



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



**CVETANJE CIJANOBAKTERIJA,  
PRISUSTVO CIJANOTOKSINA I NJIHOV  
UTICAJ NA RIBE U POJEDINIM  
JEZERSKIM EKOSISTEMIMA SRBIJE I  
MAĐARSKE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
Dr Nada Tokodi

Kandidat:  
Zoran Marinović

Novi Sad, 2021

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA<sup>1</sup>

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Zoran Marinović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr Nada Tokodi, naučni saradnik Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada:	Cvetanje cijanobakterija, prisustvo cijanotoksina i njihov uticaj na ribe u pojedinim jezerskim ekosistemima Srbije i Mađarske
Jezik publikacije (pismo):	Srpski jezik / latinica
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica 179 Poglavlja 7 Referenci 435 Tabela 25 Slika 47 Grafikona / Priloga 5
Naučna oblast:	Biologija
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Hidrobiologija
Ključne reči / predmetna odrednica:	Cijanobakterije, cijanotoksini, mikrocistin, histopatologija, Ludaš, Fehervarčurgo, Kiš-Balaton, Balaton
Rezime na jeziku rada:	U poslednjih nekoliko decenija, usled antropogenog efekta dolazi do narušavanja kvaliteta vode i eutrofizacije mnogih slatkovodnih ekosistema. U uslovima povećane koncentracije nutrijenata u vodi dolazi do prenamnožavanja cijanobakterija koje se naziva cvetanje cijanobakterija. Cilj ovog rada je bio ispitivanje pojave cvetanja cijanobakterija, produkcije cijanotoksina i uticaja ovih toksina na ribe u odabranim ekosistemima Srbije i Mađarske. Loš kvalitet vode i povećane koncentracije azotnih i fosfatnih jedinjenja detektovani su na jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, dok je voda jezera Balaton bila boljeg kvaliteta. U jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo je došlo do intenzivnog cvetanja cijanobakterija gde je broj ćelija po mililitru u pojedinim mesecima iznosio i po nekoliko miliona. Najdominantniji taksoni su bili predstavnici rodova <i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> i <i>Dolichospermum</i> . Mikrocistin- i saksitoksin-kodirajući geni su amplifikovani u biomasi cijanobakterija sva četiri analizirana jezera ukazujući na postojanje toksičnih sojeva cijanobakterija. Različite strukturne varijante mikrocistina su izmerene u jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, dok u jezeru Balaton ovi toksini nisu detektovani. Cilindrospermopsin nije kvantifikovan ni u jednom analiziranom jezeru. Takođe, akumulacija cijanotoksina nije izmerena u

<sup>1</sup> Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće Obrasce:

5b – Izjava o autorstvu;

5v – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5g – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

	<p>tkviima riba ni jednog od analiziranih jezera. Ribe izlovljene iz jezera Ludaš i Kiš-Balaton su pokazale značajna oštećenja jetre, bubrega i škrge, dok su oštećenja ovih organa kod riba iz jezera Fehervarčurgo i Balaton bila manja. Ribe izlovljene iz jezera Kiš-Balaton tokom juna 2019. godine su takođe pokazale promene u aktivnosti enzima biotransformacije, kao i povećanu lipidnu peroksidaciju i promene u aktivnosti antioksidativnih enzima ukazujući na oksidativni stres. Podaci prikupljeni tokom izrade ove doktorske disertacije ukazuju na intenzivno cvetanje cijanobakterija na jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, kao i na potencijalnu opasnost i negativne efekte na zdravne organizama izloženih cvetanju cijanobakterija u ovim ekosistemima, te su dalji monitoring, a potencijalno i sanacija ovih jezera potrebni u budućnosti.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	29.10.2020.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Zorica Svirčev; redovni profesor; Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad</p> <p>Član: dr Snežana Simić, redovni profesor, Institut za biologiju i ekologiju, PMF, Kragujevac</p> <p>Član: dr Desanka Kostić, docent, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad</p> <p>Član: dr Božidar Rašković, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd</p> <p>Član: dr Damjana Drobac Backović, naučni saradnik, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad</p>
Napomena:	<p>Izrada doktorske disertacije je finansirana od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (451-03-9/2021-14/200125 i 451-03-9/2021-14/200122), bilateralnog projekta između Srbije i Mađarske (451-03-02294/2015-09/3; TÉT_16-1-2016-0176), Ministarstva za inovacije i tehnologiju Republike Mađarske (TKP2020-NKA-16) i Evropskog fonda za regionalni razvoj i vlade Republike Mađarske (GINOP 2.3.2-15-2016-00003).</p>

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Zoran Marinović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr Nada Tokodi, research associate, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad
Thesis title:	Cyanobacterial blooming, presence of cyanotoxins and their effects on fish of several select freshwater ecosystems of Serbia and Hungary
Language of text (script):	Serbian language / latin script
Physical description:	Number of: Pages 179 Chapters 7 References 435 Tables 25 Illustrations 47 Graphs / Appendices 5
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Hydrobiology
Subject, Key words:	Cyanobacteria, cyanotoxins, microcystins, histopathology, Ludaš, Fehérvárcsurgó, Kis-Balaton, Balaton
Abstract in English language:	In the last several decades, an intense deterioration of water quality followed by subsequent eutrophication is occurring in many freshwater ecosystems due anthropogenic effects. Conditions of highened nutrient concentrations and eutrophication cause intense cyanobacterial proliferations termed cyanobacterial blooming. The aim of this study was to investigate cyanobacterial blooming, potential cyanotoxin production and their effects on fish in four select ecosystems of Serbia and Hungary. Poor water quality and higher concentrations on nitrogen and phosphorus compounds were observed in lakes Ludaš, Fehérvárcsurgó and Kis-Balaton, while the water quality of Lake Balaton was better. Intense cyanobacterial blooms occurred in these three lakes with the numbers of cyanobacterial cells/ml being several million during some months. The most numerous taxa belonged to genera <i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> and <i>Dolichospermum</i> . Microcystin- and saxitoxin-coding genes were amplified in the biomass of all four lakes indicating a presence of potentially toxin-producing strains. Different microcystin structural variants were detected in lakes Ludaš, Fehérvárcsurgó and Kis-Balaton, while these toxins were not quantified in Lake Balaton. Cylindrospermopsin was not detected in any of the analyzed lakes. Additionally, toxins were not accumulated in fish tissues in any of the analyzed lakes. Fish sampled from

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at he faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>lakes Ludaš and Kis-Balaton displayed severe histopathological alterations of liver, kidney and gills, while these alterations were milder in fish from lakes Fehérvárcsurgó and Balaton. Fish sampled from Lake Kiš-Balaton in June of 2019. displayed alterations in the activity of detoxication enzymes, as well as lipid peroxidation and alterations in the activity of antioxidant enzymes indicating that these fish were under oxidative stress. Results obtained during this study demonstrate intense cyanobacterial blooming in lakes Ludaš, Fehérvárcsurgó and Kis-Balaton, as well as potential danger and negative effects that such blooming can cause in organisms that are in contact with these ecosystems. Therefore, further monitoring, and potentially sanitation, of these ecosystems is imperative in the future.</p>
Accepted on Scientific Board on:	29.10.2020.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Dr Zorica Svirčev, Full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad</p> <p>Member: dr Snežana Simić, Full professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac</p> <p>Member: Dr Desanka Kostić, Associate professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad</p> <p>Member: Dr Božidar Rašković, Associate professor, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade</p> <p>Member: Dr Damjana Drobac Backović, Research associate, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad</p>
Note:	<p>The work conducted during the dissertation was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (451-03-9/2021-14/ 200125 and 451-03-9/2021-14/200122), Bilateral project between Serbia and Hungary (451-03-02294/2015-09/3; TÉT_16-1-2016-0176), Ministry of Innovation and Technology of Hungary (TKP2020-NKA-16) and the European Regional and Development Fund and the Government of Hungary (GINOP 2.3.2-15-2016-00003).</p>

## Zahvalnica

Na prvom mestu želim da se zahvalim mentorki Dr Nadi Tokodi na svim dobronamernim savetima i pomoći pruženoj tokom dugogodišnje saradnje. Takođe se zahvaljujem predsednici komisije Dr Zorici Svirčev, kao i članovima komisije Dr Snežani Simić, Dr Božidaru Raškoviću i Dr Damjani Drobac Backović na pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove disertacije. Posebno hvala dugujem Dr Desanki Kostić i Dr Jeleni Lujčić sa kojima sam i počeo da sarađujem tokom studija, i bez kojih nikad ne bih bio tu gde jesam. Hvala puno na svemu!

Posebnu zahvalnost takođe dugujem svojoj kolegici Ivi Uzelac bez koje bi ovaj put bio mnogo, mnogo teži. Njena bezrezervna podrška i pomoć su mi uvek davali vetar u leđa i uvek sam mogao da se oslonim na nju. Takođe, zahvaljujem se Dr Horvath Ákosu, kao i celom našem timu bez čijeg razumevanja i podrške ne bih mogao da završim ovaj rad.

Zahvalnost takođe dugujem kolegama koji su direktno pomogli u izradi disertacije. Hvala Dr Jussi Meriuoto-u, Tamari Dulić i kolegama sa Åbo Akademi Univerziteta, kao i Henni Saveli sa Univerziteta u Turku-u u Finskoj na pomoći tokom analiza kvantifikacije cijanotoksina i ekspresije cijanotoksin-kodirajućih gena; Neveni Đorđević sa Univerziteta u Kragujevcu na pomoći u determinaciji zajednica cijanobakterija; Dr Ferincz Árpádu i Dr Staszny Ádámu sa Mađarskog Univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke u Mađarskoj na pomoći tokom uzorkovanja u Mađarskoj; Dr Branku Miljanoviću i njegovim saradnicima na pomoći tokom uzorkovanja u Srbiji; Dr Ács Andrásu na pomoći tokom molekularnih i biohemijjskih analiza.

Na kraju, hvala svim prijateljima koji su me podržavali i bili uz mene tokom svih ovih godina. Naravno, najveće hvala mojoj porodici koja me je uvek razumela i bezrezervno podržavala od samog početka.

Hvala puno svima!

Izrada doktorske disertacije je finansirana od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (451-03-9/2021-14/200125 i 451-03-9/2021-14/200122), bilateralnog projekta između Srbije i Mađarske (451-03-02294/2015-09/3; TÉT\_16-1-2016-0176), Ministarstva za inovacije i tehnologiju Republike Mađarske (TKP2020-NKA-16) i Evropskog fonda za regionalni razvoj i vlade Republike Mađarske (GINOP 2.3.2-15-2016-00003).

## Biografija



Zoran Marinović je rođen 7.12.1990. u Subotici, Republici Srbiji. Osnovnu školu i gimnaziju „Svetozar Marković“ je završio u rodnom gradu. Osnovne studije je počeo na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu u 2009. godini na modulu „molekularni biolog“. Osnovne studije završava 2013. godine sa prosečnom ocenom od 9,18/10. Iste godine upisuje master studije na modulu „zoologija“ na istoj instituciji, i završava ih 2014. godine sa prosečnom ocenom 10/10. Iste godine upisuje doktorske studije na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Od svoje druge godine osnovnih studija počinje da se bavi naučno-istraživačkim radom u okviru katedre za zoologiju Departmana za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu. Prvo se bavio oblastima ihtiologije, hidrobiologije i histologije, a nakon nekoliko godina uključuje se i u istraživanja reproduktivne i ćelijske biologije riba. Kao rezultat dosadašnjeg rada, publikovao je više od 110 naučnih publikacija, od čega jedno poglavlje u knjizi, 28 radova u časopisima na SCI listi, i mnogobrojna saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima. Do sada je išao na studijske boravke u nekoliko država uključujući Japan, Izrael, Češku, Portugal, Španiju i druge, i prezentovao je svoje rezultate na brojnim naučnim konferencijama širom sveta. Osvojio je šest COST grantova za studijske boravke i treninge, kao i Aquaexcel i ICGEB grantove za istraživanja u Češkoj i Italiji. Na naučnom skupu „6<sup>th</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes“ organizovanom 2017. godine u Češkoj osvaja prvu nagradu za najbolju prezentaciju, a na naučnom skupu „55rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology“ organizovanom 2018. godine u Španiji osvaja prestižnu „Peter L. Steponkus Crystal Award“ dodeljenu od strane Zajednice za kriobiologiju. Temom cijanobakterija i njihovim uticajem na ribe se bavi još od 2011. godine, što je rezultovalo izlaganjima na nekoliko međunarodnih konferencija, objavljivanjem 7 naučnih publikacija u časopisima sa SCI liste, kao i izradom ove doktorske disertacije.

## Sadržaj

Lista skraćenica.....	1
Rezime .....	3
Abstract.....	4
1 Uvod.....	5
2 Pregled literature.....	8
2.1 Cijanobakterije .....	8
2.1.1 Ultrastruktura i morfologija .....	8
2.1.2 Metabolizam i fiziologija.....	10
2.2 Cvetanje cijanobakterija.....	11
2.2.1 Glavni uzročnici cvetanja cijanobakterija.....	13
2.3 Cijanotoksini .....	14
2.3.1 Mikrocistini (MC).....	15
2.3.1.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija mikrocistina .....	16
2.3.2 Nodularin (NOD).....	19
2.3.2.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija nodularina.....	20
2.3.3 Cilindrospermopsin (CYN).....	21
2.3.3.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija cilindrospermopsina.....	22
2.3.4 Anatoksin-a (ATX-a).....	24
2.3.4.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija anatoksina-a.....	25
2.3.5 Saksitoksin (STX).....	26
2.3.5.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija saksitoksina .....	27
2.4 Uticaj cijanotoksina na ribe.....	28
2.4.1 Načini izlaganja .....	28
2.4.2 Apsorpcija i akumulacija cijanotoksina .....	29
2.4.3 Toksični efekti cijanotoksina ispoljeni kod riba .....	30
2.5 Biomarkeri zagađenja životne sredine .....	31
2.5.1 Markeri bioakumulacije .....	32
2.5.2 Biomarkeri .....	33
2.5.2.1 Enzimi biotransformacije .....	35
2.5.2.2 Parametri oksidativnog stresa .....	38
2.5.2.3 Morfološki parametri - histopatologija.....	39
2.6 Lokaliteti Srbije i Mađarske od posebnog značaja.....	40
2.6.1 Lokalitet Srbije od posebnog značaja (jezero Ludaš) .....	40



---

2.6.2	Lokalizacija Mađarske od posebnog značaja (Sistem Kiš-Balaton, jezero Balaton i jezero Fehervarčurgo) .....	41
3	Ciljevi rada.....	44
4	Materijal i metode .....	45
4.1	Opis lokaliteta .....	45
4.1.1	Opis jezera Ludaš.....	45
4.1.2	Opis jezera Kiš-Balaton i Balaton.....	45
4.1.3	Opis jezera Fehervarčurgo .....	47
4.2	Uzorkovanje vode i riba .....	47
4.2.1	Uzorkovanje na jezeru Ludaš.....	47
4.2.2	Uzorkovanje na jezerima Kiš-Balaton i Balaton .....	48
4.2.3	Uzorkovanje na jezeru Fehervarčurgo .....	49
4.2.4	Kontrolne jedinice za molekularne, biohemijske i histološke analize.....	50
4.3	Analiza fizičko-hemijskih parametara vode.....	51
4.4	Kvalitativna i kvantitativna analiza zajednice cijanobakterija .....	51
4.5	Određivanje prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena .....	51
4.5.1	Referentni sojevi .....	51
4.5.2	Ekstrakcija DNK.....	52
4.5.3	Kvalitativna lančana reakcija polimeraze (PCR).....	53
4.6	Analize prisustva cijanotoksina.....	54
4.6.1	Standardi za određene cijanotoksine.....	54
4.6.2	Priprema uzoraka vode za analizu prisustva cijanotoksina.....	55
4.6.3	Priprema uzoraka riba za analizu prisustva cijanotoksina .....	55
4.6.4	Tečna hromatografija visoke moći razdvajanja sa UV detektorom na bazi fotoosetljivih dioda (HPLC-DAD) .....	56
4.6.5	Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) .....	57
4.7	Histološke analize .....	58
4.7.1	Priprema uzoraka .....	58
4.7.2	Polukvantitativna analiza .....	60
4.8	Molekularne i biohemijske analize .....	62
4.8.1	Priprema uzoraka .....	62
4.8.2	Analize oštećenja DNK.....	63
4.8.2.1	Fragmentacija DNK.....	63
4.8.2.2	Metilacije DNK .....	63
4.8.3	Aktivnost enzima biotransformacije .....	64

