



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



Damjana Drobac

PUTEVI IZLOŽENOSTI ČOVEKA CIJANOTOKSINIMA I NJIHOV UTICAJ NA ZDRAVLJE

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2015. godine

Predgovor

Voda je fundamentalna potreba čoveka. Međutim, ovaj dragoceni, krhki resurs je ugrožen, a samim time je ugroženo zdravlje čovečanstva i čitavog živog sveta. Naglo povećanje ljudske populacije, urbanizacija i moderna poljoprivredna praksa doveli su do ubrzane eutrofizacije vodenih ekosistema, a kao posledica toga intenzivirana je i masovna pojava prastarih, ali i opasnih mikroorganizama-cijanobakterija.

Cijanobakterije su prisutne u mnogim ekosistemima. Njihovo povećano razmnožavanje i povećanje biomase u vodi se naziva cvetanje cijanobakterija. Danas je pojava cvetanja cijanobakterija globalni problem, s obzirom da obimno cvetanje cijanobakterija može imati negativne efekte na životnu sredinu, zdravlje i ekonomiju. Opadanje kvaliteta vode, posebno u rezervoarima za vodosnabdevanje, navodnjavanje, kao i u ribnjacima je razlog za sve veću zabrinutost. Naime, tokom i posle cvetanja cijanobakterija potencijalno opasne koncentracije toksičnih cijanobakterijskih metabolita-cijanotoksina mogu biti prisutne u vodi. Cijanotoksini predstavljaju opasnost po biljake i životinje, a takođe mogu izazvati akutne i hronične poremećaje kod ljudi.

Cvetanje cijanobakterija je prisutno u mnogim vodenim ekosistemima širom Srbije. Prvi podaci o algama u Srbiji objavljeni su pre 130 godina, a nakon toga, usledila su progresivnija i temeljnija istraživanja o pojavi i efektima cijanobakterija i njihovih toksina u vodenim biotopima Srbije. Sa promenom klimatskih uslova, pojačanim antropogenim uticajem i ubrzanom eutrofizacijom, pojava cvetanja cijanobakterija postaje sve češći problem i u našoj zemlji. Iz tog razloga postoji potreba da se istraži ovaj fenomen, odnosno da se analiziraju pojave cvetanja u Srbiji, posebno u akumulacijama za vodosnabdevanje, navodnjavanje i u ribnjacima, radi praćenja puteva izlaganja čoveka i negativnih efekata na zdravlje ljudi.

Rezultati ove teze će pomoći u boljem poznavanju negativnih efekata na ljudsko zdravlje koje mogu da izazovu cijanobakterije i njihovi toksini, kao i načinima izlaganja čoveka ovim štetnim metabolitima. Informacije iz disertacije mogu predstavljati osnovu prevencije raznih oboljenja i mogu da pronađu primenu u domovima zdravlja, zavodima za javno zdravlje, bolnicama, sredstvima javnog informisanja, kao i fabrikama voda, poljoprivrednim i turističkim organizacijama. Takođe, rezultati bi mogli pomoći prilikom implementacije legislative i graničnih vrednosti cijanotoksina u Srbiji. Dobijeni podaci ukazuju na potrebu detaljnijeg izučavanja ovog fenomena, posebno kada se uzme u obzir sve češća pojava cvetanja cijanobakterija.

U Novom Sadu, 27.04.2015.

Damjana Drobac

Zahvalnica

Prvenstveno, veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorki dr Zorici Svirčev, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, na pruženoj pomoći, svim pohvalama i kritikama tokom naše saradnje. Zahvaljujući tome naučila sam mnogo, kako o nauci tako i o životu.

Takođe, zahvaljujem se Prof. dr Jelici Simeunović na saradnji, savetima, strpljenju i razumevanju, kao i Prof. dr Editi Stokić na korisnim sugestijama i komentarima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i drugim profesorima na podršci tokom izrade ove teze, ali i tokom čitavog mog studiranja. Posebno trebam istaći poštovane profesorke Radu Rakić i Tatjanu Pavlicu sa kojima sam imala divnu saradnju i koje su uvek bile tu, na čemu ću im uvek biti zahvalna. Zahvaljujem se i Prof. dr Zorani Lužanin na pomoći u statističkoj obradi podataka, kao i velikom stručnjaku u oblasti cijanobakterija Prof. dr Geoffrey Codd čije je veliko iskustvo bilo od neprocenjive pomoći tokom mog naučnog rada.

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije, čiji sam stipendista bila tokom 2009/2010. godine. Takođe, ova teza 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, te zahvaljujem i rukovodiocu projekta Prof. dr Slobodanu Markoviću.

Istraživanje prezentovano u ovoj doktorskoj disertaciji prvenstveno je rađeno u Laboratoriji za paleoekološku rekonstrukciju (LAPER) Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, ali je deo rezultata ove disertacije rezultat saradnje sa drugim laboratorijama. Iz tog razloga se zahvaljujem dr Jussi Meriluoto i njegovim saradnicima na departmenu za Bionauke, Åbo Akademi Univerziteta, Turku, Finska. Zatim, Prof dr Milki Vidović i njenim saradnicima iz Laboratorije Anahem, Beograd, koleginići Gospavi Lazić iz Veterinarskog Instituta "Novi Sad", kao i dr Biljani Kiprovska sa Departmana za ratarstvo i povrtarstvo, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Zahvalnost dugujem i kolegama dr Jeleni Lujčić i Zoranu Marinoviću na saradnji tokom naših istraživanja, ali i za neprocenjivu pomoć u vidu saveta i ohrabrenja, što mi neizmerno znači. Hvala i mom prijatelju i kolegi Barać Goranu na pomoći i druženju tokom našeg studiranja. Veliko hvala mojim kolegama i prijateljima iz LAPER-a, posebno Nadi Tokodi i Dijani Pantelić na saradnji, razumevanju i podršci tokom svih ovih godina, za brojne lepe i manje lepe trenutke, ali i izazove koje smo zajedno prevazilazile. Takođe, Tamari Važić koja je pomogla u analizama rađenim u Finskoj.

Najveću zahvalnost dugujem mojim dragim roditeljima, za neograničenu ljubav, podršku, pomoć i razumevanje, koji su mi uvek bili oslonac i utočište.

Kratak sadržaj

1. Uvod	1
2. Ciljevi istraživanja i hipoteze	50
3. Materijal i metode.....	52
4. Rezultati.....	84
5. Diskusija	130
6. Zaključci	198
7. Literatura	201
8. Prilog	237

Prošireni sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Biologija ćelije cijanobakterija i morfološka organizacija talusa	2
1.2. Cijanobakterije i cvetanje vode	4
1.3. Cijanotoksini-opšte karakteristike i njihov uticaj na zdravlje	6
1.3.1. Hepatotoksini	7
1.3.1.1. <i>Mikrocistini</i>	7
1.3.1.2. <i>Nodularin</i>	12
1.3.2. Neurotoksini	13
1.3.2.1. <i>Saksitoksini</i>	13
1.3.2.2. <i>Anatoksini</i>	14
1.3.3. Dermatotoksini	15
1.3.4. Citotoksini	15
1.3.4.1. <i>Cilindrospermopsin</i>	15
1.3.4.2. <i>Endotoksini (Lipopolisaharidni toksini)</i>	16
1.4. Srpski vodič za cvetanje cijanobakterija	17
1.5. Tolerantni dnevni unos cijanotoksina, predlozi SZO i iskustva iz sveta	19
1.6. Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima	26
1.6.1. Unošenje kontaminirane vode za piće	26
1.6.2. Kožni kontakt i inhalacija tokom rekreacije	29
1.6.3. Ishrana vodenim organizmima	31
1.6.4. Ishrana biljkama koje su zalivane cvetajućom vodom	37
1.6.5. Cijanobakterijski dijetetski suplementi	44
1.6.6. Intravenski put ekspozicije	46
1.7. Stanje u Srbiji	47
1.8. Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija (NSCCC)	49
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	50
3. MATERIJAL I METODE	52
3.1. Epidemiološki podaci	52
3.1.1. Regionalna podela Srbije	52
3.1.2. Baze podataka	53
3.1.3. Statistička analiza	55
3.2. Upitnik i anketiranje	56
3.3. Uzorkovanje na terenu	58
3.3.1. Opis lokaliteta	58
3.3.1.1. <i>Vrutci</i>	58
3.3.1.2. <i>Aleksandrovačko jezero</i>	60
3.3.1.3. <i>Kompleks ribnjaka u Vojvodini</i>	61
3.3.2. Uzorkovanje vode	62
3.3.3. Uzorkovanje mesa ribe	62
3.4. Eksperimentalno zalivanje biljaka kontaminiranom vodom	63
3.5. Odabir suplemenata na bazi cijanobakterija	63
3.6. Sprovedene analize na sakupljenim uzorcima	64
3.6.1. Analiza cijanobakterijskog fitoplanktona	64
3.6.2. Metoda određivanja koncentracije hlorofila <i>a</i>	64
3.6.2.1. <i>Priprema uzoraka</i>	64
3.6.2.2. <i>Postupak određivanja koncentracije hlorofila a</i>	64
3.6.3. <i>Artemia salina</i> bioesej	66

3.6.3.1. Priprema uzoraka	66
3.6.3.2. Postupak bioeseja <i>A. salina</i>	66
3.6.4. Enzimski imuno-vezujući test	69
3.6.4.1. Priprema uzoraka	69
3.6.4.2. Postupak ELISA testa za detekciju mikrocistina i nodularina	69
3.6.4.3. Postupak ELISA testa za detekciju saksitoksina	71
3.6.5. Tečna hromatografija visokih performansi i tečna hromatografija-masena spektrometrija	72
3.6.5.1. Priprema uzoraka	72
3.6.5.2. Postupak	77
3.6.6. Histološki preparati	80
3.6.7. Biohemijske analize u cilju procene reakcija biljaka na mikrocistine	80
3.6.7.1. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije	81
3.6.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	81
3.6.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	81
3.6.7.4. Antioksidantni testovi (DPPH, NBT, \cdot OH-test)	82
3.6.7.5. Statistička obrada podataka	83
3. REZULTATI	84
4.1. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje i incidence nekih kancera u Srbiji-analiza epidemioloških podataka	84
4.1.1. Primarni kancer jetre i faktori rizika	85
4.1.2. Epidemiološki podaci drugih kancera	88
4.2. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje i pojava nekih bolesti u Srbiji	98
4.2.1. Epidemiologija bolesti sistema za varenje i kože u Užicu	98
4.2.2. Epidemiologija pojedinih kancera u Užicu	100
4.3. Anketa o mogućoj vezi pojave cijanobakterija u sistemu za vodosnabdevanje i nekih zdravstvenih problema kod stanovnika grada Užica	101
4.3.1. Pol ispitanika	101
4.3.2. Starost ispitanika	101
4.3.3. Upotreba vode u toku zabrane korišćenja	102
4.3.4. Promene vodovodne vode u toku zabrane korišćenja	103
4.3.5. Konzumacija ribe iz jezera Vrutci	103
4.3.6. Boravak ispitanika na jezeru Vrutci	104
4.3.7. Aktivnosti kojim se ispitanici bave na jezeru Vrutci	105
4.3.8. Promene vode jezera Vrutci	105
4.3.9. Kontakt ispitanika sa vodom tokom promena	106
4.3.10. Uginule životinje u vodi ili van vode jezera Vrutci	107
4.3.11. Kontakt životinja ispitanika sa vodom iz jezera Vrutci	107
4.3.12. Zdravstveni problemi životinja nakon kontakta sa vodom	108
4.3.13. Zdravstveni problemi ispitanika u poslednje tri godine	108
4.3.14. Zdravstveni problemi ispitanika od decembra 2013. godine	110
4.3.15. Zdravstveni problemi ostalih članova porodice	111
4.4. Cijanotoksini u akumulaciji za vodosnabdevanje grada Užica	112
4.4.1. Rezultati toksičnosti uzoraka biomase i vode	112
4.4.2. Rezultati detektovanih mikrocistina u uzorcima vode, biomase i tkiva ribe iz Užica	113
4.4.2.1. Uzorci biomase i vode	113

4.4.2.2. <i>Uzorci tkiva ribe</i>	114
4.5. Cijanotoksini u ribnjacima na teritoriji Vojvodine	115
4.5.1. Rezultati koncentracije hlorofila <i>a</i> i trofički status ribnjaka	115
4.5.2. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize populacije cijanobakterija	116
4.5.3. Rezultati prisustva cijanotoksina u vodi ribnjaka	119
4.5.4. Rezultati akumulacije mikrocistina u tkivu ribe	120
4.5.5. Rezultati histopatoloških promena u tkivima ribe	120
4.6. Rezultati prisustva cijanotoksina u vodi Aleksandrovačkog jezera	125
4.7. Cijanotoksini u tkivu biljaka zalivanih kulturom cijanobakterija	126
4.7.1. Rezultati akumulacije mikrocistina u eksperimentalnoj biljci	126
4.7.2. Rezultati biohemijskih analiza eksperimentalne biljke	126
4.8. Rezultati analiza mikrocistina u suplementima	129
5. DISKUSIJA	130
5.1. Put izloženosti cijanotoksinima preko vode za piće i rekreaciju	130
5.1.1. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje u Srbiji	131
5.1.2. Hronična ekspozicija cijanotoksinima putem vode za piće i epidemiološki podaci u Srbiji	132
5.1.2.1. <i>Primarni kancer jetre i cvetanje cijanobakterija</i>	132
5.1.2.2. <i>Negativni uticaj cijanotoksina na druge organe-drugi kanceri</i>	139
5.1.3. Akutna ekspozicija u slučaju cvetanja jezera Vrutci	144
5.1.3.1. <i>Cvetanje cijanobakterije <i>Planktothrix rubescens</i></i>	145
5.1.3.2. <i>Potencijalne zdravstvene posledice usled kontakta sa kontaminiranom vodom</i>	152
5.2. Put izloženosti cijanotoksinima preko kontaminirane ribe	155
5.2.1. Potencijalno izlaganje putem ishrane kontaminiranom ribom iz jezera Vrutci	156
5.2.2. Cvetanje cijanobakterija u ribnjacima-Stanje u Srbiji	158
5.2.3. Cijanobakterije i cijanotoksini u ribnjacima, njihova akumulacija i efekti na tkivo ribe	159
5.2.3.1. <i>Cvetanje toksičnih cijanobakterija u ispitivanim ribnjacima Vojvodine</i>	159
5.2.3.2. <i>Akumulacija cijanotoksina u tkivu ribe iz ispitivanih ribnjaka Vojvodine</i>	161
5.2.3.3. <i>Histopatološke promene u tkivima izložene ribe</i>	162
5.3. Put izloženosti cijanotoksinima preko kontaminiranih biljaka	166
5.3.1. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za navodnjavanje-Stanje u Srbiji	167
5.3.2. Slučaj Aleksandrovačkog jezera	169
5.3.3. Drugi metaboliti cijanobakterija	173
5.3.4. Akumulacija mikrocistina u biljkama	175
5.3.5. Oksidativni stres kod biljaka izazvan mikrocistinima	178
5.4. Cijanotoksini u suplementima na bazi cijanobakterija	180
5.5. Predlozi za reviziju vrednosti tolerantnog dnevnog unosa i implementaciju graničnih vrednosti	183
5.6. Načini prevencije i eliminacije cijanobakterija i njihovih toksina	189
6. ZAKLJUČCI	198
7. LITERATURA	201
8. PRILOG	237

Skraćenice

Ach - acetilholin
Bcl2 - B ćelijski limfom 2
CAT - katalaza
DAG - diacil glycerol
dm - dimetilovana forma toksina
DPPH - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikal
ELISA - enzimski imuno-vezujući test (enzyme linked immunosorbent assay)
ERM - ekoremedijacija
GPX - glutation peroksidaza
GSH - glutation
GV - granična vrednost (Guideline Value)
HBV - hronični virusni hetatitis B
HCV - hronični virusni hetatitis C
HPLC - tečna hromatografija visokih performansi (High-Performance Liquid Chromatography)
ip - intraperitonealno
iv - intravenski
LC-MS - tečna hromatografija-masena spektrometrija (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LD₅₀ - letalna doza koja ubija 50 % test organizama
MAPK - mitogen-aktivirajuće protein kinaze
MC-LF - mikrocistin LF (leucin fenilalanin)
MC-LR - mikrocistin LR (leucin arginin)
MC-LW - mikrocistin LW (leucin triptofan)
MC-LY - mikrocistin LY (leucin tirozin)
MC-RR - mikrocistin RR (arginin arginin)
MC-YR - mikrocistin YR (tirozin arginin)
MDA - malondialdehid
NBT - nitroblutetrazolijum hlorid
NSCCC - novosadska kolekcija kultura cijanobakterija
OATP - organski anjonski transportni polipeptidi
PCC - Pasterova kolekcija kultura (Pasteur Culture Collection)
PKC - protein kinaza C
POD - peroksidaza
PP1 - protein fosfataza 1
PP2A - protein fosfataza 2A
PSP - paralitičko trovanje školjkama
ROS - reaktivne kiseonične vrste (Reactive Oxygen Species)
SOD - superoksid dismutaza
SPE - ekstrakcija na čvrstoj fazi (Solid-Phase Extraction)
st - suve težine
SZO - Svetska zdravstvena organizacija
TDI - tolerantni dnevni unos (Tolerable Daily Intake)
vt - vlažna težina

1. UVOD

Cijanobakterije poznate još kao modro-zelene alge (*Cyanobacteria*, *Cyanophyta*) (Stanier, 1971; Lewin, 1979) predstavljaju najstariju i raznovrsnu grupu fotoautotofnih organizama na Zemlji, koja se pojavila pre oko 2,3 do 2,9 milijardi godina (Olson, 2006; Blank i Sanchez-Baracaldo, 2010; Schirrmeyer i sar., 2011). Prema nekim autorima (Schopf i Walter, 1982; Herrero i Flores, 2008) nađeni su fosili cijanobakterija čija se starost procenjuje na 3,5 milijardi godina. Pre pojave cijanobakterija zemljina atmosfera je bila puna otrovnih gasova sa veoma malom količinom kiseonika. Cijanobakterije su prvi organizmi koji su vršili oksigenu fotosintezu i na taj način su pomogle u stvaranju atmosfere kakva je danas i samim tim omogućile evoluciju ostalih organizama na Zemlji (Michael, 1995; Skulberg, 1996).

Zbog izuzetne sposobnosti adaptacije ovi drevni organizmi opstaju već milijardama godina. O njihovoj sposobnosti prilagođavanja svedoči i činjenica da su cijanobakterije eurivalentni, kosmopolitski organizmi, sa širokom valencom rasprostiranja u raznim ekosistemima, možemo ih naći kako u slatkim i slanim vodama, u tlu i na vlažnim površinama. Poznate su i kao pionirski i ekstremofilni organizmi jer mogu da naseljavaju sve tipove zemljišta, peščare, bunare, pećine, planinske vrhove, mineralne vode, termalne izvore, fasade, slatine, stene, lesne sedimente, lišajevе i druga staništa (Whitton i Potts, 2000). Mogu da prežive na Antartiku na -83°C , kao i u termalnim vodama toplijim od 70°C (Blaženčić, 1998). Vrstama koje su izložene jakoj sunčevoj radijaciji, kao što su vrste koje naseljavaju kopno i sneg na Antarktiku, preživljavanje obezbeđuje sluzavi zaštitni omotač (Metcalf i Codd, 2004).

Naseljavajući terestrične, slatkovodne i marinske ekosisteme, cijanobakterije igraju veoma važnu ulogu u funkcionisanju pomenutih ekosistema, pre svega kao primarni producenti i učesnici u ciklusima kruženja elemenata azota i sumpora (Kaebernick i Neilan, 2001). Sposobnost da fiksiraju slobodan azot iz atmosfere, koju poseduje većina cijanobakterijskih vrsta (kao na primer pripadnici rodova: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* i *Nostoc*), dodatno im obezbeđuje veoma široku valencu rasprostiranja. Zahvaljujući ovoj osobini one često dominiraju u ekosistemima sa niskim sadržajem neorganskog azota. Pomoću enzima nitrogenaze, cijanobakterije direktno pretvaraju azot u amonijak koji dalje ulazi u biohemijske cikluse. Zbog pomenute osobine cijanobakterije često ulaze u simbiotske odnose sa drugim organizmima (Seckbach, 2007).

Takođe, igraju značajnu ulogu u obogaćivanju zemljišta azotom, pa kao takve mogu imati široku primenu u poljoprivredi (Svirčev, 2005).

Cijanobakterije su organizmi sa brojnim specifičnim ekološkim, fiziološkim i biohemijskim karakteristikama, usled čega imaju veliki značaj i ulogu u raznim prirodnim procesima, a predstavljaju i izrazito značajan potencijal u biotehnološkoj primeni. Cijanobakterije imaju sposobnost produkcije širokog spektra metabolita poput proteina, lipida, vitamina, ugljenih hidrata, pigmenata, antioksidativnih jedinjenja, biološki aktivnih supstanci i drugih važnih produkata metabolizma koji mogu imati komercijalnu primenu (Gantar, 1985; Ciferri i sar., 1989; Gantar i sar., 1995). Ovi organizmi predstavljaju potencijalne prečišćivače voda, biofertilizatore zemljišta, kao i značajne izvore hrane, energije i lekova (videti Svirčev, 2005).

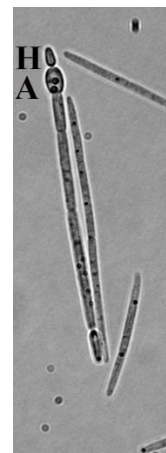
1.1. Biologija ćelije cijanobakterija i morfološka organizacija talusa

Struktura ćelija cijanobakterija karakteristična je za prokariotske organizme. Na površini samih ćelija nalazi se sluzavi, galertni, želatinozni omotač koji štiti cijanobakterijske ćelije od isušivanja. Ćelijski zid im je višeslojan i sastoji se iz 4 sloja, ispod kog se nalazi tanka plazmalema i procitoplazma. Procitoplazma je gusta i nepokretna i u njoj su smešteni ribozomi (70S), rezervne supstance, različiti kristali i gasne vakuole. Rezervne materije čine glikopeptidi, lipidne inkluzije, cijanoficinska zrna i polifosfatna tela. Pomenute materije se akumuliraju u uslovima viška određenih nutrijenata. Kao rezerve azota služe cijanoficinska zrna, dok kao energetska izvor i rezerve fosfora služe volutinska zrna ili metahromatska tela koja sadrže polifosfate i lipidnu ili proteinsku komponentu. Gasne vakuole su ispunjene azotom i predstavljaju jednu od adaptacija na planktonski način života. Fibrili DNK i hijaloplazma se nalaze u centralnom delu cijanobakterijske ćelije, gde grade nukleoplazmu. Karakteristike nukleoplazme su da se oko nje nikada ne obrazuje membrana i ne poseduje jedarce, histone, hromosome i jedrovo vreteno (Blaženčić, 1998).

Cijanobakterije su jednoćelijski i višećelijski organizmi (Castenholz i Waterbury, 1989). U pogledu morfološke organizacije, među cijanobakterijama se javljaju predstavnici na jednoćelijskom, kolonijalnom i trihalnom (končastom) nivou razvoja talusa (Holt, 1994). Jednoćelijske cijanobakterije su često prisutne u morima, dok u kopnenim vodama vrste koje se pojavljuju masovno po pravilu se ne javljaju u takvom obliku. Jednoćelijski oblici

cijanobakterija u slatkovodanim ekosistemima često predstavljaju početak nastanka kolonija. Pojedine vrste kolonijalnih cijanobakterija razlikuju se po veličini ćelija, obliku i omotaču kolonije. Kolonije mogu u promeru dostići veličinu više stotina μm (Sedmak i Svirčev, 2011).

Trihalne cijanobakterije mogu imati homocitni ili heterocitni tip talusa. Homocitni talus se sastoji od identičnih vegetativnih ćelija, dok heterocitni tip talusa poseduje i specijalizovane ćelije, spore (akineti) i heterociste (Slika 1). Spore imaju zadebljao ćelijski zid, bogate su hranljivim materijama i visokim sadržajem DNK (20-30 puta veći sadržaj DNK u sporama nego u vegetativnim ćelijama) i služe za preživljavanje nepovoljnih uslova. Značaj heterocista se ogleda u tome da predstavljaju mesta nakupljanja enzima, vezivanja atmosferskog azota, kao i da su to rudimenti ćelija za razmnožavanje (Blaženčić, 1998).



Slika 1. Heterocista (H) i akinet (A) u trihomu *Cylindrospermopsis raciborskii* (Svirčev i sar., submitirano)

Cijanobakterije se razmnožavaju prostom ćelijskom deobom, hormogonijama i hormocistama. Prosta ćelijska deoba je karakteristična za jednoćelijske i kolonijalne cijanobakterije, samo što se ćelije kolonijalnih cijanobakterija nakon deobe ne rastavljaju, nego ostaju spojene gradeći grupacije ćelija različitog oblika. Končasti predstavnici cijanobakterija se razmnožavaju hormogonijama i hormocistama. Razdeljivanjem končastog talusa na fragmente gde svaki fragment (hormogonija) može da izraste u novu jedinku, predstavlja razmnožavanje hormogonijama. Hormociste su slične hormogonijama, a razlikuju se po tome što se nalaze u grupama gde su obavijene zajedničkim debelim omotačem (Blaženčić, 1998).

Cijanobakterije su primarno fotoautotrofni organizmi, koji poseduju sposobnost da se hrane i fotoheterotrofno, autoheterotrofno, heteroautotrofno i heterotrofno (Metcalf i Codd, 2004). Cijanobakterije imaju fotosintetičke pigmente kao i biljke. Poseduju hlorofil *a*, koji je smešten u membranama tilakoida i pigmente iz grupe karotenoida i fikobilina, koji su smešteni na spoljašnjoj površini tilakoida (Holt, 1994; Codd i sar., 2005). Fikocijanini iz grupe fikobilina daju cijanobakterijama karakterističnu modro-zelenu boju, dok fikoeritrin, takođe iz grupe fikobilina, daje oranž ili crvenu boju (Simić, 1988).

1.2. Cijanobakterije i cvetanje vode

Cijanobakterije su mikroskopski organizmi, obično toliko sitni da se ne mogu uočiti golim okom. Međutim, ponekad ovi sićušni organizmi mogu da obrazuju vidljive kolonije ili da se toliko prenamnože da formiraju приметne nakupine, najčešće zelene boje, mada mogu biti žute, pa i crvene boje, što je praćeno i pojavom neprijatnog mirisa. Ovaj fenomen masovnog razvoja cijanobakterija predstavlja “cvetanje vode”.

Masovna pojava cijanobakterija u vodenim ekosistemima postala je značajan ekološki problem širom sveta. U Evropi, Aziji i Americi više od 40 % jezera i akumulacija su eutrofni i predstavljaju povoljnu sredinu za masovni razvoj cijanobakterija (Chorus i Bartram, 1999). Antropogena ubrzana eutrofizacija vodenih ekosistema vodi ka neminovnom prenamnožavanju fotoautotrofnih organizama, uključujući i cijanobakterije.

Eutrofizacija je prirodni proces postepenog povećanja količine organske materije koji može da traje vekovima i ne može se zaustaviti, mada se može usporiti (Đukić i sar., 2000). To je prirodni proces “starenja” svakog vodenog ekosistema, dok je znatno brža veštačka ili ubrzana eutrofizacija koja se najčešće odvija pod uticajem antropogenog faktora. Velike količine nutrijenata antropogenog porekla doposevaju u vodene ekosisteme putem spiranja sa poljoprivrednih površina, nedovoljno tretiranim otpadom, kao i otpadnim vodama različitih industrijskih postrojenja, naselja itd. (Bartram i sar., 1999).

U vodenim ekosistemima razgradnja organskih jedinjenja se odvija pod uticajem fizičkih, hemijskih i bioloških procesa, pri čemu se razlažu na neorganska jedinjenja. Povećana koncentracije nutrijenata, pre svega azota i fosfora, uz posebne i odgovarajuće uslove kao što su optimalna pH vrednost od 6 do 9, temperatura vode od 15 do 30°C, kao i slaba pokretljivost vode (Carmichael, 1996), mogu omogućiti ubrzano razmnožavanje cijanobakterija i naglo povećanje njihove ukupne biomase. Ova pojava cvetanja vode (Slika 2) predstavlja najuočljiviji znak eutrofizacije vodenog ekosistema.

Cvetanje cijanobakterija je favorizovano u vodenim ekosistemima bogatim mineralnim i organskim jedinjenjima, kao što su sporotekuće eutrofne vode, eutrofna jezera, bare, sistemi za navodnjavanje, kanali i ribnjaci (Codd, 2000). Cvetanje vode se definiše kada je u vodenim sredinama proliferacija jedne ili nekoliko vrsta cijanobakterija masovna, odnosno kada je koncentracija cijanobakterijskih ćelija veća od 10 000 u mililitru vode (Falconer, 1998; 1999).



Slika 2. Cvetanje vode u a) ribnjaku u Vojvodini b) jezeru Vrutci (b-Foto: Tijana Jeftić)

Cvetanje je lako uočljivo i manifestuje se promenom boje vode, mutnoćom i smanjenom providnosti, zatim pojavom površinskog penušanja, vidljivim nakupinama na površini vode u vidu prevlaka, površinske skrame ili grudvastih debelih formacija. Nakupine cijanobakterija na površini vode mogu biti razbijene delovanjem talasa ili vetrom, dispergovane po celom vodenom ekosistemu i naknadno nagomilane uz obalu vodenog ekosistema (Svirčev, 2011).

Usled sve većeg povećanja broja cijanobakterija smanjuje se providnosti vode i blokira prodor sunčevih zraka, čime se sprečava proces fotosinteze, a samim tim dolazi i do smanjenja količine kiseonika u vodi. Kada se potroše zalihe jednog ili više neophodnih elemenata za rast, cijanobakterije počinju da odumiru. Kao posledica toga dolazi do intenzivnih procesa truljenja koji zahtevaju dodatnu potrošnju kiseonika. Koncentracija kiseonika se dalje smanjuje i to naročito noću, što može prouzrokovati nedostatak kiseonika za ostala živa bića u vodi. Ovakva hipoksija, a u težim slučajevima i anoksija, naročito u dubljim slojevima vode, može da dovede do masovnog uginuća aerobnih organizama (Svirčev, 2001).

Ukoliko je pojava izraženog cvetanja algi i cijanobakterija povezana sa negativnim posledicama po okolinu, kao što su: poremećaj stabilnosti ekosistema, mortalitet živog sveta, negativan uticaj na lance ishrane, produkcija toksičnih materija i drugo, tada se ona definiše kao opasno algalno cvetanje (eng. “harmful algal blooms”-HABs) (Carmichael i Falconer, 1993; Chorus i Bartram, 1999). Najveći problem vezan za pojavu cvetanja vode jeste produkcija toksičnih sekundarnih metabolita cijanobakterija. Ovi opasni produkti se nazivaju cijanotoksini. To su visoko aktivne toksične supstance koje su rizične po druge mikroorganizame, biljke, divlje i domaće životinje, a mogu da dovedu do ozbiljnih zdravstvenih problema i kod ljudi (Carmichael i Falconer., 1993; Falconer, 1998; Kuiper-Goodman i sar., 1999).

1.3. Cijanotoksini-opšte karakteristike i njihov uticaj na zdravlje

Cijanotoksini su biološki aktivna jedinjenja sintetisana od strane cijanobakterija i kod najvećeg broja vrsta oni se ne sintetišu tokom svih faza rasta, nego ulaskom u sekundarni metabolizam koji je uslovljen stresnim faktorima. Toksini cijanobakterija su biohemijski i funkcionalno raznovrsna grupa jedinjenja, koji su po hemijskom sastavu najčešće peptidi, alkaloidi i lipopolisaharidi. Cijanotoksini mogu biti intracelularni, zatvoreni unutar ćelije ili oslobođeni u spoljašnju sredinu, kada postaju ekstracelularni toksini. Njihovo oslobađanje u spoljašnu sredinu se može desiti za vreme života ćelija, ali se češće dešava nakon ćelijske smrti i oštećenja ćelijskog zida kada se oslobađaju zajedno sa ćelijskim sadržajem (Chorus, 2001). Njihova produkcija, nagomilavanje u ćeliji i izlučivanje u spoljašnju sredinu nisu slučajni, nego predstavljaju deo evolutivnog procesa tokom kojeg su se cijanobakterije adaptirale na specijalne potrebe ili promene u spoljašnjoj sredini.

Diverzitet cijanotoksina je širokog raspona i globalna distribucija toksičnih cijanobakterija svedoči o njihovom ekološkom uspehu, koji sa druge strane stvara probleme vezane za zdravlje ljudi i životinja. Ekofiziologija i otkrivanje prave funkcije cijanotoksina za sada ostaju nepoznati, uprkos velikom broju istraživanja posvećenih cijanobakterijama. Produkcija cijanotoksina je pod uticajem mnogobrojnih ekoloških faktora sredine, od kojih posebnu važnost imaju dostupnost nutrijenata, temperatura, pH, uslovi osvetljenosti i drugo. Jedna od hipoteza koja bi mogla da objasni ekološku funkciju cijanotoksina govori o mogućnosti njihovog nastanka iz ćelijske potrebe za odbrambenim mehanizmom, kao odgovor na pritisak sredine i/ili konkurencije za resurse. Takođe, jedna od mogućih ekoloških funkcija cijanotoksina je i odbrambeni mehanizam protiv predatora, gde vrste koje imaju sposobnost produkcije cijanotoksina bivaju favorizovane i imaju veću šansu za opstanak u odnosu na one vrste koje nisu toksične. Još jedna funkcija koju bi cijanotoksini mogli da imaju je fiziološka asistencija (poboljšavanje ćelijske fiziologije, naknada za homeostazu, fotosintetička efikasnost i ubrzana stopa rasta) (Holland i Kinnear, 2013).

U sagledavanju potencijalne ekološke uloge cijanotoksina, važno je imati na umu da su cijanobakterije, kao jedna od najstarijih grupa organizama na Zemlji, uspele da opstanu uprkos svim promenama koje su se desile tokom vremena. Sinteza cijanotoksina je kontrolisana različitim genetskim i/ili enzimskim faktorima koji uslovljavaju varijabilnost biosintetskih puteva cijanotoksina kod različitih vrsta. Samim tim, priroda i kompozicija cijanotoksina može biti promenljiva, kao odgovor na abiotičke i biotičke faktore sredine.

Sve ovo ukazuje na moguću divergentnost i multifunkcionalnost ekološke uloge toksina koja se razvijala tokom vremena (Holland i Kinnear, 2013).

Mehanizmi cijanobakterijske toksičnosti su takođe veoma različiti, te se cijanotoksini mogu kategorisati prema targetnom sistemu, odnosno organu ili ćelijama na koje deluju. Na osnovu toga cijanobakterijski toksini se mogu podeliti u nekoliko uslovnih (jer neki cijanotoksini mogu imati više različitih dejstava i da utiču na više organa) kategorija (Carmichael, 1992; Codd i sar., 2005):

1. Hepatotoksini (mikrocistini, nodularini)
Iako primarno oštećuju jetru, mogu da utiču i na druge organe;
2. Neurotoksini (anatoksini i saksitoksini)
Utiču na centralni nervni sistem blokadom neuromuskularnih veza;
3. Dermatotoksini (aplaziatoksin, debromoaplaziatoksin i lingbiatoksin)
Izazivaju dermatitise, oralne i gastrointestinalne inflamacije;
4. Citotoksini (cilindrospermopsin i lipopolisaharidi)
Izazivaju alergijske reakcije, oštećuju jetru, bubrege i kožu.

1.3.1. Hepatotoksini

Hepatotoksini su po hemijskom sastavu ciklični peptidi, koji ispoljavaju svoj toksični efekat inhibišući enzime protein fosfataze. Najčešće su prisutni u toku cvetanja površinskih voda, a svojim delovanjem mogu da izazivaju hemoragije, poremećaje jetre i stimulišu rast ćelija tumora. Trovanje hepatotoksinima se prepoznaje po opštoj slabosti, bledilu, otežanom disanju, abdominalnim bolovima, nadutosti, povraćanju, pojavi dijareje, kao i ubrzanom ili slabom pulsu (Codd i sar., 2005). Najznačajniji i najpoznatiji hepatotoksini su mikrocistini i nodularini.

1.3.1.1. Mikrocistini

Mikrocistini su hepatotoksični cijanotoksini koji su najviše proučavani kao najzastupljeniji toksini u površinskim vodama. Oni predstavljaju najveću i strukturno veoma raznovrsnu grupu cijanobakterijskih toksina i ne postoji jedinstvena lista sa svim poznatim varijantama mikrocistina, ali procenjuje se da ukupan broj varijanti ovog toksina, prikupljen iz različitih literaturnih izvora, prevazilazi 200, a nove varijante se stalno otkrivaju (Svirčev i

sar., 2014). Varijacije u strukturi odgovorne su za razlike u toksičnosti ovih jedinjenja. Jedna od najtoksičnijih i najviše proučavanih formi je MC-LR (Chorus, 2001).

Ovi cijanotoksini zbog svoje hemijske strukture su izuzetno stabilni u vodi, mogu tolerisati radikalne promene u spoljašnjoj sredini, otporni su na ekstremne pH vrednosti (Harada i sar., 1996; Harada i Tsuji, 1998) kao i temperature, čak mogu da opstanu posle ključanja vode, što ukazuje da kuvanje nije dovoljno da bi se eliminisali ovi perzistentni cijanotoksini (SZO, 1999).

Mikrocistini su dobili naziv prema predstavniku cijanobakterijskog roda iz kojeg su prvi put izolovani, a to je *Microcystis*. Pored navedenog roda, brojni drugi cijanobakterijski rodovi imaju predstavnike sa sposobnostima produkcije ovog cijanotoksina, a tu se ubrajaju: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Hapalosiphon*, *Nostoc*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Pseudanabaena*, *Synechococcus* i *Synechocystis* (Hardy, 2011). Pomenuti rodovi imaju kosmopolitsku distribuciju, zbog čega ovaj njihov hepatotoksični metabolit predstavlja globalnu opasnost.

Mikrocistini mogu ispoljiti akutne toksične efekte na životinje i ljude (Jochimsen i sar., 1998; Codd i sar., 2005; Campos i Vasconcelos, 2010). Ovi cijanotoksini mogu dovesti do uginuća životinja, najčešće pasa i stoke, a ribe i ptice su takođe podložne delovanju i toksičnosti mikrocistinima. Bez obzira na vrstu, mehanizam delovanja mikrocistina je isti, a to je inhibicija protein fosfataza, koja izaziva pre svega oštećenje jetre, ali može da utiče i na druge organe. Pored akutnih ovi toksini mogu imati i hronične efekte. Sve više istraživanja pokazuje da mikrocistini mogu predstavljati potencijalne kancerogene (Ito i sar., 1997; Hernandez i sar., 2009; Svirčev i sar., 2009; 2010; 2013; 2013a; Gan i sar., 2010, Žegura i sar., 2011) i kao takvi oni predstavljaju pretnju po zdravlje ljudi, životinja i biljaka sa kojima dolaze u kontakt.

Molekularni mehanizmi toksičnosti mikrocistina

Većina oralno unetih mikrocistina koja se apsorbuju iz gastrointestinalnog trakta se zatim resorbuju portalnim krvotokom u jetru. Mikrocistini ulaze u hepatocyte pomoću specifičnih nosača-superfamilije organskih anjonskih transportnih polipeptida (Oatp1b2, OATP1B1 i OATP1B3) koji su prisutni i u krvno-moždanoj barijeri (OATP1A) (Fischer i sar., 2005; Komatsu i sar., 2007; Lu i sar., 2008). Kada stigne u hepatocyte MC-LR formira prvo ne-kovalentne veze, a kasnije i kovalentne veze sa protein fosfatazama 1 (PP1) i 2A (PP2A) (Honkanen i sar., 1990; MacKintosh i sar., 1990; 1995) i na taj način inaktivira ove

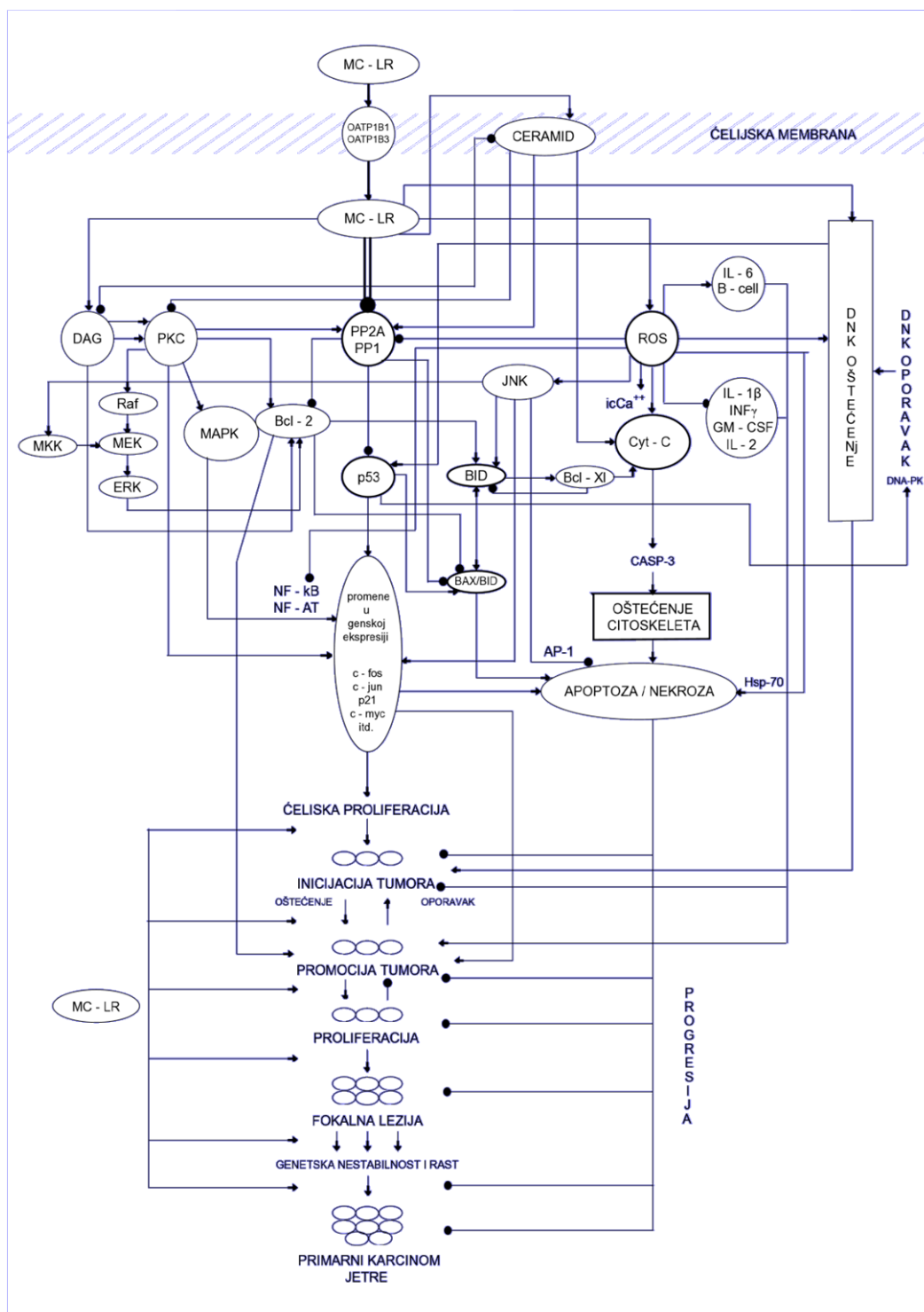
značajne enzime. Naime, PP1 i PP2A predstavljaju važne regulatore ćelijske homeostaze, koja se ostvaruje kroz fosforilaciju/defosforilaciju proteina (Cohen, 1989; Yamano i sar., 1994; Wera i Hemmings, 1995).

Efekti mikrocistina na ćelije jetre zavise od trajanja izloženosti kao i koncentracije cijanotoksina (Svirčev i sar., 2010). U zavisnosti od doze MC-LR, u Vero (bubrežnim) ćelijskim linijama indukovao je različite patološke procese, kao što su autofagija, apoptoza ili nekroza (Alvarca i sar., 2009). Veoma visoke koncentracije MC-LR izazivaju nekrozu ćelija jetre, subletalne doze mogu izazvati apoptozu, a niska koncentracija je povezana sa proliferacijom ćelija (Svirčev i sar., 2010). Kompleksnu interakciju na molekularnom nivou unutar membrane, citoplazme i jedra hepatocita tokom akutnog i hroničnog izlaganja različitim koncentracijama MC-LR objasnili su Svirčev i saradnici (2010) i dali prikaz pomoću Šeme 1 (Svirčev i sar., 2011).

MC-LR može uzrokovati malignu transformaciju i proliferaciju hepatocita, nakon uzastopnih ponavljajućih mutacija. U toku svih ovih promena nastaje disregulacija gena koji su kritični u kontroli ćelijskog ciklusa, proliferacije, apoptoze, ćelijske migracije i metastaziranja. Mikrocistin može da modulira glavne proliferacione signalne puteve preko p53 supresornog gena tumora ili preko ciklin-ciklin zavisnih kinaznih enzima koji inhibiraju ćelijski ciklus, mitogen-aktivirajuće protein kinaze (MAPK), PI3K/AKT-mTOR signalne kaskade i drugih regulatornih gena ćelijskog rasta (Svirčev i sar., 2011).

Hronična ekspozicija niskim koncentracijama MC-LR povećava rizik za razvijanje kancera. Tumor promovišuća aktivnost MC-LR proizilazi iz njegove sposobnosti da inhibiše PP2A i PP1, koje aktiviraju neke MAPK, onkogene i supresorne gene tumora. Aktivacija MAPK indukuje preko transkripcionih faktora onkogene i citokine koji izazivaju povećanu proliferaciju hepatocita i promociju tumora. Dugotrajno izlaganje ćelija jetre na MC-LR dovodi i do stimulacije antiapoptičkih proteina (Bcl-2) i aktivacije protein kinaze C (PKC), favorizujući ćelijsko preživljavanje i ćelijsku deobu što sve rezultira promocijom tumora (Svirčev i sar., 2011).

Takođe, hronična izloženost MC-LR može aktivirati diacil glicerol (DAG) put koji favorizuje preživljavanje ćelija, povećava ćelijsku proliferaciju i rezultira promocijom tumora (Svirčev i sar., 2010). Neki dokazi ukazuju na to da bi dugoročno izlaganje MC-LR moglo izazvati neoplastične nodularne formacije koje mogu predstavljati preteče primarnog kancera jetre (Sedmak i Šuput, 2002; Leong i Leong, 2005).



Šema 1: Molekularni mehanizmi prilikom akutne i hronične ekspozicije MC-LR sa teorijskom mogućnošću indukcije hepatokarcinogeze (Svirčev i sar., 2011).

Puna linija-akutna izloženost mikrocistinu. Sa strelicama na krajevima: stimulacija u jednom ili oba smera; sa tačkama na krajevima: inhibicija u jednom ili oba smera.

Isprekidana linija-hronična izloženost mikrocistinu. Sa strelicama na krajevima: stimulacija u jednom ili oba smera; sa tačkama na krajevima: inhibicija u jednom ili oba smera.

Tačkasta linija-veza između ceramida, DAG (diacil glicerol), PKC (protein kinaza C), PP2A, Raf (mitogen aktivirajuća protein kinaza kinaza), MEK (mitogen aktivirajuća protein kinaza kinaza), ERK (ekstracelularni signaling-regulisan protein kinazom), MAPK (mitogen aktivirajuća protein kinaza) i Bcl2 (B ćelijski limfom 2) u ćelijskoj proliferaciji i apoptozi. Sa strelicama na krajevima: stimulacija u jednom ili oba smera; sa tačkama na krajevima: inhibicija u jednom ili oba smera.

Pored toga što MC-LR ima mutageno dejstvo i što deluje kao promotor tumora (Bouaicha i sar., 2005), on može da deluje i kao inicijator tumora. Inicijacija tumora može da se realizuje usled DNK oštećenja, bilo putem direktne interakcije MC-LR sa DNK ili preko indirektnih mehanizama kao što je indukcija formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Žegura i sar., 2008). U poslednje vreme, mehanizmi toksičnosti i karcinogeneze mikrocistina privlače mnogo pažnje i kao rezultat proizišli su brojni radovi koji analiziraju te mehanizme (Li i sar., 2009; Campos i Vasconcelos, 2010; Takumi i sar., 2010; Žegura i sar., 2011; Zhang i sar., 2012; Xu i sar., 2012).

MC-LR može da dovede i do apoptoze na različite načine. Inhibicija PP1 i PP2A može poremetiti aktivnost p53 gena, koji mogu da utiču na ćelijski ciklus i suzbijanje tumora (Takumi i sar., 2010). Pokazano je da inhibicija PP1 i PP2A može da smanji aktivnost sistema za DNK reparaciju (Mereish i sar., 1991; Moreno i sar., 2005), a kada DNK ne može da se popravi, ćelije ulaze u apoptozu. Takođe, MC-LR može izazvati formaciju ROS, i oslobađanje citohroma C i Ca^{2+} koji aktiviraju pojedine kaspaze koje dovode do oštećenja citoskeleta i konačno, apoptoze (Svirčev i sar., 2010).

Apoptoza je složen proces u koji su uključeni antiapoptotski članovi Bcl-2 familije (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) i proapoptotički članovi (Bax, Bid, Bad). MC-LR izaziva povećanje ekspresije Bcl i Bax molekula, a MC-RR značajno smanjuje ekspresiju Bcl-2 molekula, ali pospešuju Bax ekspresiju. Niske koncentracije mikrocistina primarno prouzrokuju apoptozu preko Bid-Bax-Bcl-2 apoptotskog puta. Brzo nastale koncentracije kiseoničnih radikala ubrzavaju regulaciju na dole Bcl-2 proteina, što utiče na disbalans između proliferacije hepatocita i njihove apoptoze (Svirčev i sar., 2011).

MC-LR delovanjem na PP1 i PP2A može izazvati razne ćelijske poremećaje uz oštećenje citoskeleta (Chorus i Bartram, 1999; Hiraga i Tamura, 2000) i to pre svega mikrotubula hepatocita, što vodi njihovoj morfološkoj transformaciji (Fu i sar., 2005). MC-LR u visokim dozama tokom akutnog izlaganja izaziva kolaps i agregaciju citokeratina intermedijernih filamenata i aktinskih mikrofilamenata oko jedra (Falconer i sar., 1992; Ghosh i sar., 1995; Clark i sar., 2007). Visoke doze MC-LR mogu dovesti do ruptуре mitohondrijalne membrane i oštećenja hepatične arhitekture sa posledničnim masivnim krvarenjem u jetri (McDermott i sar., 1998; Chen i sar., 2005). Hepatično oštećenje prouzrokovano MC-LR je rezultat brze apoptoze u većini hepatocita. Hepatociti su međusobno odvojeni, sakupljeni i zaobljeni, sa povećanom eozinofilijom i marginacijom nuklearnog hromatina ili piknozisa (Hooser, 2000).

Glutation (GSH) ima važnu ulogu u ćelijskoj odbrani od MC-LR. Naime, GSH može da inhibira aktivnost toksina formiranjem MC-GSH konjugata ili pomoću njegove antioksidativne aktivnosti (Žegura i sar., 2006). GSH i cistein (Cis) konjugati sintetisani od MC-LR, MC-YR, i MC-RR su pokazali smanjenu toksičnost kod miševa u poređenju sa originalnim mikrocistinom (Kondo i sar., 1992). Uočeno je da se MC-LR-Cis efikasno izlučuje putem bubrega, dok se MC-RR uglavnom izlučuje preko creva, a MC-LR-GSH se slično izlučuje putem creva i bubrega (Ito i sar., 2002).

1.3.1.2. Nodularin

Još jedan moćan hepatotoksin koji proizvode cijanobakterije je nodularin. Ovaj ciklični pentapeptid je slične hemijske strukture i načina delovanja kao mikrocistini. Toksični efekti ovog cijanotoksina se prvenstveno odnose na hepatocite, zbog aktivnog transporta nodularina u jetru pomoću multi-specifičnih organskih anjon transportera žučne kiseline (Runnegar i sar. 1995). Toksičnost nodularina se svodi na inhibiciju eukariotske PP1 i PP2A i pri tome više utiče na PP2A nego PP1. Inhibicija PP2A se odvija pri relativno sličnim koncentracijama, kao i u slučaju mikrocistina (~0,1 nM) (Honkanen i sar., 1991). Nodularin dovodi do hemoragije jetre kod miša i ima letalan efekat pri intraperitonealnom (ip) injektiranju doze od 50 µg/kg (LD₅₀) (Eriksson i sar., 1988). Pri dozama manjim od te koncentracije nodularin može delovati kao kancerogen i to putem inicijacije i promocije tumora jetre (Ohta i sar., 1994).

Istraživanja su pokazala da nodularin ima sposobnost bioakumulacije u različitim organizmima, uključujući ribe, škampe, zooplankton i druge bentosne organizme (Mazur-Marzec i sar., 2007; Karjalainen i sar. 2008). Pri tome nodularin može da izazove oksidativni stres u tkivima u kojima se akumulira (Persson i sar., 2009) i može imati negativan uticaj na zdravlje ljudi i životinja.

Sposobnost produkcije nodularina imaju predstavnici cijanobakterijskog roda *Nodularia* (Hardy, 2011), prvenstveno vrsta *Nodularia spumigena*. Kontaminacija vode ovom vrstom je povezana sa slučajevima uginuća životinja (Francis, 1898; Main i sar., 1977; Carmichael i sar., 1988; Nehring, 1993). U prvom naučnom izveštaju iz 1878. godine o potencijalnoj toksičnosti cijanobakterija, George Francis (1878) je opisao nekoliko smrtnih slučajeva životinja u Australiji, kao posledica korišćenja vode za piće iz jezera koje je bilo zahvaćeno cvetanjem cijanobakterija. Sto godina kasnije pretpostavljeno je da je *Nodularia*

spumigena bila odgovorna za cvetanje pomenutih jezera, dok je toksin izolovan iz pomenute vrste označen kao nodularin (Rinehart i sar., 1988).

Cvetanje toksične vrste *Nodularia spumigena* zabeleženo je širom sveta: na Novom Zelandu (Carmichael i sar., 1988), u Baltičkom moru (Sivonen i sar., 1989), Severnoj Americi (Galat i sar., 1990), Nemačkoj severnoj obali (Nehring, 1993), u estuarima i primorskim lagunama Australije (Heresztyn i Nicholson, 1997), kao i brakičnim i slatkovodnim jezerima na ušću reke Murray u Australiji, koja je glavni izvor vode za piće i navodnjavanje (Baker i Humpage, 1994).

1.3.2. Neurotoksini

Neurotoksine proizvode veliki broj cijanobakterija. Ovi cijanotoksini utiču na centralni nervni sistem blokadom neuromuskularnih veza, što može da dovede do respiratornog i kardiovaskularnog šoka (Carmichael i Falconer, 1993; Sivonen i Jones, 1999). Letalni efekat se može ispoljiti već nekoliko minuta, odnosno sati nakon unošenja neurotoksina u organizam, zbog čega se nazivaju još i brzo delujućim toksinima. Najčešći neurotoksini su saksitoksini i anatoksin, koji spadaju u grupu najjačih poznatih neurotoksina (Carmichael i sar., 1979).

1.3.2.1. Saksitoksini

Ova grupa neurotoksina obuhvata saksitoksine i neosaksitoksine. Saksitoksini se mogu akumulirati u vodenim organizmima koji se konzumiraju, kao što su morski plodovi, posebno školjke (Shumway, 1995). Ingestija kontaminiranih organizama ovim toksinima kod čoveka može dovesti do bolesti poznate kao paralitičko trovanje školjkama (eng. "*paralytic shellfish poisoning*" PSP). Simptomi ovog trovanja počinju da se pojavljuju već nakon 30 min od ingestije i to u vidu peckanja usana, jezika i grla, utrnulosti lica i vrata, znojenja, povraćanja, dijareje, slabosti mišića, gubitka motorne koordinacije i paralize. Zbog paralize respiratornih mišića i kardiovaskularnog kolapsa može doći i do smrti (Llewellyn, 2006), što se događalo kod čoveka nakon unošenja 1 mg saksitoksina (Evans, 1969). Ovi neurotoksini uzrokuju 2 000 PSP slučajeva godišnje, sa stopom od 15 % ljudske smrtnosti (Kellmann i sar., 2008).

Uklanjanje neapsorbovanog toksina se vrši uz pomoć aktivnog uglja, dok trenutno ne postoji klinički odobren protivotrov u terapiji trovanja saksitoksinom (Pearson i sar., 2010).

Poluživot saksitoksina u telu je u proseku 90 min i šanse za preživljavanje se značajno smanjuju nakon 12 h od inicijalne konzumacije toksina (Kao, 1993). Mehanizam toksičnosti se bazira na blokiranju i remećenju rada natrijumovih, kalijumovih i kalcijumovih kanala (Kao i Levinson, 1986; Wang i sar., 2003; Su i sar., 2004).

U slatkovodnim ekosistemima producenti saksitoksina mogu biti vrste: *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon sp.*, *Aphanizomenon gracile*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei* i *Planktothrix sp.* (Humpage i sar., 1994; Onodera i sar., 1997; Carmichael i sar., 1997, Lagos i sar., 1999, Humpage, 2008, Ballot i sar., 2010).

1.3.2.2. Anatoksini

Anatoksini obuhvataju anatoksin-a, homoanatoksin-a i anatoksin-a (S) (Metcalf, 2004).

Anatoksin-a je po hemijskoj strukturi biciklični amin, potentan alkaloid, niske molekulske težine. Ovaj cijanotoksin deluje zaustavljanjem postsinaptičke depolarizacije i prekidom neurotransmisije, što se manifestuje sledećim kliničkim znacima: mišićnim fascikulacijama, konvulzijama, kolapsom, paralizom, gušenjem, cijanozom i smrću (Carmichael i sar., 1979; Edwards i sar., 1992; Gunn i sar., 1992). Iako je prijavljen samo ograničen broj slučajeva trovanja ovim toksinom, čini se da je lečenje trovanja anatoksinom-a od male ili nikakve koristi, a ishod je obično smrtonosan (Puschner i sar., 2008). Izveštaji o trovanju anatoksinom-a su ređi od trovanja hepatotoksinima, međutim, ova trovanja se ipak dešavaju širom sveta. Zabeležen je veliki broj trovanja pasa (Edwards i sar., 1992; Gunn i sar., 1992; Gugger i sar., 2005; Puschner i sar., 2008), a smatra se da bi ovaj cijanotoksin mogao biti povezan sa uginućem teladi u SAD-u (Carmichael i sar., 1977), kao i flaminga u Keniji (Krienitz i sar., 2003). Anatoksin-a mogu da produkuju neki predstavnici cijanobakterijskih rodova: *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* i *Cylindrospermum* (Sivonen i Jones, 1999).

Homoanatoksin-a je strukturni homolog anatoksina-a, koji takođe imitira efekat neurotransmitera acetilholina (Ach) i tako deluje na neuromuskulatornu vezu i dovodi do konstantne stimulacije mišićnih ćelija, izazivajući vrtoglavicu, teturanje, otežano disanje, paralizaciju grudnih mišića, konvulzije i smrt (Catterall, 1980; Carmichael i Falconer, 1993). Smatra se da je nedavno ovaj toksin izazvao uginuće tri psa koja su se kupala u cvetajućem jezeru u Holandiji (Faassen i sar., 2012).

Anatoksin-a (S) se razlikuje u strukturnom pogledu i toksičnosti od anatoksin-a. Mehanizam delovanja anatoksin-a (S) je ireverzibilna inhibicija enzima acetilholin esteraze, čime sprečava njegovu reakciju sa Ach (Mahmood i Carmichael, 1986). Kao posledica toga Ach se vezuje za membranske receptore i rezultuje stalnom stimulacijom mišića. Ovo se manifestuje nekontrolisanim trzanjem mišića i konvulzijama, a ako zahvati i respiratorne mišiće, usled prestanka disanja može doći do smrtnog ishoda (Matsunaga i sar., 1989, Carmichael i Falconer, 1993). Karakterističan simptom trovanja ovim toksinom je salivacija i otuda slovo S u nazivu ovog toksina (Matsunaga i sar., 1989). Ovaj toksin prvenstveno produkuju cijanobakterije iz roda *Anabaena* i to vrste *A. flos-aqua*, *A. spiroides*, *A. circinalis* i *A. lemmermannii* (Sivonen i Jones, 1999; Carmichael, 2001).

1.3.3. Dermatotoksini

Dermatotoksini su alkaloidi koji se dele na aplaziatoksine, lingbiatoksine i debromoaplaziatoksine. Dermatotoksini mogu da izazovu različite alergijske reakcije i iritacije, kako na koži, tako i na drugim organima. Najčešće izazivaju teške oblike dermatitisa poznate kao “plivački svrab”, zatim oralne i gastrointestinalne promene (Cardellina i sar., 1979; Sivonen i Jones, 1999), samim tim ovi toksini predstavljaju posebnu opasnost u vodama za rekreaciju, a o tome će biti više reči kasnije u tekstu o ovom načinu izlaganja.

Pojedine vrste roda *Lyngbya* su poznate po produkciji toksina aplaziatoksina i dermoaplaziatoksina, jedinjenja koja su inicijatori tumora i aktivatori enzima protein kinaze C (Fujiki i sar., 1990). Cijanobakterije koje takođe mogu da produkuju dermatotoksine su tropske i subtropske cijanobakterije roda *Oscillatoria* i *Schizothrix* (Chorus i Bartram, 1999).

1.3.4. Citotoksini

1.3.4.1. *Cilindrospermopsin*

Cilindrospermopsin je toksin koji ispoljava negativne efekte na ćelije različitih tkiva zbog čega je i svrstan u grupu citotoksina (Harada i sar., 1999). U pitanju je izuzetno biološki aktivan alkaloid koji ometa nekoliko metaboličkih puteva. Toksičnost cilindrospermopsina se ispoljava kroz inhibiciju glutaciona, sinteze proteina i citohroma P450 (Runnegar i sar., 2002). On oštećuje jetru, bubrege, slezinu, srce, creva, timus, kožu i mukozne membrane izazivajući alergijske reakcije (osip, astmu, iritacije nosa, očiju i grla), dovodi do grčeva u

stomaku, groznice, glavobolje (Metcalf i Codd, 2004; Wieg i Pflugmacher, 2005). Cilindrospermopsin se prema delovanju može smatrati citotoksinom (Runnegar i sar., 2002), ali i hepatotoksinom i neurotoksinom (Kiss i sar., 2002), a osim toga smatra se i potencijalnim karcinogenom (Humpage i sar., 2000).

Takođe, cilindrospermopsin može pruzrokovati toksičnost *in utero*, jer je povezan sa preuranjenim rađanjem, smanjenom veličinom i povećanim mortalitetom mladunaca miša (Rogers i sar., 2007). Na osnovu jednog istraživanja postoji mogućnost da cilindrospermopsin ima potencijalne endokrine efekte, odnosno da utiče na odnos progesteron/estrogen kod žena, ali se ovaj rezultat mora posmatrati sa oprezom zbog varijabilnosti među testiranim individuuama (Young i sar., 2008).

Cilindrospermopsin je prvi put indentifikovan 1979. godine, kada je 148 osoba hospitalizovano sa simptomima hepatoenteritisa u Kvinsledu, Australiji, što je dovedeno u vezu sa cvetanjem cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* u rezervoaru vode za piće (Bourke i sar., 1983). Ovaj cijanotoksin je povezan i sa uginućem goveda u Kvinsledu, Australiji (Saker i sar., 1999).

Cilindrospermopsin je 1992. godine izolovan iz cijanobakterijske vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani i sar., 1992), koja se najčešće javlja u tropskim krajevima u slatkovodnim jezerima, rekama i akumulacijama. Međutim, reč je o invazivnoj vrsti koja širi svoje rasprostanjenje i samim tim se povećava opasnost od pojave ovog potentnog toksina koji gotovo da sada ima kosmopolitsku distribuciju. Navedeno se može pripisati karakteristikama vrste, kao na primer otpornost i formiranje veoma rezistentnih akineta (Padisák, 1997), ali tome pomažu i klimatske promene, kao i ubrzana eutrofizacija. Ova cijanobakterijska vrsta širi svoj areal rasprostranjenja i u Srbiji (Ćirić sar., 2010; Simić i sar., 2011; Cvijan i Fužinato, 2012; Karadžić i sar., 2013; Institut za javno zdravlje, Subotica, 2013; Svirčev i sar., 2014). Predstavnici još nekih rodova mogu da proizvode cilindrospermopsin: *Anabaena*, *Aphanizomemon*, *Umezakia* i *Raphidiopsis* (Hardy, 2011).

1.3.4.2. Endotoksini (Lipopolisaharidni toksini)

Lipopolisaharidi ili endotoksini su integralni delovi spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija, uključujući i cijanobakterije, gde formiraju komplekse sa proteinima i fosfolipidima. Cijanobakterijski lipopolisaharidi, kao i bakterijski lipopolisaharidi imaju toksično i pirogeno dejstvo, odnosno mogu da dovedu do inflamacija i gastroenteritisa, ali su od njih manje potentni (Bell i Codd, 1996). Smatra se da ovi toksini mogu da izazovu iritaciju

kože i očiju, sluzokože, alergijske reakcije, vrtoglavicu, glavobolju, groznicu, grčeve, gastroenteritis, povraćanje, dijareju i respiratorne probleme (Weckesser i Drews, 1979; Stewart, 2006). Mogućnost da se pomenuti simptomi pripišu cijanobakterijskim lipopolisaharidima se nalazi u činjenici da i lipopolisaharidi heterotrofnih Gram-negativnih bakterija mogu da dovedu do značajnog morbiditeta i mortaliteta. Stoga možda i cijanobakterije mogu ravnopravno biti odgovorne za slične bolesti jer sadrže lipopolisaharide (Stewart, 2006). Codd (2000) je prvi ovo sugerisao: “Lipopolisaharidi drugih bakterija su povezani sa gastroenteritisom i inflamatornim problemima, pa se može smatrati da i cijanobakterijski lipopolisaharidi mogu doprineti zdravstvenim incidentima vezanim za vodu, mada oni nisu adekvatno istraženi”.

Toksični lipopolisaharidi su izolovani iz nekoliko vrsta *Anabaena cylindrica*, *Oscillatoria brevis*, *Microcystis aeruginosa*, pa čak i *Spirulina platensis* (videti Stewart, 2006), što je interesantno sa medicinskog i higijenskog aspekta budući da se ova cijanobakterija obično smatra netoksičnom i koristi za proizvodnju suplemenata u ishrani. Falconer (1999) je potvrdio da je lizat spiruline bio visoko toksičan za miša kada se aplicira ip injekcijom.

1.4. Srpski vodič za cvetanje cijanobakterija

Svirčev i Baltić (2011) su zbog realnih mogućnosti izloženosti stanovnika Srbije cijanotoksinima, napravili prvi Srpski vodič za cvetanje cijanobakterija u kojem se, između ostalog, nalazi i tabela sa simptomima i znacima trovanja izazvanim konkretnim cijanotoksinima, koja će u Tabeli 1 biti delom prikazana.

Navedeni simptomi i znaci trovanja cijanobakterijskim toksinima zavise od načina i vremena izlaganja, a pojavljuju se između nekoliko sati do nekoliko dana nakon izlaganja. Trovanje cijanotoksinima se može dijagnostikovati na osnovu kliničke slike, navedenih simptoma i anamneze. Anamnestička pitanja podrazumevaju: opis vode, izlaganje-gde, kada, koliko dugo, svesnost pacijenta, unos alkohola, hrane i lekova neposredno pre izlaganja, kao i druge razloge za prisutne simptome. Takođe, utvrđivanje dokaza izloženosti toksinima se preporučuje u svim slučajevima na osnovu sačuvanog uzorka iz želuca, zbog dokazivanja prisustva cijanobakterija mikroskopiranjem ili cijanotoksina pomoću laboratorijskih analiza (Svirčev i Baltić, 2011).

Tabela 1. Trovanje cijanotoksinima, simptomi i znaci (Svirčev i Baltić, 2011)

Toksini	Simptomi i znaci trovanja
Mikrocistini hepatotoksin	<p><i>Čovek</i>: Karuaru sindrom-gubitak apetita, grčevi u stomaku, mučnina, povraćanje, dijareja/ krvava dijareja, povišena temperatura, glavobolja, bol u mišićima i zglobovima, opšta slabost.</p> <p><i>Znaci</i>: opšte bledilo kože i mukoznih membrana, dermatitis, suženje očiju, curenje nosa i hladni ekstremiteti; povišen nivo γ-GT, LDH, ALT, SDH.</p> <p>Hronično trovanje: hepatocelularni karcinom, amiotrofična lateralna skleroza.</p> <p><i>Pacov</i>: smrtnost embriona, teratogenost, inicijator i promoter tumora, kardiotoksičnost i nefrotoksičnost, povišen nivo ALT.</p> <p><i>Sisari</i>: slabost, ograničena pokretljivost, anoreksija, bledilo kože ekstremiteta i mukoznih membrana, zbunjenost, preosetljivost na svetlost.</p>
Nodularin hepatotoksin	<p><i>Čovek</i>: iritacija kože i očiju.</p> <p>Ekperimentalni sistemi: inhibicija protein fosfataza, promocija tumora.</p>
Saksitoksin, Neosaksitoksin neurotoksin	<p><i>Čovek</i>: parestezija, utrnulost usana i usta do 3 h nakon ekspozicije, izobličena lica, slabost mišića vrata i ekstremiteta, diskoordinacija, respiratorna i mišićna paraliza.</p> <p><i>Životinje</i>: diskoordinacija, smrt usled gušenja.</p>
Anatoksin-a neurotoksin	<p><i>Čovek</i>: nije potvrđeno.</p> <p><i>Životinje</i>: progresivno podrhtavanje mišića, umanjena pokretljivost, abdominalni tip disanja, cijanoza, konvulzije, paraliza, asfiksija i smrt.</p> <p><i>Ptice</i>: opisotonus ("s"-oblik vrata), vrtoglavica, fascikulacije mišića, otežano disanje, konvulzije, cijanoza, lučno savijanje vrata unazad i smrt.</p>
Anatoksin-a (S) neurotoksin	<p><i>Čovek</i>: grčevi i fascikulacija mišića, paraliza, srčana i respiratorna insuficijencija.</p> <p><i>Svinja</i>: hipersalivacija, otežano disanje, tremor, fascikulacija, ataksija, dijareja, ležeći položaj.</p> <p><i>Patka</i>: regurgitacija, pareza, opistotonus, klonični grčevi, smrt.</p> <p><i>Miš</i>: pojačano suženje i lučenje pljuvačke, uriniranje, defekacija, respiratorni zastoj i smrt.</p> <p><i>Pacov</i>: crvenilo kože ušiju, grčenje i fascikulacija mišića, konvulzije, cijanoza, nesvestica i smrt.</p>
Apliziatoksin Lingbiatoksin dermatotoksin	<p><i>Čovek</i>: dermatitis, iritacija kože, "plivački svrab", duboka deskvamacija i plikovi, kancer kože.</p> <p><i>Miš</i>: gastrointestinalne erozije sluznice, upala pluća i smrt.</p>
Cilindrospermopsin hepatotoksin, citotoksin	<p><i>Čovek</i>: nelagodnost, slabost, anoreksija, povraćanje, dijareja, glavobolja, bubrežna disfunkcija.</p> <p><i>Znaci</i>: bledilo mukoznih membrana, uvećana jetra, anomalije hromozoma.</p> <p><i>Miš</i>: potištenost, anoreksija, dijareja, otežano disanje i smrt.</p>
Lipopolisaharidi citotoksin	<p><i>Čovek</i>: dermatitis, iritacija kože, gastroenteritis, dijareja, grčevi u stomaku, mučnina, alergijske reakcije, iritacija očiju, nosa i bronhopulmonarnog sistema (emfizem, obstruktivna hronična bolest i astma), groznica, drhtavica, glavobolja, plikovi mukoznih membrana.</p>

1.5. Tolerantni dnevni unos cijanotoksina, predlozi SZO i iskustva iz sveta

Zbog brojnih zdravstvenih posledica koje mogu da izazovu navedeni cijanotoksini, posebno mikrocistini, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je odredila tolerantni dnevni unos (TDI) od 0,04 µg/kg dnevno, kao i privremenu graničnu vrednost (GV) za MC-LR u pijaćoj vodi od 1 µg/L (SZO, 1998). TDI je količina potencijalno štetne supstance koja može da se konzumira dnevno tokom života sa zanemarljivim rizikom od neželjenih efekata po zdravlje.

Odrednice za MC-LR potiču iz studije oralnog izlaganja miša čistom toksinu MC-LR tokom 13 nedelja. Na osnovu histopatologije jetre i serumskih promena nivoa enzima određen je NOAEL (nivo bez uočenih neželjenih efekata) od 40 µg/kg telesne mase dnevno (Fawell i sar., 1994). Primenom ukupnog faktora nesigurnosti 1 000 (koji uključuje: 10 za varijabilnosti unutar vrste, 10 za varijabilnosti između vrsta i 10 za ograničenja u bazi podataka prvenstveno o hroničnim efektima), dobijen je TDI od 0,04 µg/kg telesne mase čoveka dnevno za MC-LR.

Na osnovu ove TDI vrednosti SZO je predložila GV MC-LR za kritične puteve izlaganja. Naime, TDI vrednost je pomnožena sa standardizovanom telesnom težinom (TT) prosečne odrasle osobe (60 kg ili 70 kg) i faktorom raspodele (FR), odnosno procentom ukupnog unosa putem različitih načina izlaganja (npr. voda za piće 0,8; hrana 0,2; suplementi 1). Dobijeno je zatim podeljeno sa dnevnim unosom (količinom K) preko određenog izvora (npr. 2 L vode za piće; 0,1 kg ribe; 2 g suplemenata) (Dietrich i Hoeger, 2005), što se može videti u priloženoj formuli:

$$GV = (TDI \times TT \times FR) / K$$

Do danas, GV za druge forme mikrocistina, kao i druge cijanotoksine nisu definisane od strane SZO, jer nema adekvanih informacija o dugotrajnom oralnom izlaganju i toksičnosti ovih metabolita.

SZO je u cilju zaštite zdravlja ljudi predložila i nivoe rizika u odnosu na brojnost cijanobakterija, kao i koncentracije mikrocistina u vodama za rekreaciju i vodosnabdevanje (Tabela 2 i 3).

Tabela 2. Stepen zdravstvene ugroženosti u odnosu na gustinu populacije cijanobakterija i koncentracije mikrocistina u vodama za rekreaciju predložen od SZO

(Chorus i Bartram, 1999)

Stepen zdravstvene ugroženosti	Stanje/gustina populacije	Mikrocistin ($\mu\text{g/L}$)	Zdravstveni rizik	Preporučene aktivnosti
Mala zdravstvena ugroženost, opasnost niskog stepena	<20 000 ćelija cijanobakterija/mL ili <10 $\mu\text{g/L}$ hlorofil <i>a</i> sa dominacijom cijanobakterija	2-10	- kratkotrajne zdravstvene negativne posledice (iritacije kože i sluzokože, intestinalne tegobe)	- postavljanje oznake koje ukazuju na prisustvo cijanobakterija; - informisanje relevantnih institucija
Srednja zdravstvena ugroženost, opasnost srednjeg stepena	20 000-100 000 cijanobakterijskih ćelija/mL ili 10-50 $\mu\text{g/L}$ hlorofil <i>a</i> sa dominacijom cijanobakterija	10-20	- kratkotrajne zdravstvene negativne posledice (iritacije kože i sluzokože, intestinalne tegobe); - hronična obolenja	- intenzivna kontrola gustine populacije; - suzdržavanje od kupanja i direktnog kontakta sa vodom; - postavljanje oznake o prisustvu cijanobakterija; - informisanje relevantnih institucija
Velika zdravstvena ugroženost, opasnost visokog stepena	>100 000 cijanobakterijskih ćelija/mL ili >50 $\mu\text{g/L}$ hlorofil <i>a</i> formiranje cijanobakterijskih nakupina	>20	- kratkotrajne zdravstvene negativne posledice (iritacije kože i sluzokože, intestinalne tegobe); - hronična obolenja; - mogućnost akutnog trovanja sa letalnim ishodom	- momentalna akcija prevencije kontakta sa cijanobakterijama; - hitno zbrinjavanje svih koji su bili u kontaktu sa nakupinama; - postavljanje oznake koje ukazuju na zabranu kupanja i drugih aktivnosti u vodama za rekreaciju; - informisanje relevantnih institucija

Tabela 3. Nivo upozorenja u odnosu na gustinu populacije cijanobakterija u vodama namenjenim za vodosnabdevanje predložen od strane SZO (Chorus i Bartram, 1999)

Nivo upozorenja	Stanje-gustina i brojnost ćelija	Aktivnosti
opasnost niskog stepena	200 ćelija cijanobakterija po mL	- necvetajući uslovi, cijanobakterije se detektuju u malom broju, nedeljni monitoring
opasnost srednjeg stepena	2 000 cijanobakterijskih ćelija po mL ili 1 µg/L hlorofil <i>a</i> sa dominacijom cijanobakterija	- trend kretanja ka povećanom broju ili održavanju srednjeg broja cijanobakterija; - voda može biti neupotrebljiva za piće bez predhodne obrade; - u fabrikama vode uvodi se testiranje toksina, naročito ukoliko su u uzorku dominantne poznate toksične vrste - ponavljati nedeljno analize; - nizak rizik za iritaciju kože i gastrointestinalne probleme kroz kontakt tokom aktivnosti u vodi - kontinuirano nedeljno određivanje brojnosti cijanobakterija i davanje izveštaja javnosti
opasnost visokog stepena	100 000 cijanobakterijskih ćelija po mL ili 50 µg/L hlorofil <i>a</i> sa dominacijom cijanobakterija	- stalno visok broj potencijalno toksičnih cijanobakterija u vodi i/ili vidljivo lokalizovane formirane nakupine; - voda može biti neupotrebljiva za piće bez predhodnog odgovarajućeg tretmana; - uvodi se redovno dnevno testiranje toksina; - ako je moguće zameniti izvor snabdevanja vodom; - nedeljno uzimanje uzoraka i određivanje broja cijanobakterija; - visok rizik od negativnih zdravstvenih efekata; - šire medijsko izveštavanje javnosti

Neke zemlje su prihvatile navedene vrednosti (Češka, Danska, Francuska, Holandija, Italija, Japan, Koreja, Norveška, Poljska i Španija), dok su druge formulisale svoje vrednosti, u zavisnosti od lokalnih uslova (Australija, Novi Zeland, Kanada), a najopsežniji zakon uveden je u Brazilu (videti Chorus, 2005 i 2012).

Pored standardnih mikrocistina, neke države su odredile vrednosti i za druge cijanotoksine. Tako je na primer u Novom Zelandu određena privremena maksimalna vrednost za nodularin od 1 µg/L, zatim za cilindrospermopsin 1 µg/L (što je slučaj i u Australiji), saksitoksin od 3 µg/L (kao i u Australiji i Brazilu), Novi Zeland je odredio još i privremene maksimalne vrednosti za anatoksin-a (S) (1 µg/L), homoanatoksin (2 µg/L) i anatoksin-a (6 µg/L), dok je Kanada odredila nešto nižu vrednost od 3,7 µg/L za anatoksin-a. Najnoviji stavovi država po pitanju procene rizika, menadžmenta i regulacija cijanobakterija i cijanotoksina u vodama za piće i rekreaciju predstavila je Ingrid Chorus (2012), a osnovne informacije su sumirane u narednim Tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Primeri graničnih vrednosti (GV) ili standarda (S) i drugih propisa ili preporuka za upravljanje cijanotoksinima u vodi za piće; (P)MAV/(P)MAC: (privremena) maksimalna vrednost ili koncentracija; HAV: vrednost opasna po zdravlje (Chorus, 2012)

Država	Cijanobakterija	Cijanotoksin	Komentar
Argentina	Nema posebnog menadženta i monitoringa, neki vodovodi imaju svopstvene odrednice i obično su to predložene GV SZO za MC-LR od 1 µg/L		
Australija	Toksični soj <i>Microcystis aeruginosa</i> 6 500 ćelija/mL ili biovolumen od 0,6 mm ³ /L	MC GV 1,3 µg/L	Australijske smernice za pijaće vode (2011) su skup nacionalnih smernica koje pojedinačne države/teritorije koriste kao osnov za njihove specifične regulatorne zahteve.
	Toksični soj <i>Nodularia spumigena</i> HAL 40 000 ćelija/mL ili biovolumen od 9,1 mm ³ /L	NOD -	
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 15 000-20 000 ćelija/mL ili biovolumen od 0,6-0,8 mm ³ /L	CYN HAL: 1 µg/L	
	Toksični soj <i>A. circinalis</i> 20 000 ćelija/mL ili biovolumen 5 mm ³ /L	STX HAL: 3 µg/L	
Brazil	GV: 10 000-20 000 ćelija/mL ili biovolumen 1 mm ³ /L	MC S: 1 µg/L	>10 000 ćelija/mL potrebno nedeljno praćenje; >20 000 ćelija/mL testiranje toksičnost i / ili cijanotoksina u vodu za piće su obavezni
		CYN GV: 15 µg/L	
		STX ekvi. GV: 3 µg/L	
Češka Republika	U sirovoj vodi ≥1 kolonija/mL ili ≥5 filamenata/mL	MC-LR u tretiranoj vodi S: 1 µg/L Monitoring jednom nedeljno	Nivo opreza: kvantifikacija cijanobakterija u sirovoj vodi najmanje jednom nedeljno; vizuelne opservacija cvetanja
	≥2 000 ćelija/mL ili ≥0,2 mm ³ /L biovolumen ili ≥1 µg/L hlorofil <i>a</i>		Nivo uzbune 1: pokušaj smanjenja cijanobakterija i toksina tretmanom vode (ako je potrebno analize toksina)
	≥100 000 ćelija/mL ili ≥10 mm ³ /L biovolumen ili ≥10 µg/L hlorofil <i>a</i>		Nivo uzbune 2: veći naglasak na efikasnost tretmana i monitoring MC
Danska	Nema posebnih propisa za cijanotoksine u pijaćim vodama jer gotovo sve potiču iz podzemnih voda. U malom broju slučajevima površinskih voda primenjuju se GV SZO za MC-LR od 1 µg/L		
Finska	Potencijalno toksično cijanobakterije u sirovoj vodi >5 000 ćelija/mL ili >1 mg/L biomase		Monitoring MC i pojačani tretman
	>100 000 ćelija/mL, >20 mg/L biomase	MC u sirovoj vodi GV: >1 µg/L	Restrikcija upotrebe vode, informisanje potrošača
		MC u finalnoj vodi za piće GV: >10 µg/L	Zabrana upotrebe
Francuska		MC 1 µg/L	Analize potrebne u sirovoj vodi i na tački distribucije samo pri cvetanju
Holandija	Nema posebnih propisa za cijanotoksine u vodi za piće, 40 % vodosnabdevanja su dobro zaštićene površinske vode. Po potrebi se koristi SZO GV MC 1 µg/L		
Italija	Nacionalni dekret uključuje "alge" kao parametar za praćenje ako lokalne vlasti pretpostavljaju rizik, na osnovu SZO GV za MC-LR		
Južna Afrika		MC-LR GV: 1 µg/L	Praćenje i hlorofila <i>a</i> i broja ćelija cijanobakterija

Kanada		MC-LR MAC: 1,5 µg/L	Monitoring u slučaju cvetanja
		Anatoksin a PMAC: 3,7 µg/L	Samo u Kvebeku
Kuba	Fitoplankton <20 000 ćelija/mL Cijanobakterije <1500 ćelija/mL		Vizuelna mesečna inspekcija, uzorkovanje 4 meseca godišnje
	Fitoplankton 20 000 – 100 000 ćelija/mL; Cijanobakterije >50% Bar jedna vrsta toksična		Pojačana inspekcija i uzorkovanje, obaveštenje za potrošače i nadležne
	Potvrđeno cvetanje i toksični efekti na ljude i životinje		Uzbuna, restrikcija upotrebe vode
Mađarska	Legislativa uključuje praćenje bioloških parametara mikroskopiranjem npr. cijanobakterije, barem jednom godišnje		
Nemačka	Nema posebnih propisa za cijanotoksine u vodi za piće, 20 % vodosnabdevanja su dobro zaštićene površinske vode. U slučaju pojave cijanobakterija koristi se SZO GV MC. Nacionalne smernice za supstance sa nepotpunim toksikološkim dokazima ukoliko se kancerogeneza ne može isključiti kao mogućnost predlaže < 0,1 µg/L može se primeniti na cilindropermopsin		
Novi Zeland		MC-LR ekvi. PMAV 1 µg/L	Efektivna primena protokola je sprečila da PMAV koncentracije stignu do potrošača
		NOD PMAV 1 µg/L	
		CYN PMAV 1 µg/L	
		STX ekvi. PMAV 3 µg/L	
		Anatoksin a PMAV 6 µg/L	
		Anatoksin a(S) PMAV 1 µg/L	
		Homoanatoksin a PMAV 2µg/L	
SAD	Nema nacionalnih zahteva, ali mnoge države preduzimaju razne akcije		
Singapur		MC-LR totalni intra i ekstracelularni S: 1 µg/L	Svaki dobavljač vode za piće je u zakonskoj obavezi da pripremi i sprovede sigurnosni plan za kvalitetu vode u skladu sa standardom
Španija		MC S: 1 µg/L	Analiza usled jasne eutrofikacije izvora vode
Turska	>5 000 ćelija/mL ili >1 µg/l hlorofil <i>a</i>		Mesečne analize sirove vode, u slučaju prekoračenja nedeljno uzorkovanje i analize toksina
		MC-LR ekvi. 1 µg/L	Analize toksina u tretiranoj vodi, pojačan tretman ili alternativni izvor vode
Urugvaj		MC-LR S: 1 µg/L	Uredba: "Voda za piće ne bi trebalo da sadrži količinu cijanobakterija koja bi mogla uticati na karakteristike vode ili ljudsko zdravlje"

MC-mikrocistin; NOD-nodularin; STX-saksitoksin; CYN-cilindropermopsin

Tabela 5. Primeri upravljanje cijanotoksinima u vodi za rekreaciju u različitim državama
(Chorus, 2012)

Država	Parametar i vrednosti	Akcija
Australija	<i>M. aeruginosa</i> ≥ 500 do $< 5\ 000$ ćelija/mL ili biovolumen $> 0,04$ do $< 0,4$ mm ³ /L svih cijanobakterija	Regularni monitoring
	<i>M. aeruginosa</i> $\geq 5\ 000$ do $< 50\ 000$ ćelija/mL ili biovolumen $\geq 0,4$ do < 4 mm ³ /L svih cijanobakterija sa prisutnim producentom toksina ili $\geq 0,4$ do < 10 mm ³ /L svih cijanobakterija gde producent toksina nije prisutan	Obaveštavanje agencija, češće uzorkovanje, vizuelna inspekcija, procena potrebe monitoringa toksina
	Toksični <i>M. aeruginosa</i> $\geq 50\ 000$ ćelija/mL ili biov. ≥ 4 mm ³ /L svih cijanobakterija sa prisutnim producentom toksina MC ≥ 10 µg/L ili ≥ 10 mm ³ /L svih cijanobakterija gde producent toksina nije prisutan ili je cvetanje stalno prisutno	Nastavak monitoring, obaveštenje organizacija za zdravstvene savete, analiza toksina, obaveštavanje javnosti o zdravstvenim posledicama
Češka Republika	$> 20\ 000$ ćelija/mL	1 nivo upozorenja
	$> 100\ 000$ ćelija/mL	2 nivo upozorenja, zatvaranje
Danska	Nakupine u delu za rekreaciju hlorofil > 50 µg/L i dominacija cijanobakterija	Informisanje nadležnih i odluka o obaveštavanju javnosti-postavljanje znakova, preko medija i lokalnih korisničkih grupa.
Finska	Zelene fleke na vodi ili nakupine na obali. Redukcija providnosti vode.	Nivo 1: Moguće mikroskopiranje i analize toksina ako su u pitanju popularne plaže ili su uočeni efekti na ljude ili uginule životinje
	Obojenje vode, cijanobakterijska masa na plaži	Nivo 2: Poželjno mikroskopiranje i analize toksina; obaveštavanje javnosti
	Izraženi debeli agregati cijanobakterija na površini vode i obali	Nivo 3: Poželjno mikroskopiranje i analize toksina; obaveštavanje javnosti
Francuska	Uočljivo cvetanje, promena boje vode	Mikroskopiranje. Ako su prisutne cijanobakterije: brojanje i identifikacija roda
	$< 20\ 000$ ćelija/mL $\pm 20\ %$	Dnevni monitoring. Nedeljno brojanje. Normalne rekreativne aktivnosti
	$20\ 000 - 100\ 000$ ćelija/mL $\pm 20\ %$	Dnevni monitoring. Nedeljno brojanje. Dozvoljene rekreativne aktivnosti; javnost je informisana posterima
	$> 100\ 000$ ćelija/mL $\pm 10\ %$. 25 µg/L MC-LR ekvi. $\pm 5\ %$	MC < 25 µg/L restrikcija kupanja i rekreativnih aktivnosti. MC > 25 µg/L zabrana kupanja i restrikcija rekreativnih aktivnosti. Obaveštavanje javnosti
	Nakupine ili pena na mestu rekreacije	Zabranjene sve aktivnosti na vodi gde su nakupine. Druge oblasti koje nisu zahvaćene mogu ostati otvorene
Holandija	Hlorofil <i>a</i> $< 12,5$ µg/L biovolumen $< 2,5$ mm ³ /L	Monitoring
	Hlorofil <i>a</i> $12,5 - 75$ µg/L biovolumen $2,5 - 15$ mm ³ /L	Nivo uzbune 1: nedeljni monitoring i izdavanje upozorenja u trajanju od nedelje dana: "Toksične modro-zelene alge. Rizik od iritacije kože i intestinalnih problema".
	Hlorofil <i>a</i> > 75 biovolumen > 15 mm ³ /L	Nivo uzbune 2: nedeljni monitoring i savet protiv kupanja: "Savetuje vam se da se ne kupate u ovoj vodi"; moguća zabrana od strane lokalnih vlasti

Italija	< 20 000 ćelija/mL	Dnevna vizuelna inspekcija; nedeljno brojanje
	20 000 – 100 000 ćelija/mL	Dnevna vizuelna inspekcija; nedeljno brojanje; informisanje javnosti; kvantifikovanje MC
	>100 000 ćelija/mL	Zabrana kupanja do određivanja MC; informisanje javnosti; nedeljno brojanje
	Prisutne nakupine	Zabrana kupanja do određivanja MC; upozorenje; monitoring pomeranja nakupina
	MC >25 µg/L	Zabrana kupanja
Kanada	≤100,000 ćelija/mL MC-LR ≤20 µg/L	Može se izdati upozorenje za plivače, da se izbegava dalji kontakt sa vodom
Kuba	Fitoplankton <1500 ćelija/mL Cijanobakterija <500 ćelija/mL	Mesečna vizuelna inspekcija i uzorkovanje barem 4 meseca godišnje
	20 000 – 100 000 ćelija/mL; >50 % cijanobakterija. Bar jedna toksična vrsta	Uzbuna: češće uzorkovanje (nedeljno); dnevna inspekcija; obaveštenje zdravstvenim institucijama, lokalnoj vladi i javnosti
	Nakupine stalno prisutne; potvrđeno cvetanje. Prijave toksičnih efekata kod ljudi ili životinja	Uzbuna sa pojačanim akcijama informisanja javnosti
Mađarska	Hlorofil <i>a</i> <10 µg/L ili <20 000 ćelija/mL ili MC-LR ekvi. <4 µg/L	odlično
	<25 µg/L ili <50 000 ćelija/mL ili <10 µg/L	dobro
	<50 µg/L ili <100 000 ćelija/mL ili <20 µg/L	zadovoljavajuće
	>50 µg/L ili >100 000 ćelija/mL ili >20 µg/L	neprihvatljivo
Nemačka	Secchi Disk >1 m i <40 µg/L hlorofil <i>a</i> ili biovolumen <1 mm ³ /L ili MC <10 µg/L	Monitoring daljeg razvoja cijanobakterija
	Secchi Disk <1 m i >40 µg/L hlorofil <i>a</i> ili biovolumen >1mm ³ /L ili MC >10 µg/L	Izdavanje upozorenja protiv kupanja, razmotriti trenutno zatvaranje
	Izražene nakupine i/ili MC >100 µg/L	Izdavanje upozorenja protiv kupanja, predlaže se trenutno zatvaranje
Novi Zeland	<500 ćelija/mL	Posmatranje: nedeljna vizuelna inspekcija i uzorkovanje između leta i jeseni
	0,5 do <1,8 mm ³ /L biovolumen potencijalno toksičnih cijanobakterija ili 0,5 do <10 mm ³ /L svih cijanobakterija	Uzbuna: povećana nedeljna inspekcija i uzorkovanje, na više mesta; obaveštenje zdravstvenih institucija
	MC ≥12 µg/L ili biov. ≥1,8 mm ³ /L potencijalno toksičnih cijanobakterija ili ≥10 mm ³ /L biov. svih cijanobakterija ili konstantno prisustvo nakupina	Akcija: nastaviti monitoring; ako su prisutni toksični rodovi, testirati cijanotoksine. Obavestiti javnost o potencijalnim zdravstvenim rizicima.
Poljska	Uzorkovanje ne manje od 4 puta po sezoni (ne više od mesec dana između)	
SAD	Nema nacionalnih zahteva, ali mnoge države preduzimaju razne akcije	
Singapur	Hlorofil <i>a</i> ≤50 µg/L	Status se procenjuje godišnje. Ako je vodeno telo nestabilno za kontaktne vodene aktivnosti, obaveštava se javnost.
Španija	Mala verovatnoća cvetanja	Lokalni kriterijumi; neki koriste SZO smernice, neki imaju dodatne parametre; trenutno zatvaranje se dešavalo na osnovu brojnosti cijanobakterija
	Srednja verovatnoća	
	Visoka verovatnoća	
Turska	<20 000 ćelija/mL ili <10 µg/L MC-LR ekvi. ili <10 µg/L hlorofil <i>a</i>	Nivo 1: dozvoljena rekreacija, javnost je obaveštena posterom. Monitoring (uzorkovanje, brojanje i identifikacija vrste)
	20 000 – 100 000 ćelija/mL ili >25 µg/L MC-LR ekvi.	Nivo 2: >20 000 ćelija/mL, analiza MC. MC-LR ekvi >25 µg/L, hitna akcija informisanja nadležnih i javnosti. Postavljanje natpisa
	Nakupine u oblasti rekreacije	Nivo 3: sve aktivnosti se zabranjuju

1.6. Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima

Glavni putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima su (videti Drobac i sar., 2013):

1. hronično unošenje kontaminirane vode za piće;
2. kožni kontakt sa toksinima tokom rekreativnih aktivnosti kao što su plivanje, vožnja kanuom ili kupanje, uz udisanje ili kontakt putem nosne sluzokože;
3. ishrana vodenim organizmima (ribe, školjke,...) iz zagađenih voda, koji su akumulirali cijanotoksine u svojim tkivima;
4. unošenje kontaminiranog povrća i voća navodnjavano vodom koja sadrži cijanotoksine;
5. konzumiranje dijetetskih suplemenata na bazi cijanobakterija, ako nivoi cijanotoksina nisu kontrolisani;
6. specifičan način izlaganja-intravenozno tokom hemodijalize

1.6.1. Unošenje kontaminirane vode za piće

Direktno unošenje kontaminirane vode za piće je čest put unosa cijanotoksina. Ako se uzima voda iz površinskih izvora koji cvetaju, moguće je da takva voda sadrži cijanotoksine (Chorus, 1999). Zabeleženi su brojni slučajevi detekcije cijanotoksina u sirovim i vodovodnim vodama širom sveta (Argentina, Australija, Bangladeš, Češka, Finska, Francuska, Kanada, Kina, Nemačka, Letonija, Poljska, SAD, Srbija, Španija, Švajcarska, Tajland, Turska) (Westrick, 2003; Hoeger i sar., 2004; 2005; Dietrich i Hoeger, 2005; Svirčev i sar., 2009).

