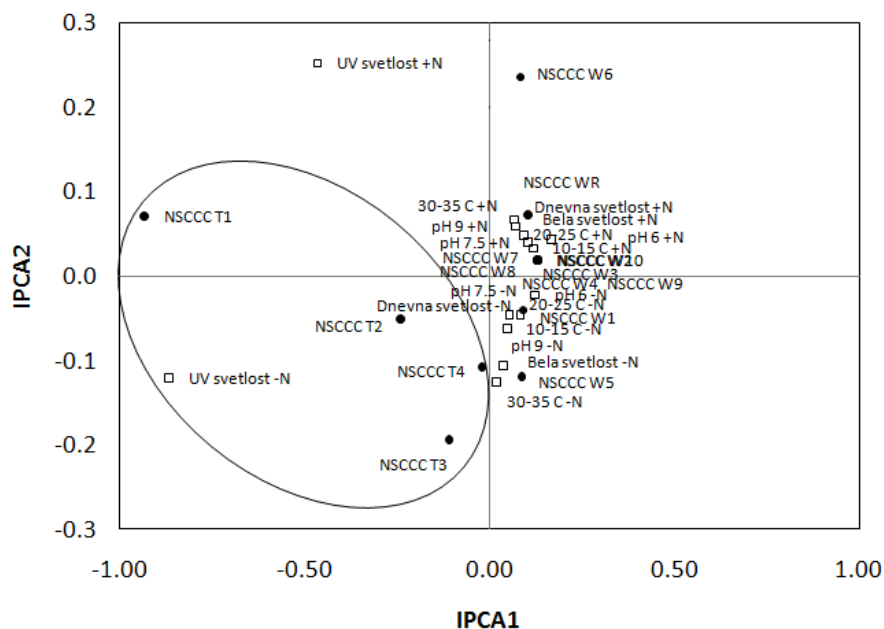


**Grafikon 53.** AMMI1 grafikon sadržaja MOSA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kultivacijom u različitim sredinskim uslovima, zavisno od sadržaja azota

Vidljive su dve grupacije, gde su zemljišni sojevi izdvojeni sa UV uslovima u oba tipa podloge. Na osnovu produkcije MOSA, soj T1 se izdvojio kao najproduktivniji soj. S druge strane, sojevi W2, W3, W4, W7, W8, W9 i W10 su bili smešteni u krajnjem levom delu grafikona s obzirom da kod njih nije zabeležena sposobnost produkcije MOSA. Upravo kod soja sa najvećom produkcijom MOSA je zabeleženo da je produkcija značajno zavisila od sredine u kojoj se soj gaji (nestabilna produkcija). Sojevi kod kojih sadržaj pigmenta nije mnogo varirao u zavisnosti od uslova gajenja su upravo sojevi sa malom sposobnošću produkcije scitonemina (npr. sojevi W1, WR, W5, W6). Pored zavisnosti od karakteristika samog soja, produkcija MOSA je varirala znatno u zavisnosti od sredine u kojima su sojevi gajeni. U proseku, uslovi kultivacije pod UV svetlošću, u podlozi -N ili +N su predstavljale povoljne sredine za produkciju MOSA. S druge strane, najmanja produkcija scitonemina je ostvarena u uslovima kisele sredine (pH 6.0), u podlozi +N.

Primena AMMI2 biplota omogućava identifikovanje veze između produkcije MOSA sojeva u određenim sredinama (Grafikon 54). Bliska asocijacija između soja i sredine na biplotu, ukazuje da je dati soj ostvario najbolju produkciju pigmenta u toj sredini. Tako na primer, na

AMMI2 biplotu se jasno vidi da je soj W6 izdvojen od drugih sojeva i da je najbliži sredini UV svetlost, u podlozi +N, i to je upravo sredina gde je ovaj soj ostvario najveću produkciju MOSA.

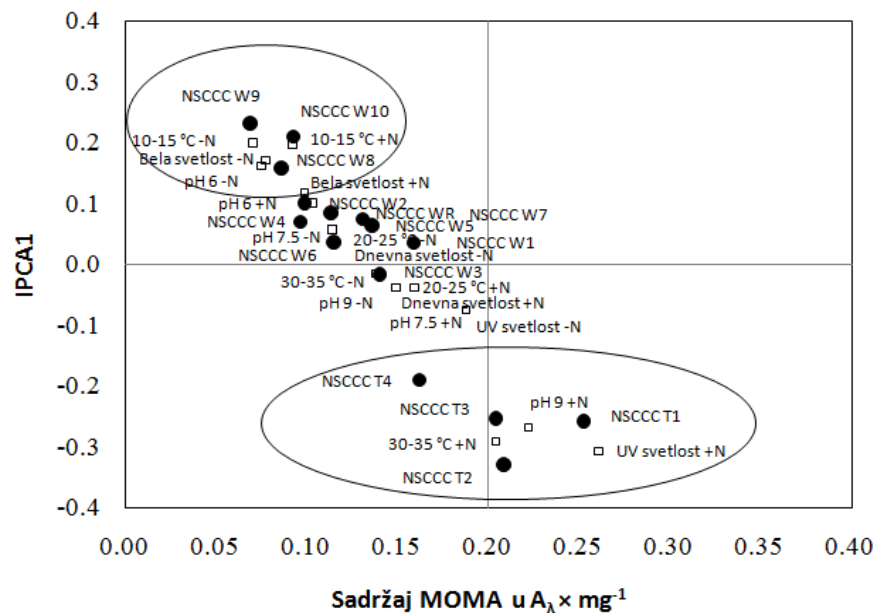


**Grafikon 54.** AMMI2 biplot vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kroz različite sredinske uslove u produkciji MOSA

Većina vodenih sojeva se zajedno grupisala oko centra biplota, a zemljišni sojevi su grupisani nasuprot ove grupe. Kultivacija u uslovima delovanja UV svetlosti, u podlozi -N je jasno bila izdvojena iz centralnog dela biplota. Ovoj sredini su najbliže smešteni zemljišni sojevi, koji su u uslovima delovanja UV svetlosti ostvarili najveću produkciju MOSA.

#### 4.1.5.2. AMMI model interakcije sredinskih faktora na produkciju MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC

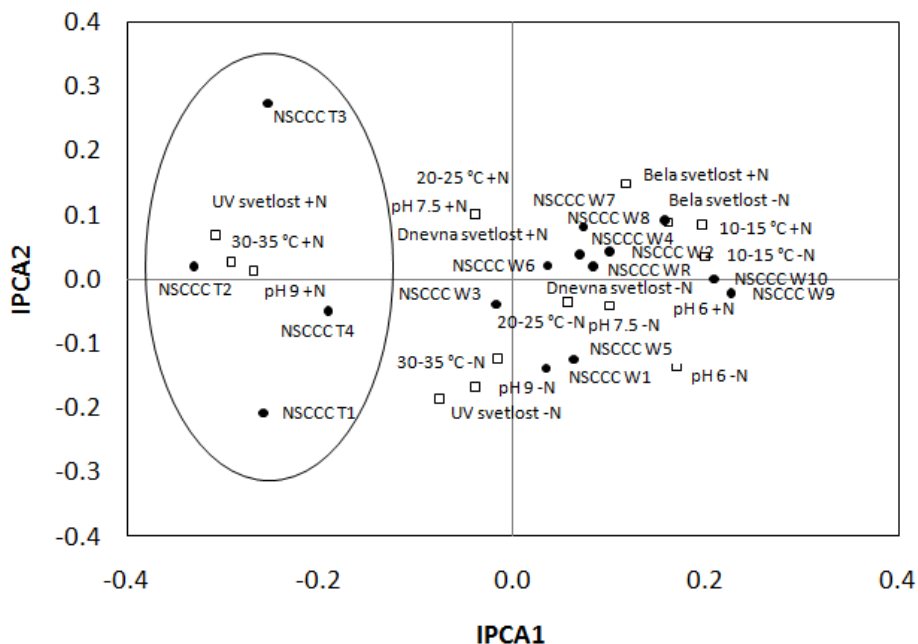
Analizom rezultata, AMMI1 grafikon prikazuje varijacije u produkciji MOMA zavisno od sredinskih uslova (Grafikon 55).



**Grafikon 55.** AMMI1 grafikon sadržaja MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kultivacijom u različitim sredinskim uslovima, zavisno od sadržaja azota

U proseku, zemljišni sojevi se mogu izdvojiti kao sojevi sa najvećom produkcijom MOMA. Nasuprot njih, na grafikonu su grupisani vodeni sojevi W9, W8 i W10, kod kojih je uočena najniža produkcija MOMA. Prema stabilnosti produkcije, T2 i W9 su pokazali izražajniju varijabilnost zavisno od uslova gajenja. Sojevi W5, W3, W6, W1 i W2 su imali stabilniju produkciju u različitim uslovima. Kultivacija u uslovima 30-35 °C, UV svetlosti i pH 9.0, u podlozi +N je dovela do izraženije produkcije MOMA. Nasuprot njih, u uslovima delovanja bele fluorescentne svetlosti, pH 6.0 i 10-15 °C, u podlozi -N, i 10-15 °C, u podlozi +N postignuta je mala produkcija MOMA kod svih testiranih cijanobakterijskih sojeva.

AMMI2 biplot (Grafikon 56) je napravljen upotrebom vrednosti sojeva i sredinskih uslova dobijenih iz prve dve IPCA ose.



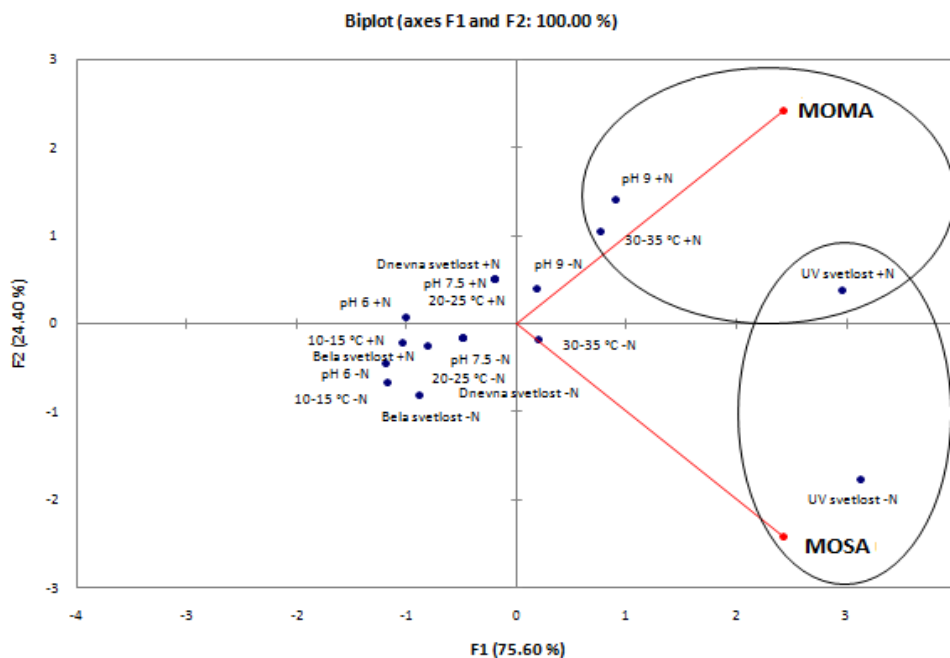
**Grafikon 56.** AMMI2 biplot vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC kroz različite sredinske uslove u produkciji MOMA

AMMI 2 biplot prikazuje da je produkcija pigmentata varirala delovanjem različitih abiotičkih faktora. Uočava se da su zemljišni sojevi bili zasebno grupisani u odnosu na vodene sojeve. Testirani uslovi 30-35 °C i UV svetlost u podlozi +N smešteni su blizu jedno drugom ukazujući da su pod ovim uslovima sojevi imali sličnu produkciju. Takođe su i sojevi W1 i W5 formirali pozitivne asocijacije sa uslovima povišene temperature (30-35 °C) u podlozi -N. A soj T2 pozitivne asocijacije sa tretmanom UV svetlosti i povišene temperature (30-35 °C) u podlozi +N.

#### 4.1.5.3. Komparativna analiza produkcije MOSA i MOMA korišćenjem AMMI modela

Radi isticanja prikaza u kojim uslovima je dominantna produkcija MOSA i MOMA izrađen je jedinstveni grafikon za prikaz produkcije oba pigmenta (Grafikon 57). Nakon izračunavanja prosečnih vrednosti sredina, formirana je tabela Sredina × Osobina i prikazan je odgovarajući biplot. Ovaj tip biplota omogućava pručavanje interakcije i veze produkcije pigmentata u odnosu na sredine. Ovakav prikaz je veoma značajan u vizualizaciji istovremenog

proučavanja koje sredine su povoljne (ili nepovoljne) za ekspresiju većeg broja osobina (Yan i Tinker, 2006) odnosno koji abiotički faktori su najdominantniji za produkciju određenih pigmenata (Yan i Tinker, 2006). PCA analiza (eng. *Principal Components Analysis*, Analiza glavnih komponenti) produkcije pigmenata u interakciji sa uslovima tretmana (Grafikon 57) prikazuje postojanje dva klastera. Prema biplotu, tretmani UV svetlosti +N i -N su bili povoljni za produkciju oba pigmenata, pri čemu je UV -N bio povoljniji za produkciju MOSA, a UV +N za produkciju MOMA. Tretman pod UV svetlosti, u podlozi +N je pokazao znatan uticaj na produkciju MOSA, ali slabiji u odnosu na isti tretman u podlozi -N. Takođe, uočava se i bliska veza između MOMA i tretmana pH 9.0 +N i 30-35 °C +N. Tretmani 10-15 °C -N, pH 6.0 -N, bela fluorescentna svetlost -N imaju neznatnog uticaja na produkciju MOSA i MOMA.

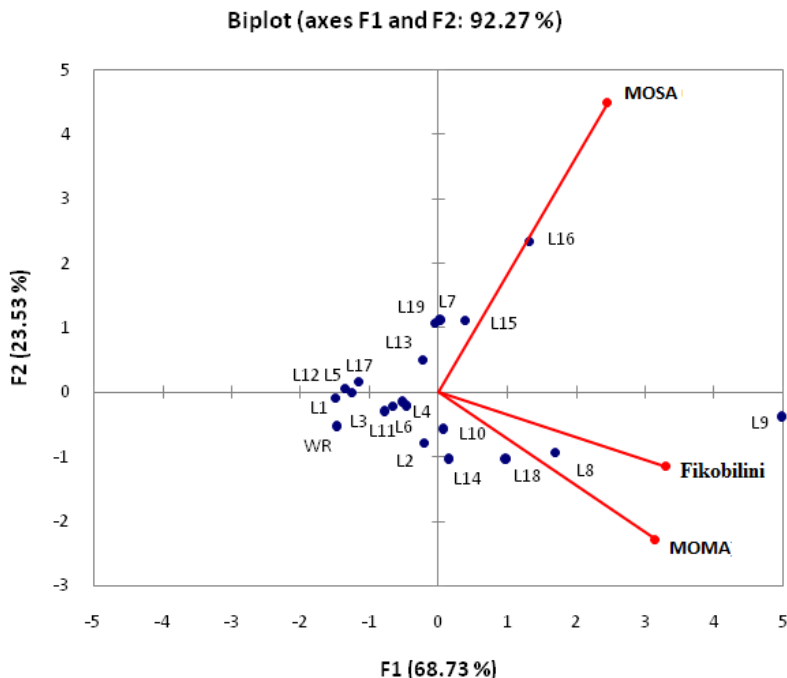


**Grafikon 57.** *Produkcija MOSA i MOMA kod posmatranih vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC zavisno od tretmana*

#### 4.1.5.4. Produkcija fikobilina, MOSA i MOMA lesnih cijanobakterija NSCCC

Grafikon 58 prikazuje PCA analizu koja je urađena na osnovu početne koncentracije pigmenata u kontrolnim uslovima rasta.





**Grafikon 58.** PCA analiza produkcije fikobilina, MOSA i MOMA kod analiziranih lesnih cijanobakterija NSCCC

Uočava se bliska veza između produkcije fikobilina i MOMA, dok ugao između vektora za osobinu - produkcija MOSA i vektora za produkciju fikobilina i MOMA iznosi oko 90°, ukazujući na nepostojanje veze između ove dve osobine. Kao kulture sa najizraženijom produkcijom fikobilina i MOMA se izdvajaju L8, L9, L18, dok se kultura L16 odlikuje boljom produkcijom MOSA.

## 4.2. Toksičnost i produkcija cijanotoksina lesnih cijanobakterija i procena stabilnosti mikrocistina

### 4.2.1. Toksičnost određena u *Artemia salina* bioeseju

*A. salina* bioesej poslužio je za ispitivanje ukupne toksičnosti lesnih cijanobakterija NSCCC. Rezultati očitavanja ukupne toksičnosti u *A. salina* bioeseju nakon 24 h su pokazali nizak mortalitet račića *A. salina* (< 50%). Stoga, dobijene vrednosti ukazuju da se testirane lesne cijanobakterije NSCCC mogu smatrati netoksičnim.

#### 4.2.2. Koncentracije cijanotoksina određene ELISA testom

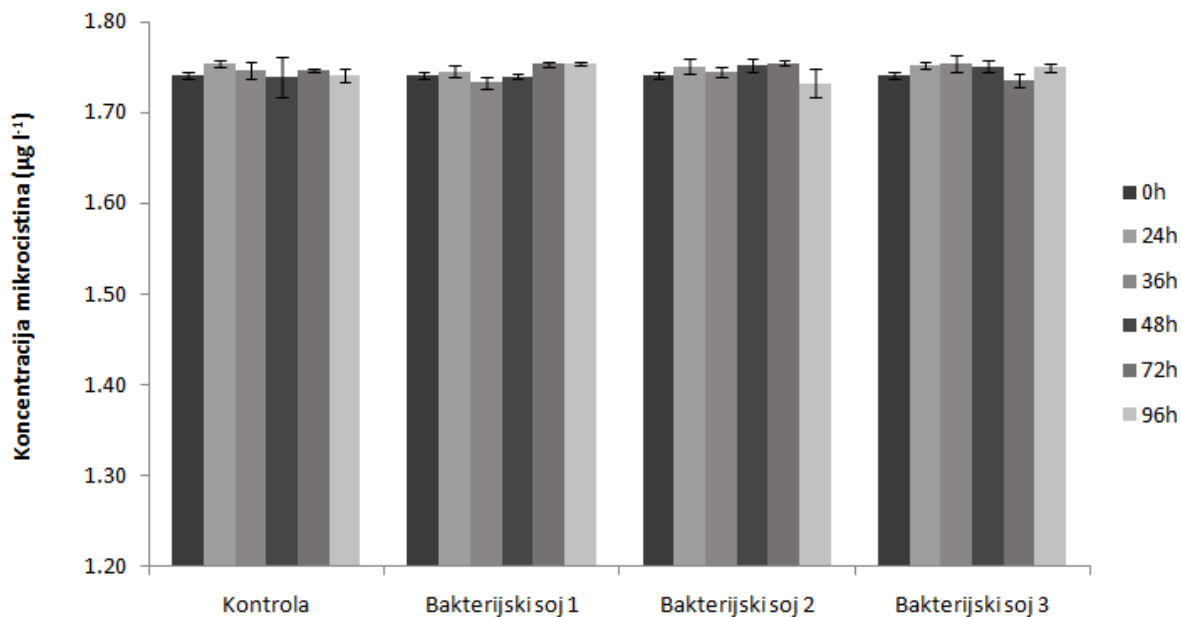
Ispitivanjem produkcije mikrocistina, cilindrospermopsina i saksitoksina lesnih cijanobakterija NSCCC korišćenjem ELISA testa, cijanotoksini nisu detektovani u analiziranim uzorcima ili su koncentracije bile blizu ili ispod opsega detekcije. Samo dva uzorka su pokazala niske koncentracije mikrocistina-soj L13 ( $0.10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) i referentni soj WR ( $> 2.0 \mu\text{g l}^{-1}$ ). U ponovljenom merenju, soj L13 je bio negativan na produkciju mikrocistina ili ga je proizvodovao ispod praga detekcije testa ( $<0.1$ ) i može se protumačiti kao netoksičan soj.

#### 4.2.3. Koncentracije cijanotoksina određene LC-MS(/MS) i HPLC metodom

Analiza cijanotoksina lesnih cijanobakterija NSCCC je obuhvatila analizu 8 varijanti mikrocistina, cilindrospermopsina i saksitoksina korišćenjem LC-MS(/MS) i HPLC metode. Primenom LC-MS(/MS) i HPLC metode nisu dobijeni pozitivni rezultati kod testiranih lesnih cijanobakterija NSCCC. Mikrocistini su detektovani samo kod referentnog soja WR (MC-LR- $126.8 \mu\text{g g}^{-1}$  i MC-dmLR- $30.15 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

#### 4.2.4. Stabilnost mikrocistina nakon testa biodegradabilnosti

Sprovedeno je analiziranje stabilnosti mikrocistina izolovanog iz referentnog soja *M. aeruginosa* PCC 7806 nakon delovanje tri bakterijska soja izolovana iz bioloških lesnih pokorica. ELISA test je poslužio za procenu koncentracije mikrocistina nakon testa biodegradabilnosti (Grafikon 59).



**Grafikon 59.** Biodegradacija mikrocistina izolovanog iz *M. aeruginosa* PCC 7806 nakon različitog perioda ekspozicije (0 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h) bakterijskim sojevima 1, 2 i 3. Standardna devijacija prikazuje opseg greški (srednja vrednost  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

U kontrolnim uzorcima, tokom posmatranog vremenskog perioda od 96 h nije uočeno smanjenje koncentracije mikrocistina. Degradacija mikrocistina nije detektovana ni u uzorcima gde su dodati bakterijski sojevi. Uočeno je da su mikrocistini pokazali stabilnu hemijsku strukturu nakon perioda izlaganja bakterijama od 96 h.

## **5. D I S K U S I J A**

## 5.1. Fikobilini kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji

Fikobilini su pigmenti koji se sreću samo kod cijanobakterija i crvenih algi kod kojih imaju pomoćnu ulogu apsorbovanja onog dela svetlosne energije koju ne apsorbuju hlorofili (Reynolds, 2006). Ova osobina fikobilina je njihova najvažnija biološka uloga jer u uslovima manje ili veće zasene ili u uslovima smanjenog intenziteta i kvalitativno izmenjene svetlosti organizmi koji ih poseduju mogu da se razvijaju. Fikobilini u cijanobakterijama čine 50–60% rastvorljivih proteina ćelije (Ting i sar., 2002) i njihov sadržaj se menja u zavisnosti od sredine u kojima se ćelija nalazi. Pojedini autori su koristili fikobilinski sastav za karakterizaciju različitih cijanobakterijskih taksona (Waterbury i Rippka, 1989; Komarek i sar., 1999). Međutim, Schenk i Kuhfittig (1983) analizom fikobilinskog sastava kod 21 vrste cijanobakterija nisu uočili klasifikacijsku šemu. Shodno njihovom karakterističnom prisustvu kod cijanobakterija i učestvovanju u fotosintezi, u okviru doktorske disertacije analiziran je njihov potencijal kao biomarkera.

Prisustvo fikobilina je uočeno kod svih analiziranih lesnih cijanobakterijskih kultura, a njihova produkcija je izuzetno varirala u zavisnosti od ispitivanog soja. Njihova različita distribucija u okviru predstavnika razdela *Cyanobacteria* je poznata pojava (Hoffmann i sar., 1990). Među najefikasnijim producentima su se našli predstavnici rodova *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp. i *Leptolyngbya* sp.. Uočava se da je sadržaj fikobilina u kontrolnim uslovima opadao s vremenom. U pojedinim kulturama (L5 i L11) je uočena intenzivna razgradnja već nakon 24 h. I u kulturama kod kojih je detektovana najveća produkcija fikobilina (L9 i L18) je evidentirana intenzivnija razgradnja fikobilina zavisno od vremenskog perioda. U pojedinim kulturama (L1, L5 i WR) je uočena potpuna razgradnja pigmenata nakon 60 h. Rezultati pokazuju da što je manja koncentracija fikobilinskih pigmenata, dolazi do intenzivnije razgradnje tokom ispitivanog perioda.

Razgradnja organske materije često zahteva aktivnost ekstracelularnih enzima u obradi kompleksnih organskih komponenti u asimilativne subjedinice. Zemljišna enzimska aktivnost je povezana sa fizičko-hemijskim karakteristikama, mikrobnom strukturom zajednica, vegetacijom i sukcesijom ekosistema. Kako pored cijanobakterija, BLC čine i zajednice bakterija, posmatran je uticaj bakterija na stabilnost fikobilina u vremenskoj zavisnosti.

U testu biodegradabilnosti uočen je različit stepen degradacije ukupnih fikobilina zavisno od perioda izlaganja, posmatranog soja, kao i od bakterijskog soja. Stepenn degradacije zavisio je od sadržaja fikobilina, gde su sojevi koje karakteriše slaba inicijalna produkcija pigmenata pokazali intenzivniju i bržu degradaciju s vremenom izlaganja bakterijama. Rezultati dobijeni tokom eksperimenta biodegradabilnosti pokazuju da je sadržaj ukupnih fikobilina redukovan delovanjem sva tri soja bakterija. U većini kultura je detektovana intenzivnija razgradnja fikobilina nakon 36 h, koja se nastavila s periodom izlaganja bakterijama. Kod većine analiziranih lesnih kultura uočena je potpuna razgradnja ukupnih fikobilina nakon 60 h kontinuiranog izlaganja. Poređenjem sa rezultatima degradacije u kontrolnim uslovima, intenzitet degradacije je povećan u prisustvu bakterija. Bakterijski sojevi korišćeni u testu biodegradabilnosti pripadaju različitim grupama i shodno tome karakteriše ih različita metabolička sposobnost produkcije enzima (npr. alkalnih serin tip proteaza), a time i različit stepen sposobnosti degradacije. Primetno je da je bakterijski soj 1 pokazao slabiju sposobnost degradacije fikobilina, gde je uočena potpuna razgradnja pigmenata nakon tretmana od 60 h kod samo šest analiziranih lesnih kultura. Ova sposobnost je jače izražena kod druga dva bakterijska soja, koji su doveli do potpune razgradnje fikobilina kod jedanaest, odnosno dvanaest lesnih cijanobakterijskih kultura. Poređenjem kontrolnih vrednosti fikobilina sa vrednostima u tretmanima sa bakterijskim sojevima, uočava se da je kod većine kultura najintenzivnija degradacija ukupnih fikobilina bila delovanjem bakterijskog soja 3 (Grafikon 33).

U prilog nestabilne strukture fikobilina govore i naučna dostignuća drugih autora. Rezultati analize stabilnosti fikobilina u prisustvu *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens* su pokazali redukciju fikobilina za 48% nakon 24 h inkubacije, odnosno do 62% nakon inkubacije od 48 h (Bolesnikov, 2014). Miralles i sar. (2012) su ustanovili da sukcesija cijanobakterijskih bioloških pokorica u pokoricu sa dominacijom lišajeva dovodi do povećanja enzima koji učestvuju u kruženju azota. Sukcesija azotofiksirajućih individua autotrofima koji ne vrše atmosfersku fiksaciju azota dovodi do razgradnje formirane cijanobakterijske biomase, a samim tim i fikobilina. Takođe, fikobilini su osetljivi i na uticaj pH, nedostatka nutrijenata (gvožđa, azota i sumpora) (Stevens i Poane, 1981; Richaud i sar., 2001; Baier i sar., 2004; Lahmi i sar., 2006), koncentracije soli, temperaturnih promena, isušivanja i stresa izazvanog različitim intenzitetom svetlosti (Sherman i Sherman, 1983; Wanner i sar., 1986; Rapala, 1998; Richa i Sinha, 2011; Sharma i sar., 2013), kao i na delovanje UV zračenja (Fisher i Häder, 1992;

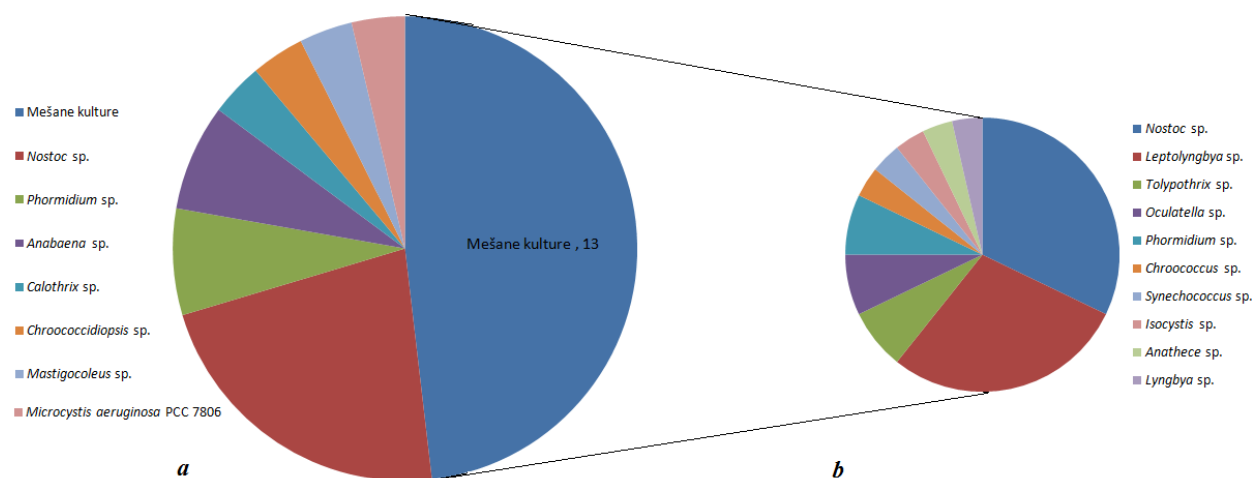
Grossman i sar., 1993; Sinha i sar., 1995; Donkor i Häder, 1996; Sinha i sar., 1996; Aráoz i Häder, 1997; Ehling-Shulz i Scherer, 1999; Singh i sar., 2010). Takođe je i u drugim studijama potvrđeno da relativna stabilnost fikobilina zavisi od vrsta prisutnih cijanobakterija koje rastu u različitim klimatskim uslovima (Rastogi i sar., 2015), kao i od delovanja različitih fizičko-hemijskih stresnih faktora (Pumas i sar., 2011; Chaiklahan i sar., 2012). U prilog njihove nestabilne prirode je i činjenica da su fikobilini hidrofilne prirode i bivaju uništeni pre deponovanja u sedimentu (Sanger, 1988).

Shodno utvrđenoj nestabilnosti fikobilina kako u kontrolnim, tako i u uslovima delovanja bakterija, fikobilini se ne mogu smatrati pogodnim biomarkerima u paleoklimatskoj rekonstrukciji.

## **5.2. Zaštitni pigmenti cijanobakterija kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji**

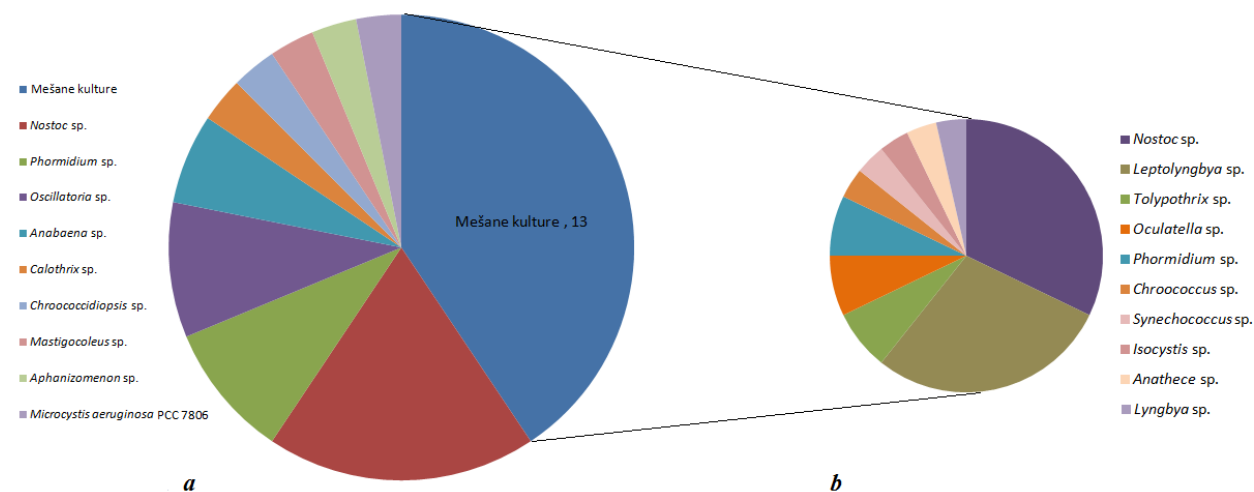
### **5.2.1. Komparativna analiza sadržaja metabolita u opsegu scitonemin apsorbanca i metabolita u opsegu mikosporin apsorbanca u vodenim, zemljišnim i lesnim cijanobakterijama**

Tokom sprovedenih analiza o produkciji MOSA i MOMA kod 34 vodenih, zemljišnih i lesnih cijanobakterija NSCCC, utvrđeno je da sposobnost produkcije MOSA nije pokazalo 7 vodenih sojeva cijanobakterija NSCCC, dok je isto uočeno kod samo dve lesne kulture u slučaju produkcije MOMA. Sposobnost produkcije MOSA je detektovana kod 27 analiziranih cijanobakterijskih kultura, koje čine 15 različitih rodova (Grafikon 60).