---

4.8.3.1	Aktivnost Cyp1A1 enzima .....	64
4.8.3.2	Aktivnost GST .....	64
4.8.4	Parametri oksidativnog stresa .....	65
4.8.4.1	Lipidna perkosidacija (LPO) .....	65
4.8.4.2	Aktivnost CAT .....	65
4.8.4.3	Aktivnost SOD .....	65
4.8.4.4	Aktivnost GPx .....	66
4.8.4.5	Aktivnost GR .....	66
4.9	Statistička analiza podataka .....	66
5	Rezultati i diskusija .....	67
5.1	Jezero Ludaš .....	67
5.1.1	Fizičko-hemijski parametri vode jezera Ludaš .....	67
5.1.2	Sastav zajednice cijanobakterija jezera Ludaš .....	68
5.1.3	Prisustvo cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija jezera Ludaš . .....	71
5.1.4	Prisustvo cijanotoksina u uzorcima vode i tkiva riba iz jezera Ludaš .....	72
5.1.5	Histopatološke promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Ludaš .....	73
5.1.5.1	Jetra .....	74
5.1.5.2	Bubreg .....	77
5.1.5.3	Škrge .....	79
5.1.5.4	Ostali organi .....	82
5.1.6	Opasnost cvetanja cijanobakterija po ptice vodenih ekosistema .....	84
5.1.7	Potencijalni načini za poboljšanje statusa jezera Ludaš .....	85
5.2	Jezeru Kiš-Balaton i Balaton .....	87
5.2.1	Fizičko-hemijski parametri vode jezera Kiš-Balaton i Balaton .....	87
5.2.2	Sastav zajednice cijanobakterija jezera Kiš-Balaton i Balaton .....	89
5.2.3	Prisustvo cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija iz jezera Kiš- Balaton i Balaton .....	92
5.2.4	Prisustvo cijanotoksina u vodi i tkivima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton i Balaton .....	93
5.2.5	Histopatološke promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton i Balaton .....	94
5.2.5.1	Jetra .....	94
5.2.5.2	Bubreg .....	97
5.2.5.3	Škrge .....	100
5.2.5.4	Ostali organi .....	103

---

5.2.6	Molekularne i biohemijske promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton .....	104
5.2.6.1	Analize oštećenja DNK .....	104
5.2.6.2	Aktivnost enzima biotransformacije.....	105
5.2.6.3	Parametri oksidativnog stresa .....	105
5.2.7	Uloga jezera Kiš-Balaton u zaštiti kvaliteta vode jezera Balaton.....	108
5.3	Jezero Fehervarčurgo .....	110
5.3.1	Fizičko-hemijski parametri vode jezera Fehervarčurgo .....	110
5.3.2	Sastav zajednice cijanobakterija jezera Fehervarčurgo .....	111
5.3.3	Prisustvo cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija jezera Fehervarčurgo .....	112
5.3.4	Prisustvo cijanotoksina u uzorcima vode i tkiva riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo .....	113
5.3.5	Histopatološke promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo ..	114
5.3.5.1	Jetra.....	114
5.3.5.2	Bubrezi.....	116
5.3.5.3	Škrge.....	118
5.3.5.4	Ostali organi .....	120
5.3.6	Posledice cvetanja cijanobakterija na upotrebu jezera Fehervarčurgo .....	121
5.4	Opšta diskusija .....	123
5.4.1	Uporedni pregled fizičko-hemijskih parametara vode i cvetanja cijanobakterija . .....	123
5.4.2	Uporedni pregled sastava zajednica cijanobakterija .....	124
5.4.3	Uporedni pregled prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena, cijanotoksina u vodi i akumulacije cijanotoksina u tkivima riba .....	126
5.4.4	Uticao cvetanja cijanobakterija na pojedine biomarkere riba.....	129
5.4.5	Potencijalni zdravstveni rizici uzrokovani cvetanjem cijanobakterija.....	132
6	Zaključci .....	135
7	Literatura.....	137
	Prilozi.....	178

## Lista skraćenica

- AI** – indeks promene (*engl.* Alteration Index)
- ATX** – anatoksin
- BOD** – biološka potrošnja kiseonika (*engl.* Biological Oxygen Demand)
- CAT** – katalaza
- COD** – hemijska potrošnja kiseonika (*engl.* Chemical Oxygen Demand)
- CS** – Australijska nacionalna kolekcija algalnih kultura (*engl.* Australian National Algae Culture Collection)
- CYN** – cilindrospermopsin
- CYP** – familija citohroma
- EROD** – etoksirezorufin *O*-deetilaza
- GPx** – glutation peroksidaza
- GR** – glutation reduktaza
- GSH** – redukovani glutation
- GSSG** – oksidovani glutation
- GST** – glutation-S-transferaza
- HPLC-DAD** – tečna hromatografija visoke moći razdvajanja sa UV detektorom na bazi fotoosetljivih dioda (*engl.* High-performance liquid chromatography with diode-array UV detection)
- IF** – faktor značajnosti (*engl.* Importance Factor)
- LC-MS/MS** – hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (*engl.* Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)
- MC** – mikrocistin
- NOD** – nodularin
- OATP** – superfamilija organskih anjonskih transportnih polipeptida
- PCC** – Pasterova kolekcije kultura (*engl.* Pasteur Culture Collection)
- PP** – protein fosfataze
- ROS** – reaktivne kiseonične vrste (*engl.* Reactive Oxygen Species)
- RT** – sobna temperatura (*engl.* Room Temperature)
- SOD** – superoksid dismutaza
- SOP** - standardni operativni postupak (*engl.* Standard Operating Procedure)
- STX** – saksitoksin
- SYKE** – algalna kultura Finskog Instituta za životnu sredinu

**TOC** – ukupni organski ugljenik (*engl.* Total Organic Carbon)

**TSS** – ukupna količina suspendovanih čestica (*engl.* Total Suspended Solids)

**IBA** – područja značajna za ptice i biodiverzitet (IBA, *engl.* Important Bird and Biodiversity Area)

## Rezime

U poslednjih nekoliko decenija, usled antropogenog efekta dolazi do narušavanja kvaliteta vode i eutrofizacije mnogih slatkovodnih ekosistema. U uslovima povećane koncentracije nutrijenata u vodi dolazi do prenamnožavanja cijanobakterija koje se naziva cvetanje cijanobakterija. Cilj ovog rada je bio ispitivanje pojave cvetanja cijanobakterija, produkcije cijanotoksina i uticaja ovih toksina na ribe u odabranim ekosistemima Srbije i Mađarske. Loš kvalitet vode i povećane koncentracije azotnih i fosfatnih jedinjenja detektovani su na jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, dok je voda jezera Balaton bila boljeg kvaliteta. U jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo je došlo do intenzivnog cvetanja cijanobakterija gde je broj ćelija po mililitru iznosio i po nekoliko miliona u pojedinim mesecima. Najdominantniji taksoni su bili predstavnici rodova *Microcystis*, *Aphanizomenon* i *Dolichospermum*. Mikrocistin- i saksitoksin-kodirajući geni su amplifikovani u biomasi cijanobakterija sva četiri analizirana jezera ukazujući na postojanje toksičnih sojeva cijanobakterija. Različite strukturne varijante mikrocistina su izmerene u jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, dok u jezeru Balaton ovi toksini nisu detektovani. Cilindrospermopsin nije kvantifikovan ni u jednom analiziranom jezeru. Takođe, akumulacija cijanotoksina nije izmerena u tkivima riba ni jednog od analiziranih jezera. Ribe izlovljene iz jezera Ludaš i Kiš-Balaton su pokazale značajna oštećenja jetre, bubrega i škrge, dok su oštećenja ovih organa kod riba iz jezera Fehervarčurgo i Balaton bila manja. Ribe izlovljene iz jezera Kiš-Balaton tokom juna 2019. godine su takođe pokazale promene u aktivnosti enzima biotransformacije, kao i povećanu lipidnu peroksidaciju i promene u aktivnosti antioksidativnih enzima ukazujući na oksidativni stres. Podaci prikupljeni tokom izrade ove doktorske disertacije ukazuju na intenzivno cvetanje cijanobakterija na jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, kao i na potencijalnu opasnost i negativne efekte na zdravlje organizama izloženih cvetanju cijanobakterija u ovim ekosistemima, te su dalji monitoring, a potencijalno i sanacija ovih jezera potrebni u budućnosti.

## Abstract

In the last several decades, an intense deterioration of water quality followed by subsequent eutrophication is occurring in many freshwater ecosystems due anthropogenic effects. Conditions of highened nutrient concentrations and eutrophication cause intense cyanobacterial proliferations termed cyanobacterial blooming. The aim of this study was to investigate cyanobacterial blooming, potential cyanotoxin production and their effects on fish in four select ecosystems of Serbia and Hungary. Poor water quality and higher concentrations on nitrogen and phosphorus compounds were observed in lakes Ludaš, Fehérvárcsurgó and Kis-Balaton, while the water quality of Lake Balaton was better. Intense cyanobacterial blooms occurred in these three lakes with the numbers of cyanobacterial cells/ml being several million during some months. The most numerous taxa belonged to genera *Microcystis*, *Aphanizomenon* and *Dolichospermum*. Microcystin- and saxitoxin-coding genes were amplified in the biomass of all four lakes indicating a presence of potentially toxin-producing strains. Different microcystin structural variants were detected in lakes Ludaš, Fehérvárcsurgó and Kis-Balaton, while these toxins were not quantified in Lake Balaton. Cylindrospermopsin was not detected in any of the analyzed lakes. Additionally, toxins were not accumulated in fish tissues in any of the analyzed lakes. Fish sampled from lakes Ludaš and Kis-Balaton displayed severe histopathological alterations of liver, kidney and gills, while these alterations were milder in fish from lakes Fehérvárcsurgó and Balaton. Fish sampled from Lake Kiš-Balaton in june of 2019. displayed alterations in the activity of detoxication enzymes, as well as lipid peroxidation and alterations in the activity of antioxidant enzymes indication that these fish were under oxidative stress. Results obtained during this study demonstrate intense cyanobacterial blooming in lakes Ludaš, Fehérvárcsurgó and Kis-Balaton, as well as potential danger and negative effects that such blooming can cause in organisms that are in contact with these ecosystems. Therefore, further monitoring, and potentially sanation, of these ecosystems is imperative in the future.

## 1 Uvod

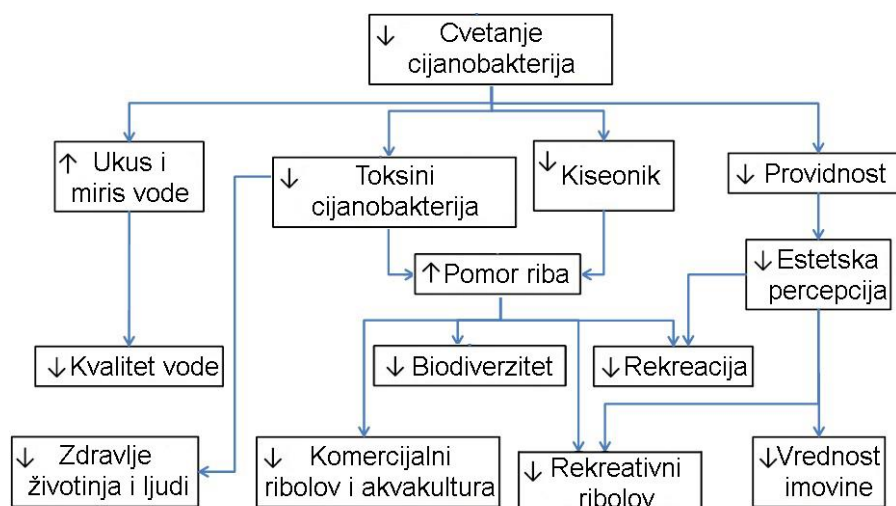
Voda je jedan od najbitnijih resursa na planeti Zemlji. Kao takav, veoma je bitno održavati adekvatan kvalitet vodenih resursa koji će omogućiti optimalne životne uslove za sve organizme. Razni biološki, geološki, hidrološki, meteorološki i topografski faktori imaju bitan uticaj na kvalitet vode raznih ekosistema (Codd, 2000). Međutim, od početka industrijske revolucije, antropogeni faktor je počeo da uzima sve više maha i da sve više utiče na kvalitet vode reka, jezera, akumulacija, estuara, pa čak i mora i okeana. Urbanizacijom i industrijalizacijom je čovek počeo sve više da se otuđuje od prirode, a samim tim da nemarno koristi površinske vode izlivajući u njih otpadne vode iz industrijskih postrojenja, domaćinstava i sa poljoprivrednih površina. Ovim dolazi do naglog povećanja neorganskih i organskih materija u površinskim vodama što uzrokuje novi tip eutrofizacije (starenja ekosistema) tzv. antropogenu eutrofizaciju. Povećanim prilivom nutrijenata se povećava i ukupni kapacitet tj. stepen zasićenosti ekosistema koji narušava biološku i ekološku ravnotežu, a samim tim bitno utiče na živi svet unutar datog ekosistema.

Jedna od karakterističnih posledica ubrzane eutrofizacije ekosistema jeste naglo povećanje biomase primarnih producenata tj. algi, cijanobakterija i vodenih biljaka (Farley, 2012; Hudon, 2013; Bhagowati i Ahamad, 2019). U uslovima obilja nutrijenata dolazi do prenamnožavanja cijanobakterija koje se još naziva i cvetanje cijanobakterija. Iako su cijanobakterije mikroskopski organizmi, kada dođe do njihovog cvetanja, voda ekosistema poprima maslinasto-zelenkastu boju i ovi organizmi mogu da se vide čak i golim okom. U pojedinim situacijama tokom cvetanja dolazi i do stvaranja skrama ili biofilmova na površini vode, ali i do velike zamućenosti vode, pa čak i pojave neprijatnog mirisa i/ili ukusa (Huisman *i sar.*, 2018; Yunes, 2019; Singh i Babele, 2020). Međutim, najveća opasnost koja prati cvetanje cijanobakterija jeste pojava toksičnih metabolita koje ovi organizmi sintetišu, tzv. cijanotoksina. Do sada su identifikovani mnogobrojni cijanotoksini, i većina je izrazito toksična (Buratti *i sar.*, 2017; Huang i Zimba, 2019). Intoksikacije, pa čak i smrti životinja i ljudi koji su u kontaktu sa zagađenom vodom su do sada veoma dobro opisani i zabeleženi (Drobac, 2015; Svirčev *i sar.*, 2017a, 2019; Codd *i sar.*, 2020).