Brojni su primeri letalnog trovanja životinja nakon upotrebe vode za piće iz slatkovodnih ekosistema u kojima su masovno bile razvijene cijanobakterije (Chorus i Cavalieri, 2000). Prvi slučajevi sežu još iz XIX veka, a odnosili su se na trovanje ovaca, krava, konja, svinja, pasa, riba, glodara, vodozemaca, ptica, slepih miševa, zebri i nosoroga (Codd i sar., 1989).

Poznat je i veliki broj slučajeva intoksikacije ljudi izazvanih cijanobakterijama. Postoje brojni izveštaji o povezanosti ljudskih bolesti sa cijanobakterijama iz vode za piće u Kini, SAD, Brazilu, Australiji i Švedskoj. Ovi incidenti uključuju nekoliko hiljada slučajeva trovanja, sa gastroenteritisom kao najčešćim ishodom. U narednom tekstu sledi kratak opis nekih od slučajeva trovanja cijanotoksinima ovim putem izlaganja.

Najstariji izveštaj o trovanju cijanotoksinima je pisani dokument generala Zhu Ge-Linga, star oko 1 000 godina, koji govori o pojavi smrtnih slučajeva među vojnicima koji su pili vodu iz reke u južnoj Kini, koja je bila zelene boje (Chorus i Bartram, 1999).

U Čarlstonu, Zapadna Virdžinija, u populaciji od 60 000 ljudi, njih 9 000 imalo je akutni gastroenteritis nakon kontaminacije vode za piće cijanobakterijama (Veldee, 1931). Slično je viđeno i na reci Ohajo iste godine (Tisdale, 1931). U SAD-u su i 1968. godine zabeleženi slučajevi gastrointestinalnih obolenja nakon upotrebe vode za piće iz vodozahvata sa masovnim razvojem cijanobakterija (Schwimmer i Schwimmer, 1968).

Cvetanje cijanobaktrijskih rodova *Microcystis* i *Anabaena* u rezervoaru Bahia, Brazil je izazvalo 2 000 slučajeva gastroenteritisa, uključujući 88 smrtnih slučajeva, među stanovništvom koje je pilo vodu iz kontaminiranog rezervoara. Iako nema informacija o toksičnosti prisutnih cijanobakterija, testovi vode na enterične bakterije i viruse, pesticide i teške metale su bili negativni. Prokuvavanje vode za piće nije sprečilo pojavu bolesti jer ovaj postupak ne utiče na mikrocistine (Teixeira i sar., 1993).

Izbijanje hepatoenteritisa na Palm Islandu, Kvinslend, Australija 1979. godine, zahvatilo je 139 dece i 10 odraslih, što je rezultovalo sa oko 70 % pacijenata kojima je bila neophodna intravenska terapija. Sindrom je uključivao povraćanje, glavobolju, bolove u stomaku sa hepatomegalijom, letargiju, dijareju, acidozu i oštećenje jetre, bubrega, pluća i intestinuma. Navedeni simptomi su bili povezani sa konzumacijom vode za piće iz rezervoara kontaminiranim sa cijanobakterijom *Cilindrospermopsis raciborskii*. Obimno cvetanje izazvalo je razvoj neprijatnog ukusa i mirisa, pa je voda bila tretirana sa bakar sulfatom u cilju uništavanja cijanobakterija (Byth, 1980; Bourke i sar., 1983). Iako postoji mogućnost da je bolest delom izazvana trovanjem bakar sulfatom (Prociv, 1987), toksičnost *Cilindrospermopsis raciborskii* izolata (Hawkins i sar., 1985), identifikacija cijanotoksina cilindrospermopsina (Ohtani i sar., 1992), kao i epidemiološki dokazi, ukazuju na učešće cilindrospermopsina u ovom incidentu.

Dokazi o oštećenju ljudske jetre usled izloženosti mikrocistinima preko vode za piće su pronađeni u rutinskim testovima funkcije jetre izvršenim 1981. godine kod bolničkih pacijenata u Armidejlu, Novi Južni Vels, Australija (Falconer i sar., 1983). Signifikantna statistička korelacija pronađena je između povišenja aktivnosti enzima jetre (GGT) i unošenja vode iz lokalnog rezervoara, koja je bila kontaminirana hepatotoksičnom cijanobakterijom *Microcystis aeruginosa*, u poređenju sa drugim izvorima vode za piće.

U južnoj Australiji istraživanja su vršili i El Saadi i saradnici (1995) i to u 11 gradova duž reke Mari, istorijskom epicentru cijanobakterija. Osobe koje su pile vodu iz reke, pa i

nakon hlorinacije imale su veću verovatnoću razvoja gastrointestinalnih simptoma, a one osobe koje su vodu koristile za kućnu upotrebu razvile su pored gastrointestinalnih i dermatološke simptome, za razliku od osoba koje su koristile kišnicu. Takođe, pronađena je korelacija između simptoma i koncentracije cijanobakterija.

Da bi ispitali vezu između cijanobakterija i prevremenog rađanja, male težine novorođenčadi i kongenitalnih poremećaja, Pilotto i saradnici (1999) su vršili ispitivanje 32 700 novorođenčadi u Australiji od 1992. do 1994. Iako su dobijene statistički značajne veze između ekspozicije tokom prvog tromesečja trudnoće i procenta prevremenog rađanja, male težine novorođenčadi i kongenitalnih malformacija, ipak nije utvđen tačan odgovor zavisano od doze tokom čitavog gestacionog perioda, ali za pouzdane zaključke potrebna su dalja istraživanja.

U Malmeu u Švedskoj je 1994. godine nakon mešanja netretirane rečne vode sa izvorom vode za piće došlo do trovanja 121 od 304 stanovnika tog naselja (Cronberg i sar., 1995). Cijanotoksini su mogući, ali nedokazani uzrok epidemije gastroenteritisa kod 70 do 80 ljudi koji je izbio u dva sela u Švedskoj 1994. godine. U ovom incidentu netretirana voda iz eutrofne reke Kavlingeana slučajno je prodrla u izvor opštinske pijaće vode. Uzimajući u obzir da nisu pronađeni patogeni koji bi mogli biti odgovorni za pojavu gastroenteritisa, zajedno sa informacijama o bolestima domaćih životinja koje su pile kontaminiranu vodu, kao i koincidencijom pojave vrste *Planktothrix agardhii* (*Oscillatoria agardhii*) u reci iz koje je dospela voda do ljudi i životinja, podiže se verovatnoća učešća cijanobakterija u incidentu. Ova mogućnost je podržana i pronalaskom mikrocistina u uzorku cvetajuće vode jezera Vombsjon neposredno pre i posle izbijanja epidemije (Annadotter i sar., 1996).

U rafineriji šećera u Švedskoj, distributivni sistem vode za piće pogrešno je spojen sa netretiranom rečnom vodom u kojoj je bila prisutna vrsta *Planktothrix agardhii* kao i 1 µg MC-LR ekvi/L. U narednim danima, kod 121 osobe, koje su konzumirale kontaminiranu vodu, razvili su se brojni simptomi uključujući temperaturu, glavobolju, povraćanje, dijareju, bol u trbuhu i mišićima. Smatra se da patogene bakterije i virusi nisu predstavljale uzrok ovih oboljenja. Interesantna je činjenica da 100 % osoba koje su pile čaj su se razbolele u danima nakon nesreće, dok nijedna od osoba koje su pile kafu nije bila pogođena. Postoji mogućnost da su toksini i metaboliti, oslobođeni iz ćelija nakon prokuvanja vode, eliminisani filtriranjem tokom pripreme kafe. Međutim, ovo nije bio slučaj prilikom pripreme čaja, kada se kesica čaja samo stavi u prokuvanu vodu koja je sadržala koktel cijanobakterijskih metabolita. Može se pretpostaviti da su cijanotoksini učestvovali u uočenim simptomima

(Annadotter i sar., 2001). Interesantno je primetiti da je količina mikrocistina bila na gornjoj graničnoj vrednosti TDI, preporučenog od strane SZO.

Visok nivo rizika po ljudsko zdravlje je povezan kako sa akutnim unosom velikih količina cijanotoksina tako i sa hroničnim izlaganjem malim dozama putem vode za piće koja je kontaminirana metabolitima toksičnih cijanobakterija (Svirčev i sar., 2010). Hepatotoksini u vodi za piće mogu biti faktor rizika za razvoj primarnog kancera jetre, ali samo mali broj epidemioloških studija se bavi ovom problematikom. Potencijalnu povezanost povećanog rizika za pojavu primarnog kancera jetre sa kvalitetom površinske vode uočio je Fleming sa saradnicima (2002) u Floridi. Ovakva vrsta analize je sprovedena i u Kini, gde je primećeno da hepatotoksini iz rezervoara za vodu za piće mogu uticati na razvoj primarnog kancera jetre (Yu, 1995) i kolorektalnog kancera (Zhou i sar., 2002). Takođe, epidemiološka istraživanja u Srbiji su ukazala da se cijanobakterijski metaboliti mogu smatrati važnim spoljašnjim hemijskim faktorom u razvoju primarnog kancera jetre (Svirčev i sar., 2009; 2013; Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011), ali potencijalno i nekih drugih maligniteta (Svirčev i sar., 2014a).

1.6.2. Kožni kontakt i inhalacija tokom rekreacije

Do kožnog kontakta sa cijanobakterijama i njihovim toksinima može doći tokom boravka na vodama za rekreaciju u kojima se javlja cijanobakterijsko cvetanje. Širok spektar simptoma je opisan i povezan sa rekreativnom izloženosti cijanobakterijama, kao na primer: deskvamacija, osip na koži, alergijske reakcije, konjuktivitis, iritacije očiju, zapaljenje uha, ranice u ustima, jake glavobolje, vrtoglavica, groznica, mijalgija, suv kašalj, astma, upala pluća, povraćanje i drugi gastrointestinalni simptomi. Ovi simptomi su zabeleženi u Japanu, Havajima, Australiji i Floridi (Grauer i Arnold, 1961; Cardellina i sar., 1979; Yasumoto i Murata, 1993; Stewart i sar., 2006a). Slatkovodne cijanobakterije izazivaju pomenute simptome najčešće nakon plivanja ili sportova na vodi u kojoj su prisutne cijanobakterije i njihovi toksini (Codd i sar., 1999). Takvu sposobnost imaju na primer slatkovodne cijanobakterije iz rodova: *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* i *Gloeotrichia*, koje su povezane sa razvojem kožne iritacije i alergijskih reakcija posle plivanja ili vodenih sportova (Bell i Codd, 1994).

Biomasa cijanobakterija se nanosi talasima i formira guste nakupine na površini priobalnih voda. Tokom plivanja u kontaminiranim vodama cijanobakterijski filament i ćelije se mogu nakupiti ispod kupaćih kostima, gde dolazi do kontakta sa kožom što može dovesti do njene iritacije (Burke i Tester, 2002). "Plivački svrab" je ozbiljni kontaktni

dermatitis koji se javlja posle kupanja u morskim vodama koje sadrže cijanobakterijsku vrstu *Lyngbya majuscula*. U roku od nekoliko minuta do nekoliko sati javlja se svrab i osećaj pečenja kože, a crvenilo i vidljiv dermatitis se razvijaju do osam sati nakon kontakta, a zatim se formiraju plikovi i dolazi do duboke deskvamacije (SZO, 2003).

Ingestija vode tokom rekreacije (npr. plivanja, vožnje kanuom i skijanja na vodi) može da doprinese izloženosti cijanotoksinima. Prvi detaljan opis u lekarskom nalazu nakon slučajnog gutanja cijanobakterija prilikom plivanja sadržao je: bolove u stomaku i mučninu tri sata nakon incidenta, usledili su povišena temperatura, bolovi u mišićima i zglobovima ekstremiteta i bolna dijareja sa mikrocistisom i anabenom detektovanim u fecesu (Dillenberg i Dehnel, 1960). U SAD-u 1985. godine nakon direktnog kontakta ljudi sa vodom u kojoj su se masovno razvile cijanobakterije, konstatovana je pojava mučnine, povraćanja, dijareje, groznice i uho-grlo-nos infekcija (Carmichael, 1994).

U Australiji 1995. godine vršena su epidemiološka istraživanja zdravstvenih komplikacija kod 852 pacijenta nakon kontakta sa rekreacionim vodama, koja su pokazala da se simptomi trovanja javljaju tokom 2-7 dana nakon kontakta sa vodom. To su najčešće simptomi gripa, povraćanje, dijareja, osipi na koži, ulcerozne promene na usnama, groznica, iritacije očiju i ušiju. Simptomi su se povećali sa trajanjem ekspozicije i gustom cijanobakterijskih ćelija, ali nisu bili u zavisnosti od prisustva određenih cijanotoksina (Pilotto i sar., 1997). Postoji i niz drugih primera rekreativnih aktivnosti na vodi koje su dovele do zdravstvenih problema (kožni osip, infekcije uha i oka, ranice u ustima, gastrointestinalni i respiratorni problemi) kod više od 800 ljudi na šest lokacija u Novom Južnom Velsu, Viktoriji i Južnoj Australiji (Pilotto i sar., 1997).

U Milvokiju, SAD 2002. godine smrt tinejdžera je bila povezana sa trovanjem cijanotoksinima. Sedamnaestogodišnjak se kupao u jezeru na golf terenu. Ovo je kod tinejdžera izazvalo muku i povraćanje, dalje mu se stanje progresivno pogoršavalo, sledio je šok, napadi, prestanak rada srca i smrt oko 48 h nakon izlaganja kontaminiranoj vodi. Jedan od njegovih prijatelja koji je progutao vodu imao je bolove u stomaku i dijareju, dok su ostali ispoljili blaže oblike simptoma. Analizom stolice, krvi i ostalih telesnih tečnosti dobijeno je da bi uzročnici mogli biti anatoksin iz *Anabaena flos-aquae* (Behm, 2003), međutim zbog izvesnih nejasnoća ova dijagnoza je ostala bez relevantnih dokaza.

Pored boravka na vodi koja cveta kao i nakon vodenih sportova na istoj, izlaganje cijanotoksinima je moguće udisanjem i tokom tuširanja i radne prakse koja uključuje boravljenje uz kontaminiranu poljoprivrednu ili industrijsku vodu (Codd i sar., 1999). Dermalni kontakt sa cijanotoksinima se pored rekreativnih aktivnosti može ostvariti i

tuširanjem neadekvatno tretiranom vodom koja sadrži ćelije cijanobakterija i njihove toksine. Pod takvim okolnostima su prijavljene kožne promene u Novom Južnom Velsu (Falconer, 1998).

Tokom rekreacije, još jedan potencijalni put izlaganja je inhalacija. Disajne smetnje su prijavljene nakon inhalatornog izlaganja određenim morskim i slatkovodnim cijanobakterijama (Hawser i sar., 1991; Falconer, 1998). Uočeno je da je MC-LR kod miševa izazvao oštećenje jetre i nekrozu mirisnog i respiratornog epitela. Štaviše, osetljivost je bila oko 10 puta veća nego nakon oralnog izlaganja cijanotoksinima (Fitzgeorge i sar., 1994).

Turner i saradnici (1990) su objavili slučajeve pneumonije kod zdravih vojnika nakon vežbi, plivanja i vožnje kanua kada su došli u kontakt sa mikrocistinom poreklom od *Microcystis aeruginosa* iz Radjard jezera, Engleska. Vojnici su prijavili i razne gastrointestinalne, dermatološke i respiratorne smetnje, kao što su astma, plikovi oko usta, iritacija očiju, visoka temperatura i hepatoenteritis. Ovaj incident pored dermalne verovatno uključuje i ekspoziciju putem inhalacije i ingestije (Turner, 1990).

Na Hingvort jezeru u Engleskoj 1996. godine kod 11 kadeta je došlo do pojave osipa na licu, astme i suvog kašlja sa povraćanjem, na dan izlaganja cijanotoksinima i tokom narednih dana. I u ovom slučaju je verovatno reč o više puteva ekspozicije, pored dermalnog. Kadeti su tokom vožnje kanuom došli u kontakt sa vodom u kojoj se nalazila cijanobakterija *Oscillatoria agardhii*, koja produkuje nekoliko tipova mikrocistina (Codd, 1999).

Cijanobakterije su vitalni primarni proizvođači u pustinjama. Nedavno su uzorci iz suvih, efemernih rečnih korita u Kataru analizirani na cijanotoksine, pri čemu su detektovane koncentracije mikrocistina između 1,5 ng/g i 53,7 ng/g u svim uzorcima. U slučaju inhalacije ovih količina cijanotoksina sa prašinom, TDI vrednost koja je izračunata za ovaj način ekspozicije od 1 do 2 ng mikrocistina po kg dnevno, bi bila prekoračena. Prisustvo mikrocistina i potencijalno anatoksina-a (S) u pustinjskim pokoricama može imati značajne implikacije za ljudsko zdravlje (Metcalf i sar., 2012).

1.6.3. Ishrana vodenim organizmima

Bioakumulacija cijanotoksina može da se odvija u širokom spektru vodenih životinja koje se koriste za ljudsku ishranu. Mikrocistini su detektovani u slatkovodnim račićima (*Palemon modestus*, *Macrobrachium nipponensis*), slatkovodnim školjkama (Chen i Xie, 2005; 2005a), kao i u hepatopankreasu, abdomenu, gonadama, škragama i stopalu slatkovodnog puža *Bellamya aeruginosa* (Chen i sar., 2005a). Autori su utvrdili da se većina

toksina nalazi u nejestivim delovima ovog puža i uklanjanjem hepatopankreasa, digestivnog trakta i gonada pre konzumiranja može smanjiti rizik od trovanja. Međutim, puževi se obično kuvaju celi, što stvara put za unošenje mikrocistina. Osim toga, treba naglasiti da kuvanje ne uništava većinu poznatih cijanotoksina (Dietrich i Hoeger, 2005).

Saksitoksini iz vrste *Anabaena circinalis* mogu se akumulirati u australijskoj slatkovodnoj školjki posle samo jedne nedelje izloženosti gustini od 100 000 ćelija/mL, koja se obično javlja tokom cvetanja ove vrste cijanobakterija (Negri i sar., 1995). U marinskom ekosistemu, saksitoksin je detektovan u ostrigama (*Pinctada maxima*) (Negri i sar., 2004). Takođe, akumulacija saksitoksina je detektovana u jetri i mišićima ribe *Oreochromis niloticus* (Galvão i sar., 2009).

Cilindrospermopsin je pronađen u hemolimfi, crevima, gonadama i stopalu školjki (Saker i sar., 2004). Takođe, White i saradnici (2005) su pronašli cilindrospermopsin u vrsti slatkovodnog puža (*Melanoides tuberculata*), koji se obično ne koristi u ljudskoj ishrani, ali ovo svakako ukazuje da je akumulacija cijanotoksina moguća u ovim organizmima i da putem lanaca ishrane i bioakumulacije toksini mogu stići do čoveka. Cilindrospermopsin je detektovan i u mišićnom tkivu raka *Cherax quadricarinatus* kao i visceralnom tkivu ribe *Melanotaenia eachamensis* iz akvakultura (Saker i Eaglesham, 1999). Nedavna studija na jezeru Katemako (Veracruz, Meksiko), gde je ekstenzivno cvetala vrsta roda *Cilindrospermopsis* tokom cele godine, pokazala je prisustvo cilindrospermopsina i saksitoksina u ribama koje se koriste za lokalnu potrošnju i ukazala na moguću bioakumulaciju (Berry i sar., 2012).

Budući da su na samom vrhu vodenih lanaca ishrane, ribe su izložene cijanotoksinima prvenstveno preko hrane. Cijanotoksini se zatim aktivno unose u jetru, gde remete normalnu ćelijsku aktivnost inhibiranjem protein fosfataza, a mogu i da se akumuliraju u jetri ribe, mišićima, škragama, crevima, bubrezima i drugim organima (Tencalla i Dietrich, 1997; Magalhaes i sar., 2003; Malbrouck i sar., 2004; Malbrouck i Kestemont, 2006). U slučaju akutnih trovanja, visoke doze toksina deluju letalno na vodene organizme. Međutim, kada su doze subletalne, životinje mogu da prežive, akumuliraju toksine i prenose ih kroz lance ishrane (Vasconcelos, 1999).

Uočeno je da različite vrste riba akumuliraju različite količine mikrocistina. Jedna studija je pokazala da je sadržaj mikrocistina u jetri i mišićima najviši kod karnivornih riba, zatim omnivornih, dok je najniži kod fitoplanktivornih i herbivornih riba. U ovom slučaju, može se zaključiti da se mikrocistini akumuliraju vertikalno kroz lance ishrane (Xie i sar., 2005). U drugoj studiji, mikrocistini u jetri i crevima su bili najviši kod fitoplanktivornih,

zatim omnivornih i karnivornih riba. S druge strane, mikrocistini u mišićima su bili najviši kod omnivornih, onda fitoplanktivornih i na kraju kod karnivornih riba (Zhang i sar., 2009). Očigledno je da veza između tipa ishrane riba i pravila akumulacije cijanotoksina u njihovom tkivu još uvek ne može biti jasno definisana i za to su potrebna dalja istraživanja.

Postoje brojna eksperimentalna istraživanja koje su se bavila akumulacijom cijanotoksinima u tkivima riba. Nakon eksperimenata u kojima je riba hranjena mikrocistinima, ovi toksini su prvo detektovani u crevima, a zatim u mišićima, jetri i fecesu (Jang i sar., 2004; Xie i sar., 2004). Kod belog tolstolobika (*Hypophthalmichthys molitrix*) koji je hranjen ćelijama vrste *Microcystis viridis*, MC-RR je pronađen u krvi, jetri i mišićima (49,7, 17,8 i 1,77 µg/g st), dok je MC-LR u velikim koncentracijama bio prisutan u crevima, ali ne i u mišićima i krvi (Xie i sar., 2004).

Soares i saradnici (2004), su hranili juvenilnu *Tilapia rendalli* toksičnim ćelijama vrste *Microcystis aeruginosa* u kombinaciji sa hranom za ribe, na tri različita načina. U prvom eksperimentu, riba je hranjena 15 dana hranom za ribe koja je sadržala toksične ćelije *Microcystis aeruginosa* (20,4 µg mikrocistina po ribi dnevno), a sledećih 15 dana su hranjene bez toksičnih cijanobakterijskih ćelija. U drugom eksperimentu riba je 28 dana hranjena samo sa toksičnim ćelijama (14,6 µg mikrocistina po ribi dnevno), a u trećem, tokom 42 dana, ribe su hranjene ribljom hranom i toksičnim ćelijama koje su prethodno bile lizirane u cilju simulacije propadanja cveta (29,2 µg mikrocistina po ribi dnevno). Najveća akumulacija mikrocistina zabeležena je u jetri (2,8 µg/g) u drugom eksperimentu kada su ribe hranjene samo sa toksičnim ćelijama. U prvom eksperimentu najveća akumulacija u jetri (0,6 µg/g) je zabeležena u toku ishrane, a u toku perioda depuracije u mišićima (0,05 µg/g), kada je primećena i eliminacija toksina putem fecesa. Prema tome, toksini mogu i dalje biti prisutni u mesu ribe iako je cvetanje prestalo. U drugom i trećem eksperimentu prosečne akumulirane koncentracije su gotovo bile jednake, iako je riba bila duplo više izložena toksinima u trećem, ali sa dodatkom riblje hrane. Ovo upućuje na to da kada se ribe hrane isključivo cijanobakterijskim ćelijama, unos mikrocistina je veći, nego kada je ribi ponuđena i druga hrana i da dostupnost druge hrane može značajno da utiče na stepen akumulacije cijanotoksina. Ono što je od velike važnosti jeste da je u svakom od slučajeva došlo do akumulacije, a u mišićima je koncentracija toksina prvezilazila preporučene GV za ljudsku upotrebu (0,03-0,06, 0,29 i 0,24 µg/kg telesne težine/dnevno) (Soares i sar., 2004).

Na akumulaciju može uticati i status uhranjenosti ribe. Interesantno je da je inkubacijom izolovanih hepatocita sitih i gladnih riba sa MC-LR, uočena brža akumulacija cijanotoksina kod gladne grupe, gde je najveća koncentracija zabeležena 1 h nakon izlaganja,

dok je u sitoj grupi kasnila 4 h (Malbrouck i sar., 2004). Na osnovu prethodnih eksperimentalnih istraživanja može se primetiti da je akumulacija toksina u tkivima ribe prisutna, a zavisi od brojnih faktora: trajanja ekspozicije, vrste toksina, tkiva, ribe, uhranjenosti ribe, ponuđene dodatne hrane i drugo.

Postoje i brojni primeri iz sveta koji ukazuju na potencijalnu opasnost po ljudsko zdravlje usled akumulacije cijanotoksina u tkivu ribe u prirodnim uslovima, a ovde će biti navedeno nekoliko takvih primera.

U Grčkoj u jezeru Pamvotis gde je primećeno cvetanja rodova *Microcystis*, *Anabaena*, *Chroococcus*, *Oscillatoria*, *Ceratium*, *Asterionella*, *Melosira*, *Pediastrum*, *Synedra*, *Scenedesmus* i *Closterium* utvrđivana je akumulacija mikrocistina u tkivu i organima ribe *Carassius gibelio* (babuška) koja se koristi u ljudskoj ishrani. Koncentracije mikrocistina u vodi varirale su između 310 i 2 388 ng/L, a koncentracije ovog toksina tokom cvetanja u jezeru iznosile su između 3 109 i 11 585 ng/L. Babuška je komercijalna riba koja se koristi za ishranu u mnogim regionima Grčke. U uzorcima ribe *Carassius gibelio* iz ovog jezera detektovan je mikrocistin i najveće koncentracije su pronađene u jetri (275,1 ng/g), zatim crevima (233,51 ng/g), bubrezima (155,8 ng/g) i mozgu (38,5 ng/g). Najmanje koncentracije bile su u gonadama (21,02 ng/g) i mišićima (16,05 ng/g). Na osnovu vrednosti mikrocistina pronađenih u mišićima ribe dnevni unos toksina bi iznosio 0,096 µg/kg, što je duplo više od preporučene vrednosti. Monitoring mikrocistina u konzumnoj ribi neophodan je radi prevencije negativnih posledica i očuvanja zdravlja ljudi (Kagalou i sar., 2008). Distribucija i bioakumulacija mikrocistina u *Carassius gibelio* je zabeležena i u 13 Grčkih jezera od srtane Papadimitriou i saradnika (2010). Mikrocistini su pronađeni u jetri, crevima, bubrezima, mozgu, gonadama i mišićima. Prosečne vrednosti mikrocistina u ribljim mišićima bile su 7,1 ng/g, dok su koncentracije zabeležene u nekoliko jezera premašile TDI vrednosti. Prema autorima, osoba od 60 kg koja dnevno konzumira 300 g porcije ove ribe bila bi u opasnosti, posebno ako su u pitanju starije osobe, deca ili osetljivi pojedinci.

U Španiji na jezeru Albufera vršeno je istraživanje pojave i distribucije mikrocistina u vodi i tkivima komercijalne ribe *Liza* sp. U jezeru je pronađena vrsta *Microcystis aeruginosa* i mikrocistini, pri čemu je maksimalna koncentracija mikrocistina iznosila je 16 µg/L, a srednja vrednost bila je 1,7 µg/L. Uzorci ribe nasumično su uzeti iz ulova profesionalnih ribara. Svi uzorci ispitanog tkiva *Liza* sp. sadržali su mikrocistine. Najviše koncentracije toksina pronađene su u jetri (2,480 ng/g), zatim crevima (859 ng/g), škragama (49 ng/g), pa mišićnom tkivu (5,21 ng/g). Veće jedinke ove vrste imale su veće koncentracije mikrocistina u jetri i crevima, a pronađeno je i oštećenje jetre kod nekih jedinki. Srednje vrednosti

mikrocistina u mišićima odgovarale su dnevnom unosu od 0,025 µg/kg telesne težine dnevno, ali 13 % analiziranih jedinki imale su vrednosti iznad preporučenih GV. U proseku, 200 tona *Liza* sp. se prodaje svake godine, koja je na osnovu dobijene srednje vrednosti mikrocistina, ekvivalentna skoro 350 mg mikrocistina (5 ng/g mišića ribe) (Romo i sar., 2012).

U ribnjacima Egipta vršeno je istraživanje akumulacije mikrocistina u različitim organima slatkovodne vrste ribe *Oreochromis niloticus*. U blizini ribnjaka nalazi se restoran koji poslužuje ribu iz ovih ribnjaka, u kojima svake godine dolazi do izraženog cvetanja vrste *Microcystis aeruginosa*. Koncentracija mikrocistina tokom cvetanja iznosila je 1,12 mg/g st u vodi, a u biomasi 6,7 g/L st. Distribucija mikrocistina u organima ribe ulovljene od strane ribara je znatno varirala. Najveće koncentracije su zabeležene u crevima (821 ng/g st), zatim u jetri (531,8 ng/g) i bubrezima (400 ng/g) dok su manje količine detektovane u mišićima (102 ng/g), pri čemu je najmanja količina detektovana u mišićima iznosila 45,7 ng/g st. Prosečna porcija mesa ribe iznosi oko 100 do 200 g, što bi u ovom slučaju značilo da jedna porcija sadrži oko 10 µg mikrocistina, odnosno unos toksina u organizam je 5 puta veći od preporučenog u vodi za piće. Istraživanje pokazuje da koncentracije akumuliranog mikrocistina, iako nisu toksične za samu životinju, mogu biti opasne za ljude nakon konzumacije tkiva ove ribe. Monitoring cijanobakterija i njihovih toksina u uzgajalištima riba je neophodan da bi se umanjilo izlaganje riba cijanotoksinima a samim tim i ljudi koji se hrane njima (Mohamed i sar., 2003).

U Brazilu na Funil i Furnas rezervoaru uzorkovane su dve vrste riba *Oreochromis niloticus* i *Tilapia rendalli*. Na Funil rezervoaru, mikrocistin-produkujuća grupa cijanobakterija dominirala je u biomasi fitoplanktona, a na Furnas rezervoaru ona je činila samo malu frakciju ukupne populacije fitoplanktona. Koncentracija mikrocistina u Funilu iznosila je 986 ng/L, a 941 ng/L u Furnasu. Od 27 riba uhvaćenih u oba rezervoara, 26 % su imale vrednosti mikrocistina iznad preporučene TDI (8 ng/g tkiva), a one više kontaminirane sadržale su 50 % više toksina od preporučene vrednosti. Štaviše, uprkos činjenici da je vrednost mikrocistina u vodi bila ispod predložene GV SZO za pijaću vodu, akumulirani mikrocistin u tkivima ribe dostizao je toksične nivoe, što predstavlja potencijalnu opasnost za potrošače. Koncentracije su se kretale od 0,8 do 32,1 µg/g u jetri i od 0,9 do 12,0 ng/g u mišićima riba. Vrsta *Tilapia rendalli* imala je niske koncentracije mikrocistina u jetri i mišićima u odnosu na *Oreochromis niloticus*, a bile su uhvaćene u istom rezervoaru i izložene istim koncentracijama toksina. Razlog ove razlike u akumulaciji mikrocistina između fitoplanktivornih vrsta riba može biti usled razlika u ishrani ili razlike u metabolizmu mikrocistina. Primećeno je i da *Oreochromis niloticus* akumulira više cijanotoksina u Furnas

rezervoaru. Moguće je da su prisutne varijante mikrocistina u Furnas rezervoaru mnogo teže za eliminisanje. Negativna korelacija pronađena između faktora sredine i mikrocistina u jetri riba govori kako zdravije jedinke imaju manje ovog toksina u jetri. Takođe je uočeno da nema razlike u koncentraciji mikrocistina pronađenog u mišićima ženki i mužjaka ovih vrsta, što ukazuje da oba pola predstavljaju zdravstveni rizik pri konzumaciji. Interspecijske varijacije ukazuju da određene vrste riba mogu biti sigurnije za konzumaciju u odnosu na druge, što treba imati u vidu pri donošenju javnih zdravstvenih odrednica (Deblois i sar., 2008).

U Kini na jezeru Taihu gde dolazi do obimnog cvetanja cijanobakterija vršeno je istraživanje distribucije mikrocistina (MC-LR, MC-RR i MC-YR) u tkivima fitoplanktivornog belog tostolobika (*Hypophthalmichthys molitrix*) koji se koristi u ishrani. U jezeru dominira *Microcystis aeruginosa* i koncentracija intracelularnog mikrocistina u vodi je iznosila 4,16 µg/L, odnosno između 0 i 15,58 µg/L. U uzorcima ribe pronađeno je 78 % MC-RR i 81 % MC-LR. Najveće koncentracije mikrocistina detektovane su u crevima, zatim jetri, bubrezima i krvi, a prosečne vrednosti tokom godine bile su najveće u crevima, zatim jetri, bubrezima, krvi, mišićima, slezini, žučnoj kesi i škragama. Prosečne vrednosti mikrocistina u crevima, jetri i mišićima iznosile su 24,3, 0,957 i 0,197 µg/g st, a 16,7 % uzorka tkiva mišića imalo je vrednosti toksina iznad TDI. Na osnovu toga, preporučeno je da se ne trebaju konzumirati mišići belog tostolobika iz ovog jezera tokom perioda cvetanja roda *Microcystis*, a ostali organi su rizični za ishranu duži vremenski period (Chen i sar., 2006a).

Rizik povezan sa konzumacijom akvatičnih proizvoda sistematično je proučavan analizom 26 ekonomski bitnih vrsta riba i školjki u tri velika jezera u Kini (Peng i sar., 2010). U sva tri jezera pronađeni su MC-RR i MC-LR, s tim da je MC-RR bio dominantan. Koncentracije MC kretale su se između 0,38 do 2,52 µg/L u jezeru Taihu, između 0,28 do 2,32 µg/L u jezeru Chaohu i između 0,21 i 2,36 µg/L u jezeru Dianchi. U vodenim uzorcima, vrednosti su dva puta veće od preporučenih GV. Rezultati ukazuju da većina proizvoda iz tri jezera nije odgovarajuća za ishranu ljudi zbog akumulacije mikrocistina. Procenjeno je da su vrednosti dnevnog unosa 5 do 148 puta (jezero Taihu), 2 do 50 puta (jezero Chaohu) i 1,5 do 4 puta (jezero Dianchi) veće od TDI. Akumulacija toksina ulovljenih organizama varirala je od meseca do meseca, kao i zavisno od vrste, što ukazuje na to da se rizik konzumacije može umanjiti ili izbeći pomeranjem ribolovne sezone ili lovljenjem odgovarajuće vrste riba i školjki (Peng i sar., 2010).

Pored akumulacije istraživanja su dokazala i negativan uticaj mikrocistina i nodularina na ribe, pri čemu su razne patohistološke promene zabeležene u mnogim

organima izložene ribe. Nedavno su Svirčev i saradnici (2015) rezimirali sadašnja znanja o uticaju ovih cijanotoksina na histologiju ribe. Iako mikrocistin i nodularin imaju prvenstveno hepatotoksične efekte, patohistološke promene su uočene i u drugim organima, što ukazuje na široki opseg dejstva ovih toksina. Intenzitet i ozbiljnost promena se razlikovao u zavisnosti od načina izlaganja, vrste riba i koncentracije toksina, međutim pojedini obrasci efekata mikrocistina mogli su se uočiti u jetri i bubrezima zbog specifičnog mehanizma delovanja.

Zbog negativnih efekata na tkivo ribe i prisustva cijanotoksina u jestivim delovima riba, toksično cijanobakterijsko cvetanje u akvakulturama može uticati na kvalitet ribe, kao i drugih vodenih organizama, ali i da posredno negativno utiču na ljudsko zdravlje, životnu sredinu i ekonomiju.

1.6.4. Ishrana biljkama koje su zalivane cvetajućom vodom

Usevi mogu da dođu u kontakt sa cijanotoksinima kada se površinske vode koje sadrže cijanobakterije koriste za navodnjavanje, pri čemu mogu biti narušeni prinos i kvalitet biljnih kultura. Osim toga, ako akumulacija mikrocistina prelazi preporučene GV, konzumacija ovakvih biljaka može predstavljati rizik za zdravlje ljudi i životinja (Saqrane i sar., 2009).

Prethodna istraživanja su pokazala da cijanotoksini mogu imati negativne efekte na biljke (MacKintosh i sar., 1990; Abe i sar., 1996; Pflugmacher i sar., 2001; Chen i sar., 2004). Kod različitih vrsta sadnica koje su izlagane cijanotoksinima došlo je do inhibicije rasta (Kós i sar., 1995; Kurki-Helasma i Meriluoto, 1998; McElhiney i sar., 2001; M-Hamvas i sar., 2003). Osim toga, MC-LR kod vodenih biljaka dovodi do inhibicije rasta i fotosintetske proizvodnje kiseonika i izbeljuje im hlorofil (Pflugmacher i sar., 2002).

Prisustvo cijanotoksina je otkriveno u i na tkivima izloženih zemljišnih i vodenih biljaka (Codd i sar., 1999a; Mitrović i sar., 2005; Jarvenpaa i sar., 2007; Crush i sar., 2008; Chen i sar., 2010). Pronađeni toksini u tkivima izloženih biljaka sugerišu da ukoliko se za navodnjavanje koristi voda koja sadrži ove toksine, takve biljke mogu biti toksične i nepogodne za ljudsku upotrebu.

Generalno, MC-LR inhibira PPI i PP2A kako sisara tako i biljaka. Pomenuti enzimi su uključeni u defosforilaciju regulatornih proteina koji kontrolišu mnoge ćelijske funkcije. Ova inhibicija bi delimično mogla objasniti smanjenje diverziteta biljnih i životinjskih vrsta u vodama u kojima cvetaju toksične cijanobakterije (MacKintosh i sar., 1990). U biljnim tkivima, protein fosfataze su uključene u brojne molekularne i fiziološke procese, kao što je

regulacija gena odgovornih za skladištenje skroba (Takeda i sar., 1994), aktivacija enzima uključenih u fiksaciju CO₂ (Carter i sar., 1990) i svetlom indukovana sinteza saharoze (Siegl i sar., 1990). Mikrocistini mogu uticati na metaboličke procese i ekspresiju gena biljaka, i na taj način remete celu fiziologiju i rast biljke. Kos i saradnici (1995) su prvi prijavili inhibiciju rasta kod sadnica biljke *Sinapis alba*, kao efekat mikrocistina i ekstrakta toksičnih cijanobakterija. Od tada se povećalo interesovanje za fitotoksične efekte cijanobakterija na terestrične biljke, pri čemu su dobijeni brojni dokazi o morfološkim i fiziološkim promenama u raznim biljnim vrstama izazvanim cijanotoksinima.

Uticaj cijanotoksina je često ispitan na pomenutoj vrsti, čija se semena koriste za dobijanje senfa. Kurki-Helasma i Meriluoto (1998) su primetili da naklijavanje semena *Sinapis alba* sedam dana na čvrstoj hranljivoj podlozi sa MC-RR dovodi do poremećaja razvoja biljke. MC-RR u zavisnosti od koncentracije inhibira rast sadnica i to u korelaciji sa inhibicijom aktivnosti PP1 i PP2A. Uočena je i inhibicija izduživanja korena i rasta korenskih dlaka. Takođe, detekcijom radioaktivnosti ³H-dihidroMC-LR konstatovano je unošenje toksina od strane biljke (5,3 µg/kg). Dalje, Solin i Meriluoto (2001) su ovu biljku, kao i brokoli gajili sedam dana u tečnom medijumu koji je sadržao 1 mg ¹⁴C-MC-LR/L. Nakon eksperimenta detektovano je 24 ng ¹⁴C-MC-LR/g u listovima biljke *Sinapis alba* i 62 ng/g u listovima brokolija.

M-Hamvas i saradnici (2003) su zaključili da je MC-LR uticao na fiziologiju i rast biljke *Sinapis alba* na osnovu vlažne težine (vt), dužine biljke, dužine hipokotila i korena, uključujući i bočno korenje koje je bilo inhibirano ovim cijanotoksinom. McElhiney i saradnici (2001) su otkrili da MC-LR, MC-RR i MC-LF inhibišu rast sadnica *Sinapis alba*. Takođe su uočili da je rast i sadržaj hlorofila kultura *Solanum tuberosum* inhibisan sa MC-LR, kao i da je ovaj toksin poremetio razvoj korena izloženoj *Phaseolus vulgaris*, uzrokujući da biljka unosi oko 30 % manje medijuma od kontrole. Smanjena apsorpcija vode i hranljivih materija može imati negativne efekte na biljku i tako uticati na njen opstanak. Takođe, MC-LR je detektovan u tkivima izloženih biljaka nakon samo 3 dana (11,55 µg/mL). Količine toksina otkrivene u biljnim ekstraktima su rasle u skladu sa vremenom ekspozicije. Moguće je da tkiva jestivih biljaka izloženih MC-LR predstavljaju vektor za izlaganje cijanotoksinima.

Jarvenpaa i saradnici (2007) su takođe procenjivali efekte mikrocistina na sadnice *Sinapis alba* i brokolija (*Brassica oleracea* var. *italica*) ali u ovom slučaju gajenim u zemlji i zalivanim 19-20 dana sa vodom koja sadrži ove toksine u koncentracijama koje se obično nalaze u prirodi (0,1 ili 10 µg/L). Sudeći po indikatorima rasta i koncentraciji hlorofila, biljke

su samo vrlo blago bile oštećene. Slaba (<10 %) inhibicije rasta je viđena kod brokolija. Niže koncentracije mikrocistina i veća starost biljaka su verovatno razlog za ispoljavanje blažih efekata. Efekti toksina na klijanje mladih sadnica bi verovatno bili očigledniji (Kós i sar., 1995; Kurki-Helasma i Meriluoto, 1998). Osim toga, adsorpcija mikrocistina u zemljištu je smanjila koncentraciju slobodnog toksina u vodenoj fazi, što bi dodatno moglo da se smatra faktorom odgovornim za niske koncentracije mikrocistina detektovane u biljkama. MC-LR je detektovan samo u korenu biljaka (0,9 do 2,4 ng/g vt u brokoliu, 2,5 do 2,6 ng/g vt u *Sinapis alba*), koji se ne konzumiraju. Posmatrane koncentracije toksina premašile su samo neznatno smernice za vrednost MC-LR u pijaćoj vodu (1 µg/L ili 1 µg/kg). Kako je potrošnja brokolija i senfa niža od potrošnje vode, ove biljke ne bi predstavljale značajnu opasnost po ljudsko zdravlje pri ispitivanim uslovima.

Biljke pored toga što mogu biti izložene cijanotoksinima preko medijuma u kojem su gajene, ili preko zemlje koja je zalivana kontaminiranom vodom, one mogu biti izložene direktno i putem prskanja. Abe i saradnici (1996) su pokazali da direktan kontakt obe strane lista sa MC-LR u vodenom rastvoru dovodi do smanjenja stope lisne fotosinteze, efikasnosti karboksilacije i lisne nekroze kod izložene *Phaseolus vulgaris*. Codd i saradnici (1999a) su pokazali da posle prskanja vodom koja sadrži cijanobakterije koje proizvode mikrocistine, kolonije i pojedinačne ćelije *Microcystis aeruginosa* kao i mikrocistini su se zadržavali na salati (*Lactuca sativa*). Autori su ukazali i da se kolonije *Microcystis aeruginosa* nisu mogle ukloniti ispiranjem vodom, na način na koji se to vrši tokom pripreme salate u domaćinstvima.

Crush i saradnici (2008) su ispitivali efekat navodnjavanja sa jezerskom vodom koja sadrži mikrocistine na rast biljaka i akumulaciju toksina u ljulju, detelini, repi i zelenoj salati. Biljke su gajene u stakleniku u peščanoj kulturi i primile su po tri ili šest aplikacija (170 µg 10 mikrocistina po aplikaciji) jezerske vode, koja je posipana ili na površinu peska ili na stabljike biljaka. Biljke su se razlikovale po svojoj osetljivosti i zadržavanju mikrocistina, koje je bilo specifično za vrstu, posebno u slučaju aplikacije na stabljiku. Voda koja je aplicirana na izdanak slivala se sa listova repe i ljulja i vrlo malo je vlažila listove, bez merljivog zadržavanja mikrocistina od strane izdanaka. Nasuprot tome, listovi zelene salate i deteline bili su vidno navlašeni i zadržavali su mikrocistine. Ovo sugerše da su svojstva kutikule lista veoma važna za zadržavanje cijanotoksina. Mikrocistini su takođe smanjili suhu težinu izdanaka ljulja, repe i zelene salate, a povećali suhu težinu korena ljulja i salate, dok kod deteline nije bilo promena. Efekti na rast biljaka su bili očigledniji pri prvoj berbi nego pri drugoj, što može da sugerše da su se biljke prilagodile na prisustvo toksina. Naime,

mikrocistini mogu poremetiti absorpciju i prenos hranljivih materija ili funkciju floema korena. Da bi nadoknadili smanjenu funkciju korena, dodatni rast korena može biti stimulisan na račun rasta izdanaka, kao što je to moglo biti kod ljulja i repe. U pogledu akumulacije, koncentracije mikrocistina u korenu se nisu mnogo razlikovale u tretmanima gde je aplicirana voda u pesak ili je do korena stigla oticanjem sa izdanaka. Koncentracije mikrocistina u korenu su bile najviše kod deteline (1,45 mg/kg st), umerene u salati (0,68 mg/kg st) i male kod ljulja (0,20 mg/kg st) i repe (0,12 mg/kg st). Nije bilo dokaza za translokaciju toksina iz korena u izdanak. Nakon aplikacija na izdanak, mikrocistini nisu bili prisutni u izdanaku ljulja i repe, ali su bili prisutni u detelini (0,20 mg/kg st) i zelenoj salati (prosečno 0,79 mg/kg st; 0,094-2,487 mg/kg st). U tom slučaju osoba od 60 kg konzumiranjem 65-75 g st tretirane salate (6,8-7,9 g st) bi unosila oko 5,8 µg MCs po obroku (0,10 µg/kg telesne težine). To bi premašilo preporučene TDI vrednosti. Ne postoje standardi za unos mikrocistina od strane domaćih životinja. Krava koja pase 15 kg st dnevno pašnjaka koji sadrži 20 % deteline bi unela 3 kg deteline (st). Izmerena koncentracija mikrocistina u detelini bila je 0,21 mg/kg (st) što ukazuje da bi krava unosila 630 µg mikrocistina dnevno (1,26 µg/kg telesne težine dnevno za 500 kg žive težine životinje). To bi premašilo preporučenu granicu za mikrocistine u vodi za piće za domaće životinje (ANZECC, 2000). Prema tome postoji mogućnost za prenos mikrocistina kroz lanace ishrane do ljudi i životinja putem navodnjavanja vodom zagađenom sa ovim cijanotoksinima (Crush i sar., 2008).

Brojna istraživanja su pokazala da cijanotoksini različito deluju na različite vrste biljaka. Chen i saradnici (2004) su koristili sirovi ekstrakt cvetajuće biomase toksičnih cijanobakterija iz Jezera Dianchi (Kina) da bi odredili efekte mikrocistina na repu (*Brassica napus* L.) i pirinač (*Oryza sativa* L.) pri čemu su otkrili da toksin inhibiše rast i razvoj obe biljke, međutim, nivo inhibicije se razlikovao između ove dve vrste. Mikrocistin je izazvao jaču inhibiciju repe nego pirinča u procentu klijanja semena i visine sadnica. Koncentracije mikrocistina otkrivene u sadnicama repe su bile mnogo veće od onih iz sadnica pirinča, što upućuje da možda postoje različiti mehanizmi tolerancije prema ovom toksinu među biljnim vrstama. Naime, postoji mogućnost da je pirinač, koji se gaji u vodi u kojoj mogu biti prisutne cijanobakterije, evoluirao mehanizam koji sprečava usvajanje mikrocistina i čini ga otpornijim. Mikrocistin je inhibisao razvoj primarnih korena pirinča, međutim, jače bočno korenje moglo je da absorbuje nutrijente tako da su sadnice pirinča mogle i dalje rasti. Kod sadnica repe više koncentracije mikrocistina dovele su do inhibicije formiranja korena, što je usled nedostatka hranljivih materija rezultovalo propadanjem biljke. Sadnice repe i pirinča izložene mikrocistinu (0,024 µg/mL odnosno 0,12 µg/mL) izgledale su gotovo zdrave, ali su

utvrđeni nivoi mikrocistina iz ekstrakata ovih biljaka (2,61 i 2,94 µg/kg) značajno prekoračili privremene odrednice nivoa MC-LR u vodi za piće (Chen i sar., 2004).

Saqrane i saradnici (2008) istraživali su efekte ekstrakta cvetajuće biomase koja sadrži mikrocistine iz Lala Takerkoust rezervoara (Maroko) na klijanje semena i rast biljaka *Pisum sativum*, *Lens esculenta*, *Zea mays* i *Triticum durum*. Ove biljke su bile osjetljive na ekstrakte mikrocistina i inhibicija klijanja je bila dozno zavisna. Mikrocistini su posle 8 dana izlaganja doveli do značajnog smanjenja dužine epikotila, dužine korena biljke i inhibicije lateralnih korena. Vrsta *Pisum sativum* je bila najosetljivija, a *Lens esculenta* najviše otporna. Dalje, Saqrane i saradnici (2009) su primetili da cijanobakterijski ekstrakt koji sadrži mikrocistine (MC-RR, -LR, -YR, -(H4)YR, -WR, i -FR (0,5-4,2 µg ekvi. MC-LR/mL)) posle 30 dana izloženosti utiče na rast, razvoj, fotosintetsku aktivnost, produktivnost i mineralnu ishranu ovih sorti. Svi uočeni efekti su bili specifični za biljne vrste, koncentracije toksina i trajanje izloženosti. Akumulacija svake varijante mikrocistina veoma je varirala među biljnim vrstama i biljnim organima. Ovim eksperimentom je dokazano da se mikrocistini mogu translocirati kroz biljku.

Mohamed i Al Shehri (2009) su opisali prisustvo mikrocistina u tkivima sedam povrtarskih biljaka navodnjavanih vodom iz podzemnih bunara u Saudijskoj Arabiji. Kontaminacija podzemne vode sa cijanobakterijama se može javiti usled infiltracije iz obližnjih reka, jezera i bara, kao i putem padavina ili vetra, nošenjem cijanobakterijskih akineta i spora (Dubovik, 2002; Mohamed i Al Shehri, 2007). Kada dospeju do bunara podzemnih voda, u odgovarajućim uslovima cijanobakterije mogu da se prenamnože. Tako su u ovom slučaju cijanobakterije bile prisutne u podzemnim bunarima sa dominacijom vrste *Oscillatoria limnetica*, a u vodi su bili prisutni mikrocistini (0,3-1,8 µg/L), kao i u listovima i korenu svih povrtarskih biljaka sa farmi (0,07-1,2 µg/g st). Koncentracije mikrocistina u biljkama su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom toksina u vodi. Koncentracije mikrocistina su značajno varirale među povrtarskim biljkama, najveća koncentracija toksina je zabeležena u rotkvi (1,2 µg/g st), a najniža u kupusu (0,07 µg/g st). Korenje je imalo više koncentracije toksina nego lišće, jedini izuzetak je bilo lišće mirođije. Korenje mirođije, rukole, zelene salate, peršuna i kupusa koji su akumulirali toksine se ne konzumiraju, međutim koreni rotkve koji su sadržali najveće koncentracije mikrocistina se koriste za ishranu ljudi. Koreni rotkve i listovi mirođije, rukole, zelene salate, peršuna i kupusa obično se jedu sveži i ukoliko sadrže velike količine mikrocistina mogu predstavljati opasnost po ljudsko zdravlje. Na osnovu izmerenih vrednosti koje se nalaze u jestivom lišću i korenju (0,11-36 µg/g st), 100 g porcije bi sadržalo od 11 do 36 µg mikrocistina, što je više od

preporučenih GV za ovaj toksin iz vode za piće. Sve biljke su izgledale zdravo, ali to može biti usled nižih koncentracija mikrocistina u podzemnim bunarima koje nisu bile dovoljno visoke da utiču na rast ili izazovu morfološke i fiziološke promene (Mohamed i Al Shehri, 2009).

Kontaminirana voda cijanobakterijama i cijanotoksinima može predstavljati jedan od spoljašnjih faktora koji izazivaju oksidativni stres kod izloženih biljaka. Razni abiotički faktori kao što su suša, salinitet, ekstremne temperature, jaka iradijacija, UV svetlost, nedostatak hranljivih sastojaka, zagađivači vazduha izazivaju oksidativno oštećenje biljaka preko formiranja ROS (He i Häder, 2002; Noctor i Foyer, 1998; Lin i Kao, 2000). Da bi eliminisale ROS i izbegle oksidativna oštećenja, biljke poseduju antioksidativne enzime uključujući superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), peroksidazu (POD) i glutation peroksidazu (GPX). SOD blokira O_2^- oštećenje ćelija, dok CAT, POD i GPX razbijaju H_2O_2 na H_2O i O_2 (Cakmak i Marschner, 1992). Promenu u količini i aktivnosti ovih enzima mogu izazvati ekološki stresovi (Gueta-Dahan i sar., 1997).

Ispitivanje Chen i saradnika (2004) su pokazala da su aktivnosti endogenih zaštitnih enzima SOD i POD u repi zavisile od doze toksina, dok je u pirinču mikrocistin aktivirao SOD, ali nikakav značajni efekat na aktivnost POD nije primećen. SOD i POD mogu učestvovati u odbrani biljke protiv stresa, kao što je izlaganje mikrocistinima, koji takođe može da manifestuje svoju toksičnost kroz oksidativni stress. Kontaminirana voda sa mikrocistinima može predstavljati stres koji utiče na produktivnost izloženih biljaka.

Rezultati Yin i saradnika (2005) takođe pokazuju da MC-RR (50 mg/L) može da izazove oksidativni stres u suspenziji ćelija duvana, koji se manifestuje akumulacijom ROS i povećanom aktivnosti antioksidativnih enzima. Oksidativni stres na ćelije uglavnom zavisi od odnosa sadržaja ROS i antioksidativnog sistema, pa ako prva komponenta ima prednost nad drugom, ćelije će biti oštećene i to će dovesti do smrti ćelije, što reflektuje vitalnost ćelija. MC-RR izazvao je pad vitalnosti ćelija za približno 80 % nakon tretmana od 144 h, dok su se nivoi ROS, POD i GPX aktivnosti postepeno povećavali. Promene SOD i CAT aktivnosti su takođe otkrivene u ćelijama duvana. MC-RR može uzrokovati povećanje sadržaja ROS u biljnim ćelijama što dovodi do razvoja oksidativnog stresa, a ćelije mogu eliminisati ROS unapređenjem antioksidativnih enzima i borbom protiv oksidativne povrede izazivane od strane cijanotoksina.

Chen i saradnici (2010) izložili su *in vitro* jabuku (*Malus pumila*) sirovom ekstraktu cveta toksičnih cijanobakterija iz Dianchi jezera (Kina). Nakon izlaganja mikrocistinima iznad 0,3 $\mu\text{g/mL}$ značajno je smanjen rast i širenje izdanaka jabuke. Nakon 7 dana izlaganja 3

$\mu\text{g/mL}$ POD aktivnost je bila značajno povećana, a posle 14 dana izlaganja, mikrocistin je izazvao povećanje POD već pri koncentraciji od $0,3 \mu\text{g/mL}$. Tokom 7 dana mikrocistini pri koncentracijama do $3 \mu\text{g/mL}$ nisu uticali na aktivnost SOD, međutim, nakon 14 dana izlaganja SOD aktivnost je značajno povećana pri koncentraciji od $0,3$ i $3 \mu\text{g/mL}$ u izdancima jabuke. Koncentracija mikrocistina u izdancima se povećavala sa vremenom ekspozicije i koncentracijom toksina. Nakon 14 dana izlaganja mikrocistinima $3 \mu\text{g/mL}$, izdanci jabuke su sadržali $510,23 \text{ ng MC-LR ekvi/g st.}$

Pflugmacher i saradnici (2007) su uočili da različite varijante iste biljne vrste mogu reagovati na različite načine u prisustvu istog toksina. Pokazali su da cijanobakterijski ekstrakti koji sadrže MC-LR ($0,5 \mu\text{g/L}$), utiču na klijanje, rast i morfologiju, kao i parametre antioksidativnog odgovora u različitim varijantama spanaća (*Spinacia oleracea*) šest nedelja nakon izlaganja. Povećana aktivnost antioksidativnih enzima u spanaću još jednom potvrđuje da izlaganje MC-LR izaziva oksidativni stres u biljkama, a to povećanje je u cilju ublažavanja negativnih efekata izazvanih od strane ROS. Odgovor na negativne efekte oksidativnog stresa podrazumeva stimulaciju antioksidativnog sistema koji pored enzima uključuje i set antioksidanasa kao što su glutation, askorbinska kiselina i tokoferoli (Pflugmacher i sar., 2007).

Fenolna jedinjenja takođe igraju važnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala, uključujući $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ i $^1\text{O}_2$ (Ksouri i sar., 2007). L-fenilalanin amonijum liaza je ključna u sintezi fenola i pokazalo se da postoji korelacija između povećane aktivnosti ovog enzima i povećanja fenolnih jedinjenja kao odgovor na različite stimulse u biljkama (Boudet, 2007; Sakihama i sar., 2002). Ovo bi moglo da objasni povećanje sadržaja fenola u *Vicia faba* biljci navodnjavane ekstraktom cijanobakterija koji sadrži cijanotoksine (Lahrouni i sar., 2013), slični rezultati su dobijeni i kod biljke *Lemna gibba* (Saqrane i sar., 2007). Dakle, sadržaj fenolnih jedinjenja se menja u biljkama koje su izložene mikrocistinima. Njihovo značajno povećanje je otkriveno i u korenu i listovima lucerke (*Medicago sativa*). Akumulacija fenola upućuje na značaj tih jedinjenja sekundarnog metabolizma biljaka u zaštiti od biotičkih ili abiotičkih stresova i/ili stresora. Biljke izložene mikrocistinima sintetišu veće količine fenolnih jedinjenja da bi se suočile sa stresnim uslovima izazvanim cijanotoksinima. Uz angažovanje antioksidativnih enzima i fenolna jedinjenja učestvuju u procesu odbrane biljaka protiv stresa izazvanog navodnjavanjem vodom kontaminiranom cijanotoksinima. Nivo fenolnih jedinjenja i aktivnost peroksidaza su dva parametra koja su veoma povezana sa oksidativnim stresom, jer oni ublažavaju/sprečavaju poremećaje koji

nastaju u biljnoj ćeliji (lipidna peroksidacija) i učestvuju u odbrambenom mehanizmu biljaka protiv stresa (El Khalloufi i sar. 2011).

Flavonoidi su prirodna polifenolna jedinjenja proizvedena od strane biljaka, a koji mogu takođe služiti u ublažavanju stresa izazvanog cijanobakterijama. Novo istraživanje je pokazalo da flavonoidi mogu da izazovu značajnu inhibiciju rasta kod izložene cijanobakterijske vrste *Microcystis aeruginosa* (Huang i sar., 2015).

Navodnjavanje vodom koja je kontaminirana cijanotoksinima ima negativne biohemijske efekte na metabolizam izloženih biljaka i time utiče na kvalitet poljoprivrednih kultura. Takođe, biljke mogu da akumuliraju mikrocistine i potencijalno prenose ove toksine do životinja i ljudi i to u visokim koncentracijama koje su opasne po zdravlje potrošača.

1.6.5. Cijanobakterijski dijetetski suplementi

Unos cijanobakterija takođe može biti dobrovoljan, putem suplemenata u ishrani, pravljenih na bazi cijanobakterija i to najčešće vrsta rodova *Spirulina*, *Nostoc*, kao i *Aphanizomenon flos-aquae*, a koji su uglavnom poznati po svom bogatom sadržaju proteina. Cijanobakterije i alge u nekim delovima sveta već hiljadama godina predstavljaju izvor hrane i lekova (Hoppe, 1979; Richmond, 1990). Nekada Asteci (Farrar, 1966), a danas brojna plemena na severu Afrike gaje cijanobakterije (spirulinu) u jezerima i od njih prave hleb i kolače (Ciferri, 1983; Abdulqader i sar., 2000). Najduži staž u konzumaciji ima Kina, gde se kao hrana koristi cijanobakterija *Nostoc* i to oko dve hiljade godina (Gao, 1998). Njihova eksploatacija u zapadnim zemljama počinje 70-tih godina prošlog veka (Becker i Venkataraman, 1980) i to u vidu suplemenata koji se uglavnom proizvode od biomase cijanobakterijskih vrsta *Aphanizomenon flos-aquae* i *Spirulina* spp., koje se najčešće gaje u Africi (Toerien i Grobbelaar, 1980), Kaliforniji, Havajima, Tajlandu, Kini (Li i Qi, 1997), Tajvanu (Soong, 1980) i Indiji (Becker i Venkataraman, 1984), a u velikoj meri su namenjeni zapadnom tržištu (Carmichael i sar., 2000).

Naime, u zemljama Zapadne Evrope i Severne Amerike promoviše se zdrav način života, koji između ostalog, uključuje i primenu bioloških proizvoda, kao što su suplementi u ishrani pravljeni na bazi biomase cijanobakterija. Oni se uzimaju zbog svojih korisnih efekata po zdravlje poput detoksikacije, gubitka telesne težine, poboljšanja raspoloženja, podizanja energije i povećane budnosti (Carmichael i sar., 2000; Jensen i sar., 2001). Osim toga, neki od ovih proizvoda se koriste kao alternativna terapija za smanjenje pažnje usled hiperaktivnosti kod dece (Lindermann, 1995).

Cijanobakterijski suplementi u obliku pilula, kapsula i praškova se mogu konzumirati bez lekarske konsultacije. S obzirom na to da su ovi proizvodi prirodni, pretpostavlja se da su ujedno i bezbedni, zbog čega se često uzimaju u visokim dozama i tokom dužeg vremenskog perioda. Međutim, ovo može imati negativne posledice po zdravlje, uključujući simptome kao što su mučnina, povraćanje i dijareja. Iako se gastrointestinalni poremećaji mogu dovesti u vezu sa konzumacijom ovih suplemenata, obično se oni pripisuju željenoj “detoksikaciji” organizma. Takođe, brojni negativni efekti mogu proći neprimećeni ili mogu biti pripisani drugim uzročnicima (Gilroy i sar., 2000).

Međutim, pomenute posledice mogu biti rezultat prisustva cijanotoksina u suplementima pravljenim na bazi biomase cijanobakterija. Uprkos opštem mišljenju da spirulina nije toksična, anatoksini su identifikovani u suplementima na bazi spiruline (Draisci i sar., 2001). Takođe, utvrđeno je da *Spirulina fusiformis* može da proizvede niske koncentracije mikrocistina i anatoksina-a (Ballot i sar., 2004; 2005). Smatra se da su suplementi na bazi spiruline izazvali oštećenje jetre kod jednog Japanca (Iwasa i sar., 2002). Takođe, *Aphanizomenon flos-aquae* može da proizvodi anatoksin-a (Rapala i sar., 1993) i saksitoksin (Pereira i sar., 2000; Ferreira i sar., 2001). Ova vrsta se generalno gaji u prirodnim jezerima, gde može da koegzistira sa drugim cijanobakterijama kao što je i *Microcistis* sp. (Carmichael i sar., 2000), što podrazumeva da potrošači suplemenata mogu biti izloženi mikrocistinima i drugim toksinima proizvedenim od strane pratećih cijanobakterija.

Nezavisna ispitivanja koncentracije mikrocistina u suplementima na tržištu Amerike, Kanade, Nemačke i Švajcarske su i dokazala prisustvo ovih toksina u suplementima na bazi cijanobakterija. Za većinu tih suplemenata utvrđeno je da sadrže mikrocistine u koncentracijama većim od dozvoljenih 1 µg/g (Gilroy i sar., 2000; Lawrence i sar., 2001; Hoeger i Dietrich, 2004). TDI za MC-LR se lako može prekoračiti konzumacijom kontaminiranih cijanobakterijskih suplemenata u ishrani. Neophodno je da se cijanobakterijske vrste i sojevi koji se sa ovim ciljem masovno gaje selektuju na bazi odsustva produkcije cijanotoksina nakon brojnih biotestova. Monitoring i kvalitetna kontrola biomase namenjene za dobijanje dodataka u ishrani, kao i samih proizvoda, su neophodni u cilju zaštite potrošača.

1.6.6. Intravenski put ekspozicije

Prvi dokumentovani smrtni ishodi usled kontakta sa cijanotoksinima preko hemodijalize dogodili su se u klinici za dijalizu u gradu Karuaru, Brazil tokom 1996. godine (Jochimsen i sar., 1998; Carmichael i sar., 2001). U februaru 1996. nakon rutinske hemodijalize od 131 pacijenta, 116 (89 %) požalili su se na glavobolju, bolove u očima, poremećaje vida, mučninu, povraćanje i slabost mišića. Kasnije je kod 100 bolesnika došlo i do akutnog prestanka rada jetre. Od decembra 1996. godine, 52 smrtna slučaja mogu biti pripisana sindromu nazvanom "Karuaru sindrom" (Barreto i sar., 1996; Jochimsen i sar., 1998).

Uzroci opisanog sindroma su ubrzo pronađeni u vodi od koje je pripremana fiziološka tečnost za dijalizu. Klinika je tokom leta 1996. godine za dijalizu koristila neadekvatno tretiranu vodu (Jochimsen i sar., 1998). Na osnovu pređašnjih znanja o pojavi cijanobakterija u Brazilu, zatim hemijskoj stabilnosti hepatotoksina, kao i sličnosti sa simptomima opisanih kod pacijenata sa onim uočenim kod eksperimentalnih životinja, došlo se do pretpostavke da bi za ove intoksikacije mogli biti odgovorni cijanotoksini. Na osnovu ove hipoteze izvršeno je ispitivanje fitoplanktona u vodi rezervoara koji snabdeva kliniku, zatim analiza cijanotoksina u vodnom sistemu klinike, kao i analiza tkiva jetre pacijenata.

Analize fitoplanktona u rezervoaru su pokazale da od 1990. godine cijanobakterije dominiraju u vodi i predstavljale su 99 % od ukupne fitoplanktonske zajednice. Najčešća cijanobakterijska vrsta bila je *Aphanizomenon manguinii*, kao i dve vrste *Oscillatoria*, dok su najčešći cijanobakterijski rodovi bili: *Microcystis*, *Anabaena* i *Cylindrospermopsis*, potencijalni producenti cijanotoksina. Na osnovu analiza vode, seruma i tkiva jetre pacijenata, identifikovana su dva hepatotoksična cijanotoksina: mikrocistini u svim uzorcima i cilindrospermopsin u sistemu za prečišćavanje vode u lokalnom rezervoaru (Carmichael i sar., 2001).

Histopatološki pregled tkiva jetre 16 žrtava je pokazao uniformnost oštećenja jetre, deformiteta ćelija, nekroze, apoptoze i citoplazmatične vakuolizacije. Ova histopatološka slika je bila veoma slična onoj dobijenoj kod eksperimentalnih životinja tretiranim mikrocistinima (Dabholkar i Carmichael, 1987; Runnegar i sar., 1987; Theiss i sar., 1988). Na osnovu ovih bioloških i hemijskih dokaza se moglo zaključiti da su mikrocistini (MC-YR, MC-LR i MC-AR) iz vode glavni uzrok smrti pacijenata sa hemodijalize u Brazilu (Azevedo, 2002).

1.7. Stanje u Srbiji

Sa poznavanjem puteva ekspozicije čoveka cijanotoksinima, na važnosti dobijaju informacije o pojavi i toksičnosti cijanobakterija u vodama Srbije, prvenstveno u rezervoarima za vodosnabdevanje, navodnjavanje, rekreaciju i ribnjacima. Ubrzana eutrofizacija vodnih ekosistema, kao direktna posledica naglog povećanja ljudske populacije, urbanizacije i moderne intenzivne poljoprivredne prakse je intenzivirala pojavu cvetanja toksičnih cijanobakterija (Svirčev i sar., 2008). Učestala pojava štetnih cvetanja cijanobakterija u brojnim vodenim ekosistemima dovela je do povećanog interesovanja za istraživanje cijanobakterija širom sveta uključujući i Srbiju.

Na osnovu pregleda 130 godina istraživanja biodiverziteta, pojave i toksičnosti cijanobakterija u vodama širom Srbije, kao i njihovog uticaja na kvalitet vode i zdravlje ljudi, može se zaključiti da je cvetanje cijanobakterija prisutno u mnogim rezervoarima koji se koriste za snabdevanje vodom za piće, rekreaciju, navodnjavanje poljoprivrednih useva, ribnjacima, ali i drugim vodenim telima u našoj zemlji (Svirčev i sar., 2014).

Značajni uticaj na ljudsko zdravlje može se manifestovati kroz hronično izlaganje cijanotoksinima preko vode za piće (Falconer, 1998; Codd i sar., 2005). Na primer, u rezervoaru Čelije, koji se koristi za snabdevanje vodom za piće grada Kruševca, tokom 2004. godine dogodilo se cvetanje cijanobakterija *Aphanizomenon*, *Anabaena* i *Microcystis*. Uzorci vode prikupljeni iz rezervoara sadržali su 650 µg mikrocistina/L, dok je u vodovodnoj vodi Kruševca, koncentracija mikrocistina bila 2,5 µg/L (Svirčev i sar., 2009). Osim toga, i u drugim akumulacijama u Srbiji (Bovan, Bresnica, Garaši, Grlište, Grošnica, Gruža, Krajkovac, Pridvorica) zabeleženo je cvetanje cijanobakterija (Sedmak i Svirčev, 2011). Epidemiološka istraživanja su pokazala da postoji povezanost između cvetanja cijanobakterija u akumulacijama koje se koriste za snabdevanje vodom i povećane učestalosti primarnog kancera jetre u Centralnoj Srbiji (Svirčev i sar., 2009; 2013; 2013a; 2014; 2014a; Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011).

Istraživanje o cijanobakterijama u ribnjacima Srbije su započela 1950. godine (Milovanović i Živković, 1953, 1959; 1963; Ristić i sar., 1979). U poslednje vreme sve veća zabrinutost u pogledu zdravstvenih efekata koji cijanotoksini mogu da imaju na ribe i potencijalno na ljude koji konzumiraju ribu koja sadrži toksine, dovela je do povećanja broja studija na ribnjacima. Najveći broj ovih istraživanja je sproveden na ribnjacima na teritoriji Vojvodine (Svetska banka izveštaj DM 4307, 2011).

Cijanobakterije takođe mogu biti uzročno povezane sa masovnim pomorom ribe koji se dogodio 2012. godine u Aleksandrovačkom jezeru (Svirčev i sar., submitirano), koje se prvenstveno koristi za navodnjavanje. Prisustvo mikrocistina i bujanje cijanobakterija je takođe primećeno u mnogim drugim akumulacijama koje se koriste za navodnjavanje u Srbiji. Na primer, u Mrtvoj Tisi su detektovane visoke koncentracije mikrocistina (279,87 µg/L) u leto 2007. godine (Simeunović, 2009). Ovi nalazi mogu biti važni, jer su istraživanja pokazala da navodnjavanje površinskom vodom koja sadrži cijanobakterije i cijanotoksine može negativno uticati na poljoprivredne biljke, koje potencijalno mogu akumulirati te toksine i predstavljati rizik za zdravlje ljudi i životinja (Codd i sar., 1999a; Crush i sar., 2008; Saqrane i sar., 2009; Chen i sar., 2010).

Pored navedenih, cvetanjem cijanobakterija su bili zahvaćeni i drugi vodeni ekosistemi kao na primer bare, jezera, kanali, pa čak i reke širom Srbije. Visok nivo javnog medijskog interesovanja dogodio se u junu 2009. godine nakon uginuća ribe i nekoliko stotina domaćih životinja (krava i svinja), koje su pile vodu iz reke Ponjavica u blizini grada Pančeva. Tačan uzrok uginuća nije utvrđen, međutim, istraživanja u 2008. i 2009. godini na Ponjavici su pokazala prisustvo mikrocistina u vodi, mulju, biljkama i ribi (Karadžić, 2011; Natić i sar., 2012). Moguće je da su ovi cijanotoksini doprineli uginuću životinja, međutim za ovakav zaključak nema dovoljno podataka.

Generalno, u našoj zemlji postoji veliki broj podataka o pojavi cijanobakterija. Naime, tokom pomenutog perioda od 130 godina, na teritoriji Republike Srbije sprovedeno je preko 250 objavljenih analiza. Pri tome je u vodama Srbije zabeleženo oko 70 vrsta cijanobakterija. Cijanobakterije koje su najčešće cvetale pripadaju rodovima: *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* i *Anabaena*, dok su *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae*, *Pseudanabaena limnetica*, *Oscillatoria agardhii* (*Planktothrix agardhii*), *Oscillatoria rubescens* (*Planktothrix rubescens*), *Anabaena solitaria*, *Anabaena flos-aquae* i *Aphanizomenon flos-aquae* najčešće cijanobakterijske vrste (Svirčev i sar., 2014).

Istorijski podaci o pojavi cijanobakterija i cijanotoksina u vodenim ekosistemima Srbije, kao i njihovim biološkim efektima i uticaju na ljudsko zdravlje (videti Svirčev i sar., 2014), ukazuju na potrebu daljeg praćenju ovog fenomena kako u našoj zemlji tako i širom sveta.

1.8. Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija (NSCCC)

Cijanobakterije su ubikvitarni organizmi koji naseljavaju širok spektar vodenih i kopnenih sredina širom sveta. Njihov biodiverzitet se može očuvati u kolekcijama kultura cijanobakterija. Tako i Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija (NSCCC) (Slika 3) sadrži brojne sojeve izolovene iz raznih ekosistema Srbije, ali takođe i sveta. Od preko 300 sojeva (Simeunović, 2005) iz ove kolekcije analizirana je toksičnost 70 kultura i to 36 kulture terestričnog i 34 vodenog porekla (Tokodi i sar., u pripremi).

Artemia salina bioesej je pokazao toksičnost (mortalitet račića preko 50 %) 17 kultura od kojih osam potiču iz terestrične, a devet iz vodene sredine. Osim toga, ELISA test je korišćen za skrining istih kultura i utvrđeno je da 31 analizirana kultura (17 vodenog i 14 terestričnog porekla) ima sposobnost produkcije cijanotoksina, pri čemu je 28 kultura bilo pozitivno na mikrocin i nodularin, a sedam na saksitoksin, od kojih su četiri kulture proizvodile obe grupe cijanotoksina. Cijanotoksini su produkovani od strane različitih rodova poreklom iz vodenih (*Geitlerinema*, *Gloeocapsa*, *Jaaginema*, *Leptolyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*) i terestričnih ekosistema (*Anabaena*, *Chroococcus*, *Leptolyngbya*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Synechocystis*) (Tokodi i sar., u pripremi).

Ove informacije su značajne jer se iz kolekcije može molekularnim i ekofiziološkim metodama ispitati ne samo trenutna toksičnost nego i potencijalna, koja se može očekivati i u različitim prirodnim ekosistemima, a samim tim predstavlja opasnost po čoveka i druge organizme.



Slika 3. Sojevi iz NSCCC

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Glavni ciljevi istraživanja su:

- a) praćenje prisustva cijanobakterija i cijanotoksina u cvetajućim akumulacijama za snabdevanje vodom za piće, rekreaciju, navodnjavanje i u ribnjacima na teritoriji Republike Srbije;
- b) proučavanje negativnih efekata cijanotoksina na ljudsko zdravlje, kao i načina izlaganja čoveka ovim štetnim metabolitima cijanobakterija;
- c) ispitivanje potencijalne akumulacije i prenosa cijanotoksina putem lanca ishrane, odnosno kontaminiranim prehrambenim proizvodima, do čoveka;
- d) predlozi moguće prevencije izlaganja i negativnih efekata.

U okviru ispitivanja biće testirane sledeće hipoteze:

1. U akumulacijama za snabdevanje vodom za piće, rekreaciju, navodnjavanje i ribnjacima u Srbiji su prisutne toksične cijanobakterije i njihovi cijanotoksini;
2. U Centralnoj Srbiji postoji povezanost povećanih incidenzi kancera, prvenstveno primarnog kancera jetre sa pojavom cvetanja cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje;
3. Cijanotoksini mogu da se akumuliraju u mesu ribe koja se gaji u ribnjacima u kojima dolazi do cvetanja cijanobakterija;
4. Cijanotoksini mogu da se akumuliraju u plodovima biljaka za ljudsku upotrebu, koje se zalivaju kontaminiranom vodom u kojoj se nalaze cijanotoksini;
5. Cijanotoksini su prisutni u suplementima na bazi cijanobakterija koji se prodaju na našem tržištu.

Da bi se ostvarili ciljevi istraživanja neophodno je sprovesti sledeće postupke:

- pratiti slučajevne cvetanja i uzorkovati vodu radi detekcije prisutnih cijanobakterija i cijanotoksina u akumulacijama za snabdevanje vodom za piće i rekreaciju (Vrutci, Užice), navodnjavanje (Aleksandrovačko jezero, Vranje) kao i u ribnjacima (Vojvodina) sa teritorije Srbije;

- analizirati desetogodišnje epidemiološke podatke o 13 kancera u Srbiji, sa akcentom na primarni kancer jetre, uključujući i podatke o njegovim osnovnim faktorima rizika;

- uočiti negativne efekte cijanobakterija i cijanotoksina na ljude i druge izložene organizme, sprovesti upitnik na lokalitetu gde je došlo do cvetanja (Vrutci, Užice);

- analizirati prisustvo i negativne efekte mikrocistina u mesu ribe (*Cyprinus carpio*) iz ribnjaka u Vojvodini koji su cvetali;

- sprovesti eksperiment radi procena akumulacije i negativnih efekata cijanotoksina u tkivima biljke (*Capsicum annuum*) zalivanjem vodom kontaminiranom mikrocistinima (*Microcystis aeruginosa* PCC 7806);

- testirati suplemenate u ishrani pravljenih na bazi cijanobakterijske biomase sa našeg tržišta na prisustvo mikrocistina;

- diskutovati o graničnim vrednostima za cijanotoksine u svetu i potrebi definisanja istih u Srbiji radi zaštite ljudskog zdravlja;

- sagledati mogućnosti prevencije i eliminacije cijanobakterija i cijanotoksina u vodenim ekosistemima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Epidemiološki podaci

Epidemiološki podaci o incidenci 13 kancera analizirani su po okruzima Centralne Srbije u cilju ispitivanja povezanosti sa pojavom cvetanja cijanobakterija u rezervoarima za vodosnabdevanje. Takođe su praćena i pojedina oboljenja građana Užica radi procene potencijalnih efekata na zdravlje, nakon cvetanja akumulacije za vodosnabdevanje Vrutci.

3.1.1. Regionalna podela Srbije

Republika Srbija je podeljena na tri regiona: Vojvodina, Centralna Srbija i Kosovo. Prema administrativnoj podeli, Centralna Srbija ima 18 okruga (Slika 4).



Slika 4. Administrativna podela Srbije na regione. Ukupno 3 regiona sa 18 okruga u Centralnoj Srbiji: (1) Rasinski, (2) Zaječarski, (3) Mačvanski, (4) Borski, (5) Podunavski, (6) Pčinjski, (7) Moravički, (8) Zlatiborski, (9) Braničevski, (10) Pomoravski, (11) Beogradski, (12) Jablanički, (13) Raški, (14) Kolubarski, (15) Pirotski, (16) Šumadijski, (17) Nišavski, (18) Toplički

Jedan od okruga, Pirotski, je isključen iz istraživanja, zbog sumnje u nepouzdanost podataka jer su sve incidence kancera u ovom okrugu bile veoma visoke, što zahteva dodatna istraživanja. Ispitivani okruzi sa odgovarajućim skraćenicama koje se koriste u disertaciji, prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Istraživani okruzi Centralne Srbije sa skraćenicama

Skraćenica	Okrug
O1	Pčinjski
O2	Jablanički
O3	Toplički
O4	Raški
O5	Rasinski
O6	Pomoravski
O7	Zlatiborski
O8	Podunavski
O9	Braničevski
O10	Nišavski
O11	Borski
O12	Moravički
O13	Mačvanski
O14	Kolubarski
O15	Šumadijski
O16	Zaječarski
O17	Beogradski

Učestalost kancera i zaraznih bolesti iz svih okruga u centralnom registru su dokumentovani po okruzima i moguće je uporediti pojave kancera sa drugim bolestima, kao i sa pojavom cvetanja cijanobakterija u lokalnim rezervoarima koji se koriste za snabdevanje vodom ovih okruga. Vojvodina se snabdeva podzemnim vodama i ovaj region predstavlja adekvatnu negativnu kontrolu u izvršenom epidemiološkom ispitivanju.

3.1.2. Baze podataka

- Za izradu ove disertacije, desetogodišnji podaci o hroničnom virusnom hepatitisu B (cum delta agent i sine delta agent) (HBV) i hroničnom virusnom hepatitisu C (HCV) za Centralnu Srbiju su dobijeni iz Instituta za zaštitu zdravlja “Dr Milan Jovanović-Batut” Centra za prevenciju i kontrolu zaraznih bolesti (Zarazne bolesti na teritoriji Republike Srbije bez Kosova i Metohije, 1999-2008).

- Podaci o HBV i HCV za Vojvodinu su dobijeni iz Instituta za javno zdravlje Vojvodine.
- Podaci o mortalitetu ciroze jetre u elektronskom obliku su dobijeni iz Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut".
- Kao izvor podataka o učestalosti trinaest kancera u Centralnoj Srbiji tokom desetogodišnjeg perioda od 1999. do 2008. godine, korišćen je objavljeni materijal Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", Beograd (Registar za rak u Centralnoj Srbiji, 1999-2008).

Trinaest ispitanih kancera su navedeni u Tabeli 7, uključujući i odgovarajuće skraćenice koje se koriste u ovoj disertaciji, kao i njihovi stručni kodovi Međunarodne klasifikacije bolesti za statistiku i druge zdravstvene probleme (ICD 10. revizija), definisane od strane SZO (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/II>).

Tabela 7. Ispitivani kanceri sa skraćenicama i kodovima

Skraćenica	ICD-10 kod	Kancer
K ₁	C71	mozga
K ₂	C34	bronhija i pluća
K ₃	C38	srca, medijastinuma i plućne maramice
K ₄	C56	jajnika
K ₅	C62	testisa
K ₆	C64	bubrega (bez bubrežne karlice)
K ₇	C16	želuca
K ₈	C17	tankog creva
K ₉	C18, C20	kolorektuma
K ₁₀	C48	retroperitoneuma i peritoneuma
K ₁₁	C91-95	leukemije
K ₁₂	C43	maligni melanom kože
K ₁₃	C22	primarni kancer jetre

Kanceri su izabrani i podaci o incidencama podvrgnuti epidemiološkim analizama na osnovu ranije objavljenih podataka koji svedoče o negativnim efektima cijanotoksina na odgovarajuće organe (Falconer, 1988; Falconer i Buckley, 1989; Humpage i sar., 2000; Milutinović i sar., 2002; Zhou i sar., 2002; Botha i sar., 2004; Ding i sar., 2006; Milutinović i sar., 2006; Soares i sar., 2007).

- Podaci o pet kancera (mozga, jajnika, testisa, malignog melanoma kože i jetre) za region Vojvodine (kontrolni region) su dobijeni iz Registra za rak Vojvodine, Instituta za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica.

- U saradnji sa Zavodom za javno zdravlje Užice, sakupljeni su podaci za period od 2008. do 2013. godine o pojavi bolesti kožnog i potkožnog tkiva i bolesti digestivnog trakta, kod građana Užica, kao i pojavi kancera prostate, larinksa, bubrega i leukemije kod muškaraca, kancera dojke, ovarijuma, grlića materice i materice kod žena, zatim kancera pluća, kolona, rektuma, mokraćne bešike, želuca, pankreasa, mozga i jetre kod oba pola. Podaci o broju obolelih su zabeleženi prilikom pružanja primarne i sekundarne zdravstvene zaštite.
- Podaci o cvetanju cijanobakterija su uzeti iz 25-godišnjeg programa monitoringa u Srbiji koji vrši Republički hidrometeorološki zavod (vidi Svirčev i sar., 2011), zatim iz objavljenih radova na ovu temu (npr. Svirčev i sar., 2007) kao i baze podataka cijanobakterija Srbije (Svirčev i sar., 2014).

3.1.3. Statistička analiza

Za analizu incidence svih posmatranih kancera definisan je novi scoring sistem. Neka je posmatran kancer K_j , $j=1,2,\dots,13$ čija je prosečna vrednost incidence u svih 17 okruga

$\bar{x}_j = \frac{1}{17} \sum_{i=1}^{17} \bar{x}_{ij}$ sa standardnim odstupanjem $\sigma_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{17} (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_j)^2}{17}}$. Svakom okrugu pridružena

je jedna od vrednosti -2,-1,0,1,2. Ako je \bar{x}_{ij} prosečna incidenca u posmatranih deset godina kancera K_j u okrugu O_i tada se okrugu O_i pridružuje broj poena za kancer K_j određen formulom:

$$scor_j(\bar{x}_{ij}) = \begin{cases} -2, & \bar{x}_{ij} < \bar{x}_j - 2\sigma_j \\ -1, & \bar{x}_j - 2\sigma_j \leq \bar{x}_{ij} < \bar{x}_j - \sigma_j \\ 0, & \bar{x}_j - \sigma_j \leq \bar{x}_{ij} \leq \bar{x}_j + \sigma_j \\ 1, & \bar{x}_j + \sigma_j < \bar{x}_{ij} \leq \bar{x}_j + 2\sigma_j \\ 2, & \bar{x}_j + 2\sigma_j < \bar{x}_{ij} \end{cases}$$

Odnosno, posmatranom okrugu dodeljuje se vrednost -2 ako je incidenca kancera značajno ispod proseka u Srbiji (manja od $\bar{x} - 2\sigma$), vrednost -1 ako je incidenca umereno ispod proseka u Srbiji (između $\bar{x} - 2\sigma$ i $\bar{x} - \sigma$), vrednost 0 ako je u granicama proseka (između $\bar{x} - \sigma$ i $\bar{x} + \sigma$), vrednost 1 ako je umereno iznad proseka (između $\bar{x} + \sigma$ i $\bar{x} + 2\sigma$)

i vrednost 2 ako je incidenca kancera u regionu značajno iznad republičkog proseka (veća od $\bar{x} + 2\sigma$).

Za rangiranje okruga korišćena je suma poena za sve kancere, odnosno svakom okrugu je pridružen SCOR definisan sa:

$$SCOR(i) = \sum_{j=1}^{13} scor_j(\bar{x}_{ij}), \quad i = 1, 2, \dots, 17$$

Pored toga t-testom je testirana razlika u pojavi kancera u pojedinim okruzima i regionima.

Takođe, t-testom su testirane razlike u broju obolelih u Užicu u 2013. godini i prosečnog broja obolelih u periodu od 2008. do 2012. godine za bolesti sistema za varenje, kože i podkožnog tkiva ($P < 0,05$). Izračunati su: srednja vrednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije.

U statističkoj analizi korišćen je softver IBM SPSS Statistics, version 20, kao i Statgraphics centurion XV.

3.2. Upitnik i anketiranje

Nakon pojave cvetanja cijanobakterija u rezervoaru za vodosnabdevanja Vrutci kod grada Užica, sastavljen je upitnik sa sedam pitanja uz dodatna potpitanja o putevima izloženosti cijanobakterijama i cijanotoksinima, kao i njihovom uticuju na zdravlje ljudi i životinja.

Na samom početku anonimnog upitnika su traženi osnovni lični podaci ispitanika, pol i godine starosti. Zatim, prva tri pitanja, kao i početak četvrtog pitanja se odnose na načine i učestalost izlaganja, putem vodovodne vode, ishrane ribom i tokom rekreativnih aktivnosti. Preostala pitanja se odnose na zdravstvene komplikacije koje bi mogle biti rezultat izlaganja, kako ispitanika, tako i njegovih članova porodice i životinja. Pitanja su vremenski usmerena na dešavanja od decembra 2013. godine, kada je zabeleženo cvetanja u odnosu na prethodne tri godine pre incidenta.

Sledi prikaz upitnika:

ANONIMNI UPITNIK ZA GRAĐANE UŽICA

Pol (podvući): Muški Ženski

Godine starosti (dopisati): _____

1. Vodovodnu vodu U TOKU ZABRANE KORIŠĆENJA sam upotrebljavao/la (podvući odgovore):

- | | | | |
|-------------------------------------------------|-------------|-----------|-------|
| a) Za piće | svakodnevno | povremeno | nikad |
| b) Za spremanje hrane | svakodnevno | povremeno | nikad |
| c) Ličnu higijenu (pranje ruku, zuba, umivanje) | svakodnevno | povremeno | nikad |
| d) Tuširanje | svakodnevno | povremeno | nikad |

2. Da li je vodovodna voda U TOKU ZABRANE KORIŠĆENJA promenila (podvući odgovore):

- | | | | |
|---------|---------|----------|-------------------|
| a) boju | b) ukus | c) miris | d) ostala je ista |
|---------|---------|----------|-------------------|

3. Ribu iz jezera Vrutci konzumiram (podvući odgovore):

- | | | | | | |
|---------------------------|-------------|-------------------|---------|----------|-------|
| a) U poslednje tri godine | svakodnevno | par puta nedeljno | mesečno | godišnje | nikad |
| b) Od decembra 2013. | svakodnevno | par puta nedeljno | mesečno | nikad | |

4. Boravak na jezeru (podvući odgovore na sledeća pitanja):

- | | | | | |
|---------------------------------------------------|-------------------|---------|--------------------|-------|
| a) Koliko često posećujete jezero Vrutci? | par puta nedeljno | mesečno | godišnje | nikad |
| b) Kojim aktivnostima se bavite na jezeru Vrutci? | kupanje | pecanje | boravak pored vode | |
- drugo (navesti koje): _____

c) Da li ste primetili neke promene vode jezera?

pojavu neprijatnog mirisa vode jezera	promenu boje vode	pojavu pene, prevlake ili nakupine
---------------------------------------	-------------------	------------------------------------

d) Da li ste došli u kontakt sa vodom tokom promena?