**Grafikon 60.** a) Rodovi cijanobakterija unutar sojeva sa sposobnošću produkcije MOSA, b) Rodovi cijanobakterija unutar mešanih kultura sa sposobnošću produkcije MOSA

Od 34 analiziranih kultura NSCCC, sposobnost produkcije MOMA je uočena u 32, koje su činili pripadnici 17 rodova cijanobakterija (Grafikon 61).



**Grafikon 61.** a) Rodovi cijanobakterija unutar sojeva sa sposobnošću produkcije MOMA, b) Rodovi cijanobakterija unutar mešanih kultura sa sposobnošću produkcije MOMA



Kod svih vodenih sojeva je uočena veća produkcija MOMA u odnosu na produkciju MOSA. Nasuprot tome, samo jedan zemljišni soj je pokazao neznatno veći sadržaj MOMA (T4), što je uočeno kod 47.37% lesnih cijanobakterija NSCCC. Primetna je izraženija sposobnost produkcije obe grupe pigmenata kod lesnih kultura cijanobakterija. Ovi rezultati bi mogli da ukazuju da cijanobakterije poreklom iz terestričnih sredina imaju veću otpornost na nepovoljne sredinske uslove i da su izraženije karakteristike adaptacije na stresne uslove, odnosno produkcije MOSA i MOMA. Posebno je izražena sposobnost produkcije MOSA kod lesnih cijanobakterija, u odnosu na vodene i zemljišne. Ovi rezultati bi mogli da ukazuju da su cijanobakterije poreklom iz lesnih sredina izložene jakom UV zračenju, a time i uslovima aridnosti. Sudeći po dobijenim rezultatima to su uslovi u kojima MOSA imaju najdominantniju produkciju. Takođe je i u drugim studijama pokazano da je sposobnost sinteze scitonemina karakteristika češće prisutna kod terestričnih predstavnika cijanobakterija (Garcia-Pichel i sar., 1992; Varnali i Edwards, 2010; Gao, 2017) i usled toga se pretpostavlja da je scitonemin mogući pokazatelj aridnosti (Svirčev i sar., 2013; Fulton i Van Mooy, 2014). Iz tog razloga su očekivane niže vrednosti produkovanog scitonemina kod vodenih sojeva cijanobakterija.

Među predstavnicima cijanobakterija koji su se pokazali kao bolji producenti MOSA i MOMA su dominantno bili rodovi *Nostoc* sp. i *Leptolyngbya* sp. Ovi rodovi su često najdominantniji rodovi prisutni u pokoricama širom sveta (Hill i sar., 1994; Potts, 2000; Fleming i Castenholz, 2007; Soule i sar., 2007; Flechtner i sar., 2008; Liu i sar., 2011; Nazifi i sar., 2013; Hagemann i sar., 2014; Pushkareva i sar., 2015; Schulz i sar., 2015). Velik broj vodenih i terestričnih predstavnika roda *Nostoc* su identifikovani kao jači producenti scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina i često su predmet istraživanja njihove sinteze u eksperimentalnim studijama (Wright i sar., 2005; Gao i Ye, 2007; Ferroni i sar., 2010; Matsui i sar., 2011; Roshan i sar., 2015; Rastogi i sar., 2016; Gao, 2017). Mešane kulture su imale najveću sposobnost produkcije UV zaštitnih molekula, najverovatnije usled evolucionog pritiska i sinergističke produkcije UV zaštitnih pigmenata. Sposobnost produkcije MOSA je detektovana kod 10 heterocistnih sojeva i kod samo 5 neheterocistnih. Prilikom analize produkcije MOMA, sposobnost produkcije je detektovana kod 11 heterocistnih sojeva i kod 8 neheterocistnih. Ovo se može povezati sa činjenicom da se heterocistni predstavnici nalaze uglavnom u površinskom sloju gde fiksiraju azot, a gde je prodor UV zraka najjači. Takođe su i Singh i sar. (2008a) i Mushir i Fatma (2011; 2012) u svom istraživanju, poredeći koncentracije produkovanog

scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina heterocistnih i neheterocistnih cijanobakterija, zaključili da je većina heterocistnih cijanobakterija imala veću produktivnost u svim posmatranim uslovima. Cantonati i sar. (2014a) su utvrdili da su heterocistne cijanobakterije prisutne u površinskim slojevima vode, u slojevima karakterističnim po većoj koncentraciji scitonemina, gde su cijanobakterije najviše izložene fluktaaciji nivoa vode, jakom zračenju i UV ekspoziciji, suši i smrzavanju (Cantonati i sar., 2014b). Ukoliko je fiksacija azota neophodna za rast, razumljivo je što isključivo heterocistne vrste obezbeđene prisustvom UV zaštitnih pigmenta kolonizuju površinske slojeve (Garcia-Pichel i Belnap, 1996).

Terestrični predstavnici cijanobakterija adaptirani na UV zračenje mogu preživeti uspješnije u ekstremnim, sušnim i polu-sušnim sredinama zahvaljujući visokoj koncentraciji scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina. Usled nemogućnosti produkcije UV zaštitnih pigmenta, pojedini predstavnici cijanobakterija se karakterišu migratornim i vertikalnim kretanjima gde vrsta može apsorbovati maksimalnu koncentraciju svetlosti i minimalnu količinu štetnog UV zračenja (Quesada i Vincent, 1997). S obzirom da čak i srodne vrste pokazuju razliku u osetljivosti ka UV zračenju (Quesada i Vincent, 1997), unutar jezera i tla se mogu razlikovati različiti slojevi cijanobakterija. U slojevima bliže površini dominiraju vrste koje imaju višu toleranciju ka UV zračenju u odnosu na vrste prisutne u dubljim slojevima tla. Istraživanje Karsten i sar. (1998) je obuhvatalo analizu produkcije scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina površinskog biofilma u šumama mangrove i utvrđeno je da *Lyngbya cf. aestuarii* akumulira visoke koncentracije scitonemina u gornjem površinskom sloju u korelaciji sa sezonskim fluktuacijama sunčevog zračenja. Nasuprot ove vrste, druga vrsta iz zajednice (*Microcoleus chthonoplastes*) je imala sposobnost produkcije samo mikosporinu sličnih aminokiselina i zauzimala je niže slojeve, ispod sloja *Lyngbya*. Vrsta *M. chthonoplastes* pokazuje izuzetno izraženo migratorno kretanje kao odgovor na UV svetlost i opstaje zahvaljujući sinergizmu postignutom ovim zaštitnim, površinskim slojem scitonemina i sopstvenoj produkciji mikosporinu sličnih aminokiselina (Amsler, 2007).

Rezultati sadržaja fikobilina, MOSA i MOMA kod analiziranih vodenih i zemljišnih cijanobakterija ukazuju da je prisustvo pigmenta veoma variralo u zavisnosti od soja, ali da je dominantan i uticaj ekoloških faktora. Među lesnim kulturama, veća produkcija MOMA je detektovana u 67% analiziranih kultura poreklom iz Irana, u 75% kultura iz Srbije dok se jedino u kulturama poreklom iz lesnih uzoraka Kine uočava dominantnija produkcija MOSA (78%).

Takođe je zanimljivo da su sve kulture sa lokaliteta Irana mešovite kulture i da u kulturama poreklom iz Kine nema neheterocistnih predstavnika kao producenata ovih pigmenata. U kulturama poreklom iz Kineskog lesnog platoa uočava se izraženija sposobnost sinteze MOSA u ukupno 7 od 9 analiziranih kultura. U tim kulturama dominantan je bio rod *Nostoc*. U pojedinim kulturama je prisustan i rod *Leptolyngbya* sp.. Može se zaključiti da je produkcija ovih pigmenata zavisna od samog soja, a zatim u najvećoj meri od minerologije lesnog sedimenta i dominantnih klimatskih faktora. Da je važan uticaj sredinskih faktora na produkciju pigmenata je i činjenica da je u kulturi L1 uočena niska produkcija pigmenata iako kulturu čine rodovi *Nostoc* sp. i *Leptolyngbya* sp. poznati po produkciji scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina (Fleming i Castenholz, 2007; Rastogi i sar., 2016; Gao, 2017). Rezultati dobijeni istraživanjem u okviru disertacije, kao i u drugim istraživanjima (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Garcia-Pichel i sar., 1992; Fleming i Castenholz, 2007) ukazuju da se MOSA odnosno scitonemin proizvodi u toplim, sušnim uslovima pri jakom UV zračenju. Takođe je pokazano da je prisustvo azota bitno za sintezu MOMA, odnosno mikosporinu sličnih aminokiselina (Peinado i sar., 2004; Singh i sar., 2008a; Yadav i sar., 2011). Stoga se može pretpostaviti da se geomorfologija lesa u Kini karakteriše niskim sadržajem azota, na šta sugeriše veća produkcija MOSA i potpuno odsustvo neheterocistnih predstavnika cijanobakterija u analiziranim sojevima (neračunajući mešovite kulture). Takođe, sudeći prema indeksu aridnosti, kineski lesni plato spada u polusušne regione. U Kini se beleži najozbiljniji oblik dezertifikacije na svetu, gde je 2.5 miliona km<sup>2</sup> prekriveno pustinjama. Time se može objasniti izraženija produkcija MOSA kod cijanobakterijskih predstavnika u lesnim područjima Kine.

Primenom klaster analize uočava se bliska veza između produkcije fikobilina i MOMA (Grafikon 58), što ukazuje da su sojevi sa visokom produkcijom fikobilina imali i visoku produkciju MOMA. Povezanost produkcije fikobilina i MOMA je najverovatnije usled uloge fikobilina i mikosporinu sličnih aminokiselina kao intracelularnih metabolita koji takođe služe kao rezervoari azota (Schwarz i Grossman, 1998; Peinado i sar., 2004; Oren i Gunde-Cimerman, 2007). Takođe obe grupe pigmenata imaju antioksidativnu ulogu i hidrofилne su prirode (Zhang i sar., 2007; AWWA, 2011; Wada i sar., 2013), za razliku od hidrofobnog scitonemina (Wada i sar., 2013). Nasuprot ove povezanosti je odsustvo korelacije u produkciji fikobilina i MOMA sa produkcijom MOSA. Upravo nepostojanje korelacije u produkciji MOSA i MOMA, ukazuje da povećanje produkcije jednog pigmenta neće uticati na produkciju drugog pigmenta. Takođe se u

istraživanjima Garcia-Pichel i Castenholz (1993) i Mushir i Fatma (2011, 2012) može uočiti da nema korelacije u produkciji scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina. I preliminarnim analizama pigmentnog sastava uzoraka sa Titelskog lesnog platoa (Bokhorst i sar., 2011; Gaudenyi i sar., 2011) uočeno je prisustvo obe grupe pigmenata (Svirčev i sar., 2013). Moguće je da usled intenzivnog UV zračenja vrste koje ne mogu da postignu potpunu zaštitu produkcijom jedne grupe pigmenata, usled pritiska sredine razvijaju i produkciju druge grupe. Mikosporinu slične aminokiseline mogu činiti oko 10% suve težine isušene kolonije (Scherer i sar., 1988) i njihovo oslobađanje nakon rehidratacije dovodi do značajnog gubitka ćelijskog ugljenika i azota. Nasuprot ovome, scitonemin se ne gubi rehidratacijom (Hill i sar., 1994). Stoga je strategija u produkciji obe grupe pigmenata-i hidrosolubilne (mikosporinu sličnih aminokiselina) i hidrofobne (scitonemin) jasna. Mikosporinu slične aminokiseline mogu zasiti brzo glikanske odeljke usled rehidratacije ali na račun velikog gubitka pigmenta, gde scitonemin pruža više lokalizovanu UV zaštitu sa prednošću da se on zadržava unutar kolonija (Hill i sar., 1994). Pojedinačno ili u kombinaciji, scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline pružaju zaštitu od sunčevog zračenja (Garcia-Pichel i Castenholz 1991, 1993; Garcia-Pichel i sar., 1993), obezbeđuje se fiziološka zaštita, metabolička homeostaza i opstanak vrsta-producenata. Međutim, scitonemin verovatno ima mnogo važniju ulogu od vodenih UV-apsorbujućih pigmenata tokom pružanja zaštite ćelija (Hill i sar., 1994).

### **5.2.2. Komparativna analiza sadržaja metabolita u opsegu scitonemin apsorbance i metabolita u opsegu mikosporin apsorbance u lesnim uzorcima i biološkim lesnim pokoricama**

Analizom prisustva MOSA i MOMA u uzorcima lesa i BLC utvrđeno je njihovo prisustvo u svim analiziranim uzorcima. Od 6 analiziranih lesnih uzoraka u 4 je utvrđeno prisustvo većih koncentracija MOMA, u odnosu na koncentraciju MOSA. U preostala dva lesna uzorka su primetne ujednačene vrednosti oba pigmenta. U uzorku LES T20 je uočena 4 puta veća koncentracija MOMA u odnosu na MOSA. Za razliku od pigmentnog sadržaja lesnih uzoraka, u uzorcima BLC je u 3 od 4 analizirana uzorka detektovan izrazito veći sadržaj MOSA. U uzorku BLC 3 je detektovan 26 puta veći sadržaj MOSA u odnosu na MOMA. Izuzetak je uzorak BLC 1 gde su zastupljene ujednačene vrednosti oba pigmenta. Potencijal scitonemina da

vrši strukturnu stabilizaciju egzopolisaharidnog matriksa je ključna za preživljavanje terestričnih cijanobakterija u ekstremnim sredinama (Gao, 2017).

### **5.2.3. Mogućnost primene metabolita u opsegu scitonemin apsorbanca kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji**

Produkcija MOSA varira značajno zavisno od uslova gajenja kao i zavisno od analiziranog soja. Prema AMMI1 biplotu (Grafikon 53), produkcija MOSA je pokazala značajno variranje među analiziranim cijanobakterijskim sojevima. Najveća produkcija je posmatrana kod zemljišnih sojeva, koji su izdvojeni kao posebna grupa na biplotu. Očigledno, određeni sredinski faktori vode ka selekciji zemljišnih sojeva, dovodeći do veće produkcije ovih pigmentata. Terestrični cijanobakterijski sojevi adaptirani na UV zračenje mogu preživeti bolje u ekstremnim, sušnim i polu-sušnim sredinama zahvaljujući visokoj koncentraciji UV zaštitnih molekula. Moguće je da što su uslovi ekstremniji razvija se šira amplituda metaboličkih strategija, što rezultuje u produkciji specifičnih supstanci, od kojih neki mogu biti odlični kandidati za paleorekonstrukciju.

Značajna varijabilnost u produkciji MOSA, gledajući zavisno od produkcije tokom posmatranog tretmana, je detektovana u sojevima sa najvećom produkcijom MOSA (T1, T2). Pored zavisnosti od karakteristika samog soja, produkcija MOSA je varirala i u zavisnosti od sredine u kojima su sojevi gajeni. Produkcija MOSA je bila najjača i najviše stimulisana u uslovima delovanja UV svetlosti u podlozi +N i -N (Grafikon 53). Primena AMMI2 biplota omogućava identifikovanje veze između produkcije MOSA sojeva u određenim sredinama. Mala udaljenost između soja i sredine na grafikonu, odnosno bliska asocijacija između njih, ukazuje da je najverovatnije dati soj ostvario najbolju produkciju pigmenta u datoj sredini. Pozitivna korelacija između UV svetlosti i produkcije MOSA je takođe potvrđena i prikazom AMMI2 biplota (Grafikon 54) na kom su svi zemljišni sojevi izdvojeni i grupisani zajedno kao najveći producenti MOSA pod tretmanom delovanja UV svetlosti. Većina vodenih sojeva grupisana je oko centra biplota, ukazujući na nemogućnost sinteze MOSA pod datim uslovima. Zemljišni sojevi su bili izdvojeni od ove grupe, što predstavlja pre svega rezultat same razlike u produkciji pigmenta. Kultivacija u uslovima delovanja UV svetlosti, u podlozi -N je jasno bila izdvojena iz centralnog dela biplota. Ovoj sredini su najbliže smešteni zemljišni sojevi, koji su ostvarili

najveću produkciju u ovoj sredini. S druge strane, najmanja produkcija MOSA je ostvarena u uslovima kisele sredine (pH 6.0), u podlozi +N (Grafikon 53).

U prilog UV-indukovane prirode scitonemina ide i činjenica da je znatno povećanje koncentracije MOSA u odnosu na detektovane početne vrednosti (0 h) uočeno nakon 12 h ekspozicije kod većine analiziranih sojeva (Grafikon 12), gde su najveće vrednosti detektovane nakon 60 h kontinuiranog izlaganja UV svetlosti. Do istih rezultata su došli i Rastogi i Incharoensakdi (2014b) gde se povećanje koncentracije scitonemina kod vrste *Lyngbya* sp. CU2555 dalje nastavilo tokom narednih 72 h ekspozicije. Takođe je i u prirodnim uslovima utvrđeno da povećanje UV zračenja stimuliše sintezu i akumulaciju visoke koncentracije scitonemina kod vrste *Lyngbya* sp. (Karsten i sar., 1998).

Iako je brojnim studijama pokazano da je scitonemin UV-indukovan molekul i da se prvenstveno produkuje delovanjem UV svetlosti (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Ehling-Schulz i sar., 1997; Bandaranayake, 1998), uočeno je da i drugi abiotički faktori u kombinaciji sa UV utiču na biosintezu scitonemina kod cijanobakterija (Dillon i sar., 2002), i to: visoka temperatura, isušivanje, osmotski stres i prisustvo hranljivih materija (Dillon i sar., 2002; Fleming i Castenholz, 2007; Mushir i Fatma, 2012; Rath i sar., 2012; Rastogi i sar., 2014). Međutim uticaj ostalih abiotičkih faktora na produkciju MOSA, odnosno scitonemina je zanemarljiv u poređenju sa njihovom produkcijom stimulisanom UV svetlošću.

Posmatrana je i zavisnost produkcije MOSA od dostupnosti nutrijenata, prevashodno azota. Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru doktorske disertacije ukazuju da je produkcija MOSA kod većine sojeva bila slabija u podlozi +N u odnosu na rast u podlozi -N, tokom svih analiziranih sredinskih faktora. Prikaz AMMI grafikonom jasno ukazuje da je najmanja produkcija MOSA ostvarena u uslovima rasta u podlozi +N (Grafikon 53), izuzetak su neheterocistini, vodeni sojevi WR i W6 (Grafikon 54). Klaster koji obuhvata tretman UV svetlost u podlozi -N i zemljišne sojeve pokazuje blisku povezanost ovih članova, ukazujući da su dati sojevi postigli najveću produkciju MOSA u podlozi -N. U istraživanju Belnap i sar. (2008) vodeni rastvor od 0.5 g N/L je dodat preko bioloških pokorica. Smanjenje koncentracije scitonemina je uočeno kod gornjih i središnjih pokoričnih slojeva. Iako je mehanizam nejasan, ovi rezultati ukazuju da što je veća restrikcija u pristupačnosti azota, veća je produkcija scitonemina. Utvrđeno je da je neophodno sintetisati scitonemin u visokoj koncentraciji kako fotosinteza ne bi bila inhibisana jakim UV zračenjem (Dillon i Castenholz, 2003). Sintetisan

scitonemin smanjuje efekte štetnog UV zračenja bez ikakvog daljeg metaboličkog ulaganja i nakon dugotrajne fiziološke neaktivnosti (npr. isušivanja) kada su drugi mehanizmi zaštite od UV neaktivni (Brenowitz i Castenholz, 1997; Fleming i Castenholz, 2007).

Dostupni literaturni navodi uglavnom obuhvataju oblast distribucije i biosinteze scitonemina, njihove hemijske strukture i fiziološke uloge, dok je manje poznata njihova stabilnost prema delovanju različitih stresnih faktora. Pored specifičnosti povezane sa uslovima pojave i organizmima producentima, biomarker u geološkim istraživanjima mora takođe da poseduje strukturnu stabilnost. U pogledu uspešnog korišćenja ovih UV-inducibilnih pigmenata kao biomarkera cijanobakterija u geološkim istraživanjima, neophodno je poznavanje nivoa rezistencije prema abiotičkim i biotičkim stresnim faktorima. Izrazita strukturalna stabilnost MOSA je posmatrana nakon delovanja različitih abiotičkih faktora, poput pH i temperature tokom šest dana, kao i prolongiranog izlaganja UV svetlosti tokom 60 h. U svim analiziranim kulturama ovi metaboliti su pokazali izrazito stabilnu strukturu i nakon testa biodegradabilnosti tokom određenog vremenskog perioda. Sveukupno gledano, apsorpcione karakteristike MOSA izgleda da se održavaju i da ostaju prilično stabilne prema delovanju različitih fizičko-hemijskih faktora, uključujući pH stres, toplotni stres, UV zračenje i dejstvo bakterija.

Još su 1991. godine Garcia-Pichel i Castenholz (1991) ukazali da uzimajući u obzir široku distribuciju i održivost tokom vremena, scitonemin bi se potencijalno mogao koristiti u paleobiološkim studijama kao indikator prisustva cijanobakterija i za razumevanje evolucione istorije u paleobiološkim istraživanjima. Postoji nekolicina literaturnih zapisa o stabilnosti scitonemina delovanjem stresogenih faktora kao što su temperatura, jako UV zračenje i pH (Ehling-Schulz i sar., 1997; Abed i sar., 2008; Fulton i sar., 2012; Rastogi i Incharoensakdi, 2014b). U istraživanju Fleming i Castenholz (2007) oko 84% scitonemina izolovanog iz *Nostoc punctiforme* je ostalo netaknuto tokom 2 meseca kontinuirane ekspozicije UV zračenju, što ukazuje na njegovu izraženu stabilnost pod uticajem UV svetlosti. Rastogi i Incharoensakdi (2014b) su detektovali samo neznatni pad koncentracije scitonemina nakon UV tretmana i tretmana visokom temperaturom, u odnosu na detektovane početne vrednosti kod vrste *Lyngbya* sp. CU2555. Stabilnost scitonemina se takođe ogleda u njegovoj očuvanosti u sedimentu arhaičkog porekla (Leavitt i sar., 1997; Verleyen i sar., 2005; Fleming i Castenholz, 2007; Fulton, 2013). Scitonemin je pronađen u jezerskom i marinskom sedimentu (Leavitt i sar., 1997; Fulton, 2013; Fulton i Van Mooy, 2014; Florian i sar., 2015), kao i u slojevima stena izloženih

jakom zračenju (Vítek i sar., 2014). Scitoneminu slični pigmenti su pronađeni očuvani u stromatolitima poreklom iz Proterozoika (Golubic i Hofmann, 1976). Takođe, prisustvo velike koncentracije scitonemina u površinskim slojevima pokorica može ukazati na njegovu strukturnu stabilnost i veoma nizak nivo fotodegradacije (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991).

MOSA je detektovan kod svih testiranih lesnih cijanobakterijskih kultura (Grafikon 34), kao i u samom sedimentu - u svim analiziranim uzorcima lesa i BLC (Grafikon 38 i 39). Kako je prisustvo MOSA potvrđeno u lesu i BLC, ovi metaboliti se mogu smatrati pouzdanim indikatorom sušnih sredina izloženih jakom UV zračenju, ukazujući na veliku potrebu daljih analiza lesnog sedimenta s ciljem paleoklimatske rekonstrukcije. Imajući u vidu njihovu specifičnost u odnosu na ekološke uslove i prema određenim grupama organizama, kao i njihovu izuzetnu strukturnu stabilnost izlaganjem različitim abiotičkim i biotičkim stresnim faktorima, MOSA imaju ogroman potencijal kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji.

#### **5.2.4. Mogućnost primene metabolita u opsegu mikosporin apsorbance kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji**

Analizom sposobnosti produkcije MOMA, MOMA su detektovani kod svih vodenih i zemljišnih sojeva. Veća produkcija MOMA je uočena kod svih zemljišnih sojeva (Grafikon 55), koji su prikazani kao poseban klaster na AMMI1 biplotu, što se može objasniti kroz različite metaboličke odgovore na stresne faktore, s obzirom da terestrične vrste cijanobakterija žive u ekstremnijim sredinskim uslovima. Fiziološke manifestacije izazvane stresom zbog promena faktora sredine su kompleksne i variraju između cijanobakterijskih sojeva što je vidljivo kroz različit kvantitativan sadržaj MOMA kod svakog posmatranog soja. U proseku, zemljišni sojevi se mogu izdvojiti kao sojevi sa najvećom produkcijom MOMA. Nasuprot ove grupacije izdvojeni su vodeni sojevi W9, W8 i W10 koji su pokazali najnižu produkciju MOMA. Prema stabilnosti produkcije, T1 i W9 su pokazali izraženiju oscilaciju produkcije MOMA zavisno od uslova gajenja. Sojevi W5, W3, W6, W1 i W2 su imali stabilniju produkciju u različitim uslovima i kod njih nisu detektovane velike promene u koncentraciji pigmenta promenom sredine u kojoj je soj rastao.

Takođe AMMI1 biplot prikazuje varijacije u produkciji MOMA zavisno od sredinskih uslova gajenja (Grafikon 55). Mikosporinu slične aminokiseline su antioksidativni molekuli i



sintetišu se intracelularno kada je organizam izložen nekom stresnom faktoru (Wada i sar., 2013). Faktori koji stimulišu produkciju MOMA su različiti i uključuju promene u pH, temperaturi, azotu i delovanje UV svetlosti. Tretmani delovanja temperature od 30-35 °C, UV svetlosti i gajenje u podlozi sa pH 9.0, u podlozi +N su se pokazali kao uslovi u kojima je postignuta izraženija produkcija MOMA. I u drugim istraživanjima je utvrđen stimulatívni uticaj više faktora, uključujući UV zračenje, dnevnu svetlost, isušivanje i prisustvo hranljivih materija i različite koncentracije soli (Karsten i sar., 1998; Portwich i Garcia-Pichel, 2000; Sinha i sar., 2001; Jiang i sar., 2008; Sinha i Häder, 2008; Singh i sar., 2008b; Rastogi i sar., 2010a,b; Rastogi i Incharoensakdi, 2015). Sinteza mikosporinu sličnih aminokiselina je energetski-zavistan proces koji zavisi od sunčeve energije, neophodne za održavanje u prirodnim uslovima (Rastogi i sar., 2010a) u kojima je utvrđeno da koncentracija mikosporinu sličnih aminokiselina zavisi od dubine prodiranja UV zraka (Karsten i sar., 1998). Međutim, jednogodišnja istraživanja u prirodnom okruženju ukazala su na promenljivu količinu mikosporinu sličnih aminokiselina tokom godišnjih doba bez ikakvog očiglednog trenda (Karsten i sar., 1998) ukazujući da količina produkovanih mikosporinu sličnih aminokiselina nije određena samo i isključivo izlaganjem povećanom intenzitetu sunčevog zračenja.

Tokom istraživanja uočeno je znatno povećanje sinteze MOMA izlaganjem UV svetlosti u prvih 24 h i ovo povećanje se nastavilo daljim izlaganjem. Primetno je da se kod zemljišnih sojeva uočava znatnije povećanje u sintezi MOMA već nakon 24 h kontinuirane ekspozicije UV svetlosti. Kod većine vodenih sojeva je uočena izrazitija sinteza MOMA nakon 36 h ekspozicije u odnosu na period od 24 h. U odnosu na zemljišne cijanobakterijske sojeve, kod vodenih je uočena niža produkcija MOMA. Ova pojava je zanimljiva jer neki vodeni sojevi migriranjem u dublje slojeve vode mogu izbeći štetno dejstvo UV zraka, te samim tim sadržaj mikosporinu sličnih aminokiselina u ovakvim vrstama nije visok, za razliku od zemljišnih sojeva kod kojih su alternativni mehanizmi onemogućeni, te se oni štite produkcijom zaštitnih pigmenata. U vremenskom periodu stimulacije sinteze MOMA UV zračenjem, vodeni sojevi - W2, W8, W9 i W10 su imali ujednačen porast sadržaja MOMA s povećanjem perioda izlaganja. Izuzev soja W2 koji je predstavljen rodom *Aphanizomenon*, ostale su činili predstavnici roda *Oscillatoria* za koje je poznato da pokazuju vertikalna migratorna kretanja na dnevnom nivou (Richardson i Castenholz, 1987; Garcia-Pichel i Castenholz, 1993; Kruschel i Castenholz, 1998; Ehling-Shulz i Scherer, 1999; Nadeau i sar., 1999). Ova četiri soja su ujedno najslabiji producenti MOMA.

Može se pretpostaviti da je usled pojačanog globalnog zagrevanja i evolucionim pritiskom došlo do razvoja sposobnosti produkcije neznatne količine mikosporinu sličnih aminokiselina i pored sposobnosti migratornih kretanja.

Gotovo svi cijanobakterijski sojevi su pokazali bolju produkciju MOMA u uslovima rasta u podlozi +N u svim posmatranim uslovima (Grafikon 55). Ovi rezultati ukazuju na značaj azota u podlozi za njihovu produkciju. I u drugim studijama je utvrđen stimulatívni efekat azota na produkciju značajno više koncentracije mikosporinu sličnih aminokiselina (Litchman i sar., 2002; Peinado i sar., 2004; Klisch i Häder, 2008; Singh i sar., 2008a; Mohlin i Wulff, 2009; Rosic i Dove, 2011; White i sar., 2011; Yadav i sar., 2011). U prirodnim uslovima, amonijum se brzo mobilíše u molekule mikosporinu sličnih aminokiselina, pa samim tim se mikosporinu slične aminokiseline mogu smatrati intracelularnim rezervoarima azota u situacijama kada su ograničavajuće koncentracije azota (Peinado i sar., 2004; Korbee i sar., 2006; Oren i Gunde-Cimerman, 2007). Ovo je moguće objašnjenje za postojanje sposobnosti produkcije mikosporinu sličnih aminokiselina i normalnog rasta u uslovima insuficijencije azota kod neheterocistnih cijanobakterijskih vrsta. U tom smislu, mikosporinu slične aminokiseline će osloboditi azot kad god su drugi odgovarajući oblici azota u deficitu. Međutim, do sad, malo je eksperimentalnih dokaza koji bi podržali ovu ideju. Menjanje asimilacije azota i sastava fotosintetičkih pigmenata vodi ka povećanju fotosinteze i stimulanju šikimatskog puta sinteze, a time i produkcije mikosporinu sličnih aminokiselina (Saadatmand i Zamani, 2015). Kao što se može videti, ne postoje taksonomske granice za proizvodnju mikosporinu sličnih aminokiselina, najverovatnije zbog evolutivnog pritiska za razvoj efikasnog UV-zaštitnog mehanizma. Iz svega navedenog, kao i prema rezultatima istraživanja, može se zaključiti da pored ekoloških faktora sinteza MOMA zavisi i od specifične metaboličke aktivnosti cijanobakterija.

Uslovi koji pružaju nižu produkciju MOMA kod testiranih cijanobakterijskih sojeva su bela fluorescentna svetlost, pH 6.0 i 10-15 °C, u podlozi -N, dok se rastom u podlozi +N postiže mala produkcija MOMA samo u tretmanu rasta na temperaturi 10-15 °C. Može se pretpostaviti da je ovo usled činjenice da su pod niskim temperaturama metabolički procesi i rast većine cijanobakterija svedene na minimum, te u uslovima fiziološke stagnacije smanjena je i produkcija MOMA. Takođe uočava se da su manje fluktuacije u koncentraciji MOMA u tretmanima rasta u podlozi -N tokom analiziranih sredinskih faktora.

Korelacija između produkcije MOMA svakog pojedinačnog soja i različitih tretmana je prikazana na AMMI2 biplotu (Grafikon 56). Upravo se primenom AMMI 2 biplota prikazuje da je produkcija pigmenta varirala delovanjem različitih abiotičkih faktora. Primetno je grupisanje zemljišnih sojeva nasuprot svih vodenih sojeva. Sojevi grupisani zajedno su adaptirani na slične uslove sredine sugerišući da ovi sojevi imaju slično poreklo. Zemljišni sojevi su u bliskoj vezi sa tretmanima - UV svetlost, 30-35 °C i pH 9.0, u podlozi +N sredine ukazujući da ovi sojevi imaju specifične adaptacije na date uslove i da su upravo u tim uslovima ispoljili najveću produkciju MOMA. Na primer, pozitivna asocijacija je utvrđena kod soja T2 i UV svetlosti i povišene temperature (30-35 °C) u podlozi +N.