Ekosistemi koji su najčešće zahvaćeni cvetanjem cijanobakterija jesu slatkovodni ekosistemi, uglavnom jezera i akumulacije. Ovi ekosistemi su najčešće izvori pijaće vode, važna mesta za rekreaciju ljudi, ribolov i navodnjavanje. Povećanje biomase primarnih producenata kao što su cijanobakterije i makrofite znatno otežava i/ili onemogućava ribolov i korišćenje ovakvih ekosistema u rekreativne svrhe. Takođe, usled pojave toksičnih supstanci,



voda ovih ekosistema nije pogodna za piće, niti navodnjavanje, a s obzirom da akvatični organizmi mogu da akumuliraju razne toksine (van der Oost *i sar.*, 2003), uključujući i cijanotoksine (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011; Pham i Utsumi, 2018), organizmi izlovljeni iz ovih ekosistema nisu pogodni za ishranu. S obzirom da cvetajući ekosistemi nisu pogodni za ljudsku upotrebu, pojava cvetanja može da nanese velike ekonomske gubitke. Dodds *i sar.* (2009) i Hamilton *i sar.* (2013) su sumirali ekonomske gubitke i štetu koju cvetanje cijanobakterija može da nanese i ustanovili su da ona može da iznosi i do nekoliko hiljada američkih dolara po hektaru po godini. U ove brojke su uračunati troškovi monitoringa, prečišćavanja i tretiranja vode za piće, metode smanjenja tačkastih zagađivača i uticaj na rekreativne aktivnosti kao što su smanjen broj kupaca i ribolovaca (Slika 1).



**Slika 1.** Shema ekonomskih troškova koje cvetanje cijanobakterija može da nanese kod slatkovodnih ekosistema. Preuzeto i modifikovano iz Dodds *i sar.* (2009) i Hamilton *i sar.* (2013) uz odobrenje izdavača.

Eutrofizacija i cvetanje cijanobakterija takođe mogu da imaju veliki uticaj na biodiverzitet. Brojne studije su do sada pokazale da eutrofizacija uzrokuje smanjenje biodiverziteta mikroinvertebrata, riba, pa čak i pojedinih vrsta primarnih producenata (Leibold, 1999; Gong i Xie, 2001; Wang *i sar.*, 2007; Dodds *i sar.*, 2009). Mnogi organizmi ne mogu da žive u uslovima visokog zagađenja, ili u uslovima koje prouzrokuje samo cvetanje kao što su zamućenost vode, velike razlike u koncentraciji rastvorenog kiseonika između dana i noći, povećana pH, povećana koncentracija amonijaka i amonijuma i drugi (Huisman *i sar.*, 2018). Stoga, pojava cvetanja može da ima izrazito negativan uticaj ukoliko se javi u ekosistemima koji su pod određenim nivoom zaštite s obzirom da mogu da izazovu gubitak ugroženih i endemičnih vrsta, a metode koje bi dovele do amelioracije kvaliteta vode najčešće nisu

dozvoljene u ovakvim ekosistemima, i zahtevaju iznimne dozvole kako bi se sprovele. Zbog svega navedenog, veoma je važno kontinuirano voditi monitoring eutrofnih ekosistema, i pratiti dinamiku povećanja biomase primarnih producenata, potencijalnu produkciju toksina, kao i uticaj toksičnog prenamnožavanja algi i cijanobakterija na živi svet, što je i bio predmet ove disertacije.

## 2 Pregled literature

### 2.1 Cijanobakterije

Cijanobakterije su prokariotski organizmi koji imaju sposobnost vršenja fotosinteze. Zbog ove osobine se takođe nazivaju i modro-zelene alge, međutim, one nisu alge s obzirom da se taj naziv koristi samo za eukariotske fotoautotrofe (Huisman *i sar.*, 2018). Cijanobakterije predstavljaju filogenetski koherentnu grupu veoma starih i morfološki veoma raznovrsnih bakterija (Soule i Garcia-Pichel, 2019). Smatra se da su nastale pre oko 2,3 do 2,9 milijardi godina (Olson, 2006; Blank i Sánchez-Baracaldo, 2010), a po nekim autorima čak pre 3,5 milijardi godina (Schopf, 1993; Tomitani *i sar.*, 2006). One su primarni producenti u mnogim ekosistemima, a pojedini autori smatraju da je njihova fotosintetska aktivnost inicirala oksidaciju atmosfere planete Zemlje (Schirrmeister *i sar.*, 2015).

Cijanobakterije su kosmopolitski organizmi i naseljavaju gotovo sva staništa, uključujući vodene ekosisteme, terestrične ekosisteme, polarne krugove, polupustinje, pustinje, čak i staništa pokrivena vulkanskim pepelom (Gaysina *i sar.*, 2019). S obzirom na veliku raznovrsnost i svoj kosmopolitizam, u ovu grupu bakterija spada oko 2000 vrsta razvrstanih u 150 rodova i 5 redova (Vincent, 2009; Percival i Williams, 2013; Vachard, 2021).

#### 2.1.1 Ultrastruktura i morfologija

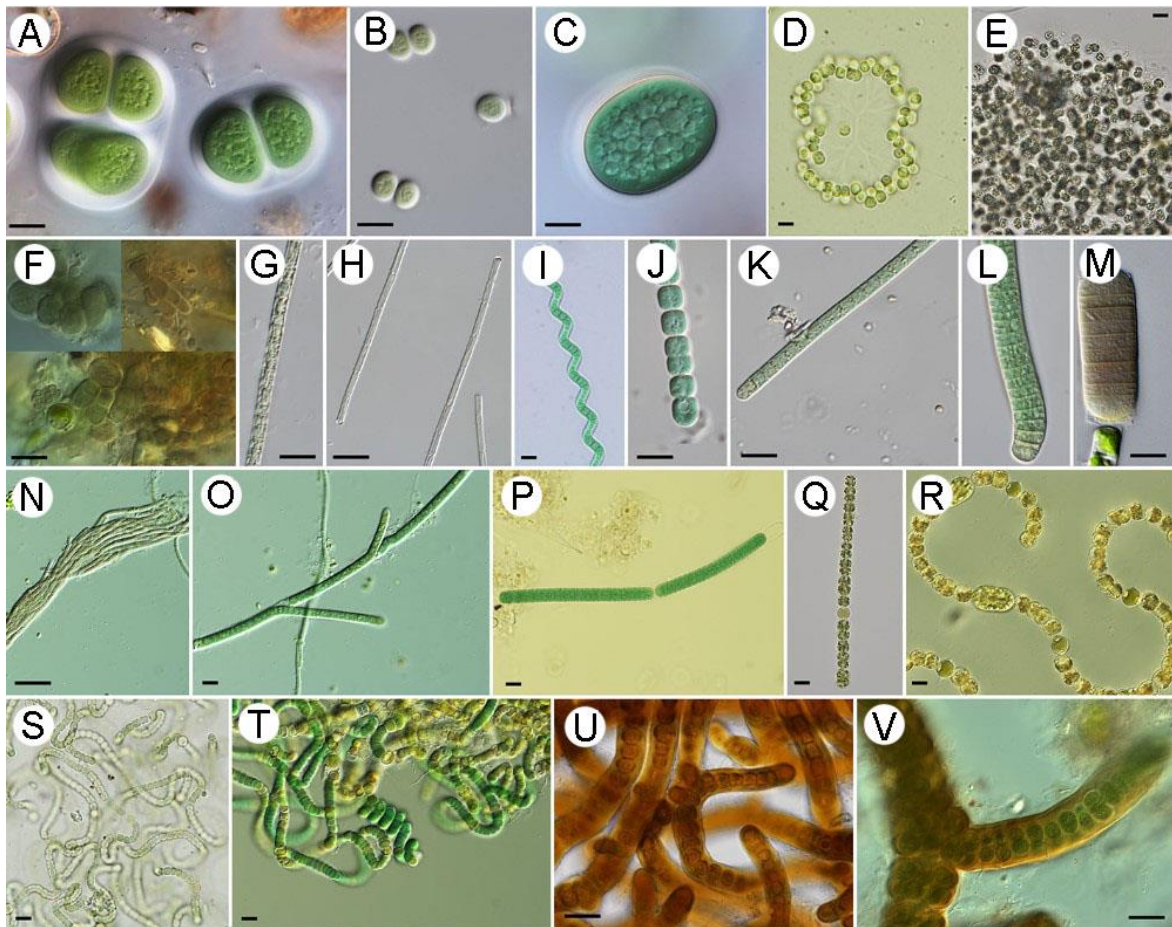
Ovi organizmi imaju tipičnu prokariotsku ćelijsku građu. Ne poseduju jedro, niti većinu organela kao što su mitohondrije, Goldžijev aparat i druge membranske organele (Soule i Garcia-Pichel, 2019; Vachard, 2021). Ćelijski zid je sastavljen od peptidoglikana slično gram-negativnim eubakterijama, i može biti različite debljine (od nekoliko slojeva do čak 200 nm) (Vincent, 2009; Percival i Williams, 2013; Soule i Garcia-Pichel, 2019). Površina ćelijskog zida je najčešće pokrivena sluzavim (galertnim) omotačem koji prevashodno ima zaštitnu ulogu. S obzirom da su fotosintetski aktivne, cijanobakterije sadrže hlorofil a koji je raspoređen unutar tilakoida koji se sastoje od dvostruke membrane koja ograničava unutrašnji intratilakoidni prostor (Soule i Garcia-Pichel, 2019). Pored hlorofila a, cijanobakterije sadrže i fikobiliproteine unutar fikobilizoma koji apsorbuju svetlost talasnih dužina od 500 do 650 nm, i koji predavanjem svoje energije hlorofilu a omogućavaju iskorišćavanje šireg opsega talasnih dužina.

Iako ne sadrže membranske organele, cijanobakterije poseduju razne ćelijske strukture koje imaju slične funkcije (Vincent, 2009). Kao što je prethodno opisano, tilakoidi imaju

funkciju hloroplasta kod algi i viših biljaka. Umesto jedra, cijanobakterije poseduju jedarni region ili centroplazmu u centru ćelije koja sadrži cirkularnu DNK (Vincent, 2009; Soule i Garcia-Pichel, 2019). Ulogu vakuola preuzimaju nemembranske granule koje sadrže glikogen, fosfate, lipidne kapljice i druge molekule (Soule i Garcia-Pichel, 2019). Cijanobakterije takođe sadrže karakteristične membranske inkluzije kao što su karboksizomi i gasne vakuole. Karboksizomi sadrže enzim ribulozo-1,5-bifosfat karboksilazu/okseginazu (RubisCO, *engl.* Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase) koji je odgovoran za prvi korak Kalvinovog ciklusa, dok gasne vakuole sadrže vazduh i omogućavaju cijanobakterijama da plutaju.

Pored ćelijskih inkluzija, filamentozne cijanobakterije sadrže i posebne specijalizovane ćelije koje imaju zasebne funkcije u odnosu na ostale vegetativne ćelije. To su heterociste, akineti i hormogonije (Vincent, 2009; Soule i Garcia-Pichel, 2019). Osnovna uloga heterocista je u azotofiksaciji tj. fizičkom odvajanju procesa azotofiksacije s obzirom da nije kompatibilan sa fotosintezom (Kumar *i sar.*, 2010). One su uglavnom veće od vegetativnih ćelija, okrugle su, imaju manje pigmenta i manje granularnu citoplazmu, deblji ćelijski zid i nastaju na krajevima filamenata ili unutar trihoma (Kumar *i sar.*, 2010; Soule i Garcia-Pichel, 2019; Singh *i sar.*, 2020). Akineti su ćelije slične heterocistama s obzirom da sadrže velike količine azotnih rezervi, veće su od vegetativnih ćelija, imaju deblji ćelijski zid i formiraju ih isključivo filamentozne cijanobakterije koje poseduju heterociste (Soule i Garcia-Pichel, 2019). Međutim, njihova funkcija je u potpunosti drugačija. S obzirom da su ove ćelije otporne na desikaciju, niske temperature, čak i digestiju u crevima životinja, smatra se da se one stvaraju tokom nepovoljnih uslova životne sredine i da su odgovorne za fazu mirovanja, slično bakterijalnim endosporama (sa razlikom da nisu otporne na visoke temperature) (Sukenic *i sar.*, 2019; Singh *i sar.*, 2020). Hormogonije su kratki lanci ćelija (najčešće 5-25 ćelija) koji se odvajaju od roditeljskog filameta ili trihoma (Marsac, 1994; Meeks i Elhai, 2002; Soule i Garcia-Pichel, 2019). Hormogonije su najčešće manje od vegetativnih ćelija, ne sadrže heterociste i imaju ulogu u disperziji s obzirom da su pokretne.

U odnosu na morfologiju, cijanobakterije su veoma raznovrsne (Slika 2). Oblik ćelija može da bude sferičan, spiralan ili nepravilan (Singh i Montgomery, 2011). Prema građi talusa mogu biti jednostavne građe kao što su jednoćelijske i kolonijalne vrste, međutim, pojedine filamentozne vrste mogu imati i kompleksniju građu koja ukazuje na rane znake višćelijske organizacije (Nürnberg *i sar.*, 2014; Bornikoel *i sar.*, 2018; Kieninger i Maldener, 2021). Filamentozni talusi mogu biti homocitni ili heterocitni, gde homocitni sadrže samo vegetativne ćelije, dok heterocitni sadrže i specijalizovane ćelije poput heterocista i akineta (Cvijan, 2013).



**Slika 2.** Prikaz morfološke raznovrsnosti cijanobakterija redova Chroococcales (A-E), Pleurocapsales (F), Oscillatoriales (G-P), Nostocales (Q-T) i Stigonematales (U, V). Vrste redova Chroococcales i Pleurocapsales su primarno jednoćelijske (i kolonijalne) građe: (A) *Chroococcus subnudus*, (B) *Ch. Limneticus*, (C) *Cyanothece aeruginosa*, (D) *Snowella litoralis*, (E) *Microcystis aeruginosa*, (F) *Pleurocapsa minor*. Vrste reda Oscillatoriales su filamentozne homocitne građe: (G) *Planktothrix agardhii*, (H) *Limnothrix redekei*, (I) *Arthrospira jenneri*, (J) *Johanseninema constrictum*, (K) *Phormidium* sp., (L, M) *Oscillatoria* sp., (N) *Schizothrix* sp., (O) *Tolypothrix* sp., (P) *Katagnymene accurata*. Vrste redova Nostocales i Stigonematales su filamentozne heterocitne građe: (Q) *Dolichospermum planctonicum*, (R) *Dolichospermum* sp., (S) *Nostoc* sp., (T) *Nodularia moravica*, (U, V) *Stigonema* sp.. Razmera: A-U – 10 µm; v – 20 µm. Preuzeto iz Dvořák i sar. (2015).

### 2.1.2 Metabolizam i fiziologija

Kao što je prethodno opisano, cijanobakterije su jedini prokariotski organizmi koji imaju sposobnost fotosinteze. One su primarni producenti u vodenim ekosistemima, ali i u mnogim ekstremnim ekosistemima (Percival i Williams, 2013; Soule i Garcia-Pichel, 2019). Proces fotosinteze koji se odvija u cijanobakterijama je gotovo identičan onom što se uočava kod viših biljaka (Percival i Williams, 2013), a pojedini autori smatraju da su cijanobakterije

zapravo preteča hloroplasta kod viših biljaka (Rexroth *i sar.*, 2017). Ukratko, fotosistem II posredstvom svetlosne energije generiše elektrone iz vode koji se prenose na unutrašnju membranu tilakoida. Fotosistem I (hlorofil) se potom redukuje što dovodi i do redukcije NADP. Ovako razvijen protonski gradijent potom služi za sintezu ATP-a.