DA NE

e) Da li ste videli uginule životinje u vodi ili van vode?

NE DA (navesti koje životinje): _____

f) Da li su Vaše životinje došle u kontakt sa vodom iz jezera Vrutci?

NE DA (navesti koje životinje): _____

g) Da li su imale zdravstvene probleme nakon kontakta?

NE DA (navesti koje simptome): _____

5. U poslednje TRI GODINE od navedenih problema imao/la sam (zaokružiti i dopuniti):

- | | |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| a) Iritacije kože (osip, crvenilo) | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| b) Iritacije očiju (suzenje, crvenilo) | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| c) Stomačne tegobe | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| d) Groznica | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| e) Učestale glavobolje | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| f) Probleme sa bubrežima | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| g) Probleme sa jetrom | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| h) Drugo (navesti): | _____ |

6. OD DECEMBRA 2013. od navedenih problema imao/la sam (zaokružiti i dopuniti):

- | | |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| a) Iritacije kože (osip, crvenilo) | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| b) Iritacije očiju (suzenje, crvenilo) | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| c) Stomačne tegobe | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| d) Groznica | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| e) Učestale glavobolje | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| f) Probleme sa bubrežima | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| g) Probleme sa jetrom | ako ste posetili lekara, navesti oboljenja: |
| h) Drugo (navesti): | _____ |

7. Ostali članovi porodice su imali/imaju (zaokružiti i podvući):

- | | | |
|----------------------------------------|-------------------|----------------------|
| a) Iritacije kože (osip, crvenilo) | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| b) Iritacije očiju (suzenje, crvenilo) | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| c) Stomačne tegobe | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| d) Groznica | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| e) Učestale glavobolje | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| f) Probleme sa bubrežima | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| g) Probleme sa jetrom | od decembra 2013. | poslednje tri godine |
| h) Drugo (navesti): | _____ | |

Hvala Vam na učešću

Anketirano je ukupno 320 ispitanika metodom slučajnog uzorka. Anketiranje je sprovedeno na dva načina, pismenim putem kada je upitnik u papirnoj formi podeljen građanima Užica koji se snabdevaju vodovodnom vodom, na ovaj način anketirano je ukupno 100 ispitanika.

Drugi vid anketiranja je bio online preko sajta <http://www.qualtrics.com/>. Odgovarajući link za upitnik je postavljen na društvene mreže koje su se bavile ovom problematikom, a distribuiran je i putem elektronske pošte ispitanicima koji su bili u mogućnosti da odgovore elektronskim putem, što je bio slučaj sa 220 ispitanika. Dobijeni podaci su analizirani po pitanjima i prikazani su tabelarno i grafički.

3.3. Uzorkovanje na terenu

Istraživanje je obuhvatilo različite vodene ekosisteme koji su cvetali tokom izrade doktorata: rezervoar Vrutci, Aleksandrovačko jezero i kompleks ribnjaka u Vojvodini, koji se koriste kao važni vodni resursi za vodosnabdevanje, rekreaciju, navodnjavanje i akvakulturu, iz tog razloga bili su predmet ovih istraživanja.

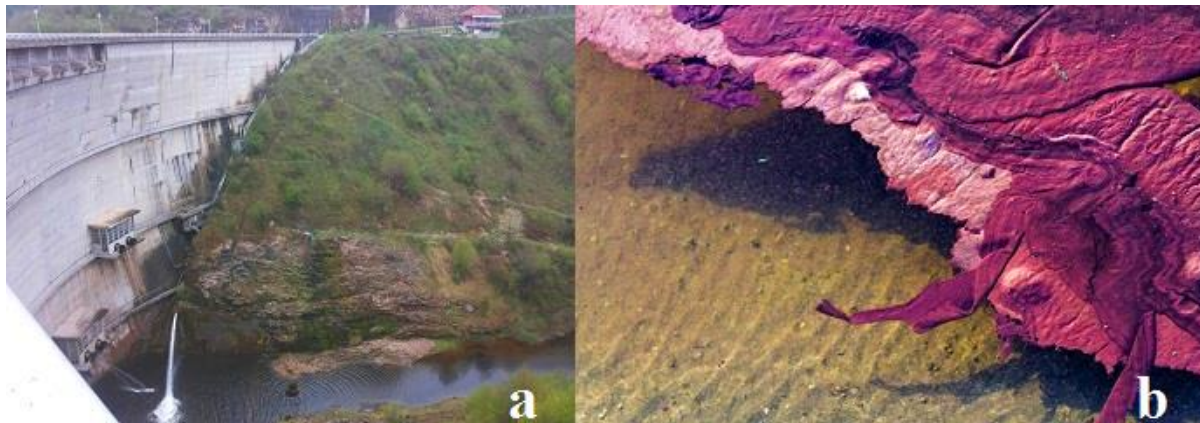
3.3.1. Opis lokaliteta

3.3.1.1. Vrutci

Akumulacija Vrutci ima višestruku namenu: vodosnabdevanje Užica (70 000 stanovnika) i okoline, zaštitu od poplava, zadržavanje nanosa i oplemenjivanje malih voda. U praksi akumulacija Vrutci se koristi i u rekreativne svrhe kao što su sportski ribolov, kupanje u letnjim mesecima, nekontaktna rekreacija i slično. Nekoliko puta vršeno je i poribljavanje akumulacije u cilju upravljanja ribljim fondom u akumulaciji. Na levoj obali akumulacije na samo nekoliko metara od brane, izgrađena je i mini hidroelektrana koja je za pogon koristila vodu iz akumulacije.

Izgradnja brane Vrutci počela je 1977. godine, a zajedno sa akumulacijom i cevovodom sirove vode puštena je u funkciju 1986. godine. Da bi se rešilo pitanje vodosnabdevanja stanovnika i industrije vodom, kao najkvalitetniji i najpouzdaniji izvor vodosnabdevanja prihvaćene su vode reke Đetinje. Brana Vrutci (Slika 5a) izgrađena je na

ulazu u klisuru reke Đetinje, 12 km uzvodno od Užica. Betonska lučna brana je kupolastog tipa, građevinske visine 77 m i dužine u kruni 241 m, a ukupna zapremina akumulacije je 54 miliona m³ (http://www.vodovod-ue.co.rs/?page_id=27).



Slika 5. Akumulacija Vrutci a) Velika brana b) plutajuće formacije *Planktothrix rubescens* (b-Foto: Tijana Jeftić)

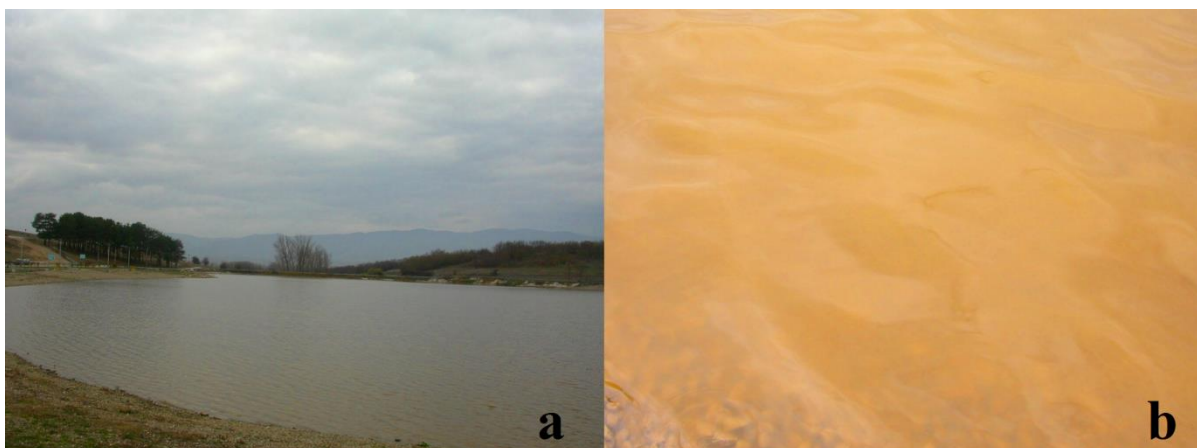
Krajem decembra 2013. godine, na površini akumulacije Vrutci, primećena je mrlja crvene boje, čiji se obim u narednim danima uvećavao, nakon čega je izvršeno ispitivanje. Analiza je obavljena u Institutu za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović Batut”, referentnoj ustanovi za ispitivanje prisustva i determinaciju algi. Dobijeni rezultati su utvrdili prisustvo cijanobakterije *Planktothrix rubescens* u prečišćenoj, dezinfikovanoj vodi sa postrojenja i u vodi iz mreže

(<http://uimenaroda.rs/cache/watermark/15de82f9ff01b65cfac16752419b8a1f.jpg>).

Ova cijanobakterijska vrsta je obojila vodu duž vodenog stuba u tamno purpurno-crvenu (Slika 2b), a takođe je formirala purpurne plutajuće formacije u vidu crvenog tepiha (Slika 5b), koje je vetar naneo u priobalje. S obzirom da je reč o cvetanju potencijalno toksične cijanobakterijske vrste i to u akumulaciji koja se koristi za vodosnabdevanje, pa i razne rekreativne aktivnosti (kupanje, boravak pored vode, pećanje, i sl.), na ovom lokalitetu je obavljeno uzorkovanje jezerske vode, cijanobakterijske biomase i ribe u cilju ispitivanja prisustva cijanotoksina.

3.3.1.2. Aleksandrovačko jezero

Aleksandrovačko jezero (Slika 6a) je veštačka akumulacija, koja se nalazi oko osam kilometara jugozapadno od Vranja, u ataru sela Aleksandrovac, Kupinince i Donje Trebešinje. Aleksandrovačko jezero je rezervoar površine 120 000 m², izgrađen za potrebe navodnjavanja na reci Aleksandrovac 1964. godine. Tokom vremena, povećanje aktivnosti i priliv hranljivih materija u slivu su doveli do intenzivne eutrofizacije. To je pre svega posledica priliva hranljivih materija iz sliva, relativno male dubine jezera, kao i prirodnih faktora i klimatskih karakteristika. Na početku 21. veka, Aleksandrovačko jezero je već bilo eutrofno i u gotovo anaerobnim uslovima (Svirčev i sar., submitirano).



Slika 6. a) Aleksandrovačko jezero (Svirčev i sar., submitirano)

b) cvetanje *Cylindrospermopsis raciborskii* (Svirčev i sar., submitirano)

Dva masovna pomora ribe su se desila 2008. godine sa posledičnim gubitkom preko 3 000 kg ribe (<http://www.politika.rs/rubrike/Srbija/Uginulo-dve-tone-ribe.lt.html>). Ubrzana eutrofizacija jezera primorala je na napore u cilju poboljšanja kvaliteta vode i jezero je ispražnjeno do kraja 2009., a u proleće 2010. je počeo program obnove, kada su uklonjeni mulj i makrofitska vegetacija. Jezero je ponovo napunjeno, a zatim se koristilo za turizam i rekreaciju tokom leta 2010. godine (Svirčev i sar., submitirano).

Međutim, 20. decembra 2012. ponovo je došlo do masovnog pomora ribe. Lokalni stanovnici su prijavili zastrašujuću scenu o hiljadama mrtvih riba koje su plutale na vodi (Slika 23). Gotovo cela riblja populacija je izgubljena (više od 1,7 tona), uključujući: Šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*), amura (*Ctenopharyngodon idella*), tolstolobika (*Hypophthalmichthys molitrix*), deverike (*Abramis brama*), babuške (*Carassius gibelio*), bucova (*Aspius aspius*) i klena (*Squalius cephalus*). Nekoliko nedelja pre incidenta,

registrovano je cvatanje cijanobakterijske vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* koja je dala žuto/braon boju vodi (Slika 6b). Osim toga, led se formirao na površini jezera neposredno pre uginuća ribe.

Predstavnici Instituta „Jaroslav Černi“ izvršili su fizičko-hemijske, biološke i ekotoksikološke analize uzoraka iz jezera. Međutim nisu uočene značajne vrednosti koje mogu da ukažu na uzrok(e) ovog masovnog pomora ribe (Svirčev i sar., submitirano). Do pomora riba može da dovede širok spektar uzročnih faktora, uključujući prisustvo cijanobakterija i njihovih toksičnih metabolita i zbog toga je na ovom lokalitetu obavljeno uzorkovanje vode.

3.3.1.3. Kompleks ribnjaka u Vojvodini

Nazivi ribnjaka na kojima su sprovedene analize se iz komercijalnih razloga i zaštite vlasnika neće javno iznositi. Ispitivani ribnjaci se snabdevaju vodom iz podzemnih voda. Vodni režim se kontroliše na osnovu nivoa vode u obližnjim rekama. Temperatura vode ribnjaka tokom ispitivanog perioda kretala se od 12 do 31°C (Svetska banka izveštaj DM 4307 2011).

Pojava cvetanja cijanobakterija u kompleksu ribnjaka (Slika 7) primećena je tokom maja, juna, jula, avgusta i septembra 2011. godine, tako da je uzorkovanje vode sprovedeno u toku leta 2011. godine. Nakon skrininga i određivanja cvetajućih ribnjaka uzorkovana je i riba, radi detekcije prisustva i akumulacije mikrocistina u mišićnom tkivu ribe, kao i njihovih negativnih efekata na tkivo ribe.



Slika 7. Cvetanje cijanobakterija u ispitivanim ribnjacima Vojvodine

3.3.2. Uzorkovanje vode

Vodeni uzorci iz svih istraživanih vodenih ekosistema su uzimani standardnom metodom uzorkovanja vode adekvatnim sterilnim priborom. Uzorci vode su sakupljeni u plastične flaše (1,5 L) sterilisane UV zračenjem, sa obale 13 ribnjaka, Aleksandrovačkog jezera i rezervoara Vrutci. U akumulaciji Vrutci je sakupljena i cijanobakterijska biomasa, a uzorkovanje vode je vršeno na centru na dubinama 4 m, 10 m i 14 m. Svi uzorci su u relativno kratkom vremenskom periodu transportovani i čuvani na niskoj temperaturi (4°C) do dalje obrade i analize.

Uzorci za analize fitoplanktona (kvantitativnu i kvalitativnu analizu cijanobakterija) su prikupljeni sa sredine ribnjaka Ruttner-ovom bocom zapremine 1 L, tako što su boce punjene vodom na 30 cm od površine vode. Uzorci su odloženi u falkone od 100 mL i fiksirani 4 % formaldehidom.

3.3.3. Uzorkovanje mesa ribe

Uzorkovanje ribe je sprovedeno u deset ribnjaka (kompleks ribnjaka u Vojvodini) nakon pojave cvetanja cijanobakterija. Kao kontrola uzorkovane su jedinke iz ribnjaka koji nisu bili zahvaćeni cvetanjem. Pojedinačni ribnjaci iz kojih je uzorkovana riba nisu naznačeni zbog tehnoloških postupaka pri gajenju ribe, koja se premešta kroz ribnjake. Iz ribnjaka metodom slučajnog uzorka uzeto je prosečno po 5 primerka omnivornog maloljuskavog šarana (*Cyprinus carpio*). Nakon žrtvovanja, izmereni su i zabeleženi osnovni podaci za svaku jedinku (težina, totalna dužina i standardna dužina ribe).

Od svake jedinke uzorkovano je mišićno tkivo koje je pulovano, liofilizirano ("CHRIST ALPHA 2-4 LD plus", Nemačka) i čuvano za dalju pripremu i analizu akumulacije cijanotoksina. Uzorkovana su i tkiva iz različitih organa svake ribe (jetre, bubrega, škrge, creva i mišića) u cilju procene histopatoloških efekata cijanotoksina, pri čemu su tkiva fiksirana u 4 % formalinu.

Uzorkovanje ribe sprovedeno je i u jezeru Vrutci. Ribe su dobijene od ribara koji su ribu pecali tokom oktobra 2013. (mišićno tkivo šest jedinki čuvano u zamrzivaču) i aprila 2014. godine (dva uzorkovanja po tri ribe-zajedno pulovano meso i iznutrice). Uzorak se sastojao od tri vrste riba: deverika (*Abramis brama*), bodorka (*Rutilus rutilus*) i zeka (*Alburnus alburnus*). Ribe su čuvane u zamrzivaču, a njihova tkiva su kasnije liofilizirana ("CHRIST ALPHA 2-4 LD plus", Nemačka).

3.4. Eksperimentalno zalivanje biljaka kontaminiranom vodom

U cilju procene potencijalne akumulacije mikrocistina u biljkama sproveden je eksperiment u kontrolisanim uslovima (temperatura 25°C, 60-70 % relativne vlažnosti, 16 h fotoperioda) u tri ponavljanja na tri biljke ljute papričice (*Capsicum annuum*) koje su imale formirane plodove (Slika 8). Tokom tri meseca zalivanje je vršeno sa razblaženim ekstraktom mikrocistisa, pripremljenim od kulture soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 iz Pasterove kolekcije kultura (Pasteur Culture Collection) iz Pariza. Kultura je tretirana sonikacijom (10 min u ciklusima od 30 sek) i uzastopnim procesom odmrzavanja/zamrzavanja, u cilju lize ćelije i oslobađanja ćelijskog sadržaja uključujući intraćelijske cijanotoksine. Procenjeno je da je dobijeni ekstrakt sadržao MC-LR 245 µg/L (LC-MS).

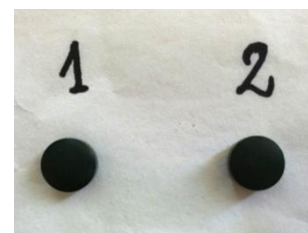
Ovako tretirana kultura u količini od 20 mL (ukupno 580 mL kulture) je pomešana sa 20 mL odstajale dehlorisane vodovodne vode i korištena za zalivanje eksperimentalnih biljaka dva puta nedeljno (14 nedelja). Kontrolna biljka je zalivana isključivo sa 40 mL odstajale dehlorisane vodovodne vode 14 nedelja. Na kraju eksperimenta, nakon više od tri meseci zalivanja, radi utvrđivanja akumulacije mikrocistina, ubrani su listovi i plodovi iz kojh su izvađena semena. Delovi paprike su usitnjeni, liofilizirani ("CHRIST ALPHA 2-4 LD plus", Nemačka) i čuvani za analize.



Slika 8. Kontrolna i eksperimentalna biljka

3.5. Odabir suplemenata na bazi cijanobakterija

Na našem tržištu postoji veliki broj suplemenata u ishrani i preparata pravljenih na bazi cijanobakterija. Najčešće su to suplementi koji se mogu kupiti u apotekama, drogerijama, prodavnicama zdrave hrane ili naručiti putem interneta. Dva popularna proizvoda sa našeg tržišta su kupljena u apoteci i ovlašćenoj prodavnici ovih preparata. Suplementi u formi tableta (Slika 9) su samleveni do praha i dalje pripremljeni (objašnjeno u delu priprema uzorka) za analize u cilju procene potencijalnog prisustva mikrocistina.



Slika 9. Dva testirana suplementa u vidu tableta

3.6. Sprovedene analize na sakupljenim uzorcima

3.6.1. Analiza cijanobakterijskog fitoplanktona

Cijanobakterijski fitoplankton je analiziran u vodama ribnjaka. Uzorci su razblaženi prilikom stavljanja u komoricu od pleksiglasa da bi mogli da se broje, korišćenjem UTERMOHL-ovog metoda (1958) pomoću invertnog mikroskopa Leica DML. Posmatranje je vršeno mikroskopom Karl Zeiss Imager M1 pod uveličanjem od 400, 800 i 1 000 puta, a snimanje je vršeno digitalnom kamerom AxioCam MRc5.

Identifikacija vrsta izvršena je prema standardnim ključevima za identifikaciju fitoplanktona: Huber-Pestalozzi (1983), Krammer i Lange-Bertalot (1986; 1988; 1991) Komárek i Anagnostidis (1998; 2005). Brojnost cijanobakterija je izražena kao broj ćelija/mL. Obrada uzorkovanog materijala izvršena je u cilju realizacije projekta Svetske banke (DM 4307 2011).

3.6.2. Metoda određivanja koncentracije hlorofila *a*

3.6.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci vode iz ribnjaka su u cilju utvrđivanja koncentracije hlorofila *a* koncentrovani filtriranjem 500 mL vode kroz membranski filter 0,45 μm (Sartorius). Filteri su umotani i stavljeni u epruvete sa čepom, u koje je dodato 10 mL 90 % acetona i ostavljeni su preko noći na 4°C u mraku radi ekstrakcije hlorofila. Ekstrakti su centrifugirani na 3 000 obrtaja/min tokom 15 min. U dobijenom supernatantu spektrofotometrijski je izmerena koncentracija hlorofila *a* (APHA, 1995).

*3.6.2.2. Postupak određivanja koncentracije hlorofila *a**

Očitavanje optičke gustine vršeno je na spektrofotometru "Beckman 25" u kiveti od 1 cm sa 3 mL ekstrakta (OD na 750 nm i 664 nm), zatim je ekstrakt zakišeljjen sa 0,1 N HCl i nakon 90 sekundi očitana je optička gustina na 750 nm i na 665 nm. Koncentracija hlorofila *a* je izračunata po formuli:

$$\text{Hlorofil } a \text{ (mg/m}^3\text{)} = (26,7 \times ((664 - 750) \text{ pre} - (665 - 750) \text{ posle}) \times V1) / V2 \times L$$

26,7 = korekcija apsorbance koja zavisi od apsorpcionog koeficijenta hlorofila *a* na 664 nm

664 pre i 665 posle = optička gustina ekstrakta pre i posle zakišeljavanja

750 = optička gustina za zamućenje

V1= zapremina ekstrakta, l

V2= zapremina uzorka, m³

L = širina kivete spektrofotometra (u cm)

Kao slepa proba korišćen je 90 % rastvor acetona (90 delova acetona i 10 delova zasićenog rastvora MgCO₃).

Merenja su vršena u dva ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tih merenja.

Na osnovu dobijenih vrednosti određen je stepen trofičnosti ribnjaka na osnovu kategorizacija po Felfoldy (1980) (Tabela 8).

Tabela 8. Trofički status vode na osnovu koncentracije hlorofila *a* po Felfoldy (1980)

Trofički status (Felfoldy, 1980)	Koncentracija hlorofila <i>a</i> (mg/m³)
Atrofična	0
Ultra-oligotrofna	<1
Oligotrofna	1-3
Oligo-mezotrofna	3-10
Mezotrofna	10-20
Mezo-eutrofna	20-50
Eutrofna	50-100
Eu-politrofna	100-200
Politrofna	200-800
Hipertrofna	>800

Analize su rađene na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

3.6.3. *Artemia salina* bioesej

U cilju detekcije toksičnosti (ukupne, intracelularne i/ili ekstracelularne) uzoraka biomase i vode iz rezervoara Vrutci kao i vodovodne vode grada Užica, primenjen je bioesej sa vrstom račića *Artemia salina*.

3.6.3.1. Priprema uzoraka

Uzorci iz jezera Vrutci su pripremljeni za detekciju ukupne toksičnosti vode, kao i intracelularnog i ekstracelularnog sadržaja biomase. U uzorcima vode sa različitih dubina jezera i vodovodne vode određena je ukupna toksičnost bez ekstrakcije. Toksičnost biomase je testirana na tri načina, ekstracelularno, intracelularno i u uzorku biomase tretirane sonikacijom i odmrzavanjem/zamrzavanjem, pa centrifugiranjem.

Biomasa sakupljena iz jezerske vode (10 mL) je filtrirana i ekstracelularni deo (filtrat) je prikupljen za bioesej radi testiranja ekstracelularne toksičnosti. Filteri poroziteta 0,45 µm (Sartorius) sa koncentrovanim cijanobakterijskim ćelijama (intracelularni deo) su osušeni na 40°C preko noći (vlažna biomasa je iznosila 1,1382 g; a suva 0,2622 g). Sledećeg dana osušeni filteri su isečeni i prekriveni sa 3 mL 75 % metanola radi ekstrakcije cijanotoksina tokom 24 h. Da bi se biološki aktivne materije oslobodile iz ćelija vršeno je razaranje ćelijskog zida postupkom sonikacije (10 min u ciklusima 30 sek/30 sek) na sonikatoru 250 Branson. Uzorak je potom homogenizovan mešanjem, nakon čega je usledilo centrifugiranje na 5 000 obrtaja/min u trajanju od 15 min (Multi-Spin MSC 6000). U dobijenim supernatantima ispitivana je intracelularna toksičnost (Šema 2).

3.6.3.2. Postupak bioeseja *A. salina*

Priprema biotesta počinje inkubacijom jaja larvi *A. salina* u slanoj vodi, dodavanjem 2 g jaja račića sa mešavinom hranljivih soli (Artemia-mix Sera, Nemačka) u 200 mL mlake vodovodne vode. Nakon perioda inkubacije od oko 30 h u uslovima aeracije i osvetljenosti na temperaturi od 30°C, izlegle larve račića su se koristile za detekciju toksičnosti pripremljenih uzoraka (Kiviranta i sar., 1991).

Bioesej *A. salina* je izvođen u mikrotitar pločama od 96 vela, koje su prethodno sterilisane UV zračenjem i dobro isprane destilovanom vodom. Zatim je u tri ponavljanja aplicirano po 100, 75, 50 i 25 μL intracelularnog uzorka. Mikrotitar ploča sa uzorcima je ostavljena na uparavanje metanola na 30°C, tokom 24 h.

Sledećeg dana 50 μL ekstracelularnog uzorka i netretiranih uzoraka vode dozirano je u velove mikrotitar ploče (bez uparavanja), a potom je u sve uzorke dodato još 100 μL medijuma slane vode (eng. "artificial seawater" ASW) sa 10-20 račića, a u velove sa uparenim ekstraktom dodato je i još 100 μL samog medijuma slane vode. Mikrotitar ploče su potom stavljene u uslove osvetljenosti na 30°C u termostat. Način pripreme uzoraka i sam postupak bioeseja je prikazan na Šemi 2.

Određivanje mortaliteta i brojanje mrtvih račića je vršeno nakon 24 h i 48 h od momenta postavljanja eksperimenta. Nakon 24 h pomoću lupe brojane su uginule jedinke u svakom velu, a zatim je mikrotitar ploča vraćena na inkubaciju. Drugo brojanje se vršilo nakon 48 h i zatim su sve preživjele jedinke usmrćene dodavanjem 100 μL 100 % metanola u svaki vel, posle 15 min izbrojan je ukupan broj račića po velu.

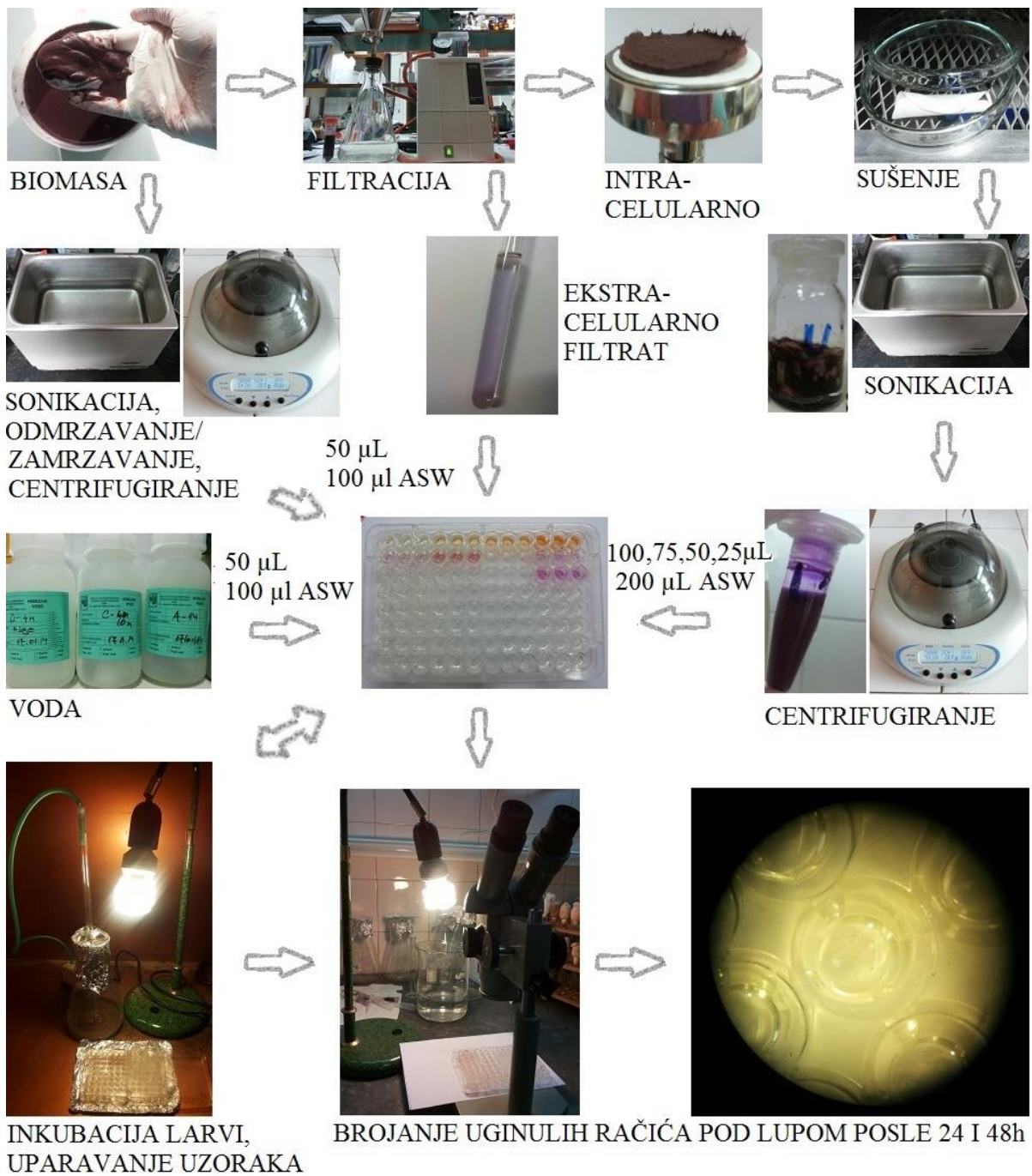
Kao kontrola korišćen je sam medijum slane vode sa račićima (bez uzoraka), kao i 75 % uparen metanol u medijumu sa račićima (radi eliminacije uticaja ekstrakcionog sredstva na test jedinke).

Svaki test je napravljen u triplikatu, pa je izračunata njihova srednja vrednost, a toksičnost je izražena kao procenat mrtvih larvi u uzorcima umanjen za smrtnost račića u kontroli.

Nivo toksičnosti uzoraka 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 %)
- Nizak mortalitet (mortalitet ispod 50 %)

Analize su rađene na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.



Šema 2: Priprema uzoraka i postupak bioeseja *A. salina*

3.6.4. Enzimski imuno-vezujući test

Analiza prisustva cijanotoksina mikrocistina, nodularina i saksitoksina u uzorcima vode ribnjaka vršena je enzimskim imuno-vezujućim testom (eng. “enzyme-linked immunosorbent assay” ELISA). Prisustvo cijanotoksina je analizirano pomoću dva ELISA kita: mikrocistin-ADDA i saksitoksin. Abraxis Mikrocistin-ADDA ELISA (Mikrocistin/Nodularin ADDA ELISA, Abraxis LLC, Pennsylvania, SAD) je imunoesej za kvantitativno otkrivanje mikrocistina i nodularina nezavisno od kongenera. Saksitoksin ELISA (Saxitoxin (PSP) ELISA, Abraxis LLC, Pennsylvania, SAD) je imunoesej za kvantitativnu detekciju saksitoksina. Prema proizvođaču kita, granice detekcije za mikrocistin-ADDA ELISA test na osnovu MC-LR, su 0,10 i 5 ppb ($\mu\text{g/L}$), a granice detekcije za saksitoksin su 0,015 i 0,4 $\mu\text{g/L}$.

3.6.4.1. Priprema uzoraka

Ovi kitovi su dizajnirani u svrhe skrininga cijanotoksina i nije potrebna posebna priprema uzoraka vode, samo procedura za osiguravanje lize ćelija ukoliko su one prisutne u uzorku vode. Kako bi se obezbedila ćelijska razgradnja i oslobađanje unutarćelijskog sadržaja uključujući potencijalno prisutne cijanotoksine, uzorci vode su nekoliko puta uzastopno zamrzavani i odmrzavani, a zatim je vršena sonikacija 10 min u ciklusima 30 sek/30 sek (sonikator 250 Branson). Uzorak je potom centrifugiran 15 min na 5 000 obrtaja/min (Multi-Spin MSC 6000). Dobijeni supernatant je korišćen u dva ELISA testa u cilju skrininga prisustva cijanotoksina mikrocistina, nodularina i saksitoksina. Priprema uzoraka za ELISA test je vršena na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

3.6.4.2. Postupak ELISA testa za detekciju mikrocistina i nodularina

- a) Odmereno je 50 μL standarda, kontrole i uzorka u velove mikrotitar ploče na osnovu protokola.
- b) Dodato je 50 μL rastvora antitela u svaki vel pomoću multikanalne pipete. Velovi su prekriveni i sadržaj velova je pažljivo promešan kružnim pomeranjem ploče po podlozi 30 sek. Inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 90 min.

- c) Nakon inkubacije prosut je sadržaj mikrotitar ploče. Svaki vel je ispiran tri puta sa po 250 μL pufera za ispiranje (pufer za ispiranje je koncentrovan i treba se razblažiti dejonizovanom 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.
- d) Dodato je 100 μL konjugata enzima u svaki vel pomoću multikanalne pipete. Sadržaj prekrivenih velova je promešan na već objašnjen način. Inkubacija na sobnoj temperaturi 30 min.
- e) Nakon inkubacije prosut je sadržaj mikrotitar ploče. Svaki vel je ispiran tri puta sa po 250 μL pufera za ispiranje i ostatak rastvora je uklonjen tapkanjem ploče po papirnim ubrusima.
- f) Dodato je 100 μL rastvora u boji u svaki vel pomoću multikanalne pipete. Inkubacija na sobnoj temperaturi u mraku 20-30 min.
- g) Dodato 50 μL stop rastvora u svaki vel istim redosledom pomoću multikanalne pipete (Slika 10).
- h) Očitavanje absorbance je vršeno na 450 nm pomoću ELISA čitača (Asys Expert Plus UV Microplate Reader, Biochrom, UK; Software: Kim Immunochemical Processing).



Slika 10. Izvođenje poslednje faze u proceduri ELISA testa

Indirektna kompetitivna ELISA se bazira na prepoznavanju mikrocistina, nodularina i njihovih kongenera od strane specifičnih antitela (a, b). Ovi cijanotoksini prisutni u uzorku se takmiče sa analognim mikrocistin-proteinima imobilizovanim na ploči, za vezivanje sa antitelima u rastvoru. Nakon ispiranja (c) se dodaje sekundarno obeleženo antitelo (d). Ponovo, nakon ispiranja (e) i dodavanja rastvora substrata stvara se signal u boji (f). Intenzitet plave boje je inverzno proporcionalan koncentraciji mikrocistina ili nodularina u uzorku. Nakon prekida reakcije (g) boja se procenjuje pomoću ELISA čitača (h).

3.6.4.3. Postupak ELISA testa za detekciju saksitoksina

- a) Dodato je 50 μ L standarda i uzorka u velove mikrotitar ploče.
- b) Dodato je 50 μ L konjugata enzima u svaki vel pomoću multikanalne pipete.
- c) Dodato je 50 μ L rastvora antitela u svaki vel pomoću multikanalne pipete. Velovi su prekriveni i njihov sadržaj je promešan na već objašnjen način. Inkubacija na sobnoj temperaturi 30 min.
- d) Svaki vel je ispiran četiri puta sa po 300 μ L pufera za ispiranje i ostatak rastvora je uklonjen tapkanjem ploče.
- e) Dodato je 100 μ L rastvora substrata u velove. Inkubacija na sobnoj temperaturi u mraku 30 min.
- f) Dodato je 100 μ L stop rastvora u svaki vel istim redosledom pomoću multikanalne pipete.
- g) U roku od 15 min absorbanca je očitana na 450 nm pomoću ELISA čitača (Asys Expert Plus UV Microplate Reader, Biochrom, UK; Software: Kim Immunochemical Processing).

Direktna kompetitivna ELISA se bazira na prepoznavanju saksitoksina od strane specifičnih antitela. Ovaj cijanotoksin se takmiči sa saksitoksin konjugatom enzima za vezivanje sa anti-saksitoksin antitelima u rastvoru. Saksitoksin antitela se vezuju zatim za drugo antitelo imobilizovano na ploči (a,b,c). Nakon ispiranja (d) i dodavanja rastvora substrata proizvodi se signal u boji (e). Intenzitet plave boje je inverzno proporcionalan sa koncentracijom saksitoksina u uzorku. Nakon prekidanja reakcije (f) boja se procenjuje pomoću ELISA čitača (g). Koncentracije u uzorcima se određuju pomoću standardne krive.

ELISA test je urađen na Veterinarskom Institutu "Novi Sad" u Novom Sadu.

3.6.5. Tečna hromatografija visokih performansi i tečna hromatografija-masena spektrometrija

Tečna hromatografija visokih performansi (eng. "High-performance liquid chromatography" HPLC) i tečna hromatografija-masena spektrometrija (eng. "Liquid chromatography-mass spectrometry" LC-MS) su analitičke hemijske metode za kvantitativnu i kvalitativnu detekciju određenih cijanotoksina u uzorcima vode, biomase, suplemenata, biljnih i ribljih tkiva.

3.6.5.1. Priprema uzoraka

Uzorci **vode** iz Aleksandrovačkog jezera su tretirani ultrasonikator sondom i filtracijom. Uzorak zapremine 4 mL je uparen u struji azota na 50°C. Suvi ostatak je resuspendovan u 200 µL vode i isčišćen filtriranjem. Uzorci su analizirani na HPLC-DAD i LC-MS/MS u cilju detekcije cijanotoksina mikrocistina (Spoof i sar., 2003; Hautala i sar., 2012) i cilindropermopsina (Spoof i sar., 2006; Kokocinski i sar., 2013). Za detekciju saksitoksina uzorci vode su odmrzavani i zamrzavani, pa razblaženi u 1 mL 80 % acetonitrila koji sadrži 0,1 % mravlje kiseline. Ekstrakti su zatim sonifikovani (15 min u sonikatoru i jedan min sa sonikator sondom-Bandelin Sonopuls HD 2070), centrifugirani (10 min na 10 000 obrtaja/min), filtrirani (špric filter 0,2 µm GHP Acrodisc 13 mm) i potom ostavljeni u zamrzivač (-20°C), gde je došlo do razdvajanja gornjeg sloja (prvenstveno acetonitril koji se odbacuje) i donjeg sloja (prvenstveno voda) koji je testiran na rastvorene saksitoksine (Sayfritz i sar., 2008) pomoću tečne hromatografije visokih performansi sa građenjem jonskih parova, sa postkolonskom oksidacijom i fluorescentnom detekcijom (HPLC-FLD) (Oshima, 1995, Diener i sar., 2006, van de Riet i sar., 2011). Priprema uzoraka vode Aleksandrovačkog jezera i analize cijanotoksina su izvršene na Katedri za biohemiju, Biosciences/Åbo Akademi Univerziteta u Finskoj.

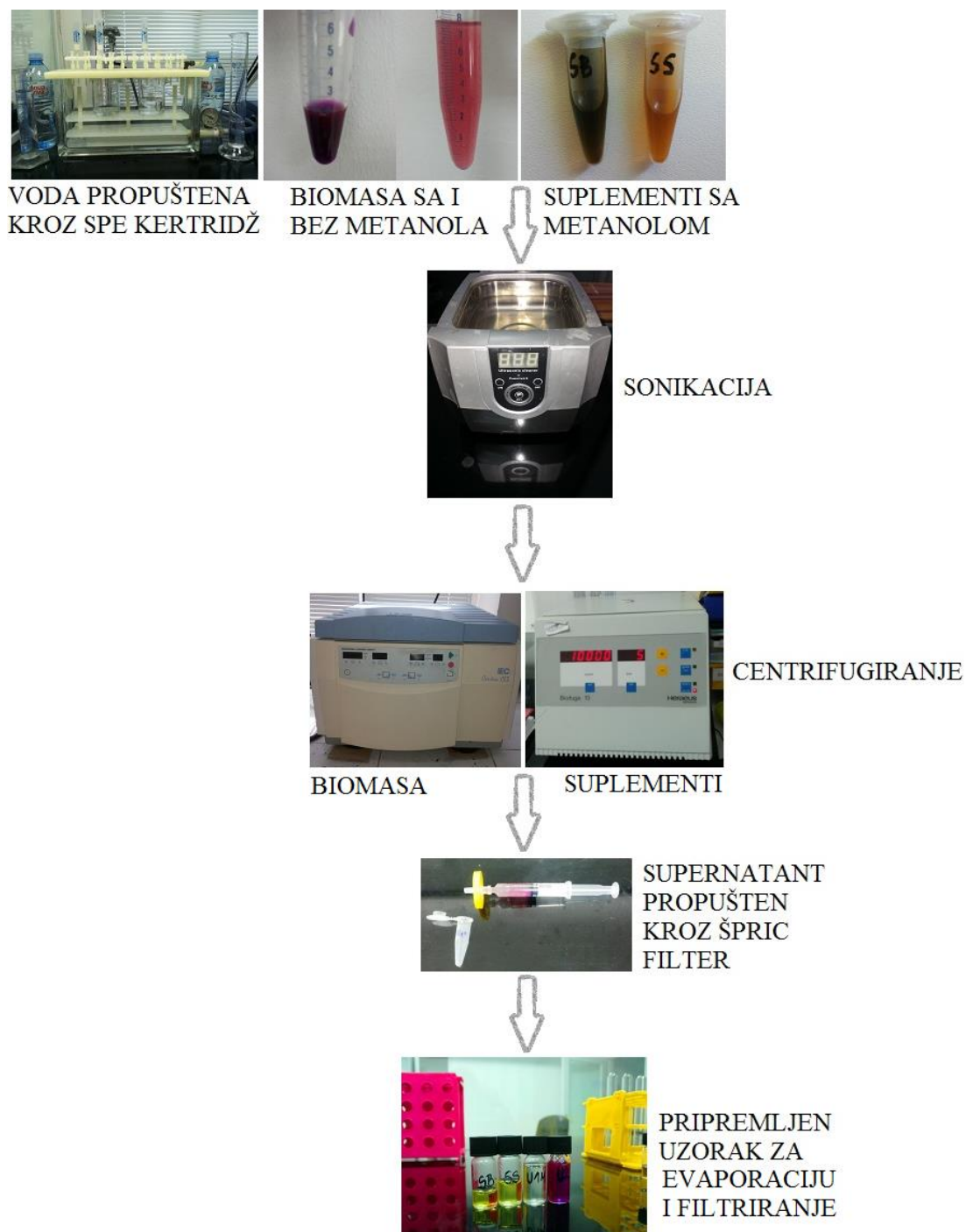
Analiza vode iz jezera Vrutci kao i vodovodne vode iz Užica, su rađene u referentnoj Laboratoriji Nacionalnog centra za naučne analize "Demokritos", Atina, Grčka. Metod koji se koristio u ovoj analizi je rađen po standardu Internacionalne Organizacije za Standardizaciju (ISO 20179-Kvalitet vode-Određivanje cijanotoksina-Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (solid-phase extraction SPE) i tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) sa ultraljubičastom (UV) detekcijom).

Priprema uzoraka vode je vršena filtriranjem (0,45 μm) i koncentrovanjem pomoću SPE kertridža (HLB Oasis 6cc 200 mg):

- Kondicioniranje sa 6 mL 100 % metanola (MeOH)
- Propuštanje uzorka kroz kertridž
- Ispiranje kertridža sa 4 mL 20 % metanola/H₂O 20/80
- Sušenje kertridža 10 min
- Ispiranje kertridža sa 6 mL metanola (0,1 % mravlje kiseline u metanolu)
- Sakupljanje eluenta
- Uparavanje eluenta u struji azota na 40°C
- Rastvaranje u 20 % metanola/H₂O
- Filtriranje kroz špic filter (Millex PVDF Durapore-GF 13 mm 0,22 μm)

Biomasa iz rezervoara Vrutci je pripremljena tako što su uzeta dva uzorka od po 2 mL, a u jedan od uzoraka je dodato 6 mL metanola. Uzorci su sonifikovani 10 min (Ultrazvučno kupatilo High Powered Ultrasonic Cleaner, Sper Scientific 100004), a zatim centrifugirani na 3 000 obrtaja/min u trajanju od 15 min (IEC Centra CL3). Supernatant je pomoću šprica propušten kroz filter (Membrane Solutions najlonski filter za špic prečnika 25 mm, 0,22 μm) (Šema 3). Sakupljeni eluent je uparen u struji azota na 40°C i zatim je suvi ostatak rastvoren u 20 % metanolu. Na kraju je izvršena špic filtracija dobijenog rastvora. Uzet je 1 mL pripremljenog uzorka za LC-MS/MS analizu koja je rađena u Laboratoriji Anahem, Beograd.

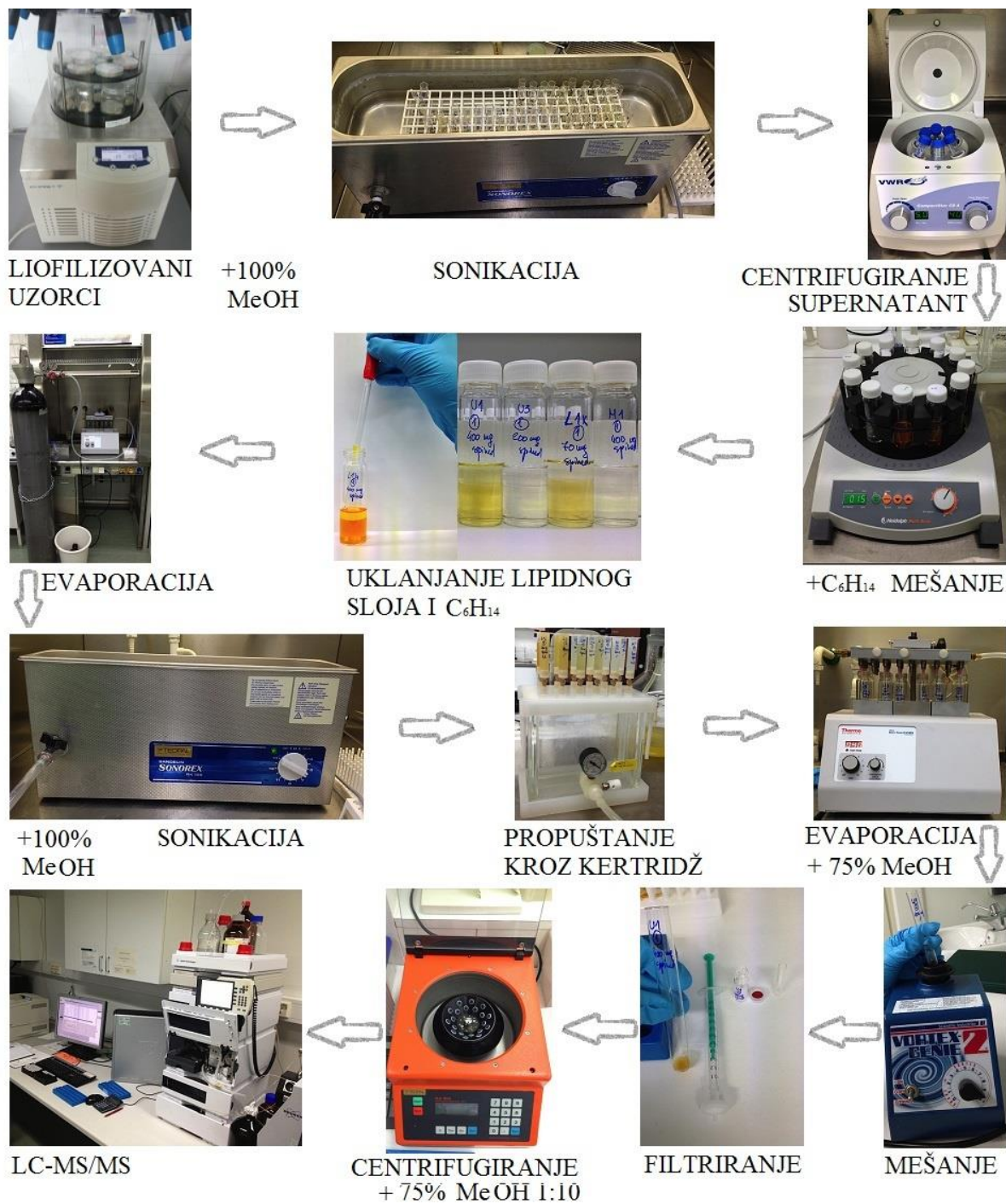
Slično su pripremljeni **suplementi** na bazi spiruline. Uzeto je po pet tableta iz oba pakovanja i izmrvljeno, a od toga je korišćeno 10 mg uzorka u koje je dodat 1 mL 75 % metanola. Izvršena je sonikacija (10 min), pa centrifugiranje 10 000 obrtaja/min 5 min (Heraeus Biofuge 13 Sepatech), a supernatant je pomoću šprica propušten kroz filter (Membrane Solutions najlonski filter za špic prečnika 25 mm, 0,22 μm) (Šema 3). Zatim je sprovedena evaporacija i filtracija. Uzet je 1 mL dobijenog uzorka za LC-MS/MS analizu koja je rađena u Laboratoriji Anahem Beograd.



Šema 3. Priprema uzoraka vode, biomase i suplemenata za LC-MS/MS

Priprema liofilizovanog **tkiva** (mesa i čitave **ribe**, listova i plodova **biljke**) vršena je prema sledećoj proceduri (Šema 4):

- Na 100-500 mg tkiva dodato je 3 mL 100 % metanola
- Sonikacija je vršena četiri puta 30 min (Sonorex Bandelin RK 156)
- Centrifugiranje 10 min na 6000 obrtaja/min (CompactStar CS4 VWR)
- Sakupljanje supernatanta
- Dodavanje 6 mL heksana u uzorak radi ekstrakcije lipida
- Mešanje uzoraka 15 min na šejkeru (Heidolph multi reax)
- Uklanjanje lipidnog sloja i heksana staklenom pasterovom pipetom
- Evaporacija uzorka
- Dodavanje 5 mL 10 % metanola
- Sonikacija 15 min
- Propuštanje kroz kertridž (OASIS HLB Cartridge, 200 mg)
 - aktivacija sa 100 % metanolom i MQ Water
 - propuštanje uzorka kap po kap
 - ispiranje sa MQ Water
 - sušenje 2 min
 - ispiranje sa 3 mL 100 % metanola
 - sakupljanje eluenta
- Evaporacija eluenta
- Rastvaranje sa 200 µL 75 % metanola
- Mešanje na vorteksu (VORTEX genie 2 Scientific Industries) 30 sek do 1 min
- Prebacivanje uzoraka pasterovom pipetom u špriceve sa filterom (0,2 µm GHP ACRODISC 13 PALL)
- Filtriranje uzoraka u inserte
- Centrifugiranje 10 min na 10 000 obrtaja/min (Ole Dich instrumentmakers ApS)
- Razblaživanje sa 75 % metanolom u odnosu 1:10
- Prebacivanje 100 µL uzorka u vial za LC-MS/MS koji je rađen na Katedri za biohemiju, Biosciences/Åbo Akademi Univerziteta u Finskoj



Šema 4. Priprema uzoraka tkiva ribe i biljke za LC-MS/MS

U cilju provere metode na samom početku vršeno je kontrolno prskanje svakog uzorka sa toksinima poznate koncentracije i njihova dalja priprema je tekla na isti prethodno naveden način. Naime, ovaj korak je bitan za interpretaciju i validaciju rezultata, odnosno za procenu povezanosti signala i koncentracije. U prirodnim uzorcima je potrebno ispitati efekat matriksa i proceniti *recovery* (istinitost) nakon 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. U ovom slučaju dobijene vrednosti su bile očekivane, a navedene su u rezultatima.

3.6.5.2. Postupak

Za identifikaciju i kvantifikaciju mikrocistina MC-LR, MC-RR, MC-YR i njihovih demetilovanih strukturnih varijanti u vodi, biomasi i suplementima u Laboratoriji Anahem u Beogradu, korišćen je Thermo Surveyor tečni hromatograf sa detektorom Thermo Finnigan Quantum triplequadropole (QqQ) tandem-masenim spektrometrom (Slika 11). LC-MS/MS (Liquid chromatography tandem mass spectrometry, tj. Tečna hromatografija sa tandemnom



masenom (masenom-masenom) spektrometrijom) se sastoji od kvaternerne pumpe, autosemplera i termostatirane kolone održavane na 40°C. Za identifikaciju i kvantifikaciju traženih mikrocistina se koristio Xcalibur 2.0.7. softver. Za odvajanje mikrocistina se koristila reverzno-fazna kolona (Phenomenex Synergy Fusion RP C18), dimenzija 50 mm x 2 mm (unutrašnji prečnik), sa predkolonom Phenomenex C8, dimenzija 4 mm x 2 mm (unutrašnji prečnik). Mobilnu fazu su činili 0,1 % rastvor mravlje kiseline (MQ Water-ultračista voda) (rastvarač A) i 0,1 % rastvor mravlje kiseline u acetonitrilu (rastvarač B).

Slika 11. Tečni hromatograf, Laboratorija Anahem u Beogradu

Instrument na Katedri za biohemiju, Biosciences/Åbo Akademi Univerziteta u Finskoj se sastoji od tečnog hromatografa Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies) kuplovanog sa masenim spektrometrom sa elektrosprej-jonizacijom i trostrukim kvadrupolom Agilent 6460 (Agilent Technologies). Za razdvajanje je korišćena Ascentis C18 kolona (Supelco, Bellefonte, PA, USA) dimenzija 50 mm × 3 mm I.D. sa 3 µm česticama, zaštićena C8 kolonom 4 mm × 2 mm, i temperirana 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 je bio 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 dm-MC-YR i MC-YR, 40 V za dm-MC-RR i MC-RR, i 60 V za preostale varijante mikrocistina. Joni prekursori dati su u Tabeli 9:

Tabela 9. Joni prekursori za tražene mikrocistine

Jon	m/z
[dm-MC-RR+2H] ²⁺	512,8
[dmMC-YR+2H] ²⁺	516,3
[MC-RR+2H] ²⁺	519,8
[MC-YR+2H] ²⁺	523,3
[dmMC-LR+H] ⁺	981,5
[MC-LF+H] ⁺	986,5
[MC-LR+H] ⁺	995,5
[MC-LY+H] ⁺	1002,5
[MC-LW+H] ⁺	1025,5

Obrada podataka je urađena sa MassHunter Quantitative Data Analysis Software (Agilent Technologies). Za uzorake tkiva je izračunata količina mikrocistina izražena kao ng varijante toksina po mg tkiva.

Pri analiziranju hromatograma potrebni su standardi cijanotoksina. Analizirano je prisustvo sledećih varijanti mikrocistina: MC-LR, dmMC-LR, MC-RR, dmMC-RR, MC-YR, dmMC-YR, MC-LY, MC-LW i MC-LF. Standardi ovih toksina su dobijeni iz dva

cijanobakterijska ekstrakta *Microcystis* NIES-107 (deponovan u Nacionalnom institutu za studije životne sredine, Tsukuba, Japan) i to: dmMC-RR, MC-RR, dmMC-YR, MC-YR, dmMC-LR i MC-LR (Prilog I). Dok su iz ekstrakta *Microcystis* PCC 7820 (Pasterov Institut, Pariz, Francuska) dobijeni MC-LR, dmMC-LR, MC-LY, MC-LW i MC-LF (Prilog II). Ekstrakcija i purifikacija mikrocistina je urađena prema Meriluoto i Spooft (2005; 2005a). Ekstrakti su rastvoreni u 75 % metanolu, razblaženi do odgovarajućih koncentracija potrebnih za analize.

Uzorci vode iz Aleksandrovačkog jezera su pored mikrocistina analizirani sa LC-MS/MS (Spooft i sar., 2003; Hautala et al., 2012) analizirani i na cilindrospermopsin sa HPLC-DAD i LC-MS/MS (Spooft i sar., 2006; Kokocinski i sar., 2013) u laboratoriji u Finskoj. Identifikacija cilindrospermopsina u uzorcima je vršena na osnovu retencionog vremena (2,09 minuta standardnog cilindrospermopsina) i UV spektra (200-300 nm sa apsorpcionim maksimumom na 262 nm) čistog cilindrospermopsina (12,5 μ M CRM-CYN, NRC-IMB, Halifax, Kanada). LC-MS/MS ispitivanja su izvedena na 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 analize mikrocistina koristili su se isti LC-MS/MS instrumenti kao i za analize cilindrospermopsina. Referentni uzorak za identifikaciju izabranih mikrocistina bio je ekstrakt *Microcystis wesenbergii* NIES-107.

Pored ova dva pomenuta cijanotoksina analizirano je i prisustvo saksitoksina u uzorcima vode iz Aleksandrovačkog jezera, pomoću Merck Hitachi LaChrom HPLC-sistema (Tokijo, Japan) koji se sastoji od kvaternarne pumpe (L-7100), autosamplera (L-7200) i termostataranog odeljka za kolonu (L-7360). Za odvajanje saksitoksina korišćena je Waters Xbridge C18, 3,5 μ m, 150 mm \times 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) 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 \times 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 sa 0,38 mM azotne kiseline, sa protokom 0,4 mL/min i oksidovani derivati su detektovani fluorescentnim detektorom na λ_{Ex} 330 nm, λ_{Em} 395 nm. Referentni materijal za saksitoksin je dobijen iz NRC-IMB, Halifax, Kanada.

3.6.6. Histološki preparati

Uzorci tkiva ribe *Cyprinus carpio* (jetre, bubrega, škrge, creva i mišića) iz cvetajućih ribnjaka i kontrolnih jezera fiksirani u formalinu, obrađeni su standardnom histološkom metodologijom. Uzorci su dehidrirani u rastućoj seriji etanola i prosvetljeni u ksilolu, zatim ukalupljeni u parafinske blokove. Trake debljine 5 μm su isečene na mikrotomu, a zatim postavljane na mikroskopske pločice obložene albuminom. Preparati tkiva su bojani standardnom hematoksilin-eozin tehnikom bojenja (H&E). Preseci su posmatrani svetlosnim mikroskopom Primo Star (Carl Zeiss, Heidenheim, Germany) i fotografisani digitalnom kamerom AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss, Heidenheim, Germany).

Analize su rađene na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta.

3.6.7. Biohemijske analize u cilju procene reakcija biljaka na mikrocistine

Ekstrakti svežeg biljnog materijala, lista i ploda za biohemijske analize dobijeni su homogenizacijom 1 g svežeg biljnog materijala u avanu sa 10 mL 0,1 M KH_2PO_4 pufera (pH 7). Homogenat je prenet u plastičnu epruvetu i ostavljen na ledu. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani na 2 500 obrtaja/min 15 min. Supernatant je korišćen u daljim analizama.

Ekstrakti suvog biljnog materijala, lista i ploda dobijeni su prelivanjem 0,2 g samlevenog suvog biljnog materijala organskim rastvaračima (1/50, w/v) i to 70 % metanolom za određivanje ukupnih flavonoida ili 70 % acetonom za određivanje ukupnih fenola i antioksidantne testove (DPPH-, NBT- i $\cdot\text{OH}$ -test).

Komponente antioksidantnog sistema određene su spektrofotometrijskim metodama pomoću UV/VIS spektrofotometra Evolution 220 (Thermo Scientific, San Jose, USA).

Biohemijske analize na uzorcima eksperimentalne biljke su rađene u Laboratoriji predmeta Biohemija biljaka, Departman za ratarstvo i povrtarstvo, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

3.6.7.1. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Intenzitet lipidne peroksidacije određuje se na osnovu sadržaja malondialdehida (MDA), jednog od krajnjih proizvoda razgradnje membranskih lipida u ćelijama, ekstrahovanog iz svežeg biljnog materijala pomoću smeše tiobarbiturine kiseline (TBA) i trihlorsirćetne kiseline (TCA) (Moon i Shibamoto, 2009). Sadržaj MDA određen je u uzorcima u odnosu na slepu probu. Uzorak je činilo 0,5 mL ekstrakta svežeg biljnog materijala i 4,5 mL rastvora za ekstrakciju MDA (20 % TCA i 0,5 % TBA), a slepu probu je predstavljalo 5 mL rastvora za ekstrakciju MDA. Reakcione smeše su zagrevane 30 min na 95°C u vodenom kupatilu, ohlađene i centrifugirane na 1 500 obrtaja/min 10 min. U dobijenom supernatantu sadržaj MDA je očitana spektrofotometrijski na $\lambda=532$ nm. Intenzitet lipidne peroksidacije izražen je brojem nmol MDA ekvivalenata po g svežeg biljnog materijala

3.6.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Količina ukupnih fenola određena je po metodi Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003). U epruvete je stavljeno 8,4 mL H₂O, 0,5 mL 33 % rastvora Folin-Ciocalteu i 0,1 mL acetonskog ekstrakta (osim u slepu probu). Rastvori su promućkani i posle 3-6 min dodat je 1 mL 20 % Na₂CO₃. Nakon 1 h očitana je apsorbance na $\lambda=720$ nm. Izračunavanje je vršeno iz kalibracione krive na osnovu zavisnosti apsorbance i standarda galne kiseline (GA) različitih koncentracija. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline po g suve mase biljnog materijala.

3.6.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Flavonoidi sa metalnim jonima grade odgovarajuće metalo-komplekse, kao Al-kompleks koji se vezuje za ukupne flavonoide, i određuju se po Pękal i Pyrzyńska metodi (2014). Uzorak je činilo 2,5 mL metanolnog ekstrakta suvog biljnog materijala, 0,5 mL H₂O i 1,25 mL rastvora AlCl₃ (osim u slepoj probi gde se stavlja H₂O). Nakon mešanja i centrifugiranja na 1 960 obrtaja/min 15 min, apsorbance je očitana na $\lambda=430$ nm. Izračunavanje je vršeno iz kalibracione krive na osnovu zavisnosti apsorbance i različitih koncentracija standarda rutina. Količina ukupnih flavonoida izražena je u mg rutina po g suve mase biljnog materijala.

3.6.7.4. Antioksidantni testovi

DPPH – test

Ukupna ne-enzimska aktivnost biljnog ekstrakta određena je po metodi Panda (2012) koja se zasniva na razlici u aktivnosti uklanjanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikala (DPPH-radikal) između slepe probe i uzorka. Suvi biljni materijal (0,4 g) je usitnjen i homogenizovan u rashlađenom (4°C) avanu sa 4 mL apsolutnog etanola. Posle centrifugiranja, u 0,5 mL supernatanta (u slepu probu umesto uzorka dodato je 0,5 mL apsolutnog etanola) dodato je 0,25 mL DPPH etanolnog rastvora i 1,25 mL apsolutnog etanola. Nakon 30 min očitana je apsorbance na $\lambda=517$ nm. Antioksidantna aktivnost u DPPH-testu izražena je kao % neutralisanih DPPH-radikala.

NBT-test

Sposobnost ekstrakta da neutrališe superoksid-anjon ($O_2^{\cdot-}$) određena je po metodi Panda (2012) koja se zasniva na sposobnosti inhibicije fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijum hlorida (NBT). Reakcioni medijum se sastoji od 50 mM KH_2PO_4 pufera (pH 7,8), 75 μ M NBT, 13 mM L-metionin, 0,1 mM EDTA, 2 μ M riboflavin i 0,5 mL ekstrakta suvog biljnog materijala (odnosno, H_2O u slepoj probi). Epruvete sa reakcionim smešama bile su izložene 15 min fluorescentnoj lampi od 18 W, pa su 15 min držane u tami i onda su očitane apsorbance u uzorcima i slepoj probi na $\lambda=560$ nm. Antioksidantna aktivnost u NBT-testu izražena je kao % inhibicije NBT redukcije.

\cdot OH-test

Sposobnost ekstrakta da neutrališe hidroksil-radikal (\cdot OH) određena je po metodi Sánchez-Moreno (2002) na osnovu reakcije inhibicije degradacije deoksiriboze. U reakcioni medijum (0,1 mL 0,015 % H_2O_2 , 0,1 mL 10 mM $FeSO_4$, 0,1 mL 0,05 M 2-deoksi-D-riboze i 2,7 mL 0,1 M KH_2PO_4 pufera pH 7,0) dodat je 0,1 mL ekstrakta suvog biljnog materijala. U korekciju je umesto 2-deoksi-D-riboze dodato 0,1 mL 0,1 M KH_2PO_4 pufera (pH 7,0), a u kontrolu umesto uzorka je dodato 0,1 mL ekstrakcionog sredstva. Posle 60 min inkubacije na 37°C, u sve probe dodato je po 0,2 mL 0,1 M EDTA i 2 mL TBA reagensa (20 % TCA i 0,5 % TBA). Nakon inkubacije 10 min na 100°C u vodenom kupatilu, uzorci su ohlađeni i

spektrofotometrijski očitani na $\lambda=532$ nm. Antioksidantna aktivnost u \cdot OH-testu izražena je kao % inhibicije \cdot OH-radikala.

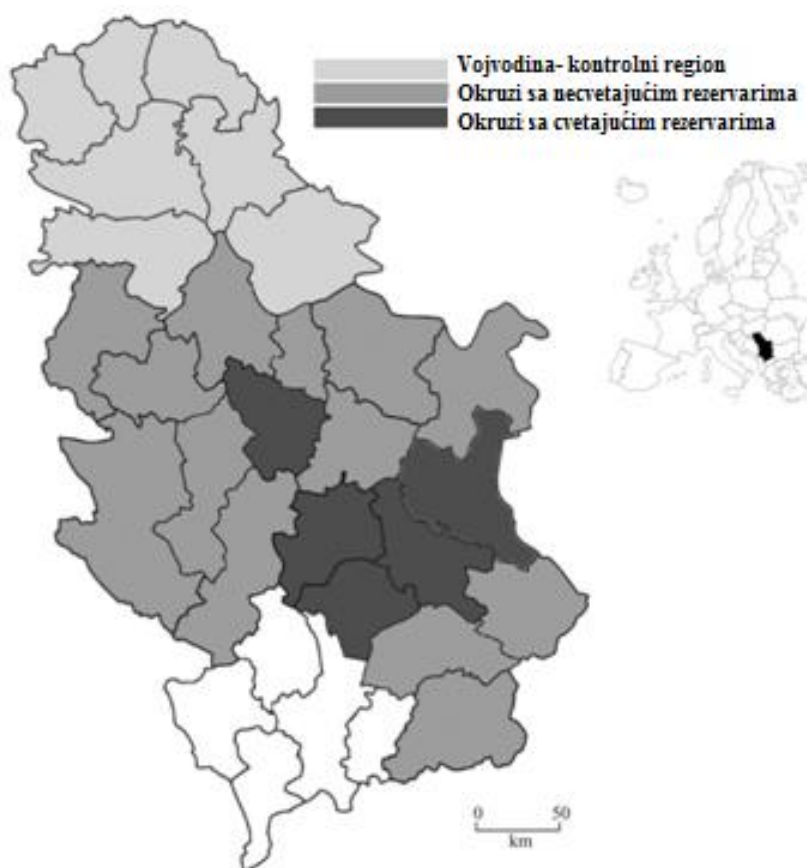
3.6.7.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je program STATISTICA for Windows version 11.0. Izračunati su pokazatelji varijabilnosti: srednja vrednost, greška srednje vrednosti i koeficijent varijacije. Za testiranje različitosti sredina korišćen je Duncan test ($P<0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje i incidence nekih kancera u Srbiji-analiza epidemioloških podataka

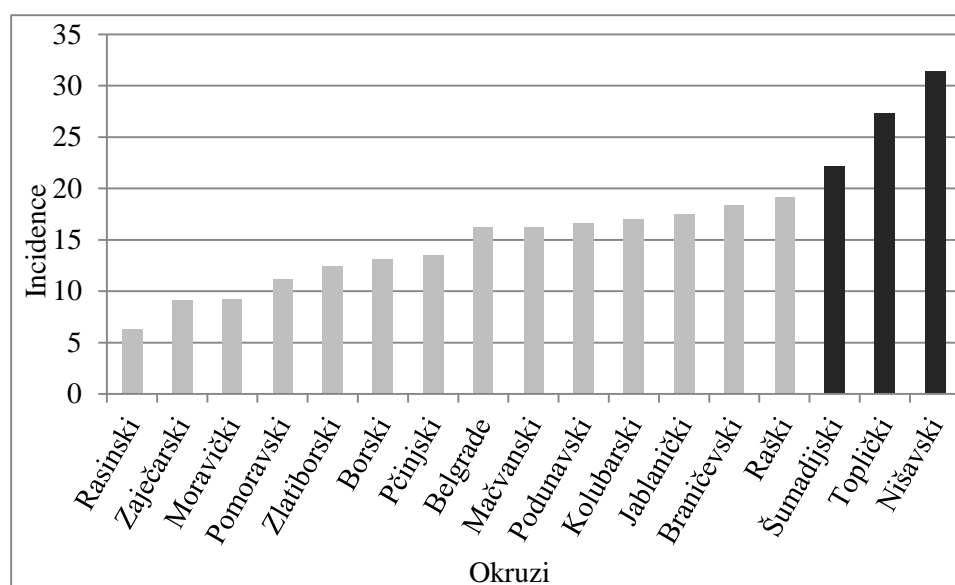
Pojava cvetanja cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje je čest problem u Centralnoj Srbiji i neki okruzi su više izloženi od drugih. Na Slici 12 su prikazani okruzi (Šumadijski, Toplički, Nišavski, Rasinski i Zaječarski) koji se snabdevaju vodom iz rezervora sa perzistentnim cvetanjem cijanobakterija, zatim ostali okruzi Centralne Srbije koji nisu imali ove probleme do 2014. godine, kao i Vojvodina koja se može posmatrati kao kontrolni region jer se snabdeva podzemnim vodama.



Slika 12: Mapa Srbije sa naznačenim okruzima koji se snabdevaju vodom iz rezervoara koji su cvetali do 2014. godine (Šumadijski, Toplički, Nišavski, Rasinski i Zaječarski).

4.1.1. Primarni kancer jetre i faktori rizika

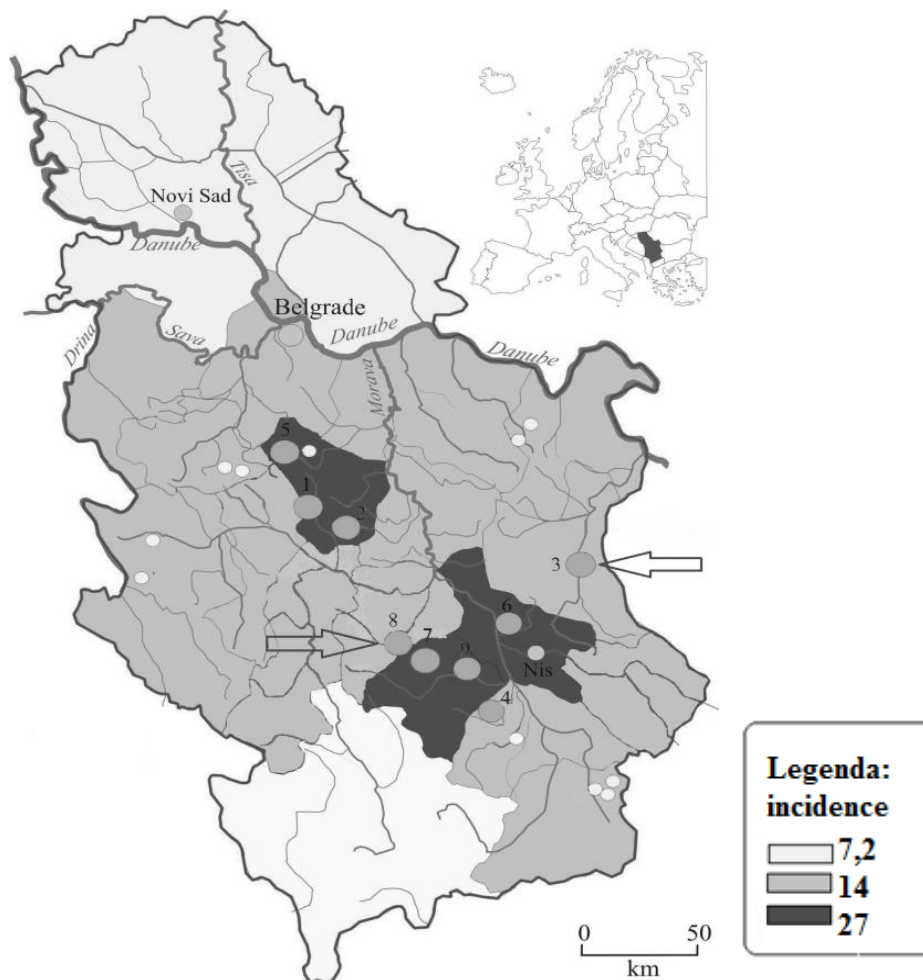
U cilju ispitivanja moguće povezanosti pojave cvetanja cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje i povećane incidence primarnog kancera jetre, analizirani su epidemiološki podaci u periodu od 1999. do 2008. godine. Dobijene su sledeće incidence primarnog kancera jetre po okruzima u Centralnoj Srbiji (Graf. 1):



Grafikon 1. Učestalost primarnog kancera jetre po okruzima Centralne Srbije u periodu od 1999. do 2008. godine

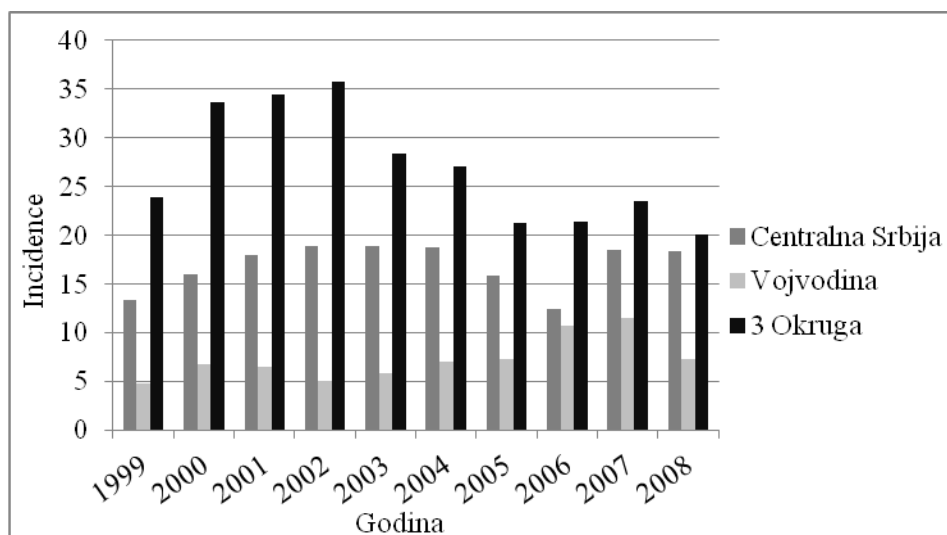
Najveća prosečna učestalost primarnog kancera jetre je uočena u Nišavskom (31,4), Topličkom (27,3) i Šumadijskom (22,1) okrugu gde se javlja cvetanje cijanobakterija u rezervoarima za vodosnabdevanje, što je prikazano na Slici 13. Prosečna incidenca primarnog kancera jetre za ova tri okruga je iznosila 27, dok je u preostalim okruzima Centralne Srbije skoro duplo niža (14), a u Vojvodini incidenca ovog kancera (7,2) je skoro četiri puta niža u poređenju sa kritičnim okruzima.

Iako je cvetanje zabeleženo u akumulacijama (Ćelije i Grliška) za vodosnabdevanje Rasinskog i Zaječarskog okruga, incidence primarnog kancera u ovim okruzima su bile najniže tokom desetogodišnjeg perioda (6 odnosno 9), u slučaju Rasinskog okruga čak i niže od Vojvodine. Ovi vodovodi u Kruševcu i Zaječaru koji koriste ozonizaciju su naznačeni strelicama na Slici 13.



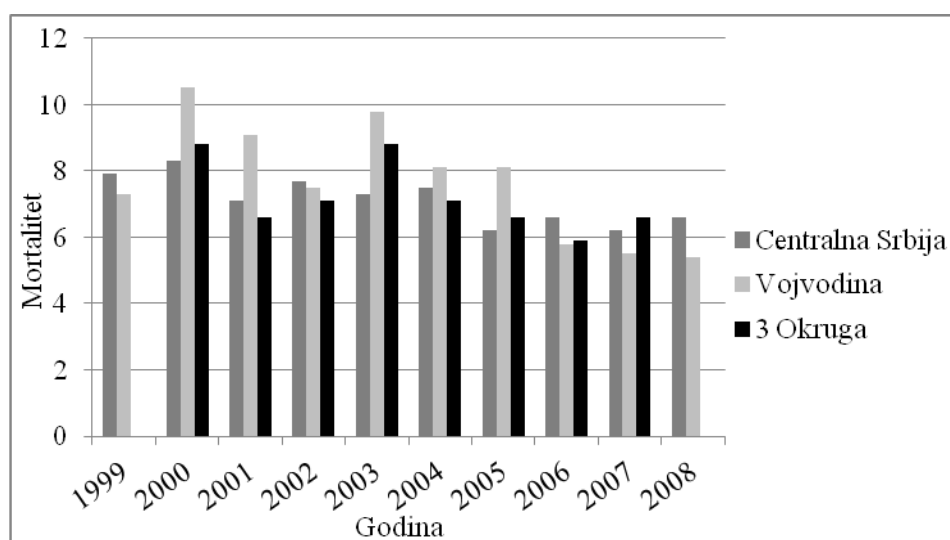
Slika 13. Okruzi u Centralnoj Srbiji sa povećanom incidencijom primarnog kancera jetre (tamnije) za period od 1999. do 2008. godine; Rezervoari u kojima cvetaju cijanobakterije (prikazani tačkama-1. Gruža, 2. Grošnica, 3. Grliška, 4. Brestovac, 5. Garaši, 6. Bovan, 7. Pridvorica, 8. Čelije, 9. Krajkovac); Tačke naznačene strelicama-8. i 3. su vodovodi u Kruševcu i Zaječaru koji koriste ozonizaciju.

Uporedni odnos incidenciji primarnog kancera jetre po godinama (od 1999. do 2008.) u tri kritična okruga (Nišavski, Toplički i Šumadijski) i preostalim okruzima Centralne Srbije, kao i u kontrolnom regionu Vojvodini (snabdevanje podzemnim vodama) je prikazan na Grafikonu 2. Može se uočiti da su tokom svih proučavanih godina incidence primarnog kancera jetre bile najviše u tri kritična okruga, zatim u preostalim okruzima Centralne Srbije, a najniže su bile u Vojvodini.

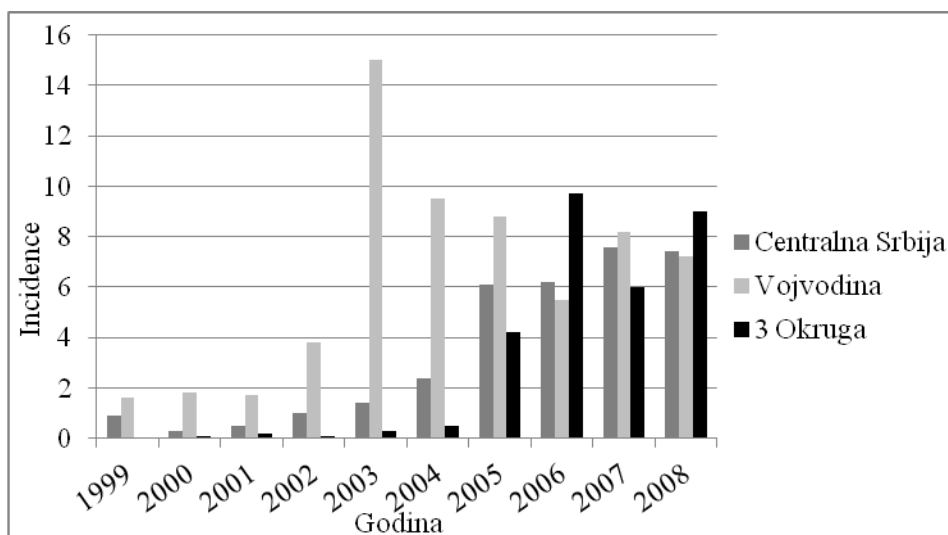


Grafikon 2. Incidence primarnog kancera jetre u Vojvodini, tri kritična i preostalim okruzima Centralne Srbije

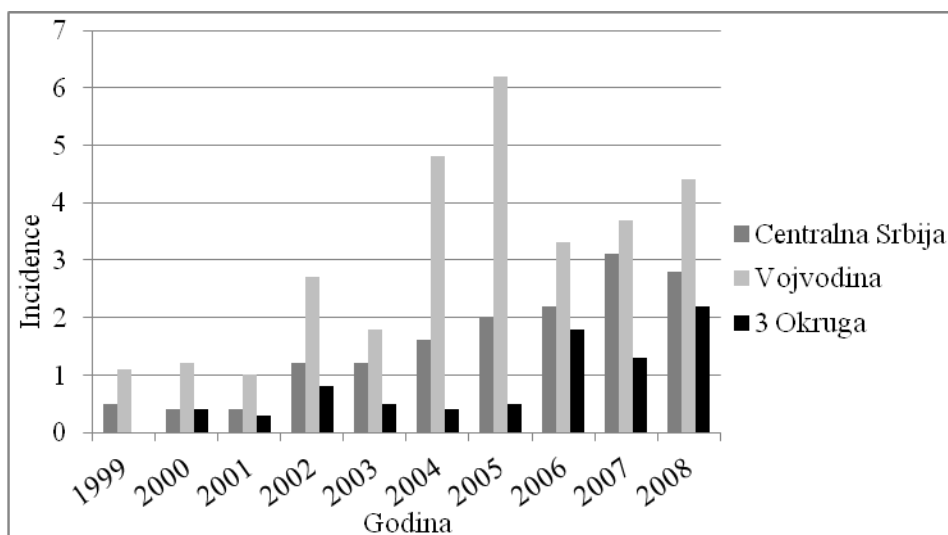
U cilju ispitivanja uloge drugih rizičnih faktora, ciroze, HBV i HCV u učestalosti primarnog kancera jetre, analizirani su podaci o smrtnosti od ciroze jetre i učestalost infekcija HBV i HCV u periodu od 1999. do 2008. u Centralnoj Srbiji. Poređenjem srednjih vrednosti incidenci primarnog kancera jetre, HBV, HCV i mortaliteta ciroze jetre, uočeno je da tri kritična okruga (Šumadijski, Nišavski i Toplički) sa najvećom incidencom primarnog kancera jetre, imaju prosečne vrednosti za mortalitet ciroze jetre (Graf. 3) i niske incidence HCV (Graf. 4) i HBV (Graf. 5).



Grafikon 3. Mortalitet ciroze jetre u Srbiji od 1999. do 2008.



Grafikon 4. Incidenca HCV u Srbiji od 1999. do 2008.

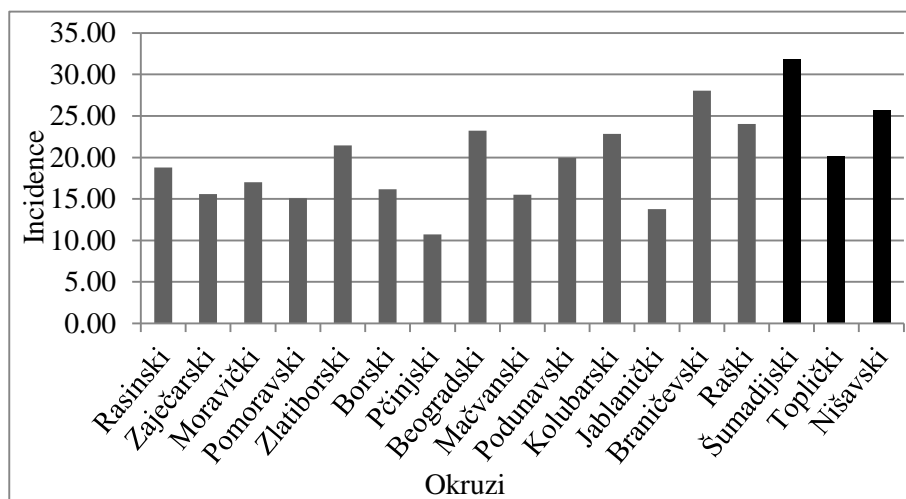


Grafikon 5. Incidenca HBV u Srbiji od 1999. do 2008.

4.1.2. Epidemiološki podaci drugih kancera

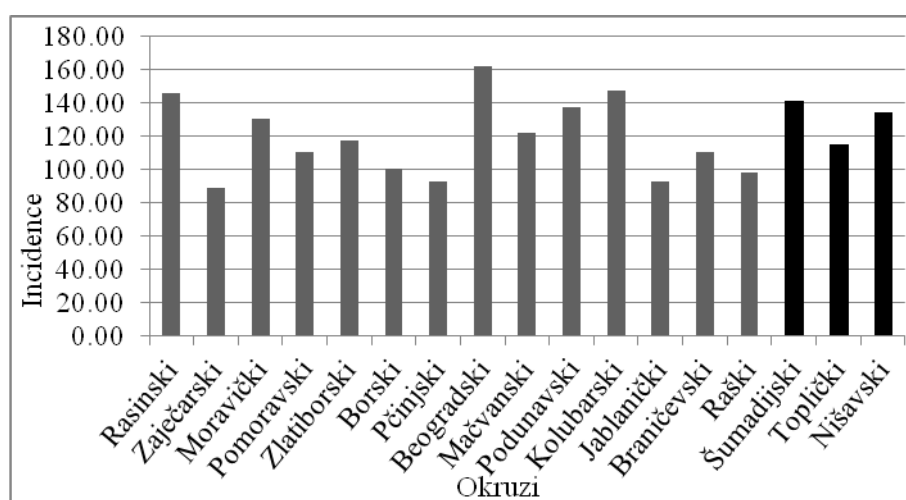
Pored primarnog kancera jetre, tokom istog perioda od 1999. do 2008, godine po okruzima Centralne Srbije analizirano je i poređeno još 12 kancera: mozga (Graf. 6), bronhija i pluća (Graf. 7), srca, medijastinuma i plućne maramice (Graf. 8), jajnika (Graf. 9), testisa (Graf. 10), bubrega (Graf. 11), želuca (Graf. 12), tankog creva (Graf. 13), kolorektuma (Graf. 14), retroperitoneuma i peritoneuma (Graf. 15), leukemije (Graf. 16), kao i maligni melanom kože (Graf. 17).

Incidence kancera mozga u posmatranom periodu su bile najveće u Šumadijskom okrugu (31,82), takođe su bile povećane u Nišavskom (25,66), a nešto niže u Topličkom okrugu (20,18). Od ostalih okruga ističe se i Braničevski (28,04) sa visokom incidencom ovog kancera.



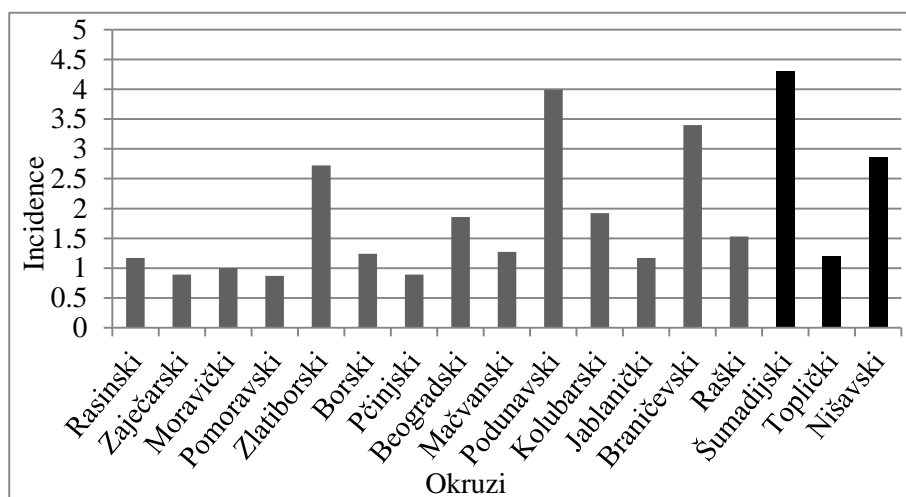
Grafikon 6. Incidence kancera mozga (K_1) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Šumadijski (140,68), Nišavski (133,93) i Toplički (114,53) okrug su imali srednje visoku incidencu kancera bronhija i pluća, dok su najviše incidence zabeležene u Beogradskom (161,57), Kolubarskom (146,84) i Rasinskom okrugu (145,93) Centralne Srbije.



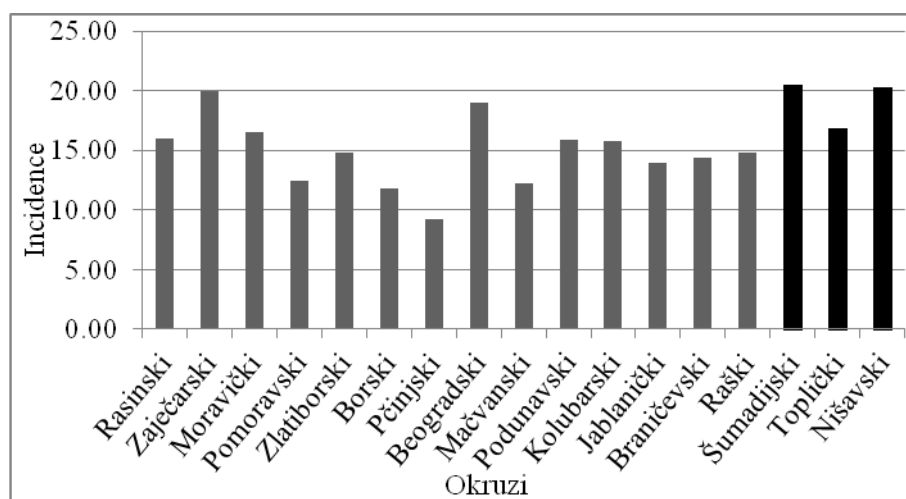
Grafikon 7. Incidence kancera bronhija i pluća (K_2) tokom 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Incidence kancera srca, medijastinuma i plućne maramice su bile najveće u Šumadijskom okrugu (4,3), a povišene su bile i u Nišavskom (2,87), a niske u Topličkom okrugu (1,19). Od drugih okruga Centralne Srbije visoke incidence ovog kancera imali su Podunavski (3,99), Braničevski (3,4) i Zlatiborski okrug (2,72).



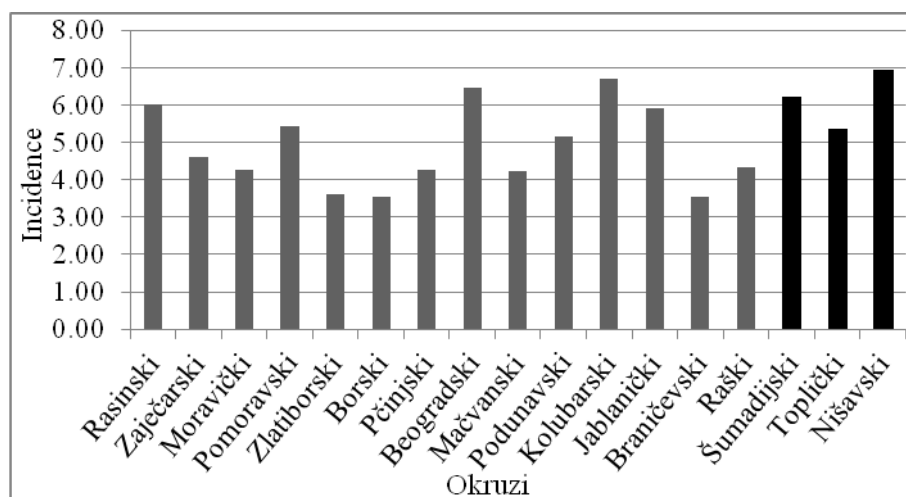
Grafikon 8. Incidence kancera srca, medijastinuma i plućne maramice (K_3) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Najviše incidence kancera jajnika su zabeležene u Šumadijskom (20,48) i Nišavskom okrugu (20,29), a visoke incidence su bile i u trećem kritičnom okrugu (Toplički 16,84), više incidence od njega su samo imali Zaječarski (19,97) i Beogradski okrug (19,04).