Veoma je važno razumevanje uticaja ekoloških parametara na sintezu MOMA kako bi se pravilno ocenila njihova uloga tokom evolucije i u sticanju jasnijeg uvida uticaja klimatskih faktora. Primetno je da se kultivacijom u različitim uslovima mogu postići različite manifestacije u produkciji MOMA. Pojedini uslovi favorizuju intenzivniju produkciju ovog pigmenta, dok je u drugim uslovima sinteza MOMA bila znatno slabije izražena. Moguće objašnjenje leži upravo u metaboličkim afinitetima organizama producenata. Poznato je da rast cijanobakterija biva favorizovan u uslovima viših temperatura (Reynolds, 2006; Berg i Sutula, 2015) i pri jačoj insolaciji, dok npr. kisela sredina ne pogoduje njihovom rastu, verovatno usled postojanja tanke peptidoglikanske membrane bez ćelijskog zida. U takvim uslovima sledi denaturacija proteina, a time je i metabolička aktivnost znatno smanjena, što sve utiče na nižu sintezu mikosporinu sličnih aminokiselina. Moguće je i da je usled rasta u neoptimalnim uslovima usporen metabolizam i svi fiziološki procesi i shodno tome ćelije ulaze kasnije u eksponencijalnu fazu rasta (Li i sar., 2014). Ćelija štedi energiju i smanjena je produkcija sekundarnih metabolita.

Analiziranjem sposobnosti produkcije MOMA lesnih kultura, MOMA nisu produkovani od strane sojeva L12 i L17, koji pripadaju rodu *Nostoc* sp. i poreklom su iz Kineskog lesnog depoa. Prisustvo MOMA je uočeno u svim uzorcima lesa i BLC (Grafikon 40 i 41).

Dostupni podaci o mikosporinu sličnih aminokiselina se svode na njihovu distribuciju, biosintezu, hemijsku strukturu i fiziološku ulogu, dok se manje zna o njihovoj stabilnosti prema različitim stresnim faktorima. S ciljem uspešnog korišćenja MOMA kao biomarkera cijanobakterija u geološkim istraživanjima, neophodno je poznavanje njihove sposobnosti održavanja stabilne strukture delovanjem različitih stresnih abiotičkih i biotičkih faktora. Ovo je krucijalan i neophodan korak u deklarisanju ovih molekula kao pouzdanih biomarkera

cijanobakterija. Stabilnost MOMA se analizirala delovanjem abiotičkih i biotičkih faktora i utvrđena je visoka stabilnost ovih molekula tokom svih analiziranih stresnih uslova. MOMA su se pokazali veoma rezistentnim na delovanje različitih pH vrednosti podloge, od kiselih ka baznim sredinama. Različite temperaturne vrednosti podloge nisu dovele do degradacije MOMA, ni temperatura od 85 °C. I u uslovima prolongirane ekspozicije UV zračenju nije uočena razgradnja MOMA. Uticaj povišenih temperatura i UV zračenja je od većeg značaja zbog globalnog zagrevanja koje za posledicu ima povećanje UV zračenja i temperature. I nakon delovanja tri različita soja bakterija, MOMA nisu degradirani. Postoji nekoliko literaturnih zapisa o stabilnosti mikosporinu sličnih aminokiselina delovanjem različitih stresogenih faktora kao što su temperatura, jako UV zračenje i pH (Ehling-Schulz i sar., 1997; Gröniger i Häder, 2000; Rastogi i Incharoensakdi, 2014a,b,c; Rastogi i sar., 2016). Takođe i sinhronim delovanjem UV svetlosti i toplote ( $75 \pm 2$  °C) u trajanju od 6 h nije došlo do njihove degradacije (Sinha i sar., 2000).

Produkcija i akumulacija različite količine MOMA i njihova izražena stabilnost prema delovanju brojnih abiotičkih i biotičkih stresogenih faktora održavaju ćelijsku dinamiku cijanobakterija u uslovima delovanja različitih stresnih ekoloških faktora, dovodeći do dugoročnog opstanka i održivosti cijanobakterija u njihovim prirodnim staništima. Izražena stabilnost ovih metabolita pruža mogućnost njihove potencijalne upotrebe kao biomarkera u paleoklimatskoj i paleoekološkoj rekonstrukciji jezerskih/marinskih, kao i lesnih sedimenata, ali zbog odsustva produkcije ovih pigmenata kod nekih targentnih sojeva, kao i usled produkcije od strane drugih organizama, za stabilniji zaključak o njihovoj upotrebi u paleoklimatskoj rekonstrukciji neophodna su dalja istraživanja.

### **5.3. Cijanotoksini kao biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji**

#### **5.3.1. Produkcija cijanotoksina u biološkim pokoricama**

Poznato je da su pokorice u pustinjama izgrađene većinom od cijanobakterija, međutim nedostaju literaturni podaci o pojavi toksičnih metabolita cijanobakterija u pokoricama i lesnom depozitu. Procena toksičnosti i sposobnosti produkcije mikrocistina, cilindropermopsina i saksitoksina analizirana je kod 12 rodova lesnih cijanobakterija NSCCC. Različite metode imaju

razne prednosti i nedostatke u pogledu detekcije cijanotoksina. Za detekciju toksičnosti lesnih cijanobakterija korišćen je *A. salina* bioesej. Brojnim literaturnim navodima je potvrđeno da intracelularni i ekstracelularni cijanotoksini mogu dovesti do toksičnog efekta na larvama račića *A. salina* (Metcalf i sar., 2002; Beattie i sar., 2003; Assay i sar., 2006; Lindsay i sar., 2006; Hisem i sar., 2011). Takođe, poznato je da je korišćen bioesej adekvatan za detekciju toksičnosti mikrocistina (Kiviranta i sar., 1991; Campbell i sar., 1994; Beattie i sar., 2003; Assay i sar., 2006), cilindrospermopsina (Metcalf i sar., 2002; Hisem i sar., 2011) i saksitoksina (Park i sar., 1986; Kanwar, 2007; Ruebhart, 2008). Međutim, u istraživanjima obuhvaćenim disertacijom nije utvrđena toksičnost lesnih cijanobakterija (mortalitet viši od 50%) nakon 24 h. Takođe, ELISA test je korišćen s obzirom da inicijalnim skriningom pruža informacije o prisutnosti pojedinih grupa toksina, međutim cijanotoksini nisu detektovani u analiziranim lesnim cijanobakterijama. Pored toga, korišćena je LC-MS(/MS) metoda za identifikaciju pojedinačnih cijanotoksina, ali ni ova metoda nije pokazala prisustvo testiranih cijanotoksina. Dostupni su literaturni podaci o analizi produkcije cijanotoksina u pokoricama gde takođe nije uočena toksičnost (Tokodi, 2016; Dulić i sar., 2017). Mikrocistini su detektovani jedino u pokoricama pustinje u Kataru u koncentraciji od 1.5 do 53.7 ng g<sup>-1</sup> s.t. (Metcalf i sar., 2012).

Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja rezultata dobijenih istraživanjima u okviru doktorske disertacije. Jedno od objašnjenja može biti da cijanobakterije u BLC ne proizvode cijanotoksine. Veoma je moguće da cijanobakterije koje formiraju pokorice ne sintetiziraju cijanotoksine usled neaktivnosti gena odgovornih za njihovu sintezu ili usled neposjedovanja istih. Kako su cijanobakterije pionirski organizmi u terestričnim ekosistemima postoji mogućnost da ne dolazi do produkcije cijanotoksina usled odsustva kompeticije sa drugim mikroorganizmima ili su koncentracije toksičnih metabolita ispod praga detekcije korišćenih metoda. Isto tako, uglavnom se sprovode analize koje uzimaju u obzir najčešće dokumentovane i najšire rasprostranjene cijanotoksine (Tokodi, 2016; Dulić i sar., 2017), što implicira da se ne prati prisustvo drugih cijanobakterijskih toksina. Stoga odsustvo analiziranih grupa cijanotoksina ne isključuje prisustvo drugih potencijalno toksičnih metabolita cijanobakterija. Iz tog razloga je neophodno usmeravanje istraživanja ne samo na ove tri grupe cijanotoksina već i drugih grupa.

Brojni su literaturni podaci o sposobnosti produkcije cijanotoksina rodova koji su analizirani u doktorskoj disertaciji. Vodeni i terestrični rodovi *Nostoc* poznati su po produkciji mikrocistina i saksitoksina (Sivonen i sar., 1990, 1992a; Oksanen i sar., 2004; Mohamed i sar.,

2006; Hrouzek i sar., 2009; Silva i sar., 2014), sa najnižom koncentracijom evidentiranom kod sojeva izolovanih iz tropskih i pustinjских zona (Hrouzek i sar., 2009). Produkcija mikrocistina je detektovana kod *Leptolyngbya* sp. (Silva i sar., 2014) mada najčešće povezana sa vodenim sredinama, slično kao i kod *Synechococcus* sp. (Codd i sar., 2005; Carmichael i Li, 2006; Frazão i sar., 2010). Kod roda *Phormidium* je detektovana produkcija mikrocistina, BMAA, lipopolisaharidnih endotoksina i anatoksina-a (Codd i sar., 1999; Viaggiu i sar., 2004; Cox i sar., 2005; Gantar i sar., 2009; Wood i sar., 2010; McGorum i sar., 2015). Takođe, *Chroococcus* i *Chroococidiopsis* imaju sposobnost produkcije cijanotoksina (Codd i sar., 2005; Cox i sar., 2005; Neilan i sar., 2008), a rod *Lyngbya* je poznat po produkciji neurotoksina (Sivonen, 2009; Silva i sar., 2014). Moguće je da je produkcija i koncentracija cijanotoksina soj-specifična karakteristika i da zavisi od sredinskih faktora, kao i faze rasta. Shodno tome, u poslednjoj deceniji detektovane su nove vrste koje su sposobne da produkuju cijanotoksine, kao i vrste cijanobakterija koje su od nedavno počele da produkuju toksine u sredinama koja su njihova staništa dugi niz godina (Mohamed i Al-Shehri, 2013). Širenjem areala rasprostranjenja toksin-produkujućih cijanobakterija usled globalnog zagrevanja može se očekivati povećanje broja toksin-produkujućih vrsta i u lesnim sredinama. Uočeno je da je *Microcystis* sp. povećao svoju brojnost u slatkovodnim ekosistemima u umerenim i tropskim klimatskim uslovima (Zurawell i sar., 2005; Harke i sar., 2016), a takođe i *C. raciborski* u umerenim klimatskim regionima (Kinnear, 2010). Isto tako identifikovane su nove vrste sa sposobnošću produkcije mikrocistina (Ballot i sar., 2005; Carey i sar., 2007), kao i cilindropermopsina i saksitoksina (Lagos i sar., 1999; Seifert i sar., 2007; Berry i Lind, 2010).

U doktorskoj disertaciji je rađeno ispitivanje prisustva cijanotoksina u lesnim kulturama, međutim, ukoliko bi se toksični metaboliti koristili kao biomarkeri, oni bi se merili direktno iz lesnih sredina što bi bilo otežavajuće iz nekoliko razloga koji će biti pomenuti. Nemogućnost detekcije cijanotoksina u uzorcima iz terestričnih sredina ne isključuje njihovo prisustvo, jer postoji mogućnost da su za njihovu pripremu potrebni dodatni koraci ili da su korišćene metode isključivo prilagođene samo vodenim uzorcima. U poređenju sa vodenim sredinama, u terestričnim su više temperature i dostupnost nutrijenata je ograničavajuć faktor. U takvim uslovima može doći do demetilacije cijanotoksina rezultujući u redukovanju toksičnosti (Rapala i sar., 1997). U uslovima nedostatka nutrijenata ili dehidratacije cijanobakterijske ćelije mogu da se osuše, sa cijanotoksinima koji ostaju očuvani intracelularno i oslobađaju se u okolinu prilikom

ponovne rehidracije (Jones i sar., 1995; Chen i sar., 2006b). Takođe, sastav zemljišnog supstrata može uticati na različitu apsorpciju cijanotoksina (Morris i sar., 2000; Miller i sar., 2001; Miller i Fallowfield, 2001; Bibo i sar., 2008; Kanzo i sar., 2013), što smanjuje njihovu raspoloživost u mobilnom stanju ili usled izgradnje kompleksa sa metalnim jonima na površini čestica (Oliveira i sar., 2005; Chen i sar., 2006a). Stoga, mogućom apsorpcijom na česticama zemljišta mikrocistini se mogu akumulirati u zemljištu na duže vreme. Još jedan od limitirajućih faktora prilikom detekcije cijanotoksina u terestričnim sredinama je prisustvo bakterija u zemljištu koje mogu degradirati produkovane cijanotoksine (Chen i sar., 2006a; Manage i sar., 2009).

Generalno, metode za detekciju cijanotoksina iz terestričnih i lesnih sredina su i dalje u razvoju, moraju biti optimizovane, tako da izvođenje bilo kakvog zaključka dobijenog na osnovu metodologije prvenstveno osmišljene za vodene uzorke treba uzimati s oprezom.

### 5.3.2. Stabilnost toksina cijanobakterija

Mikrocistini su najšire rasprostranjeni cijanotoksini i stoga se najveći broj naučnih istraživanja sprovodi upravo na njima. Zahvaljujući cikličnoj strukturi, mikrocistini su veoma stabilni na delovanje pH, temperature i uobičajnih proteaza (Jones i Orr, 1994; Tsuji i sar., 1994; Lawton i Robertson, 1999; Figueiredo i sar., 2004; Chen i sar., 2008; Edwards i sar., 2008; Pawlik-Skowrońska i sar., 2008; Gagala i Mankiewicz-Boczek, 2012). U prilog stabilnosti mikrocistina govori i rezistentnost na konvencionalne tretmane prečišćavanja voda usled čega postoji neophodnost sprovođenja kombinacije više tretmana, nekada u izuzetno jakim dozama kako bi došlo do njihove degradacije (Pantelić i sar., 2013). Aplikiranje UV zračenja može dovesti do degradacije MC-LR, cilindropermopsina i anatoksin-a, ali u uslovima korišćenja jakog zračenja (Pantelić i sar., 2013). O stabilnoj strukturi mikrocistina govore i istraživanja gde su mikrocistini ostali očuvani u herbarskom materijalu cijanobakterija skupljanom iz vodenih i terestričnih sredina iz 11 zemalja širom sveta, čuvanih na sobnoj temperaturi, u mraku više od 170 godina (Metcalf i sar., 2012). Stoga je jasna postojanost ovih toksina unutar osušenih cijanobakterijskih ćelija tokom dužeg vremenskog perioda, koji se ponovnom rehidracijom mogu opet osloboditi u okolnu sredinu (Chen i sar., 2006a).

U vodenoj sredini mikrocistini mogu opstati nekoliko meseci do nekoliko godina (Jones i Orr, 1994; Harada i sar., 1996; Sivonen i Jones, 1999; Zastepa i sar., 2014), čak i duže od 20 godina na osnovu merenja mikrocistina u površinskim vodama (Zastepa i sar., 2017). Takođe u prirodnim uslovima je utvrđeno da MC-LR i -LA opstaju duboko u jezerskom sedimentu (Pawlik-Skowrońska i sar., 2010; Efting i sar., 2011; Kaczorowska i Kornijow, 2012). Stabilnost cijanotoksina se povećava prisustvom veće količine organskih materija i u anaerobnim uslovima (Holst i sar., 2003; Klitzke i Fastner, 2012; Waters, 2016), što je potvrđeno u prirodnim uslovima u studiji Welker i Steinberg (2000) u kojoj je pokazano da je fotodegradabilnost veoma niska i da ima efekta samo u veoma plitkim vodenim sredinama.

Uprkos hemijskoj stabilnosti mikrocistina i rezistentnosti na eukariotske i mnoge bakterijske peptidaze, utvrđeno je da su u laboratorijskim uslovima mikrocistini podložni razgradnji bakterijama normalno prisutnih u rekama, jezerima, jezerskim sedimentima i rezervoarima (Jones, 1990; Jones i Orr, 1994; Rapala i sar., 1994; Tsuji i sar., 1995; Bourne i sar., 1996; Cousins i sar., 1996; Ho i sar., 2012), kanalizacionom mulju (Lam i sar., 1995) i biofilmu (Saitou i sar., 2002), što se, iako do sad neistraženo, može očekivati i u terestričnim sredinama (Zhang i sar., 2000; Corbel i sar., 2014b). U laboratorijskim uslovima, Maghsoudi i sar. (2016) su detektovali biodegradabilnost mikrocistina za manje od 16 h, Hu i sar. (2009) nakon 17 h, Hu i sar. (2012b) nakon 24 h, Harada i sar. (2004) su detektovali kompletnu degradaciju mikrocistina nakon 96 h, odnosno nakon 144 h (Ishii i sar., 2004) bakterijama izolovanim iz vodenih sredina. U prirodnim vodenim sistemima mikrocistin izolovan iz *M. aeruginosa* se biološki razgradi za 2-6 nedelja (Jones, 1990; Tsuji i sar., 1994; Harada i sar., 1996; Welker i Steinberg, 2000; SZO, 2003), odnosno za 7 dana potpuna degradacija je postignuta u istraživanju Cousins i sar. (1996).

Što se tiče terestričnih sredina, rasprostranjenje i sudbina cijanotoksina je veoma slabo istražena. Čini se da je glavni i jedini proces degradacije cijanotoksina uglavnom putem mikrobijalne degradacije (Bourne i sar., 2001; Miller i sar., 2001; Miller i Fallowfield, 2001; Chen i sar., 2006a; Manage i sar., 2009). Mikrobiološka degradacija cijanotoksina prisutnih u zemljištu se može razdvojiti u dve faze gde prvo dolazi do razgradnje ćelije i oslobađanja toksina, a potom do procesa degradacije oslobođenih cijanotoksina. Međutim, u zemljišnom supstratu potrebno je daleko više vremena za liziranje cijanobakterijske ćelijske strukture i oslobađanja toksina u podlogu, s obzirom na veću postojanost cijanotoksina u zemljištu (Chen i



sar., 2006a). Corbel i sar. (2016) su detektovali niske koncentracije mikrocistina u uzorku zemljišta nakon 90 dana navodnjavanja zemljišta čistim ekstraktom *M. aeruginosa* usled moguće degradacije ili apsorpcije na čestice i/ili organske materije u zemljištu. Međutim, kada je <sup>14</sup>CMC-LR dodat u muljevito-peskovito poljoprivredno zemljište uočena je njegoa slaba mikrobiološka degradacija, gde je velika koncentracija ostala u vodenoj suspenziji u zemljištu (74–80%) (Corbel i sar., 2014a). Činjenica je da u vidu podzemnih izvora vode cijanotoksini jako dugo opstaju kao rezultat niske mikrobiološke aktivnosti (Holst i sar., 2003). Takođe je istraživanjima u doktorskoj disertaciji analizirana stabilnost mikrocistina nakon testa biodegradabilnosti delovanjem bakterija izolovanih iz BLC. Tokom vremenskog perioda izlaganja bakterijama nije uočena degradacija mikrocistina. Ipak, nekoliko studija je otkrilo prisustvo heterotrofnih bakterija u zemljištu koje sadrže mikrocistin-gen klastere, *mlrA*, B, C i D neophodne za degradaciju mikrocistina (Bourne i sar., 2001; Miller i sar., 2001; Manage i sar., 2009) i u zemljištu su identifikovane bakterijske vrste sposobne da vrše razgradnju mikrocistina (Corbel i sar., 2014b). Manage i sar. (2009) i Welgama (2009) su identifikovali tri zemljišna izolata: *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp. i *Rhodococcus* sp. koja su imala sposobnost razgradnje 6 najčešćih varijanti mikrocistina. Nedostaju podaci o biodegradaciji cilindrospermopsina, saksitoksina, anatoksina-a i BMAA u zemljištu, ali se izvestan stepen degradacije može očekivati zavisno od karakteristika i hemijskih uslova zemljišta (Corbel i sar., 2014a).

Bitno je naglasiti da su sva istraživanja biodegradabilnosti mikrocistina rađena u laboratorijskim uslovima, te stvarni efekat biodegradabilnosti u prirodnim sredinama zavisi od bakterijske zajednice (od prisutnih vrsta i od njihove brojnosti) koje su prirodno prisutne u datom ekosistemu (Hoefel i sar., 2009; Ho i sar., 2012) i od inicijalne koncentracije cijanotoksina i njegove prirode (Dawson, 1998; Edwards i sar., 2008; Ho i sar., 2012; Kormas i Lymperopoulou, 2013), kao i od organskih materija i sredinskih uslova (Park i sar., 2001; Hoefel i sar., 2009). Moguće je da u prirodnim sredinama u kojima su prisutni mikrocistini i drugi cijanotoksini nisu česte bakterije sa sposobnošću degradacije mikrocistina. U prilog tome je činjenica da iako se rod *Bacillus* decenijama eksploatiše u biotehnologiji zbog izražene sposobnosti biodegradacije, do sad je izolovana samo jedna vrsta sa sposobnošću degradacije MC-LR i -RR (Newton i sar., 2011; Hu i sar., 2012b). Takođe, kako je dokazano u preliminarnim studijama lesnih uzoraka Vojvodine, cijanobakterije su činile 90% biomase BLC, a ostatak od 10% su većinom bile bakterije (Svirčev i sar., 2013). Ovaj odnos članova mikrobijalne zajednice je očekivan s

obzirom na slabu plodnost lesa, jako sunčevo zračenje i malo vlage iz čega proizilazi pretpostavka da je biodegradacija cijanotoksina u lesu neznatan proces. Takođe, kako su u zemljišnom supstratu cijanotoksini apsorbovani na česticama tla duboko ispod površine koja je izložena intenzivnom sunčevom i UV zračenju, moguće je da su cijanotoksini u lesu intaktni, nedegradabilni i stoga potencijalni kandidati za biomarkere cijanobakterija u geološkim i paleoklimatskim istraživanjima. Međutim pri izvođenju finalnih zaključaka neophodne su dodatne studije o cijanotoksinima i njihovoj sudbini u lesnim sredinama, tipu degradacije i uticaja na živi svet.

### 5.3.3. Potencijalni putevi ekspozicije cijanotoksinima u lesnim sredinama

Informacije o zastupljenosti cijanotoksina u lesnim sredinama kao i njihovoj distribuciji i ekotoksikološkim efektima i dalje nedostaju. I pored toga, korisno je izvesti pretpostavke o potencijalnim putevima ekspozicije cijanotoksinima u lesnim sredinama korelisanjem sa cijanotoksinima produkovanim u vodenim sredinama.

Potencijalna povezanost povećane incidence određenih kancera i prisustva cijanotoksina u rezervoarima namenjenim za vodosnabdevanje (Ueno i sar., 1996; Zhou i sar., 2002; Svirčev i sar., 2013, 2014) implicira mogućnost povezanosti i u terestričnim odnosno lesnim sredinama. Postoji mogućnost veze između cijanobakterija i cijanotoksina u lesnim depoima i razvoja hroničnih bolesti. Kako incidenca kancera ezofagusa pokazuje geografsku varijaciju u svetu (Marjani i sar., 2008) sa poklapanjem sa lesnim depozitima (Derbyshire, 2001; Raghimi i Ramezani Mojaveri, 2006; Rashid i sar., 2010; Wang i sar., 2012) može se pretpostaviti postojanje korelacije između lesnih depozita (usled mogućeg prisustva cijanotoksina) i razvoja ove bolesti (Raghimi i Ramezani Mojaveri, 2007; Sharifi, 2011). Naime, lesni depoziti pokrivaju ogromna prostranstva u Kini i Iranu koje karakteriše visoka incidenca kancera ezofagusa (Keshavarzi, 2014) sa otprilike 70% slučajeva u Kini (Zhang i sar., 2012) i preko 51.000 novih slučajeva obolelih od tumora na godišnjem nivou u Iranu. Takođe bitna je mogućnost transfera toksina putem lanaca ishrane. Kako cijanobakterije mogu biti prisutne u sredinama koje se koriste za ispašu stoke ili se stoka može hraniti direktno njima (Christaki i sar., 2012; McGorum i sar., 2015) postoji mogućnost prenosa BMAA preko mesa i putem mleka zaražene stoke, što je utvrđeno u istraživanju Andersson i sar. (2016). Transport BMAA kroz mleko majke pacova na

mladunčad ukazuje na moguću ekspoziciju ljudskih odojčadi putem majčinog mleka. Slični efekti bioakumulacije i transfera lancima ishrane mogu se očekivati i za druge grupe cijanotoksina. Međutim, za iznošenje finalnih zaključaka neophodno je sprovesti detaljnija istraživanja.

Još jedan od mogućih puteva ekspozicije cijanotoksinima u lesnim sredinama je putem pijaće vode. U pustinjskim sredinama postoji problem snabdevanja pijaćom vodom, gde postoje posebni postupci transporta i skladištenja desalinirane vode u specijalnim tankovima za piće. Usled transporta i postojanja otvorenih tankova ili tankova u podzemnim kopovima moguće je zagađenje vode česticama prašine koje nose apsorbirane cijanobakterije i cijanotoksine. U istraživanju Chatziefthimiou i sar. (2016) u većini tankova u urbanim i ruralnim sredinama pustinja uočen je vidljiv obraštaj cijanobakterija, sa prisustvom neurotoksičnog izomera BMAA - AEG (N-(2-amino-etil) glicin) u 91% ruralnih tankova i mikrocistina u 30% gradskih tankova (u koncentracijama izvan dozvoljenih prema SZO). MC-LR je pronađen u 83.3% ruralnih uzoraka vode i u svim uzorcima iz gradskih tankova. Sa istih lokaliteta su svi uzorci zemljišta sadržali BMAA, DAB (2,4-diaminobuterna kiselina) i AEG, gde se koncentracija BMAA i DAB smanjivala sa dubinom zemljišnog supstarata, dok isto nije uočeno kod AEG (Chatziefthimiou i sar., 2016). Ovo ukazuje na moguću apsorpciju i akumulaciju cijanotoksina u zemljištu. Upravo ovo može biti još jedan od načina izlaganja cijanotoksinima u terestričnim sredinama (Kanzo i sar., 2013) koji se rehidratacijom mogu sliti u dublje slojeve zemljišta i dovesti do kontaminacija podzemnih voda (Eynard i sar., 2000; Chen i sar., 2006a; Mohamed i Al-Shehri, 2009; Chen i sar., 2012). Najčešći pominjani putevi ekspozicije ljudi cijanotoksinima u terestričnim sredinama su putem inhalacije aerosoli (Metcalf i sar., 2012; Svirčev i sar., 2013; Dulić i sar., 2017). Chatziefthimiou i sar. (2016) su uočili prisustvo toksin-produkujućih cijanobakterijskih vrsta i cijanotoksina u terestričnim pokoricama i u priobalnom pokrivaču Katara, gde se potencijalno velike količine cijanotoksina mogu akumulirati u pustinjskom tlu dugi niz godina (Richer i sar., 2015). Suspendovane cijanobakterije i cijanotoksini (Chen i sar., 2004; Cox i sar., 2009; Metcalf i sar., 2012; Richer i sar., 2015) mogu biti nošeni vetrom („*oluje prašine*“) u vidu aerosoli i inhalacijom dovesti do mogućeg štetnog efekta po zdravlje ljudi. Ova pojava posebno može biti izražena u regionima koji su zahvaćeni intenzivnom urbanizacijom i razvojem infrastrukture (Richer i sar., 2015). Upravo se pojava ALS (amiotrofična lateralna skleroza) kod vojnika Zalivskog rata uključenih u operaciju „*Desert Storm*“ (Horner i sar., 2008; Cox i sar., 2009)

može povezati sa ekspozicijom aerosilima neurotoksina (Richer i sar., 2015). Jedino evidentirano trovanje nakon kontakta sa cijanobakterijama u terestričnim ekosistemima je trovanje pasa cijanobakterijama prisutnih u vodi u pukotinama pokorica Katara i inhalacijom neurotoksina (Metcalf i sar., 2012; Chatziefthimiou i sar., 2016).

#### **5.3.4. Mogućnost primene cijanotoksina kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji**

Primarnom sredinom cijanobakterija se smatra voda i većina sprovedenih studija i studija koje se sprovode uključuju analize vodenih ekosistema. Njihov značaj u terestričnim sredinama je od nedavno prepoznat (Smalley i sar., 2011; Svirčev i sar., 2013; Sprafke i Obreht, 2016; Svirčev i sar., 2016). Cijanobakterije u terestričnim sredinama su izložene značajno stresnijim ekološkim faktorima, koji dovode do produkcije različitih zaštitnih molekula putem sekundarnog metabolizma, među kojima su od posebnog značaja cijanotoksini. Sudbina i postojanost cijanotoksina u vodenim i terestričnim ekosistemima ostaje slabo shvaćena delom usled nedostataka analitičkih metoda za detekciju cijanotoksina u sedimentu. Postojeće metode su ograničene na ekstrakciju nekoliko najčešćih varijanti cijanotoksina (pretežno mikrocistina) (Zastepa i sar., 2015) prisutnih u vodenom stubu. Do sada nema dokumentovanih studija koje su se bavile analizom cijanotoksina iz lesnih sedimentnih zapisa.

U novije vreme, objavljena je nekolicina radova koja su se bavila kvantifikacijom mikrocistina u jezerskom sedimentu u smislu paleolimnologije. Rađene su metode kvantifikacije intracelularnih i ekstracelularnih cijanotoksina iz jezerskog sedimenta i mikrocistini su utvrđeni kako u površinskim tako i u geološki starijim, dubljim slojevima (Kaczorowska i Kornijów, 2012; Zastepa i sar., 2015; Kowalewska i sar., 2017). Ovim studijama je utvrđeno da sedimenti služe kao rezervoari mikrocistina (Zastepa i sar., 2015). Rađene su i komparativne analize cijanotoksina i pigmenata (Kowalewska i sar., 2017; Zastepa i sar., 2017) i dijatoma (Kowalewska i sar., 2017) u sedimentu. Sedimentni zapisi porasta koncentracije mikrocistina su bili u korelaciji sa koncentracijom azota i fosfora tokom istorije, a takođe prate i porast cijanobakterijskih pigmenata prisutnih u sedimentu. Međutim, nije pronađena veza između klimatskih indikatora i sedimentne koncentracije mikrocistina, iako se ta povezanost utvrdila posmatranjem koncentracije u vodenom stubu (Zastepa i sar., 2017). Povećanje koncentracije

sedimentnog mikrocistina je bilo mnogo veće nego povećanje sedimentnih cijanobakterija ukazujući na pojavu toksičnijih taksona u poslednjih 20 godina (Zastepa i sar., 2017). A takođe su sedimentni zapisi mikrocistina naglo porasli razvojem poljoprivrede.

Iako je registrovana izrazita stabilnost mikrocistina referentnog soja *M. aeruginosa* PCC 7806 prema bakterijskim sojevima, usled nemogućnosti detekcije cijanotoksina lesnih cijanobakterija, cijanotoksini se samo iz tog razloga ne mogu smatrati odgovarajućim biomarkerima u geološkim analizama. Stoga ostaje potreba za razvojem metoda njihove detekcije i kvantifikacije, kao i za daljim istraživanjem lesnih sedimenata na prisustvo cijanotoksina.

#### **5.4. Paleoklimatska rekonstrukcija na bazi biomarkera cijanobakterija**

Paleoklimatska rekonstrukcija je od ključne važnosti za razumevanje varijabilnosti globalnih klimatskih faktora i za pružanje mogućeg scenarija za sadašnje i buduće globalne klimatske promene. Nakon svega iznetog u prethodnim poglavljima, u ovom delu prikazaće se potencijal sekundarnih metabolita cijanobakterija kao paleoklimatskih biomarkera i princip analize klimatskih uslova primenom ovog novog pristupa.

Razumevanje promena klimatskih uslova u prošlosti zahteva rekonstrukciju fosilnih zapisa u jezerskim/marinskim sedimentima, a u novije vreme i terestričnim sredinama (npr. lesnim depoima). Jezerski i marinski sedimenti su osetljivi zapisi klimatskih promena. Karakteriše ih relativno visok stepen sedimentacije koji pruža kontinuirane klimatske arhive visoke rezolucije (Frechen, 2008). S druge strane, indikatori klimatskih promena poreklom iz lesa pružaju direktnije informacije paleoklimatskih i paleoekoloških promena, s obzirom da je lesni sediment u direktnom kontaktu sa atmosferskim i klimatskim uslovima u periodu njegovog formiranja (Sheldon i Tabor, 2009). Jezerski i marinski sedimenti prvenstveno nose zapise globalnih klimatskih signala, dok les, pored globalnih signala, reflektuje regionalne i lokalne klimatske i ekološke uslove.