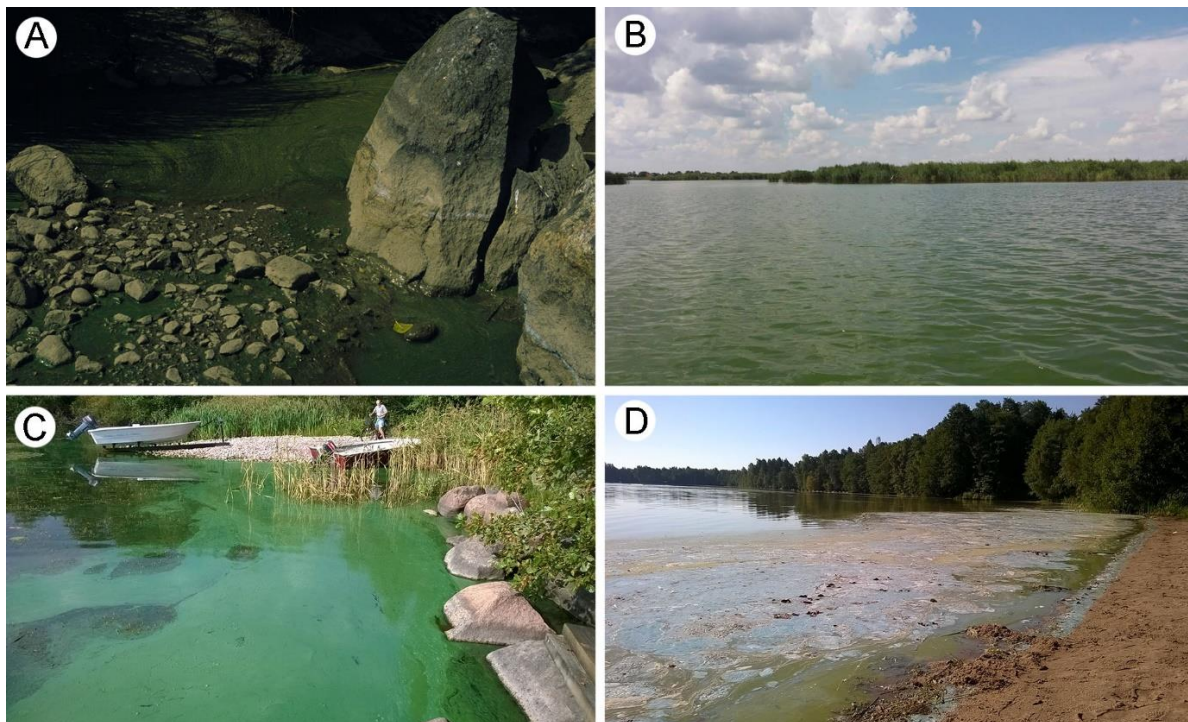
Pored fotosinteze, jedan od osnovnih procesa koji se odvijaju u određenom broju cijanobakterija jeste azotofiksacija, tj. proces redukcije azota iz atmosfere. Azot je dominantan element u atmosferi, međutim, veoma je inertan, te je za dobijanje oblika koji ćelije mogu da koriste neophodna njegova redukcija do amonijaka (Berman-Frank *i sar.*, 2003; Kumar *i sar.*, 2010; Percival i Williams, 2013). Ovaj proces se odvija pomoću enzima nitrogenaze (Bothe *i sar.*, 2010). S obzirom da prisustvo kiseonika inhibiše azotofiksaciju, tj. aktivnost nitrogenaze, cijanobakterije su morale da razviju mehanizme kako se proces fotosinteze koji oslobađa kiseonik i azotofiksacija ne bi poklapali. Cijanobakterije su jedini oksigeni organizmi koji imaju sposobnost azotofiksacije i koji mogu da razdvoje ova dva procesa ili vremenski (vršeci fotosintezu danju, a azotofiksaciju noću) ili prostorno (prisustvom heterocista) (Berman-Frank *i sar.*, 2003; Percival i Williams, 2013).

Pored opisanih procesa primarne produkcije, cijanobakterije su poznate i po svom sekundarnom metabolizmu. Smatra se da cijanobakterije ulaze u sekundarni metabolizam u uslovima biotičkog i abiotičkog stresa (Kultschar i Llewellyn, 2018), međutim, funkcija mnogih sekundarnih metabolita još nije jasna. S obzirom da cijanobakterije naseljavaju razne tipove staništa, od toga u mnogim vladaju veoma nepogodni uslovi, one mogu da sintetišu veoma velik broj sekundarnih metabolita.

## **2.2 Cvetanje cijanobakterija**

Zahvaljujući karakteristikama koje su opisane u prethodnom poglavlju, cijanobakterije su veoma prilagodljive i mogu da žive u različitim uslovima životne sredine, čak i na staništima koja drugi organizmi ne mogu da naseljavaju. Na staništima umerenog pojasa, cijanobakterije su veoma brojne i neretko mogu da dominiraju u odnosu na druge organizme (Percival i Williams, 2013; Soule i Garcia-Pichel, 2019). Ovo je posebno istaknuto u slatkovodnim ekosistemima, gde tokom perioda pogodnih za rast i razmnožavanje često dolazi do proliferacije tj. do njihovog prenamnožavanja. Naglo, brzo i nekontrolisano prenamnožavanje cijanobakterija tokom kojeg često dolazi i do stvaranja vidljivih skrama, biofilmova ili zamućenja vode se naziva cvetanje cijanobakterija (Slika 3; Huisman *i sar.*, 2018; Yunes, 2019; Singh i Babele, 2020). Prema Falconer (1998), cvetanjem cijanobakterija se smatra kada broj

cijanobakterija prevaziđe 10.000 ćelija/ml. Prenamnožavanje može da ima brojne negativne posledice poput narušavanja životne sredine, poremećaja stabilnosti ekosistema i negativnih uticaja na organizme koji žive u datom ekosistemu uključujući i intoksikacije posredstvom toksičnih metabolita, odnosno cijanotoksina. U ovakvim slučajevima, prenamnožavanje cijanobakterija se naziva opasno algalno cvetanje (HAB, *engl.* Harmful Algal Bloom) tj. opasno cijanobakterijsko cvetanje (cyanoHAB) (Huisman *i sar.*, 2018; Yunes, 2019; Singh i Babele, 2020). Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, 2003), u rekreativnim vodama postoje tri nivoa rizika po zdravlje ljudi u odnosu na broj cijanobakterija: (1) nizak rizik kada broj cijanobakterija ne prevazilazi 20.000 ćelija/ml; (2) srednji nivo rizika kada je brojnost u rasponu od 20.000 do 100.000 ćelija/ml; i (3) visok rizik kada brojnost prevaziđe 100.000 ćelija/ml. Vrste rodova *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* i *Trichodesmium* najčešće cvetaju u slatkovodnim ekosistemima (Burkholder, 2009; Watson *i sar.*, 2015; Huisman *i sar.*, 2018; Yunes, 2019; Singh i Babele, 2020).



**Slika 3.** Cvetanje cijanobakterija u slatkovodnim ekosistemima. (A) reka Raisionjoki; (B) jezero Ludaš; (C) jezero Koilionjarvi (*fin.* Köyliönjärvi); (D) jezero Litoistenjarvi (*fin.* Littoistenjärvi). Slike: A, C, D – Dr Jussi Meriluoto; B – Dr Damjana Drobac Backović.

### 2.2.1 Glavni uzročnici cvetanja cijanobakterija

Pojava cvetanja zavisi od nekoliko fizičkih i hemijskih parametara vode kao što su povećana količina nutrijenata i koncentracija rastvorenog CO<sub>2</sub> u ekosistemu, intenzitet svetla, hidro-meteorološki uslovi, temperatura, protok vode, stratifikacija i drugi (Singh i Babele, 2020). Ovi parametri, pa i samo cvetanje, su uglavnom vezani za eutrofizaciju vodenih ekosistema koja nastaje povećavanjem koncentracije nutrijenata unutar određenog vodenog tela (prvenstveno azotnih i fosfatnih jedinjenja) što dovodi do povećanja primarne produkcije i prenamnožavanja primarnih producenata tj. algi i cijanobakterija (Farley, 2012; Hudon, 2013; Bhagowati i Ahamad, 2019; Le Moal *i sar.*, 2019; Vinçon-Leite i Casenave, 2019). Eutrofizacija jezera može da bude prirodna ili antropogena (Bhagowati i Ahamad, 2019). Prirodna eutrofizacija se dešava dugotrajnom akumulacijom sedimenata i nutrijenata mimo antropogenog faktora i predstavlja prirodan proces starenja jednog ekosistema (Hudon, 2013), dok se antropogena eutrofizacija dešava posredstvom čoveka i ona je mnogo brža u odnosu na prirodnu (Hudon, 2013; Bhagowati i Ahamad, 2019). Prema trofičkom statusu, ekosistemi mogu da se svrstaju od oligotrofnih (niska koncentracija nutrijenata bez proliferacije primarnih producenata) do hipereutrofnih (veoma izražena eutrofizacija) (Cvijan, 2013).

Količina dostupnih nutrijenata ima najveći uticaj na pojavu cvetanja cijanobakterija. Azot koji je potreban za sintezu proteina i fosfor koji je neophodan za sintezu nukleinskih kiselina i transfer energije su dva ograničavajuća nutrijenta u ekosistemima za rast cijanobakterija s obzirom da ugljenik mogu da fiksiraju iz atmosfere (Conley *i sar.*, 2009). Takođe, tokom poslednjih nekoliko decenija je došlo do značajnog porasta koncentracije ova dva nutrijenta u slatkovodnim ekosistemima usled antropogenih aktivnosti što dovodi do narušavanja ekosistema i eutrofizacije. Biološki aktivne forme azota (npr. amonijak, nitrati, nitriti) i fosfora (npr. ortofosfati) dospevaju u vodu usled ispuštanja kanizacionih voda, industrijskih otpadnih voda ili đubriva koje se sliva sa okolnog poljoprivrednog zemljišta (Stumpf *i sar.*, 2012; Watson *i sar.*, 2015; Singh i Babele, 2020). Međutim, nije u potpunosti jasno da li samo jedan od ovih nutrijenata dominantno utiče na pojačanu eutrofizaciju i cvetanje cijanobakterija, ili su potrebna oba. Istraživanja sprovedena na eksperimentalnim jezerima su pokazala da samo fosfor utiče na prenamnožavanje cijanobakterija i da sa ograničavanjem koncentracije ovog nutrijenta, dolazi do amelioracije kvaliteta vode nezavisno od koncentracije azota (Schindler, 1974). Najverovatniji razlog je dominacija azotofiksirajućih cijanobakterija u uslovima ograničenog azota, te samim tim ovaj element nije limitirajuć (Beverdorsdorf *i sar.*, 2013; Paerl i Otten, 2013; Watson *i sar.*, 2015). Iako je strategija limitiranja fosfora primenjena



u brojnim ekosistemima, u određenom broju slučajeva cvetanja su se i dalje dešavala, te su pojedini istraživači počeli da smatraju da je ograničavanje azota takođe neophodno za zaustavljanje cvetanja (Conley *i sar.*, 2009; Paerl *i sar.*, 2011). Kontinuirano cvetanje nakon zaustavljanja eksternog upliva fosfora je najverovatnije posledica otpuštanja fosfora iz sedimenta i velike količine unutrašnjeg ekosistemskog opterećenja ovim nutrijentom, te smanjenje eksternog fosfora i dalje može biti najefikasniji način zaustavljanja prenamnožavanja određenih cijanobakterija (Carpenter, 2008; Schindler, 2012; Carvalho *i sar.*, 2013; Fastner *i sar.*, 2016). Međutim, postoje taksoni kod kojih su oba nutrijenta veoma bitna i za koje su i fosfor i azot limitirajući elementi, te je smanjenje eksternog upliva oba nutrijenta važno za suzbijanje njihovog prenamnožavanja (Simić *i sar.*, 2017).

### 2.3 Cijanotoksini

Kao što je prethodno pomenuto, jedna od bitnih karakteristika cijanobakterija jeste njihov ulazak u sekundarni metabolizam najčešće u uslovima biotičkog i abiotičkog stresa (Kultschar i Llewellyn, 2018). Tokom ove faze metabolizma dolazi do sinteze velikog broja različitih jedinjenja koja nisu uključena u osnovne procese kao što su rast ili ćelijska deoba, a čija funkcija još uvek nije u potpunosti razjašnjena (Carmichael, 1992; Zurawell *i sar.*, 2005; Omid *i sar.*, 2018). Smatra se da po funkciji mogu biti slični supstancama koje luče druge bakterije i gljive kao što su inhibitori enzima, imunosupresori, antibiotici i toksini, te stoga mogu imati alelopatsko dejstvo kojim mogu da inhibišu rast drugih algi, makrofita ili bakterija (Leão *i sar.*, 2009), ili mogu imati odbrambeno dejstvo protiv predatora kao što su zooplankton ili ribe (Berry *i sar.*, 2008; Goodman i Hay, 2013). Veliki broj ovih jedinjenja su toksični, i mogu predstavljati ozbiljnu pretnju za stabilnost ekosistema, ali i potencijalnu pretnju po zdravlje svih organizama sa kojima dođu u kontakt. Ovi metaboliti se nazivaju cijanotoksini.

Prema Zurawell *i sar.*, (2005), produkcija cijanotoksina je regulisana na tri osnovna nivoa: (1) genetički nivo koji određuje potencijalnu toksičnost svakog zasebnog soja; (2) ćelijski nivo koji predstavlja uticaje faktora sredine, a koji mogu dovesti do produkcije toksina kod toksičnih sojeva; i (3) populacioni nivo gde je koncentracija cijanotoksina uslovljena udelom toksičnih i netoksičnih sojeva koji se trenutno nalaze u životnoj sredini. Bitno je naglasiti da toksični sojevi tj. cijanobakterije koje sadrže gene koji kodiraju pojedine cijanotoksine ne moraju nužno i proizvoditi date toksine, već produkcija zavisi i od uslova životne sredine. Međutim, svi sojevi koji sadrže gene koji kodiraju pojedine cijanotoksine se moraju tretirati kao potencijalno opasni i potencijalno toksični.

Cijanotoksini su veoma raznovrsna grupa metabolita i mogu se razlikovati prema hemijskoj strukturi i biološkoj funkciji koju obavljaju (Bláha *i sar.*, 2009; Huang i Zimba, 2019). Prema hemijskoj strukturi, cijanotoksini mogu da budu ciklični peptidi, alkaloidi, lipopeptidi, ne-proteinske animokiseline ili lipoglikani (Du *i sar.*, 2019), dok prema funkciji i načinu delovanja mogu da se podele na hepatotoksine, neurotoksine, citotoksine i dermatotoksine (Codd *i sar.*, 2005b; Du *i sar.*, 2019). U nastavku teksta će biti detaljnije opisani najrasprostranjeniji i najčešće beleženi cijanotoksini.

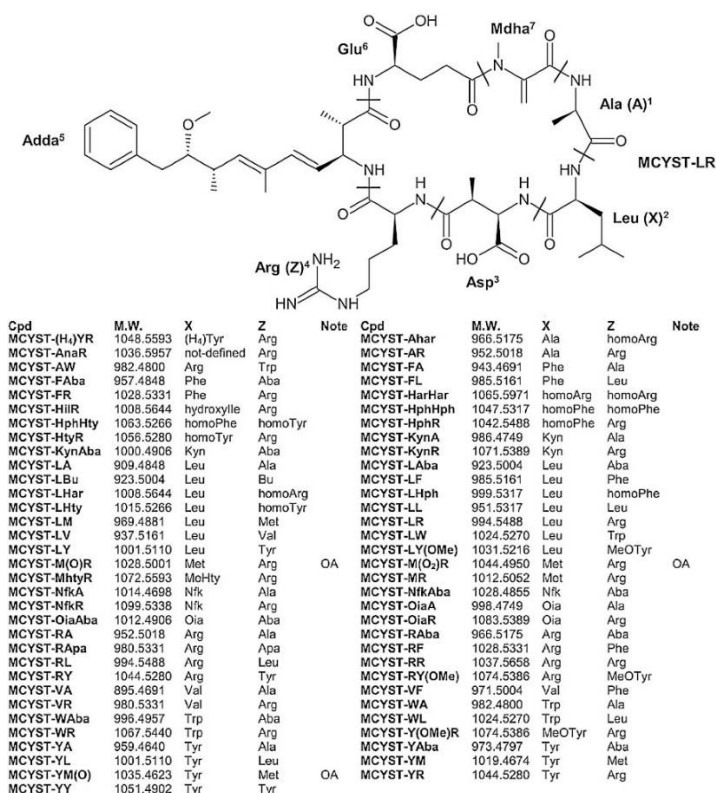
### 2.3.1 Mikrocistini (MC)

Mikrocistini su najrasprostranjeniji, a samim tim i najčešće beleženi cijanotoksini (Buratti *i sar.*, 2017; Svirčev *i sar.*, 2019). Prvi put su izolovani iz cijanobakterije *Microcystis aeruginosa*, odakle im potiče i samo ime (Carmichael *i sar.*, 1988). MC su ciklični heptapeptidi što znači da se sastoje od 7 amino-kiselina (Slika 4). Amino-kiseline karakteristične za ove toksine su N-metildehidroalanin (Mdha) i 3-amino-9-metoksi-2-6,8-trimetil-10-fenil-deka-4,6-dienoična kiselina (ADDA). Ova grupa toksina broji više od 279 strukturnih varijanti (Bouaïcha *i sar.*, 2019), a ovaj broj najviše potiče od varijabilnosti u amino-kiselinama koje se nalaze na pozicijama 2 i 4. Najtoksičnija, najčešće beležena, a samim tim i najistraženija strukturna varijanta je MC-LR koja ima leucin (L) i arginin (R) na pozicijama 2 i 4 (Carmichael *i sar.*, 1988; Buratti *i sar.*, 2017).