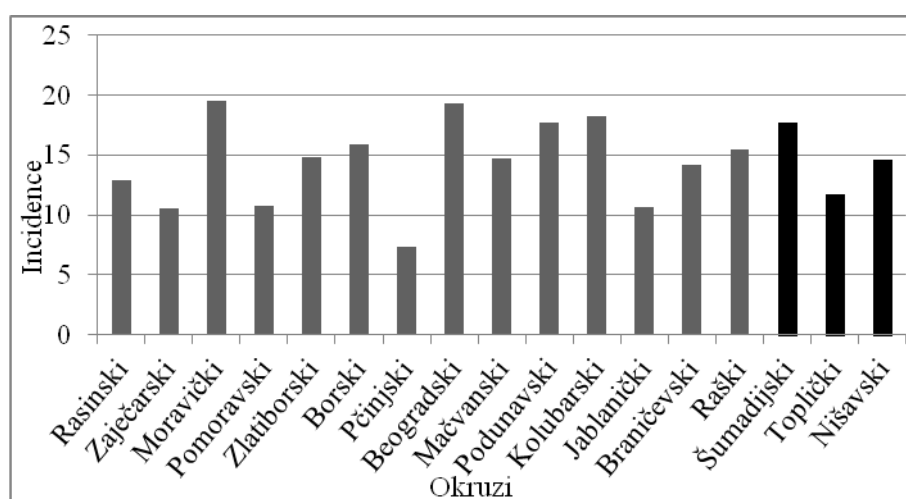
Grafikon 9. Incidence kancera jajnika (K_4) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Najviša incidenca kancera testisa je u posmatranom periodu bila u Nišavskom okrugu (6,95), zatim slede Kolubarski (6,70), Beogradski (6,47) i Šumadijski (6,22). Toplički okrug (5,36) se takođe ubraja u one sa višom incidencom ovog kancera među okruzima Centralne Srbije.



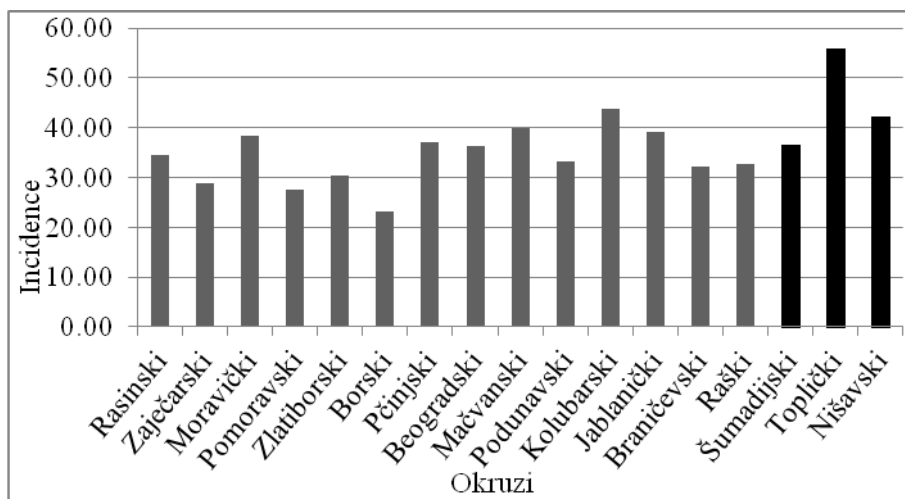
Grafikon 10. Incidence kancera testisa (K_5) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Srednje incidence kancera bubrega (bez bubrežne karlice), su uočene u posmatrana tri kritična okruga Centralne Srbije (Šumadijski 17,73, Nišavski 14,63 i Toplički 11,75). Među okruzima, najveće incidence ovog kancera su zabeležene u Moravičkom (19,46), Beogradskom (19,26) i Kolubarskom okrugu (18,28).



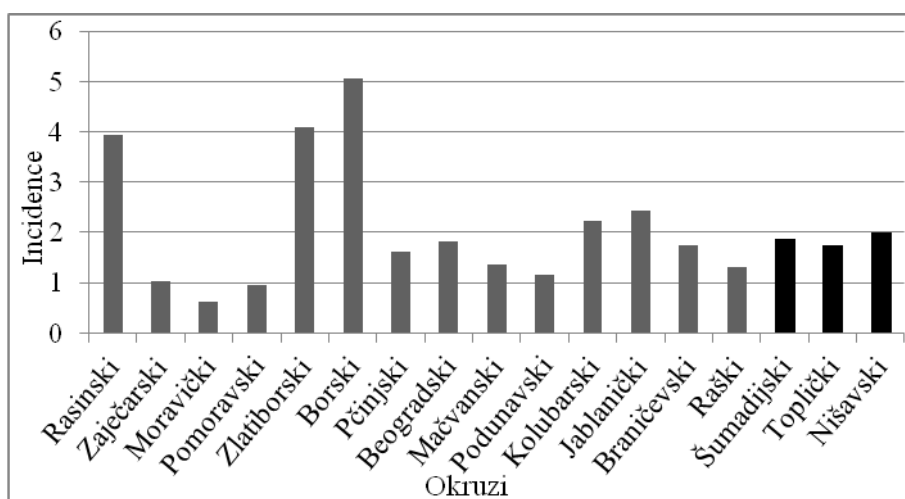
Grafikon 11. Incidence kancera bubrega (K_6) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Toplički okrug (55,83) je u ovom periodu imao najvišu incidencu kancera želuca, zatim sledi Kolubarski (43,90), pa Nišavski okrug (42,34), dok Šumadijski okrug (36,53) spada u one sa srednjom vrednosti incidence ovog kancera.



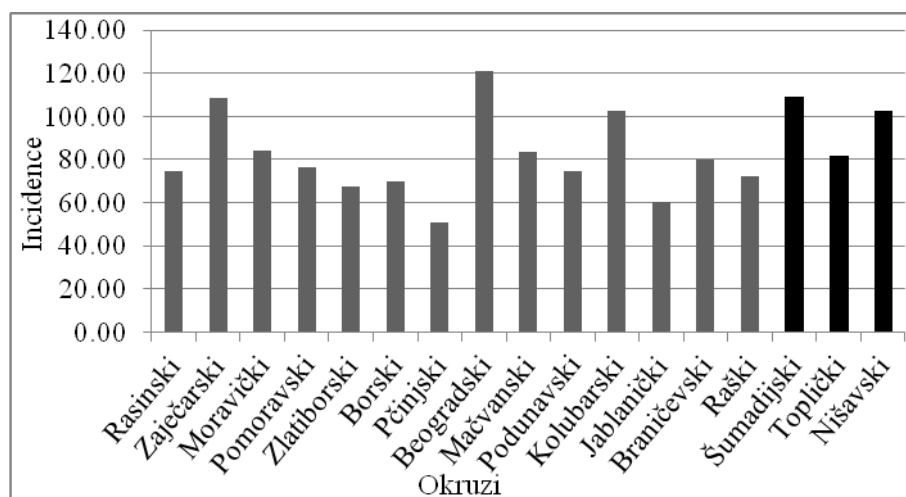
Grafikon 12. Incidence kancera želuca (K_7) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Što se incidence kancera tankog creva tiče, u kritičnim okruzima su zabeležene srednje vrednosti (Nišavski 1,99, Šumadijski 1,86 i Toplički 1,74), dok su visoke imali Borski (5,06), Zlatiborski (4,08) i Rasinski okrug (3,94), u odnosu na preostale okruge Centralne Srbije.



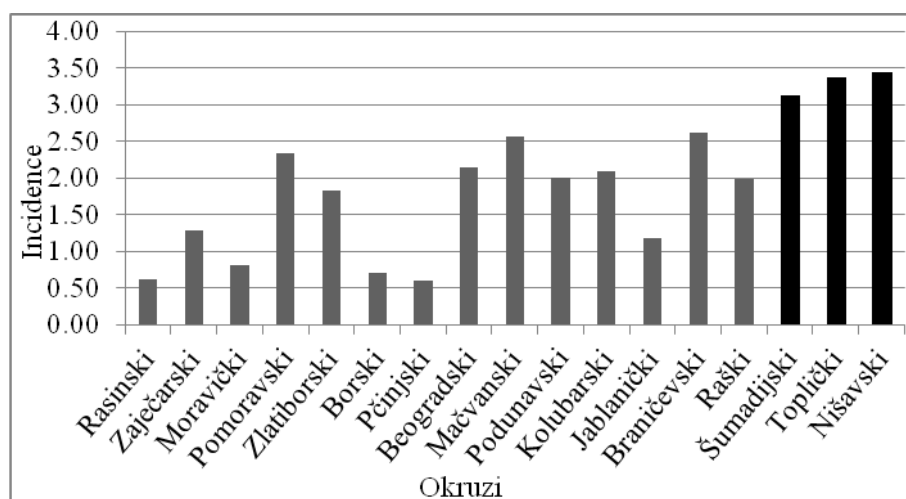
Grafikon 13. Incidence kancera tankog creva (K_8) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Incidence kancera kolorektuma su bile najviše u Beogradskom okrugu (120,77), a zatim slede Šumadijski (108,98), Zaječarski (108,75), Kolubarski (102,67) i Nišavski okrug (102,60). Toplički okrug (81,69) je imao srednje vrednosti incidence za ovaj kancer u posmatranom periodu.



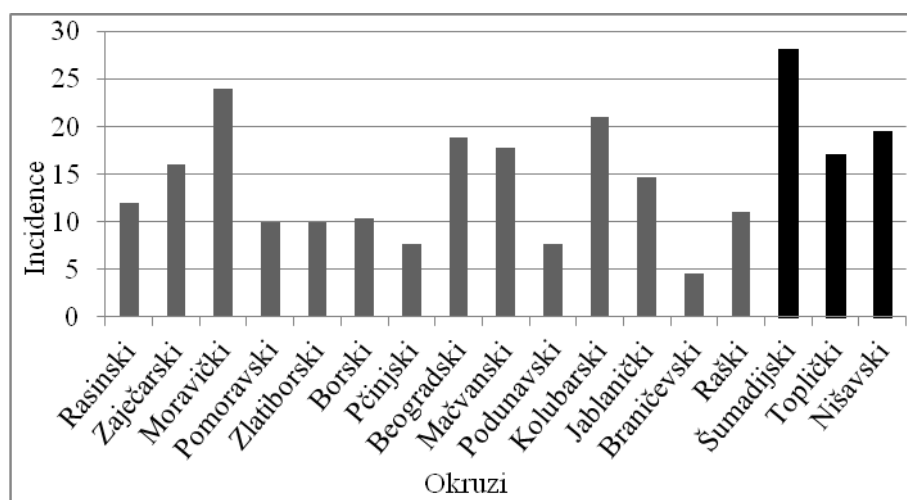
Grafikon 14. Incidence kancera kolorektuma (K_9) tokom 10 godina po okruzima Centralne Srbije

U slučaju kancera retroperitoneuma i peritoneuma, sva tri kritična okruga (Nišavski 3,45, Toplički 3,38 i Šumadijski 3,12) su imali najviše incidence među okruzima Centralne Srbije u ispitivanom periodu od 1999. do 2008. godine.



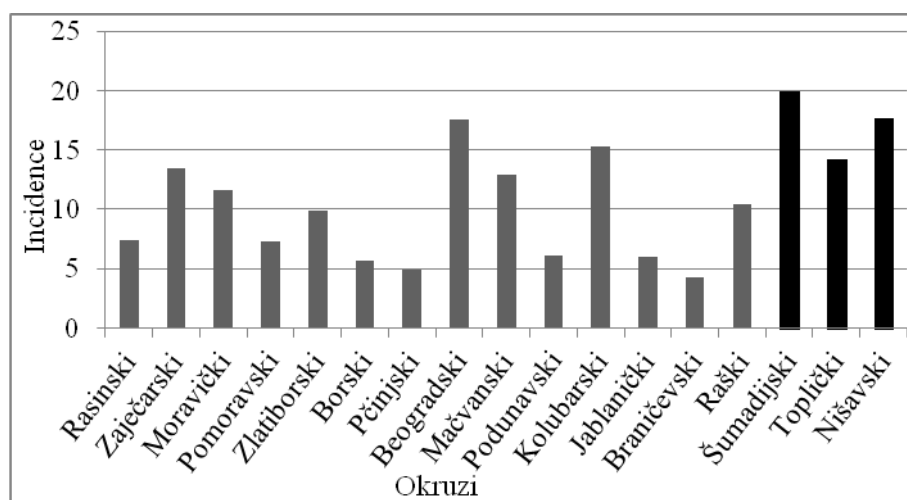
Grafikon 15. Incidence kancera retroperitoneuma i peritoneuma (K_{10}) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Srednje incidence leukemije za desetogodišnji period su bile najviše u Šumadijskom okrugu (28,1), pa slede: Moravički (23,9), Kolubarski (21), Nišavski (19,5), Beogradski (18,9), Mačvanski (17,7) i Toplički okrug (17,1).



Grafikon 16. Incidence leukemije (K₁₁) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

Melanom kože u Centralnoj Srbiji u toku 10 godina je imao najviše incidence u Šumadijskom (19,93), Nišavskom (17,68), Beogradskom (17,59), Kolubarskom (15,25) i Topličkom okrugu (14,23).



Grafikon 17. Incidence malignog melanoma kože (K₁₂) u periodu od 10 godina po okruzima Centralne Srbije

U analizi incidenci svih posmatranih kancera korišćen je scoring sistem i ukupni rezultati za okruge i kancere dati su u Tabeli 10.

Tabela 10. Ukupni bodovi za okruge i kancere u Centralnoj Srbiji

kancer/ okrug	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17
K_1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0
K_2	-1	-1	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1	1
K_3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0
K_4	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	-1	0	1	1	1
K_5	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	1	-1	0	0	1	0	0	1
K_6	-2	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	-1	1
K_7	0	0	2	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0
K_8	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	-1	0	0	0	0	0
K_9	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
K_{10}	-1	0	1	0	-1	0	0	0	0	1	-1	-1	0	0	1	0	0
K_{11}	-1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	1	0	0	2	0	0
K_{12}	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	-1	0	0	0	1	0	1
K_{13}	0	0	1	0	-1	0	0	0	0	2	0	-1	0	0	0	-1	0
SCOR	-9	-4	4	-1	0	-2	0	0	-1	8	-3	-1	-1	5	10	-1	6

Nejveći SCOR su imali sledeći okruzi: Šumadijski (10), Nišavski (8), Beogradski (6), Kolubarski (5) i Toplički (4), dok su najniži dobijeni u Pčinjskom (-9), Jablaničkom (-4) i Borskom okrugu (-3).

U cilju dalje analize incidenci 13 kancera, okruzi Centralne Srbije su bili podeljeni u dve grupe:

- Prvu statističku grupu činila su tri “kritična” okruza: Toplički, Nišavski i Šumadijski okrug, koji imaju problem čestog cvetanja cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje (TKO={O3, O10, O15})
- Drugu statističku grupu činili su preostali okruzi Centralne Srbije (CS={O1, O2, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O11, O12, O13, O14, O16, O17})

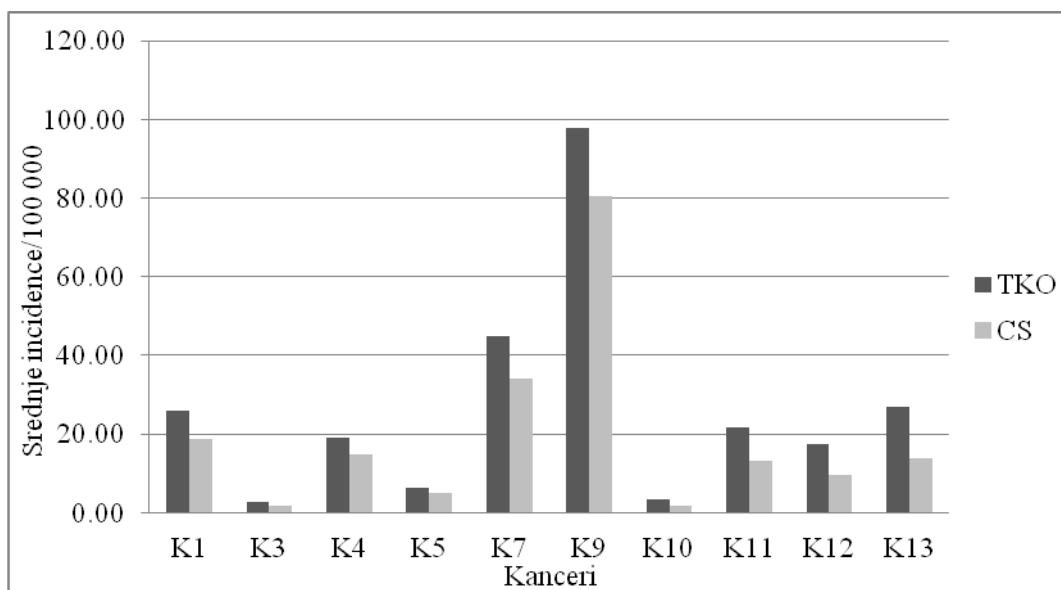
Da bi se ispitalo da li postoji razlika u učestalosti 13 kancera u ove dve grupe, korišćen je t-test. Rezultati su dati u Tabeli 11.

Tabela 11. Statistička razlika u učestalosti 13 kancera u tri kritična okruga (TKO) i preostalim okruzima u Centralnoj Srbiji (CS)

kancer	TKO		CS		t vrednost	p vrednost
	srednja v.	σ	srednja v.	σ		
K₁	25,89	4,20	18,73	4,29	3,77	0,001***
K ₂	129,71	13,04	118,15	19,91	1,54	0,142
K₃	2,79	1,14	1,71	0,35	2,85	0,011**
K₄	19,20	3,58	14,78	1,73	3,52	0,002***
K₅	6,18	1,90	4,86	0,64	2,07	0,054*
K ₆	14,70	3,49	14,42	2,89	0,20	0,843
K₇	44,90	4,15	34,10	4,56	5,54	0,000***
K ₈	1,86	0,73	2,09	0,51	-0,82	0,422
K₉	97,76	12,38	80,38	14,05	2,94	0,009***
K₁₀	3,32	1,04	1,63	0,60	4,46	0,000***
K₁₁	21,56	3,29	13,24	2,68	6,21	0,000***
K₁₂	17,28	4,25	9,48	1,37	5,53	0,000***
K₁₃	26,95	5,87	13,97	3,29	6,10	0,000***

* p < 0,1 , ** p < 0,05 , *** p < 0,01

Statistički značajna razlika nije utvrđena za samo tri kancera: bronha i pluća, bubrega i tankog creva (K₂, K₆, K₈). Za ostalih deset kancera znatno veća učestalost zabeležena je u tri kritična okruga, u poređenju sa preostalim okruzima Centralne Srbije (Graf. 18).



Grafikon 18. Učestalost kancera u tri kritična okruga (TKO) i u preostalim okruzima Centralne Srbije (CS)

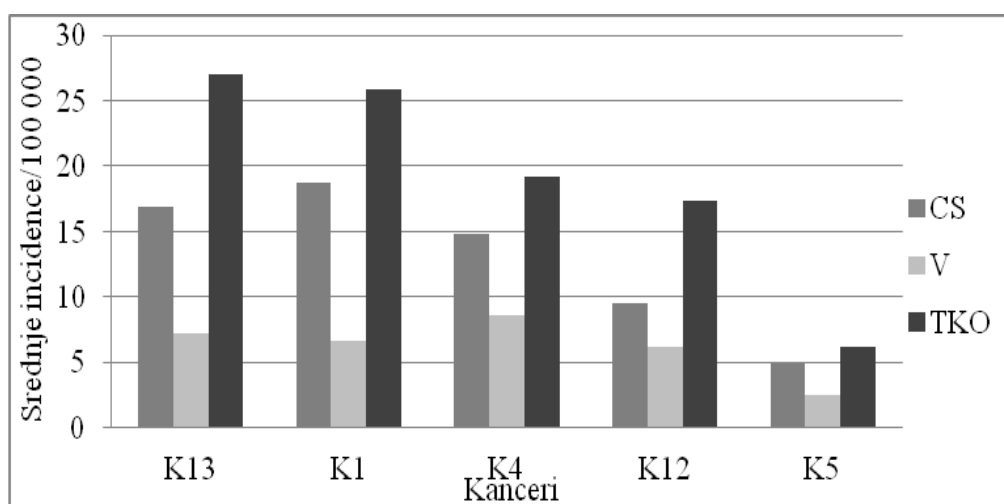
Pored dve grupe okruga TKO i CS, treći region, Vojvodina (V) je analiziran u vezi sa razlikama u učestalosti pet kancera (mozga, jajnika, testisa, malignog melanoma kože i jetre) tokom perioda od 10 godina. Ovih pet kancera je analizirano jer su uključivali identične kodove za Centralnu Srbiju i Vojvodinu, dok su za druge kancere uračunati različiti kodovi u ova dva regiona. Na primer, dobijeni podaci o leukemijama u Vojvodini obuhvatali su ICD-10 kodove C91, C92 i C93 koji se odnose na limfoblastne, limfoidne leukemije, mijeloidne leukemije i monocitne leukemije. Pored navedenih leukemija, druge leukemije određenih ćelija (C94) i leukemije neodređenog tipa ćelija su takođe bile uključene u podatke za Centralnu Srbiju.

Za svih pet kancera vrednosti su bile najveće u tri kritična okruga, zatim ostatak Centralne Srbije, a najmanje u Vojvodini. Rezultati ispitivanja statističke razlike u učestalosti ovih kancera u tri testirane grupe prikazani su u Tabeli 12 i Grafikonu 19.

Tabela 12. Statistička razlika u učestalosti pet kancera u Vojvodini (V), tri kritična okruga (TKO) i preostalim okruzima u Centralnoj Srbiji (CS)

kancer	V		TKO		CS		F-vrednost	p-vrednost	stat. sign. razlika ($p < 0,05$)
	srednja vrednost	σ	srednja vrednost	σ	srednja vrednost	σ			
K₁	6,60	1,21	25,89	4,20	18,73	4,29	75,97	0,000***	V-TKO, V-CS, TKO-CS
K₄	8,63	0,84	19,20	3,58	14,78	1,73	51,23	0,000***	V-TKO, V-CS, TKO-CS
K₅	2,52	0,64	6,18	1,90	4,86	0,64	23,54	0,000***	V-TKO, V-CS, TKO-CS
K₁₂	6,17	0,71	17,28	4,25	9,48	1,37	47,82	0,000***	V-TKO, V-CS, TKO-CS
K₁₃	7,24	2,23	26,95	5,87	13,97	3,29	59,90	0,000***	V-TKO, V-CS, TKO-CS

*** $p < 0,01$



Grafikon 19. Razlika u učestalosti pet kancera u tri grupe (CS, V, TKO)

4.2. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje i pojava nekih bolesti u Srbiji

U cilju procene potencijalne veze između pojave cvetanja cijanobakterija u akumulaciji za vodosnabdevanje Vrutci i pojave pojedinih bolesti kod ljudi, analizirani su epidemiološki podaci o broju obolelih od bolesti sistema za varenje i bolesti kože, kao i pojedinih kancera (15) kod građana Užica.

4.2.1. Epidemiologija bolesti sistema za varenje i kože u Užicu

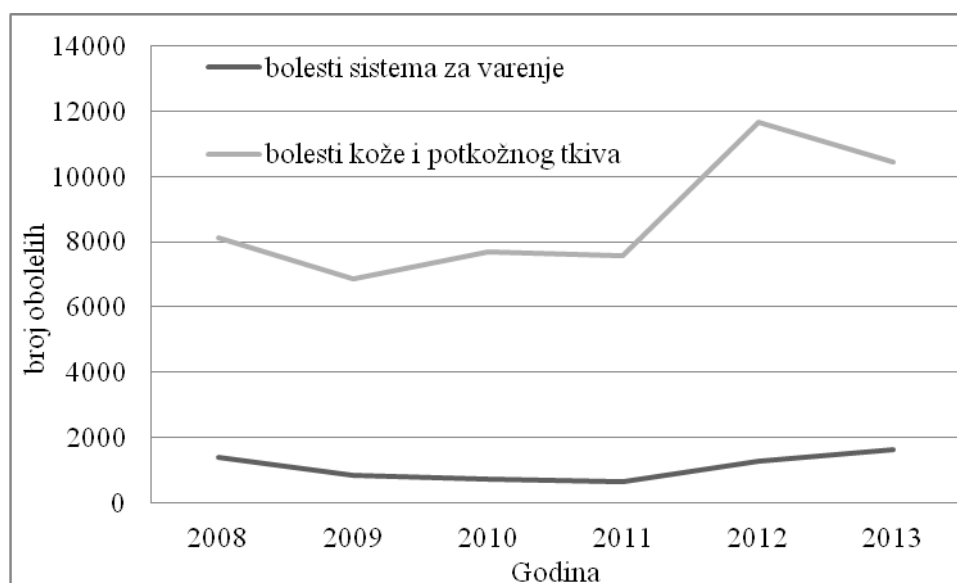
U Tabeli 13 i Grafikonu 20 je predstavljen broj registrovanih građana Užica sa bolestima sistema za varenje i bolestima kože i potkožnog tkiva u vremenskom opsegu od 2008. do 2013. godine.

*Tabela 13. Bolesti sistema za varenje i kože kod građana Užica
(Zavod za javno zdravlje Užice)*

Godina	Bolesti sistema za varenje (K00-K93) Broj obolelih	Bolesti kože i potkožnog tkiva (L00-L90) Broj obolelih
2008	1 373	8 141
2009	833	6 851
2010	725	7 711
2011	639	7 556
2012	1 258	11 653
2013	1 645	10 443

Pregledom podataka koji se odnose na broj obolelih od bolesti sistema za varenje, primećuje se blagi pad broja obolelih od 2008. do 2011. godine, a zatim u 2012. i 2013. godini beleži se porast broja obolelih Užičana. U 2013. godini registrovano je 1 645 obolelih, a u prethodnih pet godina (2008.-2012.) prosečan broj obolelih od bolesti sistema za varenje je iznosio 966.

Analizirajući pojavu oboljenja kože i potkožnog tkiva kod građana Užica, primećuje se neujednačen trend porasta obolelih uz oscilacije tokom posmatranih godina. Najveći broj obolelih zabeležen je 2012. godine i iznosio je 11 653, dok je u 2013. godini došlo do pada broja obolelih na 10 443. Prosečan broj od 2008. do 2012. bio je 8 386 obolelih od bolesti kože i potkožnog tkiva.



Grafikon 20. Broj obolelih od bolesti sistema za varenje, kao i kože i potkožnog tkiva kod građana Užica od 2008. do 2013. godine

Poređenjem prosečne vrednosti (t-test) obolelih od bolesti kože i podkožnog tkiva tokom perioda od 2008. do 2012., sa brojem obolelih u 2013. godini utvrđena je statistički značajna razlika na nivou pouzdanosti od 95,0 %.

Manja razlika je zabeležena u slučaju bolesti sistema za varenje, međutim ipak je postojala statistički značajna razlika između broja obolelih tokom 2013. i proseka tokom prethodnih pet godina ($P < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Statistička razlika u broju obolelih 2013. i proseka od 2008. do 2012. godine

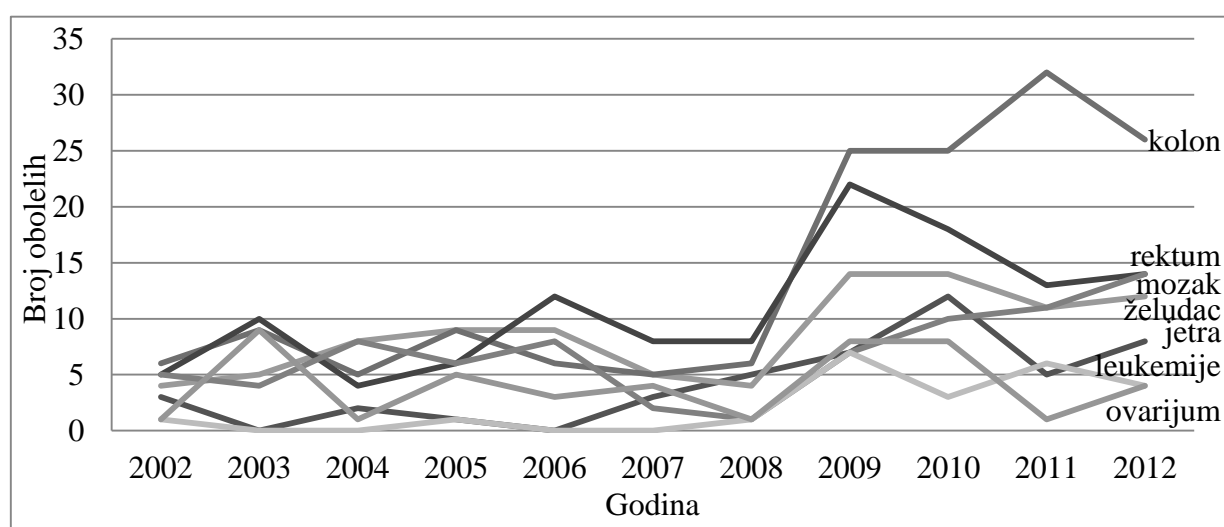
Bolesti	Srednja vrednost broja obolelih 2008-2012	Stand. devijacija	Koeficijent varijacije %	Broj obolelih 2013	t vrednost	p vrednost
Bolesti sistema za varenje	965,6	329,2	34,09	1645	-4,614	0,0017
Bolesti kože i podkožnog tkiva	8 382,4	1 886,4	22,50	10 443	-2,442	0,0404

4.2.2. Epidemiologija pojedinih kancera u Užicu

Što se tiče obolelih od malignih bolesti u Užicu (Tabela 15), ističe se veliki broj obolelih od kancera pluća i dojke. Od 13 maligniteta koji su proučavani u Centralnoj Srbiji, u Užicu najviši je broj obolelih od kancera kolona i rektuma, a ostali analizirani kanceri su u okviru niskih vrednosti (Graf. 21). Tokom ispitivanog perioda od 2002. do 2012. godine primarni kancer jetre je beležio blag porast od 2007. do 2010. godine, a u poslednje dve godine broj obolelih je bio manji.

Tabela 15. Broj obolelih od kancera u Užicu (Zavod za javno zdravlje Užice)

Broj obolelih od kancera											
Kancer	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
jetra C22	3	0	2	1	0	3	5	7	12	5	8
želudac C16	4	5	8	9	9	5	4	14	14	11	12
kolon C18	6	9	5	9	6	5	6	25	25	32	26
rektum C19-20	5	10	4	6	12	8	8	22	18	13	14
pankreas C25	1	2	6	6	4	3	4	13	14	13	17
pluća C34	11	15	13	23	15	25	26	76	66	57	65
bubreg C64	2	4	2	2	1	1	1	3	7	7	3
mokraćna bešika C67	9	4	2	4	11	4	11	14	9	10	11
mozak C71	5	4	8	6	8	2	1	7	10	11	14
leukemije C91-95	1	0	0	1	0	0	1	7	3	6	4
dojka C50	15	18	20	18	19	23	30	61	62	27	48
grlić materice C53	8	11	3	4	9	3	3	13	10	10	11
materica C54	5	3	2	1	1	4	0	2	3	4	2
ovarijum C56	1	9	1	5	3	4	1	8	8	1	4
prostata C61	3	4	5	1	8	9	3	17	19	13	20



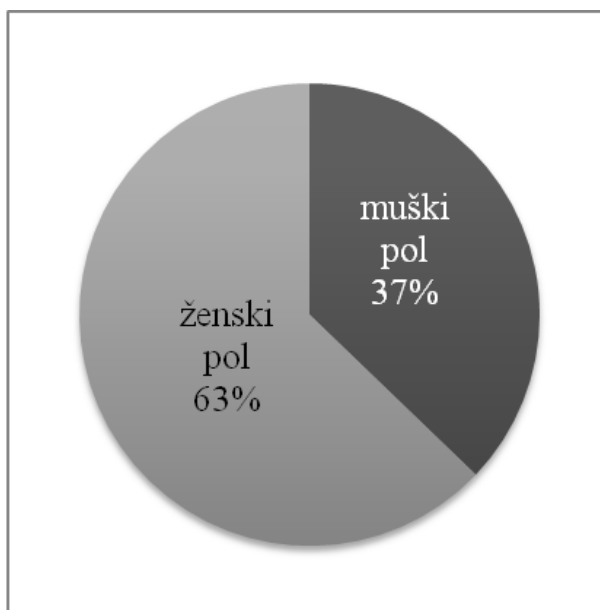
Grafikon 21. Broj obolelih od sedam kancera u Užicu

4.3. Anketa o mogućoj vezi pojave cijanobakterija u sistemu za vodosnabdevanje i nekih zdravstvenih problema kod stanovnika grada Užica

Rezultati ankete sprovedene nakon cvetanja jezera Vrutci, akumulacije koja se koristi za vodosnabdevanje, o putevima izlaganja cijanobakterijama i cijanotoksinima, kao i njihovom potencijalnom uticaju na zdravlje životinja i građana Užica, prikazani su grafički i tabelarno po anketnim pitanjima.

4.3.1. Pol ispitanika

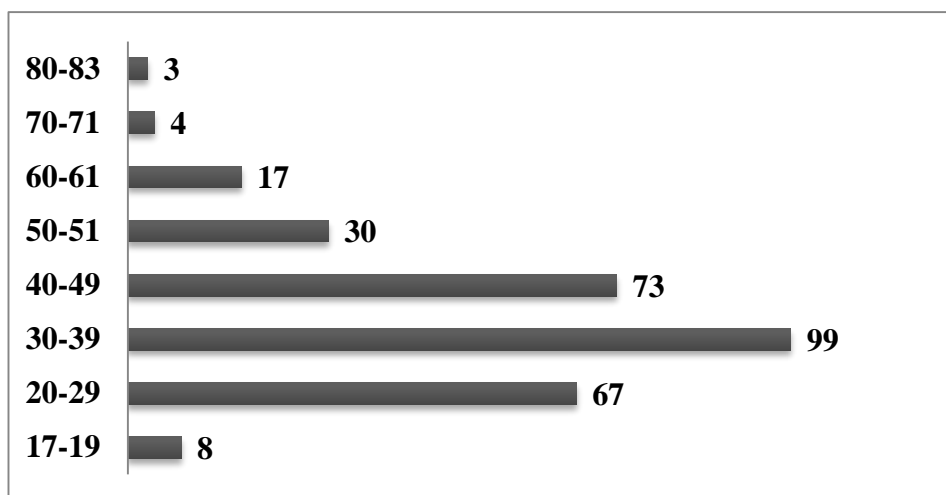
Od 320 građana Užica koji su učestvovali u anketi, veći broj ispitanika (63 %) je bio ženskog pola (Graf. 22).



Grafikon 22. Procenat ispitanika ženskog i muškog pola

4.3.2. Starost ispitanika

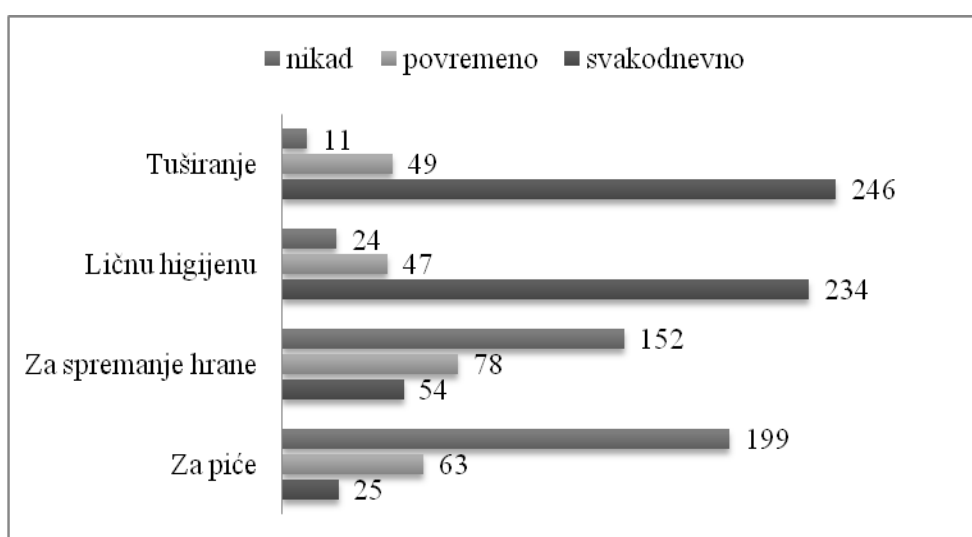
Ispitanici su bili od 17 do 83 godina starosti, pri čemu je najveći broj bio u trećoj dekadi života (Graf. 23).



Grafikon 23. Starost ispitanika

4.3.3. Upotreba vode u toku zabrane korišćenja

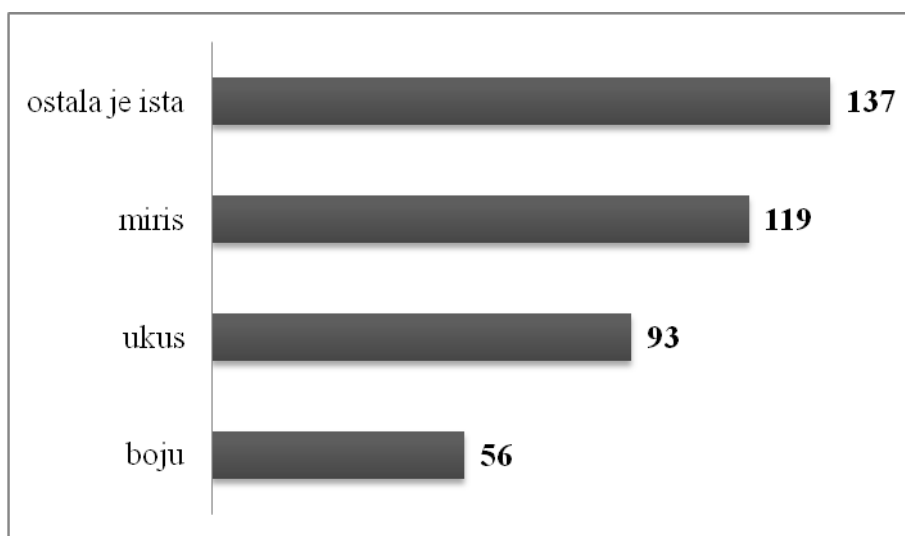
U toku zabrane korišćenja vodovodne vode, od anketiranih ispitanika, većina nije koristila vodovodnu vodu za piće (69,3 %), manji broj je to činio povremeno (22 %) i još manje ispitanika svakodnevno (8,7 %). Oko polovine ispitanika (53,5 %) tada nije koristilo vodovodnu vodu za spremanje hrane, dok je druga polovina to radila povremeno (27,5 %) ili svakodnevno (19 %). Za ličnu higijenu (pranje ruku, zuba, umivanje) 76,7 % ispitanika je svakodnevno koristilo vodovodnu vodu u toku zabrane, dok je 15,4 % to radilo povremeno, a 7,9 % nikad. Vodovodnu vodu u toku zabrane korišćenja za tuširanje svakodnevno je koristilo 80,4 % ispitanika, a 16 % povremeno i svega 3,6 % nikada (Graf. 24).



Grafikon 24. Upotreba vodovodne vode u toku zabrane korišćenja prema Anketi

4.3.4. Promene vodovodne vode u toku zabrane korišćenja

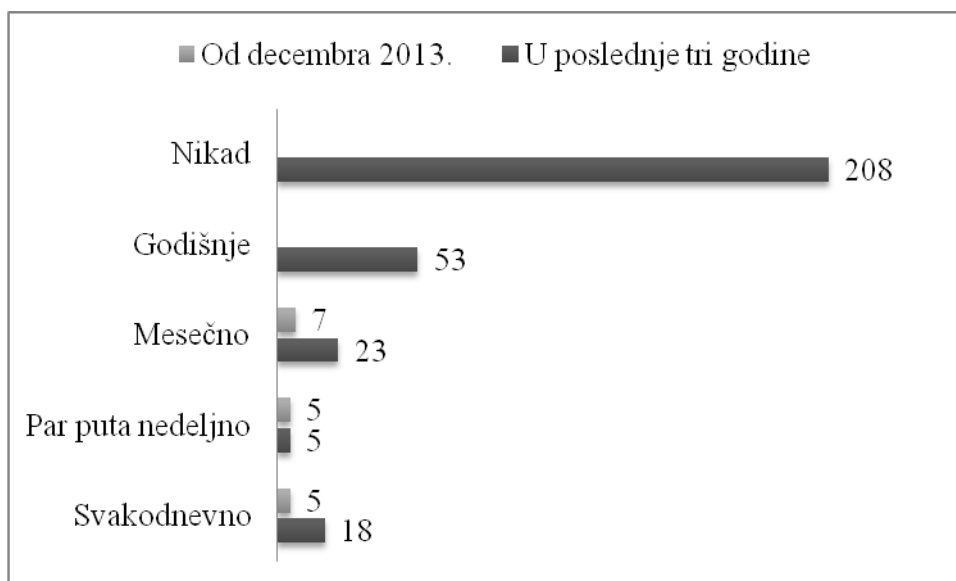
Nešto manje od polovine (45 %) ispitanika (od 305 koji su odgovorili na ovo pitanje) je iznelo da je vodovodna voda u toku zabrane korišćenja ostala ista, dok je druga polovina primetila promene organoleptičkih svojstava vodovodne vode. Ispitanici su prvenstveno primetili promenu mirisa (119 ispitanika), pa ukusa (93), a neki su uočili i promenu boje vode (56) (Graf. 25).



Grafikon 25. Odgovori na pitanje o promenama karakteristika vodovodne vode tokom zabrane korišćenja prema Anketi

4.3.5. Konzumacija ribe iz jezera Vrutci

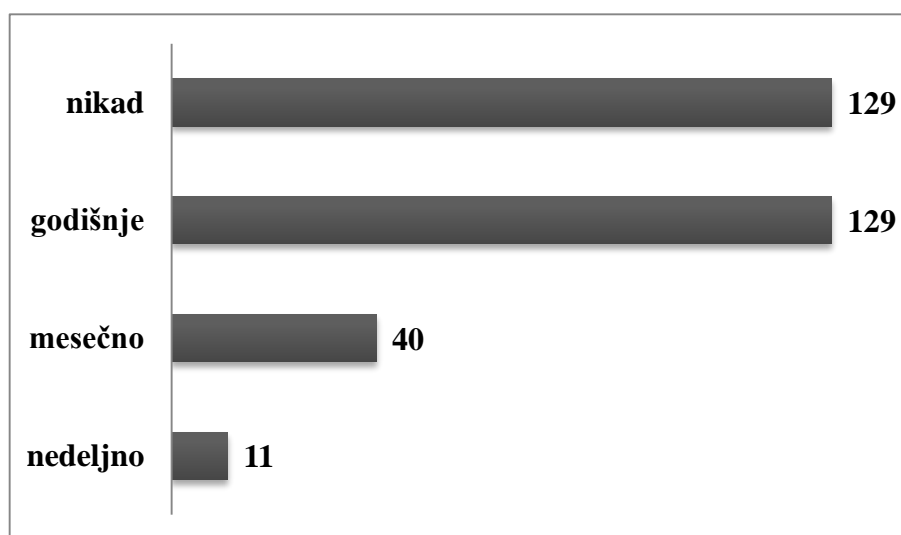
Procenat ispitanika koji u poslednje tri godine nisu konzumirali ribu iz jezera Vrutci iznosio je 68 %. Sa druge strane, na godišnjem nivou 17 % ispitanika je konzumiralo ribu iz ovog jezera. Na mesečnom nivou se uočava pad konzumacije, jer se pre decembra 2013. godine 23 ispitanika hranilo ribom, dok se nakon decembra taj broj smanjio na 7, mada je broj ispitanika u svakom slučaju bio nizak. Na nedeljnom nivou broj ispitanika koju su konzumirali ribu je bio i ostao nizak (5). Treba napomenuti da postoji 18 (5,9 %) ispitanika koji su se tokom poslednjih godina svakodnevno hranili ribom, a njih 5 to još uvek praktikuje i nakon cvetanja u decembru 2013. godine (Graf. 26).



Grafikon 26. Upotreba ribe iz jezera Vrutci u ishrani ispitanika prema Anketi

4.3.6. Boravak ispitanika na jezeru Vrutci

Od 309 ispitanika koji su odgovorili na ovo pitanje, njih 41,7 % nikada ne posećuje jezero Vrutci, isti procenat posećuje jezero sezonski na godišnjem nivou, 12,9 % na mesečnom i 3,6 % na nedeljnom nivou (Graf. 27).



Grafikon 27. Boravak ispitanika na jezeru Vrutci prema Anketi

4.3.7. Aktivnosti kojim se ispitanici bave na jezeru Vrutci

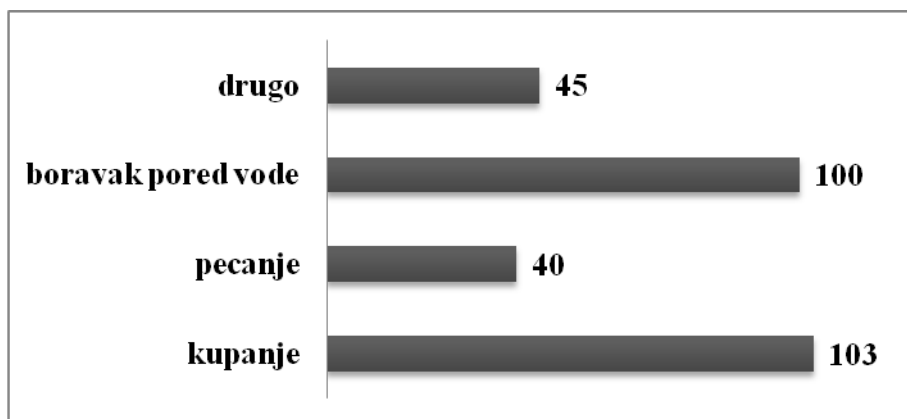
Od 213 ispitanika, najveći broj je odgovorio da se kupa u jezeru (103 ispitanika) i provodi vreme pored vode (100), neki se bave pecanjem (40) ili drugim aktivnostima (Graf. 28), kao što su naveli:

- šetnja,
- planinarenje,
- biciklizam
- veslanje

jedan ispitanik je odgovorio da od 2013. ne ide na jezero,

a tri su navela:

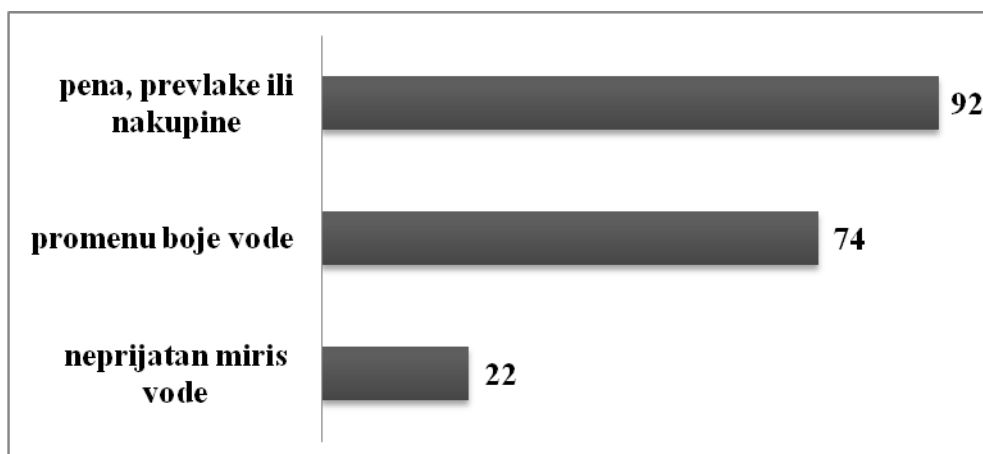
- “Ni sa čim se ne bavim na jezeru, jer to nije mesto za boravak, tu vodu treba piti”
- “Ne posećujem jezero Vrutci, apsurd je da se kupaju u vodi koju koristimo za piće”
- “Ne idem na jezero, jer mi nikad nije bilo logično da se kupam u jezeru iz kog pijem vodu!”



Grafikon 28. Aktivnosti kojima se ispitanici bave na jezeru Vrutci prema Anketi

4.3.8. Promene vode jezera Vrutci

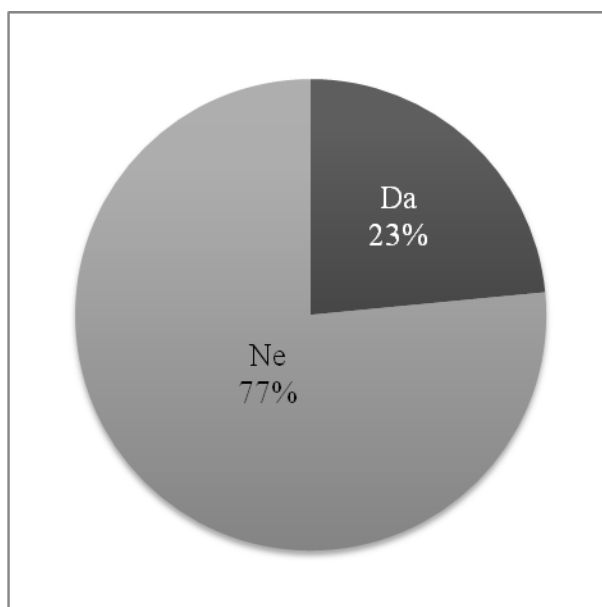
Promene u vodi jezera primetilo je 146 ispitanika i to prvenstveno u vidu pojave pene, prevlaka ili nakupina (92 ispitanika), zatim i promene boje vode (74), dok je manji broj ispitanika (22) osetio neprijatan miris vode jezera (Graf. 29).



Grafikon 29. Uočene promene vode jezera Vrutci prema Anketi

4.3.9. Kontakt ispitanika sa vodom tokom promena

Od 196 ispitanika koji su odgovorili na ovo pitanje, njih 46 (23 %) su došli u kontakt sa vodom tokom pomenutih promena (Graf. 30).

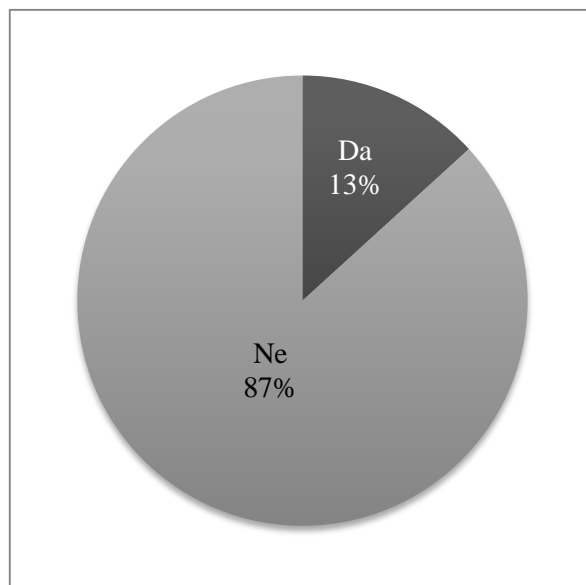


Grafikon 30: Procenat ispitanika koji su došli u kontakt sa promenama vode u jezeru Vrutci prema Anketi

4.3.10. Uginule životinje u vodi ili van vode jezera Vrutci

Na jezeru Vrutci od 219 ispitanika, 29 (13 %) je videlo uginule životinje (Graf. 31) i to:

1. ribu (16 ispitanika),
2. patke,
3. pevcu,
4. jastreba,
5. ovna,
6. ovcu,
7. kozu,
8. kravu,
9. konja,
10. jazavca

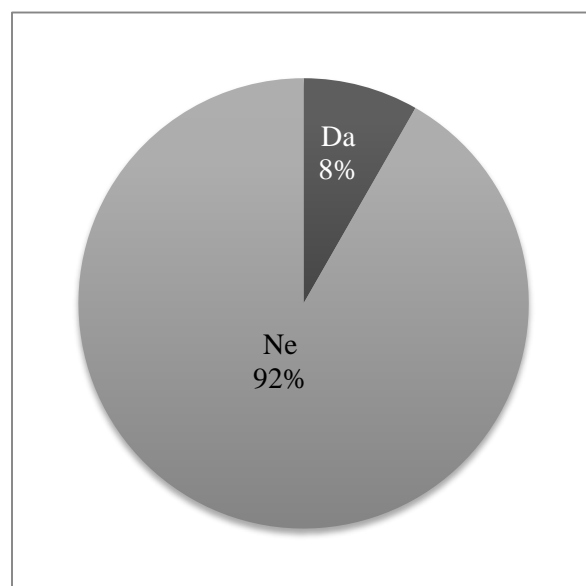


Grafikon 31. Procenat ispitanika koji su videli uginule životinje u vodi ili van vode prema Anketi

4.3.11. Kontakt životinja ispitanika sa vodom iz jezera Vrutci

Na ovo pitanje odgovorilo je 249 ispitanika, od toga 21 odnosno 8 % potvrdno (Graf. 32) i naveli su sledeće životinje:

- psi (13 ispitanika)
- zec
- ribe u akvarijumu,
- preko vodovodne mreže za piće, živina, kunići, psi, mačka

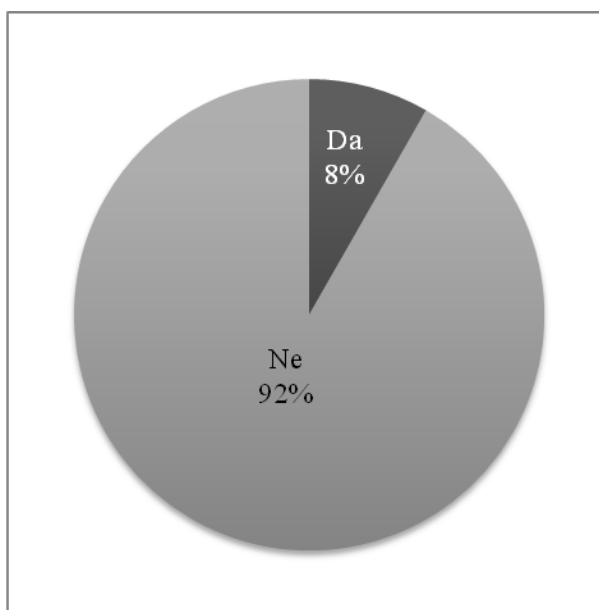


Grafikon 32. Procenat ispitanika čije su životinje došle u kontakt sa vodom iz jezera prema Anketi

4.3.12. Zdravstveni problemi životinja nakon kontakta sa vodom

Zdravstvene probleme životinja nakon kontakta sa vodom potvrdilo je 13 ispitanika (8 %) (Graf. 33) i navedeni problemi su bili:

- promene na koži crvenilo, iritacija i kraste (3 ispitanika)
- manja alergija
- bol u stomaku
- uginule su (ribe u akvarijumu)



Grafikon 33. Procenat životinja koje su imale zdravstvene probleme nakon kontakta sa vodom prema Anketi

4.3.13. Zdravstveni problemi ispitanika u poslednje tri godine

Najčešći zdravstveni problemi ispitanika u poslednjih par godina su bili: stomačne tegobe, iritacije kože, učestale glavobolje i iritacije očiju (Graf. 34). Drugi navedeni zdravstveni problem bili su: vrtoglavica, problemi sa pritiskom, sa mokraćnom bešikom, kancer uterusa, nadutost, alergija krajnika, suv kašalj, povećan broj mladeža, problemi usled starosti (Tabela 16).



Grafikon 34. Zdravstveni problemi ispitanika u poslednje tri godine prema Anketi

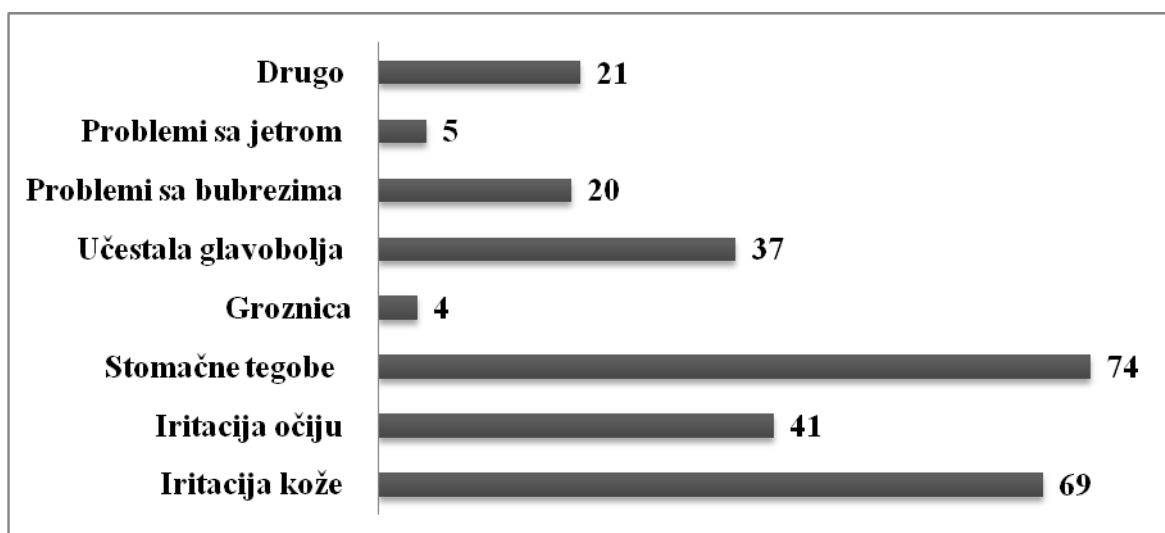
Tabela 16. Navedena oboljenja ispitanika u poslednje tri godine

Iritacije kože (osip, crvenilo)	Iritacije očiju (suzenje, crvenilo)	Stomačne tegobe	Groznica	Učestale glavobolje	Problemi sa bubrezima	Problemi sa jetrom	Drugo
alergija, alergija, alergija, svrab, alergijska reakcija uzrok nije utvrđen, česte alergije, dermatitis, ekcem od rođenja, nekakvu vrstu "šuge", neprecizirana "klasična" prolečna alergija na polen ili nešto slično, osipi po koži od mačke, perutanje kože po licu i glavi, pojava osipa po licu, promene na koži	prolečna alergija na polen, konjuktivit, od alergije iritacije očiju	candida u crevima, česte stomačne tegobe, dijareja, dijareja, gorušica, helicobacter pylori, mučnina, nekoliko puta grčeve i proliv, od pokvarene čorbe, preosetljiv želudac, nadimanje stomaka	prehlada, temperature,	glavobolja, migrena, migrena	cistitis, kamen, kamen, kamen, karcinom desnog bubrega, pesak, pesak, pesak, pesak, pesak u bubrezima	blago uvećanje jetre, masna jetra, povećane transaminaze nepoznatog uzroka, u novembru mesecu....a to se desava zbog trovanja, povećani enzimi, upala	alergija na krajnicima, bakterije u mokraćnim kanalima, kamen u zučnoj kesici, karcinom materice, nesvestica, nesvestica, operacija zučne kese, povećani broj mladeža, pritisak, pritisak, pritisak, pritisak, staračke tegobe, suvi kašalj u trajanju od pola godine

4.3.14. Zdravstveni problemi ispitanika od decembra 2013. godine

Najčešći zdravstveni problemi ispitanika od decembra 2013. su bili slični: stomačne tegobe, iritacije kože, očiju i učestale glavobolje (Graf. 35). Drugi navedeni zdravstveni problemi bili su (Tabela 17):

- problem sa mokraćnom bešikom, pritiskom, vrtoglavica, dugotrajan suv kašalj



Grafikon 35. Zdravstveni problemi ispitanika nakon decembra 2013. godine prema Anketi

Tabela 17. Navedena oboljenja ispitanika nakon decembra 2013. godine

Iritacije kože (osip, crvenilo)	Iritacije očiju (suzenje, crvenilo)	Stomačne tegobe	Groznica	Učestale glavobolje	Problemi sa bubrezima	Problemi sa jetrom	Drugo
alergija, alergija, svrab, alergijska reakcija uzrok nije utvrđen, ekcem i svrab, perutanje kože po licu i glavi, pojava osipa po licu	konjuktivit, infekcija kapka	dijareja, dijareja, mučnina, preosetljivost na sveže prskano povrće, ponovna pojava kandidate		bolovi glave, migrena, migrena	pesak, pesak	blago uvećanje jetre, upala, povećane transaminaze AST i GOT	operacija žučne kese, kamen u žučnoj kesici, suvi kašalj u trajanju od pola godine, pritisak, pospanost, nesvestica

4.3.15. Zdravstveni problemi ostalih članova porodice

Najčešći zdravstveni problemi članova porodice ispitanika su bile stomačne tegobe i to više nakon decembra 2013 (pre 49 i posle 71).

Zatim, česte su bile iritacije kože koje su takođe bile nešto učestalije nakon decembra (41 odnosno 51 član porodice),

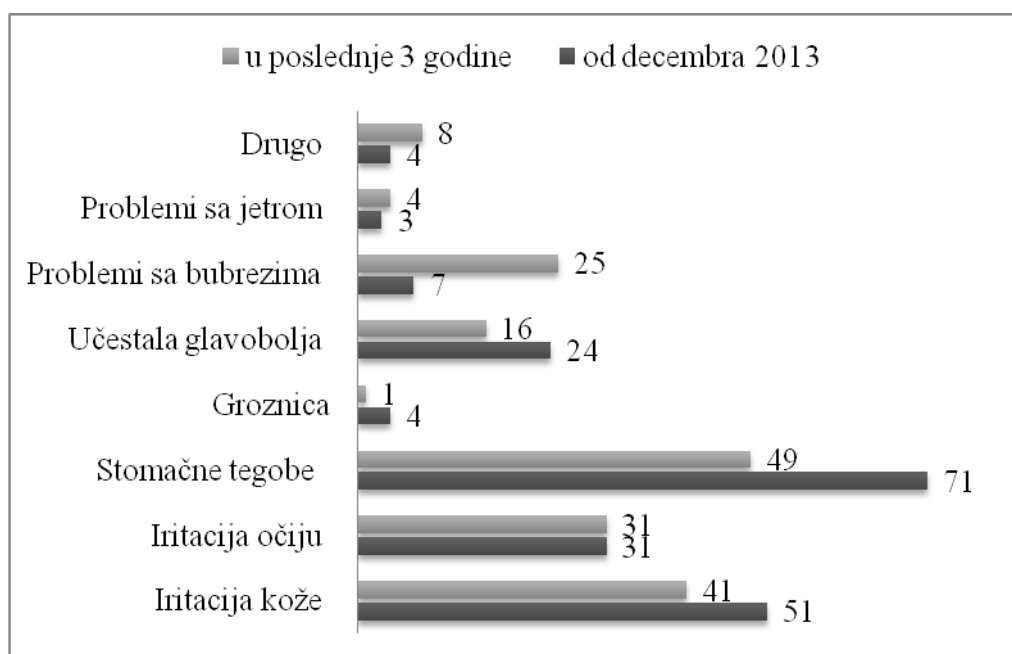
Iritacija očiju je bilo podjednako pre i posle decembra 2013. godine (31).

Učestale glavobolje (16 pa 24) i groznica (1 pa 4) su bile nešto češće nakon cvetanja, mada generalno u manjem broju.

Obrnut slučaj je bio kod problema sa bubrežima (25 pa 7) i jetrom (4 pa 3), ali ove zdravstvene komplikacije su inače sporadične (Graf. 36).

Što se drugih zdravstvenih problema tiče, navedeni su:

- problem sa pritiskom, venama, prostatom, čir i nesvestica



Grafikon 36. Zdravstveni problemi članova porodice ispitanika prema Anketi

4.4. Cijanotoksini u akumulaciji za vodosnabdevanje grada Užica

4.4.1. Rezultati toksičnosti uzoraka biomase i vode

Artemija test je rađen na biomasi iz jezera Vrutci, vodi iz jezera i vodi iz Užičkog vodovoda. Rezultati testa su prikazani u Tabeli 18.

Tabela 18. Mortalitet račića (%) u uzorcima biomase i vode iz Užica nakon 24 h.

Uzorcima biomase i vode	Mortalitet nakon 24 h %
Filtrat (biomasa)	94,6
Biomasa-100 μ L ekstrakta	97,7
Biomasa-75 μ L ekstrakta	97,7
Biomasa-50 μ L ekstrakta	94,6
Biomasa-25 μ L ekstrakta	77,4
Biomasa (sonikacija i centrifugiranje)	74,6
Voda jezero 14 m dubine	26,8
Voda jezero 10 m dubine	4,9
Voda jezero 4 m dubine	0
Vodovodna voda	0
Kontrola artemija	5,4
Kontrola metanol	2,3

Toksičnost biomase je testirana na tri načina, pri čemu je nakon 24 h najveću toksičnost pokazao intracelularni sadržaj (97,7 %), koji je zbog izrazite obojenosti i visoke toksičnosti rađen u razblaženjima, pri čemu je samo u 25 μ L ekstrakta uočen značajan nivo toksičnosti (77,4 %), a u svim preostalima je bila zabeležena vrlo visoka toksičnost (94,6-97,7 %). Takođe, ekstracelularna toksičnost (filtrat) je bila vrlo visoka (94,6 %). Biomasa koja je bila pripremljena odmrzavanjem/zamrzavanjem, sonikacijom, centrifugiranjem, bez filtriranja i ekstrakcije metanolom, imala je značajan nivo toksičnosti (74,6 %), međutim niži od toksičnosti intracelularne i ekstracelularne komponente jer delimičnom pripremom ovog uzorka nisu oslobođeni svi toksini.

Voda sa različitih dubina jezera je pokazala različit stepen toksičnosti, pri čemu je najveći nivo toksičnosti konstatovana na dubini od 14 m (26,8 %), nizak na 10 m (4,9 %), dok na 4 m nije ispoljena toksičnost. Takođe i vodovodna voda nije ispoljila toksičnost na račiće.

Nakon 24 h mortalitet račića u kontroli sa metanolom je iznosio 2,3 %, a bez metanola 5,4 %. Nakon 48 h mortalitet u kontroli bez metanola je bio viši i iznosio je 12 % kao i sa metanolom 13 %.

Usled višeg mortaliteta u kontroli nakon 48 h u uzorcima biomase nakon oduzimanja kontrole, mortalitet je prividno bio niži i nivo toksičnosti je bio značajan. Isto je zabeleženo u uzorku jezerske vode na dubini od 14 m, dok je na nižim dubinama (10 m i 4 m) i u vodovodnoj vodi mortalitet bio nizak, odnosno toksičnost nije zabeležena ni nakon 48 h.

4.4.2. Rezultati detektovanih mikrocistina u uzorcima vode, biomase i tkiva ribe iz Užica

4.4.2.1. Uzorci biomase i vode

LC-MS/MS analiza biomase i vode iz Užica je pokazala prisustvo mikrocistina u uzorcima, što je prikazano u Tabelama 19 i 20.

Tabela 19. Detektovani tipovi mikrocistina u uzorcima (mg/L) biomase iz Užica

Uzorak	dmRR	RR	YR	dmLR	LR	LY	LW	LF
biomasa 1 (bez MeOH)	11,694	-	0,020	3,690	0,053	-	-	-
biomasa 2 (sa MeOH)	18,492	-	0,036	4,564	-	-	-	-

U biomasi 1 sakupljenoj sa jezera Vrutci u januaru 2014. godine zabeleženo je prisustvo nekoliko formi mikrocistina. Najviše je bilo dmMC-RR (11,694 mg/L), zatim dmMC-LR (3,690 mg/L), MC-LR (0,053 mg/L) i MC-YR (0,020 mg/L). Biomasa 2 je takođe uzorkovana u januaru samo je tokom pripreme bila tretirana sa metanolom. Nešto veće vrednosti (dmMC-RR 18,492 mg/L, dmMC-LR 4,564 mg/L, MC-YR 0,036 mg/L) od onih zabeleženih u biomasi 1 bez metanola, se mogu pripisati dejstvu ekstrakcionog sredstva koji je oslobodio veće količine toksina.

Tabela 20. Detektovani dmMC-RR u uzorcima vode iz Užica

Uzorak	dmMC-RR µg/L
vodovodna voda januar	5,7
jezerska voda april	2,1

Prema rezultatima analize toksina u uzorcima vode, koji su dobijeni u Laboratoriji "Demokritos", Grčka (Tabela 20) u vodovodnoj vodi uzorkovanoj u januaru i jezerskoj vodi uzorkovanoj u aprilu 2014. godine detektovan je dmMC-RR (5,7 odnosno 2,1 µg/L).

4.4.2.2. Uzorci tkiva ribe

U uzorcima tkiva ribe takođe je detektovano prisustvo mikrocistina, a rezultati su prezentovani u Tabeli 21.

Tabela 21. Mikrocistini u tkivima ribe uzorkovane tokom jeseni 2013. i aprila 2014. godine

Uzorak tkiva ribe	Prosek standarda (ng/mg tkiva)		standard 1 <i>Microcystis</i> PCC 7820 ekstrakt (ng/mg tkiva)			standard 2 <i>Microcystis</i> NIES-107 ekstrakt (ng/mg tkiva)			
	dmLR	LR	LY	LW	LF	dmRR	RR	dmYR	YR
Jesen 2013.	-	-	-	-	-	0,018	0,082	-	-
April 1 2014.	0,781	-	-	-	-	6,891	0,066	-	-
April 2 2014.	0,050	-	-	-	-	0,117	-	-	-
Recovery %	93,51	89,87	-	-	-	49,23	37,33	-	-

Mišićno tkivo ribe uzorkovano tokom jeseni 2013. godine sadržalo je 0,082 ng MC-RR po mg mišićnog tkiva i 0,018 ng dmMC-RR po mg mišićnog tkiva ribe.

U uzorcima iz aprila 2014. godine analizirana je kompletna riba (zajedno mišićno tkivo i iznutrice) i u jednom uzorku je pored dmMC-RR (0,050 ng/mg) detektovan i dmMC-LR (0,117 ng/mg).

U drugom uzorku iz aprila su dobijene sve tri pomenute forme mikrocistina: dmMC-LR (0,781 ng/mg), dmMC-RR (6,891 ng/mg) i MC-RR (0,066 ng/mg).

Recovery za ove toksine je iznosio 93,51 % za dmMC-LR, 88,43 % za MC-LR, 49,23 % za dmMC-RR i 37,33 % za MC-RR, što su i očekivane vrednosti.

4.5. Cijanotoksini u ribnjacima na teritoriji Vojvodine

4.5.1. Rezultati koncentracije hlorofila *a* i trofički status ribnjaka

Rezultati koncentracije hlorofila *a* sa odgovarajućim trofičkim statusom (Felfoldy, 1980) u uzorcima vode iz 13 ribnjaka (R1-R13) su prikazani u Tabeli 22.

Tabela 22. Koncentracija hlorofila a (mg/m^3) sa trofičkim statusom u uzorcima vode iz ribnjaka uzorkovanih tokom leta 2011. godine

Ribnjak	Hlorofil a (mg/m^3)	Trofički status (Felfoldy, 1980)
R1	45,63	Mezo-eutrofna
R2	362,01	Politrofna
R3	43,86	Mezo-eutrofna
R4	97,71	Eutrofna
R5	55,11	Eutrofna
R6	35,39	Mezo-eutrofna
R7	47,53	Mezo-eutrofna
R8	336,48	Politrofna
R9	25,41	Mezo-eutrofna
R10	30,84	Mezo-eutrofna
R11	21,87	Mezo-eutrofna
R12	30,46	Mezo-eutrofna
R13	42,47	Mezo-eutrofna

Na osnovu koncentracije hlorofila *a* najveći broj ribnjaka (69 %) je spadao u mezo-eutrofni tip voda (R1, R3, R6, R7, R9-R13), dva ribnjaka (15,4 %) su bila eutrofna (R4 i R5), a dva (15,4 %) politrofna (R2 i R8). Visoke vrednosti hlorofila *a* mogu da ukažu na pojavu cvetanja cijanobakterija.

4.5.2. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize populacije cijanobakterija

Cvetanje cijanobakterija i prisustvo potencijalno toksičnih vrsta je potvrđeno mikroskopskim pregledom uzoraka vode. Detektovane cijanobakterije i broj njihovih ćelija po mL vode iz ribnjaka su navedene u Tabeli 23.

Tabela 23. Prisutne cijanobakterije i njihova brojnost (br.ćelija/mL) u ispitivanim ribnjacima

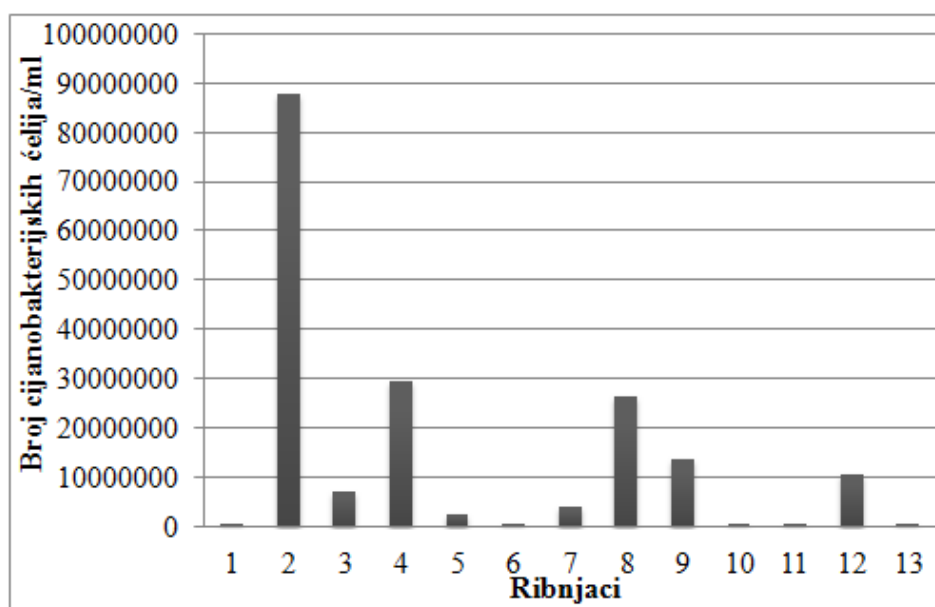
Ribnjak	Cijanobakterije	br.ćelija/mL
R1	<i>Anabaena affinis</i>	+
	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	+
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	113 160
	<i>Planktothrix agardhii</i>	+
	<i>Rhabdogloea</i> sp.	+
	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i>	2 880
R2	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	132 000
	<i>Geitlerinema amphibium</i>	+
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	78 205 440
	<i>Phormidium</i> sp.	579 040
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	+
	<i>Planktothrix agardhii</i>	2 980 760
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	6 068 040
	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> (akineti)	14 160
<i>Synechocystis aquatilis</i>	+	
R3	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	59 200
	<i>Anabaena</i> sp.	+
	<i>Leptolyngbya</i> sp.	6 402 000
	<i>Planktothrix agardhii</i>	568 480
	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> (akineti)	+
R4	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	11 800
	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> (akineti)	840
	<i>Geitlerinema amphibium</i>	+
	<i>Gleocapsa</i> sp.	3 760
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	7 680
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	19 551 360
	<i>Planktolyngbya contorta</i>	+
	<i>Planktothrix agardhii</i>	3 489 880
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	6 337 320
	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> (akineti)	10 440
	<i>Synechocystis aquatilis</i>	+
<i>Woronichinia compacta</i>	+	
R5	<i>Anabaena affinis</i>	+
	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> (akineti)	72 540
	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	108 680
	<i>Arthrospira fusiformis</i>	+
	<i>Geitlerinema amphibium</i>	223 860
	<i>Planktothrix agardhii</i>	1 412 840
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	566 280
	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> (akineti)	260

R6	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Woronichinia radians</i>	220 5 440 4 200
R7	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> (akineti) <i>Aphanocapsa</i> sp. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (akineti) <i>Geitlerinema amphibium</i> <i>Merismopedia</i> sp. <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Nodularia</i> sp. <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Pseudanabaena</i> sp.	+ + + + 3 632 160 14 880 + + 432 000 +
R8	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> <i>Chroococcus</i> sp. <i>Jaaginema subtilissimum</i> <i>Konvophoron constrictum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Phormidium</i> sp. <i>Phormidium tergestinum</i> <i>Planktolyngbya contorta</i> <i>Planktolyngbya limnetica</i> <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Pseudanabaena limnetica</i>	3 960 960 + 3 600 26 068 480 + + 2 320 + 129 000 201 960
R9	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> <i>Chroococcus</i> sp. <i>Jaaginema subtilissimum</i> <i>Merismopedia minima</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Phormidium</i> sp. <i>Planktolyngbya contorta</i> <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Rhabdogloea</i> sp. <i>Synechocystis aquatilis</i>	2 200 1 120 294 000 6 080 13 034 240 + 132 240 + + 32 000
R10	<i>Arthrospira fusiformis</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pseudanabaena limnetica</i> <i>Woronichinia radians</i>	124 800 + 382 800 +
R11	<i>Arthrospira fusiformis</i> <i>Geitlerinema amphibium</i> <i>Gleocapsa</i> sp. <i>Merismopedia</i> sp. <i>Phormidium</i> sp. <i>Planktolyngbya contorta</i> <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Pseudanabaena limnetica</i>	+ + 1 760 8 640 + 4 640 37 840 162 360

R12	<i>Anabaena circinalis</i> <i>Anabaenopsis elenkinii</i> <i>Jaaginema subtilissimum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Planktolynghya contorta</i> <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> (akineti) <i>Woronichinia radians</i>	+ 47 520 8 526 000 + 3 480 2 108 720 18 560 +
R13	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> <i>Anabaenopsis elenkinii</i> (akineti) <i>Gleocapsa</i> sp. <i>Planktothrix agardhii</i> <i>Pseudanabaena limnetica</i> <i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> (akineti)	27 280 3 880 960 9 460 479 160 8 940

(+ prisutne u uzorku)

Najmanji broj ćelija po mL je zabeležen u ribnjaku 6 (9 860), u svim ostalim ribnjacima broj ćelija je bio preko 10 000 po mL. Najviši ukupan broj ćelija cijanobakterija je otkriven u ribnjacima R2 (87 979 440 ćelija/mL), R4 (29 409 320 ćelija/mL) i R8 (26 410 280 ćelija/mL), kao što je prikazano na Grafikonu 37. U navedenim ribnjacima najdominantnija cijanobakterijska vrsta je bila *Microcystis aeruginosa*, sa brojem ćelija 78 205 440, 19 551 360 odnosno 26 068 480 po mL.



Grafikon 37. Ukupan broj cijanobakterijskih ćelija po mL u 13 ribnjaka

4.5.3. Rezultati prisustva cijanotoksina u vodi ribnjaka

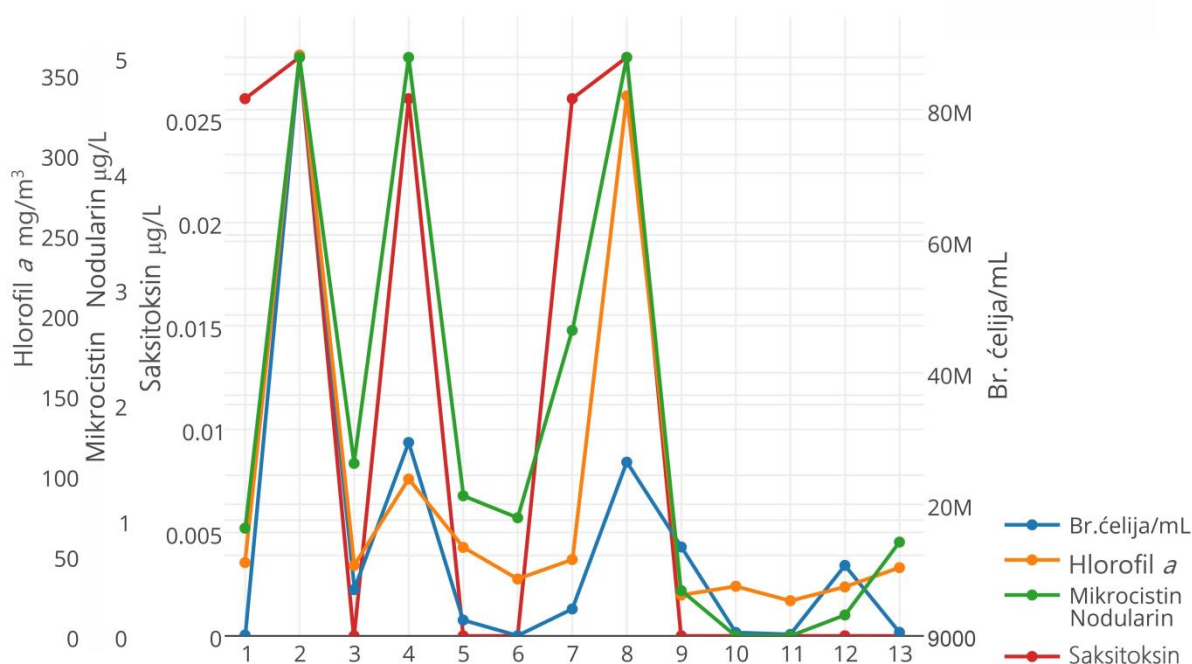
Koncentracije cijanotoksina (mikrocistina, nodularina i saksitoksina) u uzorcima vode iz 13 ribnjaka, detektovane ELISA testovima, su prikazani u Tabeli 24.

Tabela 24. Rezultati koncentracija cijanotoksina u uzorcima vode iz ribnjaka

Ribnjak	Mikrocistin i nodularin ($\mu\text{g/L}$)	Saksitoksin ($\mu\text{g/L}$)
R1	0,93	0,026
R2	>5	0,028
R3	1,49	-
R4	>5	0,026
R5	1,21	-
R6	1,02	-
R7	2,64	0,026
R8	>5	0,028
R9	0,39	-
R10	-	-
R11	-	-
R12	0,18	-
R13	0,81	-

Koncentracije mikrocistina i nodularina su bile veće od koncentracija saksitoksina u svim ispitivanim uzorcima. Saksitoksini su detektovani samo u pet (R1, R2, R4, R7 i R8) od 13 analiziranih uzoraka (38 %) i to u koncentracijama od 0,026 do 0,028 $\mu\text{g/L}$.

Mikrocistini odnosno nodularini su bili detektovani u 11 od 13 uzoraka (85 %). Tri uzorka (R2, R4 i R8) su imala veće koncentracije toksina od granica detekcije za mikrocistin-ADDA ELISA test (>5 $\mu\text{g/L}$), a u cilju dobijanja preciznijih rezultata o koncentraciji ovih cijanotoksina, potrebno je ponoviti analize sa razblaženim uzorcima. U pitanju su upravo jezera u kojima je zabeležena najveća brojnost cijanobakterijskih ćelija po mL vode kao i visoka koncentracija hlorofila *a*. Korelacija ovih vrednosti (broja cijanobakterijskih ćelija po mL, koncentracija hlorofila *a*, koncentracija mikrocistina/nodularina i saksitoksina) je prikazana na Grafikonu 38.



Grafikon 38. Koncentracije cijanotoksina, hlorofila a i ukupnog broja cijanobakterijskih ćelija po mL vode 13 ribnjaka

4.5.4. Rezultati akumulacije mikrocistina u tkivu ribe

Analizirano je prisustvo mikrocistina u mišićnom tkivu ribe iz 10 cvetajućih ribnjaka. Jedinke su imale prosečnu težinu 354 g (minimalna 55 g, maksimalna 758 g), prosečnu totalnu dužinu tela do kraja repnog peraja 270 mm (minimalna 155 mm, maksimalna 360 mm) i standardnu dužinu tela bez repnog peraja 217 mm (minimalna 125 mm, maksimalna 285 mm).

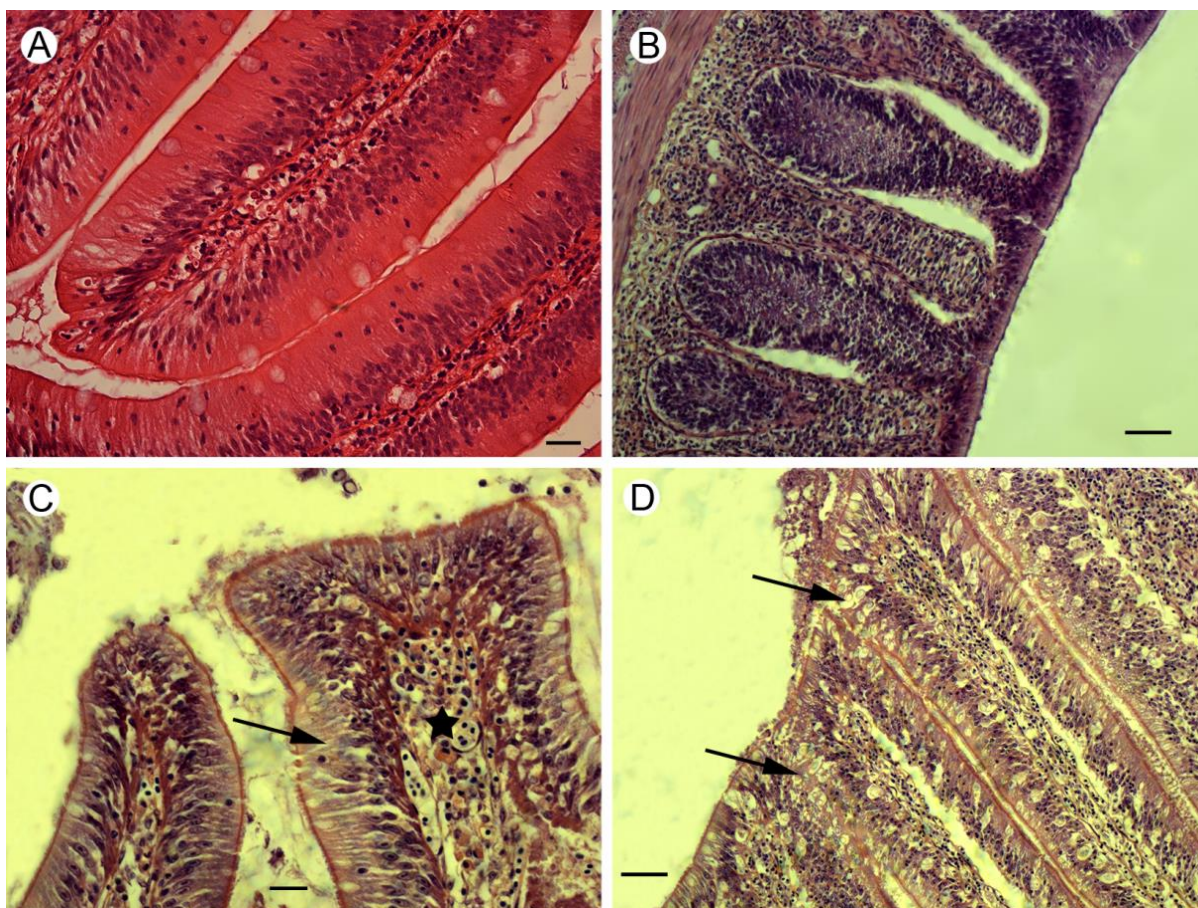
U četiri uzorka mišićnog tkiva šarana od 10 analiziranih (40 %), detektovan je MC-RR i to u koncentracijama oko 0,06 ng/mg (Prilog III-VI). Ostale forme mikrocistina (dmRR, dmLR, LR, dmYR, YR, LY, LW i LF) nisu pronađene u analiziranom mišićnom tkivu ribe.

4.5.5. Rezultati histopatoloških promena u tkivima ribe

Histopatološke promene su uočene na organima (creva, jetra, bubreg, škrge i mišići) šarana (*Cyprinus carpio*) koji su gajeni u cvetajućim ribnjacima.

Riba iz kontrolnih ribnjaka je imala normalnu histologiju creva (Slika 14A). Resice su normalno oblagale lumen, imale su jedan sloj visokih epitelijalnih ćelija sa bazalno postavljenim jedrom i nekoliko peharastih ćelija. Lamina propria je bila tanka između dva sloja epitela.

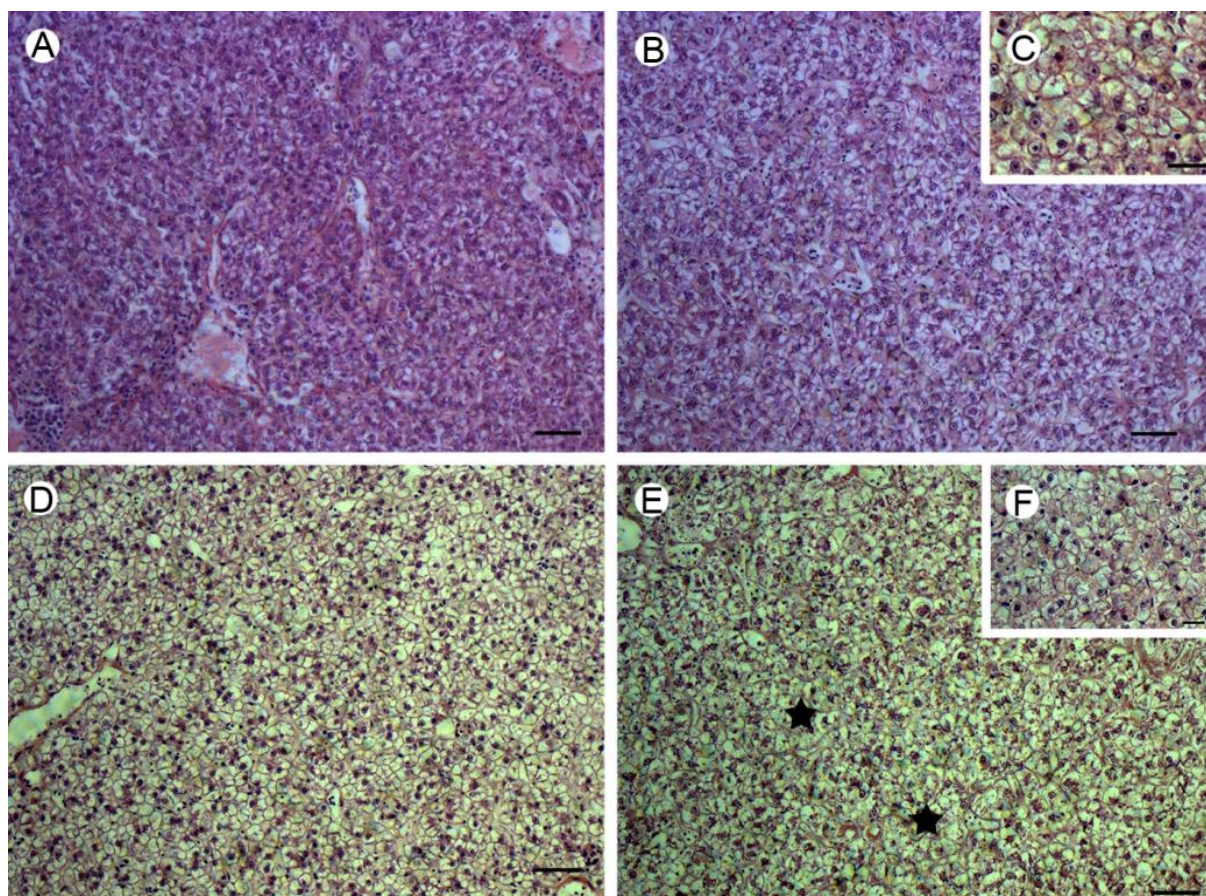
Ribe iz cvetajućih ribnjaka su ispoljavale nekoliko alteracija. Najizraženija promena je bila hiperplazija epitelijalnih ćelija koja je najčešće vodila do fuzije resica (Slika 14B). Edematozne promene koje su uočene u lamini propriji vodile su do njenog zadebljanja (Slika 14C). U epitelijalnim ćelijama su bile vidljive vakuoalizacije i nekroze (Slika 14C, D). Ćelije su imale piknotička jedra i nedovoljno jasne granice (Slika 14D). Osim toga, epitelne ćelije u epikalnom delu resica su bile zahvaćene deskvamacijom što je ukazalo na nekrotični enteritis.



Slika 14. Histopatološke promene u crevima *Cyprinus carpio* (A) Riba iz kontrolnih ribnjaka. (B-D) Riba iz cvetajućih ribnjaka: (B) hiperplazija epitelijalnih ćelija koje dovode do fuzije resica, (C) edematozne promene u lamini propriji što dovodi do debljanja (zvezdica) i vakualizacije enterocita (strelica), (D) nuklearna liza i nekroza. H&E. Razmere: A, B, D-50 μm ; C-20 μm . (Foto: Lujić J. i Marinović Z.)