Značaj jezerskih sedimentnih arhiva u paleoklimi je dobro poznat (Reuss, 2005; Birks i Birks, 2006; Reuss i sar., 2010; Funkey i sar., 2014; Florian i sar., 2015; Jiménez i sar., 2015; Limaye i sar., 2016), a poslednjih godina primećen je povećan broj studija koje se pri analizi paleoklime jezerskih sedimenata baziraju na cijanobakterijskim zapisima (uglavnom karotenoida

i hlorofila *a*) i stabilnih izotopa očuvanih u jezerskom sedimentu (Castañeda i Schouten, 2011; Funkey i sar., 2014; Florian i sar., 2015; Jiménez i sar., 2015; Kaiser i sar., 2016; Limaye i sar., 2016). Analizama cijanobakterijskog pigmentog sastava u sedimentima jezera dobijene su informacije o povećanoj produkciji koja je posledica globalnog zagrevanja (Michelutti i sar., 2005; Lami i sar., 2010), gde je povećanje brojnosti cijanobakterija zabeleženo u brojnim analiziranim jezerima (Lami i sar., 2000). Brojni su literaturni navodi o upotrebi cijanobakterijskih pigmenata u određivanju klimatskih uslova (Talbot i Allen, 1996; Kaiser i sar., 2016; Danladi i sar., 2016) prevashodno preko njihove brojnosti, kao i u određivanju stepena eutrofikacije (Reuss, 2005; Funkey i sar., 2014; Deshpande i sar., 2014; Florian i sar., 2015; Jiménez i sar., 2015; Cook i sar., 2016; Szymczak-Żyła i sar., 2017) ili hipoksije (u kombinaciji sa redoks potencijalom vode i izotopskim zapisima azota) (Funkey i sar., 2014). Pojedini aspekti paleoproduktivnosti jezera su utvrđeni na osnovu cijanobakterijskih sedimentnih pigmenata i dijatoma (Rybak i Dickman, 1988). Autori su koristili stratiografske promene odnosa cijanobakterijskih i bakterijskih pigmenata da bi zaključili koje su se promene desile tokom prelaska jezera iz mezotrofne u eutrofnu fazu. Hou i sar. (2014) su istraživali ekološke promene kod cijanobakterija i protista u jezeru, pomoću analiza podgrupa antičkih genetičkih marker gena. Kombinacijom molekularno-paleolimnoloških dostignuća mogu se obezbediti podaci koji bi mogli omogućiti rekonstrukciju istorijske biogeografske distribucije taksona i takođe njihovog odgovora na promene uslova u sredini (Savichtcheva i sar., 2011; Domaizon i sar., 2013). Scitonemin je utvrđen u površinskom sloju jezera na dubinama od 0-2 m (Florian, 2016), kao i u sedimentnom sloju Arktičkog jezera (Florian i sar., 2015) i Antarktičkog jezera (Verleyen i sar., 2005), gde je poslužio za analizu antropogene eutrofikacije i ekoloških promena u prošlosti. Takođe, postoje literaturni navodi o produkciji mikosporinu sličnih aminokiselina od strane drugih organizama i njihove upotrebe u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Njihovo prisustvo u sedimentu ukazuje na moguće korišćenje u analizama dijatom-vezanih organskih molekula kao indikatora sunčevog zračenja u prošlosti (Ingalls i sar., 2009). U marinskim sedimentima, mikosporinu slične aminokiseline se takođe ponašaju kao zapisnici ekoloških promena (Ingalls i sar., 2004). Ovi literaturni navodi ukazuju na značaj i potencijal sedimenata u vodenim ekosistemima kao arhivima promena nastalih UV zračenjem tokom prošlosti. Sve ovo ukazuje da scitonemin, mikosporinu slične aminokiseline, scitoneminu- i mikosporinu-slični metaboliti imaju potencijal da se koriste kao pouzdani geološki biomarkeri. Međutim, nedostajući su

literaturni navodi o korišćenju organskih molekula u paleoekološkoj i paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa.

Les je najdetaljniji terestrični arhiv regionalnih klimatskih i ekoloških promena u terestričnim sredinama, široko zastupljen, koji dopušta rekonstrukciju promena pejzaža nastalih klimatskim promenama tokom geološke istorije (Karimi i sar., 2011). Kako se uobičajni organski pokazatelji paleoklime jezerskih i marinskih sredina ne mogu koristiti u paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa, a fosili u lesnom depozitu su veoma retki ili gotovo potpuno degradirani (Guthrie, 1990; Sun i sar., 1997; Carter, 2000; Pigati i sar., 2010; Muhs i sar., 2014a) rekonstrukcija dinamike promena živog sveta u lesnim regionima je daleko teža (Wells i Stewart, 1987; Rousseau i Kukla, 1994; Rousseau i sar., 2000; Rossignol i sar., 2004; Muhs, 2013; Jones i sar., 2017). Brojni do sad korišćeni organski biomarkeri su nestabilni (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Vitek i sar., 2010) i degradiraju mikrobiološkom mineralizacijom i izlaganjem jakom sunčevom i UV zračenju (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Winter i sar., 2013), koji prevashodno karakterišu pustinje i predele u kojima preovladava les. Usled nedostataka tradicionalno korišćenih biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa (radioaktivni izotopi ugljenika, smole drveća, fitoliti, fosilizovan polen) i geohemijskih i fizičkih metoda (magnetina osetljivost i druge mineralne magnetne karakteristike) (Begét i sar., 1990; Sun i sar., 1997; Guo i sar., 2001; Bloemendal i Liu, 2005; Li i sar., 2016) poželjno je uvođenje novog pristupa u analizama lesa, odnosno otkriće novih indikatora-organizama/organskih molekula koji ostaju očuvani u uslovima jakog sunčevog i UV zračenja, isušivanja, nedostatka vode ili jakih vazdušnih strujanja. Mikroorganizmi (prvenstveno cijanobakterije) produktima metabolizma formiraju BLC koji su važne mikro-sredine u lesnim regionima. Stoga je analiza cijanobakterijskih sekundarnih metabolita od velikog značaja čime bi bila moguća rekonstrukcija klimatskih uslova u prošlosti. S obzirom na starost cijanobakterija, njihovu plastičnost, široku valencu rasprostiranja u habitatima najrazličitijih, ekstremnih karakteristika, sa produkcijom širokog spektra različitih sekundarnih metabolita, cijanobakterije predstavljaju odlične kandidate za istraživanje klimatskih i ekoloških uslova u prošlosti. Globalnim zagrevanjem i otopljanjem klime cijanobakterije se ekspanzivno šire (Meriluoto i sar., 2017) osvajajući nova prostranstva ostavljajući za sobom produkte metabolizma. Upravo njihova globalna distribucija na svim prostranstvima pruža mogućnost poređenja informacija i dobijanja sveobuhvatnije slike ekoloških uslova u prošlosti. Cijanobakterije postaju dominantne u nastupanju ekstremnih

sredinskih uslova (Golubic, 1991) u uslovima kada drugi organizmi podležu degradaciji, zahvaljujući brojnim adaptivnim karakteristikama koje se mogu koristiti kao indikatori ekoloških promena i u cilju paleoklimatske rekonstrukcije (Dachs i sar., 1998; Svirčev i sar., 2013). Korišćenje cijanobakterijama-specifičnih metabolita, očuvanih u sedimentu, dovoljno stabilnih u vremenu i prostoru u kombinaciji sa drugim komplementarnim pokazateljima klimatskih uslova, može omogućiti precizniju paleoklimatsku i paleoekološku rekonstrukciju.

Lesni sedimenti izgrađeni su od slojeva nastalih tokom istorije Zemlje pod uticajem klimatskih promena. Svaki sloj nosi sa sobom informacije o vladajućim klimatskim uslovima koji pravilnom analizom i tumačenjem pružaju rasvetljenje klimatskih uslova svakog specifičnog sloja odnosno vremenske ere nastanka datog sloja. Analize pigmenata svakog sloja daju informacije o vrstama koje su živele u periodu kada je sediment deponovan. Ovi zapisi su izuzetno dragoceni alati u istraživanju porekla života na Zemlji. Paleoekološka i paleoklimatska rekonstrukcija bazirana na molekularnim indikatorima, poput onih izvedenih iz biomarkera cijanobakterija, u lesnim depozitima predstavlja obećavajući način analize u istraživanju kvartara. Otkrivanje sekundarnih metabolita cijanobakterija dobro očuvanih u lesnom sedimentu mogu proširiti naše znanje o relativnim klimatskim uslovima koji su preovladavali u prošlosti i kako su se oni menjali u datom vremenskom periodu.

Istraživanjima u doktorskoj disertaciji uočeno je da fikobilini podležu degradaciji kako u prirodnim sredinama, tako i u uslovima delovanja bakterija, stoga su manje značajni sa stanovišta njihove upotrebe kao potencijalnih biomarkera. Iako je istraživanjima postignuta visoka stabilnost mikrocistina delovanjem tri bakterijska soja, toksičnost i produkcija cijanotoksina lesnih cijanobakterija nije utvrđena metodama korišćenim u doktoratu. Stoga se cijanotoksini ne mogu smatrati adekvatnim biomarkerima u geološkim istraživanjima. Međutim i u drugim studijama u prirodnim uslovima je pokazana stabilnost mikrocistina (Welker i Steinberg, 2000; Zastepa i sar., 2017) takođe i u jezerskim sedimentima (Holst i sar., 2003; Pawlik-Skowrońska i sar., 2010; Efting i sar., 2011; Kaczorowska i Kornijow, 2012). Iz tog razloga neophodno je primenom odgovarajućih analitičkih metoda za detekciju cijanotoksina u sedimentu proveriti ove rezultate pre iznošenja finalnog zaključka. Analizama obuhvaćenim doktorskom disertacijom utvrđena je visoka stabilnost MOSA i MOMA nakon delovanja abiotičkih i biotičkih faktora. Rezultati istraživanja predlažu rekonstrukciju paleoekološke i



paleoklimatske istorije vodenih i terestričnih sredina korišćenjem cijanobakterijskih biomarkera - MOSA i MOMA.

U paleoklimatskoj i paleoekološkoj rekonstrukciji veoma je važno izvesti korelaciju između određenih ekoloških faktora sa prisustvom specifičnih jedinjenja kao pokazatelja njihovog uticaja. AMMI model je podesan za analizu klimatskih uslova u prošlosti iz sedimentnih zapisa pigmenata cijanobakterija, odnosno za prepoznavanje biomarkera u paleoklimi. Komparativna analiza produkcije MOSA i MOMA korišćenjem AMMI modela omogućava poređenje između povoljnih (ili nepovoljnih) uslova i jasnu vizualizaciju za koje uslove se ovi metaboliti mogu smatrati biomarkerima. Zastupljenošću određene grupe metabolita se može govoriti o relativnim klimatskim uslovima određene vremenske ere, npr. vladali su uslovi jače insolacije ili viših temperatura što se dalje može koristiti u paleoklimi. Grafikon 57 prikazuje da je UV svetlost predstavljala povoljne uslove za dominantnu produkciju oba pigmenta. Produkcija MOSA je dominantna u uslovima delovanja UV svetlosti, u podlozi -N. Veća produkcija MOSA može biti pokazatelj sušnih uslova, s obzirom da je njegova izraženija produkcija vidljiva upravo kod vrsta izloženih jakoj suši kao i jakom sunčevom zračenju. Stoga se MOSA može smatrati reprezentativnim pokazateljem prisustva cijanobakterija u pustinjskim pokoricama i drugim sušnim regionima i može služiti kao biomarker u rekonstrukciji intenziteta UV zračenja. Za razliku od MOSA, kod MOMA faktori koji dovode do stimulacije sinteze su bili različitiji i podrazumevaju UV, temperaturu, pH i azot, generalno stresne uslove. Ovo ukazuje da pored izraženog uticaja UV svetlosti i azota na produkciju MOMA, ovi metaboliti se produkuju kao odgovor na stresne faktore u sredini i u prirodi njihova produkcija nastaje kao rezultat više korelisanih faktora. Očigledno veća koncentracija MOMA u određenom sloju sedimenta može pružiti informacije o naglom porastu lokalne temperature ili povećanog priliva organskih materija (azota) ili naglom prelasku u alkalne uslove sredine. Dobijeni rezultati pružaju mogućnost stvaranje specifične veze *ekološki uslovi-biomarker* koja se može pripisati ovim metabolitima.

Korišćenje ovih biomarkera pruža veće razumevanje taksona dominantnog u određenom vremenskom periodu i globalnih klimatskih uslova i kako su se oni promenili tokom vremena. Biomarkeri takođe mogu dati detaljne informacije vezane za poreklo određenog sloja ili čak i specifični izvor željenog biomarkera. Saznanjem kako MOSA i MOMA reaguju na UV zračenje, pH i temperaturu, i usled evidencije prisustva u uzorcima lesa i BLC, kao i zahvaljujući izraženju

stabilnosti, ovi metaboliti mogu služiti kao pouzdani BLC biomarkeri, razjašnjavajući ulogu cijanobakterija u procesu formiranja leša i u paleoklimatskoj, paleoekološkoj i paleovegetacijskoj rekonstrukciji. Takođe, s obzirom na koncentraciju MOMA u npr. uzorcima BLC 3 i BLC 4 može se izneti pretpostavka da je u datim regionima smanjen sadržaj organskih materija, kao i da u recentnom vremenu nije dolazilo do naglih, stresnih promena ekoloških faktora.

Nasuprot informacija dobijenih analizom BLC uzoraka, koji govore o trenutnim vladajućim uslovima, analizom lesnih slojeva možemo dobiti relativne podatke o regionalnim klimatskim uslovima tačno određene vremenske ere, zavisno od starosti datog lesnog nanosa. Tako npr. pigmentni sadržaj uzorka LES T5 ukazuje da su u toj vremenskoj etapi vladali slični klimatski uslovi, kada je u pitanju intenzitet UV zračenja i ostalih stresogenih ekoloških faktora, kao i u vreme nastanka lesnog sloja LES T25. Vrednosti obe grupe molekula su ujednačene u uzorcima LES T5 i LES T25. Takođe, ako se pogleda dalje, u vremenskom periodu koje oslikava sloj LES T20 niske koncentracije UZJS govore da je tada bila slaba insolacija i da uslovi nisu bili toliko sušni, ali da je došlo do znatnog priliva organskih materija, a time moguće i do pojave alkalnijih uslova tla. Dakle, najverovatnije su vladali periodi jakih kiša. Isto tako npr. sadržaj pigmentata sloja čije stanje odgovara uzorku LES T10 ukazuje da je u datom vremenskom periodu najverovatnije došlo do naglih klimatskih promena - pojačanog UV zračenja sinergizovanog sa povišenim temperaturama. Korišćenjem ovih biomarkera u paleoklimi ne dobijaju se apsolutne vrednosti parametara na osnovu kojih možemo da preciziramo klimatske i ekološke parametre, nego se ukazuje na relativne vrednosti poredeći različite vremenske periode. Nemoguće je apsolutno tvrditi da je nešto bilo suvo ili vlažno, sa jakim ili slabim UV zračenjem itd., već poređenjem različitih vremenskih perioda dobijamo informacije da li su periodi bili kiseli ili bazniji, hladniji ili topliji, siromašniji azotom ili bogatiji i tako dalje.

Korišćenjem cijanobakterijama specifičnih, geološki stabilnih derivata - biomarkera dobila bi se kvalitativna rekonstrukcija vladajućih klimatskih uslova, gde se o potpunijem scenariju određene epohe može govoriti korišćenjem informacija iz komplementarnih analiza, poput luminescencije, magnetne osetljivosti ili analize hemijskog sastava lesnih uzoraka. U kombinaciji sa podacima koje pružaju drugi paleoklimatski pokazatelji, analiza biomarkera bi mogla pružiti ključni uvid u odnose između prevladavajuće klime i uslova u sredini (Svirčev i sar., 2013). Sa kompleksnim sistemom poput klime na Zemlji, teško je predvideti buduće

klimatske promene i kako to može uticati na distribuciju biljaka i životinja, kao i celokupnog živog sveta. Fosilni, paleoklimatski zapisi pružaju korisne informacije koje se potom mogu integrisati sa zapažanjima o trenutnim klimatskim uslovima, objediniti i prikazati kroz kompjuterski program kako bi se izveli zaključci o uslovima u prošlosti i kako bi se predvideli klimatski uslovi u budućnosti. Razumevanje klimatskih uslova tokom prošlosti pomaže u objašnjavanju kako su trenutni ekosistemi nastali i koji su uslovi doveli do toga.

Ovakav pristup nam dozvoljava da poredimo dobijene informacije sa poznatim informacijama sa tih lokaliteta sa arheološkog aspekta, kao i sa aspekta drugih naučnih dostignuća. Ovo je takođe važno za novootkriveno prisustvo cijanotoksina u terestričnim sredinama, gde bi se retrospektivno pokazalo gde su se cijanobakterije pojavljivale, što se dalje može povezati sa informacijama iz drugih naučnih oblasti o datim lokalitetima.

Ovaj nov pristup može pružiti informacije i za analizu biološke evolucije, specijacije i izumiranja na Zemlji što bi moglo omogućiti bolje razumevanje ekoloških uslova i određenih ekoloških niša i antropogenih procesa, koji se javljaju na lokalnom i globalnom nivou (antropogena eutrofikacija, klimatske promene), i njihov uticaj na živi svet. Ukoliko cijanobakterije igraju ključnu ulogu u procesu formiranja lesa, to može dovesti do ponovnog razmatranja svih studija baziranih na biomarkerima organske prirode zbog izostavljenog proučavanja mogućeg doprinosa cijanobakterija. Dakle, n-alkani,  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^{15}\text{N}$  izotopi i slični pokazatelji korišćeni do sada (npr. Schatz i sar., 2011; Zech i sar., 2013; Obrecht i sar., 2014; Schreuder i sar., 2016) možda će morati ponovo da se ispituju zbog mogućeg uticaja cijanobakterija.

Biomarkeri cijanobakterija se mogu koristiti u rekonstrukciji pedogenskih procesa, u analizi ekstremofilnih mikroorganizama izolovanih iz BLC za rekonstrukciju klimatskih uslova i promena, kao i u proceni uloge pokorica u procesu formiranja eolskih lesnih sedimenata. Ovo bi nam pružilo bolje i preciznije objašnjenje o globalnoj geografskoj distribuciji cijanobakterija, posmatrajući efekte ekoloških uslova u prošlosti. Isto tako, postoji mogućnost korišćenja ovih metabolita kao biomarkera vanzemaljskog života u astrobiološkim istraživanjima (Ellery i Wynn-Williams, 2003; Jorge-Villar i sar., 2007; Varnali i sar., 2009), prvenstveno MOSA, s obzirom da je utvrđeno prisustvo scitonemina na stenama Atacama pustinje (Vítek i sar., 2010) i u Svalbardu (Norveška) (Jorge-Villar i sar., 2007) gde su uslovi analogni onima na Marsu.

Brojna su geološka istraživanja paleoekološke i paleoklimatske rekonstrukcije rađena analizom lesnih depozita Rume (npr. Marković i sar., 2004, 2005b, 2006; Vandenberghe i sar., 2014) i Titela (npr. Marković i sar., 2008a,b; Gavrilov i sar., 2009) paleopedološkim analizama morfologije, mineralogije, analizama čestica tla i karbonatnog sadržaja sedimenta, merenjem magnetne osetljivosti i primenom metode luminescencije. U tom smislu, veoma bi bilo interesantno uraditi dodatne analize cijanobakterijskih biomarkera svih dosadašnjih upotrebljenih uzoraka u kojima su urađena prethodna istraživanja.

Upotreba MOSA i MOMA kao biomarkera pruža nov pristup u kvalitativnoj rekonstrukciji semi-aridnih i aridnih regiona analizom lesnih sekvenci, što je imperativ u razumevanju uticaja promena klimatskih i ekoloških faktora u budućnosti. Kao visoko produktivne mikro-sredine, BLC uspostavljaju i kontrolišu neke osnovne fizičko-hemijske i geomorfološke procese poput pedoloških, hidroloških i eolskih procesa. U tom smislu, smatra se da lepljivi egzopolimeri, produkovani od strane cijanobakterija, na površini BLC igraju glavnu ulogu u akumulaciji čestica prašine i time iniciraju proces formiranja lesnog sedimenta (Svirčev i sar., 2013). Rezultati doktorske disertacije daju potvrdu o prisustvu cijanobakterijskih metabolita u lesu a time mogu pomoći da se podrži/dokaže BLOCDUST hipoteza o delimično biogenom poreklu lesa kako su obrazložili Svirčev i sar. (2013), a time dokaže veza između klime, bioloških lesnih pokorica i procesa formiranja lesa. Na taj način je, detekcijom prisustva MOSA i MOMA u lesu i biološkim lesnim pokoricama, potkrepljena i podržana postavka BLOCDUST hipoteze o prisustvu cijanobakterija u lesu, što ima poseban značaj na putu prevođenja ove hipoteze u teoriju. Predloženi scenario upotrebe sekundarnih metabolita cijanobakterija u paleoklimatskoj rekonstrukciji se može smatrati kao jedan od osnova za paleoklimatsku rekonstrukciju na lokalnom i regionalnom nivou. Razvoj novih, više kvalitativnih paleoklimatskih pokazatelja može inicirati novu eru lesnih istraživanja tokom naredne decenije. Verovatno je da će buduća istraživanja lesa pomoći razvijanju ovog novog pristupa i da će potreba za istraživanjem ovih organskih jedinjenja rasti u budućnosti.

## 5.5. Predlozi za poboljšanje istraživanja u budućnosti

Nakon iznošenja rezultata postignutih istraživanjima u okviru doktorske disertacije i značaja uvođenja novih biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji neophodno je naglasiti nedostatke i ukazati na moguće predloge za poboljšanje istraživanja u budućnosti.

S obzirom da je rezultatima prikazano da se MOSA i MOMA mogu koristiti kao biomarkeri cijanobakterija u paleoklimatskoj rekonstrukciji postoji potreba za razvojem pouzdanog postupka za njihovu detaljnu identifikaciju. U budućim istraživanjima bilo bi preporučljivo koristiti HPLC-DAD ili LC-MS(/MS) metode koji daju neprocenjiv doprinos u identifikaciji scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina, kao i specifičnih scitonemin- i mikosporin-ekvivalenata (Airs i sar., 2001; Squier i sar., 2002; Rastogi i Incharoensakdi, 2014b). Takav postupak je od velikog značaja prilikom analiziranja metabolita nepoznate strukture i porekla koji su spektralno i ekofiziološki slični scitoneminu i mikosporinu sličnim aminokiselinama. Kako su scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline tek u novije vreme postali fokus interesovanja naučnika evidentni su problemi postojanja i dostupnosti ogovarajućih standarda, čija priprema je veoma skupa i dugotrajna (Carreto i sar., 2005; Carreto i Carignan, 2011). Karakterizacija scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina se uglavnom vrši poređenjem retencionog vremena i apsorpcionog maksimuma (Belnap i sar., 2004; Zhang i sar., 2005; Pathak i sar., 2015; Rastogi i sar., 2016) sa podacima dostupnim u literaturi (npr. Klisch i Häder, 2002; Whitehead i Hedges, 2002, 2003; Rastogi i sar., 2013). Stoga se rezultati dobijeni ovim metodama moraju uzimati s oprezom (Bandaranayake i sar., 1996; Whitehead i sar., 2001; Whitehead i Hedges, 2002; Carreto i sar., 2005; Carreto i Carignan, 2011). Trenutno, korišćenje HPLC-DAD i LC-MS(/MS) metoda pruža samo dodatne informacije o specifičnom tipu pigmenta i nikako ne mogu biti korišćene kao jedine i kao osnova pri analizi pigmenata.

U doktorskoj disertaciji analiza produkcije i procena stabilnosti pigmenata je rađena spektrofotometrijskom metodom - tradicionalno korišćenom metodom za identifikaciju i kvantifikaciju pigmentnog sadržaja. Širok je spektar oblasti u kojima se koristi UV-Vis spektroskopska tehnika, s obzirom na kvantitativna određivanja i proveru čistoće (stabilnosti) uzorka (Hofmann, 2010), npr. u istraživačke svrhe, u kontroli kvaliteta i bezbednosti hrane, u menadžmentu i kontroli procesa... Nezamenljiva je metoda za identifikaciju prirodnih konjugovanih jedinjenja, kao što su: pigmenti, poliacetileni, porfirini, flavonoidi, itd.

Spektrofotometrija se tradicionalno koristi za analizu sadržaja hlorofila, karotenoida i fikobilina cijanobakterija nakon odgovarajućeg postupka ekstrakcije, bez dodatnih kvalitativnih analiza. Odabrana spektrofotometrijska metoda korišćena je u mnogobrojnim naučnim studijama kao jedini metod za detekciju i kvantifikaciju scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina (npr. Garcia-Pichel i Castenholz, 1992; 1993; Garcia-Pichel i sar., 1993; Brenowitz i Castenholz, 1997; Dillon i Castenholz, 1999; Dillon i sar., 2002; Fleming i Castenholz, 2007; 2008; Mushir i sar., 2014; Vítek i sar., 2014). Veoma važan podatak koji podržava ovakav analitički pristup se odnosi na izuzetnu jednostavnost metode i čak mogućnost njenog izvođenja prilikom terenskih istraživanja.

Glavni cilj doktorske disertacije je pružanje odgovora jesu li UV zaštitna jedinjenja iz scitonemin- i mikosporin-opsega pouzdani biomarkeri u geološkim istraživanjima. Sa stanovišta geoloških istraživanja veoma precizna karakterizacija pojedinačnih molekula nije krucijalna za deklarisanje datih molekula kao geoloških biomarkera. Bitno je da su analizirani molekuli produkti sekundarnog metabolizma cijanobakterija, da su stabilni na delovanje kako abiotičkih tako i biotičkih faktora i da su analitički merljivi, te stoga dobijeni podaci imaju veliki značaj u paleoklimi. U tu svrhu, bitne su ekofiziološke i apsorpcione karakteristike metabolita, a ne njihove kvalitativne karakteristike. Analizirane sekundarne metabolite (u doktorskoj disertaciji nazvane MOSA i MOMA) karakteriše isti apsorpcioni spektar karakterističan za scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline. Takođe je analizama utvrđeno da ovi metaboliti poseduju izraženu stabilnost prema UV svetlosti, što je upravo jedna od najvažnijih osobina scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina koji i nose naziv UV zaštitni pigmenti. I pored toga, kvalitativnom analizom MOSA korišćenjem LC-MS(/MS) metode je detektovano prisustvo scitonemina u 10 uzoraka (Poglavlje 4.1.4.), čime je nedvosmisleno dokazano prisustvo scitonemina. Na osnovu toga je dobijena potvrda da se ekstrahovani i spektrofotometrijski određeni MOSA mogu poistovetiti sa scitoneminom ili su vrlo srodni njima. Potencijal MOSA i MOMA kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji se smatra jednako korisnim kao i potencijal scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina, budući da im je produkcija u velikoj zavisnosti od faktora spoljašnje sredine i da im je struktura stabilna.

Takođe, prilikom korišćenja lesnog sedimenta u analizi paleoklime neophodno je uzeti u obzir da je les porozna stena i da kroz njega stalno prolazi voda. Stoga je u budućim

istraživanjima preporučljivo dodatnim analizama dokazati da se biomarkeri cijanobakterija iz lesnih slojeva ne ispiraju (npr. upotrebom izotopa C-ugljenika u n-alkanima).

## **6. ZAKLJUČCI**



Doktorska disertacija imala je za cilj da ispita potencijal sekundarnih metabolita cijanobakterija kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji. S obzirom na nedostupnost standarda scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina, a usled kompleksnosti molekula, teško je sa sigurnošću govoriti da su spektrofotometrijski analizirani molekuli scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline, stoga su u doktorskoj disertaciji uvedene nove skraćenice - MOSA (metaboliti u opsegu scitonemin apsorbanca) i MOMA (metaboliti u opsegu mikosporin apsorbanca). Ovi metaboliti su istih ekofizioloških i spektrofotometrijskih karakteristika kao i scitonemin, odnosno mikosporinu slične aminokiseline. Na osnovu istraživanja koja su sprovedena tokom izrade doktorske disertacije u periodu od 2010. do 2016. godine, mogu se potvrditi postavljeni ciljevi i zaključiti sledeće:

1. Rezultati dobijeni istraživanjem opisuju efekte pH, temperature i izvora svetlosti u korelaciji sa sadržajem azota na produkciju MOSA i MOMA vodenih i zemljišnih cijanobakterija korišćenjem AMMI modela koji pruža doprinos odabiru odgovarajućih biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Analizirani cijanobakterijski sojevi su pokazali značajan metabolički odgovor tokom tretmana različitim ekološkim faktorima. Analizom produkcije MOSA i MOMA 15 vodenih i zemljišnih cijanobakterija sposobnost produkcije MOSA je uočena kod 8, a MOMA kod svih 15 vodenih i zemljišnih sojeva. UV svetlost je imala najznačajniji uticaj na stimulaciju produkcije MOSA. Iako je UV svetlost dovela do najveće produkcije MOMA, produkcija ovih metabolita je takođe bila stimulirana različitim stresnim faktorima, uključujući pH, temperaturu i azot. Analizom produkcije pigmenata 19 lesnih cijanobakterija NSCCC prisustvo fikobilina i MOSA je uočeno u svim analiziranim kulturama, dok sposobnost produkcije MOMA nije uočena u dve kulture lesnih cijanobakterija NSCCC. Poredeći i procenjujući značaj MOSA i MOMA, prednost se može dati MOSA iz dva razloga: 1) MOSA produkuje sve istraživane lesne kulture, a MOMA većina; i 2) MOSA jasno ukazuje na prisustvo pojačanog UV zračenja, dok MOMA ukazuje generalno na prisustvo stresnih faktora. U tom smislu MOSA je univerzalniji i specifičniji metabolit od MOMA.

2. Procenom stabilnosti MOSA i MOMA delovanjem abiotičkih faktora (različitih pH i temperaturnih vrednosti podloge, različitog vremena izlaganja UV svetlosti) utvrđeno je da su MOSA i MOMA pokazali izraženu stabilnost na testirane abiotičke faktore i pokazali su potencijal za prezervaciju. Procenom stabilnosti pigmenata nakon delovanja biotičkih faktora

primetna je intenzivnija razgradnja ukupnih fikobilina posmatrano u zavisnosti od vremena, do postizanja potpune degradacije u pojedinim kulturama lesnih cijanobakterija, dok je uočeno da su MOSA i MOMA pokazali stabilnu strukturu i u testu biodegradabilnosti nije došlo do njihove degradacije. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su MOSA i MOMA mnogo podesniji za paleoklimatsku rekonstrukciju od fikobilina s obzirom da imaju postojaniju strukturu i da nisu degradirani tokom posmatranih stresnih uslova. Zbog specifične pojave u sredini i taksonomske pripadnosti cijanobakterijama, kao i visoke stabilnosti, MOSA i MOMA imaju izuzetan potencijal da se koriste kao cijanobakterijski biomarkeri u paleoklimatskoj rekonstrukciji.

3. Analizom prisustva MOSA i MOMA u lesnom sedimentu i biološkim lesnim pokoricama njihovo prisustvo je uočeno u svim analiziranim uzorcima, sa znatno izraženijom koncentracijom MOSA u uzorcima bioloških lesnih pokorica. Ovi rezultati dovode do zaključka da se MOSA mogu smatrati pouzdanim biomarkerima u lesnim sredinama, gde je usled nedostataka tradicionalno korišćenih metoda krucijalno uvođenje novih pristupa u kvalitativnoj paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa - kao terestričnog arhiva od neprocenjivog geološkog značaja. Utvrđivanjem prisustva MOSA i MOMA može se govoriti o relativnim klimatskim uslovima koji su vladali u prošlosti, u vremenskoj eri koju odgovarajući sloj sedimenta predstavlja.

4. Potencijal MOSA i MOMA kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji se smatra jednako korisnim kao i potencijal scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina, budući da im je produkcija u velikoj zavisnosti od faktora spoljašnje sredine i da im je struktura stabilna. I pored toga, kvalitativnom analizom MOSA LC-MS(/MS) metodom je detektovano prisustvo scitonemina u 10 uzoraka, čime je nedvosmisleno dokazano prisustvo scitonemina. Budući da je u ovoj doktorskoj disertaciji jasno pokazano kakve ekološke (klimatske) uslove oslikavaju metaboliti MOSA - u opsegu scitonemin apsorbance, a na koje ekološke faktore ukazuje prisustvo metabolita MOMA - u opsegu mikosporin apsorbance, nije toliko važno kako će se oni nazivati, koliko je bitno da se oni detektuju veoma jednostavnom i materijalno nezahtevnom metodom. Sa malim adaptacijama, ovom metodom se mogu analizirati metaboliti i na terenu, broj uzoraka je praktično neograničen jer su priprema i očitavanje uzoraka brzi i jednostavni, što

se nikako ne bi moglo postići analizama scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina kompleksnim i visoko sofisticiranim metodama.