MC su ne-ribozomalni peptidi koje sintetise proteinski kompleks koji sadrži sintetazu ne-ribozomalnih peptida i poliketidnu sintetazu (Vichi *i sar.*, 2016). Ovi proteinski kompleksi su kodirani klasterom gena koji se skupa naziva mikrocistin-sintetaza (*mcy*) i sastoji se iz 9-10 gena u najmanje dva operona (*mcyABC* i *mcyCD*). Ovi geni kodiraju peptidnu sintetazu, poliketidnu sintetazu, tioesterazu, transportere i peptid-modifikujuće enzime (Buratti *i sar.*, 2017). Prisustvo *mcy* klastera gena u soju označava da je dati soj potencijalno toksičan, i da ima sposobnost da sintetise ovaj toksin. Međutim, sama sinteza zavisi od spoljašnje sredine, a toksičnost cvetajućih cijanobakterija zavisi od odnosa toksičnih i netoksičnih sojeva.

MC se ne luče slobodno u spoljašnju sredinu, i većinom ostaju unutarćeljski dok dođe do liziranja ćelija koje ga sintetisu (Buratti *i sar.*, 2017). Međutim, i kad dođe do lize ćelija, MC ostaju većinom vezani za ćeliju i tek do 30% bude oslobođeno u spoljašnju sredinu (Graham *i sar.*, 2010). Usled svoje strukture, ovi toksini su veoma stabilni u spoljašnjoj sredini; u uslovima cvetanja cijanobakterija (pH 9, 30 °C) njihov poluživot je duži od 10 nedelja

(Harada *i sar.*, 1996). Takođe su otporni i na hemijsku oksidaciju na neutralnoj pH, a mogu da ostanu potentni čak i posle kuvanja.



**Slika 4.** Generalna hemijska struktura MC-a, kao i prikaz nekoliko najčešće beleženih strukturnih varijanti u zavisnosti od amino-kiseline na pozicijama 2 (X) i 4 (Z). Preuzeto iz Huang i Zimba (2019) uz odobrenje izdavača.

Ove toksine sintetiše velik broj cijanobakterija. Među njima su cijanobakterije rodova *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Cyanobium*, *Dolichospermum*, *Fischerella*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Merismopedia*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Woronochinia*, *Kamptonema*, *Nostoc*, *Synechococcus*, *Roseofilum* i *Hapalosiphon* (Huang i Zimba, 2019). Rodovi koji najčešće proizvode ove toksine su *Microcystis*, *Planktothrix* i *Dolichospermum* (ex *Anabaena*) (Buratti *i sar.*, 2017). S obzirom da većina pomenutih rodova ima kosmopolitsku distribuciju, ovi cijanotoksini predstavljaju globalnu opasnost.

### 2.3.1.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija mikrocistina

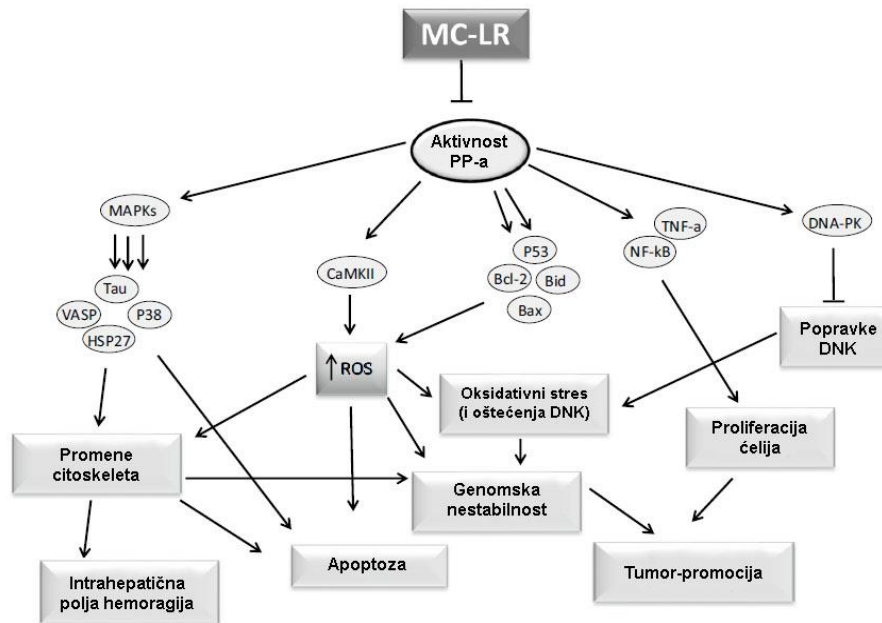
MC ne mogu da uđu u ćelije pasivnom difuzijom zbog svoje hidrofilne strukture i velike molekulske mase (Campos i Vasconcelos, 2010). Stoga, postoje određeni nosači koji ih nose

u ćeliju. Glavni transportni mehanizam se odvija preko superfamilije organskih anjonskih transportnih polipeptida (Oatp kod miševa; OATP kod ljudi) (Fischer *i sar.*, 2005, 2010; Lu *i sar.*, 2008; Feurstein *i sar.*, 2009; Buratti *i sar.*, 2017). Ovi nosači su pored organskih anjonskih transportera (Oat), organskih katjonskih transportera (Oct) i Nat-tauroholatko-transporteta (Ntcp) osnovni transporteri koji omogućavaju unošenje endogenih i egzogenih hemikalija u jetru, s tim da organski OATP usvajaju najveći deo ovih hemikalija (Klaassen i Lu, 2008). Stoga, nije iznenađujuće da se primarna toksičnost mikrocistina ogleda upravo u jetri. Međutim, jetra nije jedini organ koji ekspresuje ove proteine. Ova klasa transportera se takođe nalazi u enterocitima (Kobayashi *i sar.*, 2003; Oswald, 2019) koji omogućavaju usvajanje mikrocistina preko hrane; a nalazi se i u bubrežima (Sekine *i sar.*, 2006), moždano-krvnoj barijeri, plućima te može doći do intoksikacije inhalacijom, srcu, placenti i testisima (Tamai *i sar.*, 2000). Samim tim, toksičnost MC-a se ne ogleda samo u oštećenjima jetre, već i mnogih drugih organa.

Osnovni način na koji MC ispoljavaju svoju toksičnost jeste kroz kovalentno vezivanje sa serin/treonin protein fosfatazama PP1 i PP2A (Falconer i Yeung, 1992; Malbrouck *i sar.*, 2004; Campos i Vasconcelos, 2010; Svirčev *i sar.*, 2010; van der Merwe, 2014). Interakcija se odigrava u dva koraka gde se toksin prvo vezuje za fosfataze, a potom stvara kovalentne veze (MacKintosh *i sar.*, 1990; Craig *i sar.*, 1996). S obzirom da su PP1 i PP2A glavne protein fosfataze eukariotskih ćelija, njihovom inhibicijom dolazi do hiperfosforilacije mnogih proteina koji su uključeni u razne ćelijske funkcije. Neki od ćelijskih procesa koji su poremećeni inaktivacijom PP-a su (Slika 5):

- Modifikacija citoskeleta i remećenje aktinskih filamenata;
- Oksidativni stres;
- Indukcija apoptoze;
- Genotoksičnost;
- Proliferacija ćelija i promocija tumora.

Modifikacije mikrotubula i aktinskih filamenata su među prvim promenama koje se dešavaju tokom delovanja MC-a na ćelije (Buratti *i sar.*, 2017). MC-LR takođe može da deluje preko aktivacije MAPK (*engl.* Mitogen-Activated Protein Kinase) kinaze čime dolazi do hiperfosforilacije proteina koji su asocirani sa mikrofilamentima kao što su Tau, VASP i HSP27 (Sun *i sar.*, 2015). Hiperfosforilacija onemogućava ovim proteinima da se vezuju za citoskelet, a samim tim da ga stabilizuju na mestima gde je to potrebno.



**Slika 5.** Prikaz glavnih mehanizama toksičnosti mikrocistina. Preuzeto i modifikovano iz Buratti *i sar.* (2017) uz odobrenje izdavača.

Povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* Reactive Oxygen Species - ROS) je česta pojava nakon izlaganja MC-u. Način na koji se generišu ROS usled delovanja MC-a nije još u potpunosti jasan. Smatra se da glavnu ulogu u ovom procesu igraju mitohondrije i talas  $\text{Ca}^{2+}$  jona u mitohondrijama (Ding *i sar.*, 2001; Ding i Nam Ong, 2003). Naime, talas jona kalcijuma dovodi do tranzicije mitohondrijalne permeabilnosti što uzrokuje naglo povećanje permeabilnosti unutrašnje membrane mitohondrija za jedinjenja male molekulske mase. Ovo dalje uzrokuje stvaranje ROS, smanjenje membranskog potencijala mitohondrija i oslobađanje pro-apoptičnih faktora iz mitohondrija kao što je citohrom C, pa samim tim uzrokuje i apoptozu datih ćelija. Drugi potencijalan način izazivanja oksidativnog stresa, a potom i apoptoze jeste direktnom inhibicijom aldehid dehidrogenaze 2 (Chen *i sar.*, 2006). Takođe, usled delovanja mikrocistina dolazi i do oslobađanja nekih drugih pro-apoptičnih faktora mimo ovog signalnog puta kao što su p53, kaspaze,  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-zavisna kinaza II, Bax i Bid proteini i drugi (Buratti *i sar.*, 2017).

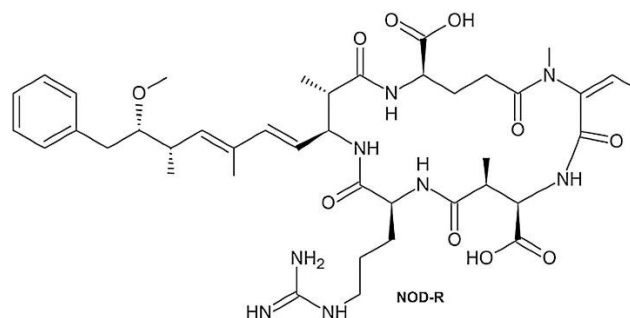
MC takođe uzrokuju genotoksičnost koja može da se ispolji na različite načine kao što su povećan broj mutacija, jednolančani i dvolančani prekidi DNK, nestabilnost hromozoma, stvaranje mikronukleusa i drugi (Buratti *i sar.*, 2017). Međutim, sam MC nema sposobnost direktnog vezivanja za DNK, tako da je uzrokovana genotoksičnost najčešće sekundarne prirode. Neki od načina na koji mogu da se indirektno uzrokuju ove promene jeste delovanjem ROS-a, mutagene oksidativne lezije DNK ili smanjenim kapacitetom za popravku DNK.

Produkcija ROS-a nakon izlaganja MC-ima je prethodno opisana. Douglas *i sar.* (2001) su pokazali da MC može indirektno da utiče na DNK-zavisnu protein kinazu (*engl.* – DNA-Dependent Protein Kinase (DNA-PK)) koja ima važnu ulogu u popravci dvolančanih prekida DNK nehomologim spajanjem krajeva. Naime, fosforilisana DNA-PK je inaktivisana, i za njenu aktivaciju je potrebno delovanje protein fosfataza PP1 i PP2A. S obzirom da mikrocistini efikasno blokiraju delovanje protein fosfataza, indirektno blokiraju i DNA-PK, a samim tim i proces popravke dvolančanih prekida DNK.

Glavni put odstranjivanja MC-a iz organizma je preko enzima II faze biotransformacije, tj. preko građenja konjugata sa glutationom (GSH) pomoću enzima glutation-S-transferaze (GST, *engl.* Glutathione-S-Transferase) (Kondo *i sar.*, 1992; Buratti *i sar.*, 2017). Pflugmacher *i sar.* (1998) su pokazali da GST biljke *Ceratophyllum demersum*, beskičmenjaka *Dreissena polymorpha* i *Daphnia magna* kao i slatkovodne ribe *Danio rerio* uspešno metabolišu MC i formiraju konjugate sa GSH. Konjugati su pokazali smanjenu toksičnost u odnosu na slobodan MC.

### 2.3.2 Nodularin (NOD)

NOD je po svojoj strukturi veoma sličan MC-u. On je pentapeptid, što znači da se sastoji od pet aminokiselina: 3-amino-9-metoksi-2-6,8-trimetil-10-fenil-deka-4,6-dienoične kiseline (ADDA), D-glutaminske kiseline, *N*-metildehidrobutirina, D-eritro-βmetil aspartične kiseline i L-arginina (Slika 6; Buratti *i sar.*, 2017; Chen *i sar.*, 2021). Do sada je opisano 10 različitih izoformi nodularina od čega su dve proizvedene u laboratoriji (Namikoshi *i sar.*, 1993). Zanimljivo je da nisu sve izoforme NOD-a toksične (Foss *i sar.*, 2017; Chen *i sar.*, 2021). Izoforma NOD-R se najčešće javlja u prirodi, i jedina je komercijalno dostupna (Chen *i sar.*, 2021).



**Slika 6.** Hemijska struktura NOD-a. Preuzeto iz Huang i Zimba (2019) uz odobrenje izdavača.

NOD su takođe ne-ribozomalni peptidi koje sintetiše proteinski kompleks kodiran klasterom gena za nodularin sintetazu (*nda*). Ovaj kompleks gena se sastoji iz dva operona, jedan uzvodno, a drugi nizvodno od bi-direkcionog promotora (Moffitt i Neilan, 2004). Nizvodno se nalaze tri modula koji kodiraju 2 ORF-a: *nda* i *ndaB*, dok se uzvodno nalaze 3 ORF-a koji kodiraju *ndaCDF*, *ndaE* i *ndaGHI*. Proteini koji su kodirani su sledeći: *N*-metiltransferaza, peptidil-noseći protein, tioesteraza, ketosintaza, aciltransferaza, ketoreduktaza, *C*-metiltransferaza, acil-noseći protein, dehidrataza i aminotransferaza (Moffitt i Neilan, 2004).

Slično MC-u, i ovi toksini su veoma stabilni u spoljašnjoj sredini zahvaljujući svojoj strukturi. Vreme poluraspada im je do 18 dana, a veoma su otporni na povišene temperature, hemijsku hidrolizu na neutralnoj pH, oksidaciju (Edwards *i sar.*, 2008; Chen *i sar.*, 2021), kao i na svetlost i mikrotalase (Metcalf *i sar.*, 2001).

NOD prevashodno sintetiše vrsta *Nodularia spumigena* (Buratti *i sar.*, 2017; Chen *i sar.*, 2021). Međutim, utvrđeno je da i druge vrste kao što su *Nostoc* sp. (Gehring *i sar.*, 2012), *Iningainema pulvinus* (McGregor i Sendall, 2017) i *Nodularia sphaerocarpa* (Huang i Zimba, 2019) mogu da sintetišu ovaj toksin. Slično MC-u, ni NOD se ne oslobađa slobodno u spoljašnju sredinu, već ostaje unutarćelijski. Do njegovog oslobađanja dolazi tek tokom stacionarne faze rasta cijanobakterija koje ga sintetišu kada počinje da dolazi do raspada ćelija, a samim tim i oslobađanja ovog toksina (Buratti *i sar.*, 2017).