Jedinke iz kontrolnih ribnjaka imale su normalnu histologiju **jetre** sa tipičnom strukturom parenhima sa pravilno organizovanim hepatocitima raspoređenim oko krvnih sudova i sinusoida (Slika 15A). Hepatociti su bili poligonalni i sa jasno diferenciranim jedrom. Međutim, kod manjeg broja jedinki je došlo do pojave blagih vakuolizacija.

Jedinke iz cvetajućih ribnjaka ispoljile su nekoliko histopatoloških promena u tkivu jetre (Slika 15). Najizraženija promena je bila gubitak pravilne strukture parenhima (Slika 15B), zaobljavanje ćelija (Slika 15C) i vakuolizacija (Slika 15D). Mnoge ćelije su imale agranulisanu citoplazmu. Uočena su i nekrotična polja (Slika 15E) kao i ćelije sa piknotičkim jedrima (Slika 15F), a u nekim slučajevima i nuklearna liza kao i liza ćelijskih membrana.

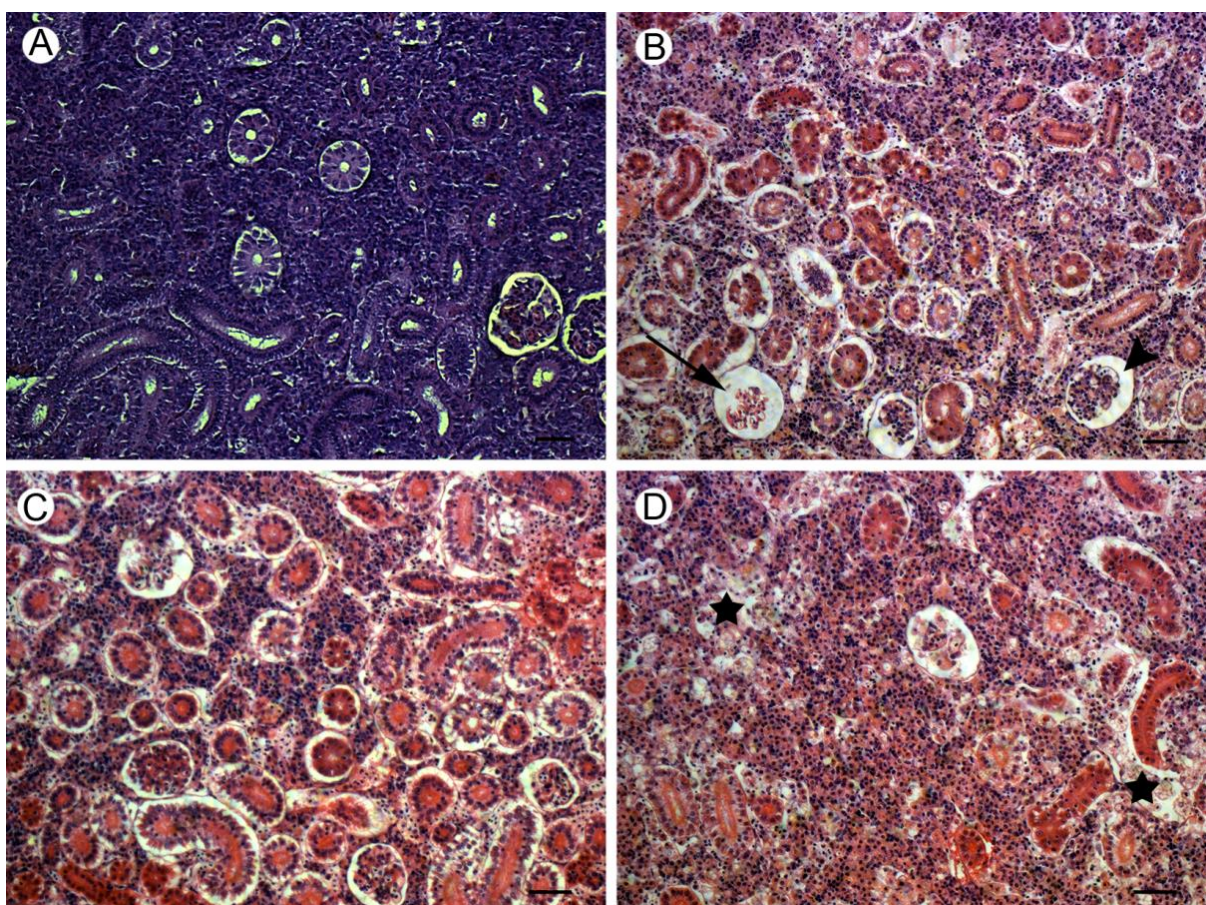


Slika 15. Histološke promene u jetri *Cyprinus carpio*. (A) Riba iz kontrolnih ribnjaka. (B-F) Riba iz cvetajućih ribnjaka: (B) gubitak tipične strukture parenhima, (C) zaobljavanje ćelija, (D) ćelije sa agranulisanom citoplazmom i vakualizacijama, (E) izražena nekrotična polja (zvezdice) sa ćelijama sa kariopiknozom i kariolizom, (F) ćelije sa piknotičkim jedrom. H&E. Razmere: A, B, C, D-50 μ m; E, F-20 μ m. (Foto: Lujčić J. i Marinović Z.)

Jedinke iz kontrolnih ribnjaka imale su normalnu histološku sliku **bubrega** (Slika 16A). Bubrežne korpuskule imale su relativno velike glomerule i tanak interkapsularni prostor Bowmanove kapsule. Bubrežni tubuli su imali jedan sloj visokih kolumnarnih epitelijalnih ćelija sa proksimalnim segmentima koji su imali tipične trepljave nastavke i

bazalno postavljena jedra, dok su distalni segmenti imali centralno postavljena jedra i nisu imali trepljave nastavke. Čak je i kod kontrolnih jedinki primećeno blago začepljenje tubula i blaga vakuolizacija ćelija u zidovima tubula.

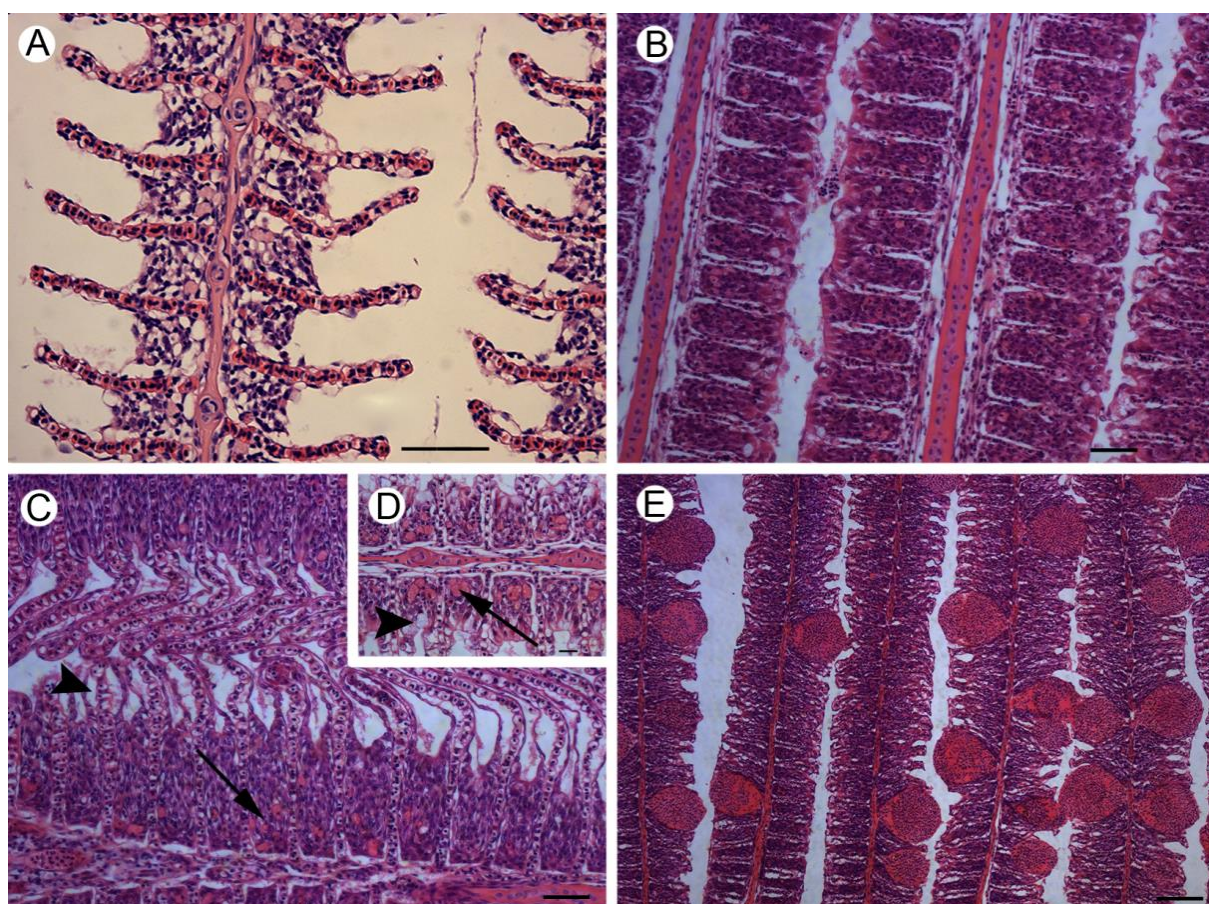
Jedinke iz ribnjaka koji su cvetali ispoljile su patologije bubrežnih korpuskula, tubula, kao i intersticijuma (Slika 16). Uočena je degeneracija u vidu smanjenja glomerula, kao i glomerularne nekroze koji uključuje nekrozu mezengijalnih ćelija i visceralnog sloja Bovmanove kapsule (Slika 16B). Ovo smanjenje veličine glomerula dovelo je do dilatacije interkapsularnog prostora Bovmanove kapsule (Slika 16B). Tubularne epitelijalne ćelije su ispoljile različite nivoe degeneracije. Promene ovih ćelija su uključivale vakuolizaciju, odlublivanje epitelijalnog sloja od bazalne lamine, začepljenje tubula (u nekim slučajevima bilo je zapušeno 90 % tubula) i nekrozu (Slika 16C); ćelije su smatrane nekrotičnim kada su imale piknotička jedra i kad se nije mogla uočiti granica ćelija, što je indikativno za lizu ćelijske membrane. Nekroza i hializacija intersticijuma su bili evidentni (Slika 16D), kao i krvarenje i infiltracija leukocita.



Slika 16. Histopatološke promene u bubregu *Cyprinus carpio* (A) Ribe iz kontrolnih ribnjaka (B-D) Ribe iz cvetajućih ribnjaka: (B) glomerularna nekroza (strelica) i dilatacija interkapsularnog prostora Bovmanove kapsule (vrh strelice), (C) degeneracija tubula uključujući vakuolizaciju, odvajanje epitelijalnog sloja od bazalne lamine, začepljenje tubula i nekroza, (D) nekroza i hializacija intersticijuma (zvezdica). H&E. Razmere: A, B, C, D-50 μ m. (Foto: Lujčić J. i Marinović Z.)

Riba iz kontrolnih ribnjaka imala je relativno normalnu histologiju **škrga** (Slika 17A). Lamelle su uredno bile postavljene sa obe strane filamenata i prekrivene jednim slojem epitelijalnih ćelija. Interlamelarna ćelijska masa sadržala je epitelijalne ćelije i manje hloridnih i mukoznih ćelija. Nekoliko riba je pokazalo blago odizanje epitela.

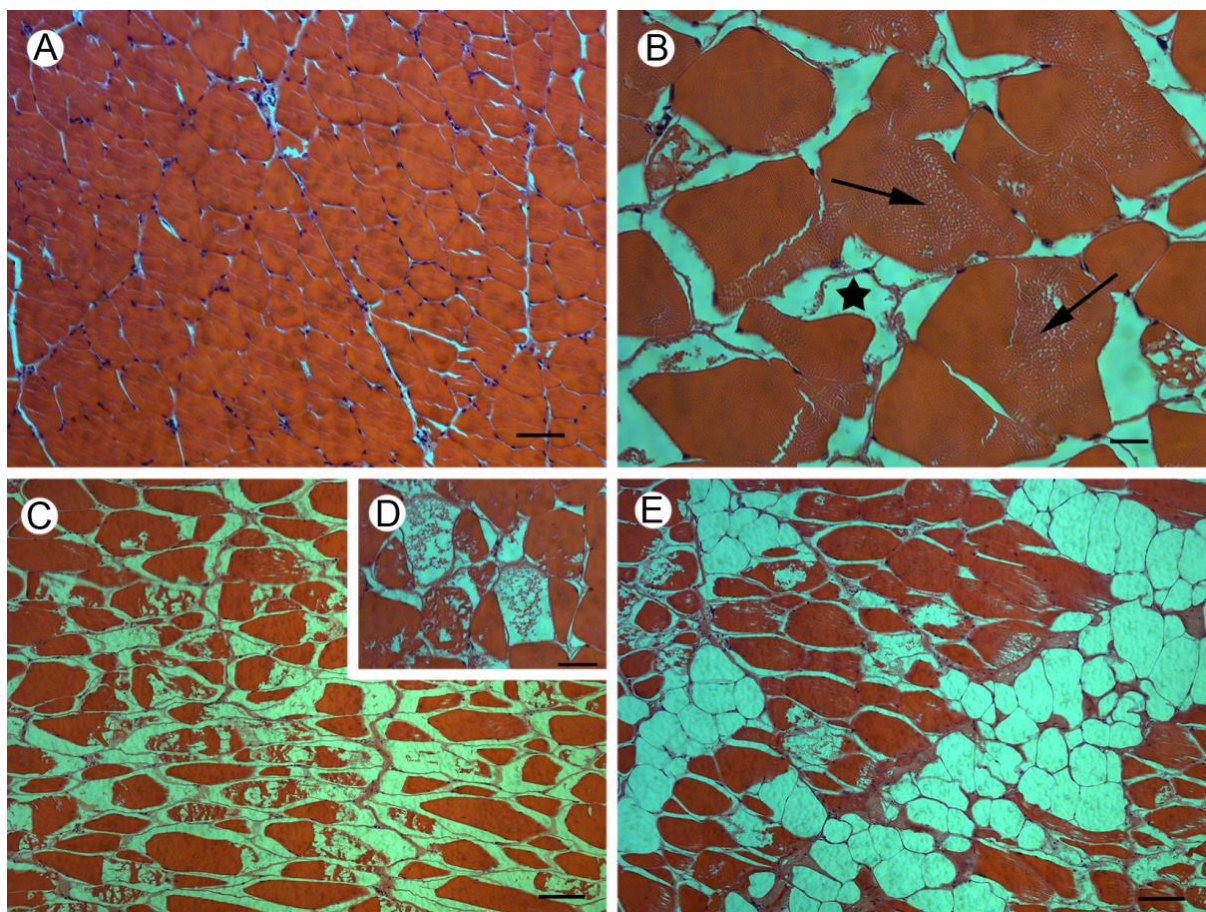
Škrge riba iz cvetajućih ribnjaka imale su nekoliko promena. Hiperplazija epitela je bila veoma izražena i vodila je do potpune fuzije lamela (Slika 17B). Takođe, zabeležene su hiperplazije i hipertrofije hloroidnih ćelija lokalizovanih pri bazi interlamelarne ćelijske mase (Slika 17C i D), i mukoznih ćelija koje su se nalazile pri vrhu interlamelarne ćelijske mase (Slika 17D). Odlublјivanje epitela je takođe bilo očigledno (Slika 17C) kao i telangiektazije (Slika 17E).



Slika 17. Histopatološke promene u škrgamma *Cyprinus carpio*. (A) Riba iz kontrolnih ribnjaka. (B-E) Riba iz cvetajućih ribnjaka: (B) Hiperplazija epitelijalnih ćelija koja vodi do kompletne fuzije lamela, (C) hiperplazija hloroidnih ćelija (strelica) i odizanje epitela (vrh strelice), (D) hiperplazija i hipertrofija hloroidnih ćelija (strelica) i mukoznih ćelija (vrh strelice), (E) telangiektazije. H&E. Razmere: A, E-100 μ m; B, C-50 μ m; D-20 μ m. (Foto: Lujčić J. i Marinović Z.)

Jedinke iz kontrolnih ribnjaka prikazale su normalnu histologiju **mišića** (Slika 18A). Preseci su pokazali okrugla mišićna vlakna, kompaktno sakupljena i homogena.

Jedinke iz cvetajućih ribnjaka su prikazale nekoliko izraženih promena. Pojedinačna mišićna vlakna su bila diskonektovana (Slika 18B), dok su mišićne fascikule često bile odignute sa perimisiuma (Slika 18B). U nekim slučajevima perimisium je bio zadebljao. Nekroza je bila evidentna na pojedinačnim mišićnim vlaknima (Slika 18C) dok su u nekim slučajevima kompletne fascikule bile nekrotične (Slika 18D). Pored navedenog, bile su uočljive i masne inkluzije u ćelijama (Slika 18E).



Slika 18. Histopatološke promene u mišićima *Cyprinus carpio*. (A) Riba iz kontrolnih ribnjaka. (B-E) Riba iz cvetajućih ribnjaka: (B) mišićna vlakna su diskonektovana i nisu kompaktno sakupljena (strelica), u nekim slučajevima mišićna fascikula je bila odignuta od perimisiuma (zvezdica), (C) nekroza mišićnog vlakna i u nekim slučajevima mišićne fascikule (D), (E) masne inkluzije. H&E. Razmere: A, D-50 μm ; B-20 μm ; C, E-100 μm . (Foto: Lujić J. i Marinović Z.)

4.6. Rezultati prisustva cijanotoksina u vodi Aleksandrovačkog jezera

Analizama LC-MS/MS i HPLC-DAD vode iz Aleksandrovačkog jezera uzorkovane na dva lokaliteta 15.11.2012. i 23.12.2012. godine, nisu detektovani ispitivani cijanotoksini: mikrocistini, cilindrospermopsin i saksitoksin.

4.7. Cijanotoksini u tkivu biljaka zalivanih kulturom cijanobakterija

4.7.1. Rezultati akumulacije mikrocistina u eksperimentalnoj biljci

U listovima eksperimentalnih biljaka (*Capsicum anuum*) zalivanih ekstraktom mikrocistisa nije detektovano prisustvo mikrocistina. Međutim, nekoliko formi ovog toksina (dmMC-LR, MC-LR, dmMC-RR, MC-RR i MC-YR) su pronađeni u plodovima ljute papričice. Dobijene su koncentracije pet formi mikrocistina: i to najviše je bilo MC-RR (0,241 ng/mg) i MC-LR (0,118 ng/mg), zatim dmMC-LR (0,077 ng/mg), MC-YR (0,066 ng/mg) i dmMC-RR (0,051 ng/mg) (Tabela 25).

Tabela 25. Koncentracije mikrocistina u delovima eksperimentalne biljke detektovane pomoću LC-MS/MS

Tkivo biljke	Prosek standarda (ng/mg tkiva)		standard 2 <i>Microcystis</i> PCC 7820 ekstrakt (ng/mg tkiva)			standard 1 <i>Microcystis</i> NIES-107 ekstrakt (ng/mg tkiva)			
	dmLR	LR	LY	LW	LF	dmRR	RR	dmYR	YR
List	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plod	0,077	0,118	-	-	-	0,051	0,241	-	0,066
Recovery %	110,9	85,8	-	-	-	24,9	31,3	-	46,5

4.7.2. Rezultati biohemijskih analiza eksperimentalne biljke

Vrednosti intenziteta lipidne peroksidacije u kontrolnim biljkama (K) su bile 70 i 76,7 nmola MDA/g sveže mase, dok su one iz tretmana imale značajno veće vrednosti (96,9 i 90,6 nmola MDA/g) (Tabela 26).

Tabela 26. Intenzitet lipidne peroksidacije u listovima i plodovima *Capsicum anuum* izložene mikrocistinima (izražen u nmola MDA/g sveže mase).

Lipidna peroksidacija	srednja vrednost	greška srednje vrednosti	koeficijent varijacije (%)
K list	76,7	2,0	3,9
T list	90,6	3,9	8,8
K plod	70,3	8,6	10,1
T plod	96,9	5,3	13,1

Sadržaj ukupnih fenola, neenzimskih antioksidanata, je bio jednak kod tretiranih (18,18 i 7,75 mg GA/g) i kontrolne biljke (18,77 i 8,30 mg GA/g) što se može videti u Tabeli 27.

Tabela 27. Ukupni fenoli u listovima i plodovima *Capsicum anuum* izložene mikrocistinima (izraženi u mg galne kiseline/g suve mase).

Ukupni fenoli	srednja vrednost	greška srednje vrednosti	koeficijent varijacije (%)
K list	18,77	0,51	4,75
T list	18,18	0,60	5,75
K plod	8,30	0,48	10,07
T plod	7,75	0,27	6,07

Sadržaj ukupnih flavonoida je bio značajno veći u listovima tretiranih biljaka (0,89 mg rutin/g) u odnosu na one iz kontrole (0,16 mg rutin/g). Manje, ali takođe značajno povećanje ukupnih flavonoida zabeleženo je u plodovima tretiranih biljaka (0,11 mg rutin/g) u poređenju sa kontrolom (0,08 mg rutin/g) (Tabela 28).

Tabela 28. Sadržaj ukupnih flavonoida u listovima i plodovima *Capsicum anuum* izložene mikrocistinima (mg rutin/g suve mase)

Flavonoidi	srednja vrednost	greška srednje vrednosti	koeficijent varijacije (%)
K list	0,16	0,04	38,77
T list	0,89	0,17	33,53
K plod	0,08	0,00	3,33
T plod	0,11	0,01	22,27

Ukupna neenzimska aktivnost biljaka određena je putem DPPH-testa. Značajno smanjenje u % neutralisanih DPPH-radikala zabeleženo je u plodu i listu tretiranih biljaka (Tabela 29).

Tabela 29. Antioksidantni kapacitet ekstrakta u listovima i plodovima *Capsicum anuum* izložene mikrocistinima; (DPPH)

DPPH	srednja vrednost	greška srednje vrednosti	koeficijent varijacije (%)
K list	37,1	0,3	1,4
T list	28,1	0,1	0,3
K plod	91,3	0,2	0,4
T plod	80,8	0,1	0,1

Sposobnost ekstrakta da neutrališe superoksid-anjon ($O_2^{\cdot-}$) određuje se na osnovu sposobnosti inhibicije fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijum hlorida (NBT). Značajno smanjenje u % neutralisanih radikala zabeleženo je samo u plodu tretiranih biljaka (Tabela 30).

Tabela 30. Antioksidantni kapacitet ekstrakta u listovima i plodovima *Capsicum anuum* izložene mikrocistinima; (NBT)

NBT	srednja vrednost	greška srednje vrednosti	koeficijent varijacije (%)
K list	73,1	0,6	2,4
T list	75,9	0,4	3,8
K plod	103,1	0,8	5,9
T plod	92,8	0,5	1,7

Značajno samanje neutralisanih hidroksil-radikala ($\cdot OH$) uočeno je u listovima, dok razlike nije bilo u plodovima tretmana i kontrole (Tabela 31).

Tabela 31. Antioksidantni kapacitet ekstrakta u listovima i plodovima *Capsicum anuum* izložene mikrocistinima; ($\cdot OH$) hidroksil-radikal

OH	srednja vrednost	greška srednje vrednosti	koeficijent varijacije (%)
K list	84,6	0,7	1,4
T list	82,4	0,3	0,7
K plod	81,5	0,8	1,7
T plod	82,2	0,2	0,5

4.8. Rezultati analiza mikrocistina u suplementima

Dva suplementa na bazi cijanobakterijske biomase sa našeg tržišta testirana su na prisustvo mikrocistina pomoću LC-MS/MS i dobijene koncentracije su prezentovane u Tabeli 32.

Tabela 32. Koncentracije dmMC-LR i MC-LR u dva suplementa na bazi cijanobakterijske biomase

Suplementi	dmMC-LR (mg/g)	MC-LR (mg/g)
1	-	0,003
2	0,0015	-

U jednom testiranom proizvodu detektovano je 0,003 mg MC-LR po g suplementa, a u drugom 0,0015 mg dmMC-LR po g suplementa. Ostali tipovi ovog toksina (MC-RR, dmMC-RR, MC-YR, dmMC-YR, MC-LY, MC-LW i MC-LF) na koje su suplementi testirani, nisu detektovani i iz tog razloga nisu prikazani u Tabeli 32.

5. DISKUSIJA

5.1. Put izloženosti cijanotoksinima preko vode za piće i rekreaciju

Najviše istraživani medijum životne sredine na prisustvo cijanotoksina je voda, bilo da se radi o vodi za piće ili za rekreaciju. Direktno oralno unošenje i kontakt sa kontaminiranom vodom je jedan od najznačajnijih i najčešćih puteva izloženosti čoveka cijanotoksinima. Ako se koristi voda iz površinske akumulacije tokom cijanobakterijskog cvetanja, moguće je (ili čak verovatno) da je takva voda kontaminirana cijanotoksinima i nekim drugim sekundarnim metabolitima oslobođenim tokom razgradnje ćelija cijanobakterija (Chorus i Bartram, 1999).

Visok nivo rizika za ljudsko zdravlje je povezan sa unošenjem velikih količina cijanotoksina putem vode ili unošenjem malih doza tokom dužeg vremenskog perioda (Svirčev i sar., 2010). Nakon izlaganja ljudi i životinja cijanotoksinima, mogu se manifestovati simptomi kao što su: bol u stomaku, povraćanje, proliv, iritacije kože, slabost, bol u grlu, bledilo sluznice i drhtanje mišića (Chorus i Bartram, 1999). Pored sposobnosti da izazovu akutna trovanja, smatra se da mikrocistini imaju i potencijal da iniciraju kancerogenezu u visokim dozama, kao i da dovedu do promocije tumora usled hroničnog izlaganja niskim koncentracijama mikrocistina u pijaćoj vodi (Svirčev i sar., 2010).

Naučnici u Kini (Yu i sar., 1989; 1989a; 1995; Junshi, 1990) su pronašli moguću vezu između kvaliteta površinske vode za piće i povećanog rizika za razvoj primarnog kancera jetre i hroničnih gastrointestinalnih bolesti. U Kini incidenca primarnog kancera jetre je veoma visoka, što se prvo dovodilo u vezu sa hepatitisom B i aflatoksinima (Yu, 1995). Međutim, vršeno je epidemiološko ispitivanje u Haimen, Quidong i Nanhui (Kina) u cilju procene kvaliteta izvora pijaće vode i rizika za primarni kancer jetre, pri čemu je dobijeno statistički značajno povećanje rizika pojave ove bolesti u regionima koji se snabdeavaju površinskom vodom, nasuprot regiona u kojima se površinske akumulacije ne koriste za piće. Prelaskom sa površinskih na dubinsko-bunarske izvore vode došlo je do smanjenja u smrtnosti od primarnog kancera jetre, dok se u regionima sa mešanom upotrebom površinske i bunarske vode nije primetila promena u mortalitetu tokom istog vremenskog perioda. Monitoringom površinskih izvora vode za piće registrovani su visoki nivoi mikrocistina i cijanobakterija, što nije bio slučaj sa drugim izvorima vode. Ueno i saradnici (1996) su postulirali da kombinacija hepatokancerogena, kao što su aflatoksini u ishrani sa

mikrocistinima iz vode za piće, može dati objašnjenje za visoke incidence ove maligne bolesti.

Stopa incidence kolorektalnog kancera u Kini je takođe bila značajno veća kod populacije koja je pila vodu pripremljenu iz reka i površinskih akumulacija od onih koji su pili podzemnu bunarsku vodu. Time je ponovo kvalitet vode povezan sa učestalosti, u ovom slučaju kancera debelog creva, a to može biti u vezi sa kontaminacijom vode za piće sa mikrocistinima (Zhou i sar., 2002). Ove epidemiološke studije u Kini upućuju na neophodna dalja epidemiološka istraživanja drugih malignih oboljenja i na drugim lokacijama u svetu, gde je stanovništvo izloženo cijanobakterijama i cijanotoksičnim metabolitima preko vode za piće.

5.1.1. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje u Srbiji

Prema istraživanju Svirčev i saradnika (2007) od 1980. godine došlo je do cvetanja cijanobakterija u velikom broju rezervoara, jezera i vodotokova (reka i kanala) u Srbiji. Među 83 ispitana vodena ekosistema, 58 su cvetala gotovo svake godine u poslednje dve decenije. Okruzi u Centralnoj Srbiji uglavnom imaju površinske rezervoare za vodosnabdevanje vodom za piće, a koji cvetaju tokom letnjih meseci. Više od 20 rezervoara služe kao izvori vode za piće, a permanentno cvetanje cijanobakterija je detektovano u 9 od njih. Region Vojvodine, s druge strane, ima podzemne sisteme vodosnabdevanja koji nisu kontaminirani cijanobakterijama. Razlike u kvalitetu pijaće vode u ovim regionima mogu biti posledica prisustva cijanotoksina kao proizvod cvetanja cijanobakterija.

U mnogim akumulacijama za vodosnabdevanje u Srbiji (npr. Bovan, Bresnica, Brestovac, Čelije, Garaši, Grlišće, Grošnica, Gruža, Krajkovac, Pridvorica,...) zabeleženo je prisustvo i cvetanje cijanobakterija, a u nekima i prisustvo cijanotoksina (Svirčev i sar., 2014).

Bovan je rezervoar izgrađen na reci Sokobanjska Moravica kod sela Bovan u Nišavskom okrugu. U ovom rezervoaru se beleži cvetanje cijanobakterija još od leta 1994. godine, a vrste koje su najčešće cvetale su *Anabaena solitaria*, *Aphanizomenon flos-aquae* i *Pseudanabaena limnetica* (Sedmak i Svirčev, 2011). Još jedan rezervoar u Nišavskom okrugu koji je zahvaćen cvetanjem je Krajkovac, gde je zabeleženo prisustvo vrsta *Gomphosphaeria lacustris* i *Aphanizomenon flos-aquae* (Čađo i sar., 2004).

U Šumadijskom okrugu na planini Bukulji i rečici Bukulja 1974. godine napravljeno je jezero Garaši, još jedno u nizu zahvaćeno fenomenom cvetanja cijanobakterija. Ovde su

cvetale *Aphanizomenon flos-aquae* i *Microcystis aeruginosa*, a pronađene su *Anabaena affinis* i *Planktothrix agardhii* (Karadžić i sar., 2010; Sedmak i Svirčev, 2011). I u Grošnici, jednom od najstarijih rezervoara za vodosnabdevanje u Srbiji, je zabeleženo prisustvo cijanobakterija (Sedmak i Svirčev, 2011). Jedna od najvažnijih akumulacija za vodosnabdevanje u Šumadijskom okrugu je Gruža, gde se često dešava cvetanje. Prvo je zabeleženo još 1984. godine (Čomić i Ranković, 1991) kada je cvetao *Aphanizomenon flos-aquae*, što se nastavilo i u narednim godinama (Ranković i Čomić, 1989; Ranković i sar., 1994; Ranković i Simić, 2005), a kasnije su pored ove vrste cvetale i *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena solitaria*, *Anabaena constricta*, a pojavljivale su se i *Aphanizomenon issatschenkoi* i *Lyngbya limnetica* (Sedmak i Svirčev, 2011). Perendija i sar. (2011) su tokom cvetanja *Aphanizomenon flos-aquae* u ovoj akumulaciji uočili ultrastrukturne, nekrotične i apoptotičke promene u jetri, kao i efekte na antioksidativne biomarkere kod ribe *Perca fluviatilis*.

U Zaječarskom okrugu, u rezervoaru Grlšte takođe je registrovano prisustvo cijanobakterija. Tako su tokom proleća i leta 1993. godine uočene sledeće cijanobakterije: *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp. i *Microcystis* sp. (Nakić i Božović, 1994), a kasnije i *Aphanizomenon flos-aquae* i *Gomphosphaeria aponina* (Sedmak i Svirčev, 2011).

Ćelije (Rasinski okrug) je još jedan od rezervoara koji često cveta i ovaj fenomen se beleži od 90-ih godina prošlog veka. Najčešće su cijanobakterijske vrste: *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Jaaginema subtilissimum* i *Microcystis aeruginosa*, a kao rezultat cvetanja detektovani su i mikrocistini (Grašić i sar., 2004; Sedmak i Svirčev, 2011).

5.1.2. Hronična ekspozicija cijanotoksinima putem vode za piće i epidemiološki podaci u Srbiji

Hronična ekspozicija ljudi niskim dozama mikrocistina može se analizirati samo na osnovu epidemioloških studija. Epidemiološki dokazi su važni jer indirektno ukazuju na vezu između toksina i zdravlja ljudi i to u potpuno prirodnim uslovima.

5.1.2.1. Primarni kancer jetre i cvetanje cijanobakterija

Primarni kancer jetre je peti najčešći malignitet i treći najčešći uzrok smrtnosti od raka u svetu (Li i sar., 2011). Hepatokancerogeneza podrazumeva složen proces koji je povezan sa hroničnim oštećenjem jetre (Xu i sar., 2012). Ovaj kancer može biti izazvan

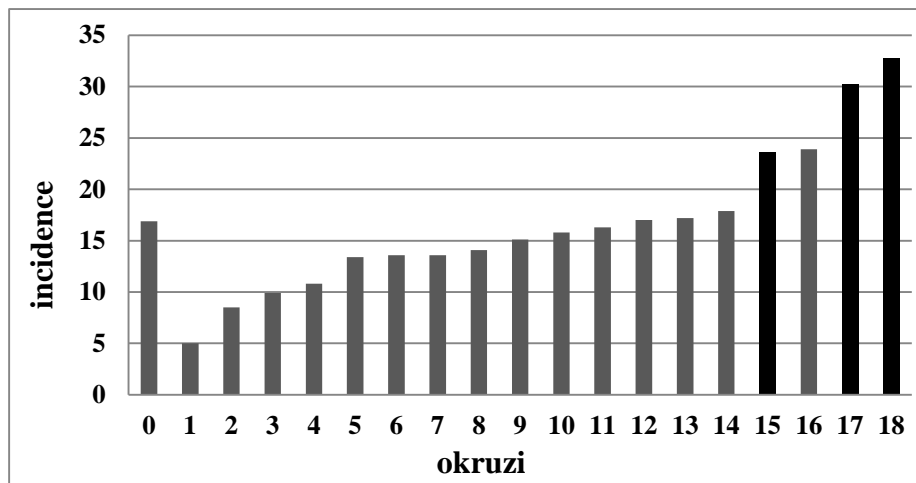
brojnim etiološkim agensima. Faktori rizika uključuju: cirozu jetre, hronične virusne infekcije hepatitisa B ili C, aflatoksine u hrani, prekomernu upotrebu alkohola, hemijsku iritaciju hepatocita, hronične infekcije digestivnog trakta i neuhranjenost (Yu, 1995; Falconer i Humpage, 1996; Ueno i sar., 1996; McGlynn i sar., 2001; Lian i sar., 2006). Pored ovih poznatih i opšteprihvaćenih faktora rizika, da li postoje i drugi koji mogu da utiču na pojavu kancera jetre?

Potencijalni kancerogeni efekat može biti povezan i sa cijanotoksinima (Svirčev i sar., 2010). Poslednjih godina, istraživanja o odnosu cvetanja cijanobakterija i povišene incidence primarnog kancera jetre rađena su u našoj zemlji (Svirčev i sar., 2006; 2009; 2013; 2013a; 2014; 2014a; Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011). U periodu od 1980. do 1990., godine mortalitet usled ovog maligniteta je bio niži u Vojvodini (7,6), kao i u okruzima Centralne Srbije koji nisu pogođeni cvetanjem (8,3) u odnosu na okruge koji su bili zahvaćeni ovim fenomenom (Moravički, Šumadijski, Raški, Braničevski, Rasinski, Zaječarski, Nišavski, Toplički i Pirotski), gde je mortalitet od primarnog kancera jetre bio 11,6 (Svirčev i sar., 2009).

Godine 2000. došlo je do značajnog porasta učestalosti primarnog kancera jetre u Centralnoj Srbiji (16), a taj trend je nastavljen i 2002. godine (18,8). U tom periodu u kontrolnom regionu (Vojvodina) zabeležena je stagnacija ovih vrednosti (6,6 i 6,2). Incidenca primarnog kancera jetre (13,6) u okruzima koji nisu pogođeni cvetanjem cijanobakterija bila je statistički značajno niža (34,7) u poređenju sa tri kritična okruga (Šumadijski, Nišavski, Toplički) u kojima cijanobakterije cvetaju svake godine (Svirčev i sar., 2009).

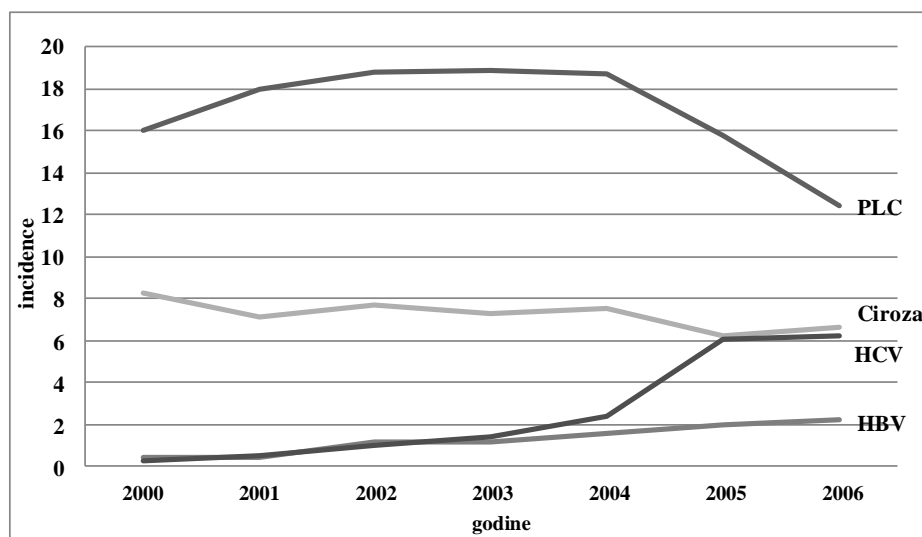
Odnos između povećanog rizika pojave primarnog kancera jetre i kvaliteta površinskih voda za piće, takođe je uočen u periodu od 2000. do 2006. godine (Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011). Nejednaka geografska distribucija kancera jetre u Srbiji bila je jasno uočljiva i žarišta mogu biti dovedena u vezu sa snabdevanjem vode za piće. Okruzi visokog rizika za razvoj primarnog kancera jetre koriste rezervoare za vodosnabdevanje koji permanentno cvetaju, a niskorizični regioni poseduju sisteme za vodosnabdevanje koji nisu pogođeni ovim fenomenom ili imaju savremeniji način prerade u fabrikama vode (Svirčev i sar., 2013).

Prema ovim preliminarnim epidemiološkim ispitivanjima (Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011) u periodu od 2000. do 2006. godine najviše incidence primarnog kancera jetre zabeležene su u Nišavskom, Šumadijskom, Pirotskom i Topličkom okrugu (Graf. 39).

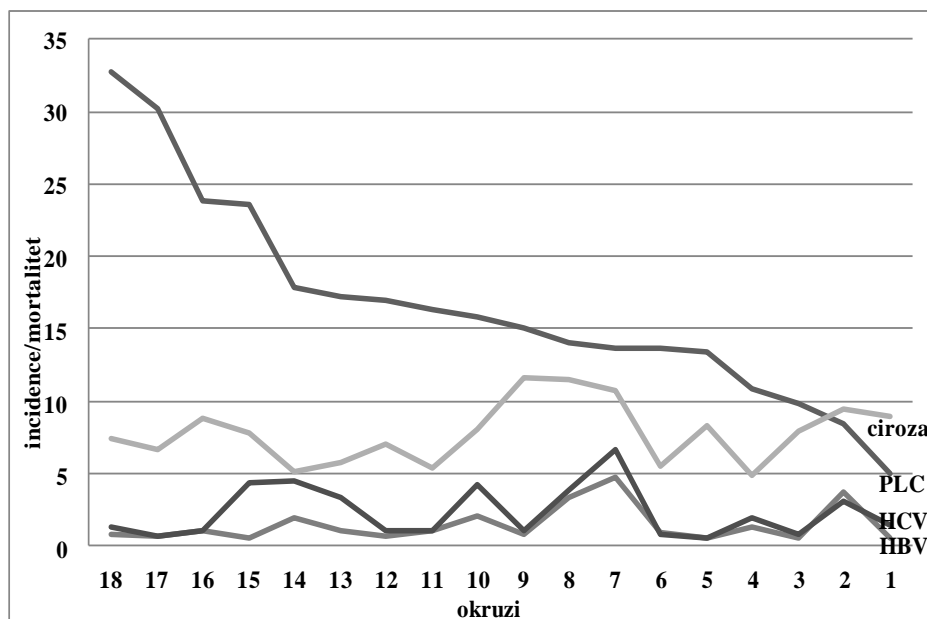


Grafikon 39. Prosečne vrednosti incidence primarnog kancera jetre od 2000. do 2006. po okruzima: (0)Centralna Srbija, (1)Rasinski, (2)Zaječarski, (3)Moravički, (4)Zlatiborski, (5)Pčinjski, (6)Jablanički, (7)Borski, (8)Pomoravski, (9)Braničevski, (10)Mačvanski, (11)Podunavski, (12)Raški, (13)Beogradski, (14)Kolubarski, (15)Šumadijski, (16)Pirotski, (17)Toplički, (18)Nišavski.

Razvoj primarnog kancera jetre se najviše povezuje sa cirozom jetre i hroničnim virusnim hepatitisima, međutim u posmatranom periodu od 2000. do 2006. godine u Centralnoj Srbiji nije uočena korelacija između incidence primarnog kancera jetre i glavnih rizičnih faktora u razvoju ovog maligniteta: ciroze jetre, HBV i HCV infekcija (Graf. 40 i 41) (Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011).



Grafikon 40. Odnos incidence primarnog kancera jetre (PLC), HBV, HCV i mortaliteta ciroze u Centralnoj Srbiji po godinama od 2000. do 2006. (Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011)



Grafikon 41. Odnos prosečnih vrednosti incidenci primarnog kancera jetre (PLC), HBV, HCV i mortalitet ciroze od 2000. do 2006. po okruzima (Drobac, 2009; Drobac i sar., 2011): (1) Rasinski, (2) Zaječarski, (3) Moravički, (4) Zlatiborski, (5) Pčinjski, (6) Jablanički, (7) Borski, (8) Pomoravski, (9) Braničevski, (10) Mačvanski, (11) Podunavski, (12) Raški, (13) Beogradski, (14) Kolubarski, (15) Šumadijski, (16) Pirotski, (17) Toplički, (18) Nišavski.

Poređenjem incidenci primarnog kancera jetre, mortaliteta ciroze i incidenci hroničnih hepatitisa tokom ispitivanog perioda može se primetiti da incidence ovih oboljenja ne prate incidence kancera, odnosno dok je primarni kancer jetre u opadanju, mortalitet ciroze jetre stagnira, a incidenca obolelih od hepatitisa raste tokom godina.

Nakon preliminarnog istraživanja, u cilju dobijanja pouzdanijih zaključaka analiziran je duži vremenski period od deset godina (od 1999. do 2008.). Ponovo, incidence primarnog kancera jetre su bile najviše u tri kritična okruga (Nišavskom (31,4), Topličkom (27,3) i Šumadijskom (22,1)) (Graf. 1). Incidence ovog maligniteta su takođe jasno bile najizraženije u tri kritična okruga, pa ostatku Centralne Srbije, a najniže u Vojvodini (Graf. 2).

Sa druge strane, mortalitet ciroze je prilično uravnotežen u posmatranim grupama i nešto je veći u Vojvodini (Graf. 3). Iako se smatra da je u većini zemalja u 80-90 % slučajeva ciroza bolest koja prerasta u kancer jetre i da je samim tim glavni faktor razvoja maligniteta, međutim, to se ne može jasno uočiti na osnovu podataka o incidenci primarnog kancera jetre i trenda mortaliteta ciroze jetre tokom perioda od 1999. do 2008. godine u Centralnoj Srbiji.

Pored ciroze jetre, za glavne faktore rizika primarnog kancera jetre smatraju se i hronični virusni hepatitisi. Često se povećanje incidence primarnog kancera jetre u zemljama

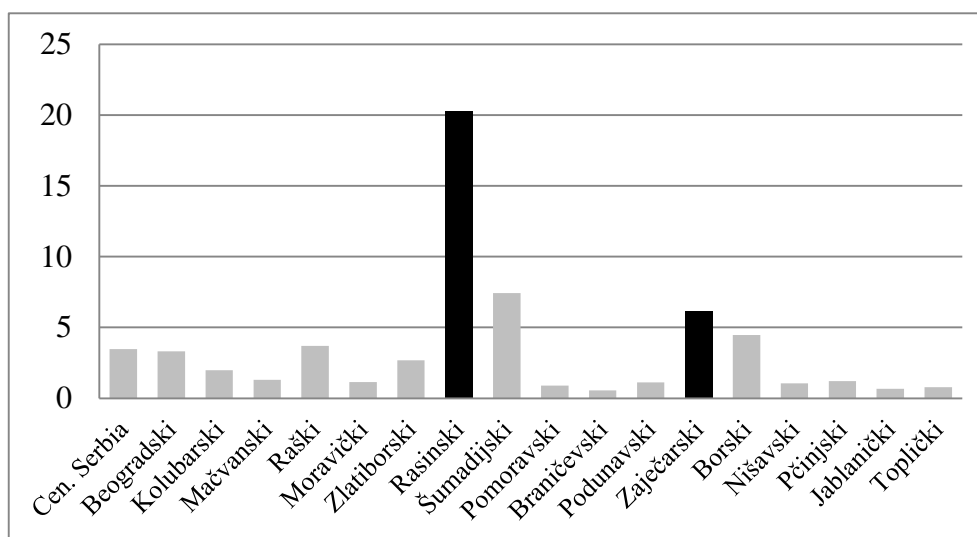
zapadnog sveta upravo dovodi u vezu sa povećanim brojem infekcija HBV i HCV. Međutim, u Centralnoj Srbiji iako postoji porast broja inficiranih ovim virusima, primarni kancer jetre je postepeno u opadanju. Takođe, hronični virusni hepatitis su u početku bili izraženiji u Vojvodini, pa ostatku Centralne Srbije, a tek u poslednjih par godina tokom istraživanog perioda je došlo do skoka obolelih od ovih infektivnih bolesti u tri kritična okruga (Graf. 4 i 5). Korelacija između ovog kancera i HBV-a odnosno HCV-a u periodu od 1999. do 2008. godine nije uočena.

Jedan od razloga nepostojanja korelacije između primarnog kancera jetre, ciroze i hepatitisa može biti faktor vremena, odnosno da je potrebno da prođu godine da bi se pojavila korelacija među proučavanim bolestima. Drugo objašnjenje može biti postojanje nekih drugih dodatnih faktora koji mogu da utiču na pojavu kancera jetre, pored ovih dobro poznatih i opšte prihvaćenih faktora rizika. Ukoliko je reč o drugoj hipotezi onda se kao jedan od mogućih faktora nameću cijanotoksini. Rezultati ovog epidemiološkog istraživanja ukazuju na mogućnost da glavni faktori rizika, zajedno sa sekundarnim metabolitima cijanobakterija u pijaćoj vodi mogu uticati na pojavu primarnog kancera jetre. Cijanotoksini mogu potencijalno da deluju kao inicijatori i/ili kofaktori, koji sinergistički sa drugim faktorima rizika dovode do povećanja incidence primarnog kancera jetre.

Tumačenje rezultata dobijenih epidemiološkim ispitivanjem u Centralnoj Srbiji može biti dovedeno u pitanje, jer je poznato da se dva okruga (Rasinski i Zaječarski), takođe snabdevaju pijaćom vodom iz rezervoara u kojima često cvetaju cijanobakterije (Ćelije i Grliška) ali ne pripadaju grupi okruga sa najvećim incidencama primarnog kancera jetre (Slika 13). Činjenica da je incidenca primarnog kancera jetre u ovim okruzima tokom decenije istraživanja među najnižim (Graf. 1) je dovela u pitanje celu hipotezu o značaju cijanobakterija u genezi primarnog kancera jetre. Međutim, prema informacijama dobijenim iz vodovoda, vodovod u Kruševcu koristi proces ozonizacije u pripremi vode za piće iz rezervoara Ćelije neprekidno od 1985. godine, a vodovod u Zaječaru koristi ozonizaciju od 1990. godine tokom meseci kada dolazi do cvetanja cijanobakterija u rezervoaru Grliška. To su jedini vodovodi u Centralnoj Srbiji koji koriste ozon kao tretman sirove površinske vode (Svirčev i sar., 2013).

Na osnovu ovih informacija možemo da pretpostavimo da je dobijen ne samo odgovor na pitanje zašto su incidence kancera jetre u tim okruzima bile toliko niske (čak niže nego u kontrolnom regionu Vojvodini), već i kako rešiti problem izazvan prisustvom cijanobakterija i cijanotoksina u rezervoarima za vodosnabdevanje koji cvetaju. Ozonizacija je poznata kao jedna od najefikasnijih metoda za uklanjanje cijanotoksina iz vode (Brooke i sar., 2006;

Rodriguez i sar., 2007). Na osnovu toga bi se moglo pretpostaviti da je rešenje za problem pojave i prisustva cijanobakterijskih toksina u pijaćoj vodi već poznat. Međutim, takvu pretpostavku ne bi trebalo iznositi dok se ne pronade objašnjenje za epidemiološke podatke o učestalosti folikularnog non-Hodžkin limfoma u Srbiji. U Rasinskom okrugu, koji stalno koristi proces ozonizacije od 1985. godine, učestalost folikularnog non-Hodžkin limfoma je značajno viša (20,3), u poređenju sa srednjim vrednostima u svim ostalim regionima Centralne Srbije (2,45). Povećana učestalost folikularnog non-Hodžkin limfoma je takođe registrovana i u Zaječarskom okrugu (Graf. 42).



Slika 42. Učestalost folikularnog non-Hodžkin limfoma od 1999. do 2008. godine
(Svirčev i sar., 2013)

Naime, efikasnost ozona zavisi od doze i vrste cijanotoksina, a formiranje nusproizvoda može biti prisutno pri procesu ozonizacije (Brooke i sar., 2006; Rodriguez i sar., 2007b). Zbog navedenih podataka može da se postavi pitanje: da li je moguće da neželjeni nusprodukti procesa ozonizacije mogu biti faktori rizika za non-Hodžkin limfom? Na osnovu rezultata dobijenih iz epidemioloških studija u Srbiji, jasna je preferencija za metode prevencije cvetanja, nego za metode eliminacije cijanotoksina. Ovo je najsigurnije i najadekvatnije rešenje problema pojave cijanobakterija i rezultujućih negativnih efekata.

Tokom ovog istraživanja, direktna veza između pojave mikrocistina u akumulacijama za snabdevanje vodom i primarnog kancera jetre nije urađena. Redovno praćenje mikrocistina u vodovodnim sistemima u Srbiji još uvek nije uspostavljeno. Međutim, prema ranije objavljenim (videti Svirčev i sar., 2014) i neobjavljenim podacima, značajne količine mikrocistina su povremeno određivane u rezervoarima za vodosnabdevanje koji su cvetali: Čelije (Rasinski) jul 2004. MC-LR 650 $\mu\text{g/L}$; Grliška (Zaječarski) septembar 2007. MC-LR

235 µg/L; Gruža (Šumadijski) avgust 2006. MC-LR 539 µg/L; Garaši (Šumadijski) jul 2009. MC-LR 112 µg/L; Bovan (Nišavski) maj 2007. MC-LR 98 µg/L; Bresnica avgust 2007. MC-LR 79 µg/L.

Informacije o cvetanju cijanobakterija se mogu smatrati važnijim od podataka o prisustvu mikrocistina, zbog mogućnosti da ljudsko zdravlje može biti ugroženo i drugim cijanotoksinima i metabolitima cijanobakterija. Da bi se došlo do pouzdanih zaključaka o statistički relevantnim korelacijama, neophodno je ispitati prisustvo cijanotoksina (ne samo mikrocistina) u rezervoarima za vodosnabdevanje. S druge strane, samo prisustvo mikrocistina ne mora predstavljati direktnu pretnju po ljude, pogotovo ako postoji efikasan sistem pripremanja vode za piće.

Postoji ograničen broj epidemioloških podataka u svetu koji mogu da objasne vezu između mikrocistina u površinskim vodama za piće i učestalosti primarnog kancera jetre. Ovakva istraživanja uglavnom dolaze iz Kine (Yu, 1995; Ueno i sar., 1996). Epidemiološke studije u različitim delovima Kine su pokazale da je MC-LR jedan od faktora rizika u razvoju primarnog kancera jetre. Najviše incidence ovog kancera su se poklopile sa prisustvom mikrocistina u vodi regiona u kojima su takođe prisutne povećane incidence HBV i aflatoksina u hrani. Epidemiološka studija je pokazala da aflatoksini u interakciji sa HBV mogu da izazovu pojavu hepatocelularnog karcinoma (Liu i sar., 2012). Takođe, primećen je sinergistički mutageni odgovor usled interakcije mikrocistina i aflatoksina B1 (Sekijima i sar., 1999; Hashimoto i sar., 2012). Kombinacija različitih faktora rizika, naročito HBV, aflatoksina i mikrocistina, može biti odgovorna za endemičnost primarnog kancera jetre (Yu i sar., 2001).

Neki od faktora rizika za primarni kancer jetre nisu analizirani tokom ovog istraživanja zbog nedostatka tačnih podataka i naučnih dokaza o povezanosti sa ovom malignom bolesti. Pre svega, evidencije o pojavi aflatoksina se ne mogu naći u statističkim i epidemiološkim bazama podataka u Srbiji. Dalje, od 1993. do 1996. godine u Srbiji je došlo do velike imigracije stanovništva, ali ne postoje objavljeni podaci o demografskim promenama u Centralnoj Srbiji. Još manje su dostupni podaci o zdravstvenom stanju izbeglica koje su prognane iz Bosne i Hrvatske, nakon ratova u bivšim jugoslovenskim republikama. Drugi faktori koji mogu da utiču na pojavu primarnog kancera jetre, kao što su alkoholizam, pušenje ili stres su isključeni iz studije zbog nedostatka relevantnih podataka za svaki okrug posebno. Ali, pojava ovih faktora rizika u Srbiji znatno su niže u poređenju sa drugim evropskim zemljama (Svirčev i sar., 2009). Pored ovih faktora, važna je i genetska osnova bolesti, ali ova problematika nije obrađena.

U ovom istraživanju se ne sugerše da su cijanotoksini u vodi za piće jedini ili definitivni faktor rizika za razvoj primarnog kancera jetre, ali se ukazuje na to da cijanotoksini, između ostalog, mogu biti potencijalni faktor rizika koje treba uzeti u obzir u budućnosti. Na osnovu dobijenih epidemioloških podataka može se zaključiti da dugotrajna hronična izloženost cijanobakterijama i njihovim toksinima može izazvati povećanu incidencu kancera jetre, odnosno moguće da glavni faktori rizika zajedno sa cijanobakterijskim sekundarnim metabolitima u pijaćoj vodi vode do geneze primarnog kancera jetre. Da bi se došlo do pouzdanih zaključaka o cijanotoksinima kao faktorima rizika, potrebno je izvršiti veliki broj istraživanja, koja bi mogla pomoći u prevenciji ove teške maligne bolesti.

5.1.2.2. Negativni uticaj cijanotoksina na druge organe-drugi kanceri

Iako je jetra njihov glavni ciljni organ, mikrocistini takođe mogu uticati i na druge organe. U cilju određivanja organa sa mikrocistin indukovanim DNK-oštećenjima Gaudin i saradnici (2008) administrirali su jednu akutnu oralnu dozu MC-LR miševima, a nakon 3 h je primećena indukcija DNK oštećenja u krvnim ćelijama. Posle intraperitonealne injekcije, DNK lezije su indukovane u jetri, bubrezima, tankom i debelom crevu.

Osim toga, Li i saradnici (2009) su istraživali ekspresiju proto-onkogeno *c-jun*, *c-fos* i *c-myc* u jetri, bubrezima i testisima pacova nakon intravenske aplikacije mikrocistina. Uočeno je značajano povećanje sinteze iRNK tri proto-onkogeno u ova tri proučavana organa. Međutim, povećanje ekspresije iRNK sva tri gena bilo je mnogo veće u jetri nego u bubrezima i testisima. Nivoi proteina *c-jun*, *c-fos* su bili indukovani u tri organa. Na osnovu ovih rezultata, može se pretpostaviti da mikrocistini mogu imati potencijal za promovisanje i iniciranje tumora u različitim organima (Li i sar., 2009).

Distribucija mikrocistina u različitim organima je ograničena zbog slabe sposobnosti ovih toksina da prolaze kroz ćelijske membrane. Organska distribucija ^3H -MC-LR je praćena na miševima nakon intraperitonealne injekcije. Pri tome jetra, creva i bubreg su sadržali radioaktivni obeleživač, koji je takođe bio prisutan i u srcu, slezini, plućima i skeletnim mišićima ali u mnogo manjim količinama (Robinson i sar., 1989). Ip injekcija ^3H -dihidro-MC-LR rezultirala je najvećim unošenjem mikrocistina od strane jetre, međutim male količine radioobeleženih markera su se takođe nalazile i u tankom crevu, bubregu, žučnoj kesi, plućima i želucu (Nishiwaki i sar., 1994). Isto tako, ^3H -dihidro-MC-LR je brzo

distribuiran u jetri svinja posle iv injekcije ili infuzije putem ilealne petlje. Manje količine su zabeležene u bubrezima, plućima, srcu, slezini i ileumu (Stotts i sar., 1997; 1997a).

Nakon oralne ekspozicije miševa MC-LR se uglavnom apsorbavao u tankom crevu, a delom i u želucu. Primećena je erozija u resicama, što može da doprinese pojačanoj apsorpciji toksina u krvotok. MC-LR je takođe bio prisutan u krvnoj plazmi, jetri, plućima, bubrezima i srcu (Ito i sar., 1997a). Distribucija je praćena i nakon intra-trahealne aplikacije MC-LR i uočeno je imunobojenje pluća, jetre, tankog creva i bubrega. Na osnovu pozitivnog imunobojenja alveola, zaključeno je da se apsorpcija dogodila u alveolama (Ito i sar., 2001).

Mikrocistini zahtevaju prisustvo organskih anjon transportnih polipeptida (glodari Oatp, humani OATP), kako bi prošli ćelijske membrane i ušli u tkiva. Oatp/OATP obezbeđuju transport širokog spektra organskih rastvorenih supstanci, uključujući i cijanotoksine (Hagenbuch i Meier, 2003). Mikrocistin može da se transportuje preko OATP-A, OATP-C i OATP8 koji su prisutni u više organa uključujući jetru, mozak, pluća, bubrege i testise. Distribucija mikrocistina je pod uticajem stepena prokrvljenosti i prisutnosti Oatp/OATP u datom organu. Zbog izražene krvne perfuzije i visoke ekspresije Oatp/OATP u jetri, mikrocistini se često karakterišu kao hepatotoksini, mada ovi cijanotoksini mogu uticati i na druge organe (Feurstein i sar., 2009). U jetri specifični OATP1B1 i OATP1B3 (humani), Oatp1b2 (miš), Oatp1d1 (raža), posreduju apsorpciju MC-LR u hepatocyte (Fischer i sar., 2005; Komatsu i sar., 2007; Meier-Abt i sar., 2007; Monks i sar., 2007; Lu i sar., 2008).

MC-LR se takođe transportuje pomoću humanog OATP1A2 koji su ekspresovani u endotelijalnim ćelijama krvno-moždane barijere (Gao i sar., 2000; Hagenbuch i sar., 2002). Osim toga, potvrđeno je postojanje mOatp u mišjim moždanim ćelijama, a koji su odgovorni za transport kongenera mikrocistina (Feurstein i sar., 2009). Prisustvo transporter, zajedno sa dobrom prokrvljenošću mozga može da ukaže da značajne količine mikrocistina mogu da stignu u ovaj organ preko krvno-moždane barijere i dovedu do patologije mozga. Nakon ip i peroralne administracije MC-LR se brzo pojavljivao u mozgu (Meriluoto i sar., 1990; Nishiwaki i sar., 1994). Dokumentovane su i patološke promene u mozgu miševa tretiranih sa toksičnim ekstraktom *Microcystis aeruginosa* (Falconer i sar., 1988). Takođe, pacovi tretirani sa mikrocistinima ispoljili su amneziju pri pronalaženju i prostornom učenju. Uporedo sa memorijskim, primećena su i oksidativna oštećenja (Maidana i sar., 2006). Slični toksikološki efekti primećeni su i kod ljudi koji su bili izloženi iv mikrocistinima kada je korišćena kontaminirana voda tokom procesa hemodijalize u Karuaru, Brazilu tokom 1996. godine (Jochimsen i sar., 1998; Azevedo i sar., 2002). Kod pacijenata je dolazilo do otkazivanja jetre, ali su se manifestovali i znakovi neurotoksičnosti, kao što su vrtoglavica, glavobolja,

zujanje u ušima, gubitak sluha i vida, vizuelni poremećaji, povraćanje i mučnina. Ova nesreća je izazvala smrt 60 izloženih pacijenata (Pouria i sar., 1998).

Pored istraživanja u Kini koja su pokazala da postoji veza između učestalosti primarnog kancera jetre i prisustva mikrocistina u vodi za piće (Ueno i sar., 1996), rađena su i istraživanja koja su pokazala pozitivnu korelaciju koncentracija mikrocistina u rekama i jezerima sa učestalosti kolorektalnog kancera. Stopa incidence kolorektalnog kancera bila je značajno veća u populaciji koja je pila vodu pripremljenu iz površinskih reka i jezera nego kod onih koji su pili pripremljenu podzemnu vodu iz bunara (Zhou i sar., 2002). MC-LR unet oralno se transportuje žučnim transportnim sistemom u jetru odakle može ponovo da se uvede u tanko crevo preko entero-hepatične recirkulacije (Falconer i sar., 1992). Oralna primena mikrocistina preko vode za piće, zajedno sa azoksimetanom inicijatorom tumora, dovelo je do povećanja veličine aberantnih crypt foci u debelom crevu izloženih miševa. MC-LR koji recirkuliše u tanko crevo može da ošteti ćelije sluzokože creva i može stimulisati preneoplastični rast tumora debelog creva (Humpage i sar., 2000a). Ip aplikiran MC-LR može indukovati apoptozu ćelija gastrointestinalnog trakta kod miševa. Najznačajnije povećanje indeksa apoptoze uočeno je u dvanaestopalačnom crevu, zatim u jejunumu i ileumu. Prisustvo MC-LR u resicama može da ukazuje da je štetni efekat uzrokovan toksinima (Botha i sar., 2004).

Cijanotoksini takođe mogu dovesti do oštećenja bubrega. MC-LR je izazvao vaskularne, glomerularne i urinarne efekte na bubregu pacova. Primećeno je značajno povećanje urinarnog protoka, perfuznog pritiska, glomerularne filtracije i značajnog smanjenja frakcionog transporta natrijuma u tubulima. Histopatološke analize su pokazale prisustvo proteinskog materijala u urinarnom prostoru, što sugeriše o toksičnom delovanju na bubrege (Nobre i sar., 1999). Hronično izlaganje MC-LR i MC-YR može dovesti do oštećenja korteksa i medule bubrega pacova. Lezije su se uglavnom sastojale od oštećenih i proširenih tubula ispunjenih homogenom eozinofilnom materijom. Shodno tome, dugotrajna izloženost relativno niskim dozama mikrocistina predstavlja rizik za oštećenje bubrega (Milutinović i sar., 2002).

Mikrocistini imaju toksične efekte na reproduktivni sistem. Mužjaci miševa koji su bili ip izloženi mikrocistinima imali su smanjenu srednju telesnu težinu, kao i srednju apsolutnu težinu testisa i epididimisa. Došlo je do atrofije testisa, struktura testisa je oštećena i prostor između semeniferanih tubula je bio povećan. Broj zrelih spermatozoida u semeniferanim tubulama je bio smanjen, što ukazuje da mikrocistin oštećuje Sertolijeve i intersticijalne ćelije. Dodatno, pokretljivost i vijabilnost spermatozoida je bila smanjena

(Ding i sar., 2006). Toksični efekti cijanotoksina MC-LR i cilindropermopsina su uočeni i na jajnicima kineskog hrčka (CHO-K1 ćelije), gde je cilindropermopsin pokazao veći toksični efekat kroz citoskeletne i nuklearne, apoptotične i nekrotične promene (Gácsi i sar., 2009).

Hronično izlaganje relativno niskim dozama MC-LR predstavlja rizik za oštećenje srca. Posmatrani toksični efekti na srcu pacova uključuju uvećanje kardiomiocita, gubitak poprečnih brazdi ćelija, smanjenje frakcije miofibrila, fibrozu i mononuklearnu infiltraciju u intersticijalno tkivo. Dakle, ovaj organ takođe može biti ugrožen usled dugotrajnog izlaganja cijanotoksinima (Milutinović i sar., 2006).

Cijanotoksini u vodi za piće mogu da podstaknu razvoj tumora kože kod pacova i miševa nakon inicijacije sa dimetilbenzantracenom (Fujiki i sar., 1989; Falconer i sar., 1991). U modelu kože miša, nakon topikalne aplikacije kancerogena i mikrocistina putem vode za piće došlo je do povećanja broja i težine tumora u odnosu na kontrolu (Falconer i Buckley, 1989). Iako je mikrocistin primenjen oralno i dalje je uspeo da promoviše rast tumora u ćelijama kože, mada mehanizam nije razjašnjen.

Miševi su posle ip injekcije smrtonosne doze mikrocistina razvili plućnu trombozu (Slatkin i sar., 1993). Niža ip doza vodenog ekstrakta toksičnog *Microcystis aeruginosa* dovela je do oštećenja pluća kod miševa: do inflamatornog procesa sa intersticijalnim edemom i angažovanjem inflamatornih ćelija i alveolarnog kolapsa (Picanço i sar., 2004). Slično, ip ubrizgan MC-LR doveo je do brzog porasta impedance pluća i inflamatornog odgovora sa intersticijalnim edemom i regrutacijom inflamatornih ćelija kod miševa (Soares i sar., 2007). Tako su dva regruta u Engleskoj razvila ozbiljnu upalu pluća nakon kontakta sa vodom koja je sadržala toksični *Microcystis aeruginosa* (Turner i sar., 1990).

U istraživanjima koja su sprovedena u okviru izrade ove teze, prethodno pomenute studije o negativnim efektima cijanotoksina na navedene organe, predstavljale su osnov za odabir 13 kancera (mozga; bronha i pluća; srca, medijastinuma i plućne maramice; jajnika; testisa; bubrega; želuca; tankog creva; kolorektuma; retroperitoneuma i peritoneuma; leukemija; malignog melanoma kože uz primarni kancer jetre) čiji su epidemiološki podaci statistički testirani u 17 okruga Centralne Srbije.

Na osnovu dobijenih rezultata, tri karakteristične grupe su definisane. Prva grupa se sastoji od oblasti sa ukupnim SCOR-om većim od ili jednakim sa 4. To su oblasti u kojima je učestalost kancera značajna i mogu se smatrati kritičnim. Okruzi O3, O10, O14, O15 i O17 (Toplički, Nišavski, Kolubarski, Šumadijski i Beogradski) pripadaju ovoj kritičnoj grupi. Dva okruga O1 i O2 (Pčinjski i Jablanički) predstavljaju grupu "zdravih" okruga čiji je ukupni SCOR manji ili jednak sa -4. Preostalih devet okruga su u okviru proseka.

U Šumadijskom okrugu, bodovi za tri kancera (mozga; srca, medijastinuma i plućne maramice; i leukemija) bili su značajno iznad proseka. U Nišavskom okrugu SCOR za primarni kancer jetre je bio znatno iznad proseka, kao što je to bio slučaj i za kancer želuca u Topličkom okrugu. Pored toga, u Topličkom okrugu vrednosti incidence primarnog kancera jetre, kao i peritoneuma i retroperitoneuma su bile iznad proseka. U šumadijskom okrugu iznad proseka su incidence kancera jajnika, kolorektuma, peritoneuma i retroperitoneuma, kao i melanoma kože. U Nišavskom okrugu je osam kancera imalo incidence iznad proseka (mozga, jajnika, testisa, kolorektuma, peritoneuma i retroperitoneuma kao i melanoma kože).

Ova tri okruga su poznata po pojavi cvetanja cijanobakterija u rezervoarima za vodosnabdevanje, čime se nametnula hipoteza da bi cijanotoksini mogli biti mogući faktor rizika za povećanje incidence ovih malignih bolesti. Međutim, kanceri su multifaktorijalne bolesti, samim tim i drugi faktori rizika utiču na njihovu pojavu, čime se mogu objasniti visoke SCOR vrednosti u Beogradu i Kolubarskom okrugu. Takođe, Beograd je glavni grad Srbije, sa intenzivnom imigracijom i emigracijom, što bi moglo da utiče na učestalost zabeleženih malignih oboljenja u ovom okrugu, dok je Kolubarski okrug poznat po metalnoj industriji.

Srednja vrednost za tri kritična okruga u odnosu na sve ostale okruge Centralne Srbije je bila statistički značajno veća za posmatranih deset kancera: jetra; mozak; srce, medijastinum i pleura; jajnika; testisa; želuca; kolorektuma; peritoneuma i retroperitoneuma; leukemije; kao i kože. Sa druge strane, nema uočene statistički značajne razlike za kancer bubrega; tankog creva; bronha i pluća u tri kritična okruga u odnosu na druge okruge Centralne Srbije.

Epidemiološki podaci za pet kancera (mozga, jajnika, testisa, malignog melanoma kože i jetre) u tri kritična okruga, preostalim okruzima Centralne Srbije i Vojvodini su međusobno poređeni. U slučaju svih pet vrsta kancera incidence su bile najviše u tri kritična okruga, zatim u ostatku Centralne Srbije, dok su najniže vrednosti zabeležene u Vojvodini. Uočene razlike u učestalosti kancera mogu potencijalno biti rezultat pojave toksičnih proizvoda cvetanja cijanobakterija u vodi za piće.

Postoji mogućnost da sekundarni metaboliti cijanobakterija deluju sinergistički sa drugim faktorima rizika i izazivaju povećanu učestalost ispitivanih kancera. Cijanotoksini mogu predstavljati novi, važni i slabo istraženi spoljašnji hemijski faktor rizika u razvoju kancera, a masovne pojave potencijalno toksičnih cijanobakterija mogu predstavljati latentnu ali realnu pretnju po zdravlje ljudi i životinja. Rezultati epidemioloških studija pokazuju potencijalnu vezu cvetanja cijanobakterija u rezervoarima za vodosnabdevanje u okruzima

Centralne Srbije sa povećanom incidencom pojedinih kancera. Oni mogu da služe kao upozorenje da cijanobakterijski toksini mogu predstavljati potencijalni faktor rizika ne samo za primarni kancer jetre, već možda i za neka druga maligna oboljenja. Direktna zaključak koji povezuje kancerogenezu kod ljudi sa prisustvom cijanobakterija i cijanotoksina u vodi za piće nije moguć u ovoj vrsti istraživanja. Međutim, važno je istaći mogućnost takvog ishoda, posebno u svetlu svakodnevne, nekontrolisane degradacije kvaliteta voda, neadekvatnog upravljanja izvorima vode za piće i prisustva cijanotoksina u brojnim vodenim ekosistemima Srbije.

5.1.3. Akutna ekspozicija u slučaju cvetanja jezera Vrutci

U akumulaciji za vodosnabdevanje Vrutci krajem decembra 2013. godine, primećena je mrlja crvene boje. U narednim danima je došlo do uvećanja obima plivajućih materija i pomeranja modro-crvene nakupine. Tamno purpurno-crvene plutajuće formacije vetar je naneo u priobalje. Boja vode bila je приметно izmenjena, tamno purpurno-crvena i to ne samo na površini nego i duž vodenog stuba. Analiza uzoraka vode ukazala je na to da je došlo do cvetanja cijanobakterije *Planktothrix rubescens* (Slika 19).



Slika 19. Promena boje vode, pojava pene, prevlaka i nakupina u vidu “crvenog tepiha” - cvetanje *Planktothrix rubescens* u Jezeru Vrutci (Foto: Tijana Jeftić)

5.1.3.1. Cvetanje cijanobakterije *Planktothrix rubescens*

Crvena cijanobakterija, koja je nekada bila poznata kao *Oscillatoria rubescens*, a sada je reklasifikovana u *Planktothrix rubescens* prema Anagnostides i Komárek (1988), predstavlja vrstu koja je najčešće prisutna u hladnim vodama srednje Evrope (Reynolds, 1984) i južnijih subalpskih jezera (Garibaldi i sar., 2000). Generalno, filamentozne vrste roda *Planktothrix* imaju sposobnost cvetanja u metalimnionu i postoje brojni primeri ovog fenomena u Evropi: Ciriško jezero (Thomas i Märki, 1949) i jezero Lucern (Zimmermann, 1969) u Švajcarskoj, zatim u Nordijskim zemljama (Skulberg, 1978; Lindholm i Meriluoto, 1991; Willén i Mattsson, 1997), Jezero Mondsee (Dokulil i Jagsch, 1992) u Austriji, jezero Nantua (Feuillade, 1994) i Lac du Bourget (Jacquet i sar., 2005) u Francuskoj, nekoliko jezera u Nemačkoj (Wiedner i sar., 2001; Padisák i sar., 2003), a takođe i u jezerima Severne Amerike (Edmondson, 1970; Klemmer, 1976; Konopka, 1982; Konopka i sar., 1993). Cvetanje vrste *Planktothrix* u metalimnionu je značajno jer se pokazalo da proizvodi najveće količine toksina po biomasi (Fastner i sar., 1999), a i teško ga je iskoreniti (Feuillade i Druart, 1994; Buergi i Stadelmann, 2000; Ernst i sar., 2001; Jacquet i sar., 2005).

Planktothrix može da opstane i da se razmnožava u metalimnionu zbog niza svojih karakteristika. Kao prvo, njegove potrebe za svetlošću i temperaturom su manje u poređenju sa drugim fototrofnim mikroorganizmima (Van Liere, 1979; Feuillade i sar., 1992). Među cijanobakterijama, *Planktothrix* toleriše najširi spektar temperature u poređenju sa predstavnicima rodova *Microcystis*, *Anabaena* i *Aphanizomenon* (Foy i sar., 1976; Post i sar., 1985). Na primer u jezeru Steinsfjorden, Norveška, najveća populacija *Planktothrix* spp. je pronađena u metalimnionu (10-14 m dubine) pri temperaturi 10-14°C (Halstvedt i sar., 2007).

Planktothrix rubescens poseduje pigment fikoeritrin koji ovoj cijanobakteriji daje crvenu boju, a fikobilini u procesu fotosinteze joj omogućuju da koristi ceo spektar (od 400 do 700 nm) fotosintetički aktivne radijacije, zbog čega i pri slabijoj svetlosti i na velikim dubinama ima sposobnost fotosinteze (Reynolds, 1997; Chorus i Bartram, 1999). Sa druge strane, ovu vrstu fotoinhibiše jaka iradijacija (Chorus i Bartram, 1999). Zbog navedenih razloga *Planktothrix* može da se održi u metalimnionu tokom letnje stratifikacije, ali i na većim dubinama pri slabijoj svetlosti i nižoj temperaturi, kao i tokom zime i jeseni u epilimnionu kada su dani kraći i hladniji, sa manje sunčeve svetlosti (Walsby i Schanz, 2002; Davis i sar., 2003).

U metalimnionu dostupnost nutrijenta može biti dobra, a i smanjena je kompeticija sa drugim fotosintetičkim organizmima. Takođe, za razliku od većine cijanobakterija, *Planktothrix* ima mogućnosti da koristi fosfor neorganskog i organskog porekla (Feuillade, 1994). Na osnovu toga ova cijanobakterija ima veliku moć preživljavanja, a to otežava njeno iskorenjivanje. Tako su i Jacquet i saradnici (2005) utvrdili da se uspešnost *Planktothrix rubescens* u jezeru Lac du Bourget, Francuska, zasniva na sposobnosti korišćenja organskog fosfora, a smanjenje svetlosti i toplije zime uz raniju stratifikaciju dale su konkurentnu prednost ovoj cijanobakterijskoj vrsti, dok je došlo do smanjenja zastupljenosti drugih vrsta fitoplanktona.

Halstvedt i saradnici (2007) su analizirali sezonsku dinamiku i vertikalnu distribuciju *Planktothrix* spp. u jezeru Steinsfjorden u južno-istočnoj Norveškoj. Tokom proleća usled mešanja vodenog stuba ova cijanobakterija je bila raspoređena širom vodenog stuba. U maju, kada se počela formirati stratifikacija, *Planktothrix* se akumulirao u metalimnionu na dubini od 10-14 m gde je ostao do kraja avgusta. U septembru populacija se podizala ka površini, a sa mešanjem vode raširila se ponovo po čitavom vodenom stubu. Maksimalni biovolumen *Planktothrix* je dostigao u novembru na 11 m dubine, a do velikog pada brojnosti je došlo u januaru naredne godine, kada su akumulirani filamenta plutali na površini jezera odmah ispod ledenog pokrivača.

Legnani i saradnici (2005) su opisali sličnu sezonsku dinamiku i vertikalnu distribuciju vrste *Planktothrix rubescens* u Jezeru Pusiano u severnoj Italiji. Preostali filamenta od prošlogodišnjeg cvetanja koji su preživeli zimu predstavljali su inokulum za novi razvoj cijanobakterijske populacije. Tokom februara i marta trihomi *Planktothrix rubescens* su bili rasprostranjeni širom vodenog stuba, ali najviše u gornjoj eufotičnoj zoni. Odgovarajući uslovi i pre svega dostupni nutrijenti dali su kompetitivnu prednost ovoj vrsti, usled čega je došlo do značajnog povećanja brojnosti tokom aprila. Ova izrazita dominacija je prekinuta tokom leta. Pri letnjoj stratifikaciji *Planktothrix rubescens* je nastanjivao metalimnion, međutim usled jake kiše koja je pala u julu povećala se providnost vode i samim tim svetlost je bila jača, iz tog razloga *Planktothrix rubescens* se morao povući u veću dubinu, što je dalo prostora za razvoj drugih cijanobakterijskih vrsta, kao što su *Microcystis* i *Aphanothece*. Njihov razvoj je doveo do smanjenja nutrijenta u višim slojevima vodenog stuba, što je primoralo *Planktothrix rubescens* da ostane na većim dubinama od 8 do 15 m do kraja avgusta, kada je opet došlo da porasta njegove brojnosti. Međutim, pad brojnosti je usledio opet u novembru nakon intenzivnih poplava. Na ovom primeru se jasno vidi kako biotički i abiotički faktori u okviru jezera mogu da utiču na dinamiku ove vrste.

Michelleti i saradnici (1998) su takođe ilustrirali fenomen cvetanja, prostorni raspored i vremensku dinamiku populacije *Planktothrix rubescens* u Ciriškom jezeru tokom 1995. godine. U leto (190. dan) malobrojna populacija cijanobakterija nastanila je sloj vodene kolone između dubina 10 i 15 m. Već devet dana kasnije (199. dan, 19. jul), cijanobakterije su uvećale populaciju i to prema dnu, verovatno se krećući u pravcu rasta koncentracije dostupnog fosfora čije je prisustvo posledica mineralizacije istaložene organske materije. Od avgusta (214. dana) cijanobakterijska populacija je značajno uvećana. Opisana dinamika se odigrava na dubini od oko 15 m, što je potpuno nevidljivo posmatraču. Usporeno cvetanje je rezultovalo da do kraja avgusta (242. dana) populacija cijanobakterija zauzima čitavu vodenu kolonu, rastući od dna i pojavljujući se na površini. Vremenom populacija polako raste i penje se ka površini, ali pik ostaje između dubina 10 i 15 m. I u oktobru (289. dana) kada je već u toku vertikalno konvektivno mešanje, brojnost populacije ima jasno naglašen pik na dubini od 10 m. Naime, cijanobakterije poseduju gasne vakuole koje im omogućavaju da se pomeraju u vertikalnom pravcu, tražeći optimalne uslove, uprkos vertikalnim pomeranjima vodene mase (Reynolds, 1987). U novembru (312. dana), vertikalni profil brojnosti populacije je relativno ujednačen, ali je najveća brojnost na samoj površini, a najmanja na dnu. Moguće je da se sličan scenario odigrao i u akumulaciji Vrutci, gde je *Planktothrix rubescens* bio stacioniran na većim dubinama i da mu je populacija rasla prema gornjim slojevima vode, pojavljujući se u decembru na površini jezera.

Pretpostavlja se da je cijanobakterija *Planktothrix rubescens* počela intenzivnije da se razvija u jezeru Vrutci u periodu između 2009. i 2011. godine kada je došlo do značajnog povećanja internog opterećenja u uslovima promene režima ispuštanja vode iz akumulacije. Analize koje je izvršila Agencija za zaštitu životne sredine u septembru 2011. godine (Denić i sar., 2014) pokazala je povišeni nivo suspendovanih materija, pad sadržaja rastvorenog kiseonika po dubini, niske vrednosti rastvorenog kiseonika i procenat zasićenja vode kiseonikom (deficit kiseonika), što ukazuje na pogoršanje kvaliteta vode, svrstavajući akumulaciju Vrutci u III i IV klasu voda.

Tokom operativnog monitoringa akumulacije Vrutci 2012. godine, obavljeno je terensko ispitivanje (tri puta godišnje). Kod brane i na sredini akumulacije u gornjim slojevima vode, u fitoplanktonu je uočena dominacija silikatnih i vatrenih algi, a prisustvo cijanobakterija nije zabeleženo. Na ulazu u akumulaciju, takođe u površinskim slojevima vode, konstatovana je dominacija silikatnih algi, ali i prisustvo cijanobakterija, pri čemu njihova brojnost nije prelazila 5 % u odnosu na ukupnu brojnost fitoplanktona tokom 2012. godine. Zastupljenost vrste *Planktothrix rubescens* tada je iznosila 0,32 % u odnosu na

ukupnu brojnost fitoplanktona. Krajem avgusta 2012. godine u hipolimnionu na dubini od 26,5 m nađen je povećan sadržaj kiseonika, odnosno saturacija od 62 %, što ukazuje na mogućnost prenamnožavanja vrste *Planktothrix rubescens* već u tom periodu, ali u dubljim slojevima akumulacije (Denić i sar., 2014).

Kako tokom 2013. godine Agencija za zaštitu životne sredine nije vršila analize vode iz akumulacije Vrutci, nema podataka o stanju tog ekosistema, promenama kvaliteta vode, progresiji eutrofizacije i prisustva cijanobakterija. U toj godini prvi rezultati su dobijeni tek u decembru, nakon što je primećeno cvetanje cijanobakterija. Po završetku fizičko-hemijskih analiza jezerske vode u decembru 2013. godine, konstatovano je značajno pogoršanje kvaliteta vode i na osnovu dobijenih rezultata, prema Pravilniku o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (Sl. glasnik RS, br. 74/2011), voda je klasifikovana kao površinska voda pete klase odnosno lošeg ekološkog statusa.

Prve kompletnije analize tokom cvetanja (uzorak od 23. decembra 2013.) obavljene su u Institutu za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", referentnoj ustanovi za ispitivanje prisustva i determinaciju algi. Dobijeni rezultati su potvrdili prisustvo cijanobakterijske vrste *Planktothrix rubescens* i to u broju od oko 10 000 ćelija/L u prečišćenoj, dezinfikovanoj vodi sa postrojenja i oko 1 000 ćelija/L u uzorku vode iz mreže (<http://uimenaroda.rs/cache/watermark/15de82f9ff01b65cfac16752419b8a1f.jpg>).

Republička sanitarna inspekcija je donela odluku o zabrani upotrebe vode za piće i pripremanje hrane i da se ne preporučuje korišćenje nakon prokuvavanja, kao i uputstvo da se voda sa postrojenja može koristiti samo u sanitarno-tehničke svrhe, (<http://www.blic.rs/Vesti/Drustvo/430536/Uzice-Zagadjena-voda-u-prodavnicama-razgrabljena-flasirana>). Ovako brza reakcija nadležnih organa je bila značajna jer je sprečila izlaganje ljudi cijanobakterijama i njihovim toksinima, a time su sprečene i potencijalne zdravstvene posledice koje mogu nastati usled delovanja cijanotoksina koje ova vrsta može da produkuje.

Po nalogu Republičke vodoprivredne inspekcije, Agencija za zaštitu životne sredine je 31. decembra 2013. godine izvršila uzorkovanje vode iz akumulacije Vrutci (Tabela 33). Uzorkovanje je sprovedeno na tri lokaliteta: kod brane (u blizini vodozahvata (oznaka A)), u centralnom delu akumulacije (B) i na ulazu u akumulaciju (C). Na sva tri lokaliteta uzeti su uzorci iz površinskog sloja vode (0,5 m ispod površine), a na lokalitetu kod brane uzeti su uzorci po vertikalnom profilu akumulacije sa 3, 6, 10, 15, 20 i 27 m dubine. Dubina akumulacije na ovom lokalitetu iznosila je 30 m. Konstatovana je totalna cirkulacija vode sa

uslovima homeotermije, jer je temperatura vode bila ujednačena od površine do dna akumulacije (5,6°C u površinskom sloju vode, a 5,5°C na dubini od 30 m).

Tabela 33. Brojnost i biomasa fitoplanktona i vrste *Planktothrix rubescens* u akumulaciji Vrutci 31.12.2013. godine (Agencija za zaštitu životne sredine)

Mesto	Dubina (m)	Br.trihoma <i>P. rubescens</i> (trihom/mL)	Br.ćelija <i>P. rubescens</i> (ćel/mL)	Ukupan br. ćelija fitoplanktona (ćel/mL)	Biomasa <i>P. rubescens</i> (mg/dm ⁻³)	Ukupna biomasa fitoplanktona (mg/dm ⁻³)
A	0,5	266	88312	89104	9,53	10,64
	3,0	228	75696	76368	8,17	10,11
	6,0	250	83000	83276	8,96	9,64
	10,0	298	98936	99252	10,68	11,66
	15,0	248	82336	82848	8,9	10,28
	20,0	201	66732	67008	7,20	7,98
	27,0	140	46480	46852	5,01	6,08
B	0,5	262	86984	87208	9,39	9,89
C	0,5	325	107900	109414	11,64	14,13

Mesta uzorkovanja: A-lokalitet u blizini brane u najdubljem delu akumulacije,

B-centralni deo akumulacije i C-najplići deo, na ulazu u akumulaciju.

Na osnovu podataka o broju ćelija *Planktothrix rubescens* u akumulaciji Vrutci, može se videti da je najmanja brojnost od 46 480 ćelija/mL zabeležena na najdubljem delu akumulacije kod brane, a najveća u najplićem delu na ulazu u akumulaciju sa čak 107 900 ćelija/mL. Kod brane u vertikalnom profilu najveća brojnost zabeležena je na 10 m dubine (98 936 ćelija/mL). Na osnovu predloga SZO za vode u svrhu vodosnabdevanja, ove vrednosti spadaju u kategorije opasnosti srednjeg stepena (od 2 000 cijanobakterijskih ćelija/mL), pa čak i opasnosti visokog stepena (od 100 000 cijanobakterijskih ćelija/mL). Kada se ove vrednosti posmatraju sa aspekta primene vode u rekreativne svrhe i ovde se stanje vode iz akumulacije Vrutci ubraja u kategoriju srednjeg stepena (od 20 000 cijanobakterijskih ćelija/mL) i opasnosti visokog stepena (preko 100 000 cijanobakterijskih ćelija/mL), što podrazumeva srednju zdravstvenu opasnost sa kratkotrajnim zdravstvenim negativnim posledicama (iritacije kože i sluzokože, intestinalne tegobe) kao i hronična obolenja, odnosno visoku zdravstvenu opasnost sa dodatnom mogućnosti akutnog trovanja sa letalnim ishodom.

Što se tiče analiziranja prisustva cijanotoksina u uzorcima vode iz akumulacije Vrutci, usled nepostojanja mogućnosti za obavljanje detaljnijih analiza u našoj zemlji, uz pomoć SZO je dogovorena saradnja i slanje uzoraka vode u laboratoriju Nemačke Federalne agencije za zaštitu životne sredine, koja je ponudila pomoć u dodatnom ispitivanju toksina. Rezultati

ispitivanja vode iz užičkog vodovoda, pokazali su da su vrednosti MC-LR u vodi za piće ispod GV koju propisuje SZO. Analize su takođe potvrdile odsustvo drugih toksina u analiziranoj vodi za piće

(<http://uimenaroda.rs/cache/watermark/4c086e621a8cad27563ee9178bce082d.jpg>).

Tokom ovog istraživanja, toksičnost pomoću bioeseja *A. salina* nije uočena u uzorku vodovodne vode, kao ni u vodi iz jezera sa manjih dubina, ali je rasla sa većom dubinom, pa je na 14 m uočen značajan nivo toksičnosti. Ovo je u skladu sa biologijom vrste i njenom karakterističnom nišom u metalimnionu, na dubinama od 10 do 15 m (brojnost *Planktothrix rubescens* kretala se od 82 336 do 98 936 ćelija/mL), na kojim je takođe uočeno cvetanje ove vrste npr. u Norveškom (Halstvedt i sar., 2007) i Ciriškom jezeru (Micheletti i sar., 1998).

Važno je istaći da je biomasa u bioeseju pokazala vrlo visoku toksičnost (kako intracelularna, tako i ekstracelularna komponenta), što je potvrđeno i LC-MS/MS analizama kojom je detektovano značajno prisustvo mikrocistina (dmMC-RR 11,694 i 18,492; dmMC-LR 3,690 i 4,564; MC-LR 0,053; MC-YR 0,020 i 0,036 mg/L). Po ovom parametru, zbog prisustva toksične biomase, voda u akumulaciji Vrutci bi sa rekreativnog aspekta predstavljala opasnost visokog stepena i pretnju za veliku zdravstvenu ugroženost (preko 0,02 mg MC/L).

U jezerskoj vodi uzorkovanoj u aprilu 2014. godine detektovano je 2,1 µg/L dmMC-RR, a u vodovodnoj vodi uzorkovanoj u januaru iste godine detektovano je 5,7 µg/L dmMC-RR. Iako su u pitanju visoke koncentracije koje prevazilaze GV za MC-LR (1 µg/L LD₅₀ 50 µg/kg), detektovan je drugi tip mikrocistina dmMC-RR kome se u zavisnosti od strukture LD₅₀ kreće od 180 do 250 µg/kg (Sivonen i Jones, 1999) i manje je toksičan od MC-LR.

Mikrocistini su detektovani i u ribi iz rezervoara Vrutci izlovljenoj u jesen 2013. godine i aprila 2014. godine. Zbog navedenih rezultata i višenamenskog korišćenja akumulacije Vrutci, građani Užica su mogli biti izloženi cijanobakterijama i njihovim toksinima na više načina. Pored osnovne namene akumulacije Vrutci, u svrhu vodosnabdevanja, Užičani su akumulaciju koristili i u rekreativne svrhe. Obale akumulacije se već više godina koriste kao određište za kampovanje i ribolov, a u letnjim mesecima za kupanje i druge rekreativne aktivnosti. U ovom slučaju, putevi ekspozicije cijanotoksinima mogli bi biti upotrebom kontaminirane vode za piće, tokom rekreativnih aktivnosti kada može doći do slučajnog gutanja neispravne vode, inhalacije kapljica vode, a prvenstveno samog dermalnog kontakta sa vodom, kao i ishranom kontaminiranom ribom. Sumirani događaji pre i nakon cvetanja u akumulaciji Vrutci predstavljeni se u Tabeli 34.