5. Analizom toksičnosti i produkcije mikrocistina, cilindropermopsina i saksitoksina lesnih cijanobakterija NSCCC korišćenjem *Artemia salina* bioeseja, ELISA testa, LC-MS(/MS) i HPLC metoda dobijeni su negativni rezultati. Procenom stabilnosti mikrocistina referentnog soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, uočena je njegoova izrazita stabilnost tokom vremenskog perioda posmatranja u kontrolnim uslovima i delovanjem tri različita soja bakterija izolovanih iz bioloških lesnih pokorica. S obzirom da nedostaju odgovarajuće, validne metode detekcije cijanotoksina poreklom iz terestričnih sredina, a da je većina detektovanih rodova poznata kao toksin-produkujuća, neophodne su dodatne analize pre iznošenja finalnog zaključka. Na osnovu navedenog može se zaključiti da usled nemogućnosti detekcije cijanotoksina lesnih cijanobakterija, i pored stabilnosti mikrocistina referentnog soja, cijanotoksini se ne mogu smatrati adekvatnim biomarkerima cijanobakterija u geološkim istraživanjima.

6. Istraživanjima u doktorskoj disertaciji je po prvi put urađena analiza i detekcija prisustva MOSA i MOMA u lesu i biološkim lesnim pokoricama, čime je data potvrda o prisustvu cijanobakterija u lesu pružajući dokaze postavljene BLOCDUST hipoteze za opravdano povezivanje bio- (BLOC - *Biological LOess Crust*, biološke lesne pokorice) i geo-komponente (DUST - prašina) u procesu formiranja lesa. Na taj način je ovom doktorskom disertacijom potkrepljena i podržana postavka BLOCDUST hipoteze, što ima poseban značaj na putu prevođenja ove hipoteze u teoriju.

7. Predloženi scenario upotrebe sekundarnih metabolita cijanobakterija u paleoklimatskoj rekonstrukciji se može smatrati kao jedan od osnova za paleoklimatsku rekonstrukciju na lokalnom i regionalnom nivou, i za razvijanje novih biomarkera u lesnim sredinama. Rezultati doktorske disertacije bi se mogli koristiti u smislu dokazivanja biološkog značaja u procesu formiranja lesa, i dokazivanje veze između klime, bioloških lesnih pokorica i procesa formiranja lesa. Predloženi scenario se može smatrati inovativnim u paleoklimatskoj rekonstrukciji, a razvoj novih, kvalitativnih paleoklimatskih pokazatelja može inicirati novu eru lesnih istraživanja u budućnosti.

## **7. L I T E R A T U R A**

1. Abed, R.M.M., Kohls, K., Schoon, R., Scherf, A.-K., Schacht, M., Palinska, K.A., Al-Hassani, H., Hamza, W., Rullkötter, J., Golubic, S. (2008): Lipid biomarkers, pigments and cyanobacterial diversity of microbial mats across intertidal flats of the arid coast of the Arabian Gulf (Abu Dhabi, UAE). *FEMS Microbiol Ecology* 65(3): 449-462.
2. Adamski, M., Żmudzki, P., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Zabaglo, K., Latkowska, E., Bialczyk, J. (2016): Effect of pH and temperature on the stability of cylindrospermopsin. Characterization of decomposition products. *Algal Research* 15: 129–134.
3. Airs, R.L., Atkinson, J.E., Keely, B.J. (2001): Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *J. Chromatogr. A* 917(1-2): 167-177.
4. Ambrož, V. (1947): The highland loesses. *Sbor. Stát. geol. Úst.* 14: 255-280 (in Czech).
5. Amsler, C.D. (Ed.) (2007): *Algal Chemical Ecology*. Springer Science & Business Media, pp. 1-313.
6. Antoine, P., Rousseau, D.D., Zöller, L., Lang, A., Munaut, A.V., Hatte, C., Fontugne, M. (2001): High-resolution record of the last interglacial–glacial cycle in the Nussloch loess–palaeosol sequences, Upper Rhine Area, Germany. *Quaternary International* 76-77(1): 211-229.
7. Antoine, P., Rousseau, D.D., Moine, O., Kunesch, S., Hatté, C., Lang, A., Tissoux, H., Zöller, L., (2009): Rapid and cyclic aeolian deposition during the Last Glacial in European loess: a high resolution record from Nussloch, Germany. *Quaternary Science Reviews* 28: 2955-2973.
8. Andersson, M., Karlsson, O., Banack, S.A., Brandt, I. (2016): Transfer of developmental neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) via milk to nursed offspring: Studies by mass spectrometry and image analysis. *Toxicology Letters* 258: 108-114.
9. Arai, T., Nishijima, M., Adachi, K., Sano, H. (1992): Isolation and structure of a UV absorbing substance from the marine bacterium *Micrococcus* sp. AK-334. *Marine Biotechnology Institute Tokyo* pp: 88-94.
10. Aráoz, R., Häder, D.-P. (1997): Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. *FEMS Microbiology Ecology* 23: 301-313.
11. Arnold, D.E. (1971): Ingestion, assimilation, survival and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.* 1: 906-920.
12. Assay, G., Akin-Oriola, A., Lawton, L.A. (2006): The detection and quantification of cyanobacterial toxins in water using the Brine Shrimp (*Artemia salina*). *West Africa Journal of Applied Ecology (WAJAE)* 9, paper 16 of 18. ISSN: 0855-4307
13. AWWA (American Water Works Association) (2011): *Algae: Source to Treatment*. Volume 57 of AWWA manual: American Water Works Association, pp. 1-439.
14. Babić, O., Simeunović, J., Škrbić, N., Kovač, D., Svirčev, Z. (2013): Detection of phosphatase activity in aquatic and terrestrial cyanobacterial strains. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 125: 31-42.

15. Babu, P., Chandel, A.K., Singh, O.V. (2014): Extremophiles and their applications in medical processes. Springer, pp. 54.
16. Baier, K., Lehmann, H., Stephan, D.P., Lockau, W. (2004): NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. *Microbiology* 150: 2739-2749.
17. Ballot, A. (2004): Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya--Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research* 26: 925-935.
18. Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005): Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4: 139-150.
19. Balskus, E.P., Walsh, C.T. (2008): Investigating the initial steps in the biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 15260-15261.
20. Balskus, E.P., Rebecca, J.C., Walsh, C.T. (2011): The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiology Ecology* 77(2): 322-332.
21. Bandaranayake, W.M., Bemis, J.E., Bourne, D.J. (1996): Ultraviolet absorbing pigments from the marine sponge *Dysidea herbacca*: Isolation and structure of a new mycosporine. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacology, toxicology and endocrinology* 115: 281-286.
22. Bandaranayake, W.M. (1998): Mycosporines: are they nature's sunscreens. *Natural Product Reports* 15(2): 159-172.
23. Barbosa, A.B. (2009): Dynamics of living phytoplankton: implications for paleoenvironmental reconstructions. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing 5(1): pp. 012001.
24. Beattie, K.A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S. (2003): Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic Toxicology* 62(3): 219-226.
25. Begét, J.E., Stone, D.B., Hawkins, D.B. (1990): Paleoclimatic forcing of magnetic susceptibility variations in Alaskan loess during the Quaternary. *Geology* 18: 40-43.
26. Belnap, J., Gardner, J.S. (1993): Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Great Basin Naturalist* 53: 40-47.
27. Belnap, J., Lange, O.I. (Eds.) (2001): *Biological soil crusts: structure, function, and management*. *Ecological Studies* 150: 202-215.
28. Belnap, J., Kaltenecker, J.H., Rosentreter, R., Williams, J., Leonard, S., Eldridge, D. (2001): *Biological soil crusts: ecology and management*. Technical Reference 1730-2. United States Department of the Interior Bureau of Land Management. Denver.
29. Belnap, J. (2003): Biological soil crusts and wind erosion. In: Belnap, J., Lange, O.L. (Eds.), *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 339-347.
30. Belnap, J., Büdel, B., Lange, O.L. (2003): Biological soil crust: Characteristics and distribution. In: Belnap, J., Lange, O.L. (Eds.), *Biological soil crusts: structure, function and management*. Springer, Berlin, pp. 3-30.
31. Belnap, J., Phillips, S.L., Miller, M.E. (2004): Response of desert biological soil crusts to alterations in precipitation frequency. *Oecologia* 141: 306-316.

32. Belnap, J. (2006): The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological Processes* 20(15): 3159-3178.
33. Belnap, J., Phillips, S.L., Flint, S., Money, J., Caldwell, M. (2008): Global change and biological soil crusts: effects of ultraviolet augmentation under altered precipitation regimes and nitrogen additions. *Global Change Biology* 14: 670-686.
34. Beltran, E.C., Neilan, B.A. (2000): Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Applied Environmental Microbiology* 66: 4468-4474.
35. Bennett, A., Bogorod, L. (1973): Complementary chromatic adaptation in filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419-435.
36. Berg, L.S. (1916): The origin of loess. *Izvestiya Russkogo Geograficheskogo Obshchestva* 52: 579-646 (in Russian).
37. Berg, M., Sutula, M. (2015): Factors affecting the growth of cyanobacteria with special emphasis on the Sacramento-San Joaquin Delta. Southern California Coastal Water Research Project Technical Report 869.
38. Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N., Stal, L.J. (1997): N<sub>2</sub> Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 19(3): 139-185.
39. Berry, J.P., Lind, O. (2010): First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon* 55: 930-938.
40. Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., Yongding, L. (2008): A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *J Environ Manage.* 86(3): 566-574.
41. Bigler, C., Grahn, E., Larocque, I., Jeziorski, A., Hall, R. (2003): Holocene environmental change at Lake Njulla (999 m asl), northern Sweden: a comparison with four small nearby lakes along an altitudinal gradient. *Journal of Paleolimnology* 29: 13-29.
42. Birks, H.J.B., Birks, H.H. (1980): *Quaternary palaeoecology*. Edward Arnold Publisher, London. ISBN 10: 0713127813
43. Birks, H.H., Birks, H.J.B. (2006): Multi-proxy studies in palaeolimnology. *Vegetation History and Archaeobotany* 15: 235-251.
44. Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B. (2009): Toxins produced in cyanobacterial water bloom—toxicity and risks. *Interdiscip Toxicol* 2: 36-41.
45. 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.
46. Blaženčić, J. (1997): *Sistematika algi*. NNK, Beograd.
47. Blaženčić, J. (2000): *Sistematika algi*. NNK International, Beograd.
48. Blaženčić, J. (2007): *Sistematika algi*. NNK international, pp. 298. ISBN 978-86-83635-67-2
49. Blinnikov, M., Busacca, A., Whitlock, C. (2002): Reconstruction of the Late Pleistocene grassland of the Columbia Basin, Washington, USA, based on phytolith records in loess. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177: 77-101.

50. Bloemendal, J., Liu, X.M. (2005): Rock magnetism and geochemistry of two Plio–Pleistocene Chinese loess–palaeosol sequences—implications for quantitative palaeoprecipitation reconstruction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 226: 149-166.
51. Bokhorst, M.P., Beets, C.J., Marković, S.B., Gerasimenko, N.P., Matviishina, Z.N., Frechen, M. (2009): Pedo-chemical climate proxies in Late Pleistocene Serbian-Ukrainian loess sequences. *Quaternary International* 198: 113-123.
52. Bokhorst, M.P., Vandenberghe, J., Sümegei, P., Łanczont, M., Gerasimenko, N.P., Matviishina, Z.N., Marković, S.B., Frechen, M. (2011): Atmospheric circulation patterns in central and eastern Europe during the Weichselian Pleniglacial inferred from loess grain-size records. *Quaternary International* 234: 62-74.
53. Bolesnikov, M. (2014): Stabilnost fikobilinskih pigmenta cijanobakterija kao biomarkera. Master rad, Univerzitet u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju.
54. Borges, H., Branco, L., Martins, M., Lima, C., Barbosa, P., Lira, G., Bittencourt-Oliveira, M.C., Molica, R.J.R. (2015): Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil. *Harmful Algae* 43: 46-57.
55. Borowitzka, M.A. (1999): Commercial applications of algae. 8th International Conference on Applied Algology. Montecatini Terme, Italy. Book of Abstracts: pp. 129.
56. Botes, D.P., Kruger, H., Viljoen, C.C. (1982a): Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 20: 945-954.
57. Botes, D.P., Viljoen, C.C., Kruger, H., Wessels, P.L., Williams, D.H. (1982b): Configuration assignments of the amino acid residues and the presence of N-methyl dehydroalanine in toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 2747-2748.
58. Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., van de Venter, M., Shephard, E.G. (2004): The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCO<sub>2</sub> cells. *Toxicon* 43: 85-92.
59. Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L., Jones, A., Negri, A.P., Riddles, P. (1996): Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4086-4094.
60. Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J., Smith, W., Blakeley, R.L. (2001): Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology* 16(6): 523-534.
61. Bradley, R.S., Jones, P.D. (Eds.) (1992): *Climate since AD 1500*. London: Routledge.
62. Brenowitz, S., Castenholz, R.W. (1997): Long-term effects of UV and visible irradiance on natural populations of a scytonemin-containing cyanobacterium (*Calothrix* sp.). *FEMS Microbiology Ecology* 24: 343-352.
63. Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.-F. (2003): Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34: 361-377.
64. Brock, T.D. (1973): Evolutionary and ecological aspects of the cyanophytes. In: Carr, N.G., Whitton, B.A. (Eds.), *The Biology of Blue-Green Algae*. Blackwell, Oxford, pp. 487-500.



65. Brocks, J.J., Buick, R., Logan, G.A., Summons, R.E. (2003): Molecular fossils in Archean rocks II: Composition, thermal maturity and integrity of hydrocarbons extracted from sedimentary rocks of the 2.78 - 2.45 billion years old Mount Bruce Supergroup, Pilbara Craton, Western Australia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 4289-4319.
66. Büdel, B., Karsten, U., Garcia-Pichel, F. (1997): Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporine-like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 112: 165-172.
67. Bush, A.B.G., Little, E.C., Rokosh, D., White, D., Rutter, N.W. (2004): Investigation of the spatio-temporal variability in Eurasian Late Quaternary loess–paleosol sequences using a coupled atmosphere–ocean general circulation model. *Quaternary Science Reviews* 23(3-4): 481-498.
68. Campbell, S.E. (1977): Desert Crust of Utah: an aridity adapted algal mat community. 16th Algal Symposium. Woods Hole, Massachusetts, pp. 11.
69. Campbell, D.L., Lawton, L.A., Beattie, K.A., Codd, G.A. (1994): Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and *Microtox* assay to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 71-77.
70. Cantonati, M., Guella, G., Komárek, J., Spitale, D. (2014a): Depth distribution of epilithic cyanobacteria and pigments in a mountain lake characterized by marked water-level fluctuations. *Freshwater Science* 33(2): 537-547.
71. Cantonati, M., Komárek, J., Hernández-Mariné, M., Angeli, N. (2014b): New and poorly known coccoid species (Cyanoprokaryota) from the mid-depth and deep epilithon of a carbonate mountain lake. *Freshwater Science* 33: 548-556.
72. Carey, C.C., Haney, J.F., Cottingham, K.L. (2007): First report of microcystin-LR in the cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. *Environmental Toxicology* 22: 337-339.
73. Carreto, J.I., Carignan, M.O., Montoya, N.G. (2005): A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146: 236-252.
74. Carreto, J.I., Carignan, M.O. (2011): Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. *Chemical and Ecological Aspects. Marine Drugs* 9: 387-446.
75. Carmichael, W.W., Gorham, P. (1978): Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of Western Canada. *Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Limnologie* 21: 285-295.
76. Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G. (1990): Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Hall, S., Strichartz, G. (Eds.), *Marine toxins: origin, structure, and molecular pharmacology*. American Chemical Society, Washington DC, pp. 87-106.
77. Carmichael, W.W. (1992): Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72(6): 445-459.
78. Carmichael, W.W., Falconer, I.R. (1993): *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press. London.
79. Carmichael, W.W., Li, R. (2006): Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Systems* 2: 5; doi:10.1186/1746-1448-2-5
80. Carmichael, W.W., Boyer, G.L. (2016): Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae* 54: 194-212.

81. Carter, J.A. (2000): Phytoliths from loess in Southland, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 38: 325-332.
82. Castaneda, I.S., Schouten, S. (2011): A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quaternary Sciences Reviews* 30(21-22): 2851-2891.
83. Castenholz, R.W. (1997): Multiple strategies for UV tolerance in cyanobacteria. *Spectrum* 10: 10-16.
84. Castenholz, R.W. (2015): Cyanobacteria/Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. pp. 1-4. DOI: 10.1002/9781118960608.cbm00020.
85. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Bunnag, B. (2012): Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochem.* 47: 659-664.
86. Chartes, C.J. (1992): Soil crusting in Australia. In: Sumner, M.E., Stewart, B.A. (Eds.), *Soil Crusting: Chemical and Physical Processes*. Lewis Publishers: Boca Raton, pp. 339-365.
87. Chatziefthimiou, A.D., Richer, R., Rowles, H., Powell, J.T., Metcalf, J.S. (2014): Cyanotoxin as a potential cause of dog poisonings in desert environments. *Veterinary Rec.* 174(19): 484-485.
88. Chatziefthimiou, A.D., Metcalf, J.S., Glover, W.B., Banack, S.A., Dargham, S.R., Richer, R.A. (2016): Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicon* 114: 75-84.
89. Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z. (2004): Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43: 393-400.
90. Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L. (2006a): Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environ. Pollut.* 144(3): 752-758.
91. Chen, W., Li, L., Gan, N., Song, L. (2006b): Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments. *Environmental Pollution* 143: 241-246.
92. Chen, W., Song, L., Peng, L., Wan, N., Zhang, X., Gan, N. (2008): Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: water and sediment-interface contributions. *Water Research* 42: 763-773.
93. Chen, W., Jia, Y., Li, E., Zhao, S., Zhou, Q., Liu, L., Song, L. (2012): Soil-based treatments of mechanically collected cyanobacterial blooms from Lake Taihu: efficiencies and potential risks. *Environmental Science and Technology* 46(24): 13370-13376.
94. Chen, L., Chen, J., Zhang, X., Xie, P. (2015): A review of reproductive toxicity of microcystins. *Journal of Hazardous Materials* 301: 381-399.
95. 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 raciborski*: effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology* 14: 155-161.

96. Chorus, I., Bartram, J. (Eds.) (1999): Toxic cyanobacteria in water: A guide for their public health consequences, monitoring and management. Published on behalf of WHO by E&FN Spon, London, New York.
97. Christaki, E., Karatzia, M., Bonos, E., Florou-Paneri, P., Karatzias, C. (2012): Effect of dietary *Spirulina platensis* on milk fatty acid profile of dairy cows. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 597-604.
98. Christiansen, G., Molitor, C., Philmus, B., Kurmayer, R. (2008): Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1695-1704.
99. Christy, J.R., Clarke, R.A., Gruza, G.V., Jouzel, J., Mann, M.E., Oerlemans, J., Salinger, M.J., Wang, S.-W. (2001): In: Hallgren, R., Nyenzi, B. (Eds.), *Climate Change: Chapter 2.3.2.1 Palaeoclimate proxy indicators*. IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change. (<https://www.ipcc.ch/ipccreports/tar/wg1/068.htm>)
100. Cilek, V. (2001): The loess deposits of the Bohemian Massif: silt provenance, palaeometeorology and loessification processes. *Quaternary International* 76: 123-128.
101. 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.
102. Cockell, C.S. (1998): Biological effects of high ultraviolet radiation on early Earth. A theoretical evaluation. *Journal of Theoretical Biology* 193: 717-729.
103. Cockell, C.S., Knowland, J. (1999): Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews* 74: 311-345.
104. Codd, G.A., Ward, C.J., Bell, S.G. (1997): Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. *Arch Toxicol Suppl* 19: 399-410.
105. Codd, G.A., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K.A., Metcalf, J.S. (1999): Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology* 34: 405-415.
106. Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. (2005): Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 203: 264-272.
107. Cohen-Bazire, G., Bryant, D.A. (1982): Phycobilisomes: composition and structure. In: Carr, N.G., Whitton, B.A. (Eds.), *The biology of cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 143-190.
108. Comte, K., Sabacká, M., Carré-Malouka, A., Elster, J., Komárek, J. (2007): Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 366-376.
109. Conde, F.R., Churio, M.S., Previtali, C.M. (2000): The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. excited-state properties and photostability of porphyrin-334 in aqueous solution. *J Photochem Photobiol B Biol* 56: 139-144.
110. Cook, P.L.M., Jennings, M., Holland, D.P., Beardall, J., Briles, C., Zawadzki, A., Doan, P., Mills, K., Gell, P. (2016): Blooms of cyanobacteria in a temperate Australian lagoon system post and prior to European settlement. *Biogeosciences* 13: 3677-3686.
111. Coolen, M.J.L. (2004): Environmental controls on present and past microbial diversity as revealed by extant and fossil DNA from Antarctic Ace Lake and Ellis Fjord. The Netherlands Organisation for Scientific Research, Project number 851.20.020.

112. Coolen, M.J.L., Muyzera, G., Rijpstra, W.I-C., Schoutena, S., Volkman, J.K., Sinnighe Damsté, J.S. (2004): Combined DNA and lipid analyses of sediments reveal changes in Holocene haptophyte and diatom populations in an Antarctic lake. *Earth and Planetary Science Letters* 223: 225-239.
113. Corbel, S., Bouaïcha, N., Mougin, C. (2014a): Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil. *Environ Chem Lett.* 12(4): 535-541.
114. Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N. (2014b): Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere.* 96: 1-15.
115. Corbel, S., Mougin, C., Nélieu, S., Delarue, G., Bouaïcha, N. (2016): Evaluation of the transfer and the accumulation of microcystins in tomato (*Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom) tissues using a cyanobacterial extract containing microcystins and the radiolabeled microcystin-LR (14C-MC-LR). *Sci Total Environ.* 541: 1052-1058.
116. Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A., Sutton, A. (1996): Biodegradation of microcystins-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Research* 30(2): 481-485.
117. Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B. (2005): Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *PNAS* 102: 5074-5078.
118. Cox, P.A., Richer, R., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Codd, G.A., Bradley, W.G. (2009): Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler* 10: 109-117.
119. Dachs, J., Bayona, J.M., Fowler, S.W., Miquel, J.C., Albaigés, J. (1998): Evidence for cyanobacterial inputs and heterotrophic alteration of lipids in sinking particles in the Alboran Sea (SW Mediterranean). *Marine Chemistry* 60: 189-201.
120. Danin, A., Yaalon, D.H. (1980): Trapping of silt and clay by lichens and bryophytes in the desert environment of the Dead Sea region. *Bat Sheva Seminar on Approaches and Methods in Paleoclimatic Research with Emphasis on Aridic Areas.* Jerusalem, Israel, pp. 32.
121. Danin, A., Bor-Or, Y., Dor, I., Yisraeli, T. (1989): The role of cyanobacteria in stabilization of sand dunes in southern Israel. *Ecologia Meriterranea* 15: 55-64.
122. Danladi, I.B., Salihoglu, R., Añ-n, Z.B., Akñ-ñer-ñ-n, S. (2016): High-resolution multi proxy evidences of climate changes during the past 1400 years from Lake Salda sediment records (SW Turkey). *Medclivar 2016 Conference, University of Athens Athens, Greece, 26-30 September 2016.*
123. Dawson, R. (1998): The toxicology of microcystins. *Toxicon.* 36(7): 953-962.
124. De la Cruz, A.A., Antoniou, M.G., Pelaez, M., Hiskia, A., Song, W., O'Shea, K.E., He, X., Dionysiou, D.D. (2011): Can we effectively degrade microcystins? - Implications for impact on human health status. *Anticancer Agents Med. Chem.* 11(1): 19-37.
125. Del Campo, J.A., Vargas, M.A., Moreno, J., Rodriguez, H., Rivas, J., Guerrero, M.G. (2002): Astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* grown in continuous culture. *1st Congress of the International Society for Applied Phycology. Almeria, Spain. Book of Abstracts: pp. 101.*

126. Derbyshire, E., Kemp, R.A., Meng, X. (1997): Climate change, loess and palaeosols: proxy measures and resolution in North China. *Journal of the Geological Society* 154: 793-805.
127. Derbyshire, E. (2001): Geological hazards in loess terrain, with particular reference to the loess regions of China. *Earth-Science Reviews* 54: 231-260.
128. Deshpande, B.N., Tremblay, R., Pienitz, R., Vincent, W.F. (2014): Sedimentary pigments as indicators of cyanobacterial dynamics in a hypereutrophic lake. *Journal of Paleolimnology* 52: 171-184.
129. Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, M.R., Pike, R.K., Stavric, B. (1977): Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NCR-44h. *Canadian Journal of Chemistry* 55: 1367-1371.
130. Dillon, J., Castenholz, R. (1999): Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UVC irradiation: implications for early photosynthetic life. *Journal of Phycology* 35: 673-681.
131. Dillon, J.G., Tatsumi, C.M., Tandingan, P.G., Castenholz, R.W. (2002): Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.). *Archives of Microbiology* 177: 322-331.
132. Dillon, J.G., Castenholz, R.W. (2003): The synthesis of the UV-screening pigment, scytonemin, and photosynthetic performance in isolates from closely related natural populations of cyanobacteria (*Calothrix* sp.). *Environmental Microbiology* 5(6): 484-491.
133. Ding, Z.L., Derbyshire, E., Yang, S.L., Yu, Z.W., Xiong, S.F., Liu, T.S. (2002): Stacked 2.6 Ma grain size record from the Chinese loess based on five sections and correlation with the deep sea delta 18 O record. *Paleoceanography* 17: 1-21.
134. Ding, Z.L., Ranov, V., Yang, S.L., Finaev, A., Han, J.M., Wang, G.A. (2002a): The loess record in southern Tajikistan and correlation with Chinese loess. *Earth and Planetary Science Letters* 200: 387-400.
135. Ding, Z.L., Derbyshire, E., Yang, S.L., Sun, J.M., Liu, T.S. (2005): Stepwise expansion of desert environment across northern China in the past 3.5 Ma and implications for monsoon evolution. *Earth and Planetary Science Letters* 237: 45-55.
136. Domaizon, I., Savichtcheva, O., Debroas, D., Arnaud, F., Villar, C., Pignol, C., Alric, B., Perga, M.E. (2013): DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. *Biogeosciences* 10: 3817-3838.
137. Donkor, V.A., Häder, D.-P. (1996): Effects of ultraviolet irradiation on photosynthetic pigments in some filamentous cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 11: 143-149.
138. Donkor, V.A., Häder, D.-P. (1997): Ultraviolet radiation effects on pigmentation in the cyanobacterium *Phormidium uncinatum*. *Acta Protozoologica* 36: 49-55.
139. Dor, I., Danin, A. (1996): Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. *Arch. hydrobiol. Suppl.* 117, *Algological Studies* 83: 197-206.
140. dos S Vieira, J.M., de P Azevedo, M.T., de Oliveira Azevedo, S.M.F., Honda, R.Y., Corrêa, B. (2003): Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (*Chroococcales*, *Cyanobacteria*) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 42: 709-713.
141. Dulić, T., Meriluoto, J., Palanački Malešević, T., Gajić, V., Važić, T., Tokodi, N., Obreht, I., Kostić, B., Kosijer, P., Khormali, F., Svirčev, Z. (2017): Cyanobacterial

- diversity and toxicity of biocrusts from the Caspian Lowland loess deposits, North Iran. *Quaternary International* 425 (part B): 74-85.
142. Duy, T.N., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Connell, D.W. (2000): Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 163: 113-185.
  143. Edwards, H.G.M., Moody, C.D., Jorge Villar, S.E., Wynn-Williams, D.D. (2005): Raman spectroscopic detection of key biomarkers of cyanobacteria and lichen symbiosis in extreme Antarctic habitats: Evaluation for Mars Lander missions. *Icarus* 174: 560-571.
  144. Edwards, C., Graham, D., Fowler, N., Lawton, L.A. (2008): Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* 73: 1315-1321.
  145. Efting, A.A., Snow, D.D., Fritz, S.C. (2011): Cyanobacteria and microcystin in the Nebraska (USA) Sand Hills Lakes fore and after modern agriculture. *Journal of Paleolimnology* 46: 17-27.
  146. Eganhouse, R.P. (Ed.) (1997): *Molecular Markers in Environmental Geochemistry*. – ACS Symposium Series 671, Washington, DC
  147. Eglinton, T.I., Eglinton, G. (2008): Molecular proxies for paleoclimatology. *Earth and Planetary Science Letters* 275: 1-16.
  148. Ehling-Schulz, M., Bilger, W., Scherer, S. (1997): UV-B-Induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology* 179(6): 1940-1945.
  149. Ehling-Schulz, M., Scherer, S. (1999): UV Protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 329-338.
  150. Ellery, A., Wynn-Williams, D. (2003): Why Raman spectroscopy on Mars?—a case of the right tool for the right job. *Astrobiology* 3: 565-579.
  151. Eynard, F., Mez, K., Walther, J.L. (2000): Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). *Water Research* 34(11): 2979-2988.
  152. Fabbro, L.D., Duivenvoorden, L.J. (2000): A two-part model linking multidimensional environmental gradients and seasonal succession of phytoplankton assemblages. *Hydrobiologia* 438: 13-24.
  153. Falconer, I.R. (2005): Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 33(1): 64-71.
  154. Falconer, I.R. (2008): Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 607-612.
  155. Fawell, J.K., James, H.A. (1994): Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of anatoxin-a and a method for its determination in reservoir water. FWR Report No. FR0434/DoE 3728, Foundation of Water Res, Marlow, UK.
  156. Fawell, J.K., James, C.P., James, H.A. (1994): Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. *Water Res Centre: Medmenham, UK*, 1-46.
  157. Ferran, G.P., López-Cortés, A., Nübel, U. (2001): Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1902-1910.

158. Ferroni, L., Klisch, M., Pancaldi, S., Häder, D.P. (2010): Complementary UV-absorption of mycosporine-like amino acids and scytonemin is responsible for the UV-insensitivity of photosynthesis in *Nostoc flagelliforme*. *Marine Drugs* 8: 106-121.
159. Fiore, M.F., Genuário, D.B., da Silva, C.S.P., Shishido, T.K., Moraes, L.A.B., Cantúcio Neto, R., Silva-Stenico, M.E. (2009): Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. *Toxicon* 53: 754-761.
160. Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Goncalves, F.J., Pereira, M.J. (2004): Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59(2): 151.
161. Fisher, M., Häder, D.-P. (1992): UV effects on photosynthesis and phycobiliprotein composition in the flagellate *Cyanophora paradoxa*. *FEMS Microbial Ecology* 101: 121-131.
162. Fitzgeorge, R.B., Clark, S.A., Keevil, C.W. (1994): Routes of intoxication. In: Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W., Potter, E. (Eds.), *Detection methods for cyanobacterial toxins*. RSC, Cambridge, pp. 69-74.
163. Fitzsimmons, K.E., Marković, S.B., Hambach, U. (2012): Pleistocene environmental dynamics recorded in the loess of the middle and lower Danube basin. *Quaternary Science Reviews* 41: 104-118.
164. Flechtner, V.R., Johansen, J.R., Belnap, J. (2008): The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist* 68(4): 405-436.
165. Fleming, E.D., Castenholz, R.W. (2007): Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 9: 1448-1455.
166. Fleming, E.D., Castenholz, R.W. (2008): Effects of nitrogen source on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *FEMS Microbiol Ecol* 63: 301-308.
167. Flores, E., Wolk, C.P. (1986): Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. *Arch Microbiology* 145: 215-219.
168. Florian, C.R., Miller, G.H., Fogel, M.L., Wolfe, A.P., Vinebrooke, R.D., Geirsdóttir, A. (2015): Algal pigments in Arctic lake sediments record biogeochemical changes due to Holocene climate variability and anthropogenic global change. *Journal of Paleolimnology* 54: 53-69.
169. Florian, C.R. (2016): Multi-Proxy reconstructions of Holocene environmental change and catchment biogeochemistry using algal pigments and stable isotopes preserved in Lake Sediment from Baffin Island and Iceland. PhD dissertation, Faculty of Earth Sciences, University of Iceland.
170. Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P., Walsby, A.E. (1973): *The Blue-Green Algae*. London. Academic Press. pp. 459.
171. Frazão, B., Martins, R., Vasconcelos, V. (2010): Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous North Atlantic marine cyanobacteria? *Marine Drugs* 8: 1908-1919.
172. Frechen, M. (2008): *New Dating Techniques to Reconstruct the Environment and Climate Change in Dynamic Landscapes*. Project proposal, Leibniz-Institut für Angewandte Geophysik.