#### 2.3.2.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija nodularina

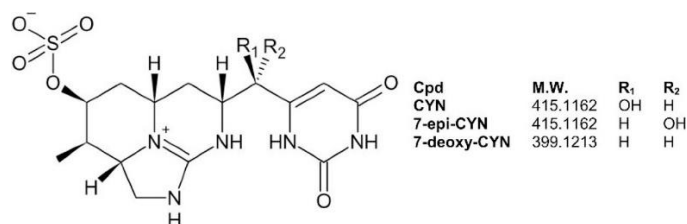
Shodno velikoj strukturnoj sličnosti, NOD imaju sličan način apsorpcije u ćelije i sličan mehanizam toksičnosti kao MC. NOD takođe ne mogu da uđu u ćelije pasivnom difuzijom, te se njihov unos u ćelije odvija preko organskih anjonskih transportnih polipeptida (OATP). Kao i kod MC-a, OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3 su glavni transporteri nodularina u ćelije (Buratti *i sar.*, 2017). Pošto su ovi transporteri najviše ispoljeni u ćelijama jetre, smatra se da su NOD primarno hepatotoksini.

S obzirom da poseduju ADDA grupu, glavni mehanizam toksičnosti koji ispoljavaju ovi toksini jeste vezivanjem za protein fosfataze PP1 i PP2A (Buratti *i sar.*, 2017; Chen *i sar.*, 2021). Ovim mehanizmom nodularini uzrokuju slična oštećenja kao i MC, a koja podrazumevaju modifikaciju citoskeleta i disrupciju aktinskih filamenata, izazivanje oksidativnog stresa i indukciju apoptoze, genotoksičnost i smanjenje kapaciteta za popravku DNK i tumor promociju (Buratti *i sar.*, 2017; Chen *i sar.*, 2021).

Biotransformacija i ekskrecija se odvijaju stvaranjem konjugata sa glutationom pomoću GST-a. Ovo je ustanovljeno kod beskičmenjaka *Artemia salina* (Beattie *i sar.*, 2003), *Perna viridis* (Davies *i sar.*, 2005), *Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha* i *Macoma balthica* (Sipiä *i sar.*, 2002), kao i riba *Platichthys flesus* (Sipiä *i sar.*, 2002) i *Carassius auratus* (Zhang *i sar.*, 2014).

### 2.3.3 *Cilindrospermopsin (CYN)*

CYN je prvi put izolovan iz cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* (curr. *Raphidiopsis raciborskii*) po kojoj je i dobio ime (Bourke *i sar.*, 1983). Po hemijskoj strukturi je triciklični alkaloid koji se sastoji iz triciklične guanidin grupe, sulfatne grupe i hidroksimetiluracila (Slika 7; Ohtani *i sar.*, 1992). Molekul je cviterjon gde je guanidin pozitivno naelektrisan, a sulfat negativno naelektrisan. Do sada su poznata 4 prirodna analoga: 7-epi-CYN, 7-deoxy-CYN, 7-deoxy-desulfo-CYN i 7-deoxy-desulfo-12-acetyl-CYN (Yang *i sar.*, 2021).



**Slika 7.** Hemijska struktura CYN-a i strukturnih varijanti u zavisnosti od prisustva jona vodonika (H) ili hidroksilnog jona (OH) na pozicijama R1 i R2. Preuzeto iz Huang i Zimba (2019) uz odobrenje izdavača.

Za biosintezu CYN su zadužena dva klastera gena: *aoa* kod vrste *Chrysochloris ovalisporum* i *cyr* kod svih ostalih vrsta (Yang *i sar.*, 2021). I ovaj metabolit je ne-ribozomalni peptid, tako da su za njegovu sintezu zaduženi sintetaza ne-ribozomalnih peptida i poliketidna sintetaza. Klaster gena *cyr* se sastoji iz 15 ORF-a koji kodiraju enzime neophodne za sintezu ovog metabolita, a to su amidinotransferaza (*cyrA*), hibridna sintetaza ne-ribozomalnih peptida (*cyrB*), poliketidna sintetaza (*cyrC*, *cyrD*, *cyrE* i *cyrF*), amidohidrolaza (*cyrG* i *cyrH*), enzimi za sečenje i skraćivanje peptida (*cyrI*, *cyrJ* i *cyrN*), transportni enzimi (*cyrK*), regulatorni enzimi (*cyrO*) i transpozaze (*cyrM* i *cyrL*) (Buratti *i sar.*, 2017). Sinteza CYN-a veoma zavisi od faktora životne sredine. Post-translatorna regulacija sinteze zavisi najverovatnije od količine svetlosti ili CO<sub>2</sub> kojoj je izložena data ćelija pošto ekspresija gena *cyrA* i *cyrK* može u znatnoj meri da zavisi od ovih parametara (Pierangelini *i sar.*, 2015). Takođe, količina sintetisanog



CYN-a zavisi od temperature. Međutim, za razliku od MC-a i NOD-a koji većinom ostaju vezani unutarćelijski, CYN se oslobađa u spoljašnju sredinu, i često vanćelijska koncentracija može da bude veća od unutarćelijske (Rücker *i sar.*, 2007; Buratti *i sar.*, 2017).

Pored cijanobakterije iz koje je prvi put izolovan, CYN sintetišu i članovi rodova *Aphanizomenon*, *Chrysochlorum*, *Dolichospermum*, *Lyngbya*, *Microseira*, *Oscillatoria*, *Raphidiopsis*, *Umezakia*, *Hormoscilla* (Đorđević *i sar.*, 2015; Buratti *i sar.*, 2017; Huang i Zimba, 2019; Adamski *i sar.*, 2020; Đorđević, 2021; Yang *i sar.*, 2021).

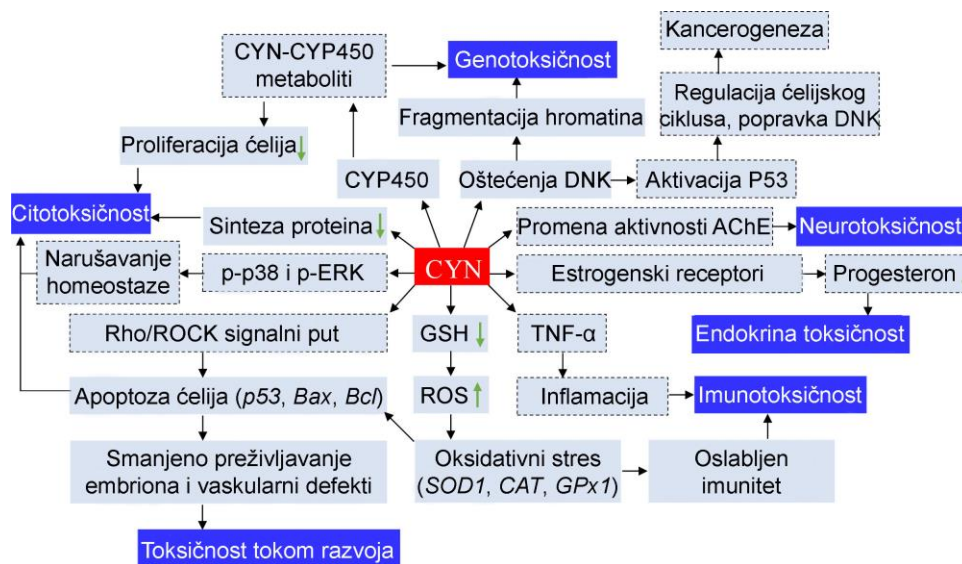
### 2.3.3.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija cilindrospermopsina

S obzirom da je CYN hidrofilne prirode, njegov unos u ćelije zahteva prisustvo aktivnog transporta. Međutim, tačan mehanizam transporta ovog metabolita nije jasan. Chong *i sar.* (2002) su pokazali da transportni sistem žučnih kiselina u mnogo manjoj meri prenosi CYN u odnosu na MC, mada, ima donekle sposobnost da ih prenosi. Stoga, očigledno postoji alternativni način unosa ovog toksina u ćelije. S obzirom da je veoma male molekulske mase, moguće je da se delom unosi i pasivnom difuzijom, iako je hidrofilan.

Toksičnost CYN-a se ispoljava uticajem na nekoliko važnih ćelijskih funkcija. Neki od osnovnih mehanizama toksičnosti CYN-a su (Slika 8):

- Citotoksičnost;
- Oksidativni stres;
- Genotoksičnost;
- Neurotoksičnost;
- Endokrini toksičnost;
- Imunotoksičnost;
- Toksičnost ispoljena tokom razvoja.

Jedan od glavnih puteva kojim ovaj toksin ispoljava svoju citotoksičnost jeste inhibicijom sinteze proteina (Yang *i sar.*, 2021). Pomoću testa sinteze globina, Terao *i sar.* (1994) su po prvi put pokazali da je CYN potentan inhibitor sinteze proteina. Froscio *i sar.* (2003) su zatim na hepatocitima miševa pokazali da je inhibicija sinteze proteina ireverzibilna i da se ne obnavlja nakon uklanjanja ovog toksina. CYN ima sličan efekat i na biljke (Yang *i sar.*, 2021). Smatra se da ovaj toksin može da ispoljava svoj toksični efekat preko citotoksičnosti zavisne od metabolizma citohroma p-450 (CYP-450). Zanimljivo je da korišćenjem inhibitora CYP-450 dolazi do smanjene toksičnosti, ali da se inhibicija sinteze proteina i dalje odvija nesmetano (Humpage *i sar.*, 2005).



**Slika 8.** Mehanizmi toksikosti CYN-a. Isprekidanim linijama su označeni hipotetički signalni putevi koji treba dodatno da se istraže i potvrde. Preuzeto i modifikovano iz Yang *i sar.* (2021) uz odobrenje izdavača.

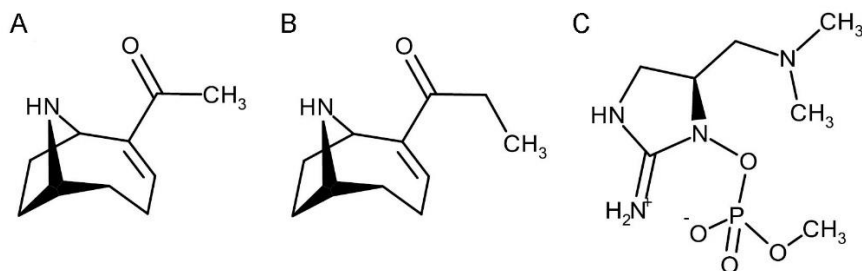
S obzirom da CYN ima strukturu sličnu uridinu, on može direktno da ometa metaboličke procese nukleotida uracila nekompetitivno inhibišući aktivnost kompleksa uridin monofosfat sintaze (Reisner *i sar.*, 2004). U pojedinim istraživanjima je uočena fragmentacija DNK, formacija mikronukleusa, pa čak i delecije hromozoma nakon izlaganja CYN-u (Đorđević *i sar.*, 2017; Yang *i sar.*, 2021). Međutim, sama genotoksičnost ovog toksina nije u potpunosti jasna tj. nije jasno da li je CYN direktno uzrokuje ili ima pro-genotoksični uticaj i da mu je potrebna metabolička aktivacija kako bi ispoljio genotoksičan efekat s obzirom da u CHO-K1 ćelijskoj linije nije došlo do genotoksičnosti nakon izlaganja (Fessard i Bernard, 2003).

Ovaj toksin takođe uzrokuje i oksidativni stres na dva načina: stvaranjem ROS-a, i inhibicijom antioksidativnih sistema u ćelijama (Runnegar *i sar.*, 1995; Humpage *i sar.*, 2005; Huguet *i sar.*, 2019). Na ovaj način dolazi do lipidne peroksidacije, oštećenja DNK i apoptoze. CYN takođe ispoljava imunotoksičnost tako što supresuje proliferaciju limfocita, ali može i da poremeti eliminaciju patogena pomoću neutrofila i limfocita (Poniedzialek *i sar.*, 2012, 2014). CYN je i potencijalni endokrini disruptor s obzirom da može da inhibiše sintezu progesterona i naruši odnos progesterona i estrogena, ali i da se vezuje za estrogenske receptore i time deluje kao antagonist estrogena (Young *i sar.*, 2008; Liu *i sar.*, 2018). Neurotoksičnost uzrokovana CYN-om je vezana za oksidativni stres, poremećaje u organizaciji citoskeleta i promene u aktivnosti acetilholinesteraze (Yang *i sar.*, 2021). Izlaganje embriona zebrića (*Danio rerio*) ovom toksinu je pokazalo da može da uzrokuje i deformitete vezane za rano ontogenetsko

razviće. Embrioni izloženi ovom toksinu su pokazali deformitete kao što su edem perikarda, zakrivljenje kičme, defekti srca, deformiteti repa i druge (Wang *i sar.*, 2020).

#### 2.3.4 Anatoksin-a (ATX-a)

ATX-a je prvi put izolovan iz cijanobakterije *Anabaena flos-aquae* (curr. *Dolichospermum flos-aquae*) po čemu je dobio ime. Po strukturi, ATX-a je sekundarni biciklični amin strukturno sličan alkaloidima (Slika 9A; Colas *i sar.*, 2021). Uglavnom se javlja u katjonskoj formi, i nema strukturne izoforme. Strukturno veoma sličan toksin je homoanatoksin-a (HATX-a) koji se od ATX-a razlikuje samo po prisustvu propionil grupe umesto acetil grupe na drugom ugljenikovom atomu (Slika 9B; Testai *i sar.*, 2016). Pored ovog toksina, javlja se još jedan toksin sa sličnim imenom, tzv. anatoksin-a(s) (ATX-a(s)), koji je u potpunosti strukturno različit. ATX-a(s) je *N*-hidroksiguanidin metil fosfatni estar, i on je jedini do sada poznati prirodan organofosfat (Slika 9C; Testai *i sar.*, 2016; Buratti *i sar.*, 2017).



**Slika 9.** Hemijska struktura ATX-a (A), HATX-a (B) i ATX-a(s) (C). Preuzeto iz Buratti *i sar.* (2017) uz odobrenje izdavača.

Za biosintezu je zadužen klaster gena za anatoksin-sintetazu (*ana*; Testai *i sar.*, 2016). Ovaj klaster se sastoji iz 8 gena (*anaA*, *anaB*, *anaC*, *anaD*, *anaE*, *anaF*, *anaG* i *anaH*) koji kodiraju: tioesterazu tipa 2, prolin dehidrogenazu, prolin-acetilirajući protein, acil-noseći protein, poliketidnu sintazu i transpozazu (Méjean *i sar.*, 2009, 2010, 2014). Shodno proteinima koji su kodirani *ana* klasterom gena, jasno je da se ATX-a sintetisuje neribozomalno, i da poliketidna sintaza igra veliku ulogu u sintezi ovih metabolita. Sinteza zavisi od uslova spoljašnje sredine kao što su temperatura, količina svetlosti i faza rasta ćelija koje ga luče (Colas *i sar.*, 2021). Istražujući količinu sintetisanog toksina od strane toksičnih sojeva vrsta *Anabaena sp.* i *Aphanizomenon sp.*, Rapala *i sar.* (1993) su ustanovili da je količina sintetisanog toksina obrnuto proporcionalna temperaturi; na 20 °C je sintetisana najveća količina toksina, dok je na 30 °C sintetisana najmanja količina.

ATX-a može da se otpušta u spoljašnju sredinu, međutim, postoje različiti navodi o unutar- i vanćelijskim koncentracijama ovog toksina (Testai *i sar.*, 2016). Naime, uzgajajući toksični soj vrste *Anabaena sp.* na 20 °C na niskoj svetlosti, Rapala i Sivonen (1998) su uočili da je vanćelijska koncentracija anatoksina 2 do 3 puta veća od unutarćelijske. Sa druge strane, pod sličnim uslovima gajenja, Rapala *i sar.* (1993) su uočili da se tek do 20% produkovanog toksina nalazi vanćelijski. Stoga, ekskrecija ATX-a u spoljašnju sredinu zavisi od datog soja koji ga produkuje, ali i uslova spoljašnje sredine.