Tabela 34. Događaji pre i nakon cvjetanja u akumulaciji Vrutci

Datum	Događaj
2009. i 2011.	Značajno povećanja internog opterećenja u uslovima promene režima ispuštanja vode iz akumulacije Vrutci. Moguća pojava cijanobakterije <i>Planktothrix rubescens</i>
Septembar 2011.	Pogoršanje kvaliteta vode-povišeni nivo suspendovanih materija, pad sadržaja rastvorenog kiseonika po dubini, niske vrednosti rastvorenog kiseonika i procenat zasićenja vode kiseonikom, Agencija za zaštitu životne sredine
2012.	Prisustvo cijanobakterija na ulazu u akumulaciju u površinskim slojevima vode (5 % ukupne brojnosti fitoplanktona) i <i>Planktothrix rubescens</i> (0,32 % ukupne brojnosti fitoplanktona)
Avgust 2012.	Povećan sadržaj kiseonika u hipolimnionu na 26,5 m dubine (saturacija 62 %)-mogućnost prenamnožavanja <i>Planktothrix rubescens</i> , Agencija za zaštitu životne sredine
2012. i 2013.	Povećan broj obolelih od kožnih i gastrointestinalnih oboljenja građana Užica
Jesen 2013.	U mišićnom tkivu ribe iz jezera Vrutci detektovan MC-RR (0,082 ng/mg) i dmMC-RR (0,018 ng/mg)
Decembar 2013.	Primećene crvene nakupine na površini jezera Vrutci, kao i promene boje jezerske vode i njenog mirisa. Primećeno manje uginuće riba
23. decembar 2013.	Potvrda cvjetanja <i>Planktothrix rubescens</i> , "Dr Milan Jovanović Batut"
26. decembar 2013.	Izolovane cijanobakterije u prečišćenoj, dezinfikovanoj vodi sa postrojenja (10 000 ćelija/L) i u vodi iz mreže (1 000 ćelija/L) MC-LR ispd 1 µg/L, "Dr Milan Jovanović Batut". Voda higijenski neispravna-zabrana upotrebe vode za piće i pripremanje hrane, voda sa postrojenja može da se koristiti samo u sanitarno-tehničke svrhe, i ne preporučuje se korišćenje nakon prokuvavanja, Republička sanitarna inspekcija
31. decembar 2013.	Brojnost <i>Planktothrix rubescens</i> najveća u najplićem delu na ulazu u akumulaciju (107 900 ćelija/mL) i kod brane na 10 m dubine (98 936 ćelija/mL), Agencija za zaštitu životne sredine
Januar 2014.	Vrednosti MC-LR u vodi za piće ispod GV SZO, odsustvo drugih toksina, Laboratorija Nemačke Federalne agencije za zaštitu životne sredine posredstvom SZO
Januar 2014.	<u>Artemia test</u> : mortalitet nije zabeležen u vodovodnoj vodi i jezerskoj vodi sa manjih dubina, na većim dubinama (14 m) dobijen je značajan nivo toksičnosti, a u biomasi vrlo visoka toksičnost. <u>LC-MS/MS</u> : u biomasi su detektovani dmMC-RR (18,492 mg/L), dmMC-LR (4,564 mg/L), MC-LR (0,053 mg/L) i MC-YR (0,036 mg/L); u vodovodnoj vodi dmMC-RR (5,7 µg/L)
Januar 2014.	Uspostavljen alternativni vodovod sa Sušičkih vrela
April 2014.	U jezerskoj vodi detektovan dmMC-RR (2,1 µg/L), u tkivu ribe (mišići i iznutrice) dmMC-RR (0,117 i 6,891 ng/mg), dmMC-LR (0,050 i 0,781 ng/mg) i MC-RR (0,066 ng/mg)

5.1.3.2. Potencijalne zdravstvene posledice usled kontakta sa kontaminiranom vodom

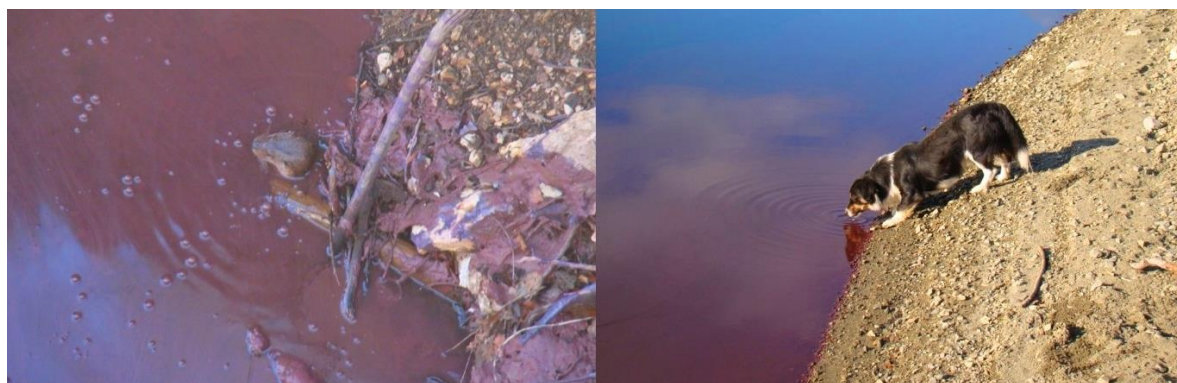
U cilju ispitivanja ekspozicije i uticaja cijanobakterijskog cvetanja hidroakumulacije Vrutci na zdravstveno stanje ljudi, sproveden je i analiziran upitnik koji je popunilo 320 građana Užica, starosti od 17 do 83 godina, pri čemu je veći broj ispitanika bio ženskog pola. Većina ispitanika u toku zabrane nije koristila vodovodnu vodu za piće (69,3 %), ipak neki su to činili povremeno (22 %) a neki svakodnevno (8,7 %). Oko polovine ispitanika (53,5 %) nije koristila vodovodnu vodu za spremanje hrane, dok je druga polovina to radila povremeno ili svakodnevno (27,5 % i 19 %). S obzirom da se kuvanjem ne uništava većina poznatih cijanotoksina (Dietrich i Hoeger, 2005) ljudi su ovim putem mogli doći u kontakt sa cijanotoksinima. Vodovodnu vodu za ličnu higijenu (pranje ruku, zuba, umivanje) svakodnevno je koristilo 76,7 % ispitanika i za tuširanje 80,4 %, a tokom tuširanja, ukoliko postoji kontaminacija vode, takođe može doći do dermalnog kontakta sa toksinima, što može da dovede do različitih oblika dermatitisa (Codd i sar., 2005). Više od polovine ispitanika (55 %) je primetilo promenu mirisa, ukusa i boje vode, a neki od njih su je i uprkos tome koristili. Naravno, neka od ovih opažanja mogu biti autosugestivna s obzirom na date okolnosti.

Jezero Vrutci je posećivalo 58 % ispitanika, neki se bave kupanjem, pećanjem, veslanjem, biciklizmom, planinarenjem i šetnjom. Jedan ispitanik je odgovorio da od 2013. ne ide na jezero, a svega tri su navela objašnjenja da ne idu na jezero iz razloga što to nije mesto za boravak i rekreaciju jer se ta voda koristi za piće. Promene u vodi jezera u vidu pojave pene, prevlake ili nakupine, promene boje vode i neprijatnog mirisa primetilo je 146 ispitanika, a 46 od njih je došlo u kontakt sa tim promenama. Ove promene u vodi su standardne manifestacije cvetanja cijanobakterija, a kao posledica cvetanja cijanobakterija može doći do trovanja ljudi i životinja.

Na jezeru Vrutci 29 ispitanika je videlo uginule životinje i to većinom ribu. Očevici su opisali uginuće manjeg broja riba, pri čemu su ribe plivale dezorijentisano, bočno i u krug, a kod uginule ribe moglo se uočiti intenzivno crvenilo u predelu škrga (Slika 20). Ispitanici su navodili i druge uginule životinje kao što su patke, pevac, jastreb, ovan, ovca, koza, krava, konj i jazavac. Da li je uzrok uginuća ovih životinja trovanje cijanotoksinima, nije moguće utvrditi na ovaj način, ali svakako predstavlja upozorenje i zahteva dalja istraživanja. Takođe, kućni ljubimci, prvenstveno psi pojedinih ispitanika (21) su došli u kontakt sa vodom (Slika 21), a neki od njih (13) potvrdili su naknadne zdravstvene probleme životinja u formi: promena na koži, crvenila, iritacija i krasti, manjih alergija i bolova u stomaku, koji između ostalog mogu biti posledice delovanja cijanotoksina.



Slika 20. Riba sa crvenilom na škragama i uginula riba (Foto: Tijana Jeftić)



Slika 21. Vidra i pas koji pije vodu iz akumulacije Vrutci (Foto: Ivetić, Izveštaj 2014)

Cijanotoksini mogu da dovedu do brojnih zdravstvenih poremećaja kod ljudi. Unošenje cijanotoksina putem vode za piće i tokom rekreativnih aktivnosti, putem direktnog dermalnog kontakta ljudi sa toksinima, ingestijom kontaminirane vode i inhalacijom aerosola, može da izazove razvoj različitih oblika dermatitisa, alergije, svrab, peckanje, iritaciju kože i očiju, groznicu, vrtoglavicu, respiratorne i gastrointestinalne smetnje (videti Svirčev i Baltić, 2011). U Užicama, nakon decembra 2013. ispitanici i njihovi članovi porodice su se žalili na: stomadne tegobe, iritacije kože, očiju i učestale glavobolje, kao i probleme sa mokraćnom bešikom, pritiskom, vrtoglavicom i dugotrajnim suvim kašljem. Neki od ovih zdravstvenih problema mogu da se povežu sa cvetanjem cijanobakterija. Međutim, u poslednje tri godine ovi zdravstveni problemi su bili slični, što može da ukaže da oni nisu rezultat delovanja cijanotoksina, ali sa druge strane postoje indicije da je do pojave cijanobakterija u jezeru Vrutci dolazilo i prethodnih godina, međutim takvi podaci nisu nigde javno objavljeni, te izostaje definitivna potvrda ovih navoda.

U cilju detaljnijeg razmatranja potencijalnog uticaja cijanotoksina na zdravlje ljudi u saradnji sa Zavodom za javno zdravlje Užice, prikupljeni su podaci o broju obolelih građana od određenih oboljenja koja se mogu dovesti u vezu sa cvetanjem cijanobakterija, a to su oboljenja sistema za varenje i oboljenja kože i podkožnog tkiva.

Tokom 2013. godine uočen je blagi porast obolelih Užičana od bolesti sistema za varenje, usled čega se oboljenja creva i potrbušnice potencijalno mogu dovesti u vezu sa pojavom cvetanja cijanobakterija u akumulaciji Vrutci. Sa druge strane, u slučaju oboljenja kože iako se poslednjih godina konstatuje trend uvećanja broja obolelih, u 2013. godini broj obolelih se smanjio. Ukoliko se pretpostavi da je određeni procenat ljudi oboleo usled korišćenja vode iz akumulacije Vrutci u rekreativne svrhe, prvenstveno za kupanje, onda se to smanjenje broja obolelih u 2013. godini, u odnosu na prethodnu godinu, može objasniti umerenim letom, sa ne tako visokim temperaturama, većom količinom padavina, pa samim tim i smanjenjem rekreativnih aktivnosti na vodi.

Što se tiče obolelih od malignih bolesti u Užicu, ističe se veliki broj obolelih od raka pluća i dojke. Od 13 maligniteta koji su proučavani u Centralnoj Srbiji, u Užicu najviši je bio broj obolelih od raka kolona i rektuma, a ostali analizirani kanceri su bili u okviru niskih vrednosti. Tokom ispitivanog perioda od 2002. do 2012. godine kancer jetre je beležio blag porast od 2007. do 2010., a u poslednje dve godine broj obolelih je bio manji.

Zabeležen broj obolelih od kancera zavisi od niza faktora, da li se i kada oboleli obratio lekaru, u kom stadijumu bolesti, da li se podvrgao lečenju i na koji način, i slično. Zatim, važni su i uslovi u kojima pacijent živi, životne navike i stil života (način ishrane, konzumacija alkohola, pušenje i drugo). Poznato je da su kanceri multifaktorijalne bolesti, a s obzirom da u Užicu nisu dodatno praćeni drugi faktori rizika, ne mogu se doneti pouzdani zaključci o pojavi kancera. Na osnovu izloženih podataka ne može se konstatovati da postoji korelacija između posmatranih kancera i cvetanja cijanobakterija u akumulaciji Vrutci.

Za jasniju i precizniju diskusiju o pojavi kancera pre 2013. godine bilo bi neophodno znati detalje cvetanja cijanobakterija pre 2013. godine, a takvi podaci ne postoje. Zbog toga se povezanost zdravstvenih problema stanovnika grada Užica sa cvetanjem toksičnih cijanobakterija u jezeru Vrutci može ispitivati samo za period od decembra 2013. godine kada je zvanično konstatovano cvetanje. Pored toga, zdravstveni problemi izazvani cijanobakterijama i cijanotoksinima mogu biti rezultat hroničnog izlaganja i potrebno je da prođe više vremena da bi se mogle uočiti neke anomalije. Neophodno je nastaviti sa praćenjem epidemioloških podataka, posebno u godinama koje dolaze, u cilju preciznije analize uticaja cvetanja na zdravstveno stanje stanovnika Užica.

5.2. Put izloženosti cijanotoksinima preko kontaminirane ribe

Ribe imaju važnu ulogu u održavanju stabilnosti vodenog ekosistema, zbog položaja koji zauzimaju u vodenim lancima ishrane, a služe i kao izvor hrane za čoveka. Sa druge strane, cijanobakterije su bitna komponenta ishrane za mnoge ribe (Zurawell i sar., 2005). Cijanobakterije su široko rasprostranjeni mikroorganizmi koji su prisutni u ribnjacima širom sveta, pa i u našoj zemlji. S obzirom da ribe žive u vodenoj sredini one mogu na različite načine da dođu u kontakt sa cijanobakterijama i njihovim toksinima, što može negativno da utiče na rast, razvoj, razmnožavanje, pa i sam opstanak riba (Oberemm i sar., 1999; Liu i sar., 2002; Jacquet i sar., 2004; Dong i sar., 2009).

Izlaganje ribe se može realizovati na dva osnovna načina: prvi način je aktivno, oralnim unošenjem hrane bilo cijanobakterijskih ćelija i/ili drugih organizama koji su akumulirali cijanotoksine. Drugi potencijalni način je pasivno, direktnim dodiranjem epitela škrga sa okolnom vodom koja sadrži toksine. Međutim, kombinacija oba načina izlaganja se najčešće odvija u prirodnim uslovima (Malbrouck i Kestemont, 2006).

U slučaju akutnih trovanja, visoke doze cijanotoksina mogu da deluju letalno na vodene organizme. Međutim, kada su doze subletalne, životinje mogu da prežive, akumuliraju cijanotoksine i prenose ih kroz lance ishrane (Vasconcelos, 1999). Naime, deo unetih cijanotoksina riba ekskretuje preko izmeta, a drugi deo se može akumulirati u različitim organima ribe. Uočeno je da se mikrocistini, nodularin i saksitoksini akumuliraju u tkivima različitih vodenih organizama (Shumway, 1995; Xie i sar., 2005; Chen i Xie, 2005; 2005a; Chen i sar., 2005a; 2006a; Mazur-Marzec i sar., 2007; Karjalainen i sar., 2008; Romo i sar., 2012). Primećeno je da se akumulacija mikrocistina prvenstveno odvija u jetri ribe, ali takođe i u mišićima, crevima i drugim organima (Malbrouck i Kestemont, 2006). Koncentracije mikrocistina su obično najveće u crevima i jetri, zatim bubrezima i gonadama, a najmanje u mišićnom tkivu (Malbrouck i sar., 2003; Li i sar., 2004; Xie i sar., 2005). Međutim, brojna istraživanja su pokazala da se velike količine cijanotoksina mogu akumulirati u mišićnom tkivu ribe koja je rasla u prirodnoj sredini i to u koncentracijama koje prevazilaze GV i TDI (Magalhaes i sar., 2001; Magalhaes i sar., 2003; Soares i sar., 2004; Xie i sar., 2005; Chen i sar., 2006a; Zhang i sar., 2009), a ako se takvo tkivo ribe koristi u ishrani ljudi, ono može da predstavlja zdravstveni rizik.

Pored bioakumulacije cijanotoksina postoji i mogućnost njihove biomagnifikacije, odnosno transfera toksina iz hrane do organizma, s tim da se viša koncentracija može naći u

organizmu nego u hrani (Hoffman i sar., 2003). Postoje nekoliko studija o biomagnifikaciji cijanotoksina ali nalazi su oprečni, neki ukazuju na potencijalnu biomagnifikaciju (Xie i sar., 2005; Zhang i sar., 2009), dok drugi nisu pronašli dokaze za ovu pojavu, moguće usled biodilucije, detoksikacije, ekskrecije, razgradnje i/ili kovalentnog vezivanja cijanotoksina (Ibelings i sar., 2005; Ibelings i Havens, 2008). Smith i Haney (2006) su pratili koncentracije mikrocistina kroz lanac ishrane od fitoplanktona, preko zooplankton do ribe *Lepomis gibbosus*, pri čemu su uočili transfer toksina od zooplanktona do ribe i njegovu akumulaciju u tkivu jetre, ali nisu uočili biomagnifikaciju. U svakom slučaju, mikrocistini su prisutni u različitim trofičkim nivoima i mogu predstavljati opasnost za sve članove lanca ishrane. Neophodno je pratiti prisustvo cijanobakterija i njihovih toksina u ribnjacima gde se uzgajaju ribe za ljudsku ishranu, kao i kontrolisati koncentracije cijanotoksina u njihovim mišićima, radi sprečavanja narušavanja kvaliteta hrane, a samim tim i sprečavanja potencijalnih zdravstvenih komplikacija kod potrošača.

5.2.1. Potencijalno izlaganje putem ishrane kontaminiranom ribom iz jezera Vrutci

U slučaju Vrutci još jedan od potencijalnih puteva izlaganja ljudi cijanotoksinima je putem kontaminirane ribe. Na osnovu podataka dobijenih iz ankete, u poslednje tri godine čak 18 ispitanika se svakodnevno hranilo ribom, a njih 5 to praktikuje i nakon decembra 2013. Nekoliko puta nedeljno se ribom hrani mali broj ispitanika (5 pre i posle decembra), a nešto više na mesečnom nivou (23 ispitanika), ali je taj broj opao nakon cvetanja u akumulaciji (7 ispitanika). Na godišnjem nivou 17 % ispitanika je konzumiralo ribu iz ovog jezera, dok je 68 % ispitanika u poslednje tri godine nisu konzumirali. Iako postoji veliki procenat ispitanika koji ne konzumiraju ribu iz jezera Vrutci, postoje i oni koji ovu ribu ipak koriste u ishrani, pa čak i nakon cvetanja akumulacije.

Mišićno tkivo ribe uzorkovano tokom jeseni 2013. godine sadržalo je 0,082 ng MC-RR po mg mišićnog tkiva i 0,018 ng dmMC-RR po mg mišićnog tkiva ribe. U uzorcima iz aprila 2014. godine gde je analizirano zajedno mišićno tkivo i iznutrice, u jednom uzorku su detektovani dmMC-LR (0,117 ng/mg) i dmMC-RR (0,050 ng/mg), dok su u drugom uzorku pronađeni: dmMC-LR (0,781 ng/mg), dmMC-RR (6,891 ng/mg) i MC-RR (0,066 ng/mg). Razlike u koncentracijama toksina između dva uzorka iz aprila mogu biti rezultat različitih lokaliteta na kojima su upecane ribe, kao i to da su u pitanju različite vrste riba, a poznato je da različite vrste različito akumuliraju cijanotoksine u svojim tkivima (Deblois i sar., 2008).

Prisustvo MC-RR i njegove dimetilovane forme u mišićima ribe uzorkovane u jesen 2013. godine mogu da ukažu na postojanje cijanobakterija u akumulaciji i pre decembra te godine. Veće koncentracije ovih toksina, ali i prisustvo dmMC-LR u uzorcima iz aprila naredne godine, se između ostalog mogu objasniti analizom mišića i iznutrica zajedno, jer na osnovu prethodnih istraživanja, značajno veće koncentracije toksina su pronađene u crevima i jetri, u poređenju sa mišićima riba (npr. Magalhaes i sar., 2001 (crevo 67,8, jetra 31,1, mišić 0,03 µg/g); Xie i sar., 2005 (crevo 22, jetra 7,8, mišić 1,8 µg/g); Chen i sar., 2006a (crevo 97,5, jetra 6,8, mišić 1,2 µg/g)). S obzirom da se prilikom pripreme ribe očiste iznutrice i konzumira se samo mišić, ovo smanjuje rizik od izlaganja cijanotoksinima. Zbog toga je generalna preporuka da se ne konzumiraju iznutrice riba ukoliko je cvetanje cijanobakterija izraženo. Međutim, iako se akumulacija cijanotoksina uglavnom odvija u jetri, ona je moguća i u drugim organima (bubrežima, crevima, žučnoj kesi, slezini, gonadama, krvi i mozgu), pa čak i u mišićima ribe (Magalhaes i sar., 2001; Magalhaes i sar., 2003; Soares i sar., 2004; Xie i sar., 2005; Chen i sar., 2006a; Zhang i sar., 2009) i to u visokim koncentracijama.

Vrednosti mikrocistina detektovane u tkivu ribe iz jezera Vrutci su visoke i prelaze GV predložene od strane SZO za MC-LR. Međutim, najtoksičnija forma ovog cijanotoksina MC-LR (LD₅₀ 50 µg/kg) nije detektovana, dok je u najvećim koncentracijama detektovan dmMC-RR (LD₅₀ 180-250 µg/kg), a koji je kao i MC-RR (LD₅₀ 600 µg/kg) manje toksičan od MC-LR (Sivonen i Jones, 1999), što ublažava rizik od izlaganja ovim putem. Takođe, treba napomenuti da su navedene vrednosti izražene u gramima suve težine, te su u realnosti ove vrednosti niže. Međutim, *recovery* za dmMC-LR je iznosio 93,51 %, za MC-LR 88,43 %, za dmMC-RR 49,23 % i za MC-RR 37,33 % što ukazuje da postoji mogućnost da ovi cijanotoksini nisu u potpunosti ekstrahovani iz tkiva ribe i da realne vrednosti mogu biti veće od dobijenih, prvenstveno se to odnosi na MC-RR i njegovu dimetilovanu formu. Uzimajući sve navedeno u obzir, dobijene vrednosti mogu da se posmatraju kao procena koncentracije mikrocistina u tkivima uzorkovane ribe, a za značajnije zaključke o kvalitetu mesa ribe u odnosu na prisustvo cijanotoksina je neophodno uraditi opsežnija istraživanja. Posebno je značajno da se nakon detaljnih i planskih istraživanja zdravstveni aspekt sagleda realno i sa posebnom pažnjom. Do sada nema podataka o tome kako na ljudsko zdravlje deluje konzumiranje vodenih organizama, uključujući i ribe, sa akumuliranim cijanotoksinima i to posebno nakon dužeg perioda konzumacije, što zahteva dalja istraživanja hroničnih efekata.

5.2.2. Cvetanje cijanobakterija u ribnjacima-Stanje u Srbiji

Istraživanje cijanobakterija u ribnjacima Srbije je počelo 50-ih godina prošlog veka. Jedno od prvih istraživanja je sprovedeno od 1949. do 1951. godine na jednom od najstarijih i najvećih ribnjaka u Evropi-Ečka, koji se nalazi kod Zrenjanina, u trouglu reka Tisa, Begej i Tamiš. Tada su Milovanović i Živković (1953) u ovom ribnjaku pronašli vrste *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae*, *Microcystis marginata*, *Aphanizomenon flos-aquae* i *Anabaena* spp. Naredno odredište ovih autora bio je ribnjak Živača kod Beograda i ovde je od 1951. do 1955. godine dolazilo do cvetanja *Microcystis aeruginosa* (Milovanović i Živković, 1959). Sledeće istraživanje Milovanović (1963) sprovodi od jula do septembra 1961. godine na ribnjaku Kolut gde je cvetao *Microcystis aeruginosa*, a bile su prisutne i vrste *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae* i *Anabaena spiroides*. Ristić i saradnici (1979) su 1977. godine u ribnjaku Futog uočili prisustvo *Anabaena* sp., *Anabaena spiroides* i *Anabaenopsis* sp. Nedavno je u Kapetanskom ritu, velikom ribnjaku kod Palića, uočeno prisustvo invazivne i potencijalno toksične vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ćirić i sar., 2010).

U skorije vreme počela je da raste zabrinutost u pogledu zdravstvenih efekata koji cijanobakterije i njihovi toksini imaju na same ribe i potencijalno na ljude koji u ishrani koriste ribu koja sadrži cijanotoksine, što je dovelo do povećanja broja istraživanja na ribnjacima. Većina naših istraživanja su rađena na ribnjacima u Vojvodini. Tokom ovih istraživanja (2010-2011 godine), zabeleženo je cvetanje cijanobakterijskih vrsta *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Phormidium foveolarum*, *Jaaginema subtilissimum*, *Pseudanabaena limnetica* i *Geitlerinema amphibium*, a kao posledica toga detektovani su mikrocistini u vodi, mulju, makrofitama i tkivu ribe (Izveštaj Svetske Banke, 2011; Svirčev i sar., 2014).

Početak januara 2014. godine došlo je do masovnog pomora ribe (babuške) u ribnjaku Dragocvet, kod Jagodine. Tada je u vodi pronađen *Planktothrix agardhii*, a u tkivima uginule ribe (testirane su čitave jedinice) detektovan je MC-RR (0,081 ng/mg) (neobjavljeni podaci).

5.2.3. Cijanobakterije i cijanotoksini u ribnjacima, njihova akumulacija i efekti na tkivo ribe

5.2.3.1. Cvetanje toksičnih cijanobakterija u ispitivanim ribnjacima Vojvodine

Tokom leta 2011. godine, došlo je do cvetanja cijanobakterija u analiziranom kompleksu ribnjaka u Vojvodini (Slika 22). Radi detekcije trofičkog statusa ispitivanih ekosistema, izvršeno je merenje hlorofila *a*, čija je koncentracija otkrila da se trofički status kretao od mezo-eutrofnog do politrofnog (Tabela 22), koje odlikuje visoka koncentracija hlorofila *a*. Ovaj zeleni pigment je najrasprostranjeniji oblik hlorofila među fotosintetičkim organizmima, uključujući cijanobakterije, pa hlorofila *a* može biti indikativan za njihovo prisustvo.



Slika 22. Cvetanje cijanobakterija u ribnjacima Vojvodine 2011. godine

Mikroskopski pregled i analize fitoplanktona potvrdili su prisustvo cijanobakterija u uzorcima vode iz ribnjaka. Kvantitativne analize cijanobakterija su pokazale da veliki broj ćelija cijanobakterija odgovara visokim koncentracijama hlorofila *a*. Samo je u jednom ribnjaku broj ćelija bio ispod 10 000 ćelija po mililitru (R6), dok su u preostalim bile zabeležene veće vrednosti, čime je potvrđeno cvetanje.

U prirodnim uslovima, cvetanje može da sadrži više vrsta cijanobakterija, od kojih su mnoge potencijalni proizvođači različitih cijanotoksina. Kvalitativne analize su pokazale prisustvo 30 vrsta cijanobakterija, od kojih neke pripadaju rodovima koji imaju sposobnost produkcije cijanotoksina. Na primer, proizvodnja mikrocistina potvrđena je kod rodova *Microcystis* (Ripka i Hardman, 1992, Luukkainen i sar., 1994) koji je bio najbrojniji u ispitivanim ribnjacima, kao i kod rodova: *Leptolygbya* (Silva i sar., 2014), *Pseudoanabaena* (Marsalek i sar., 2003) *Geitlerinema* (Gantar i sar., 2009), *Chroococcus* (Neilan i sar., 2008), *Arthrospira* (Ballot i sar., 2005), *Anabenopsis*, *Aphanocapsa* i *Synechocystis* (videti Hardy, 2011). Nekoliko autora je potvrdilo da rodovi kao što su *Anabaena* (Sivonen i sar., 1992, Namikoshi i sar., 1992, Rapala i sar., 1997, Halinen i sar., 2007, Fewer i sar., 2009, Belykh i sar., 2011) i *Phormidium* (Teneva i sar., 2005, Izaguirre i sar., 2007, Wood i sar., 2010) mogu da proizvode mikrocistine i saksitoksine. Nodularin stvara cijanobakterija *Nodularia* (Ripka i Herdman, 1992; Lehtimaki i sar., 1994) na osnovu čega je ovaj cijanotoksin i dobio svoje ime. Čak je u jednom od jezera (R7) pronađena invazivna tropska/suptropska cijanobakterija *Cylindrospermopsis raciborskii*, koja ima sposobnost produkcije saksitoksina i cilindrospermopsina (Hardy, 2011).

Imajući u vidu napred rečeno, nije bilo iznenađujuće kada je potvrđeno prisustvo cijanotoksina u uzorcima vode iz ispitivanih ribnjaka. Više koncentracije mikrocistina i nodularina su detektovane u jezerima sa najvećim brojem cijanobakterijskih ćelija i visokim koncentracijama hlorofila *a* (R2, R4, R8). U pet ribnjaka su takođe detektovane niske koncentracije saksitoksina, uključujući pomenuta tri ribnjaka. Toksičnost uzoraka vode iz ispitivanih ribnjaka je potvrđena i u ranijim istraživanjima, pomoću *A. salina* bioeseja i testa inhibicije proteina fosfataze 1 (PP1) (Tabela 35) (Tokodi i sar., 2013, 2014).

Tabela 35. Toksičnost na osnovu bioeseja *A. salina* (prosečne vrednosti) i srednje koncentracije MC-LR ekvi. dobijeni PP1 testom u uzorcima vode iz ribnjaka po grupama (Tokodi i sar., 2013; 2014)

Ribnjaci	Septembar 2011.				Novembar 2011.			
	Intracelularni sadržaj		Ekstracelularni sadržaj		Intracelularni sadržaj		Ekstracelularni sadržaj	
	<i>A.salina</i> (%)	PP1 µg/L	<i>A.salina</i> (%)	PP1 µg/L	<i>A.salina</i> (%)	PP1 µg/L	<i>A.salina</i> (%)	PP1 µg/L
R1,R2,R9, R10,R12,R13	5,26	10,78	2,4	7,28	8,9	8,05	4,41	6,07
R3,R4,R11	21,72	28,53	6	1,66	55,85	23,38	6,8	10,53
R5,R6,R7,R8	75,5	108,2	9,25	2,2	70,75	85,83	69,5	7,45

5.2.3.2. Akumulacija cijanotoksina u tkivu ribe iz ispitivanih ribnjaka Vojvodine

Cijanobakterije i njihovi toksini se javljaju širom sveta u velikom broju ribnjaka i jezera u kojima se odvija komercijalni i rekreativni ribolov i postoji zabrinutost u vezi negativnih efekta koje mogu imati na kvalitet ribe i zdravlje ljudi koji ih koriste u ishrani. Tako je na primer tokom istraživanja u Kini prvi put u serumu 35 ribara utvrđeno prisustvo MC-RR, MC-YR i MC-LR (prosečno 0,39 ng/mL), a biohemijske analize su ukazale na moguće oštećenje jetre (Chen i sar., 2009). Ribari su u periodu od 5 do više od 10 godina pili jezersku vodu u kojoj su cvetale cijanobakterije i jeli ribu i školjke iz jezera. Pri tome, dnevni unos kod ribara je procenjen na 2,2-3,9 μg MC-LR ekvi., dok TDI iznosi 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ili 2-3 μg po osobi. Ovi rezultati ukazuju na postojanje rizika od hroničnog izlaganja mikrocistinima i posledičnih zdravstvenih komplikacija, posebno kada su u pitanju populacije sa visokim nivoem izloženosti, kao što je slučaj sa ribarima.

GV za MC-LR u ribljem mesu mogu da se izračunaju ukoliko TDI od 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pomnožimo sa prosečnom težinom odrasle osobe npr. 60 kg i faktorom za ovaj put ekspozicije koji iznosi 0,2 a zatim se to podeli sa količinom mesa ribe koja se konzumira, recimo 0,1 kg. Dobijena vrednost iznosi 4,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mesa ribe. Ta vrednost može da bude i manja, ukoliko se računaju veće porcije (200, 300 g) ili manja telesna težina za decu (20 kg) (Dietrich i Hoeger, 2005).

Vrednosti mikrocistina (oko 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) detektovane u 4 uzoraka mišićnog tkiva ribe *Cyprinus carpio* koja se koristi u ishrani, prevazilaze dobijenu vrednosti od 4,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i to 12 puta. Međutim, ovde se mora naglasiti da se dobijene vrednosti odnose na MC-RR formu mikrocistina koja je oko 10 puta manje toksična od MC-LR (LD_{50} za MC-LR kod miša je 50-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a za MC-RR 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) za koji su i određene GV (Sivonen i Jones, 1999), a samim tim je i rizik značajno manji. Takođe, treba napomenuti, kao i u slučaju Vrutci, da ove vrednosti predstavljaju okvirne koncentracije mikrocistina, jer su izražene po gramima suve težine, a *recovery* (39,9 %) ukazuje da postoji verovatnoća da nisu kompletni mikrocistini ekstrahovani iz tkiva ribe.

Veća akumulacija mikrocistina je karakteristična za druge organe ribe, kao što su jetra, bubreg, creva, žučna kesa, čak i krv (Magalhaes i sar., 2001; Mohamed i sar., 2003; Li i sar., 2004; Soares i sar., 2004; Xie i sar., 2005; Adamovsky i sar., 2007). Takođe, različite vrste riba akumuliraju različite količine toksina u svojim tkivima (Xie i sar., 2005). Kao primer u jezeru Suwa (Japan), poznatom po čestom letnjem cvetanju mikrocistisa koji proizvodi MC-LR i MC-RR, analizirane su tri vrste riba *Silurus glanis*, *Carassius auratus* i

Cyprinus carpio. Sadržaj mikrocistina je bio drugačiji u različitim organima riba: MC-RR je pronađen u jetri dve vrste *Carassius auratus* i *Cyprinus carpio*, a u mišićima ovaj toksin je bio prisutan kod svih vrsta (*Silurus glanis* 0,14 µg/g st, *Carassius auratus* 0,49 µg/g st, *Cyprinus carpio* 0,27 µg/g st). MC-LR nije detektovan u tkivima ribe, iako je bio prisutan u toku cijanobakterijskog cvetanja (MC-LR 16,6 µg/g st i MC-RR 19,2 µg/g st). Postoji mogućnost da je MC-LR ostao kovalentno vezan za protein fosfataze u tkivima riba i iz tog razloga njegova detekcija nije bila moguća (Xie i sar., 2007).

Poste i saradnici (2011) su pokazali da je mikrocistin sveprisutan u vodi i ribi iz nekoliko tropskih i umerenih jezera širom sveta. Ovi autori su takođe primetili da su koncentracije mikrocistina u ribi pokazale veliku varijabilnost unutar pojedinačnih jezera. Ova varijabilnost se može pripisati sezonskoj varijabilnosti mikrocistina u vodi, razlikama u ishrani između uzorkovanih vrsta i širokom rasponu u veličini unutar vrste. Primetili su da koncentracija mikrocistina može da prevazilazi preporučene smernice za dnevni unos ovog toksina i konzumacija kontaminirane ribe može da bude važan i ponekad dominantni put izloženosti ljudi cijanotoksinima (Poste i sar., 2011).

Takođe, još jednom je važno naglasiti da ni prokuvavanje vode, kao ni kuvanje ribe ne mogu smanjiti rizik od izloženosti mikrocistinima (Harada i sar., 1996; Zhang i sar., 2010). Sve ovo zajedno sa detektovanim prisustvom MC-RR u uzorcima mišića ribe ukazuje na potrebu za kontrolom kvaliteta mesa ribe iz ribnjaka i jezera pogođenih cvetanjem cijanobakterija, kao i kontrole i prvenstveno prevencije cvetanja cijanobakterija, a samim tim i prisustva cijanotoksina u vodama koje se koriste za uzgoj ribe, a sve u cilju zaštite ribe i potrošača.

5.2.3.3. Histopatološke promene u tkivima izložene ribe

Pored akumulacije toksina u tkivima ribe, cijanobakterije mogu imati i direktne negativne efekte na samu ribu. Embrioni i larve su posebno osetljivi na delovanje mikrocistina i izlaganje ovim toksinima u ranim fazama života može da poremeti izleganja embriona, smanji opstanak i stopu rasta, kao i da izazove određene poremećaje (malu glavu, zakrivljenje tela i repa, uvećanu i neprozirnu žumančanu kesu, hepatobilijarne abnormalnosti, poremećaje u radu srca) kao i histopatološke promene (videti Malbrouck i Kestemont, 2006; Drobac, 2011a).

Cijanobakterije i njihovi metaboliti imaju širok spektar efekata i na adultne jedinke. Oni utiču na promenu lokomotorne aktivnosti i ponašanje riba, jonsku regulaciju, stopu ingestije i rasta, funkcionisanje srca, izazivaju promene u sastavu seruma i oksidativni stres, mogu poremetiti reprodukciju riba i izazivati razne histopatološke promene u tkivima i organima ribe (Keshavanath i sar., 1994; Carbis i sar., 1996; Baganz i sar., 1998; Bury i Codd, 1998; Best i sar., 2001; Li i sar., 2003; Gupta i Guha, 2006; Drobac, 2011a; Mitsoura i sar., 2013).

Histopatološke promene na različitim organima ribe imaju veliki značaj u akvatičnoj toksikologiji i široku primenu u monitoringu zagađenja vode (Nascimento i sar., 2012; Pereira i sar., 2013). S obzirom da mnoge vrsta riba uključuju cijanobakterije u svoju ishranu, creva su jedan od prvih organa pogođenih delovanjem mikrocistina. Šaran hranjen sa mikrocistinom (jedna doza 400 µg/L) ispoljio je apoptozu i piknotička jedra u enterocitima 12 h posle izlaganja. Kasnije su promene postale još intenzivnije i uključivale su oštećenje ćelija i unutrašnja krvarenja (Fischer i Dietrich, 2000). Histopatološke promene na crevima su primećene i kod šarana iz ispitivanih cvetajućih ribnjaka Vojvodine i u ovom slučaju su prvi put opisane hiperplazija enterocita i fuzija resica. S obzirom da šaran u svojoj ishrani sadrži cijanobakterije, nastale promene mogu biti povezane sa uticajem mikrocistina.

Mikrocistini apsorbovani kroz creva mogu potom da stignu i do drugih organa, pre svega jetre, gde se akumuliraju i izazivaju dodatnu štetu. Jetra je primarna meta mikrocistina (Dawson, 1998). Nakon oralnog izlaganja šarana ovom cijanotoksinu uočeni su poremećaji strukturne organizacije, disocijacija hepatocita, kondenzovanje citoplazme, liza membrane hepatocita indikativne za nekrozu, pojava piknotičkih/apoptičkih jedara (Fisher i Dietrich, 2000). *In vitro* izlaganje mikrocistinima rezultovalo je degenerativnim promenama u morfologiji izolovanih hepatocita kod šarana, sa posmatranim odlublivanjem ćelijske membrane, skupljanjem i deformacijom jedra, oticanjem, vezikulacijom endoplazmatičnog retikuluma, oticanjem i preuređenjem citoskeleta, oštećenjem ćelijske membrane i citoskeleta, kao i oticanjem i vakuolizacijom mitohondrija (Li i sar., 2001). Šaran je 14 dana posle izlaganja rastvorenim mikrocistinima (10 µg/L) putem potapanja ispoljio blagi otok hepatocita, delimično razlaganje arhitekture parenhima sa degeneracijom vakuola, staze sinusoida jetre, piknoze i oštećenje acinusa pankreasa (Jiang i sar., 2011). Slične histopatološke promene u vidu poremećaja strukture parenhima, zaobljavanja ćelija i vakuolizacije su primećene u tkivu jetre šarana iz ispitivanih ribnjaka u Vojvodini koji su bili zahvaćeni cvetanjem cijanobakterija.

Bubrezi mogu biti dobri pokazatelji stresa u životnoj sredini, jer oni primaju većinu postbranhialne krvi. Dodatno, tubularne ćelije bubrega poseduju transportni mehanizam sličan onom kod hepatocita, koji je odgovoran za unošenje toksina u ćeliju (Runnegar i sar., 1991). Nakon ip injekcije MC-LR (250 i 300 µg/kg) kod šarana su primećene patološke promene u tubulama, glomerulima i intersticijalnom tkivu. Riba izložena nižim koncentracijama mikrocistina imala je dilatacije Bovmanove kapsule, a riba izložena većim koncentracijama razvila je nekrozu i piknozu tubularnih ćelija (Rabergh i sar., 1991). Slične histopatološke promene u vidu vakuolizacije tubularnih ćelija, nekroze i piknoze su registrovane kod šarana posle ip ekspozicije mikrocistinima kao i putem potapanja (Carbis i sar., 1996). Posle oralnog izlaganja šarana mikrocistinima (400 µg/kg telesne mase), uočene su vakuolizacije tubularnih ćelija i piling epitelnih ćelija u lumen tubula, kao i piknoza, apoptoza, liza ćelija i degeneracija tubula (Fisher i Dietrich, 2000). Promene bubrega kod šarana iz jezera koja su cvetala, bile su slične onima iz laboratorijskih uslova. Kod šarana uhvaćenih iz jezera Karla (Grčka) tokom izraženog cvetanja dokumentovana je degeneracija tubula, dilatacije Bovmanove kapsule, glomerularna atrofija, piknoza, fragmentacija jedrove membrane i proliferacija lizozoma (Mitsoura i sar., 2013). I u slučaju šarana iz cvetajućih ribnjaka u Vojvodini, zabeležena je dilatacija Bovmanove kapsule i vakuolizacija tubula, a izražena nekroza tubula i glomerula ukazuje na jaku osetljivost bubrega na cijanotoksine.

Škrge riba su u direktnom kontaktu sa vodom i samim tim sa cijanotoksinima u njoj. Škrge predstavljaju pogodni marker zagađenja životne sredine jer su u direktnom kontaktu sa vodom, imaju veliku površinu, delikatnu strukturu i višestruko važne funkcije (Bernet i sar., 1999; Lujčić i sar., 2014; Rašković i sar., 2014). Šaran iz jezera Mokoan (Australija) u kome je cvetao *Microcystis aeruginosa* je imao histopatološke promene na škragama u vidu podizanja i eksfoliacije lamelnog epitela i nekroze (Carbis i sar., 1997). Šaran izložen mikrocistinima potapanjem (10 µg/L mikrocistina) tokom *in vitro* ispitivanja, pokazali su slične histološke promene, u formi podizanje epitela, oštećenja epitelnih ćelija i redukcija sluzokože (Jiang i sar., 2011). Histopatološke promene su uočene i na škragama šarana iz ispitivanih ribnjaka Vojvodine. Hiperplazija i oticanje epitela mogu predstavljati odbrambeni mehanizam u cilju smanjenja unošenja ksenobiotika (Mallatt, 1985; Fernandes i Mazon, 2003; Agamy, 2013). Međutim, intenzivna hiperplazija koja vodi lamelarnoj fuziji može narušiti funkciju škrge. Osim toga hipertrofija i hiperplazija hloroidnih ćelija mogu biti dovedene u vezu sa efektima mikrocistina koji inhibišu jonske pumpe škrge (Gaete, 1994; Zambirano i Canelo, 1996) i remete jonsku regulaciju. Nastala neravnoteža može rezultovati oticanjem i proliferacijom hloroidnih ćelija.

Histopatološke promene su uočene i na mišićnim vlaknima kod tolstolobika (*Hypophthalmichthys molitrix*) izloženog cijanobakteriji *Microcystis aeruginosa*. Uočeno je povećanje međucelijskog prostora i krvarenje u vezivnom tkivu između vlakana tokom ranijih faza eksperimenta. U kasnijim fazama registrovani su znaci nekroze i jedarne fragmentacije kao i prvi znaci fragmentacije samih mišićnih vlakana, otok i liza sa oslobađanjem ćelijskog sadržaja. Oporavak tkiva sa normalizacijom strukture ćelije je primećen dve nedelje nakon izlaganja. Međutim, nekroza i krvarenja su i dalje bili vidljivi (Ferreira i sar., 2010). Generalno, malo je radova koji svedoče o promenama u mišićnom tkivu riba usled uticaja cijanotoksina. Ovde su prvi put opisane izražene promene na mišićima šarana koji su bili izloženi cijanotoksinima u ispitivanim cvetajućim ribnjacima Vojvodine.

Na teritoriji Srbije slične histopatološke promene su uočene na organima (jetra, bubreg, škrge i creva; a promena nije bilo na srcu, slezini i mišićima) babuške (*Carassius auratus gibelio*) iz cvetajućeg jezera Ludaš (Lujić i sar., 2012, Tokodi i sar., u pripremi). Tada je comet esej otkrio DNK oštećenje jetre i škrge, uz to MC-LR i MC-RR su detektovani u tkivima ribe (crevima, škragama, bubregu, gonadama i mišićima), a mikrocistin, nodularin i saksitoksin u jezerskoj vodi (Tokodi i sar., u pripremi).

Sadašnja saznanja o uticaju cijanotoksina na histologiju ribljeg tkiva su nedavno sumirali Svirčev i saradnici (2015). Histopatološki nalazi u tkivu ribe izloženih cijanotoksinima u prirodnim uslovima ukazuju na posledice koje ovi metaboliti mogu izazvati. Pored štetnih efekata izazvanih njihovim toksinima, cijanobakterije mogu negativno uticati na ribe kroz izmenu uslova životne sredine u toku cvetanja. Cvetanje je praćeno smanjenjem koncentracije rastvorenog kiseonika, povećanjem koncentracije amonijaka, pH vrednosti i temperature vode, a navedeni faktori mogu da dovedu do promena u tkivima i organima riba. U cilju određivanja promena za koje su odgovorni cijanotoksini neophodno je da se sprovedu opsežnija i detaljnija istraživanja.

Posmatrani negativni efekti i akumulacija cijanotoksina u tkivima riba ukazuju da cvetanje toksičnih cijanobakterija u ribnjacima predstavlja rizik za kvalitet ribe, ali i zdravlje konzumenata. Neophodno je pratiti prisustvo cijanobakterija i cijanotoksina u ribnjacima, kako u vodi tako i u tkivima ribe i dalje istraživati uticaj cvetanja cijanobakterija na ribe, sve u cilju minimiziranja ili eliminisanja negativnih efekata na ljudsko zdravlje, životnu sredinu i ekonomski aspekt.

5.3. Put izloženosti cijanotoksinima preko kontaminiranih biljaka

Navodnjavanje je uobičajena poljoprivredna i hortikulturalna praksa i važna mera za poljoprivrednike u cilju poboljšanja prinosa. Za navodnjavanje se mogu primeniti podzemne vode, ali se u tu svrhu češće koriste površinske vode iz jezera i reka. Ponekad ta površinska vodena tela mogu da budu zahvaćena cvetanjem cijanobakterija i kontaminirana njihovim moćnim toksinima. Na taj način je moguće da biljke budu izložene cijanotoksinima putem navodnjavanja sa ovako kontaminiranom vodom.

Cijanotoksini mogu negativno da utiču na mnoge terestrične biljke, uključujući i one koje čovek gaji u svrhu ishrane. Istraživanja su pokazala da cijanotoksini kod biljaka deluju u pravcu inhibicije protein fosfataze i dovode do inhibicije rasta sadnica (Kos i sar., 1995; Kurki-Helasma i Meriluoto, 1998; McElhiney i sar., 2001; M-Hamvas i sar., 2003; Chen i sar., 2004) i inhibicije razvoja korena, što može da dovede do smanjene apsorpcije vode i hranljivih materija (McElhiney, 2001; Chen i sar., 2004; Crush i sar., 2008), mikrocistini takođe utiču na fotosintetsku aktivnost, produktivnost i mineralnu ishranu izloženih biljaka (Saqrane i sar., 2009). Cijanotoksini predstavljaju spoljašnji faktor koji dovodi do oksidativnog stresa i formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, što utiče na aktivnost antioksidativnih enzima kao što su SOD, POD, GPX i CAT (Chen i sar., 2004; Yin i sar., 2005; Pflugmacher i sar., 2007; Chen i sar., 2010) i antioksidanasa (Pflugmacher i sar., 2007; Saqrane i sar., 2007; Lahrouni i sar., 2013).

Navodnjavanje kontaminiranom vodom može takođe dovesti do nakupljanja cijanotoksina na površini biljaka. Ovo može da rezultuje smanjenjem fotosinteze, pa čak i lisnom nekrozom (Abe i sar., 1996). Zadržavanje mikrocistina je specifično za vrstu i zavisi od kutikule lista (Crush i sar., 2008). Spoljašnja akumulacija cijanotoksina i cijanobakterijskih ćelija je posebno važna kod biljaka kod kojih se konzumiraju nadzemni, listoliki delovi poput salate, španata i blitve (Codd i sar., 1999a), jer se na taj način otvara put ekspozicije ovim toksinima. Pored površinske akumulacije, biljke mogu da akumuliraju cijanotoksine u svojim tkivima i organima (Solin i Meriluoto, 2001; Chen i sar., 2004; Jarvenpaa i sar., 2007; Crush i sar., 2008; Mohamed i Al Shehri, 2009; Chen i sar., 2010) i to u korenu, izdancima i listovima, a nedavno je potvrđeno i u plodovima biljaka zalivanih kontaminiranom vodom (Romero-Oliva i sar., 2014). Pokazano je da se mikrocistini nakon zalivanja mogu translocirati iz korena u druge delove biljke, što je značajno u ekološkom i u medicinskom smislu (Peuthert i sar., 2007; Saqrane i sar., 2009).

Biljke koje su akumulirale cijanotoksine i to u visokim koncentracijama mogu da izgledaju zdravo (Chen i sar., 2004; Mohamed i Al Shehri, 2009). Smatra se da biljke imaju sposobnost da se adaptiraju na prisustvo cijanotoksina (Crush i sar., 2008), kao i da su vrste koje rastu u vodenim staništima (npr. pirinač) evoluirale mehanizam koji sprečava usvajanje mikrocistina i čini ih otpornijim na veću koncentraciju ovog toksina (Chen i sar., 2004). Različite biljne vrste ispoljavaju različite odgovore i različito akumuliraju mikrocistine (Chen i sar., 2004; Crush i sar., 2008; Saqrane i sar., 2008; Mohamed i Al Shehri, 2009), čak različite varijante iste biljne vrste mogu reagovati na različite načine u prisustvu istog toksina (Pflugmacher i sar., 2007). Takođe, akumulacija zavisi i od varijante toksina (Saqrane i sar., 2009; Romero-Oliva i sar., 2014), doze (Saqrane i sar., 2008; 2009; Chen i sar., 2010), trajanja izlaganja (McElhiney i sar., 2001; Saqrane i sar., 2009; Chen i sar., 2010), načina ekspozicije (Crush i sar., 2008) i organa biljke (Mohamed i Al Shehri, 2009; Saqrane i sar., 2009).

Pokazano je da su brojne povrtarske vrste, koje se koriste u ishrani ljudi i životinja, akumulirale cijanotoksine u svojim organima, a neke od njih su: brokoli, gorušica (Solin i Meriluoto, 2001; Jarvenpaa i sar., 2007), repa, pirinač (Chen i sar., 2004), ljulj, detelina, zelena salata (Crush i sar., 2008), mirođija, rukola, peršun, kupus, rotkva (Mohamed i Al Shehri, 2009), izdanak jabuke (Chen i sar., 2010), plodovi paradajza i paprike (Romero-Oliva i sar., 2014). Postoji mogućnost da se na ovaj način cijanotoksini prenose kroz lanac ishrane do životinja i ljudi, što zahteva kontrolu njihovog prisustva u akumulacijama koje se koriste za navodnjavanje.

5.3.1. Cvetanje cijanobakterija u akumulacijama za navodnjavanje-Stanje u Srbiji

Prisustvo mikrocistina i bujanje cijanobakterija je primećeno u mnogim akumulacijama koje se koriste za navodnjavanje u Srbiji. Prva cvetanja u akumulacijama sa ovom namenom su primećena i opisana početkom 60-ih godina prošlog veka, kada su Milovanović i Živković (1963) u Jegrički uočili vrste *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermum stagnale* i *Oscillatoria* spp. Istraživanja ove akumulacije u periodu od 2005. do 2007. godine su takođe potvrdila prisustvo cijanobakterija (*Anabaena flos-aquae*, *Anabaena planctonica*, *Merismopedia* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae*, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium autumnale*, *Phormidium* sp.), a mikrocistini sa najvišom vrednosti od 38,47 µg/L (PP1) nađeni su u leto 2007. godine (Simeunović, 2009).

Kalafatić i saradnici (1982) su 1974. godine uočili u Mrtvoj Tisi cvetanje cijanobakterija i registrovali *Microcystis* sp., *Aphanizomenon flos-aquae* i *Oscillatoria boretii*. Cvetanje u ovoj akumulaciji se nastavilo i u periodu od 2005. do 2007. godine kada su detektovane brojne cijanobakterijske vrste koje su proizvele mikrocistine, sa najvećom koncentracijom od 279,87 µg/L dostignutom u leto 2007. na lokalitetu kod Bačkog Gradišta (Simeunović, 2009). Dominacija cijanobakterija i to *Aphanizomenon flos-aquae*, *Pseudanabaena limnetica* i *Phormidium agardhii* je potvrđena i 2010/2011. godine, kada su u vodi bili prisutni i mikrocistini (Svetska banka izveštaj DM 4307, 2011).

Tokom 80-ih cvetanje *Microcystis aeruginosa* i *Aphanizomenon flos-aquae* je zabeleženo i u Borkovcu (Svirčev, 1983; Đukić i sar. 1991). Simeunović (2009) je potvrdila prisustvo ovih vrsta, kao i drugih cijanobakterija (*Anabaena circinalis*, *Microcystis flos-aquae*, *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. i *Planktothrix agardhii*) tokom istraživanja od 2005. do 2007., kada je detektovano prisustvo mikrocistina, čije najveće koncentracije od 165,48 µg/L su zabeležene u leto 2005. godine.

Đukić i saradnici (1991a) su tokom 80-ih uočili cvetanje u Zobnatici kada su bile prisutne cijanobakterije *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae* i *Anabaena spiroides*. Potvrda o daljem cvetanju stigla je od Simeunović (2009), kada je od 2005. do 2007. godine ponovo cvetao *Aphanizomenon flos-aquae*, ali i *Phormidium autumnale* i *Planktothrix agardhii*, a bile su prisutne i vrste iz rodova *Anabaena*, *Gloeocapsa*, *Merismopedia*, *Microcystis* i *Oscillatoria*. Najveća koncentracija mikrocistina u vodi je zabeležena u jesen 2005. godine, koja je iznosila 121,07 µg/L.

Od 2005. godine cvetanje i perzistentno prisustvo cijanobakterija sa produkcijom mikrocistina uočeno je i u brojnim drugim akumulacijama za navodnjavanje širom Srbije, neke od njih su Koviljski rit (najveća koncentracija od 96,32 µg/L zabeležena u jesen 2005. godine), Pavlovci (proleće 2007. godine sa koncentracijom 63,6 µg/L), Provala (jesen 2007. godine sa koncentracijom 26,2 µg/L) i Tavankut (leto 2007. godine sa koncentracijom 16,45 µg/L) (Simeunović, 2009). Ovi nalazi mogu biti važni, jer su prethodna istraživanja pokazala da navodnjavanje površinskom vodom koja sadrži cijanobakterije i cijanotoksine može negativno uticati na poljoprivredne biljke, koje potencijalno mogu akumulirati te toksine i predstavljati rizik za zdravlje ljudi i životinja koji ih konzumiraju (Codd i sar., 1999a; Crush i sar., 2008; Saqrane i sar., 2009; Chen i sar., 2010).

U Aleksandrovačkom jezeru tokom septembra 2010. godine Simić i saradnici (2011) su detektovali prisustvo vrsta: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Pseudoanabaena* sp. i *Anabaena bergëii*. Dve godine kasnije došlo je do cvetanja jezera i masovnog pomora ribe.

5.3.2. Slučaj Aleksandrovačkog jezera

Aleksandrovačko jezero je rezervoar izgrađen za potrebe navodnjavanja na reci Aleksandrovac. Krajem 2012. godine masovni pomor riba u Aleksandrovačkom jezeru je postao fokus u sredstvima javnog informisanja. Lokalni stanovnici su prijavili 20. decembra 2012. godine zastrašujući prizor o hiljadama mrtvih riba koje su plutale na vodi (Slika 23). Gotovo cela riblja populacija je izgubljena (više od 1,7 tona), uključujući vrste kao što su: šaran, som, amur, tolstolobik, deverika, babuška, bucov i klen. Nekoliko nedelja pre incidenta, registrovano je cvatanje invazivne cijanobakterijske vrste *Cylindrospermopsis raciborskii*. Osim toga, led se formirao na površini jezera neposredno pre masovnog pomora ribe.



Slika 23. Masovni pomor ribe u Aleksandrovačkom jezeru

(<http://images.kurir-info.rs/slika-900x608/aleksandrovacko-jezero-pomor-pomor-riba-ribolov-1356833971-247203.jpg>;

<http://www.ribolov.co.rs/wp-content/uploads/2013/01/Ko-je-kriv-za-pomor-riba-u-aleksandrovackom-jezeru.jpg>)

Zbog širokog spektra mogućih uzročnih faktora koji dovode do pomora ribe, Institut za vodoprivredu “Jaroslav Černi” izvršio je brojne fizičko-hemijske, biološke i ekotoksikološke analize uzoraka iz Aleksandrovačkog jezera. Rezultati ovih analiza (Svirčev i sar., submitirano), zajedno sa informacijama iz lokalnih medija, korišćeni su u pokušaju da se utvrdi mogući prirodni i/ili antropogeni uzročnici pomora ribe u Aleksandrovačkom jezeru tokom decembra 2012. godine. Važni događaji koji su prethodili ovom incidentu su predstavljeni u Tabeli 36.

Tabela 36. Bitni događaji pre masovnog pomora ribe u Aleksandrovačkom jezeru

Datum	Događaj	Komentar
6.11.2012.	Preliminarno ispitivanje kvaliteta vode	Nisu zabeležene značajne vrednosti u fizičko-hemijskim parametrima
15.11.2012.	Opširnije istraživanje	Nisu zabeležene značajne vrednosti u fizičko-hemijskim parametrima izuzev hlorofila <i>a</i> i koncentracije feofitina koji mogu da ukažu na cvetanje cijanobakterija- <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (potvrđeno mikroskopijom). Toksičnost vode je potvrđena <i>A. salina</i> bioesejom.
15.12.2012.	Formiranje leda na površini jezera	Led na površini jezera je bio razbijan. Kolaps cijanobakterijskog cveta.
20.12.2012.	Uginuće ribe	Preko 1,7 tone uginule ribe.

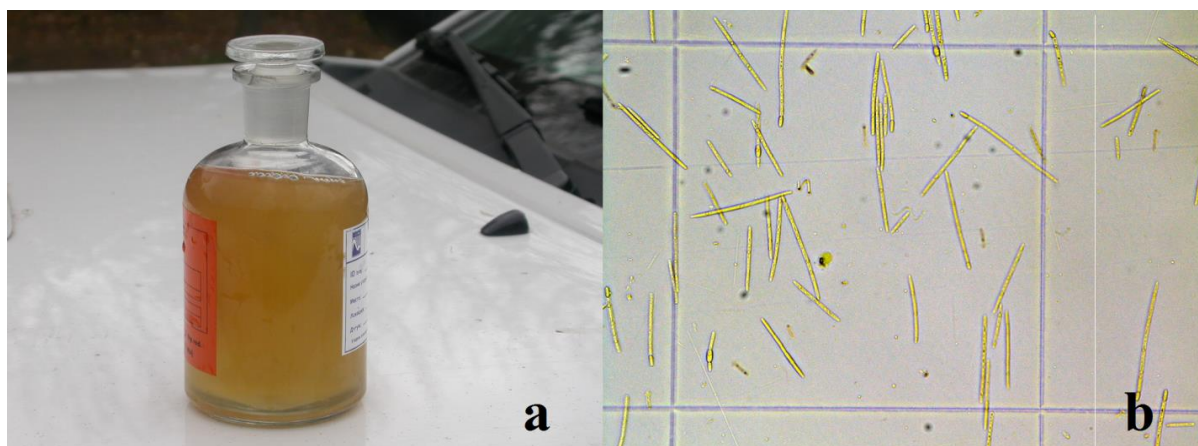
Preliminarna ispitivanja kvaliteta vode urađena su 6.11.2012. godine, koja uključuju: 24 fizičko-hemijske analize i pet mikrobioloških analiza vode. Na osnovu preliminarnih rezultata definisan je detaljan plan koji je sproveden 15.11.2012., uključujući: 36 fizičko-hemijskih analiza, hlorofila *a* i feofitina, ukupnog fosfora u sedimentu, 13 hemijskih analiza sedimenta, 11 analiza teških metala u tkivima riba, pet mikrobioloških analiza uzoraka vode i sedimenta, analize cijanotoksina (cilindrospermopsina, mikrocistina i saksitoksini) (Svirčev i sar., submitirano).

Dodatne analize su izvršene nakon pomora ribe 23.12.2012. godine: pet mikrobioloških analiza vode, hlorofila *a* i feofitina, ukupnog organskog ugljenika, NH_3 i analize cijanotoksina (cilindrospermopsina, mikrocistina i saksitoksina). Na osnovu ovih analiza, nisu uočena značajna odstupanja u vrednostima fizičko-hemijskih parametara koja bi mogla ukazati šta je izazvalo masovni pomor ribe (Svirčev i sar., submitirano).

Na ovoj lokaciji ne postoje poznati izvori industrijskih zagađivača koji bi otpuštali otpadne vode u jezero. Takođe, rezultati veterinarskih testova su isključili mogućnost infekcije i trovanja teškim metalima. Pre incidenta došlo je do brzog pada temperature ispod nule sredinom decembra (<http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/eng/December.pdf>) i led se formirao na jezeru. Prva pretpostavka bila je da se pomor ribe mogao dogoditi usled nedostatka kiseonika u vodi zbog ledenog pokrivača. Međutim, istaknuto je od strane lokalne vlasti da je led na jezeru bio razbijan pre pomora i da je snabdevanje kiseonikom trebalo biti dovoljno da bi riba opstala (<http://www.ribolov.co.rs/prijava-veternici-zbog-pomora-riba-u-aleksandrovaackom-jezeru/>).

Značajne vrednosti tokom istraživanja su bile koncentracije hlorofila *a* i feofitina. U vreme uzorkovanja 15. novembra, koncentracije hlorofila *a* i feofitina bile su $214,2 \text{ mg/m}^3$ i $53,7 \text{ mg/m}^3$, što ukazuje da je status jezera bio na granici između eu-politrofnog i politrofnog

(Felfoldy, 1980). Ove visoke koncentracije tokom novembra ukazuju na pojavu cvetanja cijanobakterija, što je potvrđeno mikroskopskim pregledom. Žuto/braon boja vode (Slika 24 a) bila je rezultat masovnog razvoja cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* (Slika 24 b). Mikroskopski pregled i brojanje filamenata *Cylindrospermopsis raciborskii* u 1 mL uzoraka vode je pokazalo prisustvo prosečno $2,06 \times 10^5$ filamenata po mL. Izmerena koncentracija hlorofila *a* 23. decembra 2012. bila je 17,2 mg/L, a feofitina 5,86 mg/L.



Slika 24. a) Uzorak vode iz Aleksandrovačkog jezera, b) *Cylindrospermopsis raciborskii* u Neubauer komori (x400)

Cylindrospermopsis raciborskii se najčešće može naći u slatkim vodama u tropskim i subtropskim područjima (Padisák, 1997). U poslednje vreme ova invazivna vrsta uočena je i u umerenim oblastima, uključujući Srbiju (Ćirić i sar., 2010; Cvijan i Fužinato, 2011; Simić i sar., 2011; Natić i sar., 2012; Karadžić i sar., 2013). Od posebnog interesa je činjenica da ova vrsta može da proizvodi cijanotoksine, pre svega cilindrospermopsin, kao i neke druge toksine koji mogu da utiču na zdravlje ljudi i životinja (Schrembri i sar., 2001; Cvijan i Fužinato, 2011), na primer saksitoksin, iako uglavnom u brazilskim vodama (npr. Lagos i sar., 1999, Molica i sar., 2002; 2005, Hoff-Risetti i sar., 2013). Međutim, tokom ispitivanja na Aleksandrovačkom jezeru nisu pronađeni cilindrospermopsin, mikrocin i saksitoksin, samim tim oni nisu bili uzročnici pomora ribe.

Toksičnost uzoraka vode uzetih 15. novembra je dokazana *A. salina* biotestom, što ukazuje na prisustvo toksičnih materija u intracelularnom sadržaju biomase cilindrospermopsisa. Toksičnost veća od 50 % je detektovana u uzorcima vode (sa najvećom toksičnošću 77,7 %) u intracelularnoj frakciji cijanobakterija. Veoma niska toksičnost je detektovana u ekstracelularnoj frakciji (od 0 do 3,4 %), što ukazuje da nije bilo značajnog oslobađanja toksina iz cijanobakterijskih ćelija u vodu dok nije došlo do razgradnje ćelija.

To je potvrđeno rezultatima toksičnosti sirovih uzoraka vode koja je takođe veoma niska (od 0 do 3,5 %), a gotovo ista kao i ekstracelularna frakcija uzoraka (Svirčev i sar., submitirano).

Pomori ribe su sve češće pojave u vodenim ekosistemima širom sveta, pa i u Srbiji, a pripisuju se raznim prirodnim i antropogenim faktorima. Širok spektar mogućih faktora može izazvati pomor ribe, bilo samostalno ili u kombinaciji. Neki od najčešćih uzroka mogu biti: ekstremne i nagle promene temperature, nizak nivo rastvorenog kiseonika u vodi (hipoksija ili anoksija), supersaturacija otrovnih gasova, promene saliniteta i pH vrednosti, poljoprivredni zagađivači (npr. pesticidi, đubriva, životinjski otpad), industrijski zagađivači (npr. metali, ugljovodonici), komunalni otpad (npr. smeće, otpadne vode i kanalizacija), transport, brojni mikrobiološki patogeni i paraziti (bakterije, protozoe, gljive, virusi), kao i promene u okolnoj sredini zbog masovnog razvoja toksičnih algi i cijanobakterija, uključujući prisustvo njihovih biotoksina (Haslouer, 1979; Hohls i Kuhn, 2001; Thronson i Quigg, 2008; La i Cooke, 2011).

U poslednjih nekoliko decenija, eutrofizacija i klimatske promene povećavaju učestalost pojave cvetanja cijanobakterija, što ih čini sve češćim uzročnikom pomora ribe. Cvetanje može da dovede do negativnih efekata na populacije ribe na različite načine. Naime, tokom intenzivnog cvetanja usled povećane fotosintetske aktivnosti smanjuje se slobodni CO₂ u vodi i podiže se pH vrednost, a visoka pH vrednost može biti opasna za određene vrste riba (Kann i Smith, 1999). Nakon kolapsa cijanobakterijskog cveta, u plitkim jezerima leti može doći do anoksije koja rezultuje pomorom ribe. Takođe, anoksija može da se javi tokom zime i dugih perioda ledenog pokrivača, kada može da dođe do pomora ribe. Povećanje broja bakterija i njihove aktivnosti nakon kolapsa letnjeg cijanobakterijskog cveta i mikrobiološka razgradnja organskih materija dovode do osiromašenja kiseonika i povećane koncentracije NH₃-N ispod zimskog ledenog pokrivača, što sve može da rezultuje masovnim pomorom ribe (Barica i Mathias, 1979; Barica, 1984; Robarts i sar., 2005). Osim toga, toksini koje proizvode cijanobakterije mogu dovesti do hepatotoksičnih efekata na ribe i pomora (Andersen i sar., 1993; Rodger i sar., 1994).

Na kraju perioda cvetanja cijanobakterija i sa kolapsom i lizom cijanobakterija, unutarćelijski cijanotoksini se ispuštaju u vodu i mogu da izazovu negativne efekte. Drugi vidovi oštećenja ćelija cijanobakterija, usled zamrzavanja i odmrzavanja (Rosen i sar., 2010) kao i primene algicida (Kenefick i sar., 1993; Lam i sar., 1995) mogu izazvati oslobađanje cijanotoksina u vodu. Ruptura cijanobakterijskih ćelija usled, na primer zamrzavanja i odmrzavanja, može dodatno da poveća rizik od intoksikacije riba.

A. salina bioesej je pokazao prisustvo toksičnih materija u cijanobakterijskim ćelijama, iako nisu otkriveni cilindropermopsin, mikrocistini i saksitoksin. Slično tome, hemijski skrining je pokazao da *Cylindropermopsis raciborskii* prikupljen iz jezera Balaton (Mađarska) nije proizvodio cilindropermopsin (Ács i sar., 2013). Novakova i saradnici (2013) su izvestili o neidentifikovanom neurotoksičnom jedinjenju iz soja *Cylindropermopsis raciborskii*. Vehovszky i saradnici (2015) su pronašli neidentifikovani, ali farmakološki aktivan neurotoksičan agens (odnosno agense) sličan anatoksinu-a u cvetu ove cijanobakterije koji je povezan sa pomorom ribe u Mađarskoj. Na osnovu prethodnih ispitivanja cijanobakterijskog materijala prikupljenog sa raznih lokacija u Mađarskoj (Kiss i sar., 2002; Vehovszky i sar., 2012) može se pretpostaviti da je neurotoksični soj *Cylindropermopsis raciborskii* široko rasprostranjen u Mađarskoj, ali i susednoj Srbiji. Ova nedavna otkrića mogu potkrepiti hipotezu da neki drugi toksični metaboliti ove cijanobakterije, osim već poznatih cijanotoksina cilindropermopsina, mikrocistina i saksitoksina, mogu biti potencijalni uzrok uginuća ribe u Aleksandrovačkom jezeru. Moguće je da neki još uvek nepoznati i neidentifikovani metaboliti ovih organizama mogu da budu oslobođeni iz ćelija nakon zamrzavanja i odmrzavanja leda, i izazovu masovni pomor ribe. Dalja istraživanja su neophodna za donošenje pouzdanijih zaključaka, a akcenat treba da bude na analiziranju novih toksičnih metabolita cijanobakterija.

5.3.3. Drugi metaboliti cijanobakterija

Iako su mikrocistini najpoznatiji i najviše proučavani cijanotoksini, treba imati na umu da cijanobakterije imaju sposobnost produkcije brojnih drugih metabolita, o kojima se generalno malo zna i svakim danom pronalaze se novi metaboliti ovih organizama. Kada bi uzeli jedan uzorak iz neke akumulacije koja je zahvaćena cvetanjem i sproveli niz savremenih biohemijskih analiza verovatno bi detektovali brojne poznate, ali i neke nepoznate metabolite cijanobakterija. Tako su Voloshko i saradnici (2008) pronašli niz biološki aktivnih jedinjanja u vodi jezera Ladoga, Rusija, tokom leta 2004. i 2005., kada su cvetale cijanobakterije u jezeru koje predstavlja izvor vode za piće grada St. Petersburga. Pored mikrocistina i enzim ihibirajućih citotoksina, pronađen je i niz neidentifikovanih supstanci. Slično, Zafrir-Ilan i Carmeli (2010) su iz ribnjaka u Izraelu sakupili *Microcystis* sp. iz čijeg su ekstrakta izolovali osam novih metabolita, koji su pokazali inhibitorni efekat na serin proteaze, tripsin, himotripsin, thrombin i elastazu.

Cijanobakterije mogu da produkuju širok spektar strukturno različitih jedinjenja koja mogu da izazovu i različite efekte, od citotoksičnih, preko enzim inhibišućih, imunosupresivnih, antiinflamatornih, do antifungalnih, antibakterijskih, antivirusnih i algicidnih efekata (Burja i sar., 2001). Ovde će biti spomenut samo deo ovih raznolikih cijanobakterijskih jedinjenja.

Mnogi metaboliti izolovani iz cijanobakterija imaju svojstvo citotoksičnosti, posebno kriptoficini koji se ispituju kao mogući kandidati u lečenju kancera. Tu sposobnost imaju još: ciklamidi (citotoksični u raznim ćelijskim linijama kancera), kalotriksini (antiproliferativna aktivnost), tolitoksin i scitoficini (inhibišu polimerizaciju aktinskih mikrofilamenata u ćeliji) (Chlipala i sar., 2011), minutisamidi, mikrocistilid A, laksaficini, cilindrociklofani i bauerini A-C (kancer kolona), karbamidociklofani, dendroamidi, hapalosin i toliporfini (kancer dojke), pahaiokolid A (kancer pluća) i tihonamid (kancer prostate). Navedena su samo neka jedinjenja izolovana iz cijanobakterija koja se na osnovu svojih citotoksičnih osobina testiraju u borbi protiv malignih bolesti (Nagarajan i sar., 2013).

Brojni cijanobakterijski metaboliti izazivaju inhibiciju proteaza. Razne proteaze kao na primer elastaza, tripsin i himotripsin su uključene u proces varenja kod životinja, uključujući artropode, recimo dafnije, koje se hrane cijanobakterijama. Na osnovu toga može se pretpostaviti da je funkcija ovih metabolita da inhibišu digestivne enzime predatora cijanobakterija (von Elert i sar., 2004; Rohrlack i sar., 2005; Czarnecki i sar., 2006), ali ovu teoriju je još potrebno potvrditi. Ovu sposobnost inhibicije imaju aeruginozini, anabenopeptini, cijanopeptolini, mikroginini, mikropeptini, mikroviridini i oscilapeptini, kao i drugi metaboliti (Chlipala i sar., 2011; Nagarajan i sar., 2013).

Veliki broj metabolita cijanobakterija ispoljava antimikrobne aktivnosti, samo neki od njih su: aeruginazol, ambigol, ambiguin izonitrili, caloficin, komnostini A-E, fišerindoli, hapalindoli, hasalidin A i B, ihtiopeptini A i B, kavagučipeptini A i B, nostokarbolini, noskomin, nostociklin A, nostofungicidin, šizotrin A, tolibisidini A i B (Chlipala i sar., 2011; Nagarajan i sar., 2013).

Nekoliko bioaktivnih sekundarnih metabolita cijanobakterija imaju i antiparazitsku aktivnost, tu se na primer ubrajaju: aeruciklamidi A-D, ambigol A i C, calothriksini A i B, nostokarbolini, kao i tihonamidi A i B. Neke cijanobakterije produkuju i alelopatska jedinjenja kojima deluju na alge i druge cijanobakterije, a to su na primer: fišerelin A, nostokarbolin, nostocin A, nostociklamid, portoamidi A i B, kao i spiroidezin (Nagarajan i sar., 2013).

Cijanobakterije predstavljaju bogat izvor novih metabolita koji mogu biti od velike važnosti zbog svoje potencijalne primene u biotehnologiji, biomedicini, farmaciji, poljoprivredi i industriji. Međutim, iako se trenutno sagledavaju njihove korisne osobine, malo se zna o njihovim toksičnim karakteristikama koje mogu biti štetne po druge organizme. Kao primer može da se istakne pomenuti inhibitor proteaze (tripsina) cijanopeptolin 1020, koji produkuje cijanobakterija *Microcystis*. Nedavno istraživanje Faltermann i saradnika (2014) je demonstriralo da pomenuti metabolit može da remeti brojne biološke i fiziološke procese na molekularnom nivou zebrića (*Danio rerio*). Autori su uočili uticaj na DNK, zatim neurotoksičnu i endokrinu aktivnost ovog jedinjenja, koje time može da izazove značajne ekološke posledice.

Postoji veliki diverzitet sekundarnih metabolita cijanobakterija i na osnovu pregleda literature može se primetiti da postoje na stotine ovakvih jedinjenja. Ali, to su samo trenutno identifikovana jedinjenja, teško je i pretpostaviti koliko ih zaista ima, a još teže, koje su sve njihove mogućnosti, od onih pozitivnih pa do negativnih. Iz tog razloga se naglašava potreba za istraživanjem, pored uobičajenih i najčešće ispitivanih cijanotoksina (mikrocistina, nodularina, saksitoksina, anatoksina i cilindropermopsina) i drugih metabolita cijanobakterija koji mogu da predstavljaju pretnju po zdravlje ljudi i životinja.

5.3.4. Akumulacija mikrocistina u biljkama

S obzirom da prisustvo poznatih cijanotoksina nije dokazano u proučavanoj akumulaciji za navodnjavanje (Aleksandrovačko jezero), praćenje sudbine mikrocistina iz kontaminirane vode i njegove potencijalne akumulacije u biljkama koje su zalivane na ovaj način nije bilo moguće. Iz tog razloga pristupilo se sprovođenju eksperimenta u laboratorijskim uslovima, u kome je ljuta paprika (*Capsicum annuum*) tri meseca zalivana vodom kontaminiranom mikrocistinima (ekstrakt *Microcystis aeruginosa* PCC 7806).

Toksičnost kulture *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 je poznata od ranije i u NSCCC je iznosila 9,16 MC-LR ekvi. $\mu\text{g}/\text{mg}$ suve mase ili 11 906 $\mu\text{g}/\text{L}$ (11,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$), što je detektovano metodom inhibicije enzima PP1 (Simeunović, 2009). Jungmann (1992) je odredio unutarćelijski sadržaj MC-LR u ovoj kulturi, koji je iznosio oko 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Razlike u produkciji toksina nađene kod istog soja su najverovatnije posledica uslova kultivacije, jer je poznato da uslovi sredine imaju značajan uticaj na rast i produkciju metabolita. Osim toga takve razlike su se mogle dobiti ukoliko je određivanje sadržaja toksina vršeno u različitim fazama rasta ispitivanog soja i korišćenjem različitih tehnika (Simeunović, 2009).

Koncentracija mikrocistina za potrebe ovog eksperimenta je procenjena (LC-MS) na 245 µg/L, što je približno maksimalnim vrednostima zabeleženim u prirodnim uslovima u Srbiji (npr. 279,87 µg/L) (Simeunović, 2009). Maksimalne koncentracije mikrocistina u proučavanim vodenim akumulacijama koje se koriste za navodnjavanje su najčešće zabeležene tokom proleća i leta kada se najviše i vrši navodnjavanje biljnih kultura.

Dobijeni rezultati su pokazali da se mikrocistin nije akumulirao u listovima, međutim, prisustvo ovih toksina je detektovano u plodovima eksperimentalne biljke. Najviše je bilo MC-RR (0,241 ng/mg, a njegove dimetilovane forme 0,051 ng/mg), pa zatim MC-LR (0,118 ng/mg, a njegove dimetilovane forme 0,077 ng/mg), čak je detektovan i MC-YR (0,066 ng/mg). S obzirom da je aplikacija vršena samo direktno u zemlju, jedino je direktan kontakt sa mikrocistinima imao koren i prisustvo ovih toksina u plodovima ukazuje na njihovu translokaciju. Translokaciju mikrocistina kroz biljke uočili su i drugi istraživači (Peuthert i sar., 2007; , Saqrane i sar., 2009).

Nekoliko studija je pokazalo da biljke mogu da akumuliraju mikrocistine u svojim tkivima (Kurki-Helasma i Meriluoto, 1998; Solin i Meriluoto, 2001; McElhiney i sar., 2001; Chen i sar., 2004; Jarvenpaa i sar., 2007; Crush i sar., 2008; Saqrane i sar., 2009; Mohamed i Al Shehri, 2009; Chen i sar., 2010; Romero-Oliva i sar., 2014). Akumulacija cijanotoksina je bila dokazana i u prirodnim uslovima u Srbiji, kada su mikrocistini detektovani u vodenim biljkama iz cvetajućeg jezera Ludaš (Tokodi i sar., u pripremi), međutim kako je reč o biljnim vrstama koje se ne konzumiraju, ovo nije od velike važnosti sa aspekta ekspozicije cijanotoksinima i ljudskog zdravlja. Zbog toga su od značaja istraživanja sa biljnim kulturama koje se gaje u cilju ishrane ljudi.

Jedno od najnovijih istraživanja tog tipa sprovedi su Romero-Oliva i saradnici (2014) u kome su procenjivali prisustvo cijanotoksina u paradajzu (*Solanu lycopersicum*) i paprici (*Capsicum annuum*) navodnjavanim jezerskom vodom kontaminiranom mikrocistinima. U jezerskoj vodi cijanobakterijski cvet se sastojao prvenstveno od vrste *Microcystis aeruginosa*, a bili su prisutni mikrocistini i to MC-LR i MC-RR u ekstracelularnom uzorku, dok je pored ova dva toksina, MC-YR takođe identifikovana u intracelularnom uzorku. MC-RR predstavljao je više od 80 odsto ukupnih mikrocistina u intra i ekstracelularnim uzorcima, a zatim sledi MC-LR. Totalna ekstracelularna koncentracija mikrocistina bila je 90 µg/L a intracelularnog 1 931 µg/L. Uzorci plodova i semena iz *Solanu lycopersicum* i *Capsicum annuum* su analizirani na mikrocistine. U plodovima i semenima paradajza pronađen je samo MC-RR (1,16 ± 0,67 µg/kg st), dok su kod paprika u semenu otkriveni MC-LR i MC-RR (7,41 ± 4,28 i 8,10 ± 4,67 µg/kg st), a samo MC-LR u plodu i semenu (0,70 µg/kg st) kao i u

uzorcima ploda ($1,03 \pm 0,75 \mu\text{g/kg st}$) *Capsicum annuum*. Translokacija mikrocistina može voditi u plodove, pa čak u semena i nove biljke. Izračunata TDI vrednost mikrocistina za osobu od 60 kg koja konzumira tri ploda ($\pm 390 \text{ gr st}$) iznosi 0,008 i 0,006 $\mu\text{g/kg}$, što je ispod dozvoljenih vrednosti od 0,04 $\mu\text{g/kg}$ dnevno. Ipak, na ove rezultate je mogao uticati period uzorkovanja jer su uzorkovane biljke navodnjavane tokom kišne sezone sa potencijalno nižom dostupnosti mikrocistina (Romero-Oliva i sar., 2014).

Navedeni razlog može eventualno predstavljati objašnjenje i zašto su dobijene vrednosti u plodu paprike bile niže u poređenju sa vrednostima koje su dobijene tokom eksperimenta. Generalno, niže vrednosti akumuliranih cijanotoksina se mogu očekivati pri aplikaciji kontaminirane vode u zemlju, jer se smatra da neki mikroorganizmi u zemljištu imaju sposobnost degradacije cijanotoksina (Miller i Fallowfield, 2001; Chen i sar., 2006), a i adsorpcija mikrocistina u zemljištu može smanjiti koncentracije slobodnog toksina u vodenoj fazi, dostupnog biljkama (Jarvenpaa i sar., 2007).

Slične koncentracije toksina su detektovane u detelini (0,20 mg/kg st) i zelenoj salati (0,79 mg/kg st) nakon aplikacija jezerske vode koja sadrži mikrocistine na izdanak (Crush i sar., 2008). Slično je uočeno i kod sedam povrtarskih biljaka navodnjavanih vodom sa mikrocistinima iz podzemnih bunara. Vrednosti su varirale među vrstama i kretale se od 0,07 $\mu\text{g/g st}$ (u kupusu) pa do 1,2 $\mu\text{g/g st}$ (u rotkvi), a koncentracije mikrocistina u biljkama su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom cijanotoksina u vodi (Mohamed i Al Shehri, 2009). I *in vitro* istraživanje sa jabukom izloženom ekstraktu cvetajuće biomase toksičnih cijanobakterija iz jezera (3 $\mu\text{g/mL}$ mikrocistina) je pokazalo akumulaciju MC-LR (510,23 ng/g st) u izdanku nakon 14 dana. Koncentracija mikrocistina u izdancima se povećavala sa vremenom ekspozicije i koncentracijom toksina (Chen i sar., 2010).

Tokom eksperimenta sa paprikom, biljke su bile izložene visokim koncentracijama mikrocistina i to tokom dugog vremenskog perioda (tri meseca), nakon čega su dobijene visoke koncentracije cijanotoksina u plodovima, i to u vrednostima koje prevezilaze GV za MC-LR u pijaćoj vodi (1 $\mu\text{g/L}$ ili 1 $\mu\text{g/kg}$). Nekoliko autora su uzeli ove vrednosti kao relevantne parametre (Chen i sar., 2004; Jarvenpaa i sar., 2007; Mohamed i Al Shehri, 2009) s obzirom da nema definitivnih GV za ovaj način ekspozicije, međutim kako je ljudska potrošnja biljaka niža od potrošnje vode, može da se napravi preračunavanje slično kao pri ishrani ribom. Tako bi na osnovu TDI uz faktor 0,2 za dati put ekspozicije hranom, osoba od 60 kg koja konzumira 10 g ovakve paprike imala prekoračenu GV (48 $\mu\text{g/kg}$) 2,5 puta za MC-LR. Detektovano je i duplo više MC-RR, ali treba naglasiti da je ova forma toksina oko 10 puta manje toksična od MC-LR (Sivonen i Jones, 1999) pa je samim tim opasnost manja.

U plodu su u nižim koncentracijama detektovane i manje toksične forme mikrocistana: MC-LY (LD₅₀ 70 µg/kg), dmMC-LR (LD₅₀ 90-300 µg/kg) i dmMC-RR (LD₅₀ 180-250 µg/kg) (Chorus i Bartram, 1999; Spooof, 2005).

Navodnjavanje vodom kontaminiranom cijanobakterijama moglo bi biti praćeno neželjenim posledicama po same biljke i što je još važnije, kontaminirane biljke mogu da predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i životinja ako unos mikrocistina preko biljaka prevazilazi preporučene GV.

5.3.5. Oksidativni stres kod biljaka izazvan mikrocistinima

Navodnjavanje kontaminiranom vodom može predstavljati opasnost po potrošače, ali ova praksa može i negativno da utiče na same biljke, što sa aspekta prinosa biljaka ima i određeni ekonomski značaj. Da bi se pratio odgovor biljke na mikrocistine, praćen je antioksidantni sistem, jer je oksidativni stres jedan od prvih odgovora biljke na nepovoljne uslove životne sredine (abiotičke i biotičke faktore).

Intenziviranje oksidacionih procesa, kao i povećana produkcija ROS, predstavljaju jedan od primarnih odgovora biljke na mikroorganizme (Nanda i sar., 2010). Termin ROS obuhvata sve kiseonične radikale i kiseonične derivate koji nisu radikali: vodonik-peroksid (H₂O₂), ozon (O₃) i singlet kiseonik (¹O₂). U kiseonične radikale spadaju superoksid-anjon (O₂⁻), hidrosil-radikal (·OH), kao i različiti peroksidi. ROS teže da spare nespareni elektron u svojoj molekulskoj orbitali ili da predaju višak energije, pri čemu reaguju sa različitim molekulima (lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama, itd.) i stvaraju nove radikale, koji reaguju sa novim molekulima i ceo proces predstavlja lančanu reakciju (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Enzim lipoksigenaza predstavlja dodatni izvor ROS, jer vrši katalizu hidroperoksidacije polinezasićenih masnih kiselina, čime se sintetišu novi radikali koji započinju lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Rosahl, 1996). Polinezasićene masne kiseline su glavne strukturne komponente lipidnih membrana i veoma su osetljive na peroksidaciju (Halliwell i Gutteridge, 2007). Pri tome kao sekundarni proizvod lipidne peroksidacije, može nastati malondialdehid (MDA) (Popović i Štajner, 2008). Sadržaj MDA, jednog od krajnjih proizvoda razgradnje membranskih lipida u ćelijama, koristi se kao merilo intenziteta lipidne peroksidacije. Intenzitet lipidne peroksidacije je bio značajno pojačan u oba testirana organa tretiranih biljaka paprike u poređenju sa kontrolom (Tabela 27).

Kako bi se odbranili od negativnog dejstva ROS, aerobi su razvili antioksidantni sistem zaštite (Apel i Hirt, 2004; Mittler i sar., 2004; Malenčić i sar., 2008). Biljke imaju sposobnost da sintetišu sve neophodne antioksidante, dok životinje jedan deo unose ishranom. Antioksidanti se mogu podeliti na enzimske i neenzimske. U enzimске antioksidante biljaka spadaju SOD, CAT i POD, dok u neenzimske antioksidante spadaju: redukovani glutation, askorbinska kiselina, α -Tokoferol, karotenoidi, fenoli, itd. (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Fenoli predstavljaju veoma značajne antioksidante koji reaguju sa skoro svim reaktivnim vrstama i prooksidansima (jonima metala) (Malenčić i sar., 2007; 2008; 2012). Oni inhibiraju produkciju ROS, inhibicijom enzima koji su uključeni u produkciju ROS i regulaciju antioksidantnih procesa (Van Acker i sar., 1996; Choi i sar., 2002; Grassmann i sar., 2002). Povećan sadržaj fenola zabeležili su Saqrane i saradnici (2007) kod vodene biljke *Lemna gibba*, zatim El Khalloufi i saradnici (2011) u *Vicia faba* biljci navodnjavanoj ekstraktom cijanobakterija koji sadrži cijanotoksine. Značajno povećanje fenola u korenu i listovima lucerke (*Medicago sativa*) otkrili su Lahrouni i saradnici (2013). U eksperimentu sa paprikom, organi iz kontrole i tretmana imali su jednak sadržaj ukupnih fenola (Tabela 28).

Međutim, sadržaj ukupnih flavonoida je bio izrazito veći u listovima tretiranih biljaka u odnosu na one iz kontrole (82 % više). Blago, ali značajno povećanje ukupnih flavonoida zabeleženo je u plodovima tretiranih biljaka (Tabela 29). Flavonoidi su prirodna polifenolna jedinjenja koja imaju važnu ulogu u brojnim metaboličkim procesima, a imaju i sposobnost da smanje fluidnost ćelijskih membrana, kao i da inhibišu proces peroksidacije lipida (Arora i sar., 2000). Novija istraživanja pokazuju da biljni ekstrakti koji sadrže flavonoide mogu negativno da utiču na rast cijanobakterija (Huang i sar., 2015).

Antioksidativni kapacitet ispitivanih biljaka određen je putem DPPH, NBT i \cdot OH testa. Značajano smanjenje u % neutralisanih DPPH-radikala zabeleženo je u oba organa tretiranih biljaka, kao i za superoksid-anjon u plodu i hidroksil-radikala u listovima. Razlike nije bilo u % neutralizovanih superoksid-anjona u listovima i hidroksil-radikala u plodovima, između kontrole i tretmana (Tabele 30-32).

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je biljka koja je bila izložena mikrocistinima, bila izložena oksidativnom stresu, tj. da je oksidativan stres odgovor biljke na biotički faktor (mikrocistin). Izlaganje toksinima je i u velikoj meri uticalo na smanjenu antioksidantnu sposobnost eksperimentalnih biljaka, što ukazuje da su mikrocistini uticali na promenu u homeostazi biljaka paprike.

Navodnjavanje sa vodama koje sadrže cijanotoksine može da utiče na kvalitet i prinos biljaka, a cijanotoksini mogu da se akumuliraju u jestivim delovima biljaka i prenose putem lanca ishrane, što može ugroziti zdravlje ljudi i životinja. Shodno tome, izloženost biljnih kultura cijanotoksinima putem navodnjavanja može imati negativne posledice po privredu i javno zdravlje. Iz tog razloga se preporučuje kontinuirano praćenje prisustva cijanobakterija i cijanotoksina u vodama koje se koriste za navodnjavanje, kao i biljnih kultura. Ali prvenstveno se naglašava potreba prevencije ubrzane eutrofizacije, a samim tim i razvoja cijanobakterija i prisustva cijanotoksina u akumulacijama koje se koriste za navodnjavanje biljnih kultura.

Sa stanovišta rizika po zdravlje, više pažnje treba posvetiti prenosu cijanotoksina u plodove i jestive delove hortikulturnog i poljoprivrednog bilja, kao i toksičnosti drugih cijanotoksina pored mikrocistina. Iako je MC-LR najčešće detektovan toksin, cijanobakterije mogu da proizvode brojne varijante mikrocistina. Osim toga, u cijanobakterijskom cvetu mogu biti prisutni brojni toksični cijanobakterijski sojevi koji imaju sposobnost produkcije širokog spektra cijanotoksina, a malo se zna o efektima različitih cijanotoksina na biljke, posebno kada se u obzir uzme još i potencijalno sinergističko delovanje. Takođe, tu su i drugi, manje poznati metaboliti koji mogu imati toksična svojstva, a o kojima se veoma malo zna. Koristeći vodu zahvaćenu cvetanjem kao izvor za navodnjavanje može se doći u kontakt sa cijanotoksinima ali i nekim drugim nepoznatim bioaktivnim metabolitima cijanobakterija koji mogu imati negativne efekte na biljke, životinje, ali i ljude, zato je ovo put izlaganja kojem treba biti posvećeno više pažnje.

5.4. Cijanotoksini u suplementima na bazi cijanobakterija

S obzirom na dokazanu sposobnost cijanobakterija da proizvode brojne i opasne toksične metabolite, realna je mogućnost da popularni dodaci u ishrani pravljeni na bazi cijanobakterijske biomase, predstavljaju jedan od puteva ekspozicije cijanotoksinima. Međutim, potencijalni rizik po zdravlje potrošača usled konzumiranja ovakvih dijetetskih suplemenata godinama je bio zanemaran. Suplementi su sveprisutni na tržištima širom sveta gde se reklamiraju i distribuiraju kao zdrava hrana, a naročito su popularni u industrijalizovanim zemljama. Suplementi se često konzumiraju svakodnevno i dugoročno, a to istovremeno može da predstavlja hroničan način izlaganja cijanobakterijskim ćelijama i

njihovim metaboličkim produktima, od kojih neki mogu biti toksični. Ovi proizvodi često sadrže i biomasu nekih vrsta koje su potencijalni producenti toksina, poput *Aphanizomenon flos-aquae*. Ako se biomasa za proizvodnju ovih suplemenata gaji u prirodnim i otvorenim sistemima treba se predvideti mogućnost kontaminacije sa toksinprodukujućim cijanobakterijama (Codd, 1999).