173. Fritz, S.C. (1989): Lake development and limnological response to prehistoric and historic land-use in Diss, Norfolk, U.K. *Journal of Ecology* 77: 182-202.
174. Fujiki, H., Sugimura, T., Moore, R.E. (1983): New classes of environmental tumor promoters: indole alkaloids and polyacetates. *Environmental Health Perspectives* 50: 85-90.
175. Fulton, J.M., Arthur, M.A., Freeman, K.H. (2012): Subboreal aridity and scytonemin in the Holocene Black Sea. *Organic Geochemistry* 49: 47-55.
176. Fulton, J.M. (2013): Tracing aridity: sedimentary preservation of scytonemin from microbiotic desert soil crusts. National Science Foundation - Directorate for Geosciences (n/a, United States). 2013-08 to 2016-07 | Grant
177. Fulton, J., Van Mooy, B. (2014): Tracing aridity: sedimentary preservation of scytonemin from microbiotic desert soil crusts. Support: National Science Foundation. Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA 02543, USA.
178. Funari, E., Testai, E. (2008): Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 38: 97-125.
179. Funkey, C.P., Conley, D.J., Reuss, N.S., Humborg, C., Jilbert, T., Slomp, C.P. (2014): Hypoxia sustains cyanobacteria blooms in the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 48: 2598-2602.
180. Gagala, I., Mankiewicz-Boczek, J. (2012): The natural degradation of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) in fresh water-the future of modern treatment systems and water quality improvment. *Polish Journal of Environmental Studies* 21(5): 1125-1139.
181. Gantar, M. (1985): Masovno gajenje mikroalgi, očekivanja i mogućnosti. *Mikrobiologija* 21(1): 63-73.
182. Gantar, M., Sekar, R., Richardson, L.L. (2009): Cyanotoxins from black band disease of corals and from other coral reef environments. *Microbial Ecology* 58(4): 856-864.
183. Gao, K., Ye, C. (2007): Photosynthetic insensitivity of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* to solar UV radiation while rehydrated or desiccated. *Journal of Phycology* 43: 628-635.
184. Gao, X. (2017): Scytonemin plays a potential role in stabilizing the exopolysaccharidic matrix in terrestrial cyanobacteria. *Microbial Ecology* 73(2): 255-258.
185. Garcia-Pichel, F., Castenholz, R.W. (1991): Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology* 27: 395-409.
186. Garcia-Pichel, F., Castenholz, R.W. (1992): Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied Environmental Microbiology* 59: 163-169.
187. Garcia-Pichel, F., Sherry, N.D., Castenholz, R.W. (1992): Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochemistry and Photobiology* 56(1): 17-23.
188. Garcia-Pichel, F., Castenholz, R.W. (1993): Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 163-169.
189. Garcia-Pichel, F., Wingard, C.E., Castenholz, R.W. (1993): Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 170-176.



190. Garcia-Pichel, F., Mechling, M., Castenholz, R.W. (1994): Migrations of microorganisms within a benthic, hypersaline mat community. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1500-1511.
191. Garcia-Pichel, F., Belnap, J. (1996): Microenvironments and microscale productivity of cyanobacterial desert crusts. *Journal of Phycology* 32: 774-782.
192. Garcia-Pichel, F. (1998): Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 28: 321-347.
193. Garcia-Pichel, F., Nübel, U., Muyzer, G. (1998): The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169: 469-482.
194. Gauch, G.H.Jr. (1992): *Statistical analysis of regional yield trials*. Cornell University, Ithaca, USA.
195. Gauch, G.H., Zobel, R.W. (1996): AMMI analysis of yield trials. In: Kang, M.S., Gauch, H.G. (Eds.), *Genotype by environment interaction*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp. 85-122.
196. Gaudenyi, T., Jovanović, M., Marković, S. (2011): Paleoenvironmental reconstruction of the last glacial at the northeastern part of the Titel loess plateau. *Comptes rendus des séances de la Société Serbe de géologie pour l' année 2008*: 89-97.
197. Gavrilov, M.M., Basarin, B., Hambach, U., Machalet, B., Gavrilov, M., Marković, S.B. (2009): Paleoclimatic Record of the Titel Loess Plateau – From Depth to Time Scale. *Loessfest'09*, Aug. 31st – Sept. 3rd, Novi Sad, Serbia. Inqua Loess Focus Group.
198. Gerasimenko, L.M., Orleanskii, V.K., Karpov, G.A., Ushatinskaya, G.T. (2013): Interaction of cyanobacteria with volcanic ashes. *Microbiology* 82(1): 111-118.
199. Glazer, A.N. (1988): The phycobilisomes. In: Packer, L., Glazer, A.N. (Eds.), *Methods of Enzymology*, Academic Press, California, 167: 304-312.
200. Gomez-Alvarez, V., King, G.M., Nüsslein, K. (2007): Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 60-73.
201. Golubic, S., Hofmann, H.J. (1976): Comparison of modern and mid-Precambrian *Entophysalidaceae* (Cyanophyta) in stromatolitic algal mats: cell division and degradation. *Journal of Paleontology* 50: 1074-1082.
202. Golubic, S. (1991): Microbial mats of Abu Dhabi. In: Margulis, L., Olendzenski, L. (Eds.), *Environmental evolution, effects of the origin and evolution of life on planet earth*. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 131-147.
203. Goudie, A. (2013): *Encyclopedia of Geomorphology*. Routledge press, ISBN 1134482760, 9781134482764, pp. 1-1200.
204. Griffin, J.L., Vidal-Puig, A. (2008): Current challenges in metabolomics for diabetes research: a vital functional genomic tool or just a ploy for gaining funding? *Physiological Genomics* 34(1): 1-5.
205. Grimley, D.A., Follmer, L.R., Hughes, R.E., Solheid, P.A. (2003): Modern, Sangamon and Yarmouth soil development in loess of unglaciated southwestern Illinois. *Quaternary Science Reviews* 22: 225-244.
206. Gröniger, A., Häder, D-P. (2000): Stability of mycosporine-like amino acids. *Recent Research Developments in Photochemistry & Photobiology* 4: 247-252.
207. Gross, E.M., NVolk, C.P., Jutter, F. (1991): Fischerellin, a new allelochemical from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *Journal of Phycology* 27: 686-692.

208. Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., Collier, J.L. (1993): Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175: 575-582.
209. Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., Collier, J.L. (1994): The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In: Bryant, D.A. (Ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 641-675.
210. Guo, B., Zhu, R.X., Roberts, A.P., Florindo, F. (2001): Lack of correlation between paleoprecipitation and magnetic susceptibility of Chinese loess/paleosol sequences. *Geophysical Research Letters* 28: 4259-4262.
211. Guo, Z.T., Ruddiman, W.F., Hao, Q.Z., Wu, H.B., Qiao, Y.S., Zhu, R.X., Peng, S.Z., Wei, J.J., Yuan, B.Y., Liu, T.S. (2002): Onset of Asian desertification by 22Myr ago inferred from loess deposits in China. *Nature* 416: 159-163.
212. Guthrie, R.D. (1990): *Frozen fauna of the Mammoth Steppe: the story of Blue Babe*. Chicago, University of Chicago Press, pp. 323.
213. Haase, D., Fink, J., Haase, G., Ruske, R., Pecsí, M., Richter, H., Alterman, M., Jäger, K.-H. (2007): Loess in Europe's spatial distribution based on a European loess map, scale 1–2 500 000. *Quaternary Science Reviews* 26: 1301-1312.
214. Häder, D.-P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C. (1998): Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46(1-3): 53-68.
215. Häder, D.-P., Sinha, R.P. (2005): Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research* 571: 221-233.
216. Häder, D.-P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C. (2007): Effects of solar UV irradiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6: 267-285.
217. Hagemann, M., Henneberg, M., Felde, V.J.M., Drahorad, S.L., Berkowicz, S.M., Felix-Henningsen, P., Kaplan, A. (2014): Cyanobacterial diversity in biological soil crusts along a precipitation gradient, Northwest Negev Desert, Israel. *Microb Ecol*, DOI 10.1007/s00248-014-0533-z
218. Häggi, C., Zech, R., McIntyre, C., Zech, M., Eglinton, T.I. (2014): On the stratigraphic integrity of leaf-wax biomarkers in loess paleosols. *Biogeosciences* 11: 2455-2463.
219. Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P.N., Kakkar, P. (2003): Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere* 52: 1-21.
220. 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 methods. *Toxicon* 32: 73-84.
221. Harada, K.-I., Tsuji, K., Watanabe, M.F., Kondo, F. (1996): Stability of microcystins from cyanobacteria-III. \* Effect of pH and temperature. *Phycologia* 35(6): 83-88.
222. Harada, K.-I., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., Tsuji, K. (2004): Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon* 44: 107-109.
223. Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A., Paerl, H.W. (2016): A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae* 54: 4-20.
224. Hautala, H., Lamminmäki, U., Spoof, L., Nybom, S., Meriluoto, J., Vehniäinen, M. (2012): Quantitative PCR detection and improved sample preparation of microcystin-producing *Anabaena*, *Microcystis* and *Planktothrix*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87: 49-56.

225. 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.
226. He, Y., Häder, D.P. (2002): Reactive oxygen species and UV – B: effect on cyanobacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 729-736.
227. He, W., He, H., Zhu, M. (2015): Calcium Nodules as a proxy for quaternary paleoclimate change on China's Loess Plateau. *PLoS ONE* 10(12): e0143928.
228. Hedges, S.B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D.Y.C., Thompson, A.S., Watanabe, H. (2001): A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* 1: 4.
229. Helbling, E.W., Menchi, C.F., Villafañe, V.E. (2002): Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 820-825.
230. Heller, F., Liu, T.S. (1982): Magnetostratigraphical dating of loess deposits in China. *Nature* 300: 431-433.
231. Herrero, A., Flores, E. (2008): *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. 1<sup>st</sup> ed. Norfolk (UK): Caister Academic Press.
232. Hill, D.R., Peat, A., Potts, M. (1994): Biochemistry and structure of the glycan secreted by desiccation-tolerant *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Protoplasma* 182: 126-148.
233. Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomsickova, J., Zapomelova, E., Skacelova, K., Loksova, A., Kopecky, J. (2011): Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon* 57(1): 76-83.
234. Ho, L., Sawade, E., Newcombe, G. (2012): Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal—a review. *Water Research* 46(5): 1536-1548.
235. Hoefel, D., Ho, L., Monis, P.T., Newcombe, G., Saint, C.P. (2009): Biodegradation of geosmin by a novel Gram-negative bacterium; isolation, phylogenetic characterisation and degradation rate determination. *Water Research* 43(11): 2927-2935.
236. Hoffmann, L., Talarico, L., Wilmotte, A. (1990): Presence of CU-phycoerythrin in the marine benthic blue-green alga *Oscillatoria cf. corallinae*. *Phycologia* 29: 19-26.
237. Hofmann, A. (Ed.) (2010): *Spectroscopic Techniques: I Spectrophotometric Techniques*. Cambridge University Press, pp. 427-521. DOI <http://www.cambridge.org>
238. Hoiczky, E., Hansel, A. (2000): Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic Envelope. *Journal of Bacteriology* 182: 1191-1199.
239. Holland, A., Kinner, S. (2013): Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Marine Drugs* 11(7): 2239-2258.
240. Holst, T., Jørgensen, N.O.G., Jørgensen, C., Johansen, A. (2003): Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. *Water Research* 37(19): 4748-4760.
241. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Maryland USA.
242. 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.

243. Horner, R.D., Grambow, S.C., Coffman, C.J., Lindquist, J.H., Oddone, E.Z., Allen, K.D., Kasarskis, E.J. (2008): Amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans: evidence for a time-limited outbreak. *Neuroepidemiology* 31: 28-32.
244. Hou, W., Dong, H., Li, G., Yang, J., Coolen, M.J.L., Liu, X., Wang, S., Jiang, H., Wu, X., Xiao, H., Lian, B., Wan, B. (2014): Identification of photosynthetic plankton communities using sedimentary ancient DNA and their response to late-Holocene climate change on the Tibetan Plateau. *Scientific Reports* 4, article number: 6648; doi:10.1038/srep06648
245. Hovan, S.A., Rea, D.K., Pisias, N.G., Shackleton, N.J. (1989): A direct link between the loess and marine  $\delta^{18}O$  records: aeolian flux to the north Pacific. *Nature* 340: 296-298.
246. Hrouzek, P., Tomek, P., Lukešová, A., Urgan, J., Voloshko, L., Pushparaj, B., Ventura, S., Lukavský, J., Stys, D., Kopecký, J. (2009): Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial *Nostoc* strains, originating from different climatic/geographic regions and habitats: Is their cytotoxicity environmentally dependent? *Environmental Toxicology* 26(4): 345-358.
247. Hu, L.B., Yang, J.D., Zhou, W., Yin, Y.F., Chen, J., Shi, Z.Q. (2009): Isolation of a *Methylobacillus* sp. that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. *New Biotechnology* 26: 205-211.
248. Hu, C., Gao, K., Whitton, B.A. (2012a): Semi-arid regions and deserts. In: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in time and space*. Springer pp. 345-369.
249. Hu, L., Zhang, F., Liu, C., Wang, M. (2012b): Biodegradation of microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. *Energy Procedia* 16: 2054-2059.
250. Humpage, A.R., Rositano, J., Breitag, A.H., Brown, R., Baker, P.D., Nicholson, B.C., Steffensen, D.A. (1994): Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Marine and Freshwater Research* 45: 761-777.
251. Ingalls, A.E., Anderson, R.F., Pearson, A. (2004): Radiocarbon dating of diatom-bound organic compounds. *Marine Chemistry* 92: 91-105.
252. Ingalls, A.E., Whitehead, K., Bridoux, M.C. (2009): Tinted windows: the presence of the UV absorbing compounds called mycosporine-like amino acids embedded in the frustules of marine diatoms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(1): 104-115.
253. Ishii, H., Nishijima, M., Abe, T. (2004): Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a Gram-negative aerobic bacterium. *Water Research* 38: 2667-2676.
254. Ito, E., Satake, M., Yasumoto, T. (2002): Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon* 40: 551-556.
255. Jensen, T.E. (1993): In: Berner, T. (Ed.), *Ultrastructure of microalgae*. CRC Press, Boca Raton, chapter 1.
256. Jiang, H., Gao, K., Helbling, E.W. (2008): UV-absorbing compounds in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) with special reference to effects of desiccation. *Journal of Applied Phycology* 20: 387-395.
257. Jiang, W., Tan, S., Hanaki, Y., Irie, K., Uchida, H., Watanabe, R., Suzuki, T., Sakamoto, B., Kamio, M., Nagai, H. (2014): Two new lyngbyatoxin derivatives from the cyanobacterium, *Moorea producens*. *Marine Drugs* 12: 5788-5800.

258. Jiménez, L., Romero-Viana, L., Conde-Porcuna, J.M., Pérez-Martínez, C. (2015): Sedimentary photosynthetic pigments as indicators of climate and watershed perturbations in an alpine lake in southern Spain. *Limnetica* 34(2): 439-454.
259. Jones, G.J. (1990): Biodegradation and removal of cyanobacterial toxins in natural waters. In: Proc. Sydney Water Board Blue-Green Algae Seminar, Sydney, pp. 33-36.
260. Jones, G.J., Orr, P.T. (1994): Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 28: 871-876.
261. Jones, G.J., Falconer, I.R., Wilkins, R.M. (1995): Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from lake Mokoan, Australia. *Environ. Toxic. Water* 10: 19-24.
262. Jones, G.J., Negri, A.P. (1997): Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research* 31: 525-533.
263. Jones, M., van Dongen, B., Covey-Crump, S., Almond, P. (2017): Reconstructing late quaternary climate change from loess successions in New Zealand using chemical proxies. Project proposal in Environmental Geochemistry and Geomicrobiology.
264. Jorge-Villar, S.E., Benning, L.G., Edwards, H.G.M., AMASE team (2007): Raman and SEM analysis of a biocolonised hot spring travertine terrace in Svalbard, Norway. *Geochemical Transactions* 8: 8.
265. Kaczorowska, A., Kornijów, R. (2012): Palaeoecological evidence for changes over the past 200 years in chironomid communities of a shallow lake exposed to cyanobacterial toxins. *Aquatic Ecology* 46(4): 465-473.
266. Kaebernick, M., Neilan, B.A. (2001): Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1-9.
267. Kahmen, A., Hoffmann, B., Schefuß, E., Arndt, S.K., Cernusak, L.A., West, J.B., Sachse, D. (2013): Leaf water deuterium enrichment shapes leaf wax n-alkane  $\delta D$  values of angiosperm plants II: Observational evidence and global implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta*: 111: 50-63.
268. Kaiser, J., On, B., Arz, H., Akcer-On, S. (2016): Sedimentary lipid biomarkers in the magnesium rich and highly alkaline Lake Salda (south-western Anatolia). *Journal of Limnology* 75(3): 581-596.
269. Kanwar, A.S. (2007): Brine shrimp (*Artemia salina*) - a marine animal for simple and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2(4): 236-240.
270. Kanzo, Y., Ruike, K., Inamori, R., Suzuki, R., Qin Xu, K., Inamori, Y. (2013): Analysis of absorption and accumulation of blue-green algae toxin Microcystin in the Komatsuna cultivation. *Journal of Biomedical Science* 2(1): 12-16.
271. Karimi, A., Frechen, M., Hossein, K., Kehl, M., Jalalian, A. (2011): Chronostratigraphy of loess deposits in northeast Iran. *Quaternary International* 234(1): 124-132.
272. Karnieli, A., Kidron, G.J., Glaesser, C., Ben-Dor, E. (1999): Spectral characteristics of cyanobacteria soil crust in semiarid environments. *Remote Sensing of Environment* 69: 67-75.
273. Karsten, U., Franklin, L.A., Lüning, K., Wiencke, C. (1998): Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta* 205: 257-262.

274. Keshavarzi, B. (2014): A possible link between mineralogy of loess deposits and high incidence rate of esophageal cancer in Golestan province of Iran. *Iranian Journal of Science & Technology* 38A3: 281-287.
275. Kinnear, S. (2010): Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Marine Drugs* 8: 542-564.
276. Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemela, S.I. (1991): Detection of toxicity of cyanobacteria by *A. salina* bioassay. *Environ. Toxic. Water.* 6: 423-436.
277. Klisch, M., Häder, D.-P. (2002): Wavelength dependence of mycosporine-like amino acid synthesis in *Gyrodinium dorsum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66: 60-66.
278. Klisch, M., Häder, D.-P. (2008): Mycosporine-like amino acids and marine toxins – The common and the different. *Marine Drugs* 6: 147-163.
279. Klitzke, S., Fastner, J. (2012): Cylindrospermopsin degradation in sediments – The role of temperature, redox conditions, and dissolved organic carbon. *Water Research* 46(5): 1549-1555.
280. Kokocinski, M., Mankiewicz-Boczek, J., Jurczak, T., Spoo, L., Meriluoto, J., Rajmonczyk, E., Hautala, H., Vehniäinen, M., Pawelczyk, J., Soininen, J. (2013): *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 5243-5264.
281. Komarek, J., Anagnostidis, K. (1998): Cyanoprocariota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, pp. 548.
282. Komarek, J., Kopecký, J., Cepák, V. (1999): Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. *Cryptogamie Algologie* 20(3): 209-222.
283. Komarek, J., Anagnostidis, K. (2005): Cyanoprocariota 2. Teil: Oscillatoriales. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M. (Eds.). Spektrum Akademischer Verlag, pp. 759.
284. Komarek, J. (2013): Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1131.
285. Korbee, N., Figueroa, F.L., Aguilera, J. (2006): Accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs): Biosynthesis, photocontrol and ecophysiological functions. *Revista chilena de historia natural* 79(1): 119-132.
286. Korhola, A., Sorvari, S., Rautio, M., Appleby, P.G., Dearing, J.A., Hu, Y., Rose, N., Lami, A., Cameron, N.G. (2002): A multi-proxy analysis of climate impacts on the recent development of subarctic Lake Saanajarvi in Finnish Lapland. *J Paleolimnol* 28: 59-77.
287. Kormas, K.A., Lymeropoulou, D.S. (2013): Cyanobacterial toxin degrading bacteria: who are they? *BioMed Research International* e463894.
288. Kowalewska, G., Szymczak-Zyla, M., Krajewska, M., Filipkowska, A., Lubecki, L., Mazur-Marzec, H., Witak, M., Ceglowska, M., Ciesielski, T.M., Ardelan, M.V., Jenssen, B.M., Breedveld, G.D., Oen, A.M., Goslar, T. (2017): Climate warming today and in the past in the Southern Baltic and Norwegian coast area – a multiproxy study. Conference paper, Aslo, 2017, Mountains to the Sea, Feb 26-Mar 3, 2017, Honolulu, Hawaii, Oral presentation.

289. Kruschel, C., Castenholz, R.W. (1998): The effect of solar UV and visible irradiance on the vertical movements of cyanobacteria in microbial mats of hypersaline waters. *FEMS Microbiology Ecology* 27(1): 53-72.
290. Kuiper-Goodman, T., Falconer, I.R., Fitzgerald, J. (1999): Human health aspects. E&FN Spon, London, pp. 113-153.
291. Kukla, G.J. (1977): Pleistocene land–sea correlations. *Earth-Science Reviews* 13: 307-374.
292. Kukla, G., Heller, F., Liu, X.M., Xu, T.C., Liu, T.S., An, Z.S. (1988): Pleistocene climates in China dating by magnetic susceptibility. *Geology* 16: 811-814.
293. Kukla, G., An, Z.S. (1989): Loess stratigraphy in Central China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 72: 203-225.
294. Kukla, G., An, Z.S., Melice, J.L., Gavin, J., Xiao, J.L. (1990): Magnetic susceptibility record of Chinese loess. *Trans. R. Soc. Edinburgh: Earth Sci.* 81(4): 263-288.
295. Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Irinolo, 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(10): 1359-1373.
296. Lahmi, R., Sendersky, E., Perelman, A., Hagemann, M., Forchhammer, K., Schwarz, R. (2006): Alanine dehydrogenase activity is required for adequate progression of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Bacteriology* 188(14): 5258-5265.
297. Lam, A.K.Y., Prepas, E.E., Spink, D., Hrudey, S.E. (1995): Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: Implications for human health. *Water Research* 29(8): 1845-1854.
298. Lami, A., Guilizzoni, P., Marchetto, A. (2000): High resolution analysis of fossil pigments, carbon, nitrogen and sulphur in the sediment of eight European Alpine lakes: the MOLAR project. *Journal of Limnology* 59 (Suppl. 1): 15-28.
299. Lami, A., Turner, S., Musazzi, S., Gerli, S., Guilizzoni, P., Rose, N.L., Yang, H., Wu, G., Yang, R. (2010): Sedimentary evidence for recent increases in production in Tibetan plateau lakes. *Hydrobiologia* 648: 175-187.
300. Lange, O.L., Kidron, G.J., Büdel, B., Meyer, A., Kilian, E., Abelovich, A. (1992): Taxonomic composition and photosynthetic characteristics of the „biological crusts“ covering sand dunes in the western Negev Desert. *Functional Ecology* 6: 519-527.
301. Lawton, L.A., Robertson, P.K.J. (1999): Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chemical Society Reviews* 28: 217-224.
302. Leavitt, P.R., Vinebrooke, R.D., Donald, D.B., Smol, J.P., Schindler, D.W. (1997): Past ultraviolet irradiation environments in lakes derived from fossil pigments. *Nature* 388: 457-459.
303. Leavitt, P.R., Hodgson, D.A. (2001): Sedimentary pigments. In: Smol, J.P., Birks, H.J.B., Last, W.M. (Eds.), *Tracking environmental change using lake sediments*: Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 295-325.
304. Lee, R. (1999): *Phycology* 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge University Press.
305. Lehtimäki, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemela, S.I. (1994): The effect of incubation time, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. *Arch. Hydrobiol.* 130: 269-282.

306. Lehtimäki, J., Moisaner, P., Sivonen, K., Kononen, K. (1997): Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(5): 1647-1656.
307. Levine, E., Thiel, T. (1987): UV-inducible DNA repair in the cyanobacteria *Anabaena* spp. *Journal of Bacteriology* 169: 3988-3993.
308. Lewin, R. (1979): Formal taxonomic treatment of Cyanophytes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29(4): 411-412.
309. Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Watanabe, M.M. (2001): First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37: 1121-1126.
310. Li, Y., Lin, Y., Loughlin, P.C., Chen, M. (2014): Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll *f*. *Front Plant Sci.* 5: 67.
311. Li, Y., Yang, S., Wang, X., Hu, J., Cui, L., Huangm, X., Jiang, W. (2016): Leaf wax n-alkane distributions in Chinese loess since the Last Glacial Maximum and implications for paleoclimate. *Quaternary International* 399: 190-197.
312. Limaye, R.B., Padmalal, D., Kumaran, N.K.P. (2016): Cyanobacteria and testate amoeba as potential proxies for Holocene hydrological changes and climate variability: Evidence from tropical coastal lowlands of SW India. *Quaternary International*, DOI: 10.1016/j.quaint.2016.09.044
313. Lindsay, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A. (2006): Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 48(8): 995-1001.
314. Litchman, E., Neale, P.J., Banaszak, A.T. (2002): Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnol Oceanogr* 47: 86-94.
315. Liu, T.S. (1985): *Loess and Environment*. Science Press, Beijing, pp. 481 (in Chinese).
316. Liu, T.S., Gu, Z.T., Wu, N.Q., Lu, H.Y. (1996): Prehistoric vegetation on the Loess Plateau: steppe or forest? *Journal of Southeast Asian Earth Sciences* 13(3-5): 341-346.
317. Liu, W., Huang, Y. (2005): Compound specific D/H ratios and molecular distributions of higher plant leaf waxes as novel paleoenvironmental indicators in the Chinese Loess Plateau. *Organic Geochemistry* 36: 851-860.
318. Liu, M., Zhao, X., Zhan, J., Gao, Y., Yang, G., Sun, Q. (2011): Cyanobacterial diversity in biological soil crusts on wastelands of copper mine tailings. *Acta Ecologica Sinica* 2011-22.
319. Liu, X.M., Liu, T.S., Xu, T.C., Liu, C., Cheng, M.Y. (1987): A study on magnetostratigraphy of a loess profile in Xifeng area, In: Liu, T.S. (Ed.), *Aspects of Loess Research*. China Ocean Press, Beijing, pp. 164-174.
320. Liu, X.M., Rolph, T., Bloemendal, J., Shaw, J., Liu, T.S. (1995): Quantitative estimates of palaeoprecipitation at Xifeng area, in the Loess Plateau of China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 113: 243-248.
321. Lotter, A.F. (2001): The palaeolimnology of Soppensee (central Switzerland) as evidenced by diatom, pollen, and fossil-pigment analyses. *Journal of Paleolimnology* 25: 65-79.



322. Ložek, V. (1965): Das Problem der Lössbildung und die Lössmollusken. *Eiszeitalter und Gegenwart* 16: 61-75.
323. Lu, H.-Y., Han, J.M., Wu, N.Q., Guo, Z.T. (1994): Magnetic susceptibility of the modern soils in China and paleoclimatic significance. *Science in China (Series B)* 24: 1290-1297 (in Chinese).
324. Lu, H.-Y., Wu, N.Q., Liu, D.S., Han, J.M., Qin, X.G., Sun, X.J., Wang, Y.J. (1996): Seasonal climatic variation recorded by phytolith assemblages from the Baoji loess sequence in central China over the last 150,000 a. *Science in China (Series D)* 39: 629-639.
325. Lu, H.-Y., Liu, X.D., Zhang, F.Q., An, Z.S., Dodson, J. (1999): Astronomical calibration of loess–paleosol deposits at Luochuan, Central Chinese Loess Plateau. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 154: 237-246.
326. Lu, H.-Y., Wu, N.-Q., Liu, K.-B., Jiang, H., Liu, T.-S. (2007): Phytoliths as quantitative indicators for the reconstruction of past environmental conditions in China II: palaeoenvironmental reconstruction in the Loess Plateau. *Quaternary Science Reviews* 26: 759-772.
327. MacColl, R. (1998): Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology* 124: 311-334.
328. Madella, M. (1997): Phytoliths from a Central Asia loess–paleosol sequence and modern soils: their taphonomical and palaeoecological implication. In: Pinilla, A. (Ed.), *The state of the art of phytoliths in plants and soils. Monografias del Centro de Ciencias Medambioentales, Madrid*, pp. 49-58.
329. Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006): *Brock Biology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> edition. Pearson Prentice Hall: New Jersey.
330. Maghsoudi, E., Fortin, N., Greer, C., Maynard, C., Pagé, A., Duy, S.-V., Sauvé, S., Prévost, d M., Dorner, S. (2016): Cyanotoxin degradation activity and mlr gene expression profiles of a *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Champlain, Canada. *Environmental Science: Processes & Impacts* 18(11): 1417-1426.
331. Mahakhant, A., Sano, T., Ratanachot, P., Tong-a-ram, T., Srivastava, V.C., Watanabe, M.M., Kaya, K. (1998): Detection of microcystins from cyanobacterial water blooms in Thailand fresh water. *Psychological Research* 42: 25-29.
332. Maher, B.A., Thompson, R., Zhou, L.P. (1994): Spatial and temporal reconstructions of changes in the Asian palaeomonsoon: a new mineral magnetic approach. *Earth and Planetary Science Letters* 125: 461-471.
333. Maher, B.A., Thompson, R. (1995): Paleorainfall reconstructions from pedogenic magnetic susceptibility variations in the Chinese loess and paleosols. *Quaternary Research* 44: 383-391.
334. Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. (1986): The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 24(5): 425-434.
335. Mahmood, W.A., Carmichael, W.W. (1987): Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC- 525-17. *Toxicon* 25: 1211-1227.
336. Mahowald, N.M., Kohfeld, K.E., Hansson, M., Balkanski, Y., Harrison, S.P., Prentice, I.C., Schultz, M., Rodhe, H. (1999): Dust sources and deposition during the Last Glacial Maximum and current climate: a comparison of model results with paleodata

- from ice cores and marine sediments. *Journal of Geophysical Research* 104: 15895-15916.
337. Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A. (2009): Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6924-6928.
338. Mandal, S., Rath, J. (2014): Secondary metabolites of cyanobacteria and drug development. Chapter 2, in: *Extremophilic Cyanobacteria For Novel Drug Development*. Part of the series Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development, pp. 23-43. Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-12009-6\_2.
339. Marjani, A., Kabir, M.J., Semnani, S., Sedaghat, S.M., Moghaddami, A. (2008): Females' esophagus cancer incidence in Golestan Province, Iran. *Internet Journal of Medical Update* 3: 36-39.
340. Marković, S. (2011): Pigmentni sastav cijanobakterijskih sojeva iz kolekcije kultura NSCCC. Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
341. Marković, S.B., Kostić, N.S., Oches, E.A. (2004): Paleosols in the Ruma loess section (Vojvodina, Serbia). *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 21(1): 79-87.
342. Marković, S.B., Jovanović, M., Mijović, D., Bokhorst, M., Vandenberghe, J., Oches, E.A., Hambach, U., Zoeller, L., Gaudenyi, T., Kovačev, N., Boganović, Ž., Savić, S., Bojanić, D., Milojković, N. (2005a): Titel Loess Plateau—geopark. *Proceedings of 2nd Conference on the Geoh heritage of Serbia, Belgrade, 22-23 June 2004*, pp. 177-184.
343. Marković, S.B., McCoy, W.D., Oches, E.A., Savić, S., Gaudenyi, T., Jovanović, M., Stevens, T., Walther, R., Ivanišević, P., Galić, Z. (2005b): Paleoclimate record in the Upper Pleistocene loess-paleosol sequence at Petrovaradin brickyard (Vojvodina, Serbia). *Geologica Carpathica* 56(6): 545-552.
344. Marković, S.B., Oches, E.A., Sümegi, P., Jovanović, M., Gaudenyi, T. (2006): An introduction to the Middle and Upper Pleistocene loess-paleosol sequences at Ruma Brickyard (Vojvodina, Yugoslavia). *Quaternary International* 149: 80-86.
345. Marković, S.B., Oches, E.A., McCoy, W.D., Frechen, M., Gaudenyi, T. (2007): Malacological and sedimentological evidence for “warm” glacial climate from the Irig loess sequence, Vojvodina, Serbia. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 8, Q09008, DOI:10.1029/2006GC001565.
346. Marković, S.B., Bokhorst, M.P., Vandenberghe, J., McCoy, W.D., Oches, E., Hambach, U., Gaudenyi, T., Jovanović, M., Zöller, L., Stevens, T., Machalett, B. (2008a): Late Pleistocene loess-palaeosol sequences in the Vojvodina region, north Serbia. *Journal of Quaternary Science* 23(1): 73-84.
347. Marković, S.B., Štrbac, D., Hambach, U., Machalett, B., Jovanović, M., Zöller, L., Lukić, T., Gaudenyi, T., Basarin, B. (2008b): Paleosurface reconstruction of the Titel loess plateau (Vojvodina, Serbia) using GIS. *Geophysical Research Abstracts*, Vol. 10, EGU2008-A-05177.
348. Marković, S.B., Smalley, I.J., Hambach, U., Antoine, P. (2009): Loess in the Danube region and surrounding loess provinces: The Marsigli memorial volume. *Quaternary International* 198: 5-6.
349. Marković, S.B., Hambach, U., Stevens, T., Kukla, G.J., Heller, F., McCoy, W.D., Oches, E.A., Buggle, B., Zöller, L. (2011): The last million years recorded at the Stari

- Slankamen loesspalaeosol sequence: revised chronostratigraphy and long-term environmental trends. *Quaternary Science Reviews* 30(9-10): 1142-1154.
350. Matsui, K., Nazifi, E., Kunita, S., Wada, N., Matsugo, S., Sakamoto, T. (2011): Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 105: 81-89.
351. Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W. (1989): Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J Am Chem Soc* 111: 8021-8023.
352. McGorum, B.C., Pirie, R.S., Glendinning, L., McLachlan, G., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Cox, P.A., Codd, G.A. (2015): Grazing livestock are exposed to terrestrial cyanobacteria. *Veterinary Research* 46: 16.
353. McGowan, S., Juhler, R.K., Anderson, N.J. (2008): Autotrophic response to lake age, conductivity and temperature in two West Greenland lakes. *J Paleolimnol* 39: 301-317.
354. Meriluoto, J., Spoof L. (2005a): Extraction of microcystins in biomass filtered on glassfibre filters or in freeze-dried cyanobacterial biomass. In: Meriluoto, J., Codd, G.A. (Eds.), *TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. ÅboAkademi University Press, Turku, pp. 69-71.
355. Meriluoto, J., Spoof, L. (2005b): Purification of microcystins by high-performance liquid chromatography. In: Meriluoto, J., Codd, G.A. (Eds.), *TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. ÅboAkademi University Press, Turku, pp. 93-104.
356. Meriluoto, J., Blaha, L., Bojadzija, G., Bormans, M., Brient, L., Codd, G.A., Drobac, D., Faassen, E.J., Fastner, J., Hiskia, A., Ibelings, B.W., Kaloudis, T., Kokocinski, M., Kurmayer, R., Quesada, A., Pantelić, D., Salmaso, N., Tokodi, N., Triantis, T.M., Visser, P.M., Svirčev, Z. (2017): Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in European waters – recent progress achieved through the CYANOCOST Action and challenges for further research. *Advances in Oceanography and Limnology* 8(1):- .DOI: 10.4081/aiol.2017.6429.
357. Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Ressler, J., Gerbersdorf, S., Pflugmacher, S., Codd, G.A. (2002): Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* 51(3): 145-151.
358. Metcalf, J.S., Codd, G.A. (2004): *Cyanobacterial toxins (cyanotoxins) in water*. Foundation for Water Resarch Allen House, FR/R0009, The Listons, Liston Road, Marlow, Bucks SL 7 1FD, U.K.
359. Metcalf, J.S., Codd, G.A. (2012): Cyanotoxins. In: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. Springer, Dordrecht, pp. 651-675.
360. Metcalf, J.S., Richer, R., Cox, P.A., Codd, G.A. (2012): Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Science of the Total Environment* 421-422, 118-123.
361. Metcalf, J.S., Banack, S.A., Richer, R., Cox, P.A. (2015): Neurotoxic amino acids and their isomers in desert environments. *Journal of Arid Environments* 112(Part B): 140-144.