Pored vrste *Anabaena flos-aquae* (curr. *Dolichospermum flos-aquae*) iz koje je prvobitno izolovan, ovaj toksin luče i predstavnici rodova *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Cuspidothrix* (syn. *Anabaena* i *Aphanizomenon*), *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Kamptonema* (syn. *Oscillatoria*), *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* (syn. *Cylindrospermopsis*), *Nostoc*, *Phormidium* (Colas *i sar.*, 2021; Huang i Zimba, 2019).

#### 2.3.4.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija anatoksina-a

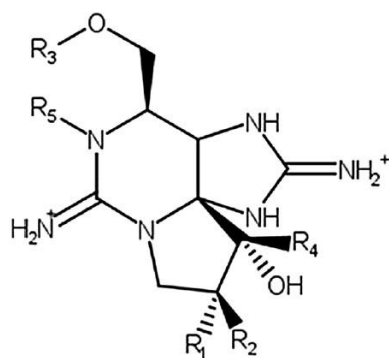
Što se kinetike ovog toksina tiče, jasno je da se veoma brzo apsorbuje nakon unošenja u organizam, i da se vrlo brzo distribuira po celom telu (Testai *i sar.*, 2016; Colas *i sar.*, 2021). Međutim, tačan način apsorpcije, kao i signalni put i nosači/transporteri koji su uključeni u njegovu apsorpciju nisu još uvek jasno definisani. Postulira se da zbog svoje strukture sekundarnog amina može lako da prelazi krvno-moždanu barijeru, i tim izaziva neurotoksičnost (Rowell i Wonnacott, 1990; Stoleran *i sar.*, 1992). Postulat je dodatno podržan činjenicom da ATX-a prevashodno ispoljava toksičnost delovanjem na sinapse. Što se ekskrecije tiče, najverovatniji putevi su preko žučnih kiselina i urina (Testai *i sar.*, 2016).

Toksičnost ATX-a se primarno ispoljava u neuro-mišićnim sinapsama i sinapsama u centralnom nervnom sistemu (van der Merwe, 2014; Testai *i sar.*, 2016; Christensen i Khan, 2020; Colas *i sar.*, 2021). Ovaj toksin je pre- i post-sinaptički depolarizujući agens, koji se takmiči sa acetilholinom za vezivanje na nikotinske receptore. S obzirom da je acetilholin glavni neurotransmiter u perifernom i centralnom nervnom sistemu, i da igra važnu ulogu u mnogim brojnim funkcijama kao što su lokomocija i kognicija, delovanje ATX-a može da ima značajne posledice po organizam. Toksin se veoma specifično vezuje za nikotinske receptore koji se nalaze na post-sinaptičkim ćelijama. Stimulacijom ovih receptora dolazi do otvaranja centralne pore koja je permeabilna za katjone ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ ), a samim tim do stimulacije postsinaptičke ćelije. S obzirom da acetilholinesteraza ne može da hidrolizuje ovaj toksin,

nikotinski receptori su prekomerno stimulisani (Rowell i Wonnacott, 1990; Clarke i Reuben, 1996; Wonnacott *i sar.*, 2000). Ova prekomerna stimulacija dovodi do poremećaja u odgovoru ganglija, mišića ili neurona kao što je npr. zamor, grčevi, a u težim slučajevima i paraliza ako su u pitanju mišići (Testai *i sar.*, 2016; Colas *i sar.*, 2021). Nikotinski receptori se nalaze i u ćelijama autonomnog nervnog sistema, tako da delovanje ATX-a može da dovede do povišenog krvnog pritiska, povećanog pulsa, poremećaja u disanju, pa čak i zastoja u disanju (Adeyemo i Sirén, 1992). U adrenergičkom sistemu, ATX-a može da stimuliše nadbubrežne nikotinske receptore stimulišući sekreciju kateholamina kao što su dopamin, epinefrin i norepinefrin (Molloy *i sar.*, 1995). ATX-a(s) ima slično dejstvo kao i ATX-a s obzirom da i on prevashodno ispoljava toksičnost inhibišući acetilholinesterazu (Matsunaga *i sar.*, 1989; Christensen i Khan, 2020). Pored neurotoksičnosti, ATX-a može da aktivira kaspaze i izazove apoptozu ćelija (Rao *i sar.*, 2002), ali i da indukuje oksidativni stres utičući na funkciju antioksidativnih enzima kao što su GST, superoksid dismutaza ili glutation peroksidaza (Mitrovic *i sar.*, 2004).

### 2.3.5 Saksitoksin (STX)

STX su prirodni alkaloidi i objedinjuju familiju jedinjenja od čak 57 analoga koji se kolektivno nazivaju paralitički toksini školjki (*engl.* Paralytic Shellfish Toxins – PSTs) (Wiese *i sar.*, 2010; Cusick i Sayler, 2013; Testai *i sar.*, 2016). U osnovi, STX su trialkil tetrahidropurini koji na pozicijama C1, C6 i C11 mogu da imaju četiri varijabilne grupe (Slika 10). U odnosu na ove grupe, saksitoksini se dele na: (1) karbamoil toksine (u koje spada i sam saksitoksin), (2) *N*-sulfokarbamoil toksine, (3) dekarbamoil toksine i (4) deoksikarbamoil toksine (Cusick i Sayler, 2013).



	R1	R2	R3	R4	R5
STX	H	H	CONH <sub>2</sub>	OH	H
neoSTX	H	H	CONH <sub>2</sub>	OH	OH
dcSTX	H	H	H	OH	H
GTX1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	OH	OH
GTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	OH	H
GTX3	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	OH	H
GTX4	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	OH	OH
B1	H	H	CONHOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	H
B2	H	H	CONHOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	OH
C1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	H
C2	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	H
C3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	OH
C4	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	OH

**Slika 10.** Generalna hemijska struktura STX-a i njegovih derivata. STX – saksitoksin; GTX – goniatoksin.

Preuzeto iz Buratti *i sar.* (2017) uz odobrenje izdavača.

Za biosintezu je zadužen klaster gena saksitoksin-sintetaze (*sxt*). Ovaj klaster se sastoji iz velikog broja gena (*sxtA* – *sxtZ*) koji su zaduženi za kodiranje proteina sa različitim katalitičkim funkcijama direktno vezanim za sintezu saksitoksina (*sxtA*, *sxtG*, *sxtB*, *sxtD*, *sxtS*, *sxtU*, *sxtH/T* i *sxtI*), ali i proteina koji su uključeni u modifikaciju STX-a u različite kongenere (*sxtL*, *sxtN* i *sxtX*) (Buratti *i sar.*, 2017). Neki od ovih proteina su poliketidna sintaza, SAM-zavisna metiltransferaza, *N*-acetil transferaza, aminotransferaze II klase, amidinotransferaze i drugi (Pearson *i sar.*, 2010). Prisustvo različitih gena unutar klastera je najčešće specifično za rod, dok su 4 gena (*sxtA*, *sxtB*, *sxtG*, *sxtS*) konzervirani među svim rodovima (Mihali *i sar.*, 2009).

STX su generalno veoma stabilni u spoljašnjoj sredini. Vreme poluzivota ovih toksina je varijabilno i zavisi od same strukture tj. grupe kojoj pripadaju, pH i temperature. U vodi za navodnjavanje na temperaturi od 25 °C i neutralnoj pH, STX je bio stabilan do 28 dana, dok je u destilovanoj vodi bio stabilan čak do 69 dana (Jones i Negri, 1997). Analog goniatoksin je u ekosistemske vode bio stabilan do čak 90 dana (Jones i Negri, 1997). Na nižoj temperaturi ovi toksini ostaju stabilni i do 2-3 puta duže (Christensen i Khan, 2020). Burns *i sar.* (2009) su pokazali da ovi toksini imaju jak afinitet ka vezivanju za sediment i glinu gde mogu da opstanu čak godinama.

Ove toksine sintetišu i cijanobakterije i dinoflagelate. Cijanobakterije koje sintetišu ovaj toksin spadaju u rodove *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Geiterinema*, *Microseira* (syn. *Lyngbya* i *Plectonema*), *Phormidium*, *Raphidiopsis*, *Scytonema*, *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Gonyaulax*, *Pyrodinium* (Buratti *i sar.*, 2017; Huang i Zimba, 2019).

#### 2.3.5.1 Kinetika, mehanizmi toksičnosti i biotransformacija saksitoksina

Usvajanje STX-a u crevima se odvija paracelularnom difuzijom (Torres *i sar.*, 2007). Nakon usvajanja, ovi toksini pasivno difunduju kroz krvno-moždanu barijeru i ispoljavaju svoju toksičnost u nervnom sistemu (Testai *i sar.*, 2016). Što se ekskrecije tiče, najčešće se izbacuju preko urina kao glukuronidi (Testai *i sar.*, 2016).

Prema toksičnosti, STX su najpoznatiji kao uzročnici paralitičkog trovanja školjkama. Njihova toksičnost se ispoljava blokiranjem Na<sup>+</sup>-zavisnih kanala u neuronima i K<sup>+</sup>- i Ca<sup>2+</sup>-kanala u mišićnim ćelijama čime sprečavaju propagaciju električnog impulsa u neuronima, mišićima i miokardu (Testai *i sar.*, 2016; Christensen i Khan, 2020). Kod voltažno-zavisnih natrijumovih kanala, STX ulazi direktno u centralni kanal ovog receptora i time blokira upliv

Na<sup>+</sup> jona u ćelije (Llewellyn, 2006; Cusick i Sayler, 2013). Međutim, kod voltažno-zavisnih kalijumovih kanala, STX ne blokiraju direktno kanal, već modifikuju otvaranje kanala, i time destabilizuju njegovo inaktivno stanje, tj. stabiliziraju zatvoreno stanje (Llewellyn, 2006). Zbog toga je neophodna jača transmembranska depolarizacija kako bi se kanal otvorio, i time ometaju funkciju ovih kanala. Što se voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala tiče, STX ih blokira slično kao i voltažno-zavisne natrijumove kanale, međutim ne kompletno, tako da verovatno postoji još neki mehanizam kojim se ovi kanali blokiraju (Llewellyn, 2006).

## 2.4 Uticaj cijanotoksina na ribe

### 2.4.1 Načini izlaganja

Glavni prirodni načini izlaganja riba cijanotoksinima jesu direktnim kontaktom sa toksinima rastvorenim u vodi ili preko ishrane (Svirčev *i sar.*, 2015). U laboratorijskim uslovima, ribe mogu da budu izložene cijanotoksinima preko hrane/kljukanjem, intrapertonealnom injekcijom ili imerzijom u vodi koja sadrži toksine (bilo čist toksin ili izolat) (Malbrouck i Kestemont, 2006). Uticaj toksina na tkiva i jačina oštećenja prouzrokovana delovanjem toksina veoma zavise od načina izlaganja. Neke studije su čak pokazale očigledne razlike u oštećenjima tkiva uzrokovanim različitim načinima izlaganja toksinima (Tencalla *i sar.*, 1994; Carbis *i sar.*, 1996; Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011).

Dominantan način izlaganja riba cijanotoksinima jeste ishranom, tj. preko gastrointestinalnog trakta. S obzirom da se gastrointestinalni trakt razlikuje kod različitih vrsta riba, bilo da su u pitanju planktivorne ili grabljive vrste, apsorpcija toksina će se takođe razlikovati i zavisice od dužine creva. Ribe sa dužim crevom kao što su herbivorne ili planktivorne vrste će apsorbovati veću količinu MC-a u odnosu na grabljive vrste riba sa kraćim ileumom (Svirčev *i sar.*, 2015). Takođe, s obzirom da ribe žive u vodenim ekosistemima, one su konstantno izložene cijanotoksinima rastvorenim u vodi. Škrge kao organ sa najvećom kontaktnom površinom sa vodom su i organ koji je najviše izložen ovim toksinima. Međutim, iako u direktnom kontaktu, apsorpcija ovih toksina preko škrge zavisi od prisustva nosača koji su odgovorni za aktivan prenos datog toksina s obzirom da veoma mali broj cijanotoksina može slobodno da difunduje preko ćelijske membrane (Buratti *i sar.*, 2017).

Intraperitonealna injekcija kao jedan od laboratorijskih načina izlaganja riba cijanotoksinima je ujedno i način kojim se uzrokuju najjača oštećenja tkiva. Ovo je i očekivano s obzirom da se cela količina toksina direktno apsorbuje u krv, a samim tim i transportuje do svih organa gde mogu da izazovu oštećenja. Zbog ove činjenice intraperitonealna injekcija ne

daje realističnu sliku delovanja cijanotoksina u prirodnim uslovima, ali zato može biti veoma korisna u određivanju načina na koji ovi toksini oštećuju tkiva riba, ustanovljavanju letalnih i subletalnih doza, kao i efekata uzrokovanih visokim subletalnim dozama (Svirčev *i sar.*, 2015).

#### 2.4.2 Apsorpcija i akumulacija cijanotoksina

Apsorpcija i akumulacija cijanotoksina u najvećoj meri zavisi od prisustva nosača specifičnih za prenos datog toksina u određenom organu s obzirom da veoma mali broj cijanotoksina može da uđe u ćelije slobodnom difuzijom (kao što je npr. STX; Testai *i sar.*, 2016). Kao što je prethodno pomenuto, ustanovljeno je da su za aktivni transport MC-a kod sisara odgovorni OATP nosači (primarno OATP1A1, OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3; Buratti *i sar.*, 2017; Feurstein *i sar.*, 2009; Fischer *i sar.*, 2010, 2005; Lu *i sar.*, 2008). Kod riba je takođe pokazano da je ova klasa nosača odgovorna za aktivan transport MC-a. Istraživanja na zebricama (Popovic *i sar.*, 2010; Steiner *i sar.*, 2016), pastrmkama (Steiner *i sar.*, 2014) i ražama (Meier-Abt *i sar.*, 2007) su pokazala da je za transport MC-a kod riba najviše odgovorna varijanta Oatp1d1 koja je homolog varijantama OATP1A1, OATP1B1 i OATP1B3 kod sisara i smatra se njihovim evolutivnim prekursorom. Međutim, i ostale varijante ovog nosača imaju sposobnost transporta različitih kongenera MC-a, a verovatno i NOD-a (Steiner *i sar.*, 2016). Takođe, ekspresija i prisustvo različitih varijanti OATP nosača zavisi od datog organa, te će i prijemčivost ili osetljivost datog organa za određeni MC kongener zavisiti od ekspresije date varijante OATP nosača u njemu.