Iako proizvođači navode da kontrolišu nivo mikrocistina u njihovim proizvodima i da se ovi toksini nalaze ispod dozvoljenih granica od 1 µg/g st (Carmichael i sar., 2000), nezavisna ispitivanja koncentracije mikrocistina u tim proizvodima pokazala su da su toksini dostizali vrednosti i od 35 µg/g st (Gilroy i sar., 2000; Lawrence i sar., 2001), pre nego što je svest o ovoj problematici porasla i kada su se kontrole počele sprovoditi. Iako su uzorci sa koncentracijom toksina višim od 10 µg/g st izuzetno retki, 8 od 13 cijanobakterijskih (*Aph. flos-aquae*) proizvoda sa Nemačkog i Švajcarskog tržišta imala su više od dozvoljenih 1 µg/g st (Hoeger i Dietrich, 2004). Takođe, u Oregonu, mikrocistin je detektovan u 85 od 87 testiranih suplemenata, a od toga 72 % ili 63 proizvoda imala su koncentracije MC-LR veće od 1 µg/g, a kod nekih je dostizala i do 16 µg/g (Gilroy i sar., 2000). I u Kanadi od 50 ispitanih uzoraka, 23 je imalo više od dozvoljenih 1 µg mikrocistina/g (Lawrence i sar. 2001).

Ranija istraživanja suplemenata na bazi cijanobakterija distribuiranih na tržištu u Srbiji su pokazala da se u pojedinim uzorcima nalazio MC-LR (Svirčev, 2011). Analizirano je 8 različitih proizvoda na bazi mikroalgi i cijanobakterija od kojih je polovina sadržala MC-LR, a koncentracije toksina su se kretale od 0,45 µg/g pa do 4,17 µg/g (Tabela 37).

Tabela 37. Sadržaj MC-LR u nekim suplementima sa tržišta Srbije (Svirčev, 2011)

Uzorci	MC-LR µg/g
P 1	N.D.
P 2	2,95
P 3	4,17
PR 6	N.D.
R 1	1,12
R 3	0,45
R 4	N.D.
T 1	N.D.

N.D. nije detektovano

Tokom ovog istraživanja pomoću LC-MS/MS metode u dva popularna proizvoda sa našeg tržišta detektovani su MC-LR (3 µg/g) i dmMC-LR (1,5 µg/g), što je u okviru

prethodnog istraživanja sprovedenog u Srbiji. U oba slučaja vrednosti su prevazilazile predložene GV od 1 $\mu\text{g/g}$. Kada bi potrošač od 60 kg konzumirao 3 tablete dnevno (1,5 g) preporučene od strane proizvođača, onda bi u slučaju prvog suplementa izračunata GV (1,6 $\mu\text{g/g}$) za MC-LR bila prekoračena 1,9 puta. U slučaju drugog suplementa u kome je detektovana dimetilovana forma ovog toksina, dobijene vrednosti su bile na granici izračunate GV, a reč je o manje toksičnoj formi mikrocistina (LD_{50} 90-300 $\mu\text{g/kg}$) (Spoff, 2005).

Iako su ovi suplementi pravljeni na bazi spiruline za koju se smatra da je generalno netoksična, ipak postoje indicije da pojedini sojevi ove cijanobakterije mogu da proizvode cijanotoksine (Ballot i sar., 2004; 2005), koji usled toga mogu biti prisutni u suplementima pravljenim od spiruline (Draisici i sar., 2001) i samim tim mogu negativno uticati na potrošače (Iwasa i sar., 2002). Međutim, treba napomenuti da nisu svi produkti ovog tipa sa povišenim nivoom cijanotoksina i da im koncentracije mogu značajno varirati u okviru jednog brenda od serije do serije (Gilroy i sar., 2000; Hoeger i Dietrich, 2004).

Još jedan problem koji se ovde nameće jeste i primena adekvatne metode detekcije cijanotoksina u suplementima, jer su istraživanja pokazala razlike u rezultatima detektovanim različitim metodama ELISA, PPA i LC-MS/MS. Ove razlike se pojavljuju usled nedostatka standarda i metoda detekcije za desetak kongenera mikrocistina koji se obično javljaju u ovim proizvodima. Na osnovu toga dobijene vrednosti se mogu smatrati samo kao procena sadržaja toksina u suplementima (Lawrence i sar., 2001; Hoeger i Dietrich, 2004; Dietrich i Hoeger, 2005).

GV za MC-LR u suplementima je izračunata za odrasle osobe, usled čega deca mogu biti podložnija dejstvu ovog toksina. Ukoliko bi dete od 20 kg konzumiralo preporučene dve tablete dnevno (oko 1 g), GV (0,8 $\mu\text{g/g}$) bi bila prekoračena za više od tri puta (3,75) kod prvog od testiranih suplemenata, a u slučaju drugog to prekoračenje bi iznosilo 1,9 puta.

Osim telesne težine potrošača, preporučena GV za MC-LR takođe zavisi i od dnevnog unosa suplementa, a koja u velikoj meri zavisi od pojedinca i može da varira od 0,25 g do 20 g (Schaeffer i sar., 1999; Gilroy i sar., 2000). Dnevna potrošnja od nekoliko grama suplemenata, koji mogu da sadrže od 1 do 35 μg ekvi. MC-LR/g st (Yu i sar., 2002), mogla bi premašiti TDI i dovesti do dugoročnih zdravstvenih problema. Međutim, ovo se može izbeći revizijom sadašnjih GV za ovaj put ekspozicije, a o čemu će se diskutovati u tekstu koji sledi. Dobijeni rezultati upozoravaju na postojanje potencijalne opasnosti po zdravlje potrošača, kao i na potrebu za uvođenjem i sprovođenjem strožije kontrole kvaliteta suplemenata u ishrani na bazi cijanobakterija na našem tržištu.

5.5. Predlozi za reviziju vrednosti tolerantnog dnevnog unosa i implementaciju graničnih vrednosti

Iz dosadašnjag sadržaja disertacije moglo se saznati da li, kada, kako i zašto cijanobakterije i njihovi metaboliti mogu biti opasni po ljudsko zdravlje. Iz poznatih razloga cijanobakterijama i njihovim toksinima, posebno najčešćem i najopasnijem MC-LR, sve veću pažnju posvećuje i SZO, koja je odredila TDI vrednost za ovaj toksin u iznosu od 0,04 µg/kg telesne mase dnevno (SZO, 1998). SZO je preporučila i orijentacione GV za doživotnu potrošnju ovih kontaminanata putem vode za piće od 1 µg MC-LR po L unete vode, a takođe je dala predloge GV za neke druge puteve ekspozicije o čemu je bilo više reči u uvodnom delu disertacije.

Međutim, preporučeno je da se predložene GV revidiraju i snize na minimum, jer postoji nedostatak informacija vezan za brojna nerešena pitanja i probleme (Dietrich i Hoeger, 2005; Svirčev i sar., 2011a; Drobac i sar., 2011b; 2013). Naime, TDI je zasnovan na histopatologiji jetre i promenama nivoa enzima u serumu tokom trinaestonedelnog istraživanja na miševima kojima je oralno davan MC-LR.

Kao prvo, iako je pri proračunu za TDI uzet u obzir bezbednosni faktor nesigurnosti (10) za interspecijsku varijabilnost, ipak postoji značajna razlika u fiziologiji između glodara i ljudi. Naime, izlaganje MC-LR putem hrane ili vode je različito kod glodara i ljudi, usvajanje MC-LR je manje kod glodara u poređenju sa usvajanjem kod ljudi, *in vitro* esaji sa primarnim hepatocitima su ukazali na veći susceptibilitet humanih hepatocita u poređenju sa glodarima (Batista i sar., 2003) i analiza ljudskih organskih anion transportera je ukazala na veći transport kod jetre čoveka nego kod jetre glodara (Fischer i sar., 2005).

Drugo, pri izračunavanju TDI vrednosti primenjen je i ukupni faktor nesigurnosti (10) za ograničenja u bazi podataka, posebno se ovo odnosi na nedostatak podataka o kancerogenosti i hroničnoj toksičnosti izučavanog cijanotoksina. Međutim, sve više pažnje se posvećuje istraživanju mehanizama toksičnosti i kancerogenosti MC-LR, a postoji i sve veći broj podataka o hroničnim negativnim efektima ovog toksina.

Treće, zna se da je glavni ciljni organ mikrocistina jetra, međutim pokazalo se da ovi toksini mogu uticati i na druge organe, kao što je debelo crevo (Humpage i sar., 2000a; Zhou i sar., 2002), tanko crevo (Botha i sar., 2004), mozak (Maidana i sar., 2006, Žegura i sar., 2008), pluća (Soares i sar., 2007; Žegura i sar., 2008), srce (Milutinović i sar., 2006), bubrezi

(Nobre i sar., 1999; Milutinović i sar., 2002; 2003) i reproduktivni sistem (Ding i sar., 2006; Li i sar., 2008).

Četvrto, postoji i pitanje vezano za trajanje izlaganja-da li je reč o subhroničnom ili hroničnom izlaganju, pa se na osnovu svega navedenog predlaže uvođenje dodatnog faktora nesigurnosti (vrednost 3). U tom slučaju ukupan faktor nesigurnosti bi mogao iznositi 3 000, a samim tim i TDI vrednost bi bila smanjena na 0,013 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Dietrich i Hoeger, 2005).

Kada su u pitanju GV, svaka zemlja ima svoje specifične socijalne, ekonomske, sredinske i klimatske faktore koje treba uzeti u obzir prilikom određivanja ovih vrednosti. Za očekivati je da postoji razlika u trajanju i načinu izlaganja, kao i količini konzumirane vode, hrane i suplemenata u različitim delovima sveta. GV je potrebno određivati u skladu sa tim lokalnim faktorima svake države.

Dalje, GV se obično računaju za zdrave odrasle osobe od prosečno 60 ili 70 kg telesne težine, pa deca mogu biti ugroženija od odraslih zbog manje telesne mase, ali i veće verovatnoće slučajnog unošenja kontaminirane vode i težeg prepoznavanja simptoma, a i suplementi su često namenjeni upravo deci. Pored novorođenčadi i male dece, naročito podložne subpopulacije su pacijenati sa oboljenjima jetre. Pri određivanju dozvoljenih vrednosti unosa treba voditi računa o najugroženijima.

Na osnovu navedenog, pri računanju GV za različite puteve izlaganja (prema formuli navedenoj u uvodu), uz standardni TDI, za telesnu težinu bi se moglo uzeti 20 kg, radi zaštite dece i osetljivih osoba, sa pretpostavkom da dnevno konzumiraju 1 L vode za piće, 0,1 kg hrane (mesa ribe i salate), kao i 1 g suplemenata (preporučene i dozvoljene 1-2 tablete) dnevno. Izračunate GV na taj način bi iznosile: 0,6 $\mu\text{g}/\text{L}$ vode za piće, 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hrane i 0,8 $\mu\text{g}/\text{g}$ suplemenata. Međutim, ako se još uzme u obzir i niži TDI (0,013 $\mu\text{g}/\text{kg}$), te vrednosti bi iznosile: 0,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ vode za piće, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hrane i 0,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ suplemenata (Dietrich i Hoeger, 2005).

Ovim vrednostima bi se približile i GV računate za odrasle osobe od prosečnih 60 kg, koje dnevno piju 2 L vode, jedu 0,3 kg hrane (mesa ribe i salata) i koriste 2 g (preporučeno i dozvoljeno 3 do 6 tableta) suplemenata u ishrani na bazi cijanobakterija. U tom slučaju pri nižoj TDI (0,013 $\mu\text{g}/\text{kg}$), GV bi iznosile: 0,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ vode za piće, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hrane i 0,3 $\mu\text{g}/\text{g}$ suplemenata.

Navedene vrednosti mogu biti i strožije, ako uzmemo u obzir malu decu telesne težine 5 kg, pa bi u zavisnosti od primenjene TDI, GV iznosile: 0,2 odnosno 0,07 $\mu\text{g}/\text{L}$ vode za piće (ako piju 0,75 L dnevno), 0,4 odnosno 0,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hrane (ako unose 0,1 kg hrane) i 0,2 odnosno 0,07 $\mu\text{g}/\text{g}$ suplemenata (ako uzimaju 1 g suplemenata) (Dietrich i Hoeger, 2005).

Naravno idealno i najbezbednije bi bilo da MC-LR u potpunosti nema, a ako to nije moguće, onda je neophodno da GV dozvoljavaju njegov minimum u svim putevima ekspozicije. Ukoliko i to nije izvodljivo, preporučene GV SZO od 1 µg/L (µg/kg ili µg/g u zavisnosti od načina izlaganja) mogu zadovoljiti potrebe zaštite stanovništva u kratkom vremenskom periodu. U svakom slučaju bi trebalo uvesti odrednice u našu legislativu, a kao uzor nam mogu poslužiti druge države koje su ovo pitanje već regulisale (videti Tabele 4 i 5).

Međutim, tu nije kraj problema, jer jedna vrsta cijanobakterija može da proizvede različite cijanotoksine, i za većinu njih TDI se ne može izvesti zbog nedostatka toksikoloških podataka. Do sada, istraživanja o kancerogenosti cijanobakterija i promociji tumora je uglavnom fokusirana na hepatotoksine (mikrocistin, nodularin i cilindospersin). Ipak, cijanobakterije proizvode i niz drugih metabolita sa potencijalnim tumor-promovišućim efektima (Nováková i sar., 2011), a tu su i brojna druga jedinjenja koja predstavljaju potpunu nepoznanicu kada su u pitanju negativna dejstva na druge organizme. Potrebno je napomenuti da simultano dejstvo nekoliko različitih cijanotoksina nije dovoljno proučeno.

Samo familija mikrocistina broji preko 200 članova koji su nedovoljno proučeni, a mogu biti toksični. Većina formi ovog cijanotoksina se trenutno ne detektuju i mogu biti unesene neopaženo, posebno ako se legislativom reguliše samo jedna ili nekoliko formi mikrocistina.

Razlike u koncentraciji detektovanog toksina mogu nastati kada se primene različite metode detekcije. Trenutne metode detekcije dozvoljavaju samo procenu koncentracije cijanotoksina zbog njihovih različitih ograničenja (osetljivosti/selektivnosti), dok većina metoda može meriti samo slobodne mikrocistine, odnosno mikrocistine koji nisu kovalentno vezani za tkiva. Preciznije i pouzdanije metode detekcije su neophodne za izvođenje adekvatnih GV i monitoring cijanotoksina (Dietrich i Hoeger, 2005). Ovo se posebno odnosi na hranu, uzorke tkiva životinja i biljaka, koja zahtevaju kompleksnu pripremu. Generalno put ekspozicije hranom je često zanemaren i potrebno mu je posvetiti više pažnje.

Da nivo rizika po ljudsko zdravlje može da zavisi od načina ekspozicije i nivoa cijanotoksina pokazano je u nedavnoj studiji, kada su mikrocistini (prosečno 0,39 ng/mL) pronađeni u uzorcima seruma ribara sa jezera Chaohu (Kina). Slučajno izabrani ribari (14 muškaraca i 21 žena) koji žive na jezeru više od 5 godina, pili su vodu iz jezera i jeli uglavnom vodene proizvode (ribe, škampe, puževe). Dnevni unos od strane ribara je procenjen u opsegu od 2,2 do 3,9 µg ekvi. MC-LR, dok je TDI za svakodnevno životno izlaganje 2 do 3 µg po osobi (Chen i sar., 2009). Navedeni podaci ukazuju da produženo izlaganje, pa i u rasponu od TDI i više, može da predstavlja rizik po zdravlje.

Imajući u vidu moguće dugoročne procese akumulacije cijanotoksina u ljudskom telu, sledeće pitanje se ne treba zanemariti: kakve posledice ima dugoročno izlaganje različitim putevima ekspozicije na ljudsko zdravlje kada su nivoi cijanotoksina povišeni ili čak unutar TDI?

Za sada su nepoznate posledice hroničnog izlaganja sa kumulativnim efektima nakon ingestije kontaminirane vode za piće, hrane i/ili cijanobakterijskih suplemenata sa povišenim nivoom cijanobakterijskih toksina. Čak i u zemljama gde postoji legislativa, ukupan dnevni unos mikrocistina i drugih cijanotoksina može biti značajno povećan združenim načinima izloženosti ovim metabolitima: uz vodu za piće, unos mikrocistina se povećava konzumiranjem supe koja je evaporat vode za piće, unosom riblje čorbe koja je evaporat vode i ekstrakt mesa ribe, same kontaminirane ribe kao i drugih akvatičnih organizama (školjke, puževi, rakovi,...), zatim ishranom povrćem i voćem koje je navodnjavano kontaminiranom vodom, upotrebom suplemenata u ishrani na bazi cijanobakterija, tuširanjem, rekreacionim aktivnostima na akumulacijama koje cvetaju i tako dalje.

Putevi izlaganja cijanobakterijama i njihovim toksinima kojima potencijalno mogu biti izloženi stanovnici Srbije se odnose prvenstveno na: upotrebu vode za piće i higijenu koja sadrži cijanotoksine (anketa pokazuje da su i pored upozorenja građani nastavili da upotrebljavaju vodu u ove svrhe), dermalni kontakt, slučajno oralno unošenje vode i inhalacija tokom rekreacije (anketa pokazuje da ljudi dolaze u kontakt sa vodom koja cveta), konzumiranje ribe (anketa pokazuje da neki ljudi često konzumiraju ribu, neki verovatno i u većim porcijama od pretpostavljenih 0,1 kg, a potvrđena je akumulacija mikrocistina u mišićima ribe) i konzumiranje poljoprivrednih kultura sa akumuliranim cijanotoksinima (brojne akumulacije za navodnjavanje u Srbiji cvetaju, a eksperimentalno je potvrđena akumulacija mikrocistina u plodovima biljke), kao i upotrebu suplemenata na bazi cijanobakterija (koncentracije mikrocistina u testiranim preparatima prevazilaze preporučene vrednosti).

Na osnovu svega navedenog, zaključuje se da GV cijanotoksina treba da budu pažljivo uvedene u domaću legislativu. U tom cilju u Tabeli 38 dat je primer koji bi mogao da posluži kao osnov domaćoj legislativi (Svirčev, 2011). Da bi se sprečili bilo kakvi potencijalni rizici, GV za cijanotoksine treba preispitati u svetlu skorijih saznanja i implementirati ih u nacionalnu legislativu, uzimajući pri tome lokalne okolnosti u obzir. Takođe, preporučljivo je da se poboljšaju i standardizuju način pripreme uzoraka i metode detekcije za različite cijanotoksine, kao i da se sprovodi kontinuirano praćenje stanja voda, hrane i suplemenata.

Tabela 38. Nivoi rizika i dozvoljene vrednosti cijanotoksina

Izvor cijanotoksina	Dozvoljene vrednosti
Voda za piće	1 µg/L MC-LR 1 µg/L nodularin 1 µg/L cilindrospermopsin 1 µg/L anatoksin-a(S) 2 µg/L homoanatoksin-a 3 µg/L anatoksin-a 3 µg/L saksitoksin i ekvivalenti
Vode za rekreaciju	
Relativno nizak rizik	20 000 ćelija/mL (2-4 µg/L MC)
Srednje značajan rizik	100 000 ćelija/mL (>20 µg/L MC)
Stanje visokog rizika	pojava vidljivih nakupina na (>100 µg/L MC)
Hrana (meso ribe i biljke)	1 µg/kg mikrocistina
Dijetetski suplementi	1 µg/g mikrocistina (1 ppm)
Dozvoljena dnevna doza	0,04 µg/kg/dan

Treba naglasiti da se svako cvetanje cijanobakterija treba smatrati toksičnim dok se ne dokaže suprotno. Preporučuje se najveći oprez i izbegavanje svakog kontakta sa takvim vodenim ekosistemima dok se ne potvrdi bezbednost korišćenja u bilo koje svrhe. Da bi se izbegla izloženost cijanotoksinima savetuje se:

- Konzumacija samo adekvatno pripremljene vode koja se prerađuje iz površinskih akumulacija.
- Izbegavati kontakt (plivanje, ronjenje, veslanje, skijanje i druge rekreativne aktivnosti) sa vodom na čijoj površini su vidljive nakupine cijanobakterija.
- Istuširati se nakon rekreacije u cvetajućim vodama.
- Ne dopustiti deci kontakt sa cvetajućom vodom.
- Označiti kupališta znakom zabrane upotrebe tokom cvetanja i najmanje dve nedelje nakon toga.
- U slučaju umerenog cvetanja preporučuje se uklanjanje iznutrica ribe, a ako je broj ćelija veći od milion u mililitru, preporuka je da se riba ne konzumira.
- Ne zalivati poljoprivredne površine i sportske terene vodom koja cveta.
- Ne koristiti algicide i druga hemijska sredstva za uništavanje cijanobakterija jer dovode do lize ćelije i oslobađanja cijanotoksina što može da pogorša problem.
- U slučaju sumnje na kontakt sa cijanotoksinima potražiti medicinsku pomoć i savet.
- Predložena terapija u slučaju trovanja cijanotoksinima prikazana je u Tabeli 39 (Svirčev i Baltić, 2011).

Tabela 39. Predložena terapija u slučaju trovanja cijanotoksinima (Svirčev i Baltić, 2011).

Toksin	Terapija
Hepatotoksini (Mikrocistini, Nodularin, Cilindro- spermopsin/ citotoksin)	<p><i>Čovek:</i> nema specifične terapije. Sprovesti mere zaštite od trovanja. Dekontaminacija (kupanje čistom vodom i sapunom). Oralna ili gastrična primena aktivnog uglja: 25-100 g kod odraslih, 25-50 g kod dece, 1 g/kg kod infanta (po mogućnosti ponovljene primene). Primena Sylibilin-a 20-50 mg/kg/dan iv, terapija tečnostima i elektrolitima, antioksidansima (E vit., polifenoli), dijaliza i transplantacija jetre. Potporna nega i simptomatska terapija. Zabrana uzimanja alkohola i Acetaminophena.</p> <p><i>Životinje:</i> Cholestyramin.</p> <p><i>Profilaksa:</i> Riphampin 50 mg/kg i Cyclosporine A 10 mg/kg.</p>
Neurotoksin Anatoksin-a	Gastrična primena aktivnog uglja, asistirana respiratorna terapija, detoksikacija i respiratorni oporavak. U slučajevima progresije bolesti primeniti Diazepam 5 mg iv Phenothiazini, parasimpatikomimetici i antihistaminici su kontraindikovani jer imaju antiholinergičnu aktivnost i mogu da pospešuju neurotoksičnost. Potporna nega i simptomatska terapija.
Neurotoksin Anatoksin-a(s)	Gastrična primena aktivnog uglja, asistirana respiratorna terapija, detoksikacija i respiratorni oporavak. U slučajevima progresije bolesti primeniti Diazepam 5 mg iv Phenothiazini, parasimpatikomimetici i antihistaminici su kontraindikovani jer imaju antiholinergičnu aktivnost i mogu da pospešuju neurotoksičnost. Potporna nega i simptomatska terapija.
Neurotoksini Saksitoksin, Neosaksitoksin	Gastrična primena aktivnog uglja, asistirana respiratorna terapija, detoksikacija i respiratorni oporavak. Potporna nega i simptomatska terapija.
Dermatotoksini Apliziatoksin, Lingbiatoksin	Dekontaminacija. Potporna nega i simptomatska terapija.
Citotoksini Lipopolisaharidi	Dekontaminacija. Potporna nega i simptomatska terapija.

Naravno treba naglasiti da je uvek bolje “sprečiti nego lečiti” i treba izbegavati puteve izlaganja cijanotoksinima, ali najvažnije je u osnovi smanjiti rast cijanobakterija i kontrolisati procese eutrofikacije.

5.6. Načini prevencije i eliminacije cijanobakterija i njihovih toksina

Uočena ubrzana eutrofizacija sa masovnim prisustvom potencijalno toksičnih vrsta cijanobakterija u slatkovodnim ekosistemima Srbije predstavlja latentnu i realnu pretnju po zdravlje ljudi i životinja, zbog čega je potrebna primena adekvatnih mera za očuvanje kvaliteta vode. Prvi korak u kontroli pojave cijanotoksina je prevencija i smanjenje procesa eutrofizacije a samim tim i cvetanja cijanobakterija u površinskim vodama koje se koriste za vodosnabdevanje. Sledeći korak u kontroli pojave cijanotoksina je pravilno upravljanje vodama, koje uključuje primenu različitih tehnika i tretmana u cilju smanjenja rasta cijanobakterija i istovremeno posledične produkcije cijanotoksina (Mouchet i Bonnelye, 1998; Chorus i Bartram, 1999).

Konvencionalni tretmani površinskih voda za piće treba da budu optimizovani za uklanjanje cijanotoksina, u zavisnosti od tipa toksina i da li se uklanjaju unutar ili vanćelijski toksini, a takođe treba voditi računa i o mogućnosti oslobađanja toksina tokom samog procesa eliminacije (Falconer, 2005). Postoji nekoliko metoda koje se koriste za uklanjanje cijanobakterija i njihovih toksina iz vode, a koje mogu da se sprovedu pojedinačno ili u međusobnoj kombinaciji sa ciljem smanjenja zagađivača, bilo putem uklanjanja, degradacije ili inaktivacije toksičnosti ciljnog jedinjenja. Tu se ubrajaju razni fizički i hemijski procesi (Videti Tokodi i sar., 2012).

Fizičko/biološki procesi

- *Koagulacija ili flokulacija*

Koagulacija ili flokulacija podrazumeva agregaciju manjih čestica u veće upotrebom hemikalija (npr. gvožđe hlorida ili aluminijum sulfata). Može se primeniti u prirodnim vodama koja sadrži više vrsta algi (Zhang, 2009a) i efektivna je u uklanjanju ćelija ali ne i slobodnih mikrocistina (James i Fawell, 1991; Rositano i Nicholson, 1994).

- *Flotacija*

Flotacija se koristi za uklanjanje suspendovanih i koloidnih čestica, smanjenjem gustine i podizanjem na površinu vode (Wang i sar., 2005). Gas (vazduh) se uvodi blizu dna vodene kolone i ispušteni mehurići kupe čestice i nose ih na površinu. Efikasna je za uklanjanje ćelija cijanobakterija (i unutarćelijskih toksina) i ne izaziva oštećenje ćelija. Međutim, nije uočeno

značajno uklanjanje rastvorenih mikrocistina, pa bi se trebala koristiti u kombinaciji sa drugim metodama za eliminaciju rastvorenih toksina u vodi (Ribau Teixeira i Rosa, 2006).

- *Filtracija*

Obično se koristi nakon koagulacije i zahteva redovno ispiranje filtera. Ako se ne obavlja adekvatno, može da dođe do uništavanja cijanobakterijskih ćelija i oslobađanja cijanotoksina u vodu (Chorus i Bartram, 1999). Direktna brza filtracija nije bila efikasna u uklanjanju cijanobakterijskih ćelija, dok spora filtracija peskom može da ukloni 99 % ćelija (Lepisto i sar., 1994; Mouchet i Bonnelye, 1998; Grutzmacher i sar., 2002). Spora i brza filtracija mogu da uklone ili inaktiviraju mikrocistine u vodi (Lahti i sar., 2001; Grutzmacher i sar., 2002; Bourne i sar., 2006). Spora filtracija peskom može biti korisna metoda ako se kombinuje sa drugim tretmanima vode (Chorus i Bartram, 1999).

- *Membranski procesi*

Predstavlja fizički proces vršen pod pritiskom, koji razdvaja zagađivače po veličini i naelektrisanju u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika membrane. Membranske filtracije pod niskim pritiskom: mikrofiltracija (MF) i ultrafiltracija (UF) su se pokazale efikasnim u uklanjanju cijanobakterijskih ćelija (Gijsbertsen-Abrahamse i sar., 2006), jer mogu ukloniti više od 98 % ćelija cijanobakterija, ali nisu u mogućnosti da eliminišu rastvorene cijanotoksine (Ribau Teixeira i Rosa, 2006a). UF se pokazala kao nepouzdana barijera za cijanotoksine (Lee i Walker, 2006). Nanofiltracija (NF) i reverzna osmoza (RO) su mogle ukloniti rastvorene mikrocistine (Neumann i Weckesser, 1998; Gijsbertsen-Abrahamse i sar., 2006; Ribau Teixeira i Rosa, 2006a), ali zahtevaju visok nivo održavanja da bi se sprečio obraštaj membrane (Drikas i sar., 2001; Miller i sar., 2001).

- *Adsorpcija, aktivni ugalj*

Uključuje primenu aktivnog uglja u prahu koji se povremeno dodaje kada postoji potreba, ili adsorbera zrnastog aktivnog ugalja, koji se koristi kontinuirano (Newcombe, 2002). Uspešno se koriste u uklanjanju mikrocistina iz vode (Nasri i sar., 2007; Wang i sar., 2007), ali postoji mogućnost adsorpcije drugih organskih zagađivača i zbog čestih zamena i potrebe primene velikih količina, aktivirani ugalj može postati skupa metoda (Lee i sar., 2005).

- *UV fotoliza*

UV može oštetiti molekularne veze i inaktivirati patogene u vodi. Mikrocistin, anatoksin-a i cilindrospermopsin mogu se fotolitički razgraditi pri visokim dozama ovog zračenja (Tsuji i sar., 1994; Chorus i Bartram, 1999; Senogles i sar., 2000). Međutim, visoke doze UV zračenja koje su potrebne za uspešnu fotolizu mikrocistina za tretman voda su nepraktične (Drikas i sar., 2001; Svrcek i Smith, 2004).

- *Probiotske bakterije*

Specifični sojevi (*Lactobacillus rhamnosus* sojevi GG i LC-705, *Bifidobacterium longum* 46, *Bifidobacterium lactis* 420 i posebno *Bifidobacterium lactis* Bb12), mogu ukloniti MC-LR iz vodenih rastvora. Sveže kulture bakterije su bile efikasnije od liofilizovanih ili nevijabilnih. Uklanjanje MC-LR je zavisilo od temperature i bakterijske koncentracije (Nybom i sar., 2007).

Hemijski procesi

- *Oksidacija*

Oksidanti razbijaju toksične organske molekule, ali mogu dovesti i do oštećenja cijanobakterijske membrane i oslobađanja toksina. Primarni oksidanti su hidroksil radikali, ozon, hlor dioksid, kalijum permanganat, hlor i hloramini (Crittenden i sar., 2005). Obično se koriste pre ili posle filtracije kao dezinficijensi (Westrick i sar., 2010). Permanganat se često primenjuje zbog relativno niske cene, jednostavnog rukovanja, stabilnosti, delotvornosti (Waldamer i Tratnyek, 2006) i ne dovodi do formiranja hlorovanih ili bromovanih nusprodukata (Rodriguez i sar., 2007). Hlor na pH<8 je efikasan u inaktivaciji mikrocistina (Acero i sar., 2005; Ho i sar., 2006), ali pri tome je moguće izlaganje ljudi toksičnim nivoima hlora u vazduhu. Takođe postoji rizik od lize ćelija cijanobakterija i formiranje visokih nivoa trihalometana (Chorus i Bartram, 1999; Newcombe, 2002; Acero i sar., 2005; Rodriguez i sar., 2007a). Efikasnost ozona zavisi od doze i vrste cijanotoksina, a formiranje nusproizvoda je prisutno pri procesu ozonizacije (Brooke i sar., 2006; Rodriguez i sar., 2007b). Permanganat je efikasan za eliminaciju anatoksin-a i MC-LR, a hlor za cilindrospermopsin i MC-LR, dok je ozon efikasan za sva tri toksina (Rodriguez i sar., 2007b).

- *Napredna oksidacija-Fenton proces*

Fenton reagens je mešavina fero jona i vodonik peroksida koji proizvodi izuzetno reaktivne hidroksilne radikale. Dovodi do degradacija MC-LR i MC-RR, a u kombinaciji sa ozonom i vodonik peroksidom dovodi i do eliminacije anatoksina-a (Al Momani, 2007). U Foto-Fenton procesu, koji uključuje UV zračenje, uklonjen je MC-LR (Bandala i sar., 2004). Nedostatak ove metode je stvaranje mulja gvožđa (Svrček i Smith, 2004).

- *Vodonik peroksid*

Vodonik peroksid (H_2O_2) je reaktivna vrsta kiseonika proizvedena u prirodi uglavnom tokom fotolize rastvorene organske materije izložene UV zračenju, predstavlja nus-produkt fotosinteze, disanja i drugih metaboličkih procesa, proizvode ga mnogi organizmi i prirodno se javlja u malim koncentracijama u površinskim vodama (Cooper i Zika, 1983; Apel i Hirt, 2004; Asada, 2006; Veal i sar., 2007). Smatra se da su cijanobakterije osetljivije na H_2O_2 nego eukariotski fitoplankton iz razloga što cijanobakterije ne proizvode H_2O_2 kao što to rade eukariotski fitoplankton i više biljke tokom fotosinteze (Helman i sar., 2003; 2005; Latifi i sar., 2009; Allahverdiyeva i sar., 2011). Nekoliko studija je i pokazalo da su cijanobakterije osetljivije na H_2O_2 nego zelene alge i dijatomeje, čime se omogućuje selektivno eliminisanje cijanobakterija (Barroin i Feuillade, 1986; Drabkova i sar., 2007; 2007a; Barrington i Ghadouani, 2008). Takođe, uočeno je da H_2O_2 može da eliminiše više od 50 % cijanobakterijske biomase u roku od 48 h iz jezera (Barrington i sar., 2011). Na osnovu istraživanja koje je vršeno u Holandiji na jezeru u kome je cvetao *Planktothrix agardhii* tretman sa H_2O_2 se pokazao kao veoma uspešan. H_2O_2 selektivno je eliminisao cijanobakterije u roku od nekoliko dana, bez većih posledica po eukariotski fitoplankton, zooplankton i makrofaunu. Posle tretmana, brojnost cijanobakterija je ostala niska 7 nedelja. Pronalaženje prave doze je ključno za primenu H_2O_2 , a zatim se željenom koncentracijom H_2O_2 homogeno tretira čitavo jezero i to u jednom danu, da bi se izbeglo ponovno prenošenje cijanobakterija iz netretiranih u tretirana područja (Matthijs i sar., 2012). Takođe, mikrocistini mogu da se oksiduju sa H_2O_2 tokom ili ubrzo nakon lize ćelija (Cornish i sar., 2000; Liu i sar., 2003; Bandala i sar., 2004). Proizvodi oksidacije mikrocistina nisu toksični i ne predstavljaju opasnost za javno zdravlje (Lawton i sar., 1999; Liu i sar., 2002; Rodriguez i sar., 2007; 2008). Konačno, H_2O_2 se brzo razlaže na vodu i kiseonik i ne ostavlja dugoročne hemijske tragove u okruženju. U svetu za sada postoji nekoliko primera uspešne aplikacije H_2O_2 u cilju eliminacije cijanobakterija i cijanotoksina, tu se ubrajaju već pomenuti autori

Matthijs i saradnici (2012) iz Holandije, zatim Barrington i saradnici (2013) iz Australije, kao i Wang i saradnici (2012) iz Kine. Primena samo ove metode ili u kombinaciji sa drugim metodama može predstavljati potencijalno oruđe u borbi protiv cijanobakterija i njihovih toksina u budućnosti, sa tim ciljem primenu i efikasnost ove metode treba dalje i detaljnije ispitivati.

Navedene metode imaju svoje nedostatke, obično su skupe, često nisu izvodljive, mogu dovesti do stvaranja negativnih sporednih efekata, kao i izazvati lizu cijanobakterijskih ćelija i masovno otpuštanje cijanotoksina čime dodatno pogoršavaju postojeći problem. Rezultati poboljšanja mogu biti vidljivi tek nakon dužeg vremenskog perioda, a obično se zahtevaju brza rešenja.

Usled trenutnog nedostatka idealnih metoda eliminacije cijanobakterija i cijanotoksina, potrebno je akcentovati važnost prevencije eutrofizacije i cvetanja. Mere za sprečavanje eutrofizacije se ostvaruju već pri projektovanju akumulacija, kada treba voditi računa o izboru lokacije uz poštovanje svih normativa koji obezbeđuju kvalitet, dugovečnost i sprečavanje ubrzane eutrofizacije. Ubrzana eutrofizacija u već izgrađenim akumulacijama može se sprečiti pravilnim pristupom njihovog korišćenja i održavanja, primenom radikalnih mera (kao što su čišćenje dna, izmuljivanje, izgradnja taložnica u regionima dotoka vode) kao i drugih mera, uz monitoring relevantnih parametara. Preduslov je prečišćavanje otpadnih voda koje dospevaju u akumulaciju (Ivanc i Miljanović, 2003).

Prevenција cvetanja cijanobakterija se sastoji u smanjenju, odnosno kontroli unošenja neorganskih materija pre svega fosfora i azota u vodene ekosisteme koji se koriste za vodosnabdevanje. Prevenција i moguća sanacija cvetanja cijanobakterija u akvatičnim sredinama svodi se na nekoliko važnih koraka: adekvatno prečišćavanje otpadnih voda, kontrolisana upotreba fertilizatora u poljoprivredi, smanjenje spiranja vode sa poljoprivrednih površina, zaštita od erozije, zaštita vodoizvorišta, drenaža sedimenta i vezivanje fosfora, promene hidrofizičkih karakteristika i pojačavanje protoka vode i biomanipulacija (Simeunović, 2010).

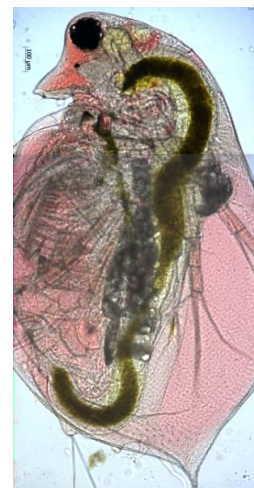
U borbi sa cvetanjem koriste se razne fizičke, hemijske i biološke metode. Neke od fizičkih metoda sastoje se u primeni usisnih postrojenja za uklanjanje algi, veštačkom zamućenju vode glinom i aeraciji. Unutrašnji ciklus nutrijenata se obično sprečava tretmanom jezera kao što je aeracija. Dobra aeracija omogućava da se voda kreće i održava konstantnu temperaturu od vrha do dna vodenog ekosistema (Jovin, 2007).

Što se tiče bioloških mera u borbi sa cvetanjem, u procesu smanjenja degradacije kvaliteta vode i u cilju obnavljanja prirodnih ekosistema značajnu ulogu ima ekoremedijacija (ERM). ERM povećava samoprečišćujuću, odnosno samoodbrambenu sposobnost životne sredine, smanjuje i ublažava posledice antropogenog delovanja (kao što su poljoprivreda, turizam, saobraćaj, industrija, otpad) i može pomoći u prevenciji i kontrolisanju cvetanja voda (Jovin, 2007).

Prirodno čišćenje u ekosistemima se zasniva pre svega na delovanju mikroorganizama i biljaka, koji mogu da prežive u zagađenoj vodi, tako što razgrađuju ili usvajaju štetne otpadne materije (Vovrkorže, 2006). Prirodna mikrobijalna populacija u akvatičnim sistemima može degradirati cijanotoksine (Chours i Bartram, 1999). Značajan je biološki metod koji se zasniva na korišćenju mikroorganizama antagonista algi i cijanobakterija. Do sada je izolovano 25 antagonista cijanobakterija. U akumulacijama Dnjepra su izolovani mikroorganizmi (algofagi) koji liziraju cijanobakterije u roku od 2-6 dana (Đukić i sar., 2000).

Zooplankton, naročito dafnije, mogu da imaju značajan uticaj na sastav i zastupljenost zajednice fitoplanktonan jer ih koriste u ishrani (Reynolds, 1994). S druge strane, cijanobakterije proizvode cijanotoksine koji utiču na zooplankton. Jedna od mogućih funkcija ovih toksina je da igraju ulogu u odbrani cijanobakterijskih ćelija od zooplanktona (Rohrlack i sar., 1999). Jang i saradnici (2007) su pružili dokaze o indukovanoj odbrani cijanobakterija povećanjem proizvodnje mikrocistina kao odgovor na veću gustinu zooplanktona. S druge strane, dafnije razviju fiziološke i bihevioralne osobine koje im pomažu u prisustvu toksičnih cijanobakterija. Nedavna istraživanja su pokazala da visoke koncentracije mikrocistina ne sprečavaju dafniju u supresiji biomase fitoplanktona u prirodi (Chislock i sar., 2013). Postoje i nalazi u kojima su lokalne populacije dafnija poboljšale svoju efikasnost da tolerišu i koriste toksične cijanobakterije u ishrani (Gustafsson i Hansson, 2004; Sarnelle i Wilson, 2005). I tokom našeg eksperimenta *Daphnia pulex* (Slika 25) se hranila različitim cijanobakterijama (testirano 80 sojeva iz NSCCC), bez obzira na rod, morfologiju i toksičnost, a zavisno od soja. U većini slučajeva u kojima se dafnija nije hranila tokom prvog dana, počela je tokom eksperimenta (Drobac i sar., 2013a). Pretpostavka je da se dafnija adaptirala i počela da koristi cijanobakterije u svojoj ishrani. Evolucija tolerancije dafnija prema cijanobakterijama može biti važna za biomanipulaciju i poboljšanje kvaliteta vode u eutrofnim jezerima (Hairston i sar., 2001; Sarnelle i Wilson, 2005). Promene u lancima ishrane u vidu povećanja ishrane herbivornog zooplanktona i posledičnog smanjenja brojnosti cijanobakterija, može biti način da se poboljša stanje ekosistema. U prethodnim istraživanjima Pogozhev i

Gerasimova (2001) su ukazali kako *Daphnia longispina* može da kontroliše razvoj fitoplanktona i tako poveća providnost vode i dovede do oporavka visoko eutrofnih voda. Takođe, i u našem istraživanju kvalitet vode ribnjaka, u smislu toksičnosti, je zavisio od introdukcije dafnija u jezerima. U jezerima gde je introdukcija dafnija izvršena pre cvetanja cijanobakterija toksičnost je bila najniža, a povećana u jezerima gde je introdukcija dafnija urađena tokom ili nakon cvetanja cijanobakterija, dok je bila najviša u kontrolnim jezerima gde nije izvršena introdukcija dafnija (Tokodi i sar., 2013).



Slika 25. Dafnija koja se hranila cijanobakterijama
(Drobac i sar., 2013a)

Postoji mogućnost i da se neke vrste riba koriste u biomanipulaciji, odnosno u kontroli cvetanja cijanobakterija ili eliminaciji njihovih metabolita. Fitoplanktivorne ribe pokazuju veću otpornost na toksična cijanobakterijska cvetanja u odnosu na omnivorne i karnivorne vrste, zbog čega fitoplanktivorne ribe mogu da se upotrebe za kontrolu cijanobakterijskog cvetanja (Qui i sar., 2007). Na primer fitoplanktivorni srebrni šaran, kao i beli i sivi tolstolobik su se pokazali kao efikasni u kontroli cvetanja cijanobakterija (Chen i sar., 2006a; Ke i sar., 2009). Naravno, s obzirom da ribe mogu akumulirati toksine u svojim tkivima, prilikom ovakve biomanipulacije treba biti veoma oprezan. Smatra se da se koncentracije akumuliranih toksina (saksitoksina) u tkivima ribe (jetra i mišići) mogu smanjiti procesom depuracije, tako što se ribe prebacuju iz cvetajućih jezera u bazene ili veštačka jezera sa čistom vodom gde se čuvaju nekoliko dana bez hrane (Galvao i sar., 2009), ali ovaj proces zahteva dalja istraživanja.

U cilju smanjenja zagađenja vodotokova mogu da se koriste i tzv. biljne naprave za čišćenje (BNČ). BNČ uz pomoć fizičkih i biohemijskih procesa kao što su aerobna i anaerobna razgradnja, filtracija, sedimentacija i adsorpcija, obezbeđuju čišćenje organskih materija, azotnih jedinjenja i fosfata, teških metala i drugih otrovnih materija, koje nastaju u domaćinstvu i poljoprivrednoj proizvodnji. Deluju gravitacijski, bez mašinske i električne opreme, tako da se voda sliva preko dva bazena koji se nalaze jedan za drugim, izolovanih folijom, napunjenim substratom i zasađenim biljkama kojima prija vlaga. Prečišćena voda iz BNČ dostiže propisane normative i može se odvoditi u okolinu, a može se sakupljati i upotrebljavati za zalivanje zelenih površina, pranje automobila, sanitarnu vodu i za gašenje požara (Jovin, 2007).

Plutajući pokretni ekoremedijacioni sistem (PPES) je nova sveobuhvatna ideja u oblasti ERM, koja podrazumeva: smanjenje kapaciteta zagađenosti vodenog ekosistema, uklanjanje i eliminaciju otrovnih supstanci, aeraciju, bioakumulaciju teških metala, korisnu upotrebu plastičnog otpadnog materijala, proizvodnju biljne biomase, akumulaciju otpada na površini vode, smanjenje koncentracije ugljen-dioksida. PPES koristi prirodne procese (npr. bioakumulacija biljaka, adsorpciju gline) u cilju regeneracije i zaštite vodenih ekosistema. Indirektno smanjenjem ukupnog kapaciteta ekosistema može se realizovati i smanjenje cijanotoksina u vodi i ribljem mesu. PPS se sastoji se od: otpadnih plastičnih flaša povezanih u plutajuća ostrva koja nose mlade autohtone biljke koje čiste vodu od hranljivih materija, uklanjaju teške metale i vrše detoksikaciju, kao i "sidra" od zeolita koji usled svoje mikroporozne kristalaste strukture i velike adsorpcione površine vrše separaciju i adsorpciju teških metala i drugih zagađivača. PPES predstavlja jeftin, lak i pristupačan način za prečišćavanje vode korišćenjem otpadnih materijala i prirodnih resursa, pri čemu ne postoje otpadni nus-proizvodi, jer se skoro sve može ponovo upotrebiti ili iskoristiti u nekom drugom obliku (npr. glina koja se koristi za akumulaciju cijanotoksina ako se hemijski tretira može se ponovo upotrebiti; biljke se u zavisnosti od kvaliteta mogu koristiti kao biofertilizator ili građevinski materijal). Ovakve jednostavne ideje se trebaju razvijati i dalje u budućnosti (Važić, 2014).

Pored svog truda koji se ulaže u pronalaženje adekvatne metode za borbu protiv cvetanja, sve one imaju više ili manje nedostataka i dugoročno gledano najbolji rezultati se mogu postići samo prevencijom eutrofizacije i cvetanja. U takvoj borbi najjače oružje predstavlja podizanje svesti ljudi. Posebnu pažnju treba posvetiti javnom informisanju korisnika voda na opasnosti od unošenja različitih polutanata u vodu koji izazivaju naglo povećanje gustine populacije cijanobakterija. Pored javnog informisanja korisnika o mogućim posledicama zagađenja, mere opreza nalažu i adekvatno informisanje javnosti o svim aspektima toksičnosti algi i cijanobakterija. Upozorenje i obraćanje pažnje javnosti nije samo mera za izbegavanje rizika, nego i informisanje o simptomima trovanja i alergija, kao i razumevanje i prepoznavanje njihovih uzročnika i određivanje načina terapije. U regionima zahvaćenim cvetanjem cijanobakterija zdravstvene informacije trebale bi biti dostupne javnosti. Informacije se mogu širiti uvođenjem edukacionih programa putem prezentovanja, uključujući škole putem popularnih predavanja, masovne medije i brošure (Svirčev, 2001).

Može se zaključiti da su cijanobakterije i njihovi toksini sveprisutni problem u brojnim akumulacijama za vodosnabdevanje, rekreaciju, nevodnjavanje i uzgoj ribe širom Srbije i kao takvi mogu različitim putevima da stignu do čoveka i utiču na njegovo zdravlje.

Ovaj problem cvetanja se teško rešava i zato se naglašava potreba njegove prevencije, a u tome bitnu ulogu ima podizanje svesti građana. Takođe, da bi mu se mogli suprotstaviti, potrebno je u potpunosti izučiti ovaj fenomen, te su dalja istraživanja imperativ.

Rezultati ove doktorske disertacije će pomoći u boljem poznavanju negativnih efekata cijanobakterija i njihovih toksina na ljudsko zdravlje, kao i načina izlaganja čoveka ovim štetnim metabolitima. Upoznavanje sa putevima ekspozicije na teritoriji Republike Srbije, odnosno, lokalitetima na kojima dolazi do pojave cvetanja cijanobakterija (akumulacije za vodosnabdevanje, rekreaciju, navodnjavanje i ribnjacima), prenošenja cijanotoksina putem lanaca ishrane i njihovog prisustva u namirnicama za ljudsku upotrebu (riblje meso, kultivisane biljke za ishranu, suplementi u ishrani na bazi cijanobakterija) može predstavljati osnovu prevencije raznih akutnih i hroničnih oboljenja. Ovi rezultati mogu da pronađu primenu u domovima zdravlja, zavodima za javno zdravlje, bolnicama, sredstvima javnog informisanja, fabrikama vode, poljoprivrednim i turističkim organizacijama.

U našoj zemlji ne postoji legislativa o dozvoljenim vrednostima cijanobakterija i cijanotoksina u vodi i hrani, tako da informacije iz ove teze mogu da svedoče o potrebi definisanja graničnih vrednosti i implementacije legislative o cijanotoksinima radi zaštite ljudskog zdravlja, posebno kada se uzme u obzir da postojeća praksa i klimatske promene pogoduju sve češćoj pojavi cvetanja cijanobakterija u Srbiji.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu istraživanja koja su sprovedena tokom izrade ove disertacije u periodu od 2010. do 2014. godine, mogu se potvrditi postavljene hipoteze i doneti sledeći zaključci:

1. U ispitivanim akumulacijama za snabdevanje vodom za piće, rekreaciju, navodnjavanje i u ispitivanim ribnjacima u Srbiji su prisutne toksične cijanobakterije i njihovi cijanotoksini.
 - 1.1. Cvetanje toksične cijanobakterije *Planktothrix rubescens* i mikrocistini su detektovani u decembru 2013., januaru i aprilu 2014. godine u jezeru Vrutci, akumulaciji za snabdevanje vodom za piće Užica, koja služi i u rekreativne svrhe. Izrazita toksičnost (*Artemia salina* bioesej) i visoke koncentracije mikrocistina (LC-MS/MS) su pronađene u biomasi cijanobakterija iz jezera, i to u rangi opasnosti visokog stepena i velike zdravstvene ugroženosti kada se posmatraju preporučene vrednosti SZO za vode za rekreaciju. U jezerskoj i vodovodnoj vodi je detektovan dmMC-RR (2,1 i 5,7 µg/L).
 - 1.2. Cvetanje potencijano toksične vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* desilo se sredinom decembra 2012. godine u Aleksandrovačkom jezeru, akumulaciji koja se koristi za navodnjavanje, kada je došlo da masovnog pomora ribe. *Artemia salina* test ukazao je na prisustvo toksičnih jedinjenja u cijanobakterijskim ćelijama, međutim cijanotoksini mikrocistini, cilindrospermopsin i saksitoksin nisu detektovani. Postoji mogućnost da je neki drugi, neidentifikovani ili nepoznati metabolit ovih organizama bio oslobođen iz ćelija nakon zamrzavanja i odmrzavanja leda tokom zime i zatim doveo do uginuća ribe.
 - 1.3. U ribnjacima Vojvodine (13 analiziranih) cvetale su toksične cijanobakterije tokom leta 2011. godine, a u uzorcima vode su detektovani (ELISA) cijanotoksini mikrocistin, nodularin (11 ribnjaka) i saksitoksin (5 ribnjaka).
2. U Centralnoj Srbiji postoji povezanost povećanih incidenzi pojedinih kancera i nekih akutnih obolenja sa pojavom cvetanja cijanobakterija u akumulacijama za vodosnabdevanje.
 - 2.1. Na osnovu analize i statističke obrade epidemioloških podataka uočeno je da su incidence primarnog kancera jetre, kao i kancera mozga, srca, medijastinuma i plućne maramice, jajnika, testisa, želuca, kolorektuma, retroperitoneuma i peritoneuma, leukemija i malignog melanoma kože veće u okruzima Centralne Srbije gde dolazi do pojave cvetanja u akumulacijama za snabdevanje vodom za piće. U tri kritična okruga (Nišavski,

Šumadijski i Toplički) koji se snabdevaju vodom za piće iz akumulacija koje cvetaju, incidence pomenutih kancera su tokom desetogodišnjeg perioda bile znatno više u poređenju sa ostalim okruzima Centralne Srbije koji nisu pogođeni ovim fenomenom, a posebno u odnosu na Vojvodinu koja se može smatrati kontrolnim regionom jer se stanovnici snabdevaju podzemnom vodom koja nije podložna fenomenu cvetanja cijanobakterija. Tokom posmatranog perioda nije uočena korelacija između incidence primarnog kancera jetre, mortaliteta ciroze jetre i incidence hroničnih virusnih hepatitisa C i B za koje se smatra da predstavljaju najznačajnije faktore rizika ovog malignog oboljenja. Da bi se definitivno potvrdila veza cvetanja i hroničnih zdravstvenih komplikacija u formi malignih bolesti potrebna su dalja istraživanja.

- 2.2. Na osnovu epidemioloških podataka i rezultata sprovedenog upitnika iz Užica nakon cvetanja u jezeru Vrutci, akumulaciji za vodosnabdevanje i rekreaciju, mogu se pretpostaviti neki negativni efekti cijanobakterija i cijanotoksina na ljude (stomačne tegobe, iritacije kože i očiju, učestale glavobolje) i na druge izložene organizme (uginuće riba i drugih životinja, iritacije kože prvenstveno pasa), međutim za pouzdanije zaključke, posebno kada su u pitanju hronični efekti, potrebno je da protekne duži vremenski period i da se sprovede još deteljnijih istraživanja.
3. Cijanotoksini mogu da se akumuliraju u mesu ribe uzgajane u akumulacijama i ribnjacima u kojima dolazi do cvetanja cijanobakterija.
 - 3.1. Toksini MC-LR, MC-RR i njihove dimetilovane forme su detektovani u tkivu ribe iz jezera Vrutci uzorkovane pre i nakon cvetanja decembra 2013. i januara 2014. godine.
 - 3.2. MC-RR je pronađen u četiri uzorka mišićnog tkiva šarana (*Cyprinus carpio*) iz ribnjaka Vojvodine. Pored toga uočene su i histopatološke promene na organima (creva, jetra, bubrezi, škrge i mišići) ribe gajene u ribnjacima koji su cvetali. Posmatrani negativni efekti i akumulacija cijanotoksina u tkivima riba ukazuju da cvetanje toksičnih cijanobakterija u ribnjacima može da utiče na kvalitet ribe, ali i potencijalno da ugrozi zdravlje potrošača. Iz tih razloga preporučeno je da se prati prisustvo cijanobakterija i cijanotoksina u ribnjacima i u tkivima ribe, sa ciljem minimiziranja ili sprečavanja negativnih efekata na životnu sredinu, ekonomiju i ljudsko zdravlje.
4. Cijanotoksini mogu da se akumuliraju u plodovima biljaka za ljudsku upotrebu, koje se zalivaju kontaminiranom vodom u kojoj se nalaze cijanotoksini. Nakon tromesečnog zalivanja biljaka paprike (*Capsicum annuum*) sa ekstraktom *Microcystis aeruginosa* PCC

7806, mikrocistini nisu detektovani u listovima, ali su bili prisutni u plodu paprike i to u vrednostima koje prevazilaze dozvoljene granične vrednosti. Mikrocistini su indukovali oksidativni stres kod izložene eksperimentalne biljke i u velikoj meri uticali na smanjenje njene antioksidantne sposobnosti. Zalivanje biljaka, koje se koriste u ljudskoj ishrani, sa kontaminiranim vodom usled cvetanja može da ima negativne efekte na same biljke ali potencijalno i ljude koji ih konzumiraju.

5. Cijanotoksini su prisutni u ispitivanim suplementima na bazi cijanobakterija koji se prodaju na našem tržištu. Mikrocistini su detektovani u dva testirana suplementa u ishrani pravljenih na bazi spiruline. U jednom suplementu je detektovan MC-LR (3 µg/g), a u drugom njegova dimetilovana forma (1,5 µg/g), u oba slučaja u koncentracijama koje prevazilaze dozvoljene granične vrednosti. Dugotrajna upotreba ovih preparata u velikim količinama takođe može da predstavlja rizik po ljudsko zdravlje, te je njihova kontrola neophodna.
6. Na osnovu dobijenih rezultata stanovnici Republike Srbije mogu da budu izloženi cijanobakterijama i njihovim toksičnim metabolitima, usled čega mogu imati zdravstvene posledice. Iz tog razloga treba uvesti kontrolu cijanobakterija i cijanotoksina, kako u vodenim ekosistemima, tako i u hrani i suplementima, kroz izmene u domaćoj legislativi. Pored kontrole prisustva cijanobakterija i cijanotoksina u vodama Srbije, potrebna je i eliminacija istih. Postoje brojne metode od kojih sve imaju svoje dobre i loše strane. Potrebno je razvijati jednostavne, brze, bezopasne i jeftine metode koje će pomoći u rešavanju ovog problema. Međutim, još važnije je ne dozvoliti da do problema cvetanja i dođe, zato je neophodno posvetiti se merama prevencije eutrofizacije, a samim tim i cvetanja. I u tu svrhu se razvijaju nove metode koje mogu sačuvati vodene ekosisteme. Ali u prvom redu je potrebno podići svest ljudi o problemima do kojih dovodi cvetanje toksičnih cijanobakterija, a ova disertacija je jedan korak u tom važnom procesu.

7. LITERATURA

1. Abdulqader, G., Barsanti, L., Tredici, M.R. (2000): Dihé: an ancient food in a forgotten world. *J. appl. Phycol.* 12.
2. Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A. (1996): Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.* 133:651-658.
3. Acero, J.L., Rodriguez, E., Meriluoto, J. (2005): Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. *Water Res.* 39(8):1628-1638.
4. Ács, A., Kovács, A.W., Csepregi, J.Z., Törő, N., Kiss, G.y., Győri, J., Vehovszky, Á., Kováts, N., Farkas, A. (2013): The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon.* 70:98-106.
5. Adamovsky, O., Kopp, R., Hilscherova, K., Babica, P., Palikova, M., Paskova, V., Navratil, S., Blaha, L. (2007): Microcystin kinetics (bioaccumulation, elimination) and biochemical responses in common carp and silver carp exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environ. Toxicol. & Chem.* 26:2687-2693.
6. Agamy, E. (2013): Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study. *Mar. Environ. Res.* 86:46-55.
7. Al Momani, F. (2007): Degradation of Cyanobacteria Anatoxin-a by Advanced Oxidation Processes. *Sep. Purif. Technol.* 57(1):85-93.
8. Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L., Aro, E.M. (2011): Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 286(27):24007-24014.
9. Alvarca, E., Andrade, M., Dias, E., Sam Bento, F., Batoreu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., Pereira, P. (2009): Morphological and ultrastructural effect of MC-LR from *Microcystis aeruginosa* extracts on a kidney cell line. *Toxicon.* 30:1-12.
10. Anagnostidis, K., Komárek, J. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement.* 80:327-472.
11. Andersen, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z., Holmes, C.F., Kent, M.L., Le Blanc, M., Taylor, F.J., Williams, D.E. (1993): Chemical and biological evidence links microcystins to salmon nepten liver disease. *Toxicon.* 31:1315-1323.
12. Annadotter, H., Cronberg, G., Lawton, L.A., Hansson, H.B., Göthe, U., Skulberg, O.M. (2001): An extensive outbreak of gastroenteritis associated with the toxic cyanobacterium *Planktothrixagardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) in Scania, South Sweden. U: Cyanotoxins, occurrence, causes, consequences. Chorus, I. (editor). Springer, Berlin. 200-208.
13. ANZECC (2000): Water quality guidelines. Section 9.3. Livestock Drinking Water Guidelines. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council. 1-32.
14. Apel, K., Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
15. APHA (1995): Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th edition. Washington, 1995.
16. Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G., Strasburg, G.M. (2000): Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:102-109.

17. Asada, K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141(2):391-396.
18. Azevedo, S.M., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2002): Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. 181-182:441-446.
19. Baganz, D., Staaks, G., Steinberg, C. (1998): Impact of the cyanobacteria toxin, MC-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Water Res.* 3:948-952.
20. Baker, P.D., Humpage, A.R. (1994): Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling Basin, Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 45:773-786.
21. Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S. (2004): Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline rift valley lakes of Kenya - Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *J. Plankton Res.* 26:925-935.
22. 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.
23. Ballot, A., Fastner, J., Wiedner, C. (2010): Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1173-1180.
24. Bandala, E.R., Martinez, D., Martinez, E., Dionysiou, D.D. (2004): Degradation of microcystin-LR toxin by Fenton and Photo-Fenton processes. *Toxicol.* 43(7):829-832.
25. Barica, J., Mathias, J.A. (1979): Oxygen depletion and winterkill risk in small prairie lakes under extended ice cover. *Fish. Res. Board. Can.* 36:980-986.
26. Barica, J. (1984): Empirical models for prediction of algal blooms and collapses, winter oxygen depletion and a freeze-out effect in lakes: Summary and verification. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 22:309-319.
27. Barreto, V., Lira, V., Figueiredo, J., Fittipaldi, H., Jr., Juca, N., Gayotto, L.C., Raposso, F., Barbosa, J., Holmes, C., Cardo, C., Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W. (1996): Caruaru Syndrome a previously undescribed form of acute toxic liver disease in humans caused by microcystinLR with a high lethality rate. *Hepatology* 24 (4 pt 2), 244 (Abstract Am. Assoc. for the Study of Liver Diseases).
28. Barrington, D.J., Ghadouani, A. (2008): Application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria and other phytoplankton from wastewater. *Environ. Sci. and Technol.* 42(23):8916-8921.
29. Barrington, D.J., Ghadouani, A., Ivey, G.N. (2011): Environmental factors and the application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria from waste stabilization ponds. *J. Environ. Eng.* 137(10):952-960.
30. Barrington, D.J., Ghadouani, A., Ivey, G.N., (2013): Cyanobacterial and microcystins dynamics following the application of hydrogen peroxide to waste stabilisation ponds. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 17:2097-2105.
31. Barroin, G., Feuillade, G. (1986): Hydrogen peroxide as a potential algicide for *Oscillatoria rubescens* D.C. *Water Research*. 20(5):619-623.
32. Bartram, J., Carmichael, W.W., Chorus, I., Jones, G., Skulberg, O. (1999): Introduction in toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. New York. Plenum Press. 1-13.
33. Batista, T., de Sousa, G., Strupi Suput, J., Rahmani, R., Suput, D., (2003): Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 65:85-91.

34. Becker, E.W., Venkataraman, L.V. (1980): Production and Processing of Algae in Pilot Plant Scale Experiences of the Indo-German Project. U: Algal Biomass, Production and Use. Shelef, G., Soeder, C.J. (editori). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 35-50.
35. Becker, E.W., Venkataraman, L.V. (1984): Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. Biomass. 4:105.
36. Behm, D. (2003): Coroner cites algae in teen's death. Milwaukee Journal Sentinel. http://www.who.edu/science/B/redtide/notedevents/bluegreen/bluegreen_9-5-03.html
37. Bell, S.G., Codd, G.A. (1994): Cyanobacterial toxins and human health. Rev. Med. Microbiol. 5:256-264.
38. Bell, S.G., Cood, G.A. (1996): Detection, analysis and risk assessment of cyanobacterial toxins. U: Agricultural chemicals and the environment. Hester, R.E., Harrison, R.M. (editori). Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.109-122.
39. Belykh, O.I., Sorokovikova, E.G., Fedorova, G.A., Kaluzhnaya, O.V., Korneva, E.S., Sakirko, M.V., Sherbakova, T.A. (2011): Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). Hydrobiologia. 671(1):241-252.
40. Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., (1999): Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22: 25-34.
41. Berry, J.P., Jaja-Chimedza, A., Dávalos-Lind, L., Lind, O. (2012): Apparent bioaccumulation of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxins by finfish in Lake Catemaco (Veracruz, Mexico). Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 29:314-321.
42. Best, J.H., Eddy, F.B., Codd, G.A. (2001): Effects of purified MC-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevins. Fish Physiol. Biochem. 24:171-178.
43. Blank, C.E., Sanchez-Baracaldo, P. (2010): Timing of morphological and ecological innovation in the cyanobacteria - a key to the understanding of the rise of atmospheric oxygen. Geobiology. 9:495-514.
44. Blaženčić, J. (1998): Sistematika algi. U: Sistematika algi. Doncev, N. (editor). Naučna Knjiga, Beograd, Jugoslavija.
45. Botha, N., Van de Venter, M., Downing, T.G., Shepard, E.G., Gehringer, E.G. (2004): The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. Toxicol. 43:251-254.
46. Bouaicha, N., Maatouk, I., Plessis, M.J., Perin, F. (2005): Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. Environ. Toxicol. 20(3):341-347.
47. Boudet, A.M. (2007): Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry. 68:2722-2735.
48. Bourke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A., Stallman, N.D. (1983): An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. Toxicol. 3:45-48.
49. Bourne, D.G., Blakeley, R.L., Riddles, P., Jones, G.J. (2006): Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in natural water and biologically active slow sand filters. Water Res. 40(6):1294-1302.
50. Brooke, S., Newcombe, G., Nicholson, B., Klass, G. (2006): Decrease in toxicity of microcystins-LA and LR in drinking water by ozonation. Toxicol. 48(8):1054-1059.

51. Buergi, H.R., Stadelmann, P. (2000): Change of phytoplankton diversity during long-term restoration of Lake Baldegg (Switzerland). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27:574-581.
52. Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G., Wright, P.C. (2001): Marine cyanobacteria-A prolific source of natural products. *Tetrahedron.* 57:9347-9377.
53. Burke, W.A., Tester, P.A. (2002): Skin problems related to noninfectious coastal microorganisms. *Dermatol. Ther.* 15:10-17.
54. Bury, N.R., Codd, G.A., Wendelaar Bonga, S.F., Flik, G. (1998): Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na^+/K^+ -ATPase activity. *J. Exp. Biol.* 201:81-89.
55. Byth, S. (1980): Palm Island mystery disease. *Med. J. Aust.*, 2:40-42.
56. Cakmak, I.H. (1992): Marschner Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology.* 98:1222-1227
57. Campos, A., Vasconcelos, V. (2010): Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 11(1):268-287.
58. Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Mitchell, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I. (1996): The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J. Fish Dis.* 19:199-207.
59. Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Grant, P., Mitchell, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I. (1997): A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *J. Fish Dis.* 20:81-91.
60. Cardellina, J.H., Marnier, F.J., Moore, R.E. (1979): Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin-A. *Science.* 204:193-195.
61. Carmichael, W.W., Gorham, P.R., Biggs, D.F. (1977): Two laboratory case studies on oral toxicity to calves of freshwater cyanophyte (blue-green-alga) *Anabaena flos-aquae* Nrc-44-1. *Can. Vet. J.* 18:71-75.
62. Carmichael, W.W., Biggs, D.F., Peterson, M.A. (1979): Pharmacology of anatoxin-a, produced by freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NCR-44-1. *Toxicon.* 17:229-236.
63. Carmichael, W.W., Eschedor, J.T., Patterson, G.M., Moore, R.E. (1988): Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(9):2257-2263.
64. Carmichael, W.W. (1992): Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72(6):445-459.
65. Carmichael, W.W., Falconer, I.R. (1993): Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press. London.
66. Carmichael, W.W. (1994): The toxins of cyanobacteria. *Scientific American.* 170(1):78-86.
67. Carmichael, W.W. (1996): Toxin *Microcystis* and the environment. U: Toxic *Microcystis*. Watanabe M.F., Harda K., Carmichael W.W., Fujii K. (editori). CRC Press. 1-11.

68. Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P., Moczydlowski, E. (1997): Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3104-3110.
69. Carmichael, W.W., Drapeau, C., Anderson, D.M. (2000): Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. and Flah. var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J. Appl. Phycol.* 12:585-595.
70. Carmichael, W.W. (2001): Health effects of toxin-producing cyanobacteria: The CyanoHABs. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 7(5):1393-1407.
71. Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.I., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2001): Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 39:341-344.
72. Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. (1990): *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Letters.* 263:233-236.
73. Castenholz, R.W., Waterbury, J.B. (1989): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 3. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G. (editori). Williams & Wilkins. Baltimore. 1710-1727.
74. Catterall, W. (1980): Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20.
75. 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.). *Toxicol.* 43:393-400.
76. Chen, T., Wang, Q., Cui, J., Yang, W., Shi, Q., Hua, Z., Ji, J., Shen, P. (2005): Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: A combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Mol. Cell. Proteomics.* 4:958-974.
77. Chen, J., Xie, P., Guo, L.G., Zheng, L., Ni, L.Y. (2005a): Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environ. Pollut.* 134:423-430.
78. Chen, J., Xie, P. (2005): Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicol.* 45:615-625.
79. Chen, J., Xie, P. (2005a): Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk for human consumption. *Environ. Toxicol.* 20:572-584.
80. Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L. (2006): Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environ. Pollut.* 144:752-758.
81. Chen, J., Xie, P., Zhang, D., Ke, Z., Yang, H. (2006a): In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture.* 261:1026-1038.
82. Chen, J., Xie, P., Li, L., Xu, J. (2009): First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol. Sci.* 108:81-89.
83. Chen, J., Dai, J., Zhang, H., Wang, C., Zhou, G., Han, Z., Liu, Z. (2010): Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology.* 19:796-803.

84. Chislock, M.F., Sarnelle, O., Jernigan, L.M., Wilson, A.E. (2013): Do high concentrations of microcystin prevent *Daphnia* control of phytoplankton? *Water research*. 47:1961-1970.
85. Chlipala, G.E., Mo, S., Orjala, J. (2011): Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria - a Source for Drug Discovery. *Curr. Drug. Targets*. 12(11):1654-1673.
86. Choi, W.C., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K. (2002): Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay - guided comparison. *Plant Science*. 163:1161-1168.
87. Chorus, I., Bartram, J. (1999): Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, WHO. London, England.
88. Chorus, I., Cavalieri, M. (2000): Cyanobacteria and Algae, U: Monitoring Bathing Waters, Bartram, J., Rees, G. (editori). Taylor and Francis Group, London. 219-271.
89. Chorus, I. (2001): Introduction: Cyanotoxins-research for environmental safety and human health. U: Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences. Chorus I. (editor). Springer-Verlag, Berlin.
90. Chorus, I. (2005): Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt), Dessau-Roßlau, Germany.
91. Chorus, I. (2012): Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt), Dessau-Roßlau, Germany.
92. Ciferri, O. (1983): *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Revs*. 47: 551-578.
93. Cifferi, O., Tiboni, O., Sanangelantoni, A.M. (1989): The genetic manipulation of cyanobacteria and its potential uses. U: Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Cresswell, R.C., Rees, T.A.V., Shah, N. (editori). Longman Scientific & Technical, Essex, England. 239-262.
94. Clark, S.P., Davis, M.A., Ryan, T.P., Searfoss, G.H., Hooser, S.B. (2007): Hepatic gene expression changes in mice associated with prolonged sublethal microcystin exposure. *Toxicol. Pathol*. 35(4):594-605.
95. Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P. (1989): Cyanobacterial toxins in water. *Wat. Sci. Technol*. 21:1-13.
96. Codd, G.A., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K.A., Metcalf, J.S. (1999): Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol*. 34:405-415.
97. Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A. (1999a): Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*. 37:1181-1185.
98. Codd, G.A. (2000): Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*. 16:51-60.
99. Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. (2005): Cyanobacterial Toxins: Risk Management for Health Protection. *Toxicol. Appl. Pharm*. 203(3):264-272
100. Cohen, P. (1989): The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem*. 58:453-508.
101. Cooper, W.J., Zika, R.G. (1983): Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science*. 220(4598):711-712.
102. Cornish, B.J.P.A., Lawton, L.A., Robertson, P.K.J. (2000): Hydrogen peroxide enhanced photocatalytic oxidation of microcystin-LR using titanium dioxide. *Appl. Catal., B*. 25(1):59-67.

103. Crittenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J., Tchobanoglous, G. (2005): Water treatment: Principles and design. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
104. Cronberg, G., Lindmark, G., Björk, S. (1988): Mass development of the flagellate *Gonyostomum semen* (Raphidophyta) in Swedish forest lakes-an effect of acidification? *Hydrobiologia*. 161:217-236.
105. Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M., Nichols, S.N. (2008): Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ. Toxicol.* 23:246-252.
106. Cvijan, M., Fužinato, S. (2011): The first finding of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszińska) Seenayya et Subba Raju 1972 (Cyanoprokaryota) in Serbia. *Archives of Biological Science*. 63:507-510.
107. Cvijan, M., Fužinato, S. (2012): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota)-potential invasive and toxic species in Serbia. *Botanica Serbica*. 36:3-8.
108. Czarnecki, O., Henning, M., Lippert, I., Welker, M. (2006): Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environ. Microbiol.* 8:77-87.
109. Ćirić, M., Marković, Z., Dulić, Z., Subakov-Simić, G. (2010): First report of cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from carp ponds in Serbia. U: The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8). Istanbul, Turkey. 14.
110. Čađo, S., Đurković, A., Miletić, A., Andrejević, S., Maljević, E. (2004): Results on phytoplankton analysis and trophy state of Krajkovac reservoir. U: Konferencija o aktuelnim problemima zaštite voda „Zaštita voda 04“. Borsko jezero. 217-222.
111. Čomić, Lj., Ranković, B. (1991): Changes in bacteria population and phytoplankton and their relationships in accumulative Lake Gruža. U: Evolution of freshwater lakes. Burchardt, L. (editor). Adam Mickijevicz Univ. Press, Poznan, Seria biologia, NR 46, II, 129-139.
112. Dabholkar, A.S., Carmichael, W.W. (1987): Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. *Toxicon*. 25:285-292.
113. Davis, P.A., Dent, M., Parker, J., Reynolds, C.S., Walsby, A.E. (2003): The annual cycle of growth rate and biomass change in *Planktothrix* spp. in Blelham Tarn, English Lake District. *Freshw. Biol.* 48:852-867.
114. Dawson, R.M. (1998): The toxicology of microcystins. *Toxicon*. 36:953-962.
115. Deblois, C.P., Aranda-Rodriguez, R., Giani, A., Bird, D.F. (2008): Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon*. 51:435-448.
116. Denić, Lj., Čađo, S., Đurković, A., Novaković, B., Stojanović, Z., Andrejević, S. i Glišić-Dopuđa, T. (2014): Status jezera i akumulacija u 2012. godini. Agencija za zaštitu životne sredine. Ministarstvo energetike, razvoja i zaštite životne sredine. Beograd.
117. Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., Luckas, B. (2006): Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *European Food Research and Technology*. 224:147-151.
118. Dietrich, D., Hoeger, S. (2005): Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203:273-289.
119. Dillenberg, H.O., Dehnel, M.K. (1960): Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can. Med. Assoc. J.* 83:1151-1154.

120. Ding, X.S., Li, X.Y., Duan, H.Y., Chung, I.K., Lee, J.A. (2006): Toxic effects of microcystis cell extracts on the reproductive system of male mice. *Toxicon*. 48:973-979.
121. Dokulil, M.T., Jagsch, A. (1992): The effects of reduced phosphorus and nitrogen loading on phytoplankton in Mondsee, Austria. *Hydrobiologia*. 243:389-394.
122. Dong, G.F., Zhu, X.M., Han, D., Yang, Y.X., Song, L.R., Xie, S.Q. (2009): Effects of dietary cyanobacteria of two different sources on growth and recovery of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Toxicon*. 54(3):208-216.
123. Drábková, M., Admiraal, W., Maršálek, B. (2007): Combined exposure to hydrogen peroxide and light: selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environ. Sci. Technol.* 41(1):309-314.
124. Drábková, M., Matthijs, H.C.P., Admiraal, W., Maršálek, B. (2007a): Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis. *Photosynthetica*. 45(3):363-369.
125. Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C. (2001): Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food. Addit. Contam.* 18:525-531.
126. Drikas, M., Chow, C.W.K., House, J., Burch, M.D. (2001): Using coagulation, flocculation, and settling to remove toxic cyanobacteria. *J. Am. Water. Works. Assoc.* 93(2):100-111.
127. Drobac, D. (2009): Rizični faktori primarnog kancera jetre u centralnoj Srbiji. Master rad, Univerzitet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
128. Drobac, D., Svirčev, Z., Tokodi, N., Vidović, M., Baltić, V., Božić-Krstić, V., Lazić, D., Pavlica, T. (2011): Microcystins - potential risk factors in carcinogenesis of primary liver cancer in Serbia. *Geographica Pannonica*. 15:70-80.
129. Drobac, D. (2011a): Efekti cijanobakterija i njihovih toksina na ribe u eksperimentalnim uslovima (*in vitro*). Master rad, Univerzitet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
130. Drobac, D., Tokodi, N., Pantelić, D., Krstić, K. (2011b): The health risk assesment related to cyanotoxin exposure. 16th Academy of Studenica: Cyanobacteria and human health. Novi Sad, July 1-3. Abstract book: 13.
131. Drobac, D., Tokodi, N., Simeunović, J., Baltić, V., Stanić, D., Svirčev, Z. (2013): Human exposure to cyanotoxins and their health effects. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 64(2):305-316.
132. Drobac, D., Tokodi, N., Dulić, T., Svirčev, Z. (2013a): Nutritional aspects of Daphnia feeding with cyanobacteria. 17th International Eco-Conference, 10th Environmental protection of urban and suburban settlements. 25th- 28th Septembar, Novi Sad, Srbija.
133. Dubovik, I.E. (2002): Migration of aerophytic algae and their colonization on different substrata. *Int. J. Algae*. 4:48-55.
134. Đukić, N., Pujin, V., Maletin, S., Gajin, S., Gantar, M., Petrović, O., Ratajac, R., Seleši, Đ., Matavulj, M. (1991). Lentic waters eutrophication in Vojvodina - Part I "Borkovac". U: Zbornik radova Instituta za biologiju. 31:4-6.
135. Đukić, N., Pujin, V., Maletin, S., Gajin, S., Gantar, M., Petrović, O., Ratajac, R., Seleši, Đ., Matavulj, M. (1991a). Lentic waters eutrophication in Vojvodina - Part I "Zobnatica". U: Zbornik radova Instituta za biologiju. 31:39-40.
136. Đukić, D.A., Gajin, S., Matavulj, M., Mandić, L. (2000): Mikrobiologija voda. Prosveta-Beograd.
137. Edmondson, W.T. (1970): Phosphorus, nitrogen, and algae in Lake Washington after diversion of sewage. *Science*. 169:690-691.

138. Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A. (1992): Identification of anatoxin- A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*. 30:1165-1175.
139. El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., El Ghazali, I., Saqrane, S., Vasconcelos, V., Oudra, B. (2011): Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-rhizobia symbiosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:431-438.
140. El Saadi, O., Esterman, A.J., Cameron, S., Roder, D.M. (1995): Murray River water, raised cyanobacterial cell counts, and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med. J. Australia*. 162:122-125.
141. Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A., Kujari, H.P., Osterlund, K., Fagerlund, K., Hällbom, L. (1988): Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon*. 26(2):161-166.
142. Ernst, B., Hitzfeld, B., Dietrich, D. (2001): Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environ. Toxicol.* 16:483-488.
143. Evans, M.H. (1969): Mechanism of saxitoxin and tetrodotoxin poisoning. *Br. Med. Bull.* 25:263-267.
144. Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L., Lurling, M. (2012): First report of (homo) anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon*. 60(3):378-384.
145. Falconer, I.R., Beresford, A.M., Runnegar, M.T.C. (1983): Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust.* 1:511-514.
146. Falconer, I.R., Smith, J.V., Jackson, A.R., Jones, A., Runnegar, M.T. (1988): Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *J. Toxicol. Environ. Health*. 24:291-305.
147. Falconer, I.R., Buckley, T.H. (1989): Tumour promotion by *Microcystis* sp., a blue green alga occurring in water supplies. *Med. J. Aust.* 150:351.
148. Falconer, I.R. (1991): Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 6(2):177-184.
149. Falconer, I.R., Yeung, S.K. (1992): Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.* 81:181-196.
150. Falconer, I.R., Dornbusch, M., Moran, G., Yeung, S.K. (1992): Effects of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from chicken small intestine. *Toxicon*. 30:790-793.
151. Falconer, I.R., Humpage, A.R. (1996): Tumor promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*. 35(6):74-79.
152. Falconer, I.R. (1998): Algal Toxins and Human Health. U: The Handbook of Environmental Chemistry 5. Part C Quality and Treatment of Drinking Water II. Hrubec, J. (editor). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 53-82.
153. Falconer, I.R. (1999): An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicol.* 14:5-12.
154. Falconer, I.R. (2005): Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33(1):64-71.
155. Faltermann, S., Zucchi, S., Kohler, E., Blom, J.F., Pernthaler, J., Fent, K. (2014): Molecular effects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms: global transcriptome analysis in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 149:33-39.

156. Farrar, W.V. (1966): Tecuitlatl: A glimpse of aztec food technology. *Nature*. 5047:341-342.
157. Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus I. (1999): Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environ. Toxicol.* 14:13-22.
158. Fawell, J., James, C., James, H. (1994): Toxins from Blue-Green Algae: Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for Its Determination in Water. Marlow: Water Research Centre.
159. Felföldy, L. (1980): A biológiai vizminőség. U: Javitott és bővített kiadás, vízügyi hydrobiológia. 3(3):1-263.
160. Fernandes, M.N., Mazon, A.F., (2003): Environmental pollution and fish gill morphology. U: Fish Adaptation. Val, A.L., Kapoor, B.G. (editori). Science Publishers, Enfield. 203-231.
161. Ferreira, F.M.B., Soler, J.M.F., Fidalgo, M.L., Fernandez-Vila, P. (2001): PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon*. 39:757-761.
162. Ferreira, M.F.N., Oliveira, V.M., Oliveira, R., da Cunha, P.V., Grisolia, C.K., Junior, O.R.P. (2010): Histopathological effects of [D-Leu¹] Microcystin-LR variants on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). *Toxicon*. 55:1255-1262.
163. Feuillade, M., Feuillade, J., Pelletier, J.P. (1992): Photosynthate partitioning in phytoplankton dominated by the cyanobacterium *Oscillatoria rubescens*. *Arch. Hydrobiol.* 125:441-461.
164. Feuillade, J. (1994): The cyanobacterium (blue-green alga) *Oscillatoria rubescens* D.C. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 41:77-93.
165. Feuillade, M., Druart, J.C. (1994): The long-term effect of the sewage diversion on the phytoplankton composition and biomass. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 41:55-76.
166. Feurstein, D., Holst, K., Fischer, A., Dietrich, D.R. (2009): OATP-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234:247-255.
167. Fewer, D.P., Köykkä, M., Halinen, K., Jokela, J., Lyra, C., Sivonen, K. (2009): Culture-independent evidence for the persistent presence and genetic diversity of microcystin-producing *Anabaena* (Cyanobacteria) in the Gulf of Finland. *Environ. Microbiol.* 11(4):855-66.
168. Fischer, W.J., Dietrich, D.R. (2000): Pathological and biochemical characterization of MC-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16:73-81.
169. Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., (2005): Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203(3):257-263.
170. Fitzgeorge, R.B., Clark, S.A., Keevil, C.W. (1994): Routes of intoxication. U: Detection Methods for Cyanobacterial Toxins. Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W., Potter, E., (editori). The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 69-74.
171. Fleming, L., Rivero, C., Burns, J., Williams, C., Beana, J., Shea, K., Stinn, J. (2002): Bluegreen algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae*. 1:157-168.
172. Foy, R.H., Gibson, C.E., Smith, R.V. (1976): The influence of daylength, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. *Br. Phycol. J.* 11:151-163.
173. Francis, G. (1878): Poisonous Australian lake. *Nature*. 18:11-12

174. Fu, W.Y., Xu, L.H., Yu, Y.N. (2005): Proteomic analyses of cellular response to microcystin in human amnion FL cells. *J. Proteome. Res.* 4:2207-2215.
175. Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Kanazawa, H., Sugimura, T., Manam, S., Kahn, S.M., Jiang, W., Hoshina, S., Weinstein, I.B. (1989): Codon 61 mutations in the c-Harvey-ras gene in mouse skin tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene plus okadaic acid class tumor promoters. *Mol. Carcinog.* 2(4):184-187.
176. Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Nakayasu, M., Ojika, M., Yamada, K., Yasumoto, T., Moore, R.E., Sugimura, T. (1990): New tumor promoters from marine natural products. U: *Marine Toxins, Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, Vol. 418. Hall, S., Strichartz, G. (editori). American Chemical Society, Washington D.C. 232-240.
177. Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M.L., Gyori, J., Farkas, A., Vehovszky, A., Bánfalvi, G. (2009): Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicol. In Vitro.* 23(4):710-718.
178. Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N., Zambirano, F. (1994): Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon.* 32(1):121-127.
179. Galat, D.L., Verdin, J.P., Sims, L.L. (1990): Large-scale patterns of *Nodularia spumigena* blooms in Pyramid Lake, Nevada, determined from Landsat imagery: 1972-1986. *Hydrobiologia.* 197:147-164.
180. Galvao, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira Mdo, C., Gouvea-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P. (2009): Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicon.* 54(6):891-894.
181. Gan, N., Sun, X., Song, L. (2010): Activation of Nrf2 by microcystin-LR provides advantages for liver cancer cell growth. *Chem. Res. Toxicol.* 23:1477-1484.
182. Gantar, M. (1985): Masovno gajenje mikroalgi, očekivanja i mogućnosti. *Mikrobiologija.* 21(1):63-73.
183. Gantar, M., Gajin, S., Obreht (Svirčev) Z. (1995): Possibilities and perspectives of microalgae application in biotechnology. *Mikrobiologija.* 32:29-43.
184. Gantar, M., Sekar, R., Richardson, L.L. (2009): Cyanotoxins from black band disease of corals and from other coral reef environments. *Microb. Ecol.* 58(4):856-864.
185. Gao, K. (1998): Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *J. appl. Phycol.* 10:37-49.
186. Gao, B., Hagenbuch, B., Kullak-Ublick, G.A., Benke, D., Aguzzi, A., Meier, P.J. (2000): Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:73-79.
187. Garibaldi, L., Buzzi, F., Morabito, G., Salmaso, N., Simona, M. (2000): I cianobatteri fitoplanctonici dei laghi profondi dell'Italia Settentrionale. *Atti Workshop "Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane"*, Roma, 16-17 decembar 1999. *Rapporti ISTISAN.* 00/30:117-135.
188. Gaudin, J., Huet, S., Jarry, G., Fessard, V. (2008): In vivo DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of intra-peritoneal and oral administration by use of the comet assay. *Mutat. Res.* 652:65-71.
189. Ghosh, S., Khan, S.A., Wickstrom, M., Beasley, V. (1995): Effects of microcystin-LR on actin and the actin-associated proteins alpha-actinin and talin in hepatocytes. *Nat. Toxins.* 3(6):405-414.

190. Gijsbertsen-Abrahamse, A.J., Schmidt, W., Chorus, I., Heijman, S.G.J. (2006): Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. *J. Membr. Sci.* 276(1-2):252-259.
191. Gilroy, D.J., Kauffman, K.W., Hall, R.A., Huang, X., Chu, F.S. (2000): Assessing potential health risks from microcystin toxins in bluegreen algae dietary supplements. *Environ. Health. Perspect.* 108:435-439.
192. Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F. (2002): Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol. Biochem.* 40:471-478.
193. Grašić, S., Vasiljević, B., Marković, B., Nikolić, G., Tadić, S., Jovanović, B. (2004): Cyanobacterial blooming in Čelije reservoir. U: Konferencija o aktuelnim problemima zaštite voda „Zaštita voda 04“. Borsko jezero. 207-212.
194. Grauer, F.H., Arnold, H.L. (1961): Seaweed dermatitis: first report of dermatitis-producing marine algae. *Arch. Dermatol.* 84:720-732.
195. Grutzmacher, G., Bottcher, G., Chorus, I., Bartel, H. (2002): Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environ. Toxicol.* 17(4):386-394.
196. Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C., Bernard, C. (2005): First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon.* 45:919-928.
197. Gunn, G.J., Rafferty, A.G., Rafferty, G.C., Cockburn, N., Edwards, C., Beattie, K.A., Codd, G.A. (1992): Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (cyanobacteria). *Vet. Rec.* 130:301-302.
198. Gupta, U.S., Guha, S. (2006): Microcystin toxicity in a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Current Science.* 91(9):1261-1271.
199. Gustafsson, S., Hansson, L.A. (2004): Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology.* 38:37-44.
200. Hagenbuch, B., Gao, B., Meier, P.J. (2002): Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News. Physiol. Sci.* 17:231-234.
201. Hagenbuch, B., Meier, P.J. (2003): The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1609:1-18.
202. Hairston, N.G., Jr Holtmeier, C.L., Lampert, W., Weider, L.J., Post, D.M., Fischer, J.M., Cáceres, C.E., Fox, J.A., Gaedke, U. (2001): Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: Evolution of phenotypic plasticity? *Evolution.* 55:2203-2214.
203. Halinen, K., Jokela, J., Fewer, D.P., Wahlsten, M., Sivonen, K. (2007): Direct evidence for production of microcystins by *Anabaena* strains from the Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(20):6543-6550.
204. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007): Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press Inc., New York.
205. Halstvedt, C.B., Rohrlack, T., Andersen, T., Skulberg, O., Edvardsen, B. (2007): Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. *J. of Plankton Res.* 29(5):471-482.
206. Harada, K.I., Tsuji, K., Watanabe, M.F., Kondo, F. (1996): Stability of microcystins from cyanobacteria: III. Effect of pH and temperature. *Phycologia.* 35:83-88.
207. Harada, K.I., Tsuji, K. (1998): Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17:385-403.

208. Harada, K., Kondo, F., Lawton, L. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chapter 13. Laboratory analysis of cyanotoxins. Chorus, I., Bartram J. (editori). SZO
209. Hardy, J. (2011): Washington State provisional recreational guidance for cylindrospermopsin and saxitoxin. Washington State Department of Health, Washington.
210. Hashimoto, E.H., Kamogae, M., Vanzella, T.P., Cólus, I.M.S., Bracarense, A.P.F.R.L., Bittencourt-Oliveira, M.C., Itano, E., Kuroda, E.K., Kato, H., Nagata, S., Ueno, Y., Harada, K.I., Hirooka, E.Y. (2012): Biomonitoring of microcystin and aflatoxin co-occurrence in aquaculture using immunohistochemistry and genotoxicity assays. Braz. Arch. Boil. Technol. 55(1):151-159.
211. Haslouer, S.G. (1979): Natural and pollution-caused fish kills in Kansas during 1978. Trans. Kans. Acad. Sci. 82:197-204.
212. 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*. Ecotoxicol. Environ. Safety. 87:49-56.
213. Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R. (1985): Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-greenalga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolozynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Env. Microbiol. 50:1292-1295.
214. Hawser, S.P., Codd, G.A., Capone, D.G., Carpenter, E.J. (1991): A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. Toxicon. 29:277-278.
215. He, Y.Y., Häder, D.P. (2002): UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: Protective effects of ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine. J. Photochem. Photobiol. B. 66:115-124
216. Helman, Y., Tchernov, D., Reinhold, L., Shibata, M., Ogawa, T., Schwarz, R., Ohad, I., Kaplan, A. (2003): Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. Current Biology. 13(3):230-235.
217. Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., Kaplan, A. (2005): Fractionation of the three stable oxygen isotopes by oxygen-producing and oxygen-consuming reactions in photosynthetic organisms. Plant Physiology. 138(4):2292-2298.
218. Herrero, A., Flores, E. (2008): The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution. Caister Academic Press.
219. Heresztyn, T., Nicholson, B.C. (1997): Nodularin concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. Environ. Toxicol. Water. Qual.12:273-282.
220. Hernandez, J.M., Lopez-Rodas, V., Costas, E. (2009): Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: A risk intensified by global change. Med. Hypotheses.72:539-540.
221. Hiraga, A., Tamura, S. (2000): Protein phosphatase 2A is associated in an inactive state with microtubules through 2A-1- specific interaction with tubuline. Biochem. J. 346(2):433-439.
222. Ho, L., Onstad, G., v Gunten, U., Rinck-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G. (2006): Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. Water Res. 40(6): 1200-1209.