362. Michaelian, K. (2012): HESS Opinions: Biological catalysis of the hydrological cycle: life's thermodynamic function. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 16: 2629-2645.
363. Michaelian, K., Simeonov, A. (2015): Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum. *Biogeosciences* 12: 4913-4937.
364. Michelutti, N., Wolfe, A.P., Vinebrooke, R.D., Rivard, B., Briner, J.P. (2005): Recent primary production increases in arctic lakes. *Geophysical Research Letters*, 32: L19715.
365. Miller, M.J., Fallowfield, H.J. (2001): Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments. *Water Science and Technology* 43: 229-232.
366. Miller, M.J., Critchley, M.M., Hutson, J. Fallowfield, H.J. (2001): The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Water Research* 35(6):1461-1468.
367. Miller, K.E., Kaufman, A.J., Misi, A., Flavio De Oliviera, T. (2009): Evaluating the environmental and ecological setting of a mesoproterozoic ice age through the analysis of lipid biomarkers. Conference paper, Geological Society of America, Portland, 18-21 October 2009. *Abstracts with Programs* 41(7): 46.
368. Miralles, I., Domingo, F., Cantón, Y., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F. (2012): Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones. *Soil Biology and Biochemistry* 53: 124-132.
369. Mishra, A., Tandon, R., Kesarwani, S., Singh, R., Tiwari, G.L. (2015): Emerging applications of cyanobacterial ultraviolet protecting compound scytonemin. *Journal of Applied Phycology* 27: 1045-1051.
370. Mittler, R., Tel-Or, E. (1991): Oxidative stress responses in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Free Radical Research Communications* 12: 845-850.
371. Mohamed, Z.A., el-Sharouny, H.M., Ali, W.S. (2006): Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon* 47(5): 584-590.
372. Mohamed, Z.A., Al-Shehri, A.M. (2009): Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *Journal of Hazardous Materials* 172(1): 310-315.
373. Mohamed, Z.A., Al-Shehri, A.M. (2013): Assessment of cylindrospermopsin toxin in an arid Saudi lake containing dense cyanobacterial bloom. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 2157-2166.
374. Mohlin, M., Wulff, A. (2009): Interaction effects of ambient UV radiation and nutrient limitation on the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Microbial Ecology* 57: 675-686.
375. Mons, M.N., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. (1998): Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005.
376. Moore, R.E. (1984): Public health and toxins from marine blue-green algae, in *Seafood toxins*. ACS Symposium Series No. 262, Ragelis, E.P. (Ed.), American Chemical Society: Washington. pp. 369-376.
377. Moore, R.E., Blackman, A.J., Cheuk, C.E., Mynderse, J.S., Matsumoto, G.K., Clardy, J., Woodard, R.W., Craig, J.C. (1984): Absolute stereochemistries of the aplysiatoxins and oscillatoxin A. *Journal of Organic Chemistry* 49(13): 2484-2489.

378. Moore, R.E. (1996): Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 134-143.
379. Morris, R.J., Williams, D.E., Luu, H.A., Holmes, C.F.B., Andersen, R.J., Calvert, S.E. (2000): The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicon* 38: 303-308.
380. Muhs, D.R., Ager, T.A., Skipp, G., Beann, J., Budahn, J.R., McGeehin, J.P. (2008): Paleoclimatic significance of chemical weathering in loess-derived paleosols of subarctic central Alaska. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 40: 396-411.
381. Muhs, D.R. (2013): The geologic records of dust in the Quaternary. *Aeolian Research* 9: 3-48.
382. Muhs, D.R., Prins, M.A., Machalett, B. (2014a): Loess as a Quaternary paleoenvironmental indicator. *Pages Magazine* 22(2): 84-85.
383. Muhs, D.R., Cattle, S.R., Crouvi, O., Rousseau, D.-D., Sun, J., Zárata, M.A. (2014b): Chapter 16 Loess Records. In book: Knippertz, P., Stuut, J.-B.W. (Eds.), *Mineral Dust: A Key Player in the Earth System*. Publisher: Springer Science+Business Media, pp. 411-441. DOI: 10.1007/978-94-017-8978-3\_16
384. Mushir, S., Fatma, T. (2011): Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in cyanobacterium *Aulosira fertilissima*: environmental perspective and characterization. *Current Research Journal of Biological Sciences* 3(2): 165-171.
385. Mushir, S., Fatma, T. (2012): Monitoring stress responses in cyanobacterial scytonemin - screening and characterization. *Environmental Technology* 33: 153–157.
386. Mushir, S., Deep, S., Fatma, T. (2014): Screening of cyanobacterial strains for UV screening compound scytonemin-environmental perspectives. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 3(2): 9191-9196.
387. Nadeau, T.-L., Howard-Williams, C., Castenholz, R.W. (1999): Effects of solar UV and visible irradiance on photosynthesis and vertical migration of *Oscillatoria* sp. (Cyanobacteria) in an Antarctic microbial mat. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 231-243.
388. Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S. (2003): Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 42: 533-538.
389. National Research Council. (2002): Chapter: 4, Chemical Reference Materials for the analysis of particulate and sediment samples. In: *Chemical Reference Materials: Setting the Standards for Ocean Science*. Washington, DC: The National Academic Press. doi: 10.17226/10476.
390. Nazifi, E., Wada, N., Yamaba, M., Asano, T., Nishiuchi, T., Matsugo, S., Sakamoto, T. (2013): Glycosylated Porphyra-334 and Palythine-Threonine from the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Marine Drugs* 11(9): 3124-3154.
391. Negri, A.P., Jones, G.J. (1995): Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon* 33: 667-678.
392. Neilan, B.A., Pearson, L.A., Moffitt, M.C., Mihali, K.T., Kaebernick, M., Kellmann, R., Pomati, F. (2008): Chapter 17: The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: Hudnell, H.K. (Ed.), *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619: 417-452.

393. Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D., Bertilsson, S. (2011): A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(1): 14-49.
394. Obrecht, I., Buggle, B., Catto, N., Marković, S.B., Bösel, S., Vandenberghe, D.A.G., Hambach, U., Svirčev, Z., Lehmkuhl, F., Basarin, B., Gavrilov, M.B., Jović, G. (2014): The Late Pleistocene Belotinac section (southern Serbia) at the southern limit of the European loess belt: Environmental and climate reconstruction using grain size and stable C and N isotopes. *Quat. Int., ED@80: Loess in China and Europe - A Tribute to Edward Derbyshire* 334-335, 10-19. doi:10.1016/j.quaint.2013.05.037
395. Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992): Cyindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cyindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114: 7941-7942.
396. Okaichi, T., Tokumura, T. (1980): Isolation of cyclohexene derivatives from *Noctiluca miliaris*. Chemical Society of Japan.
397. Oksanen, I., Jokela J., Fewer, D.P., Wahlsten, M., Rikkinen, J., Sivonen, K. (2004): Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 5756-5763.
398. Oliveira, A.C.P., Magalhaes, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O. (2005): Influence of drinking water composition on quantitation and biological activity of dissolved microcystin (cyanotoxin). *Environmental Toxicology* 20(2): 126-130.
399. Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., Baganz, F. (1998): Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16(9): 373-378.
400. Olson, J.M. (2006): Photosynthesis in the Archean Era. *Photosynthesis Research* 88(2): 109-117.
401. Oren, A. (1997): Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiology J* 14: 231-240.
402. Oren, A., Gunde-Cimerman, N. (2007): Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters* 269: 1-10.
403. Orr, P.T., Jones, G.J. (1998): Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43: 1604-1614.
404. Oyamada, C., Kaneniwa, M., Ebitani, K., Murata, M., Ishihara, K. (2008): Mycosporine-like amino-acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. *Marine Biotechnology* 10: 141-150.
405. Paerl, H.W., Huisman, J. (2009): Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology* 1: 27-37.
406. Palinska, K.A., Deventer, B., Hariri, K., Łotocka, M. (2011): A taxonomic study on *Phormidium* group (cyanobacteria) based on morphology, pigments, RAPD molecular markers and RFLP analysis of the 16S rRNA gene fragment. *Fottea* 11: 41-55.
407. 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.

408. Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M., Ward, D.M. (2003): Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 5: 650-659.
409. Park, D.L., Aguirre-Flores, I., Scott, W.F., Alterman, E. (1986): Evaluation of chicken embryo, brine shrimp, and bacterial bioassays for saxitoxin. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 18(4): 589-594.
410. Park, H.-D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A., Kato, K. (2001): Degradation of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* 16: 337-343.
411. Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P.K. (2004): Purification and characterization of C-phycoyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification* 40: 248-255.
412. Pathak, J., Richa, Rajneesh, Sonker, A.S., Kannaujiya, V.K., Sinha, R.P. (2015): Isolation and partial purification of scytonemin and mycosporine-like amino acids from biological crusts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(1): 362-371.
413. Patterson, G.M.L., Bolis, C.M. (1997): Fungal cell-wall polysaccharides elicit an antifungal secondary metabolite (Phytoalexin) in the cyanobacterium *Syntonema acellatum*. *Journal of Phycology* 33: 54-60.
414. Pawlik-Skowrońska, B., Pirszel, J., Kornijów, R. (2008): Spatial and temporal variation in MCs concentrations during perennial bloom of *Planktothrix agardhii* in a hypertrophic lake. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 44: 63-68.
415. Pawlik-Skowrońska, B., Kornijów, R., Pirszel, J. (2010): Sedimentary imprint of cyanobacterial blooms—a new tool for insight into recent history of lakes. *Polish Journal of Ecology* 58: 663-670.
416. Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B. (2010): On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8: 1650-1680.
417. Pecs, M. (1990): Loess is not just the accumulation of dust. *Quaternary International* 7/8, 1-21.
418. Pecs, M. (1995): The role of principles and methods in loess-paleosol investigations. *GeoJournal* 36: 117-131.
419. Peinado, N.K., Díaz, R.T.A., Figueroa, F.L., Helbling, E.W. (2004): Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* 40: 248-259.
420. Petit, J.R., Mounier, L., Jouzel, J., Korotkevich, Y.S., Kotlyakov, V.I., Lorius, C. (1990): Palaeoclimatological and chronological implications of the Vostok core dust record. *Nature* 343: 56-58.
421. Petrović, O., Knežević, P., Simeunović, J. (2007): Mikrobiologija, skripta za studente Biologije. Univerzitet u Novom Sadu.
422. Pewe, T.L., Berger, G.W., Westgate, J.A., Brown, P.A., Leavitt, S.W. (1997): Eva Interglaciation Forest Bed, unglaciated east-central Alaska: global warming 125 000 years ago. *Geological Society of America, special publication* 319, pp. 54.
423. Pienitz, R., Smol, J.P., Last, W.M., Leavitt, P.R., Cumming, B.F. (2000): Multi-proxy Holocene palaeoclimatic record from a saline lake in the Canadian Subarctic. *The Holocene* 10(6): 673-686.

424. Pigati, J.S., Rech, J.A., Nekola, J.C. (2010): Radiocarbon dating of small terrestrial gastropod shells in North America. *Quaternary Geochronology* 5: 519-532.
425. Pinell, S.R. (2003): Cutaneous photodamage, oxidativ stress and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 48(1): 1-19.
426. Piperno, D.R. (1988): *Phytolith Analysis. An Archaeological and Geological Perspective.* Academic Press, San Diego, pp. 280.
427. Pjevač, J. (2010): *Produkcija fikobilinskih pigmenata kod potencijalno toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija.* Završni rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
428. Porter, S.C. (2001): Chinese loess record of monsoon climate during the last glacial–interglacial cycle. *Earth Science Reviews* 54: 115-128.
429. Porter, S.C., Hallet, B., Wu, X.H., An, Z.S. (2001): Dependence of nearsurface magnetic susceptibility on dust accumulation rate and precipitation on the Chinese Loess plateau. *Quaternary Research* 55: 271-283.
430. Portwich, A., Garcia-Pichel, F. (2000): A novel prokaryotic UV-B photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 61912. *Photochemistry Photobiology* 71: 493-498.
431. Potts, M. (1996): The anhydrobiotic cyanobacterial cell. *Plant Physiology* 97: 788-794.
432. Potts, M. (1999): Mechanism of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 319-328.
433. Potts, M. (2000): Nostoc. Chapter 17, In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.* Kluwer, Dordrecht, pp. 465-504.
434. Proteau, P.J., Gerwick, W.H., Garcia-Pichel, F., Castenholz, R. (1993): The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia* 49: 825-829.
435. Pumas, C., Vacharapiyasophon, P., Peerapornpisal, Y., Leelapornpisid, P., Boonchum, W., Ishii, M., Khanongnuch, C. (2011): Thermostability of phycobiliproteins and antioxidant activity from four thermotolerant cyanobacteria. *Phycological Research* 59: 166-174.
436. Pushkareva, E., Pessi, I.S., Wilmotte, A., Elster, J. (2015): Cyanobacterial community composition in Arctic soil crusts at different stages of development. *FEMS Microbiology Ecology* 91(12): fiv143.
437. Pye, K. (1995): The Nature, origin, and accumulation of loess. *Quaternary Science Reviews* 14: 653-668.
438. Qiu, B.S., Zhang, A.H., Liu, Z.L., Gao, K.S. (2004): Studies on the photosynthesis of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* subjected to desiccation and subsequent rehydration. *Phycologia* 43: 521-528.
439. Quesada, A., Vincent, W.F. (1997): Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *European Journal of Phycology* 32: 335-342.
440. Quinlan, R., Douglas, M.S.V., Smol, J.P. (2005): Food web changes in arctic ecosystems related to climate warming. *Global Change Biology* 11: 1381-1386.
441. Raghimi, M., Ramezani Mojaveri, M. (2006): Investigation of esophageal cancer with medical geology aspect in Golestan Province, Iran. *Chinese Journal of Geochemistry* 25: 58-59.



442. Raghimi, M., Ramezani Mojaveri, M. (2007): Esophageal cancer with medical geology aspect in Golestan province, Iran. *Journal of Gorgan University of Medical Science* 8: 50-57.
443. Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K., Niemela, S.I. (1994): Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Letters in Applied Microbiology* 19(6): 423-428.
444. Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I. (1997): Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* sp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63(6): 2206-2212.
445. Rapala, J. (1998): Toxin production by freshwater cyanobacteria: effects of environmental factors. Ph.D. Thesis, University of Helsinki, Helsinki.
446. Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K., Lahti, K., Hoppu, K., Lepistö, L. (2005): First report of saxitoxin in Finnish Lakes and possible associated effects on human health. *Environmental Toxicology* 20: 331-340.
447. Rashid, F., Khan, R.N., Iftikhar, S.Y. (2010): Probing the link between estrogen receptors and esophageal cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 8: 1-9.
448. Rasmussen, B., Fletcher, I.R., Brocks, J.J., Kilburn, M.R. (2008): Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 23: 1101-1104.
449. Rastogi, R.P., Sinha, R.P. (2009): Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 27: 521-539.
450. Rastogi, R.P., Richa, Sinha, R.P., Singh, S.P., Häder, D.-P. (2010a): Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37: 537-558.
451. Rastogi, R.P., Richa, Singh, S.P., Häder, D.-P., Sinha, R.P. (2010b): Mycosporine-like amino acids profile and their activity under PAR and UVR in a hot-spring cyanobacterium *Scytonema* sp. HKAR-3. *Australian Journal of Botany* 58: 286-293.
452. Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Incharoensakdi, A. (2013): Partial characterization, UV-induction and photoprotective function of sunscreen pigment, scytonemin from *Rivularia* sp. HKAR-4. *Chemosphere* 93(9): 1874-1878.
453. Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A. (2014a): UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 130: 287-292.
454. Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A. (2014b): Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 244-256.
455. Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A. (2014c): Analysis of UV-absorbing photoprotectant mycosporine-like amino acid (MAA) in the cyanobacterium *Arthrospira* sp. CU2556. *Photochemistry and Photobiology Science* 13, 1016.
456. Rastogi, R.P., Sonani, R.R., Madamwar, D. (2014): The high-energy irradiation protectant extracellular sheath pigment scytonemin and its reduced counterpart in the cyanobacterium *Scytonema* sp. R77DM. *Bioresource Technology* 171: 396-400.
457. Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A. (2015): Occurrence and induction of a ultraviolet-absorbing substance in the cyanobacterium *Fischerella muscicola* TISTR8215. *Phycological Research* 63: 51-55.

458. Rastogi, R.P., Sonani, R.R., Madamwar, D. (2015): Physico-chemical factors affecting the *invitro* stability of phycobiliproteins from *Phormidium rubidum* A09DM. *Bioresource Technology* 190: 219-226.
459. Rastogi, R.P., Sonani, R.R., Madamwar, D., Incharoensakdia, A. (2016): Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. *Algal Research* 16: 110-118.
460. Rath, J., Mandal, S., Adhikary, S.P. (2012): Salinity induced synthesis of UV-screening compound scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 115: 5-8.
461. Ressom, R., Soong, S.F., Fitzgerald, J., Turczynowicz, L., El Saadi, O., Roder, D., Maynard, T., Falconer, I. (1994): Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). Australian Government Publishing Service, Canberra, pp. 27-69.
462. Reuss, N. (2005): Sediment pigments as biomarkers of environmental change. PhD Thesis, Faculty of Science University of Copenhagen, pp. 33. ISBN: 87-7772-856-4
463. Reuss, N., Leavitt, P.R., Hall, R.I., Bigler, C., Hammarlund, D. (2010): Development and application of sedimentary pigments for assessing effects of climatic and environmental changes on subarctic lakes in northern Sweden. *Journal of Paleolimnology* 43(1): 149-169.
464. Reynolds, C.S. (2006): The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press.
465. Rezanka, T., Temina, M., Tolstikov, A.G., Dembitsky, V.M. (2004): Natural microbial UV radiation filters – mycosporine-like amino acids. *Folia Microbiology* 49(4): 339-352.
466. Richa, M.K., Sinha, R.P. (2011): Antioxidants as natural arsenal against multiple stresses in cyanobacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2: B168-B187.
467. Richardson, L.L., Castenholz, R.W. (1987): Diel Vertical Movements of the Cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* in a Sulfide-Rich Hot Spring Microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology* 53(9): 2142-2150.
468. Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., Thomas, J.-C. (2001): Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 183(10): 2989-2994.
469. Richer, R., Banack, S.A., Metcalf, J.S., Cox, P.A. (2015): The persistence of cyanobacterial toxins in desert soils. *Journal of Arid Environments* 112 (Part B): 134-139.
470. Richmond, A. (1985): Microalga culture. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 4(4): 369-438.
471. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
472. Rinehart, K.L., Harada, K.-I., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Mulligan, P.E., Beasley, V.R., Dahlem, A.M., Carmichael, W.W. (1988): Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 110(25): 8557-8558.
473. Rodrigue, D.C., Etzel, R.A., Hall, S., De Porras, E., Velasquez, O.H., Tauxe, R.V., Kilbourne, E.M., Blake, P.A. (1990): Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *Amer J of Trop Med and Hygiene*. 42: 267-271.

474. Romero-Viana, L., Keely, B.J., Camacho, A., Vicente, E., Miracle, M.R. (2010): Primary production in Lake La Cruz (Spain) over the last four centuries: reconstruction based on sedimentary signal of photosynthetic pigments. *Journal of Paleolimnology* 43: 771-786.
475. Roshan, S.K., Farhangi, M., Emtyazjoo, M., Rabbani, M. (2015): Effects of solar radiation on pigmentation and induction of a mycosporine-like amino acid in two cyanobacteria, *Anabaena* sp. and *Nostoc* sp. ISC26. *European Journal of Phycology* 50(2): 173-181.
476. Rosic, N.N., Dove, S. (2011): Mycosporine-like amino acids from coral Dinoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology* 77(24): 8478-8486.
477. Rossignol, J., Moine, O., Rousseau, D.-D. (2004): The Buzzard's Roost and Eustis mollusc sequences: comparison between the paleoenvironments of two sites in the Wisconsinan loess of Nebraska, USA. *Boreas* 33: 145-154.
478. Rousseau, D.-D., Kukla, G. (1994): Late Pleistocene climate record in the Eustis loess section, Nebraska, based on land snail assemblages and magnetic susceptibility. *Quaternary Research* 42: 176-187.
479. Rousseau, D.-D., Kukla, G. (2000): Abrupt retreat of summer monsoon at the S1/L1 boundary in China. *Global and Planetary Change* 26: 189-198.
480. Rousseau, D.-D., Wu, N., Guo, Z. (2000): The terrestrial mollusks as new indices of the Asian paleomonsoons in the Chinese loess plateau. *Global and Planetary Change* 26: 199-206.
481. Rousseau, D.-D., Gerasimenko, N., Matviischina, Z., Kukla, G.J. (2001): Late Pleistocene environments of the Central Ukraine. *Quaternary Research* 56(3): 349-356.
482. Rozema, J., Noordijk, A.J., Broekman, A., van Beem, A., Meijkamp, B.M., De Bakker, N.V.J., Van de Staaij, J.W.M., Stroetenga, M., Bohncke, S.J.P., Konert, M., Kars, S., Peat, H., Smith, R.I.L., Convey, P. (2002): (Poly)phenolic compounds in pollen and spores of Antarctic plants as indicators of solar UV-B. In: Rozema, J., Maneta, Y., Björn, L.-O. (Eds.), *Response of Plants to UV-B irradiation*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 9-26.
483. Ruebhart, D.R. (2008): Alternative bioassays for the detection of cyanotoxins. PhD thesis, School of Public Health, Griffith Health, Griffith University.
484. Ruhe, R.V. (1969): *Quaternary Landscapes in Iowa*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 255.
485. Rybak, M., Dickman, M. (1988): Paleoecological reconstruction of changes in the productivity of a small, meromictic lake in Southern Ontario, Canada. *Hydrobiologia* 169(3): 293-306.
486. Sachs, J.P., Pahnke, K., Smittenberg, R., Zhang, Z. (2007): Biomarker indicators of past climate. *QUAT 00313*, pp. 1-7.
487. Saadatmand, S., Zamani, M. (2015): Investigating the effect of different concentrations of nitrate and phosphate on the quantity of mycosporine like amino acids production and growth in *Spirulina platensis*. *International Journal of Biosciences* 6(5): 63-69.
488. Saitou, T., Sugiura, N., Itayama, T., Inamori, Y., Matsumura, M. (2002): Degradation of microcystin by biofilms in practical treatment facility. *Water Sci. Technol.* 46: 237-244.

489. Sanger, J.E. (1988): Fossil pigments in paleoecology and paleolimnology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 62: 343-359.
490. Savichtcheva, O., Debroas, D., Kurmayer, R., Villar, C., Jenny, J.P., Arnaud, F., Perga, M.E., Domaizon, I. (2011): Quantitative PCR enumeration of total/toxic *Planktothrix rubescens* and total cyanobacteria in preserved DNA isolated from lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 77(24): 8744-8753.
491. Sayfritz, S.J., Aasen, J.A., Aune, T. (2008): Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry. *Toxicon* 52(2): 330-340.
492. Schatz, A.-K., Zech, M., Buggle, B., Gulyás, S., Hambach, U., Marković, S.B., Sümegei, P., Scholten, T. (2011): The late Quaternary loess record of Tokaj, Hungary: Reconstructing palaeoenvironment, vegetation and climate using stable C and N isotopes and biomarkers. *Quaternary International, The Second Loessfest (2009)* 240: 52-61.
493. Schefuss, E., Schouten, S., Schneider, R.R. (2005): Climatic controls on central African hydrology during the past 20,000 years. *Nature* 437: 1003-1006.
494. Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P. (2001): Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16: 413-421.
495. Schenk, H.E.A., Kuhfittig, G. (1983): Elektromorphe Phycocyanoproteid-Muster: Eine Taxonomische Identifikationsmethode für Cyanobakterien. *Biochem System Ecol* 11: 163-174.
496. Scherer, S., Chen, T.W., Böger, P. (1988): A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiology* 88: 1055-1057.
497. Schopf, J.W., Walter, M.R. (1982): Archean microfossils: New evidence of ancient microbes. In: Schopf, J.W. (Ed.), *Origin and Evolution of Earth's Earliest Biosphere: An Interdisciplinary Study*. Princeton Univ. Press, Princeton, N.J, pp. 214-239.
498. Schopf, J.W. (1996): Metabolic memories of Earth's earliest biosphere. In: Marshall, C.R., Schopf, J.W. (Eds.), *Evolution and the molecular revolution*. Jones and Bartlett, Boston, pp. 73-105.
499. Schreuder, L.T., Beets, C.J., Prins, M.A., Hatté, C., Peterse, F. (2016): Late Pleistocene climate evolution in Southeastern Europe recorded by soil bacterial membrane lipids in Serbian loess. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 449: 141-148.
500. Schulz, K., Mikhailyuk, T., Dreßler, M., Leinweber, P., Karsten, U. (2015): Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microbial Ecology* 71(1): 178-193.
501. Schwarz, R., Grossman, A.R. (1998): A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 1108-1113.
502. Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., Shaw, G. (2007): First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) *Speziale and Dyck. Harmful Algae* 6: 73-80.
503. Shams, S., Capelli, C., Cerasino, L., Ballot, A. (2015): Anatoxin-a producing *Tychonema* (cyanobacteria) in European waterbodies. *Water Research* 69: 68-79.

504. Sharifi, N. (2011): Relationship between incidence of esophageal cancer in Maravehtapeh region (Northeast of Iran - Golestan province) and concentration of trace elements in sediments. Conference paper, Goldschmidt.
505. Sharma, R., Chahar, O. P., Bhatnagar, M., Bhatnagar, A. (2013): Impact of osmotic stress and temperature on pigments and proteins of *Anabaena* strains. *Journal of Environmental Biology* 34(5): 941-943.
506. Sheldon, N.D., Tabor, N.J. (2009): Quantitative paleoenvironmental and paleoclimatic reconstruction using paleosols. *Earth-Science Reviews* 95(1-2): 1-52.
507. Sherman, D.M., Sherman, L.A. (1983): Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastructure of *Anacystis nidulans*. *Journal of Bacteriology* 156(1): 393-401.
508. Shi, C., Zhu, R., Glass, B.P., Liu, Q., Zeman, A., Suchy, V. (2003): Climate variations since the last interglacial recorded in Czech loess. *Geophysical Research Letters* 30(11): 1562.
509. Shibata, K. (1969): Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living on the Great Barrier Reef. *Plant Cell Physiology* 10: 325-335.
510. Shick, J.M., Dunlap, W.C. (2002): Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Plant Physiology* 64: 223-262.
511. Shields, L.M., Drouet, F. (1962): Distribution of terrestrial algae within the Nevada test site. *American Journal of Botany* 49: 547-554.
512. Shields, L.M., Durrell, L.W. (1964): Algae in relation to soil fertility. *The Botanical Review* 30: 92-128.
513. Sidler, W.A. (1994): Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In: Bryant, D.A. (Ed.), *The molecular biology of cyanobacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 1. Springer, Dordrecht, pp. 139-216.
514. Silva, C.S., Genuário, D.B., Vaz, M.G., Fiore, M.F. (2014): Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. *Systematic and Applied Microbiology* 37(2): 100-112.
515. Simeunović, J. (2005): Kolekcija kultura cijanobakterija. Zadužbina Andrejević, Beograd, pp. 102.
516. Simeunović, J. (2009): Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
517. Simeunović, J., Bešlin, K., Svirčev, Z., Kovač, D., Babić, O. (2013): Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. *Journal of Applied Phycology* 25(2): 597-607.
518. Simoneit, B.R.T. (2004): Biomarkers (molecular fossils) as geochemical indicators of life. *Advances in Space Research* 33(8): 1255-1261.
519. Singer, M.J., Verosub, K.L. (2007): Mineral magnetic analysis. In: Elias, S. (Ed.), *The Encyclopedia of Quaternary Sciences*. Elsevier, Amsterdam, pp. 2096-2102.
520. Singh, D.P., Kumar, A., Tyagi, M.B. (2003): Biotoxic cyanobacterial metabolites exhibiting pesticidal and mosquito larvicidal activities. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 50-56.
521. Singh, S.P., Kumari, S., Rastogi, R.P., Singh, K.L., Sinha, R.P. (2008a): Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian Journal of Experimental Biology* 46(1): 7-17.

522. Singh, S.P., Klisch, M., Sinha, R.P., Häder, D.-P. (2008b). Effect of abiotic stressors on synthesis of mycosporine-like amino acid shinorine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC7937. *Photochemistry and Photobiology* 84: 1500-1505.
523. Singh, S.P., Häder, D.-P., Sinha, R.P. (2010): Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Research Reviews* 9: 79-90.
524. Sinha, R.P., Kumar, H.D., Kumar, A., Häder, D.-P. (1995): Effects of UV-B irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria. *Acta Protozoologica* 34: 187-192.
525. Sinha, R.P., Singh, N., Kumar, A., Kumar, H.D., Häder, M., Häder, D.-P. (1996): Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 32: 107-113.
526. Sinha, R.P., Klisch, M., Gröniger, A., Häder, D.-P. (1998): Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 47: 83-94.
527. Sinha, R.P., Klisch, M., Gröniger, A., Häder, D.-P. (2000): Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*-effects of UV and heat. *Environmental and Experimental Botany* 43: 33-43.
528. Sinha, R.P., Klisch, M., Helbling, W.E., Häder, D.-P. (2001): Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *Photochemistry and Photobiology B: Biology* 60: 129-135.
529. Sinha, R.P., Häder, D.-P. (2002): Life under solar UV irradiation in aquatic organisms. *Advances in Space Research* 30(6): 1547-1556.
530. Sinha, R.P., Keshari, G., Kumari, S., Singh, S.P., Rastogi, R.P., Singh, K.L. (2006): Screening of mycosporine like amino acids (MAAs) in cyanobacteria. *Modern Journal of Life Sciences* 5: 1-6.
531. Sinha, R.P., Singh, S.P., Häder, D.-P. (2007): Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 89: 29-35.
532. Sinha, R.P., Häder, D.-P. (2008): UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science* 174: 278-289.
533. Sinha, R.P., Kumari, S., Rastogi, R.P. (2008): Impacts of ultraviolet-B radiation on cyanobacteria: photoprotection and repair. *Journal of Scientific Research* 52: 125-142.
534. Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M., Rinehart, K.L., Kiviranta, J., Niemela, S.I. (1989): Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55(8): 1990-1995.
535. Sivonen, K. (1990): Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2658-2666.
536. Sivonen, K., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., Rinhart, K.L., Dahlem, A.M., Niemela, S.I. (1990): Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9): 2650-2657.

537. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Färdig, M., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992a): Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins from *Nostoc* sp. strain 152. *Chemical Research in Toxicology* 5(4): 464-469.
538. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, R., Rinehart, K.L. (1992b): Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2495-2500.
539. Sivonen, K., Jones, G. (1999): Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management*. E&FN Spon, London, pp. 41-111.
540. Sivonen, K. (2009): Cyanobacterial Toxins. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). pp. 290-307.
541. Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Andersen, R.A., Matsunaga, S., Moore, R.E., Skulberg, R. (1992): Investigations of a neurotoxic oscillatorian strain (*Cyanophyceae*) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 321-329.
542. Smalley, I. (1995): Making the material: The formation of siltsized primary mineral particles for loess deposits. *Quaternary Science Reviews* 14: 645-651.
543. Smalley, I.J., Marković, S., O'Hara-Dhand, K., Wynn, P. (2010): A man from Bendery: L.S.Berg as geographer and loess scholar. *Geologos* 16: 111-119.
544. Smalley, I.J., Marković, S.B., Svirčev, Z. (2011): Loess is [almost totally formed by] the accumulation of dust. *Quaternary International* 240: 4-11.
545. Smayda, T.J. (1974): Some experiments on the sinking characteristics of two freshwater diatoms. *Limnology and Oceanography* 19: 628-635.
546. Smol, J.P., Birks, H.J.B., Last, W.M. (Eds.) (2001): Tracking environmental change using lake sediments. Terrestrial, algal, and siliceous indicators, vol 3. Kluwer, Dordrecht.
547. Smol, J.P., Wolfe, A.P., Birks, H.J.B., Douglas, M.S.V., Jones, V.J., Korhola, A., Pienitz, R., Rühland, K., Sorvari, S., Antoniades, D., Brooks, S.J., Fallu, M., Hughes, M., Keatley, B.E., Laing, T.E., Michelutti, N., Nazarova, L., Nyman, M., Paterson, A.M., Perren, B., Quinlan, R., Rautio, M., Saulnier-Talbot, E., Siitonen, S., Solovieva, N., Weckstrom, J. (2005): Climate-driven regime shifts in the biological communities of arctic lakes. *Proc Natl Acad Sci USA PNAS* 102: 4397-4402.
548. Sommaruga, R. (2001): The role of solar UV irradiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 62(1-2): 35-42.
549. Soule, T., Stout, V., Swingley, W.D., Meeks, J.C., Garcia-Pichel, F. (2007): Molecular genetics and genomic analysis of scytonemin biosynthesis in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Journal of Bacteriology* 189(12): 4465-4472.
550. Spooft, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J. (2003): Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin, in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1020: 105-119.
551. Spooft, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Meriluoto, J. (2006): First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology* 21: 552-560.

552. Spooof, L., Catherine, A. (2017): Appendices 3. In: Meriluoto, J., Spooof, L., Codd, G.A. (Eds.), Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Wiley publisher.
553. Sprafke, T., Obreht, I. (2016): Loess: Rock, sediment or soil – What is missing for its definition? Quaternary International, Kukla Loessfest 399: 198-207.
554. Squier, A.H., Hodgson, D.A., Keely, B.J. (2002): Sedimentary pigments as markers for environmental change in an Antarctic lake. Organic Geochemistry 33: 1655-1665.
555. Squier, A.H. Airs, R.L. Hodgson, D.A. Keely, B.J. (2004): Atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography/mass spectrometry of the ultraviolet screening pigment scytonemin: characteristic fragmentations. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18: 2934-2938.
556. Stanier, R.Y., Sistrom, W.R., Hansen, T.A., Whitton, B.A., Castenholz, R.W., Pfennig, N., Gorlenko, N., Kondratieva, E., Eimhjellen, K.E., Whittenbury, R., Gherna, R.L., Trüper, H.G. (1978): Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 28: 335-336.
557. Stevens, S.E., Poane, D.A.M. (1981): Accumulation of cyanophycin granules as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum*. Plant Physiol. 67: 716-719.
558. Stevens, T., Marković, S.B., Zech, M., Hambach, U., Sümegi, P. (2011): Dust deposition and climate in the Carpathian Basin over an independently dated last glacial–interglacial cycle. Quaternary Science Reviews 30: 662-681.
559. Stewart, I. (2004): Recreational exposure to freshwater cyanobacteria: epidemiology, dermal toxicity and biological activity of cyanobacterial lipopolysaccharides. PhD thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Queensland, pp.1-418.
560. Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R. (2006): Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health—a review. Environ Health: A Global Access Science Source 5: 7.
561. Strom, R.G. (Ed.) (2007): Hot House (Global Climate Change and the Human Condition). Copernicus, Springer-Verlag New York, pp. 255. DOI: 10.1007/978-0-387-68611-0
562. Summons, R.E., Amend, J.P., Bish, D., Buick, R., Cody, G.D., Des Marais, D.J., Dromart, G., Eigenbrode, J.L., Knoll, A.H., Sumner, D.Y. (2011): Preservation of martian organic and environmental records: final report of the Mars biosignature working group. Astrobiology 11(2): 157-181.
563. Sun, X.J., Song, C.Q., Wang, F.Y., Sun, M. (1997): Vegetation history of the loess plateau of China during the last 100,000 years based on pollen data. Quaternary International 37: 25-36.
564. Suter, G.W., Holzwarth, A.R. (1987): A kinetic model for the energy transfer in phycobilisomes. Biophysical Journal 52: 673-683.
565. Svetska Zdravstvena Organizacija, SZO. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Routledge, London and New York.
566. Svetska Zdravstvena Orgnizacija, SZO. (2003): Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. WHO, Geneva.



567. Svirčev, Z. (1992): Morfološka i ekofiziološka svojstva azotofiksirajućih zemljišnih cijanobakterija i mogućnost njihove primene kao biofertilizatora. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
568. Svirčev, Z. (2005): Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji. Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad.
569. Svirčev, Z., Četojević-Simin, D., Simeunović, J., Karaman, M., Stojanović, D. (2008): Antibacterial, antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. *Science in China Series C-Life Sciences* 51(10): 941-947.
570. Svirčev, Z., Marković, S.B., Stevens, T., Codd, G.A., Smalley, I., Simeunović, J., Obreht, I., Dulić, T., Pantelić, D., Hambach, U. (2013): Importance of biological loess crusts for loess formation in semi-arid environments. *Quaternary International* 296: 206-215.
571. Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Pantelić, D., Dulić, T. (2013a): Cyanobacterial blooms and their toxicity in Vojvodina lakes, Serbia. *International Journal of Environmental Research* 7(3): 745-758.
572. Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V. (2013b): Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. 14th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment. ICCE 2013, Barcelona, June 25-28. Book of abstracts.
573. Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Lužanin, Z., Munjas, A.M., Nikolin, B., Vuleta, D., Meriluoto, J. (2014): Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 32(4): 319-337.
574. Svirčev, Z., Nikolić, B., Vukić, V., Marković, S.B., Gavrilov, M.B., Smalley, I.J., Obreht, I., Vukotić, B., Meriluoto, J. (2016): Loess and life out of Earth? *Quaternary International* 399: 208-217.
575. Svrcek, C., Smith, D.W. (2004): Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3: 155-185.
576. Szymczak-Żyła, M., Kowalewska, G., Breedveld, G.D. (2017): Chloropigments in deep marine sediments as proxies of climate change-driven eutrophication. Conference paper, 'Climate Change Impact on Ecosystem Health - Marine Sediment Indicators', 02.2014-01.2017., Kraków.
577. Takayuki, A., Miyuki, N., Kyoko, A., Hiroshi, S. (1992): Isolation and structure of a UV absorbing substance from the marine bacterium *Micrococcus* sp. MBI Report.
578. Talbot, M.R., Allen, P.A. (1996): Sedimentary environments: processes, facies and stratigraphy. Blackwell Science, Oxford. 3rd ed. Chapter 4. pp. 83-124.
579. Tanga, Y., Jiab, J., Xiea, X. (2003): Records of magnetic properties in Quaternary loess and its paleoclimatic significance: a brief review. *Quaternary International* 108: 33-50.
580. Tegen, I. (2003): Modelling the aerosol dust cycle in the climate system. *Quaternary Science Reviews* 22: 1821-1834.
581. Terhorst, B., Kühn, P., Damm, B., Hambach, U., Meyer-Heintze, S., Sedov, S. (2014): Paleoenvironmental fluctuations as recorded in the loess-paleosol sequence of the Upper Paleolithic site Krems-Wachtberg. *Quaternary International* 351: 67-82.

582. Tierney, J.E., Russell, J.M., Huang, Y., Sinninghe Damsté, J.S., Hopmans, E.C., Cohen, A.S. (2008): Northern Hemisphere controls on tropical Southeast African climate during the past 60,000 years. *Science* 322: 252-255.
583. Ting, C.S., Rocap, G., King, J., Chisholm, S.W. (2002): Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *TRENDS in Microbiology* 10(3): 134-142.
584. Tirkey, J., Adhikary, S.P. (2005): Cyanobacteria in biological soil crusts of India. *Curr. Sci. India*. 89: 515-521.
585. Tokodi, N. (2016): Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije. Doktorska disertacija. Prirodno - matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
586. Tsoar, H., Pye, K. (1987): Dust transport and the question of desert loess formation. *Sedimentology* 34: 139-153.
587. Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M.F., Suzuki, M., Harada, K.I. (1994): Stability of microcystins from cyanobacteria: II Effect of light on decomposition and isomerization. *Environmental Science & Technology* 28(1): 173-177.
588. Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Suzuki, S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K. (1995): Stability of microcystins from cyanobacteria-II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 33(12): 1619-1631.
589. Ueno, Y., Nagatai, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M., Park, H., Chen, G., Chen, G., Yu, S. (1996): Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17(6): 1317-1321.
590. Vaccari, D.A., Strom, P.F., Alleman, J.E. (2005): Environmental biology for engineers and scientists. John Wiley & Sons, Science, pp. 688.
591. Van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I. (2007): Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 7-60.
592. Van den Ancker, J.A.M., Jungerius, P.D., Mur, L.R. (1985): The role of algae in the stabilization of coastal dune blowouts. *Earth Surface Processes and Landforms* 10: 189-192.
593. Vandenberghe, J., Huijzer, B., Mùcher, H., Laan, W. (1998): Short climatic oscillations in a western European loess sequence (Kesselt, Belgium). *Journal of Quaternary Science* 13: 471-485.
594. Vandenberghe, J., Marković, S.B., Jovanović, M., Hambach, U. (2014): Site-specific variability of loess and palaeosols (Ruma, Vojvodina, northern Serbia). *Quaternary International* 334-335, 86-93.
595. Varnali, T., Edwards, H.G.M., Hargreaves, M.D. (2009): Scytonemin: molecular structural studies of a key extremophilic biomarker for astrobiology. *International Journal of Astrobiology* 8(2): 133-140.
596. Varnali, T., Edwards, H.G.M. (2010): Ab initio calculations of scytonemin derivatives of relevance to extremophile characterization by Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 368(1922): 3193-3203.
597. Vasiljević, Đ.A., Marković, S.B., Hose, T.A., Ding, Z., Guoc, Z., Liud, X., Smalley, I., Lukić, T., Vujičić M.D. (2014): Loess–palaeosol sequences in China and Europe: Common values and geoconservation issues. *Catena* 117: 108-118.

598. Vasiljević, Đ. (2015): Geodiverzitet i geonasleđe Vojvodine u funkciji zaštite i turizma. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
599. Verleyen, E., Hodgson, D.A., Sabbe, K., Vyverman, W. (2005): Late Holocene changes in ultraviolet irradiation penetration recorded in an East Antarctic lake. *Journal of Paleolimnology* 34: 191-202.
600. Verosub, K.L., Fine, P., Singer, M.J., TenPas, J. (1993): Pedogenesis and paleoclimate: interpretation of the magnetic susceptibility record of Chinese loess–paleosol sequences. *Geology* 21: 1011-1014.
601. Viaggiu, E., Melchiorre, S., Volpi, F., Di Corcia, A., Mancini, R., Garibaldi, L., Crichigno, G., Bruno, M. (2004): Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. *Environmental Toxicology* 19(3): 191-197.
602. Vining, L.C. (1992): Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity—A review. *Gene* 115(1-2): 135-140.
603. Vinogradska, T.A. (1974): Distribution and ecology of rare and interesting species of blue-green algae. *Ukr. Bot. Rev.* 31: 733-739.
604. Vítek, P., Edwards, H.G., Jehlička, J., Ascaso, C., De los Ríos, A., Valea, S., Jorge-Villar, S.E., Davila, A.F., Wierzchos, J. (2010): Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 368: 3205-3221.
605. Vítek, P., Jehlička, J., Ascaso, C., Mašek, V., Gómez-Silva, B., Olivares, H., Wierzchos, J. (2014): Distribution of scytonemin in endolithic microbial communities from halite crusts in the hyperarid zone of the Atacama Desert, Chile. *FEMS Microbiol Ecol* 90: 351-366.
606. Wada, N., Sakamoto, T., Matsugo, S. (2013): Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. *Metabolites* 3(2): 463-483.
607. Wang, L., Yang, H.Y., Zheng, Y.Q. (2012): Personalized medicine of esophageal cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 8: 343-347.
608. Wanner, G., Henkelman, G., Schmidt, A., Kost, P. (1986): Nitrogen and sulfur starvation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 An Ultrastructural, Morphometrical, and Biochemical Comparison. 41(7-8): 741-750. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-1986-7-814>
609. Waterbury, J.B., Rippka, R. (1989): The order Chroococcales Wettstein 1924, emend. Rippka et al., 1979. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holts, J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins Baltimore, 3: 1728-1746.
610. Waters, M.N. (2016): A 4700-year history of cyanobacteria toxin production in a shallow subtropical lake. *Ecosystems* 19: 426-436.
611. Weise, G., Drews, G., Jann, B., Jann, K. (1970): Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green algae *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology* 71: 89-98.
612. Welgama, A. (2009): Novel bacterial strains clear algal toxins from drinking water. *Society for General Microbiology. Science Daily*.

613. Welker, M., Steinberg, C. (2000): Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural waters. *Environmental Science & Technology* 34(16): 3415-3419.
614. Wells, P.V., Stewart, J.D. (1987): Cordilleran-boreal taiga and fauna on the central Great Plains of North America, 14,000–18,000 years ago. *American Midland Naturalist* 118: 94-106.
615. Westrick, J.A., Szlag, D.C., Southwell, B.J., Sinclair, J. (2010): A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 1705-1714.
616. White, D.A., Polimene, L., Llewellyn, C.A. (2011): Effects of UVA radiation and nutrient availability on the cellular composition of photoprotective compounds in *Glenodinium foliaceum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 47: 1078-1088.
617. Whitehead, K., Karentz, D., Hedges, J.I. (2001): Mycosporine-like amino acids (MAAs) in phytoplankton, a herbivorous pteropod (*Limacina helicina*), and its pteropod predator (*Clione antarctica*) in McMurdo Bay, Antarctica. *Marine Biology* 139: 1013-1019.
618. Whitehead, K., Hedges, J.I. (2002): Analysis of mycosporine-like amino acids in plankton by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Mar Chem* 80: 27-39.
619. Whitehead, K., Hedges, J.I. (2003): Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17(18): 2133-2138.
620. Whitehead, K., Hedges, J.I. (2005): Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 80: 115-121.
621. Whitton, B.A. (1973): Freshwater plankton. In: Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P., Walsby, A.E. (Eds.), *The Blue-green algae*. Academic Press, London, pp. 353-367.
622. Whitton, B.A., Potts, M. (2000): *The ecology of cyanobacteria-Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers.
623. Whitton, B.A., Potts, M. (2002): Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, USA, pp.1. ISBN: 0-30646855-7
624. Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A. (2010): Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8: 2185-2211.
625. Winter, Y.D., Lowenstein, T.K., Timofeeff, M.N. (2013): Identification of carotenoids in ancient salt from Death Valley, Saline Valley, and Searles Lake, California, using laser raman spectroscopy. *Astrobiology* 13: 1065-1080.
626. Wolk, C.P. (1980): Cyanobacteria (Blue-green algae). In: Strumpf, P.K., Conn, E.E. (Eds.), *The Biochemistry of Plants, Volume 1*. Academic Press, New York, pp. 659-687.
627. Wood, S.A., Heath, M.W., Holland, P.T., Munday, R., McGregor, G.B., Ryan, K.G. (2010): Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon* 55(4): 897-903.

628. Wright, D.J., Smith, S.C., Joardar, V., Scherer, S., Jervis, J., Warren, A., Helm, R.F., Potts, M. (2005): UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (cyanobacteria). *Journal of Biological Chemistry* 280: 40271-40281.
629. Wu, N.Q., Lu, H.Y., Sun, X.J., Guo, Z.T., Liu, J.Q., Han, J.M. (1995b): Climatic factor transfer function from opal phytolith and its application in paleoclimate reconstruction of China loess-paleosol sequence. *Scientia Geologica Sinica, Supplementary Issue (1)*: 105-114.
630. Wynn-Williams, D.D., Edwards, H.G.M., Garcia-Pichel, F. (1999): Functional biomolecules of Antarctic stromatolitic and endolithic cyanobacterial communities. *European Journal of Phycology* 34(4): 381-391.
631. Wynn-Williams, D.D. (2000): Cyanobacteria in desert-life at the limit. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 341-366.
632. Wynn-Williams, D.D., Edwards, H.G.M., Newton, E.M. (2000): Raman spectroscopy of microhabitats and microbial communities: Antarctic desert and Mars analogues. *Lunar and planetary sciences XXXI*. Abstract no. 1015. Lunar and Planetary Institute, Houston.
633. Xie, S.P., Hafner, J., Tanimoto, Y., Liu, W.T., Tokinaga, H., Xu, H. (2002): Bathymetric effect on the winter sea surface temperature and climate of the yellow and East China seas. *Geophysical Research Letters* 29(24): 81-1 – 81-4.
634. Xu, H.F., Chen, T. (2008): Microbe-templated calcite nanofibers in Chinese Loess Plateau: Potential carbon dioxide sinker. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 72, A1046.
635. Yadav, S., Sinha, R.P., Tyagi, M.B., Kumar, A. (2011): Cyanobacterial secondary metabolites. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(2): B-144 – B167.
636. Yoshida, T., Makita, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Sekijima, M., Tamura, S., Ueno, Y. (1997): Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Nat Toxins* 5: 91-95.
637. Zastepa, A., Pick, F.R., Blais, J.M. (2014): Fate and persistence of particulate and dissolved microcystin-LA from *Microcystis* blooms. *Int. J. Hum. Ecol. Risk Assess.* 20: 1670-1686.
638. Zastepa, A., Pick, F.R., Blais, J.M., Saleem, A. (2015): Analysis of intracellular and extracellular microcystin variants in sediments and pore waters by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 872: 26-34.
639. Zastepa, A., Taranu, Z.E., Kimpe, L.E., Blais, J.M., Gregory-Eaves, I., Zurawell, R.W., Pick, F.R. (2017): Reconstructing a long-term record of microcystins from the analysis of lake sediments. *Science of the Total Environment* 579: 893-901.
640. Zech, M., Zech, R., Glaser, B. (2007): A 240 000-year stable carbon and nitrogen isotope record from a loess-like palaeosol sequence in the Tumara Valley, Northeast Siberia. *Chemical Geology* 242(3-4): 307-318.
641. Zech, M., Andreev, A., Zech, R., Müller, S., Hambach, U., Frechen, M., Zech, W. (2010): Quaternary vegetation changes derived from a loess-like permafrost palaeosol sequence in northeast Siberia using alkane biomarker and pollen analyses. *Boreas* 39: 540-550.

642. Zech, M., Zech, R., Bugge, B., Zöller, L. (2011): Novel methodological approaches in loess research – interrogating biomarkers and compound-specific stable isotopes. *Quaternary Science Journal* 60(1): 170-187.
643. Zech, R., Huang, Y., Zech, M., Tarozo, R., Zech, W. (2011a): High carbon sequestration in Siberian permafrost loess-paleosols during glacials. *Climate of the Past* 7: 501-509.
644. Zech, R., Zech, M., Marković, S., Hambach, U., Huang, Y. (2013): Humid glacials, arid interglacials? Critical thoughts on pedogenesis and paleoclimate based on multi-proxy analyses of the loess-paleosol sequence Crvenka, Northern Serbia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 387: 165-175.
645. Zhang, W., Fang, T., Xu, X. (2000): Study on photodegradation of cyanobacterial toxin in blooms of Dianchi Lake. *Zhongguo Huanjing Kexue* 21(1): 1-3.
646. Zhang, Z., Tashiro, Y., Matsukawa, S., Ogawa, H. (2005): Influence of pH and temperature on the ultraviolet-absorbing properties of porphyrin-334. *Fisheries Science* 71: 1382-1384.
647. Zhang, Z., Zhao, M., Eglinton, G., Lu, H., Huang, C.-Y. (2006): Leaf wax lipids as paleovegetational and paleoenvironmental proxies for the Chinese Loess Plateau over the last 170 kyr. *Quaternary Science Reviews* 25: 575-594.
648. Zhang, L., Li, L., Wu, Q. (2007): Protective effects of mycosporine-like amino acids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and their partial characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 86: 240-245.
649. Zhang, D., Xie, P., Liu, Y., Qiu, T. (2009): Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the Total Environment* 407(7): 2191-2199.
650. Zhang, S.W., Zhang, S.-w., Zou, X.-n., Zhao, P. (2012): An analysis of incidence and mortality of esophageal cancer in China, 2003–2007. *China Cancer* 21: 241-247.
651. Zhou, L., Yu, H., Chen, K. (2002): Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences* 15: 166-171.
652. Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepas, E.E. (2005): Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 8: 1-37.

## BIOGRAFIJA



**Dijana Pantelić** je rođena 19.03.1984. godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu „Dositej Obradović“ i srednju školu "Zrenjaninska gimnazija", prirodno-matematički smer završila je u Zrenjaninu. 2003. godine je maturirala i upisala Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, odsek za biologiju i ekologiju, smer diplomirani biolog. Aktivnosti i obaveze predviđene studijskim programom završava 2009. godine sa prosekom 8.58. Školske 2009/10 godine upisuje diplomske akademske-master studije, smer diplomirani biolog-master (mikrobiologija). Master studije završava u roku, sa prosečnom ocenom 9.29. Doktorske akademske studije bioloških nauka na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu upisuje 2010. godine, gde je položila sve predviđene ispite ocenom 9.67. Dobitnik je stipendije za doktorante Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj 2010. godine i biva angažovana kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Transformacija geoprostora Srbije-prošlost, savremeni problemi i predlozi rešenja“ (176020), a od 2014. godine kao istraživač-saradnik na istom projektu. Pored naučnog rada, uključena je i u nastavu na Departmanu za biologiju i ekologiju, na predmetima: Biotehnologija, Biotehnologija mikroorganizama i Algologija. Angažovana je na Katedri za hidrobiologiju i zaštitu životne sredine. Takođe, pomaže u održavanju Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija (NSCCC). Angažovana je i kao član Laboratorija za Hidrobiologiju i u akreditovanoj laboratoriji "Laboratorija za paleoekološku rekonstrukciju - LAPER". Autor je i koautor 4 rada objavljenih u vrhunskim međunarodnim časopisima, jednog poglavlja objavljenog u monografiji međunarodnog značaja, kao i 6 saopštenja sa međunarodnog skupa štampanih u izvodu. Učestvovala je u organizaciji 2 naučne konferencije međunarodnog značaja. Recenzent je više naučnih radova objavljenih u vrhunskim međunarodnim časopisima. Ukupan broj citata, bez autocitata: 86 (Google Scholar) / 49 (SCOPUS).

Tetka je dvoje predivne dece, Nemanje i Jelene Kantar.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dijana Pantelić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Zorica Svirčev, redovni profesor
Naslov rada: NR	Potencijal sekundarnih metabolita cijanobakterija kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Srbija, Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića br. 2



Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 7 / stranica 229 / tabela 6/ slika 15 / grafikona 61/ šema 1/ referenci 652
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Hidrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Cijanobakterije, Sekundarni metaboliti, Pigmenti, Cijanotoksini, Biomarkeri, Paleoklimatska rekonstrukcija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, Srbija
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>U doktorskoj disertaciji je rađena analiza produkcije i procena stabilnosti sekundarnih metabolita cijanobakterija. U analizi pigmenata cijanobakterija kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji poslužio je nov model analize-AMMI model, koji pruža značajan doprinos odabiru odgovarajućih biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Analizom produkcije MOSA i MOMA 15 vodenih i zemljišnih cijanobakterija NSCCC sposobnost produkcije MOSA je uočena kod 8, a MOMA kod svih sojeva. Kultivacija u različitim pH vrednostima podloge i različitim temperaturnim uslovima nije pokazala znatan uticaj na produkciju MOSA. Produkcija MOMA je bila izraženija u baznoj sredini (pH 9.0) i na višim temperaturama (30-35 °C). UV svetlost se pokazala kao najznačajniji faktor i inicirala je najveću produkciju MOSA i MOMA kod svih sojeva. Veća koncentracija azota u podlozi nije uticala na povećanje produkcije MOSA kod većine analiziranih sojeva, dok je znatno uticala na povećanje produkcije MOMA kod svih analiziranih sojeva.</p> <p>Analizom produkcije pigmenata 19 lesnih cijanobakterija NSCCC prisustvo fikobilina i MOSA je uočeno u svim analiziranim kulturama, dok sposobnost produkcije MOMA nije uočena u dve kulture lesnih cijanobakterija NSCCC. Tokom posmatranog vremenskog perioda uočena je razgradnja ukupnih fikobilina u kontrolnim uslovima rasta, dok za isti vremenski period nije došlo do degradacije MOSA i MOMA u kontrolnim uslovima.</p> <p>Procenom stabilnosti MOSA i MOMA delovanjem abiotičkih faktora (različitih pH i temperaturnih vrednosti podloge, različitog vremena izlaganja UV svetlosti) utvrđeno je da su MOSA i MOMA pokazali izraženu stabilnost na testirane abiotičke faktore. Procenom stabilnosti pigmenata nakon delovanja biotičkih faktora primetna je intenzivnija razgradnja ukupnih fikobilina posmatrano u zavisnosti od vremena, do postizanja potpune degradacije u pojedinim kulturama lesnih cijanobakterija, dok je uočeno da su MOSA i MOMA pokazali stabilnu strukturu i u testu biodegradabilnosti nije došlo do njihove degradacije.</p>

Analizom prisustva MOSA i MOMA u lesnom sedimentu i biološkim lesnim pokoricama njihovo prisustvo je uočeno u svim analiziranim uzorcima. Takođe, korišćenjem LC-MS(/MS) metode utvrđeno je prisustvo scitonemina u 10 terestričnih kultura NSCCC.

Analizom toksičnosti i produkcije mikrocistina, cilindropermopsina i saksitoksina lesnih cijanobakterija NSCCC dobijeni su negativni rezultati. Razvojem novih metoda za detekciju cijanotoksina u terestričnim ekosistemima potrebno je proveriti dobijene rezultate. Procenom stabilnosti mikrocistina referentnog soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, uočena je njegova izrazita stabilnost tokom vremenskog perioda od 96 h u kontrolnim uslovima i delovanjem tri bakterijska soja.

Shodno dobijenim rezultatima, UV zaštitni pigmenti su mnogo podesniji za paleoklimatsku rekonstrukciju od fikobilina s obzirom da molekuli MOSA i MOMA imaju postojaniju strukturu i da nisu degradirani tokom posmatranih stresnih uslova. Usled nemogućnosti detekcije cijanotoksina lesnih cijanobakterija, i pored izražene stabilnosti mikrocistina referentnog soja, cijanotoksini se ne mogu smatrati biomarkerima cijanobakterija u geološkim istraživanjima.

Postavljanje BLOCDUST teorije i otkriće stabilnosti MOSA i MOMA i njihove upotrebe kao pouzdanih biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji predstavlja osnovu za mnoga buduća istraživanja od neprocenjivog naučnog značaja, pogotovo u paleoklimatskoj rekonstrukciji lesa. Predloženi scenario se može smatrati osnovom u paleoklimatskoj rekonstrukciji.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	12.07.2016.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: prof. dr Jelica Simeunović, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu  mentor: prof. dr Zorica Svirčev, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu  član: Akademik prof. dr Slobodan B. Marković, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu i član Srpske akademije nauka i umetnosti  član: prof. dr Snežana B. Simić, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND  
MATHEMATICS**

**Key word documentation**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Dijana Pantelić
Mentor: MN	Prof. dr Zorica Svirčev
Title: TI	Potential of cyanobacterial secondary metabolites as biomarkers for paleoclimatic reconstruction
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Serbia, Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Department for Biology and Ecology, Faculty of Science, Trg Dositeja Obradovića 2

Physical description: PD	Chapters 7 / pages 229/ tables 6/ pictures 15 / graphs 61/ / sheme 1 / literature 652
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Hidrobiology
Subject, Key words SKW	Cyanobacteria, Secondary metabolites, Pigments, Cyanotoxins, Biomarkers, Paleoclimatic reconstruction
UC	
Holding data: HD	Faculty of Sciences Library, 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, Republic of Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	<p>This PhD thesis analyzed the production and stability of cyanobacterial secondary metabolites. The results describe the effects of pH, temperature and light source combined with the effects of medium nitrogen content on the production of the MOSA and MOMA compounds of aquatic and soil cyanobacterial strains through AMMI model. The application of the AMMI model represents a significant contribution to the selection of appropriate biomarkers in the paleoclimatic reconstructions because it reveals the increased production of certain secondary metabolites in certain environmental conditions. MOSA compounds were observed in 8 out of 15 soil and aquatic cyanobacterial strains, while MOMA compounds were found in all 15 strains. Results show that exposure to UV light induced a higher synthesis of both pigments. The production of the MOSA compounds was clearly increased by UV irradiation and other treatments did not show a significant impact on its production. The production of MOMA compounds was increased by several stress factors including pH (pH 9.0), temperature (30-35 °C), nitrogen content and UV irradiation. A higher concentration of nitrogen in the medium did not influence the increase in the production of MOSA compounds in most of the analyzed strains, while it significantly influenced the increase in the production of MOMA in all analyzed strains.</p> <p>By analyzing the production of pigments in 19 loess cultures, phycobilins and MOSA were present in all examined loess isolates, while presence of MOMA was not detected in two samples from China. In control conditions, it was observed degradation of phycobilins depending on time, but MOSA and MOMA showed a stable structure.</p> <p>Stability assessment of the MOSA and MOMA by the treatment with abiotic factors (different pH and temperature values of the medium, different time of exposure to UV light) revealed their pronounced stability on tested abiotic factors. Considering unstable structure of phycobilins in the presence of bacterial strains, phycobilins cannot be considered as biomarkers in loess studies. Detected results indicate that MOSA and MOMA have stable core structures resistant to bacterial strains, which</p>

makes them potentially good biomarkers for paleoclimatic reconstruction.

Moreover, the presence of MOSA and MOMA compounds was confirmed in loess sediment samples and BLC. Also, the LC-MS(/MS) method revealed the presence of scytonemin in 10 terrestrial cyanobacterial cultures.

Testing of the toxicity of loess cyanobacterial cultures and their ability to produce microcystins, cylindrospermopsin and saxitoxins, negative results were obtained. The development of new methods for detection of cyanotoxins in terrestrial ecosystems is necessary in order to revise obtained results. By assessing the stability of microcystins of the reference strain of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, its pronounced stability was observed over a 96 h in control conditions and in the presence of three bacterial strains.

Due to MOSA and MOMA narrow environment and organism specificity, as well as its structural stability, these metabolites are designated with a strong potential to be used as a cyanobacterial biomarker in paleoclimatic research. Due to the inability to detect cyanotoxins in loess cyanobacteria, despite the pronounced stability of the microcystin of the reference strain, cyanotoxins cannot be considered as adequate biomarkers of cyanobacteria in geological research.

The production of the MOSA and MOMA compounds across examined stress conditions, and further, their presence in loess samples and BLCs indicate the potential of these compounds to be regarded as biomarkers in paleoclimatic research of lacustrine/marine and loess sediments. Setting up the BLOCDUST theory and determining stability of MOSA and MOMA compounds and their application as a convenient biomarkers of cyanobacteria in paleoclimatic reconstruction provides the foundation for many future research of invaluable scientific significance, especially in the paleoclimatic reconstruction of loess. The proposed scenario can be considered as one of the basic model for paleoclimatic reconstruction.

Accepted on Senate on: AS	12.07.2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: prof. dr Jelica Simeunović, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad  mentor: prof. dr Zorica Svirčev, Full Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad  member: Academician prof. dr Slobodan B. Marković, Full Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad and Corresponding member of the Serbian Academy of Sciences and Arts  member: prof. dr Snežana B. Simić, Associate Professor, Faculty of Sciences, Kragujevac