223. Hoeger, S.J., Dietrich, D.R. (2004): Possible health risks arising from consumption of blue-green algae food supplements. Sixth International Conference on Toxic Cyanobacteria; 21-27 Jun. Bergen, Norway. Abstrakt. 30.
224. Hoeger, S.J., Shaw, G., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R. (2004): Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon*. 43(6):639-649.
225. Hoeger, S.J., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R. (2005): Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203:231-242.
226. Hoff-Risetti, C., Dorr, F.A., Schaker, P.D.C., Pinto, E., Werner, V.R., Fiore, M.F. (2013): *Cylindrospermopsin* and *Saxitoxin Synthetase* Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. *PLoS ONE*. 8(8): e74238.
227. Hoffman, D.J., Ratter, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. (2003): *Handbook of ecotoxicology*. Lewis Publishers.
228. Hohls, B.C., Kuhn, A.L. (2001): *Field guide to fish kill assessments*. Institute for Water Quality Studies, Department of Water Affairs and Forestry, Pretoria, South Africa.
229. Holland, A., Kinnear, S. (2013): Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide?. *Marine Drugs*. 11(7):2239-2258.
230. Holt, J.G. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.
231. Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, A.L. (1990): Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 265:19401-19404.
232. Honkanen, R.E., Dukelow, M., Zwiller, J., Moore, R.E., Khatra, B.S., Boynton, A.L. (1991): Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Mol. Pharmacol.* 40(4):577-583.
233. Hooser, S.B. (2000): Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.* 28(5):726-733.
234. Hoppe, H.A. (1979): *Marine algae and their products and constituents in pharmacy*. U: *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Hoppe, H.A., Levring, T., Tanaka, Y. (editori). Walter de Gruyter Pubs, New York. 25-119.
235. Huang, H., Xiao, X., Ghadouani, A., Wu, J., Nie, Z., Peng, C., Xu, X., Shi, J. (2015): Effects of Natural Flavonoids on Photosynthetic Activity and Cell Integrity in *Microcystis aeruginosa*. *Toxins*. 7:66-80.
236. Huber-Pestalozzi, G., Komárek, J., Fott, B. (1983): *Das Phytoplankton des Süßwassers*. Band XVI, 7. Teil, 1. Hälfte. Chlorophyceae, Ordnung: Chlorococcales. U: *Die Binnengewässer*. Elster, H.-J., Ohle, W. (editori). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart. 1044.
237. Humpage, A.R., Rositano, J.A.B., Brown, R., Baker, P., Nicholson, B.C., Steffensen, D.A. (1994). Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 45:761-771.
238. Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R. (2000): Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research*. 472(1-2):155-161.
239. Humpage, A.R., Hardy, S.J., Moore, E.J., Frosco, S.M., Falconer, I.R. (2000a): Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J. Toxicol. Environ. Health. A*. 61:155-165.

240. Humpage, A. (2008): Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619.
241. Ibelings, B.W., Bruning, K., de Jonge, J., Wolfstein, K., Pires, L.D.M. (2005): Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microb. Ecol.* 49(4):487-500.
242. Ibelings, B.W., Havens, K.E. (2008): Cyanobacterial toxins: a qualitative meta-analysis of concentrations, dosage and effects in freshwater, estuarine and marine biota. U: *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs*, Vol. 619. 37-48.
243. Institut za javno zdravlje, Subotica (2013): Monitoring kvaliteta vode jezera Palić i Ludaš i potoka Kereš u 2012. godini. Godišnji izveštaj.
244. ISO (2005): Water Quality: Determination of microcystins - method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. ISO, Geneva, Switzerland (ISO 20179:2005).
245. Ito, E., Kondo, F., Terao, K., Harada, K.I. (1997): Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon.* 35:1453-1457.
246. Ito, E., Kondo, F., Harada, K. (1997a): Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon.* 35(2):231-239.
247. Ito, E., Kondo, F., Harada, K. (2001): Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. *Toxicon.* 39(2-3):265-271.
248. Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., Harada, K. (2002): Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon.* 40(7):1017-1025.
249. Ivanc, A., Miljanović, B. (2003): Hidroakumulacije. Monografija. Departman za biologiju i ekologiju. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
250. Iwasa, M., Yamamoto, M., Tanaka, Y., Kaito, M., Adachi, Y. (2002): Spirulina-associated hepatotoxicity. *Am. J. Gastroenterol.* 97:3212-3213.
251. Izaguirre, G., Jungblut, A.D., Neilan, B.A. (2007): Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Water Res.* 41(2):492-498.
252. Izveštaj o terenskim merenjima kvaliteta vode akumulacije Vrutci u toku cvetanja cijanobakterije *Planktothrix rubescens* (2014): JKP Vodovod Užice i Univerzitet u Beogradu Građevinski fakultet Institut za hidrotehniku i vodno ekološko inženjerstvo Beograd. (Foto: Ivetić)
253. Izveštaj Svetske Banke DM 4307 (2011): Introducing Daphnia grazing to control global warming - associated cyanobacterial toxic blooms in fishing pond.
254. Jacquet, C., Thermes, V., de Luze, A., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J-S., Bourrat, F., Edery, M. (2004): Effects of MC-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon.* 43:141-147.
255. Jacquet, S., Briand, J.F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.C., Anneville, O., Humbert, J.F. (2005): The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae.* 4:651-672.
256. James, H., Fawell, J. (1991): Detection and removal of cyanobacterial toxins from freshwaters. FR 0211 Foundation for Water Research, Marlow.
257. Jang, M.H., Ha, K., Lucas, M.C., Joo, G-J, Takamura, N. (2004): Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquat. Toxicol.* 68:51-59.

258. Jang, M.H., Jung, J.M., Takamura, N. (2007): Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and inorganic concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 52(4):1454-1466.
259. Jarvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spoof, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E., Meriluoto, J. (2007): Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicol.* 49:865-874.
260. Jensen, G.S., Ginsberg, D.I., Drapeau, C. (2001): Blue-green algae as an immunoenhancer and biomodulator. *JANA.* 3:24-30.
261. Jiang, J., Gu, X., Song, R., Zhang, Q., Geng, J., Wang, X., Tang, L. (2011): Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology.* 20:1000-1009.
262. Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, E.A., Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R. (1998): Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338(13):873-879.
263. Jovin, V., (2007): Cvetanje voda u slatkovodnim ekosistemima: uzroci, posledice i sanacija; Diplomski rad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad.
264. Jungmann, D. (1992): Toxic compounds isolated from microcystis Pcc7806 that are more active against daphnia than 2 microcystins, *Limnol. Oceanogr.* 37:1777-1783.
265. Junshi, C., Campbell, T.C., Junyao, L., Peto, R. (1990): Diet, Life Style and Mortality in China. Oxford University Press, Oxford, England.
266. Kaebernick, M., Neilan, B.A. (2001): Ecological and Molecular Investigations of Cyanotoxin Production. *FEMS Microbiology Ecology.* 35(1):1-9.
267. Kagalou, I., Papadimitriou, T., Bacopoulos, V., Leonardos, I. (2008): Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. *Environ. Monit. Assess.* 137(1-3):185-195.
268. Kalifatić, V., Obušković, Lj., Živković, A. (1982): A contribution to phytoplankton studies of some waters in North Banat. *Archiv of Biological Sciences.* 34:89-101.
269. Kann, J., Smith, V.H. (1999): Estimating the probability of exceeding elevated pH values critical to fish populations in a hypereutrophic lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56:2262-2270.
270. Kao, C.Y., Levinson, S.R. (1986): Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium Channel. Vol. 479, The New York Academy of Science, New York, USA.
271. Kao, C.Y. (1993): Paralytic shellfish poisoning. U: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Falconer, I.R. (editor). Academic Press, London, UK. 75-86.
272. Karadžić, V., Subakov-Simić, G., Krizmanić, J., Natić, D. (2010): Phytoplankton and eutrophication development in the water supply reservoirs Garaši and Bukulja (Serbia). *Desalination.* 255:91-96.
273. Karadžić, V. (2011): Eutrofikacija i njene posledice na primeru reke Ponjavice (opština Pančevo). Doktorska disertacija, Beogradski Univerzitet, Beograd, Srbija.
274. Karadžić, V., Subakov Simić, G., Natić, D., Ržaničanin, A., Ćirić, M., Gačić, Z. (2013): Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia.* 711(1):43-60.

275. Karjalainen, M., Pääkkönen, J.P., Peltonen, H., Sipiä, V., Valtonen, T., Viitasalo, M. (2008): Nodularin Concentrations in Baltic Sea Zooplankton i Fish during a Cyanobacterial Bloom. *Marine Biology*. 155(5):483-491.
276. Ke, Z.H., Xie, P., Guo, L.G. (2009): Impact of two biomanipulation fishes stocked in a large pen on the plankton abundance and water quality during a period of phytoplankton seasonal succession. *Ecological Engineering*. 35(11):1610-1618.
277. Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A. (2008): Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4044-4053.
278. Kenefick, S.L., Hrudey, S.E., Peterson, H.G., Prepas, E.E. (1993): Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Science and Technology*. 27(3-4):433-440.
279. Keshavanath, P., Bevrige, M.C.M., Baird, D.J., Lawton, L.A., Nimmo, A., Codd, G.A. (1994): The functional grazing response of a phytoplankton fish *Oreochromis niloticus* to mixture of toxic and nontoxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Fish. Biol.* 45:123-129.
280. Kiss, T., Vehovszky, Á., Hiripi, L., Kovács, A., Vörös, L. (2002): Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurons. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131(2):167-176.
281. Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemela, S.I. (1991): Detection of toxicity of cyanobacteria by *A. salina* bioassay. *Environmental Toxicol. Water Quality*. 6:423-436.
282. Klemer, A.R. (1976): The vertical distribution of *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix*. *Arch. Hydrobiol.* 78:343-362.
283. 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. *Environ. Sci. Poll. Res.* 20:5243-5264.
284. Komárek, J., Anagnostidis, K., (1992): Cyanoprokariota, 1. Teil: Chroococcales. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
285. Komárek, J., Anagnostidis, K. (2005): Cyanoprocaryota 2. Teil: Oscillatoriales. U: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M. (editori): Süßwasserflora von Mitteleuropa, Spektrum Akademischer Verlag. 759.
286. Komatsu, M., Furukawa, M., Ikeda, R., Takumi, S., Nong, Q.Q., Aoyama, K., Akiyama, S., Keppler, D., Takeuchi, T. (2007): Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicol. Sci.* 97:407-416.
287. Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K., Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M. (1992): Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* 5:591-596.
288. Konopka, A. (1982): Buoyancy regulation and vertical migration by *Oscillatoria rubescens* in Crooked Lake, Indiana. *Br. Phycol. J.* 17:427-442.
289. Konopka, A.E., Klemer A.R., Walsby, A.E., Ibelings, B.W. (1993): Effects of macronutrients upon buoyancy regulation by metalimnetic *Oscillatoria agardhii* in Deming Lake, Minnesota. *J. Plankton Res.* 15:1019-1034.
290. Kós, P., Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G. (1995): Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal. Biochem.* 225:49-53.

291. Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1986): Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. U: Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (editori). Band 2/1. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena. 876.
292. Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1988): Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. U: Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (editori). Band 2/2. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena. 596.
293. Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1991): Bacillariophyceae. 2. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, Achnantheaceae. U: Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (editori). Band 2/3. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena. 576.
294. Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S. (2003): Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. FEMS Microbiol. Ecol. 43:141-148.
295. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C. (2007): Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Physiol. Biochem. 45:244-249.
296. Kuiper-Goodman, T., Falconer, I.R., Fitzgerald, J. (1999): Human health aspects. E&FN Spon, London. 113-153.
297. Kurki-Helasma, K., Meriluoto, J. (1998): Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. Toxicon. 36:1921-1926.
298. La, V.T., Cooke, S.J. (2011): Advancing the science and practice of fish kill investigations. Rev. Fish. Sci. 19(1):21-33.
299. 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.
300. Lahrouni, M., Oufdou, K., El Khalloufi, F., Baz, M., Lafuente Dary, A., Pajuelo, M., Oudra, B. (2013): Physiological and biochemical defense reactions of *Vicia faba* L.–*Rhizobium* E., symbiosis face to chronic exposure to cyanobacterial bloom extract containing microcystins. Environ. Sci. Pollut. Res. 20:5405-5415.
301. Lahti, K., Rapala, J., Kivimäki, A.-L., Kukkonen, J., Niemela, M., Sivonen, K. (2001): Occurrence of microcystins in raw water sources and treated drinking water of Finnish waterworks. Water Sci. Technol. 43(12):225-228.
302. Lam, A.K.Y., Prepas, E.E., Spink, D., Hrudey, S.E. (1995): Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: Implications for human health. Wat. Res. 29(8):1845-1854.
303. Latifi, A., Ruiz, M., Zhang, C.C. (2009): Oxidative stress in cyanobacteria. FEMS Microbiology Reviews. 33(2):258-278.
304. Lawrence, J.F., Niedzwiadek, B., Menard, C., Lau, B.P., Lewis, D., Kuiper-Goodman, T., Carbone, S., Holmes, C. (2001): Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. J. AOAC Int. 84:1035-1044.
305. Lawton, L.A., Robertson, P.K.J., Cornish, B.J.P.A., Jaspars, M. (1999): Detoxification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) using TiO₂ photocatalytic oxidation. Environ. Sci. Technol. 33(5):771-775.
306. Lee, J-W., Choi, D-Y., Kwak, D-H., Jung, H-J., Shim, W-S., Moon, H. (2005): Adsorption dynamics of water vapor on activated carbon. Adsorption. 11(suppl 1):437-441.

307. Lee, J-W., Walker, H. (2006): Effect of process variables and natural organic matter on removal of microcystin-LR by PAC-UF. *Environ. Sci. Technol.* 40(23):7336-7342.
308. Legnani, E., Copetti, D., Oggioni, A., Tartari, G., Palumbo, M.T., Morabito, G., (2005): *Planktothrix rubescens*' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy). *J. Limnol.* 64(1):61-73.
309. 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.
310. Leong, T.Y., Leong, A.S. (2005): Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *HPB Oxford.* 7(1):5-15.
311. Lepistö, L., Lakti, K., Niemi, J. (1994): Removal of cyanobacteria and other phytoplankton in four Finnish waterworks. *Algolog. Stud.* 75:167-181.
312. Lewin, R. (1979): Formal Taxonomic Treatment of Cyanophytes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29(4):411-412.
313. Li, D-M., Qi, Y-Z. (1997): *Spirulina* industry in China: Present status and future prospects. *J. appl. Phycol.* 9:25-28.
314. Li, H., Xie, P., Li, G.Y., Hao, L., Xiong, Q. (2009): In vivo study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins. *Toxicol.* 53:169-175.
315. Li, X.Y., Liu, Y.D., Song, L.R. (2001): Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environmental Toxicology.* 16:517-522.
316. Li, X.Y., Liu, Y.D., Song, L.R., Liu, J. (2003): Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of MC-LR. *Toxicol.* 42:85-89.
317. Li, X.Y., Chung, I.K., Kim, J.I., Lee J.A. (2004): Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.* 44:821-827.
318. Li, Y., Chen, J.A., Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z., Zhang, R., Weiqun, S. (2011): A cross-sectional investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environ. Health. Perspect.* 119(10):1483-1488.
319. Lian, M., Liu, Y., Yu, S.Z., Qian, G.S., Wan, S.G., Dixon, K.R. (2006): Hepatitis B virus x gene and cyanobacterial toxins promotes aflatoxin B1-induced hepatotumorigenesis in mice. *World J. Gastroenterol.* 12(19):3065-3072.
320. Lin, C.C., Kao, C.H. (2000): Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 30:151-155.
321. Lindermann, B. (1995): *Complicated Child? Simple Options.* Ramona (CA): Ransom Hill Press.
322. Lindholm, T., Meriluoto, J. (1991): A. O. Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:1629-1634.
323. Liu, I., Lawton, L.A., Cornish, B., Robertson, P.K.J. (2002): Mechanistic and toxicity studies of the photocatalytic oxidation of microcystin-LR. *J. Photoch. Photobio. A.* 148(1-3):349-354.
324. Liu, I., Lawton, L.A., Robertson P.K.J. (2003): Mechanistic studies of the photocatalytic oxidation of microcystin-LR: an investigation of byproducts of the decomposition process. *Environ. Sci. Technol.* 37(14):3214-3219.

325. Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T. (2002): The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach *Misgururus mizolepis* Gunthe. *Toxicon*. 40:395-399.
326. Liu, Y., Chang, C.C., Marsh, G.M., Wu, F. (2012): Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer*. 48(14):2125-2136.
327. Llewellyn, L.E. (2006): Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* 23:200-222.
328. Lu, H., Choudhuri, S., Ogura, K., Csanaky, I.L., Lei, X., Cheng, X., Song, P.Z., Klaassen, C.D. (2008): Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. *Toxicol. Sci.* 103(1):35-45.
329. Lujčić, J., Marinović, Z., Stojiljković, B., Baltić, V., Svirčev, Z., Zilberg, D., Galit, S. (2012): Cyanotoxin effects on fish grown in Lake Ludaš. U: Abstract book: Diagnostics and Therapy for Advanced Gastrointestinal Tumors, 17th Academy of Studenica, 7-9. Oktobar. Novi Sad, Srbija.
330. Lujčić, J., Matavulj, M., Poleksić, V., Rašković, B., Marinović, Z., Kostić, D., Miljanović, B. (2014): Gill reaction to pollutants from the Tamiš River in three freshwater fish species, *Esox lucius* L. 1758, *Sander lucioperca* (L. 1758) and *Silurus glanis* L. 1758: A comparative study. *Anatomia Histologia Embryologia*. In press. DOI: 10.1111/ah.12119
331. Luukkainen, R., Namikoshi, M., Sivonen, K., Rinehart, K.L., Niemelä, S.I., (1994): Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp.: structure of a new hepatotoxin. *Toxicon*. 32(1):133-139.
332. MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A. (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264:187-92.
333. MacKintosh, R.V., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T., Cohen, P., MacKintosh, C. (1995): The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase - 1. *FEBS Lett.* 371(3):236-40.
334. Magalhaes, V.F., Soares, R., Azevedo, S.M.F.O. (2001): Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*. 39(7):1077-1085.
335. Magalhaes, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S.M.F.O. (2003): Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*. 42:289-295.
336. 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.
337. Maidana, M., Carlis, V., Galhardi, F.G., Yunes, J.S., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Barros, D.M. (2006): Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chem. Biol. Interact.* 159:223-234.
338. Main, D.C., Berry, P.H., Peet, R.L., Robertson, J.P. (1977): Sheep mortalities associated with the bluegreen alga *Nodularia spumigena*. *Aust. Vet. J.* 53:578-581.
339. Makkar, H.P.S. (2003): Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 49-53.
340. Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P. (2003): Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol.* 135:39-48.

341. Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P. (2004): Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity and glycogen content in isolated hepatocytes of fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicon*. 44:927-932.
342. Malbrouck, C., Kestemont, P. (2006): Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25:72-86.
343. Malenčić, Đ., Popović, M., Miladinović, J. (2007): Phenolic content and antioxidant properties of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Molecules*. 12:576-581.
344. Malenčić, Đ., Maksimović, Z., Popović, M., Miladinović, J. (2008): Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*. 99(14):6688-6691.
345. Malenčić, Đ., Cvejić, J., Miladinović, J. (2012): Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe. *J. Med. Food*. 15(1):89-95.
346. Mallatt, J. (1985): Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42:630-648.
347. Marsalek, B., Blaha, L., Babica, P. (2003): Analyses of microcystins in the biomass of *Pseudanabaena limnetica* collected in Znojmo reservoir. *Czech Phycology*. 3: 195-197.
348. Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W. (1989): Anatoxina(s), a potent anticholinesterase from *Anabena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111(20):8021-8023.
349. Matthijs, H., Visser, P.M., Reeze, B., Meeuse, J., Slot, P.C., Wijn, G., Talens, R., Huisman, J. (2012): Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water Res.* 46(5):1460-1472.
350. Mazur-Marzec, H., Tyminska, A., Szafranek, J., Plinski, M. (2007): Accumulation of nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Environ. Toxicol.* 22:101-111.
351. McDermott, C.M., Nho, C.W., Howard, W., Holton, B. (1998): The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon*. 36:1981-1996.
352. McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C. (2001): Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*. 39:1411-1420.
353. McGlynn, K.A., Tsao, L., Hsing, A.W., Devesa, S.S., Fraumeni, J.F. (2001): International trends and patterns of primary liver cancer. *Int. J. Cancer*. 94:290-296.
354. Meier-Abt, F., Hammann-Hanni, A., Stieger, B., Ballatori, N., Boyer, J.L. (2007): The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218:274-279.
355. Mereish, K.A., Bunner, D.L., Ragland, D.R., Creasia, D.A. (1991): Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by Silymarin: biochemistry, histopathology, and lethality. *Pharm. Res.* 8(2):273-277.
356. Meriluoto, J.A., Nygard, S.E., Dahlem, A.M., Eriksson, J.E. (1990): Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon*. 28:1439-1446.
357. Meriluoto, J., Spoof, L. (2005): Purification of microcystins by high-performance liquid chromatography. U: *TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Meriluoto, J., Codd, G.A., (editori). Åbo Akademi University Press, Turku. 93-104.
358. Meriluoto, J., Spoof, L. (2005a): Extraction of microcystins in biomass filtered on glassfibre filters or in freeze-dried cyanobacterial biomass. U: *TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Meriluoto, J., Codd, G.A., (editori). Åbo Akademi University Press, Turku. 69-71.

359. Metcalf, J. (2004): Cyanobacterial Toxins in the Water Environment: A Review of Current Knowledge. Marlow, Foundation for Water Research.
360. Metcalf, J.S., Codd, G.A. (2004): Cyanobacterial toxins in the water environment. United Kingdom, Foundation for Water Research Allen House.
361. Metcalf, J.S., Richer, R., Cox, P.A., Codd, G.A. (2012): Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci. Total. Environ.* 421-422:118-123.
362. M-Hamvas, M., Máthé, C., Molnár, E., Vasas, G., Grigorszky, I., Borbely, G. (2003): Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquat. Toxicol.* 62:1-9.
363. Michael, J. (1995): Wild Blue-Green Algae: From Power to Promise. Klamath Falls, Oregon. 20-24.
364. Micheletti, S., Schanz, F., Walsby, A.E. (1998): The daily integral of photosynthesis by *Planktothrix rubescens* during summer stratification and autumnal mixing in Lake Zurich. *New Phytol.* 139:233-246.
365. 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 Res.* 35(6):1461-1468.
366. Miller, M.J., Fallowfield, H.J. (2001): Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments. *Water Sci. Technol.* 43:229-232.
367. Milovanović, D., Živković, A. (1953): Plankton production investigations in Ečka fish ponds. *Proceedings S.A.N.* XXIX. 197-264.
368. Milovanović, D., Živković, A. (1959): Phytoplankton production in Živača fishpond (II Contribution to limnology of lentic waters in Panonia valley). *Archive of Biological Science.* 2:1-7.
369. Milovanović, D., Živković, A. (1963): Phytoplankton composition and dynamics in Jegrička fishpond in 1959-1960 period. *Archive of Biological Science.* 6:3-30.
370. Milutinović, A., Sedmak, B., Horvat-Žnidaršić, I., Šuput, D. (2002): Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:139-141.
371. Milutinović, A., Živin, M., Zorc-Plesković, R., Sedmak, B., Šuput, D. (2003): Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins-LR and -YR. *Toxicol.* 42:281-288.
372. Milutinović, A., Zorc-Plesković, R., Petrovič, D., Zorc, M., Šuput, D. (2006): Microcystin-LR induces alterations in heart muscle. *Folia. Biol. (Praha).* 52:116-118.
373. Mitrović, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J. (2005): Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 61:345-352.
374. Mitsoura, A., Kagalou, I., Papaioannou, N., Berillis, P., Mente, E., Papadimitriou, T. (2013): The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: a histopathological study. *International Aquatic Research.* 5:8.
375. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.
376. Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A. (2003): Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an egyptian fish farm containing a Microcystis bloom. *Environ. Toxicol.* 18(2):137-141.
377. Mohamed, Z.A., Hussein, A.A. (2006): Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: a laboratory study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63(3):424-429.

378. 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. *J. Hazard Mater.* 172(1):310-315.
379. Molica, R.J.R., Onodera, H., Garcia, C., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S.M.F.O., Lagos, N. (2002): Toxins in freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia.* 41:606-611.
380. Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.P.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O. (2005): Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae.* 4:743-753.
381. Monks, N.R., Liu, S., Xu, Y., Yu, H., Bendelow, A.S., Moscow, J.A. (2007): Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol. Cancer Ther.* 6:587-598.
382. Moon, J.K., Shibamoto, T. (2009): Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agr. Food Chem.* 57:1655-1666.
383. Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gómez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C.M., Cameán, A.M. (2005): Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol.* 45(4):395-402.
384. Mouchet, P., Bonnelye, V. (1998): Solving algae problems: French expertise and world-wide applications. *Aqua.* 47(3):125-141.
385. Nagarajan, M., Maruthanayagam, V., Sundararaman, M. (2013): SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds: a review. *J. Appl. Toxicol.* 33:313-349.
386. Nakić, S., Božović, M. (1994): Plankton i saprobiološke analize vode u akumulaciji „Grlišće“ u 1993. godini. Plankton i saprobiološke analize u akumulaciji. Čačak. 121-124.
387. Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rouhiainen, L., Luukkainen, R., Rinehart, K.L. (1992): Structures of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66. *Chem. Res. Toxicol.* 5(5):661-666.
388. Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., Dunand, C. (2010): Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* 52(2):195-204.
389. Nascimento, A.A., Araújo, F.G., Gomes, I.D., Mendes, R.M.M., Sales, A. (2012): Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in south-eastern Brasil. *Anat. Histol. Embryol.* 41:209-216.
390. Nasri, H., Bouaicha, N., Kaid Harche, M. (2007): A new morphospecies of *Microcystis* sp. forming bloom in the Cheffia dam (Algeria): Seasonal variation of microcystin concentrations in raw water and their removal in a full-scale treatment plant. *Environ. Tox.* 22(4):347-356.
391. Natić, D., Jovanović, D., Knežević, T., Karadžić, V., Bulat, Z., Matović, V. (2012): Microcystin-LR in surface water of Ponjavica River. *Vojnosanitetski Pregled.* 69:753-758.
392. Negri, A.P., Bunter, O., Jones, B., Llewellyn, L. (2004): Effects of the bloom forming alga *Trichodesmium erythraeum* on the pearl oyster *Pinctada maxima*. *Aquaculture.* 232:91-102.

393. 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.
394. Nehring, S. (1993): Mortality of dogs associated with a mass development of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) in a brackish lake at the German North Sea coast. *J. Plankton Res.* 15:867-872.
395. 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. U: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Hudnell Kenneth H. (editor) *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 619.
396. Neumann, U., Weckesser, J. (1998): Elimination of microcystin peptide toxins from water by reverse osmosis. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 13(2):143-148.
397. Newcombe, G. (2002): Removal of algal toxins from drinking water using ozone and GAC. AWWA Research Foundation and AWWA. Denver.
398. Nishiwaki, R., Ohta, T., Sueoka, E., Suganuma, M., Harada, K., Watanabe, M.F., Fujiki, H. (1994): Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer Lett.* 83(1-2):283-289.
399. Nobre, A.C.L., Jorge, M.C.M., Menezes, D.B., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A. (1999): Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 32:985-988.
400. Noctor, G., Foyer, C.H. (1998): Foyer Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Phys.* 49:249-279.
401. Nováková, K., Babica, P., Adamovský, O., Bláha, L. (2011): Modulation of gap-junctional intercellular communication by series of cyanobacterial samples from nature and laboratory cultures. *Toxicon*. 58:76-84.
402. Nováková, K., Kohoutek, J., Adamovsky, O., Brack, W., Krauss, M., Bláha, L. (2013): Novel metabolites in cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* with potencies to inhibit gap junctional intercellular communication. *J. Hazard. Mater.* 262:571-579.
403. Nybom, S., Salminen, S., Meriluoto, J. (2007): Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 270(1):27-33.
404. Oberemm, A., Becker, J., Codd, G., Steinberg, C. (1999): Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.* 14:77-88.
405. Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S.J., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (1994): Nodularin, a Potent Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A, Is a New Environmental Carcinogen in Male F344 Rat. *Liver Cancer Res.* 15(54):6402-6406.
406. Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., (1992): Cylindrospermopsin-a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114(20):7941-7942.
407. Olson, J.M. (2006): Photosynthesis In The Archean Era. *Photosynthesis Research.* 88(2):109-117.
408. Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T., Carmichael, W.W. (1997): New Saxitoxin Analogues from the Freshwater Filamentous Cyanobacterium *Lyngbya Wollei*. *Natural Toxins.* 5(4):146-151.
409. Oshima, Y. (1995): Post-column derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC International.* 78:528-532.

410. Padisák, J. (1997): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Arch. Hydrobiol. 4:563-593. Supplement 107 (Monographic Studies)
411. Padisák, J., Barbosa, F., Koschel, R., Krienitz, L. (2003): Deep layer cyanoprokaryota maxima in temperate and tropical lakes. Adv. Limol. 175-199.
412. Panda, S.K. (2012): Assay Guided Comparison for Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Activities with Special Reference to Medicinal Plants. U: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Antioxidant Enzyme", Mohammed Amr El-Missiry, CC BY 3.0 license.
413. Papadimitriou, T., Kagalou, I., Bacopoulos, V., Leonardos, I.D. (2010): Accumulation of microcystins in water and fish tissues: an estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek Lakes. Environ. Toxicol. 25:418-427.
414. Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan B. (2010): On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. Mar. Drugs. 8(5):1650-1680.
415. Pękal, A., Pyrzyńska, K. (2014): Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Analytical Methods. 1-7.
416. Peng, L., Liu, Y., Chen, W., Liu, L., Kent, M., Song, L. (2010): Health risks associated with consumption of microcystin-contaminated fish and shellfish in three Chinese lakes: significance for freshwater aquacultures. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73(7):1804-1811.
417. Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., Oshima, Y. (2000): Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. Toxicon. 38:1689-1702.
418. Pereira, S., Pinto, A.L., Cortes, R., Fontainhas-Fernandes, A., Coimbra, A.M., Monteiro, S.M. (2013): Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. Ecotox. Environ. Safe. 90:157-166.
419. Perendija, B., Despotović, S., Radovanović, T., Gavrić, J., Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Ognjanović, B., Simić, S., Pajović, S., Saičić, Z. (2011): Biochemical and ultrastructural changes in the liver of European perch (*Perca Fluviatilis* L.) in response to cyanobacterial bloom in the Gruža reservoir. Archives of Biological Sciences. 63:979-989.
420. Persson, K., Legrand, C., Olsson, T. (2009): Detection of nodularin in European flounder (*Platichthys flesus*) in the west coast of Sweden: Evidence of nodularin mediated oxidative stress. Harmful Algae. 8:832-838.
421. Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S. (2007): Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). Environ. Toxicol. 22:436-442.
422. Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K.A., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (1998): Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by aquatic macrophytes. J. Appl. Bot. 72:228-232.
423. Pflugmacher, S., Ame, M.V., Wiegand, C., Steinberg, C.E. (2001): Cyanobacterial toxins and endotoxins their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. Wasser Boden. 53:15-20.
424. Pflugmacher, S., Aulhorn, M., Grimm, B. (2007): Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. New Phytol. 175(3):482-489.

425. Picanço, M.R., Soares, R.M., Cagido, V.R., Azevedo, S.M.F.O., Rocco, P.R.M., Zin, W.A. (2004): Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(8):1225-1229.
426. Pilotto, L.S., Douglas, R.M., Burch, M.D., Cameron, S., Beers, M., Rouch, G.J., Robinson, P., Kirk, M., Cowie, C.T., Hardiman, S., Moore, C., Attewell, R.G. (1997): Health effects of exposure to cyanobacteria (blue green algae) during recreational water activities. *Australian N. Zealand J. Pub. Health.* 21:562-566.
427. Pilotto, L.S., Kliwer, E.V., Davies, R.D., Burch, M.D., Attewell, R.G. (1999): Cyanobacterial (blue green algae) contamination in drinking water and perinatal outcomes. *Australian New Zealand J. Pub. Health.* 23:154-158.
428. Pogozhev, P.I., Gerasimoval, T.N. (2001): The effect of zooplankton on microalgae blooming and water eutrophication. *Water Resources.* 28(4):420-427.
429. Popović, B., Štajner, D. (2008): Oksidativni stres kod biljaka. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
430. Post, A.F., de Wit, R., Mur, L.R. (1985): Interactions between temperature and light intensity on growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *J. Plankton Res.* 7:487-495.
431. Poste, A.E., Hecky, R.E., Guildford, S.J. (2011): Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environ. Sci. Technol.* 45(13):5806-5811.
432. Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A. (1998): Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet.* 352:21-26.
433. Prociv, P. (1987): Palm Island reconsidered. Was it copper poisoning? *Aust. N.Z.J. Med.* 17:345-349.
434. Puschner, B., Hoff, B., Tor, E.R. (2008): Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(1):89-92.
435. Qiu, T., Xie, P., Ke, Z., Li, L., Guo, L. (2007): In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicol.* 50:365-376.
436. Rabergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E. (1991): Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic toxicology.* 20:131-146.
437. Ranković, B., Čomić, Lj. (1989): Phytoplankton studies of Gruža reservoir. U: Konferencija o aktuelnim problemima zaštite voda „Zaštita voda 89“. Rovinj. 397-403.
438. Ranković, B., Čomić, Lj., Simić, S. (1994): Phytoplankton and saprobiological characteristics of Gruža reservoir in 1992. U: Konferencija o aktuelnim problemima zaštite voda „Zaštita voda 94“. 110-115.
439. Ranković, B., Simić, S. (2005): Phytoplankton of Gruža reservoir. U: Gruža reservoir - Monography. Faculty of Natural Sciences, Kragujevac. 65-78.
440. Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemela, S.I. (1993): Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains: A laboratory study. *J. Appl. Phycol.* 5:581-591.
441. Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I. (1997): Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(6):2206-2212.
442. Rašković, B., Poleksić, V., Višnjić-Jeftić, Ž., Skorić, S., Gačić, Z., Djikanović, V., Jarić, I., Lenhardt, M. (2014): Use of histopathology and elemental accumulation in

- different organs of two benthophagous fish species as indicators of river pollution. *Environmental Toxicology*. U štampi.
443. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji (1999.-2006.): Institut za zaštitu zdravlja "Dr. Milan Jovanovic-Batut", Beograd.
444. Reynolds, C.S. (1984): The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University. 384.
445. Reynolds, C.S. (1987): Cyanobacterial water-blooms. *Adv. Bot. Res.* 13:67-143
446. Reynolds, C.S. (1994): The ecological basis for the successful biomanipulation of aquatic communities. *Arch. Hydrobiol.* 130:1-33.
447. Reynolds, C.S. (1997): Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. *Excellence in Ecology.* 9:1-371.
448. Ribau Teixeira, M., Rosa, M.J. (2006): Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*: Part I: The key operating conditions. *Separation and Purification Technology.* 52(1):84-94.
449. Ribau Teixeira, M., Rosa, M.J. (2006a): Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration. *Water Res.* 40(15):2837-2846.
450. Richmond, A. (1990): *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 528.
451. 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. i Carmichael, W.W., (1988): Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *J. Amer. Chem. Soc.* 110.
452. Ripka, R., Herdman, M. (1992): Pasteur culture collection (PCC) of cyanobacterial strains in axenic culture, vol 1, catalogue of strains. Paris, France; Institute Pasteur.
453. Ristić, O., Gajin, S., Gantar, M., Matavulj, M. (1979): Microbiological studies of some fish ponds in Vojvodina. U: *Proceedings of the II Congress of Ecologists in Yugoslavia*. Zagreb. 1923-1935.
454. Robarts, R.D., Waiser, M.J., Arts, M.T., Evans, M.S. (2005). Seasonal and diel changes of dissolved oxygen in a hypertrophic prairie lake. *Lakes & Reservoirs: Research and Management.* 10:167-177.
455. Robinson, N.A., Miura, G.A., Matson, C.F., Dinterman, R.E, Pace, J.G. (1989): Characterization of chemically tritiated microcystin5LR and its distribution in mice. *Toxicol.* 27:1035-1042.
456. Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A. (1994): Cyanobacteria (blue-green algae) bloom and associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L, in Loch Leven, Scotland. *J. Fish Dis.* 17:172-181.
457. Rodriguez, E., Majado, M.E., Meriluoto, J., Acero, J.L. (2007) Oxidation of microcystins by permanganate: reaction kinetics and implications for water treatment. *Water Res.* 41(1):102-110.
458. Rodriguez, E., Sordo, A., Metcalf, J.S., Acero, J.L. (2007a): Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate. *Water Res.* 41(9):2048-2056.
459. Rodriguez, E., Onstad, G.D., Kull, T., Metcalf, J.S., Acero, J.L., von Gunten, U. (2007b): Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Res.* 41(15):3381-3393.
460. Rogers, E.H., Zehr, R.D., Gage, M.I., Humpage, A.R., Falconer, I.R., Marr, M., Chernoff, N. (2007): The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicol.* 49(6):855-864.

461. Rohrlack, T., Dittman, E., Henning, M., Börner, T., Kohl, J.G. (1999): Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:737-739.
462. Rohrlack, T., Christoffersen, K., Friberg-Jensen, U. (2005): Frequency of inhibitors of daphnid trypsin in the widely distributed cyanobacterial genus *Planktothrix*. *Environ. Microbiol.* 7:1667-1669.
463. Romero-Oliva, C.S., Jara, V.C., Block, T., Pflugmacher, S., (2014): Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops-A casestudy from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotox. Environ. Safe.*102:121-128
464. Romo, S., Fernández, F., Ouahid, Y., Barón-Sola, A. (2012): Assessment of microcystins in lake water and fish (Mugilidae, *Liza* sp.) in the largest Spanish coastal lake. *Environ. Monit. Assess.*184:939-949.
465. Rosahl, S. (1996): Lipxygenases in plants-Their role in development and stress response. *Zeitschrift für Naturforschung.* 51:123-138.
466. Rosen, B.H., Loftin, K.A., Smith, C.E., Lane, R.F., Keydel, S.P. (2010): Microphotographs of cyanobacteria documenting the effects of various cell-lysis techniques: U.S. Geological Survey Open-File Report, 2010-1289. 203.
467. Rositano, J., Nicholson, B. (1994): Water treatment techniques for the removal of cyanobacterial toxins from water2/94, Australian Centre for Water Quality.
468. Runnegar, M.T.C., Andrews, J., Gerdes, R.G., Falconer, I.R. (1987): Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon.* 25:1235-1239.
469. Runnegar, M.T., Gerdes, R.G., Falconer, I.R. (1991): The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon.* 29:43-51.
470. Runnegar, M.T., Berndt, N., Kaplowitz, N. (1995): Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters. *Toxicol. Appl. Pharm.* 134(2):264-272.
471. Runnegar, M.T., Xie, C., Snider, B.B., Wallace, G.A., Weinreb, S.M., Kuhlenkamp, J. (2002): In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol. Sci.* 67(1):81-87.
472. Saker, M.L., Eaglesham, G.K. (1999): The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon.* 37:1065-1077.
473. Saker, M.L., Thomas, A.D., Norton, J.H. (1999): Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 14:179-182.
474. Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Vasconcelos, V.M. (2004): Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon.* 43:185-194.
475. Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. (2002): Plant phenolic antioxidant and pro-oxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 177:67-80.
476. Sánchez-Moreno, C. (2002): Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8(3):121-137.
477. Saqrane, S., El Ghazali, I., Ouahid, Y., El Hassani, M., El Hadrami, I., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F.F., Vasconcelos, V. (2007): Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: microcystin accumulation, detoxification and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.* 83:284-294.

478. Saqrane, S., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V. (2008): Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Health. B.* 43(5):443-451.
479. Saqrane, S., Ouahid, Y., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F. (2009): Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon.* 53:786-796.
480. Sarnelle, O., Wilson, A.E. (2005): Local adaptation of *Daphnia pulicaria* to toxic cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* 50:1565-1570.
481. 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.* 330-340.
482. Schaeffer, D., Malpas, P., Barton, L. (1999): Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44:73-80.
483. Schirrmeister, B.E., Antonelli, A., Bagheri, H.C. (2011): The Origin Of Multicellularity In Cyanobacteria. *Bmc. Evolutionary Biology.* 11(1):45.
484. Schopf, J.W., Walter, M.R. (1982): Origin and early evolution of cyanobacteria: The geological evidence. U: *The Biology of Cyanobacteria.* Carr, N.G., Whitton, B.A. (editori). Blackwell, Oxford and University of California Press, Berkeley. 543-564.
485. Schrebri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P. (2001): Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16(5):413-421.
486. Schwimmer, M., Schwimmer, D. (1968): Medical aspects of phycology. U: *Algae, man and the environment.* Jackson, D.F. (editor). Syracuse University Press, Syracuse, NY. 279-358.
487. Seckbach, J. (2007): *Algae and cyanobacteria in extreme environments.* Springer, Dordrecht, Netherlands.
488. Sedmak, B., Šuput, D. (2002): Co-operative effects in tumorigenicity. The microcystin example. *Radiol. Oncol.* 36(2):162-164.
489. Sedmak, B., Svirčev, Z. (2011): Cijanobakterije i njihovi toksini-ekološki i toksikološki rizici i cvetanje cijanobakterija u Srbiji. *Visoka šola za varstvo okolja, Velenje, Slovenia.*
490. Sekijima, M., Tsutsumi, T., Yoshida, T., Harada, T., Tashiro, F., Chen, G., Yu, S.Z., Ueno, Y. (1999): Enhancement of glutathione S transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B₁ initiated rats. *Carcinogenesis.* 20(1):161-165.
491. Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R., Eaglesham, G. (2000): Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. *Toxicon.* 38(9):1203-1213.
492. Shumway, S.E. (1995): Phycotoxin-related shellfish poisoning: Bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.* 3:1-31
493. Siegl, G., MacKintosh, C., Stitt, M. (1990): Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS Letters.* 270:198-202.
494. Silva, C.S., Genuário, D.B., Vaz, M.G., Fiore, M.F. (2014): Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. *Syst. Appl. Microbio.* 37(2):100-112.
495. Simeunović, J. (2005): Kolekcija kultura cijanobakterija, Zadužbina Andrejević, Beograd.

496. Simeunović, J. (2009): Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
497. Simeunović, J. (2010): Cijanobakterije i cijanotoksini u površinskim vodama Vojvodine. Zadužbina Andrejević, Beograd.
498. Simić, D. (1988): Mikrobiologija I. IRO Naučna knjiga, Beograd.
499. Simić, S., Mišćević, M., Đorđević, N., Popović, N. (2011): Cyanobacteria in Aleksandrovac Lake- before and after revitalisation. Abstract book: Cyanobacteria and human health. 16th Academy of Studenica. 1-3 Jul. Novi Sad. Srbija.
500. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8):1990-1995.
501. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, R., Rinehart, K.L. (1992): Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8):2495-2500.
502. Sivonen, K., Jones, G. (1999): Cyanobacterial Toxins. U: Toxic Cyanobacteria in Water. Chorus I., Bartram J. (editori). E & FN SPON & WHO, Geneva, WHO 41-111.
503. Skulberg, O.M. (1978): Some observations on red-coloured species of *Oscillatoria* (Cyanophyceae) in nutrient-enriched lakes of southern Norway. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20:776-787.
504. Skulberg, O.M. (1996): Terrestrial and limnic algae and cyanobacteria in catalogue of Svalbard Plants, Fungi, Algae and Cyanobacteria, Part 9. Elvebakk A. Prestud P. (editori). Norsk, Polarinstitutt Skrifter. 198:383-395.
505. Slatkin, D.N., Stoner, R.D., Adams, W.H., Kycia, J.H., Siegelman, H.W. (1983): Atypical pulmonary thrombosis caused by a toxic cyanobacterial peptide. *Science.* 220:1383-1385.
506. Smith, J.L., Haney, J.F. (2006): Food transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon.* 48(5):580-589.
507. Soares, R.A., Magalhaes, V.F., Azevedo, S. (2004): Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 70(1):1-10.
508. Soares, M., Cagido, V.R., Ferraro, R.B., Meyer-Fernandes, J.R., Rocco, P.R.M., Zin, W.A., Azevedo, S.M.F.O. (2007): Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon.* 50:330-338.
509. Solin, M., Meriluoto, J. (2001): Kan alggifter anrikas i växter vid bevattning? M. Blomqvist (Ed.), Från teknik till etik: miljöförståelse i universitetsperspektiv, Åbo Akademi University Press, Åbo.167-172.
510. Soong, P. (1980): Production and Development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. U: Algal Biomass, Production and Use. Shelef, G., Soeder, C.J. (editori). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 97-113.
511. Spoo, 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. *J. Chromatogr. A.* 1020:105-119.
512. Spoo, L. (2005): Microcystins and nodularins. U: TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Meriluoto, J., Codd, G.A., (editori). Åbo Akademi University Press, Turku. 15-39.

513. 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). *Environ. Toxicol.* 21:552-560.
514. Stanier, R.J. (1971): The position of cyanobacteria in the world of phototrops. *Carlsberg Res. Commun.* 42:77-98.
515. Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R. (2006): Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ. Health.* 24(5):7.
516. Stewart, I., Webb, P.M., Schluter, P.J., Shaw, G.R. (2006a): Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria - a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ. Health.* 5:6.
517. Stotts, R.R., Twardock, A.R., Haschek, W.M., Choi, B.W., Rinehart, K.L., Beasley, V.R. (1997): Distribution of tritiated dihydromicrocystin in swine. *Toxicon.* 35(6):937-953.
518. Stotts, R.R., Twardock, A.R., Koritz, G.D., Haschek, W.M., Manuel, R.K., Hollis, W.B., Beasley, V.R. (1997a): Toxicokinetics of tritiated dihydromicrocystin-LR in swine. *Toxicon.* 35(3):455-465.
519. Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., Barry, W.H. (2004): Saxitoxin blocks L-type ICa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308(1):324-329.
520. Svetska Zdravstvena Organizacija, SZO. (1998): Guidelines for drinking- water quality. 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Geneva.
521. Svetska Zdravstvena Organizacija, SZO. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Routledge, London and New York.
522. Svetska Zdravstvena Orgnizacija, SZO. (2003): Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. WHO, Geneva.
523. Svirčev, Z. (1983): Summer aspect of microflora and microfauna in some waters of Fruška Gora. *Čovek i životna sredina.* 6:38-43.
524. Svirčev, Z. (2001): Mikroalge i cijanobakterije u vodi za rekreaciju. U: Kontrola kvaliteta voda. B. Dalmacija (editor), Institut za hemiju, PMF, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
525. Svirčev, Z. (2005): Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji. Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad.
526. Svirčev, Z., Mikov-Miladinov, M., Simeunović, J., Vidović, M., Matavulj, M., Petrović, D., Radojčić, B., Stojanović, D. (2006): PLC epidemiological studdies in Central Serbia potentially connected with cyanobacterial blooms in drinking water suppliers. *Proc. Int. Conf. «Danubius Pannonico Mysicus - Space of Challenges»*, Novi Sad. 38-39.
527. Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Vidović, M. (2007): Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. *Geographica Pannonica.* 11:12-21.
528. Svirčev, Z., Krstić, S., Marković, S.B., Plavša, J., Lazić, L. (2008). Methods for management of eutrophication in freshwater ecosystems in Vojvodina. *Geographica Pannonica.* 12(1):4-11.
529. Svirčev, Z., Krstić, S., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V., Vidović, M. (2009): Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27:36-55.
530. Svirčev, Z., Baltić, V., Gantar, M., Juković, M., Stojanović, D., Baltić, M. (2010): Molecular Aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *J Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 28:39-59.

531. Svirčev, Z., Baltić, V. (2011): Srpski vodič za cvetanje cijanobakterija. Institut za onkologiju Vojvodine- PMF, Novi Sad.
532. Svirčev, Z., Baltić, V., Simeunović, J. (2011): Cvetanje cijanobakterija u Srbiji-putevi ekspozicije, zdravstveni i zakonodavni aspekt. Studenička akademija. Novi Sad, Srbija.
533. Svirčev, Z., Baltić, V., Simeunović, J., Tokodi, N., Drobac, D. (2011a): Cyanotoxin Legislation. 16th Academy of Studenica: Cyanobacteria and human health. Novi Sad, July 1-3. Abstract book: 13.
534. Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V. (2013): Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 31(3):181-200.
535. Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V. (2013a): Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. 14th EuCheMSInternational Conference on Chemistry and the Environment. ICCE 2013, Barcelona, June 25-28. Book of abstracts.
536. Svirčev, Z., Tokodi, N., Drobac, D., Codd, G.A. (2014): Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. Systematics and Biodiversity. 12(3):261-270.
537. Svirčev, Z., Svirčev Z., Drobac D., Tokodi N., Lužanin, Z., Munjas, A.M., Nikolin, B., Vuleta, D., Meriluoto, J. (2014a): Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 32(4):319-337.
538. Svirčev Z., Lujčić J., Marinović Z., Drobac D., Tokodi N., Stojiljković B., Meriluoto J. (2015): Toxicopathology induced by microcystins and nodularin: A histopathological review. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 33(2):125-167.
539. Svirčev, Z., Obradović, V., Codd, G.A., Marjanović, P., Spoof, L., Drobac, D., Tokodi, N., Petković, A., Nenin, T., Simeunović, J., Važić, T., Meriluoto, J. Massive fish mortality and *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in Aleksandrovac Lake. Submitirano.
540. Svrcek, C., Smith, D.W. (2004): Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. J. Environ. Eng. Sci. 3:155-185.
541. Takeda, S., Mano, S., Ohto, M., Nakamura, K. (1994): Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. Plant Physiology. 106:567-574.
542. Takumi, S., Komatsu, M., Furukawa, T., Ikeda, R., Sumizawa, T., Akenaga, H., Maeda, Y., Aoyama, K., Arizono, K., Ando, S., Takeuchi, T. (2010): p53 Plays an important role in cell fate determination after exposure to microcystin-LR. Environ. Health Perspect. 118:1292-1298.
543. Teixeira, M.G., Costa, M.C., de Carvalho, V.L., Pereira, M.S., Hage, E. (1993): Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. Bull. Pan. Am. Health Org., 27:244-253.
544. Tencalla, F., Dietrich, D. (1997): Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicon. 35:583-595.
545. Teneva, I., Dzhambazov, B., Koleva, L., Mladenov, R., Schirmer, K. (2005): Toxic potential of five freshwater Phormidium species (Cyanoprokaryota). Toxicon. 45(6):711-725.
546. Theiss, W.C., Carmichael, W.W., Wyman, J., Bruner, R. (1988): Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. Toxicon. 26:603-613.

547. Thomas, E.A., Märki, E. (1949): The present state of Lake Zürich (In german). Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 10:476-488.
548. Thronson, A., Quigg, A. (2008): Fifty-five years of fish kills in coastal Texas. Estuaries Coasts. 31:802-813.
549. Tisdale, J. (1931): Epidemic of intestinal disorders in Charleston (West Virginia) occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. Am. J. Pub. Health. 21:198-200.
550. Toerien, D.F., Grobbelaar, J.U. (1980): Algal mass cultivation experiments in South Africa, U: Algae Biomass, Production and Use. Shelef, G., Soeder, C.J. (editori). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 73-80.
551. Tokodi, N., Drobac, D., Svirčev, Z., Lazić, D. (2012): Cyanotoxins in Serbia and water treatment procedures for their elimination. Geographica Pannonica. 16(4):152-160.
552. Tokodi, N., Drobac, D., Simeunović, J., Svirčev, Z. (2013): Assessment of acute cyanotoxicity using *Artemia salina* bioassay in water samples from fishponds. 17th International Eco-Conference, 10th Environmental protection of urban and suburban settlements. 25th- 28th Septembar 2013, Novi Sad, Srbija.
553. Tokodi, N., Drobac, D., Simeunović, J., Svirčev, Z. (2014): Microcystin concentrations in fishpond waters. J. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad. 127: 35-42.
554. 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. Environ. Sci. Technol. 28:173-177.
555. Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K., Codd, G.A. (1990): Pneumonia associated with cyanobacteria. Br. Med. J. 300:1400-1414.
556. 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.
557. Utermöhl, H. (1958): Zur vervolkumng der quantitative phytoplankton methodic. Mitt. int. Ver. Limnol. 9:1-38.
558. Van Acker, S.A.B.E., Van den Ber, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996): Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free radical Biology and Medicine. 20:331-432.
559. Van de Riet, J., Gibbs, R.S., Muggah, P.M., Rourke, W.A., MacNeil, J.D., Quilliam, M.A. (2011): Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters and scallops: Collaroborative study. Journal of AOAC International. 94:1154-1176.
560. Van Liere, L. (1979): Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. J. Gen. Microbiol. 115:153-160.
561. Vasconcelos, V.M. (1995): Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 32:227-237.
562. Vasconcelos, V.M. (1999): Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. Braz. J. Med. Biol. Res. 32:249-254.
563. Važić, T. (2014): Metoda ekomanipulacije u cilju smanjenja ukupnog kapaciteta. Međunarodna konferencija Voda izazov budućnosti, cijanobakterije i zdravlje ljudi. Beograd, Srbija.
564. Veal, E.A., Day, A.M., Morgan, B.A. (2007): Hydrogen peroxide sensing and signalling. Molecular Cell. 26(1):1-14.
565. Vehovszky, Á., Kovács, A.W., Szabó, H., Győri, J., Farkas, A. (2012): Neurotoxic effects evoked by cyanobacterial extracts suggest multiple receptors involved in

- electrophysiological responses of molluscan (CNS, heart) models. *Acta. Biol. Hung.* 63:160-170.
566. Vehovszky, Á., Kovács, W.A., Farkas, A., Györi, J., Szabó, H., Vasas, G. (2015): Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloom-forming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary. *Environ. Toxicol.* 30(5):501-512.
567. Veldee, M.V. (1931): An epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis. *Am. J. Publ. Health.* 21(9):1227-1235.
568. Voloshko, L., Kopecky, J., Safronova, T., Pljusich, A., Titova, N., Hrouzek, P., Drabkova, V. (2008): Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga. *Estonian Journal of Ecology.* 57(2):100-110.
569. Von Elert, E., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U., Zitt, A. (2004): Protease activity in gut *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comp. Biochem. Phys. B. Comp. Biochem. Phys. B.* 137:287-296.
570. Vovrkorže, A. (2006): Ekoremedijacije ze učinkovito varovanje okolja. Maribor.
571. Waldemer, R.H., Tratnyek, P.G. (2006): Kinetics of contaminant degradation by permanganate. *Environ. Sci. Technol.* 40(3):1055-1061.
572. Walsby, A.E., Schanz, F. (2002): Light-dependent growth rate determines changes in the population of *Planktothrix rubescens* over the annual cycle in Lake Zürich, Switzerland. *New Phytol.* 154:671-687.
573. Wang, H., Ho, L., Lewis, D.M., Brookes, J.D., Newcombe, G. (2007): Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. *Water. Res.* 41(18):4262-4270.
574. Wang, J., Salata, J.J., Bennett, P.B. (2003): Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 121(6):583-598.
575. Wang, L.K., Fahey, E.M., Wu, Z. (2005): Dissolved air flotation. U: Physicochemical treatment processes. Wang, L.K., Hung, Y.T., Shammas, N.K. (editori). Volume 3. Handbook of Environmental Engineering. Humana Press, Totowa, NJ.
576. Wang, Z., Li, D., Qin, H., Li, Y. (2012): An integrated method for removal of harmful cyanobacterial blooms in eutrophic lakes. *Environ. Pollut.* 160(1):34-41.
577. Weckesser, J., Drews, G. (1979): Lipopolysaccharides of photosynthetic prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:215-239
578. Wera, S., Hemmings, B.A. (1995): Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* 311(1):17-29.
579. Westrick, J.A. (2003): Everything a manager should know about algal toxins but was afraid to ask. *JAWWA.* 95:26-34.
580. Westrick, J., Szlag, D., Southwell, B., Sinclair, J. (2010): A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* 397(5):1705-1714.
581. White, S.H., Duivenvoorden, L.J., Fabbro, L.D., Eaglesham, G.K. (2006): Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicon.* 47:497-509.
582. Whitton, B.A., Potts, M. (2000): The Ecology of Cyanobacteria-Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers.
583. Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J. (2001): The waterbodies surveyed for cyanotoxins in Germany. U: Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. Chorus I., (editor). Berlin: Springer-Verlag. 6-21.
584. Wiegand, C., S, Pflugmacher. (2005): Ecotoxicological Effects of Selected Cyanobacterial Secondary Metabolites: A Short Review. *Toxicology i Applied Pharmacology.* 203(3): 201-218.

585. Willén, T., Mattsson, R. (1997): Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981-1995. *Hydrobiologia*. 353:181-192.
586. 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.
587. Xie, L., Xie, P., Ozawa, K., Honma, T., Yokoyama, A., Park, H-D. (2004): Dynamics of Microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ. Pollut.* 127:431-439.
588. Xie, L., Yokoyama, A., Nakamura, K., Park, H. (2007): Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon*. 49(5):646-652.
589. Xie, L.Q., Xie, P., Guo, L.G., Li, L., Miyabara, Y. (2005): Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.* 20:293-300.
590. Xu, L., Qin, W., Zhang, H., Wang, Y., Dou, H., Yu, D., Ding, Y., Yang, L., Wang, Y. (2012): Alterations in microRNA expression linked to microcystin-LR-induced tumorigenicity in human WRL-68 Cells. *Mutat. Res.* 743(1-2):75-82.
591. Yamano, H., Ishii, K., Yanagida, M. (1994): Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *EMBO J.* 13:5310-5318.
592. Yasumoto, T., Murata, M. (1993): Marine toxins. *Chem. Rev.* 93:1897-1909.
593. Yin, L.Y., Huang, J.Q., Huang, W.M., Li, D.H., Wang, G.H., Liu, Y.D. (2005): Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*. 46:507-512.
594. Young, F.M., Micklem, J., Humpage, A.R. (2008): Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol.* 25(3):374-380.
595. Yu, F.Y., Liu, B.H., Chou, H.N., Chu, F.S. (2002): Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *J. Agric. Food Chem.* 50:4176-4182.
596. Yu, S-Z., Chen, Z-Q., Liu, Y-K., Huang, Z-Y., Zhao, Y-F. (1989): The aflatoxins and contaminated water in the etiological study of primary liver cancer. U: *Mycotoxins & Phycotoxins*. Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (editori). Amsterdam, Elsevier. 37-44.
597. Yu, S-Z. (1989a): Drinking water and primary liver cancer. U: *Primary Liver Cancer*. Tang, Z-Y., Wu, M-C., Xia, S-S. (editori). Springer Verlag, Berlin. 30-37.
598. Yu, S-Z. (1995): Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10:674-682.
599. Yu, S., Zhao, N., Zi, X. (2001): The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*; 23(2): 96-99.
600. Zafrir-Ilan, E., Carmeli, S. (2010): Eight novel serine proteases inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron*. 66:9194-9202.
601. Zambirano, F., Canelo, E. (1996): Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺K⁺ pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio linneo*). *Toxicon*. 34(4):451-458.
602. Zarazne i parazitske bolesti na teritoriji Republike Srbije van pokrajne Kosova i Metohije (1999.-2006.): Institut za zaštitu zdravlja "Dr. Milan Jovanovic-Batut". Centar za prevenciju i kontrolu zaraznih bolesti, Beograd.

603. 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. *Sci. Total Environ.* 407(7):2191-2199.
604. Žegura, B., Lah, T.T., Filipič, M. (2006): Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat. Res.* 611:25-33.
605. Žegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipič, M. (2008): Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon.* 51:615-623.
606. Žegura, B., Štraser, A., Filipič, M. (2011): Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat. Res.* 727:16-41.
607. Zhang, C., Fu, D., Gu, Z. (2009a): Degradation of microcystin-RR using boron-doped diamond electrode. *J. Hazard. Mater.* 172(2-3):847-853.
608. 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. *Sci. Total Environ.* 407(7):2191-2199.
609. Zhang, D., Xie, P., Chen, J. (2010): Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *B. Environ. Contam. Tox.* 84:202-207.
610. Zhang, Z., Zhang, X.X., Qin, W., Xu, L., Wang, T., Cheng, S., Yang, L. (2012): Effects of microcystin-LR exposure on matrix metalloproteinase-2/-9 expression and cancer cell migration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 77:88-93.
611. Zhou, L., Yu, H., Chen, K. (2002): Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed. Environ. Sci.* 15(2):166-171.
612. Zimmermann, U. (1969): Ökologische und physiologische untersuchungen an der planktischen blualge *Oscillatoria rubescens* D.C. unter besonderer berücksichtigung von licht und temperatur. *Schweiz. Z. Hydrol.* 31:1-58.
613. 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. *J. Toxicol. Environ. Health. B.* 8:1-37.
614. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/II>
615. <http://www.blic.rs/Vesti/Drustvo/430536/Uzice-Zagadjena-voda-u-prodavnicama-razgrabljena-flasirana>
616. <http://images.kurir-info.rs/slika-900x608/aleksandrovacko-jezero-pomor-pomor-riba-ribolov-1356833971-247203.jpg>;
617. <http://uimenaroda.rs/cache/watermark/15de82f9ff01b65cfac16752419b8a1f.jpg>
618. <http://uimenaroda.rs/cache/watermark/4c086e621a8cad27563ee9178bce082d.jpg>
619. <http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/eng/December.pdf>
620. <http://www.politika.rs/rubrike/Srbija/Uginulo-dve-tone-ribe.lt.html>
621. <http://www.ribolov.co.rs/prijava-veternici-zbog-pomora-riba-u-aleksandrovackom-jezeru/>
622. <http://www.ribolov.co.rs/wp-content/uploads/2013/01/Ko-je-kriv-za-pomor-riba-u-aleksandrovackom-jezeru.jpg>
623. http://www.vodovod-ue.co.rs/?page_id=27

8. PRILOG

Prilog I Hromatogram standarda-ekstrakt *Microcystis* NIES-107

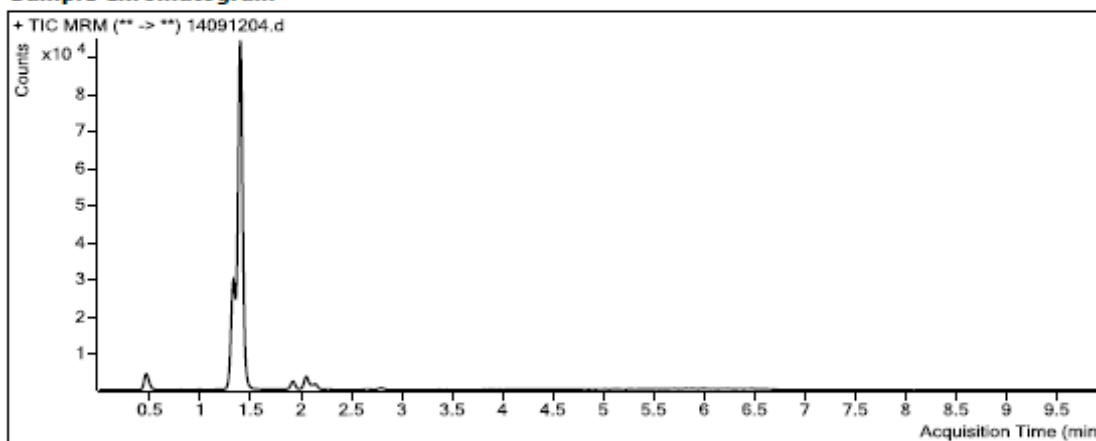
Quantitative Analysis Sample Report

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\Biokemi\Batches\QuantResults\140912.batch.bin
Analysis Time 9/15/2014 10:23 AM **Analyst Name** admin
Report Time 9/15/2014 10:25 AM **Reporter Name** admin
Last Calib Update 9/15/2014 10:23 AM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2014-09-12 15:36 **Data File** 14091204.d
Position P1-A3 **Sample Name** Nies-107 50x
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol -1 **Acq Method File** Cyanotoxins.m
Sample Type Calibration **Comment**

Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
dmMCRR		1.334	99704			20.3668	78.33
MCRR		1.401	302322			208.6383	81.50
dmMCYR		1.926	7349			0.1666	83.30
MCYR		2.056	11479			39.8380	83.00
dmMCLR		2.107	2294			0.1692	84.62
MCLR		2.145	4349			87.5341	67.33

Prilog II Hromatogram standarda-ekstrakt *Microcystis* PCC 7820

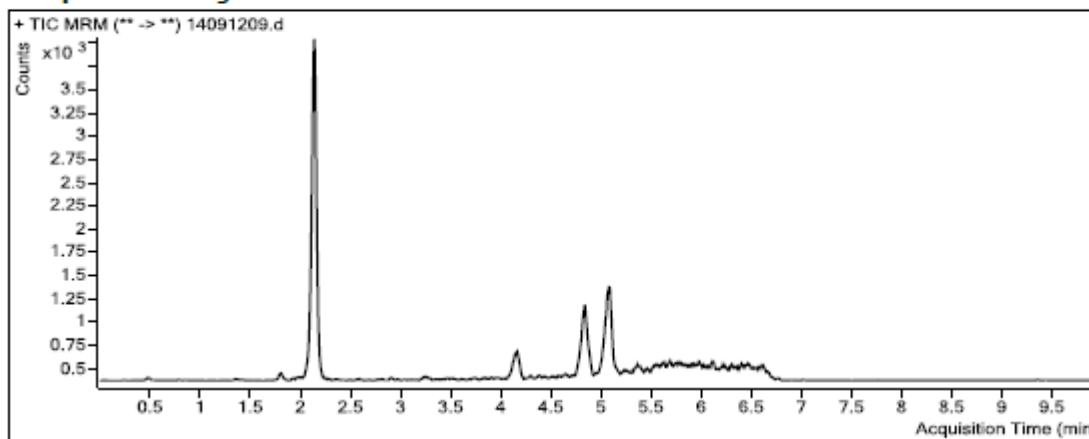
Quantitative Analysis Sample Report

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\Biokemi\Batches\QuantResults\140912b.batch.bin
Analysis Time 9/15/2014 8:13 PM **Analyst Name** admin
Report Time 9/15/2014 8:14 PM **Reporter Name** admin
Last Calib Update 9/15/2014 8:13 PM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2014-09-12 16:30 **Data File** 14091209.d
Position P1-A8 **Sample Name** Ma7820 50x
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol -1 **Acq Method File** Cyanotoxins.m
Sample Type Calibration **Comment**

Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
dmMCLR		2.099	1239			16.7993	89.36
MCLR		2.141	11374			168.9636	78.22
MCLY		4.187	1223			18.4701	98.25
MCLW		4.838	3289			63.4457	101.03
MCLF		5.087	3717			45.5449	112.18

Prilog III Hromatogram detektovanog MC-RR u uzorku 1 mišića ribe

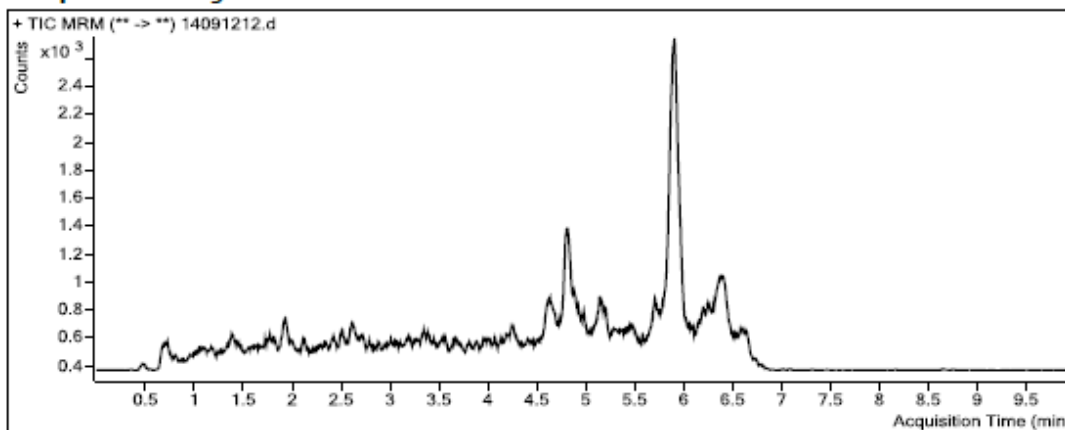
Quantitative Analysis Sample Report

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\Biokemi\Batches\QuantResults\140912.batch.bin
Analysis Time 9/15/2014 10:23 AM **Analyst Name** admin
Report Time 9/15/2014 10:25 AM **Reporter Name** admin
Last Calib Update 9/15/2014 10:23 AM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2014-09-12 17:02 **Data File** 14091212.d
Position P1-B2 **Sample Name** M1_2
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol -1 **Acq Method File** Cyanotoxins.m
Sample Type Sample **Comment**

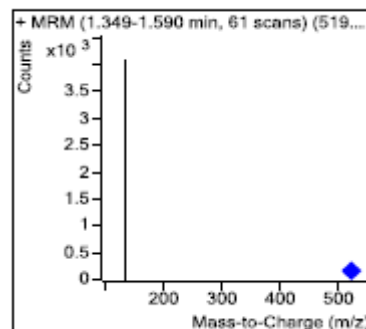
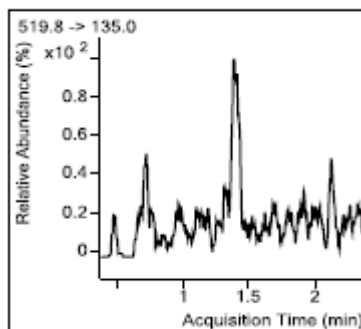
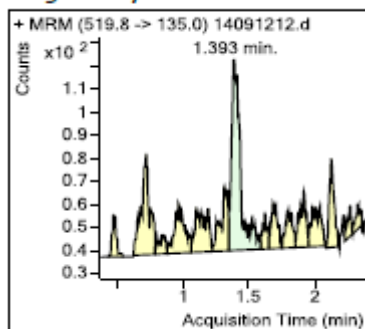
Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
dmMCRR		1.338	113			0.8223	
✓ MCR		1.393	393			12.3158	
dmMCYR		2.898	113			0.0171	
MCYR		1.989	236			2.0688	
dmMCLR		2.130	11			0.0249	
MCLR		2.137	15			8.7238	

Target Compound MCR



Prilog IV Hromatogram detektovanog MC-RR u uzorku 3 mišića ribe

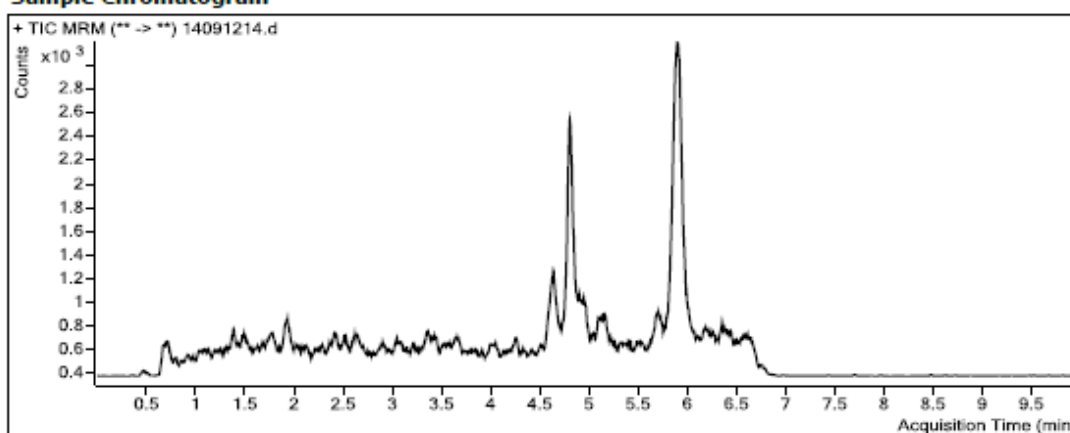
Quantitative Analysis Sample Report

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\Biokemi\Batches\QuantResults\140912.batch.bin
 Analysis Time 9/15/2014 10:23 AM Analyst Name admin
 Report Time 9/15/2014 10:25 AM Reporter Name admin
 Last Calib Update 9/15/2014 10:23 AM Batch State Processed

Analysis Info

Acq Time 2014-09-12 17:24 Data File 14091214.d
 Position P1-B4 Sample Name M3_2
 Dilution 1 Sample Info
 Inj Vol -1 Acq Method File Cyanotoxins.m
 Sample Type Sample Comment

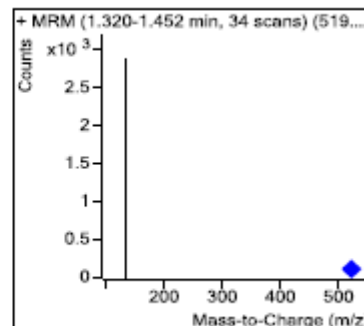
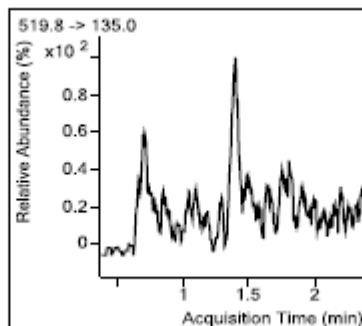
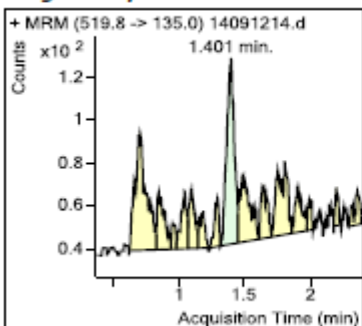
Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
dmMCRR		1.318	232			0.8458	
✓ MCRR		1.401	340			12.2817	
dmMCYR		1.922	1246			0.0405	
MCYR		2.052	122			1.6865	
dmMCLR		2.067	14			0.0251	
MCLR		2.133	18			8.7883	

Target Compound MCRR



Prilog V Hromatogram detektovanog MC-RR u uzorku 7 mišića ribe

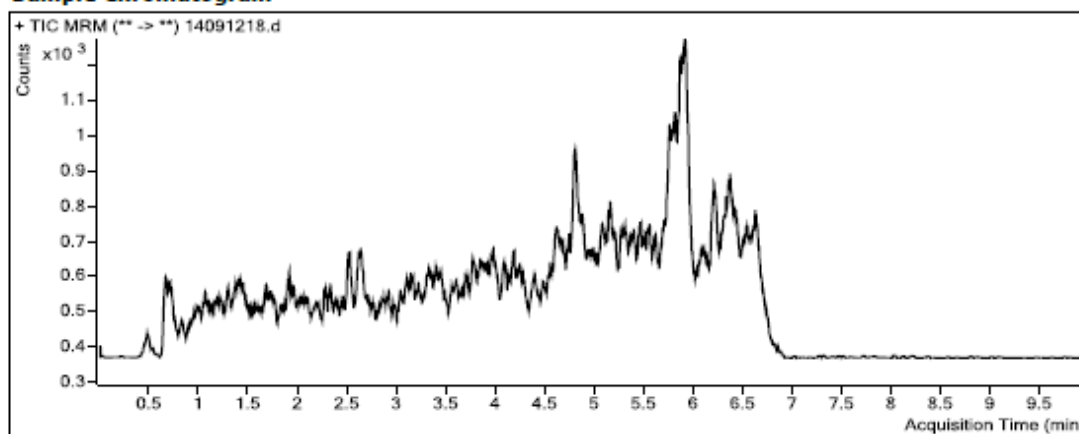
Quantitative Analysis Sample Report

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\Bioskemi\Batches\QuantResults\140912.batch.bin
Analysis Time 9/15/2014 10:23 AM **Analyst Name** admin
Report Time 9/15/2014 10:25 AM **Reporter Name** admin
Last Calib Update 9/15/2014 10:23 AM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2014-09-12 18:07 **Data File** 14091218.d
Position P1-B8 **Sample Name** M7_2
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol -1 **Acq Method File** Cyanotoxins.m
Sample Type Sample **Comment**

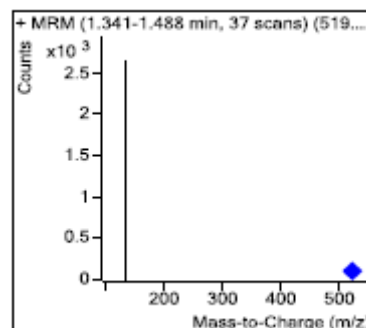
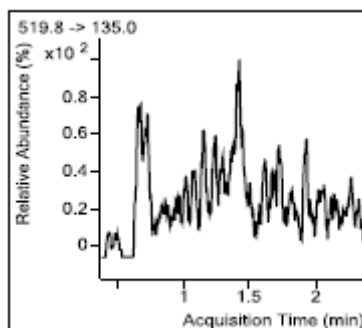
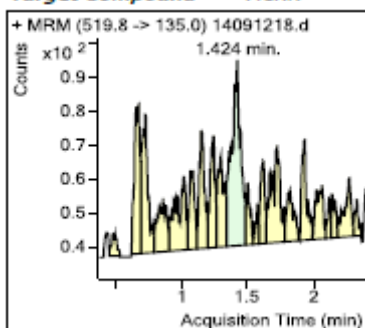
Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
dmMCRR		1.346	101			0.8201	
✓ MCRR		1.424	261			12.2303	
dmMCYR		1.926	672			0.0286	
MCYR		2.016	141			1.7514	
dmMCLR		1.953	6			0.0246	
MCLR		2.130	17			8.7556	

Target Compound MCRR



Prilog VI Hromatogram detektovanog MC-RR u uzorku 9 mišića ribe

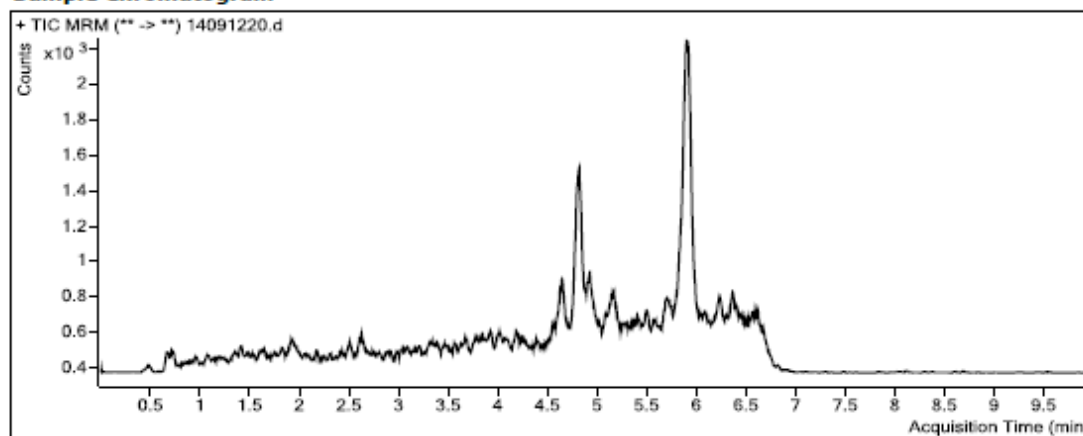
Quantitative Analysis Sample Report

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\Biokemi\Batches\QuantResults\140912.batch.bin
Analysis Time 9/15/2014 10:23 AM **Analyst Name** admin
Report Time 9/15/2014 10:25 AM **Reporter Name** admin
Last Calib Update 9/15/2014 10:23 AM **Batch State** Processed

Analysis Info

Acq Time 2014-09-12 18:28 **Data File** 14091220.d
Position P1-C1 **Sample Name** M9_2
Dilution 1 **Sample Info**
Inj Vol -1 **Acq Method File** Cyanotoxins.m
Sample Type Sample **Comment**

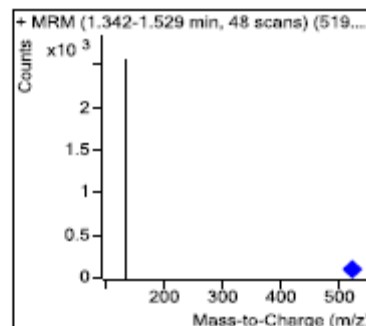
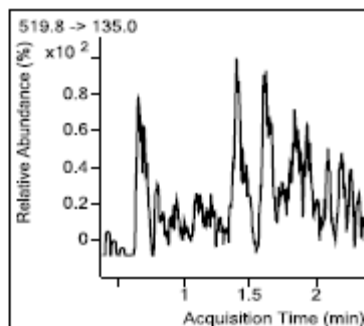
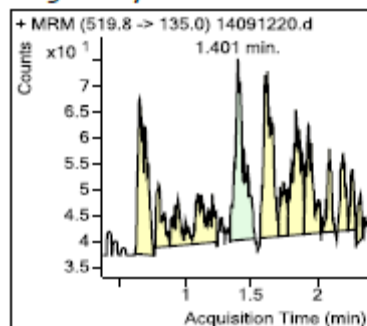
Sample Chromatogram



Quantitation Results

Compound	ISTD	RT	Response	ISTD Resp	RR	Conc	Accuracy
dmMCRR		1.307	26			0.8053	
✓ MCRR		1.401	160			12.1644	
dmMCYR		1.922	613			0.0274	
MCYR		2.052	86			1.5653	
dmMCLR		2.174	10			0.0249	
MCLR		2.157	13			8.6968	

Target Compound MCRR



Biografija



Damjana (Bogdan) Drobac je rođena 10.09.1985. godine u Zagrebu gde je pohađala prva dva razreda Osnovne škole „Grigor Vitez“. Školovanje nastavlja u Novom Sadu gde završava Osnovnu školu „Petefi Šador“ i 2000. godine upisuje Srednju medicinsku školu „7. april“, smer medicinski tehničar. 2004. godine je maturirala i upisala Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, odsek za biologiju i ekologiju, smer diplomirani biolog. Tokom osnovnih studija dobitnik je nagrada Prirodno-matematičkog fakulteta i Univerziteta u Novom Sadu za postignute rezultate tokom studiranja i dobitnik je stipendije Ministarstva prosvete i sporta Srbije. Osnovne studije je završila u roku, 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,39. Školske 2008/09 godine upisuje diplomske akademske-master studije, smer diplomirani biolog-master (mikrobiologija). 2009/10 godine upisuje drugi dvogodišnji master-profesor biologije. Oba mastera je završila u roku i sa prosečnom ocenom 9,95. Takođe, 2009. godine upisuje doktorske studije bioloških nauka i sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija položila je sa ocenom 10. U zvanje istraživača pripravnika izabrana je marta 2009., a istraživača saradnika 2012. godine. Dobitnik je stipendije za doktorante Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj 2009. godine, a 2011. se zapošljava na Republičkom projektu “Transformacija geoprostora Srbije-prošlost, savremeni problemi i predlozi rešenja“. Dve godine je bila angažovana za izvođenje vežbi iz predmeta Anatomija i morfologija biljaka na Katedri za Botaniku, a zatim i dve godine na predmetu Biologija ćelije na Katedri za Humanu biologiju i Metodiku nastave biologije. Takođe, pomaže u održavanju kolekcije kultura cijanobakterijskih sojeva Departmana za biologiju i ekologiju. Član je Laboratorije za paleoekološku rekonstrukciju (LAPER). Pored toga, iz dosadašnjeg naučnog rada proizašlo je oko 15 radova i saopštenja od kojih se 5 radova nalazi na SCI listi. Bavi se proučavanjem cijanobakterija, cijanotoksina i njihovih negativnih efekata na zdravlje ljudi i na vodene ekosisteme. Analizira, na epidemiološkom nivou, povezanost pojave malignih bolesti i cvetanja cijanobakterija, takođe ispituje potencijalne puteve ekspozicije ljudi cijanotoksinima, kao i prenošenje cijanotoksina kroz lance ishrane.

Novi Sad, 27.04.2015.

Damjana Drobac

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	Damjana Drobac
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Zorica Svirčev
Naslov rada: NR	Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima i njihov uticaj na zdravlje
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Srbija, Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 8 stranica 242 referenci 623 grafikona 42 tabela 39 slika 25 šema 4 priloga 6
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Hidrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Cijanobakterije, Cijanotoksini, Cvetanje Vode, Čovek, Epidemiologija, Putevi izlaganja, Srbija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, Srbija

Važna napomena: VN	-
<p>Izvod: IZ</p> <p>Toksične cijanobakterije i cijanotoksini detektovani su u akumulacijama za snabdevanje vodom za piće, rekreaciju, navodnjavanje i ribnjacima na teritoriji Srbije. Cvetanje <i>Planktothrix rubescens</i> i mikrocistini su detektovani u jezeru Vrutci, akumulaciji za snabdevanje vodom za piće Užica, koja služi i u rekreativne svrhe. Izrazita toksičnost (<i>Artemia salina</i> bioesej) i visoke koncentracije mikrocistina (LC-MS/MS) su pronađene u biomasi iz jezera, a u jezerskoj i vodovodnoj vodi je detektovan dmMC-RR. Mikrocistini (MC-LR, MC-RR i njihove dimetilovane forme) su detektovani u tkivu ribe iz jezera Vrutci. Na osnovu epidemioloških podataka i rezultata sprovedenog upitnika iz Užica, mogu se pretpostaviti neki akutni negativni efekti cijanobakterija i cijanotoksina na ljude (stomačne tegobe, iritacije kože i očiju, učestale glavobolje) i na druge izložene organizme (ribe, pse).</p> <p>U Centralnoj Srbiji uočena je povezanost povećanih incideneci pojedinih kancera (primarnog kancera jetre; mozga; srca, medijastinuma i plućne maramice; jajnika; testisa; želuca; kolorektuma; retroperitoneuma i peritoneuma; leukemija; i malignog melanoma kože) sa pojavom cvetanja u akumulacijama za vodosnabdevanje. U tri kritična okruga (Nišavski, Šumadijski i Toplički) koja se snabdevaju vodom za piće iz akumulacija koje cvetaju, incidence navedenih kancera su tokom desetogodišnjeg perioda bile znatno više u poređenju sa ostatalim okruzima Centralne Srbije i Vojvodine. Takođe, tokom posmatranog perioda nije uočena korelacija između incidence primarnog kancera jetre i njegovih glavnih faktora rizika (ciroze jetre, HCV i HBV). Cijanotoksini mogu biti jedan od faktora rizika koji zajedno sa drugim faktorima deluju sinergistički i dovode do povećanja incidence pojedinih kancera.</p> <p>U kompleksu ribnjaka Vojvodine (13 analiziranih) tokom leta 2011. zabeleženo je cvetanje, a u uzorcima vode su detektovani (ELISA) mikrocistin, nodularin (11 ribnjaka) i saksitoksin (5 ribnjaka). MC-RR je pronađen u četiri uzorka mišićnog tkiva šarana (<i>Cyprinus carpio</i>) iz ovih ribnjaka. Uočene su i histopatološke promene na organima (creva, jetra, bubrezi, škrge i mišići) ribe gajene u ribnjacima koji su cvetali. Posmatrani negativni efekti i akumulacija cijanotoksina u tkivima riba ukazuju da cvetanje cijanobakterija u ribnjacima može da utiče na kvalitet ribe, ali i potencijalno na zdravlje potrošača.</p> <p>Do masivnog pomora ribe došlo je u Aleksandrovačkom jezeru gde je cvetao <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>. <i>Artemia salina</i> test ukazao je na prisustvo toksičnih jedinjenja u cijanobakterijskim ćelijama, međutim mikrocistini, cilindrospermopsin i saksitoksin nisu detektovani. Postoji mogućnost da je neki drugi, neidentifikovani ili nepoznati cijanobakterijski metabolit doveo do uginuća ribe u akumulaciji koja se koristi za navodnjavanje. Cijanotoksini mogu da se akumuliraju u plodovima biljaka koje se zalivaju kontaminiranom vodom u kojoj se nalaze cijanotoksini. Nakon tromesečnog zalivanja paprika (<i>Capsicum anuum</i>) sa ekstraktom <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806, mikrocistini su detektovani u plodu paprike. Mikrocistini su indukovali oksidativni stres kod eksperimentalne biljke i u velikoj meri uticali na smanjenje njene antioksidantne sposobnosti. Zalivanje biljaka, koje se koriste u ljudskoj ishrani, sa kontaminiranom vodom usled cvetanja, može da ima negativne efekte na biljke ali potencijalno i ljude koji ih konzumiraju.</p> <p>Mikrocistini (MC-LR i dmMC-LR) su detektovani u dva testirana suplementa na bazi cijanobakterija koji se prodaju na našem tržištu, u koncentracijama koje prevazilaze preporučene granične vrednosti. Dugotrajna upotreba ovih preparata u velikim količinama, može da predstavlja rizik po ljudsko zdravlje.</p> <p>Na osnovu dobijenih podataka za teritoriju Republike Srbije, ljudi mogu na različite načine da budu izloženi cijanobakterijama i njihovim toksičnim metabolitima i da usled toga imaju zdravstvene posledice, iz tog razloga treba uvesti kontrolu cijanobakterija i cijanotoksina u vodi, hrani i suplementima.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	26.03.2015.

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: dr Jelica Simeunović, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu mentor: dr Zorica Svirčev, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu član: dr Edita Stokić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

**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	Damjana Drobac
Mentor: MN	Prof. dr Zorica Svirčev
Title: TI	Human exposure to cyanotoxins and their health effects
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	2015.
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 8 pages 242 literature 623 graphs 42 tables 39 pictures 25 shemes 4 additional lists 6

Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Hidrobiology
Subject, Key words SKW	Cyanobacteria, Cyanotoxins, Epidemiology, Exposure pathways, Freshwater blooms, Human, Serbia
UC	
Holding data: HD	Faculty of Sciences Library, 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, Republic of Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	<p>Toxic cyanobacteria and cyanotoxins were detected in reservoirs for drinking water supply, recreation, irrigation and fishponds on the territory of Serbia. Following blooming of <i>Planktothrix rubescens</i> microcystins were detected in the lake Vrutci, the reservoir for drinking water supply of Užice, which is also used for recreational purposes. Pronounced toxicity (<i>Artemia salina</i> bioassay) and high concentrations of microcystins (LC-MS/MS) were found in biomass, while in the lake and tap water dmMC-RR was detected. MC-LR, MC-RR and their dimethylated forms were detected in fish tissue from lake Vrutci. On the basis of epidemiological data and the results of questionnaire conducted in Užice, some acute adverse effects of cyanobacteria and cyanotoxins on people (abdominal problems, skin and eye irritation, frequent headaches), and the other exposed organisms (fish, dogs) could be assumed.</p> <p>In Central Serbia correlation between blooming in reservoirs for water supply and increased incidence of certain cancers (primary liver cancer; brain; heart, mediastinum and pleura; ovary; testis; stomach; colorectum; retroperitoneum and peritoneum; leukemia; and malignant melanoma of skin) was observed. During the ten-year period in three critical districts (Nišavski, Šumadijski and Toplički), which are supplied with drinking water from blooming reservoirs, the incidence of mentioned cancers were significantly higher compared with remaining districts of Central Serbia and Vojvodina. In addition, during this period correlation between the incidence of primary liver cancer and its major risk factors (liver cirrhosis, HCV and HBV) was not observed. Accordingly, cyanotoxins may be one of the risk factors that, together with other factors act synergistically and lead to increased incidence of certain cancers.</p> <p>In the summer of 2011, complex of fishponds in Vojvodina (13 analyzed) was blooming, and in water samples microcystin, nodularin (11 ponds) and saxitoxin (5 ponds) were detected (ELISA). MC-RR was found in four samples of carp (<i>Cyprinus carpio</i>) muscle tissue from investigated fishponds. Histopathological changes in organs (intestines, liver, kidneys, gills and muscles) of fish grown in blooming ponds were also observed. The observed negative effects and cyanotoxin accumulation in fish, suggest that blooming of cyanobacteria in fishponds may affect the quality of the fish, but also potentially the health of consumers.</p> <p>A massive fish kill occurred in Aleksandrovac lake, where <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> bloomed. <i>Artemia salina</i> test indicated the presence of toxic compounds in a cyanobacterial cells, however microcystins, cylindrospermopsin and saxitoxin were not detected. There is a possibility that another, unidentified or unknown cyanobacterial metabolite led to fish mortality in this reservoir used for irrigation. Cyanotoxins may accumulate in the fruits of plants that are irrigated with contaminated water containing cyanotoxins. After watering pepper (<i>Capsicum annuum</i>) for three-months with extract of <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806, microcystins were detected in fruit. Microcystin induced oxidative stress in experimental plants and influenced the reduction of its antioxidant capabilities. Irrigation of plants used for human nutrition, with contaminated water due to blooming, can have negative effects on plants and potentially humans who consume them.</p>

Microcystins (MC-LR and dmMC-LR) were also detected in the two tested cyanobacterial supplements from Serbian market, in concentrations that exceed the recommended guideline values. Therefore, long-term use of these products in large quantities, may present a risk to human health.

Based on the obtained data on the territory of the Republic of Serbia, people can in various ways, be exposed to cyanobacteria and their toxic metabolites, and as a consequence can have health problems, thus presence of cyanobacteria and cyanotoxins in water, food and supplements should be controlled.

Accepted on Senate on: AS	26.03.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: dr Jelica Simeunović, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad mentor: dr Zorica Svirčev, Full Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad member: dr Edita Stokić, Full Professor, Faculty of Medicine, Novi Sad