Nakon što toksini uđu u organizam tj. ćelije, oni mogu ili da ispoljavaju svoje toksično dejstvo, ili da se akumuliraju unutar tela. Akumulacija cijanotoksina unutar akvatičnih organizama koji su najčešće u kontaktu s njima je poznato. Različiti beskičmenjaci mogu da akumuliraju velike količine cijanotoksina (Ferrão-Filho i Kozłowsky-Suzuki, 2011). Pripadnici zooplanktona koji se hrane cijanobakterijama akumuliraju najveće koncentracije cijanotoksina i verovatno su jedini organizmi koji biomagnifikuju ove toksine (u ovom slučaju se biomagnifikacijom smatra detektovanje veće koncentracije u ispitanom organizmu u odnosu na koncentraciju u hrani) (Ferrão-Filho i Kozłowsky-Suzuki, 2011; Pham i Utsumi, 2018). Watanabe *i sar.* (1992) su ustanovili da je koncentracija MC-a u zooplanktonu bila 202% veća od koncentracije detektovane u fitoplanktonu. Međutim, u višim trofičkim nivoima dolazi do biorazređivanja, tj. koncentracija toksina detektovana u organizmima je manja od koncentracije detektovane u hrani (Ferrão-Filho i Kozłowsky-Suzuki, 2011; Pham i Utsumi, 2018). Shodno tome, koncentracije cijanotoksina beležene kod riba su generalno manje od koncentracija



beleženih kod akvatičnih beskičmenjaka. Kod riba, akumulacija cijanotoksina zavisi od načina ishrane gde planktivorne (pogotovo fitoplanktivorne) vrste akumuliraju najveće koncentracije toksina, dok grabljive vrste generalno akumuliraju manje koncentracije (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011). Međutim, metaanaliza akumulacije cijanotoksina kod riba je pokazala da zapravo omnivorne vrste akumuliraju najveće koncentracije cijanotoksina (prvenstveno MC-a; Flores *i sar.*, 2018) što je donekle iznenađujuće s obzirom da planktivorne unose veće količine ovih toksina, pogotovo tokom cvetanja. Moguće je da su planktivorne vrste razvile jače sisteme detoksikacije, te samim tim imaju veću sposobnost eliminacije cijanotoksina iz organizma, ali i da se kod omnivornih vrsta javlja aditivni efekat jer se različiti toksini i njihovi metaboliti nalaze u fitoplanktonu i/ili zooplanktonu. Takođe, akumulacija unutar različitih organa može znatno da varira i najverovatnije najviše zavisi od samog organa tj. prisustva nosača za dati toksin.

#### 2.4.3 Toksični efekti cijanotoksina ispoljeni kod riba

Nakon ulaska u organizam i apsorpcije u krvotok, a potom i u ćelije, cijanotoksini počinju da ispoljavaju svoje toksično dejstvo i izazivaju različita oštećenja. Oblik oštećenja i intenzitet zavise od samog toksina, njegovog načina delovanja i količine toksina koji se nalazi u organizmu. Takođe, ispoljavanje efekata u određenim organima zavisi od afiniteta toksina za transport u dati organ (Buratti *i sar.*, 2017).

Efekti cijanotoksina mogu da se ogledaju na različitim nivoima biološke organizacije. Na molekularnom nivou, ovi toksini izazivaju mutacije DNK, jednolančane ili dvolančane prekide DNK ili stvaranje mikronukleusa (Žegura *i sar.*, 2011; Bittner *i sar.*, 2021). Na ćelijskom nivou, cijanotoksini mogu da izazovu produkciju ROS-a, a samim tim i oksidativni stres (Buratti *i sar.*, 2017). Organizam potom reaguje aktivirajući odbrambene mehanizme protiv ROS-a u vidu pojačane sinteze antioksidativnih enzima ili drugih antioksidativnih sistema. Takođe, oštećenja jetre na ćelijskom nivou mogu da se ogledaju u vidu povišene koncentracije enzima jetre (ALT, AST) u krvi (Buratti *i sar.*, 2017), ali i povećanom koncentracijom enzima biotransformacije koji ukazuju na transformaciju i ekskreciju datih toksina. Oštećenja takođe često mogu i morfološki da se detektuju pomoću metoda kao što je histologija. Oštećenja jetre u vidu vakuolizacije hepatocita ili narušavanja parenhima jetre, vakuolizacije ćelija bubrežnih tubula, ili proliferacije epitela škrge se često uočavaju nakon izlaganja riba cijanotoksinima, ili kod riba izlovljenih iz cvetajućih ekosistema (Svirčev *i sar.*, 2015). U ekstremnim uslovima, usled cvetanja cijanobakterija može i da dođe do posledica na

populacionom nivou. Ovo se najčešće ogleda u masovnom pomoru riba koje se dešava usled hipoksije i prevelike koncentracije pojedinih organskih jedinjenja kao što je amonijak u vodi (Jewel *i sar.*, 2003; Kangur *i sar.*, 2005; Chellappa *i sar.*, 2008; Ismael, 2012; Svirčev *i sar.*, 2016; Burdick *i sar.*, 2020a, 2020b).

## 2.5 Biomarkeri zagađenja životne sredine

Tokom poslednjih nekoliko decenija, zagađenje životne sredine postaje sve učestalija tema istraživanja i debata. Industrijalizacijom i stvaranjem velikih naselja (gradova/metropola) dolazi do sve većeg otpuštanja raznih toksičnih hemikalija u spoljašnju sredinu. Kako bi znali koje hemikalije su toksične, a koje ne, neophodno je da se uspostavi veza između izlaganja određenim hemikalijama i nivoa kontaminacije ili oštećenja tkiva organizama koji su izloženi tim hemikalijama. Na početku, klasičan pristup ekološkoj toksikologiji je podrazumevao merenje količine određenih hemikalija u spoljašnjoj sredini i povezivanje datih vrednosti sa negativnim posledicama kroz eksperimente na laboratorijskim životinjama (Peakall, 1994). Međutim, postoji nekoliko problema kod ovakvog pristupa. Naime, merenje koncentracije hemikalija ne mora nužno da predstavlja i količinu koja je biodostupna; ovakav pristup ne uzima u obzir toksičnost mešavina različitih hemikalija; ekstrapolacija laboratorijskih nalaza na uslove na terenu nije jednostavna zbog različitih ekoloških uslova koji mogu da vladaju u životnoj sredini i da pozitivno utiču na toksičnost određene supstance, kao i razlike u osetljivosti različitih vrsta na date hemikalije.

Ove činjenice jasno pokazuju da je neophodno razviti mehanizme koji će direktno pokazati toksičnost i zagađenje u životnoj sredini. Sa druge strane, negativni uticaji određenih hemikalija se mogu ispoljavati na različitim nivoima – od ćelijskog do nivoa populacije. Stoga je bitno razviti signale koji će blagovremeno oslikavati negativne biološke odgovore na prisutnost toksičnih jedinjenja (van der Oost *i sar.*, 2003). Signali tj. biološki odgovori koji mogu da se dovedu u vezu sa izlaganjem toksičnim supstancama se nazivaju biomarkeri (Peakall, 1994; van der Oost *i sar.*, 2003). Sa druge strane, tokom izlaganja sub-akutnim koncentracijama ksenobiotika, ove hemikalije najčešće ne izazivaju jasne fiziološke/biohemijske/strukturne promene, tako da običnim toksikološkim testovima ili korišćenjem nekih od biomarkera nije moguće ustanoviti negativne posledice takvog izlaganja. Međutim, to ne znači da su ovakve koncentracije beznačajne ili da nisu opasne s obzirom da mogu da ispolje svoje dejstvo nakon hroničnog izlaganja ili mogu da se akumuliraju unutar

tkiva i dalje prenose u lancu ishrane. Markeri bioakumulacije oslikavaju distribuciju ksenobiotika i/ili njihovih derivata unutar organizma (van der Oost *i sar.*, 2003).

Ribe, kao jedni od najsloženijih organizama koji naseljavaju vodene ekosisteme, mogu predstavljati dobre bioindikatore jer se praćenjem različitih biomarkera u njihovom telu mogu dobiti brojne i veoma značajne informacije o stanju životne sredine (van der Oost *i sar.*, 2003). Na ribama mogu da se prate biomarkeri na različitim nivoima biološke organizacije: molekularni, ćelijski, fiziološki, bihevioralni, populacioni (Janz, 2013), te ribe mogu da ukažu na prisustvo potencijalno toksičnih supstanci u vodenim ekosistemima, mogu da pokažu kakav efekat te supstance mogu da imaju, kao i da služe za ekstrapolaciju i predviđanje kakve efekte te supstance mogu da imaju i na sisare ili čoveka. Naravno, najefektivnije je integrisati što više biomarkera različitih nivoa biološke organizacije kako bi se dobila što kompletnija slika (Schlenk, 1999; Sanchez i Porcher, 2009; Lyons *i sar.*, 2010; Kramer *i sar.*, 2011). Takođe, ovi organizmi mogu da akumuliraju ksenobiotike, te takođe mogu da budu veoma korisni markeri bioakumulacije.

### 2.5.1 Markeri bioakumulacije

Kao što je prethodno opisano, merenje koncentracije hemijskih agenasa unutar samog organizma/organa/tkiva predstavlja jedan od načina procene delovanja ksenobiotika na organizme. Nakon što organizam apsorbuje određenu hemikaliju, ona može da cirkuliše telom, da izaziva negativne efekte, da se skladišti u samom telu, da se putem biotransformacije metaboliše i pretvori u određeni derivat ili da se izluči. Markeri bioakumulacije oslikavaju distribuciju ksenobiotika i/ili njihovih derivata unutar organizma (van der Oost *i sar.*, 2003). Akumulacija ksenobiotika najviše zavisi od kinetike usvajanja i eliminacije datog ksenobiotika (Gobas *i sar.*, 1988; van der Oost *i sar.*, 2003). Akumulacija može da se ispolji u tri osnovna oblika: (1) bioakumulacija, (2) biokoncentracija i (3) biomagnifikacija.

Bioakumulacija predstavlja skladištenje ksenobiotika unutar organizma preko izlaganja ksenobiotcima u vodi i preko hrane. Biokoncentracija kod riba podrazumeva apsorpciju ksenobiotika direktno iz vode preko škrga ili kože, i najčešće je koncentracija hemikalija veća u organizmu nego što je u vodi (MacKay i Fraser, 2000). Smatra se da se usvajanje ovih jedinjenja odvija pasivnom difuzijom, i da se uglavnom odvija preko škrga s obzirom da imaju najveću površinu koja je konstantno u kontaktu sa vodom i veoma tanak jednoslojan pločasti epitel (Yang *i sar.*, 2000). Za razliku od biokoncentracije, biomagnifikacija podrazumeva bioakumulaciju koja se dešava isključivo preko hrane i oslikava skladištenje ksenobiotika na

različitim trofičkim nivoima. Ovaj vid akumulacije je posebno važan u objašnjavanju apsorpcije veoma hidrofobnih supstanci, s obzirom da matematički modeli difuzije ne mogu jasno da objasne stope usvajanja ovih jedinjenja (van der Oost *i sar.*, 2003; Ali i Khan, 2019). Takođe, na ovaj način može da se objasni usvajanje ksenobiotika koji se nalaze nataloženi u sedimentu, s obzirom da takve supstance prvo ishranom usvajaju organizmi bentosa, a dalje predacijom unose i drugi organizmi kao što su ribe (Farrington, 1991). Međutim, ribe ne mogu da usvoje bilo koje toksično jedinjenje. Da bi organizmi apsorbivali određeno jedinjenje, oni moraju posedovati mehanizam za usvajanje datog jedinjenja. Frakcija hemikalije rastvorene u vodi ili u sedimentu koja može potencijalno da se usvoji od strane organizama koji su joj izloženi predstavlja biodostupnost (MacKay i Fraser, 2000; van der Oost *i sar.*, 2003).

### 2.5.2 Biomarkeri

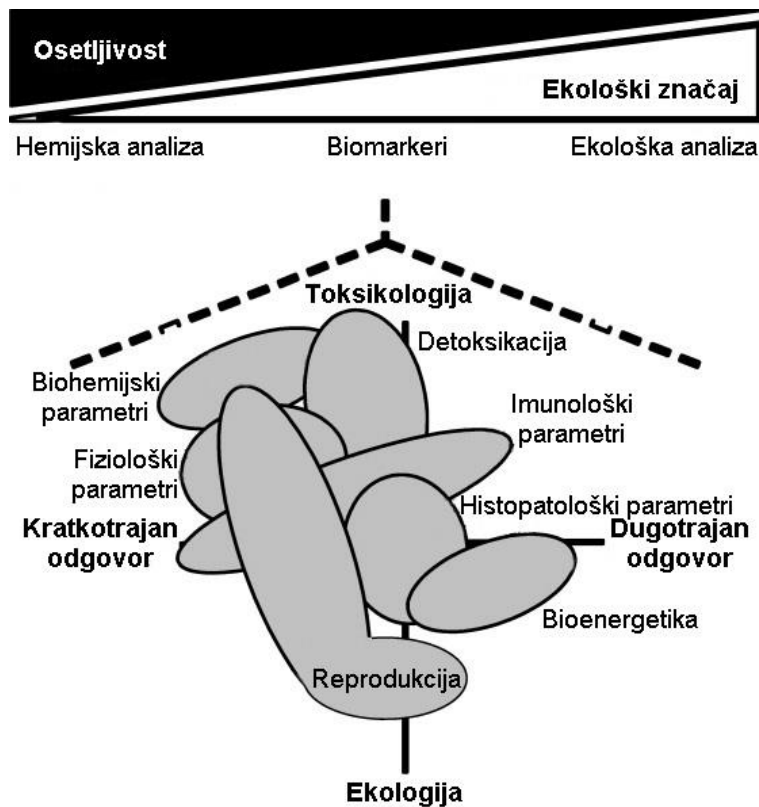
Biološki odgovori koji mogu da se dovedu u vezu sa izlaganjem toksičnim supstancama se nazivaju biomarkeri (Peakall, 1994; van der Oost *i sar.*, 2003). Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, biomarkeri mogu da se podele u tri osnovne kategorije:

- Biomarkere izlaganja;
- Biomarkere efekta;
- Biomarkere osetljivosti.

Biomarkeri izlaganja podrazumevaju detekciju supstance, njenih metabolita ili produkta interakcije datog ksenobiotika i ciljnog molekula ili ćelije u određenom delu organizma (van der Oost *i sar.*, 2003; Allan *i sar.*, 2006). Ovo su najčešće molekularni markeri tj. proteini koji su zaduženi za zaštitu organizma od negativnih dejstava ksenobiotika kao što su proteini toplotnog stresa (*engl.* Heat Shock Proteins – HSP), citohrom P450 i cela familija citohroma (CYP), metaltioneini i drugi. Biomarkeri efekta predstavljaju fiziološke, biohemijske ili bilo kakve druge merljive promene u organizmu koje najstaju kao rezultat delovanja ksenobiotika. Ovo mogu biti markeri integriteta ćelijske membrane, integritet DNK molekula, promene seruma i drugi (Allan *i sar.*, 2006). Biomarkeri osetljivosti predstavljaju inherentnu ili stečenu sposobnost organizma da odgovori na izlaganje određenom ksenobiotiku.

Iako je u teoriji ovakvo raščlanjivanje biomarkera jasno, u praksi često nije toliko jednostavno ustanoviti kojoj grupi određeni biomarkeri pripadaju. Npr., pojedini biohemijski markeri mogu da budu i biomarkeri izlaganja, jer date promene ukazuju na postojanje izlaganja ksenobiotiku, ali te iste promene mogu biti i biomarkeri efekta jer pokazuju kakav efekat ima

izlaganje ksenobiotiku. Dobri biomarkeri bi trebalo da budu indikatori i podložnosti, ali i ranog biološkog efekta, i samim tim da stoje između prisustva ksenobiotika i značajnijih efekata koje taj ksenobiotik može da izazove. Takođe, pri izboru biomarkera, posebna pažnja mora da se obrati na nivo biološke organizacije, ali i na vremenski okvir u kom dati biomarker reaguje. Kao što je prethodno opisano, u odnosu na biološku strukturu, markeri mogu biti različiti, od molekularnih do populacionih. U odnosu na vremenski okvir mogu da ukazuju na kratkotrajno tj. akutno delovanje ksenobiotika ili na dugotrajno tj. hronično delovanje (van der Oost *i sar.*, 2003; Sanchez i Porcher, 2009). Pozicija različitih biomarkera u odnosu na nivo organizacije tj. ekološki značaj (s obzirom da efekti na višem nivou biološke organizacije imaju veći biološki i ekološki značaj) i vremenski okvir delovanja je prikazana na Slici 11.



**Slika 11.** Pozicija različitih biomarkera u odnosu na nivo organizacije tj. ekološki značaj i vremenski okvir delovanja. Preuzeto i modifikovano iz Sanchez i Porcher (2009) uz odobrenje izdavača.

Najčešće korišćeni biomarkeri poredani u odnosu na biološki nivo organizacije počevši od molekularnih su:

- Enzimi biotransformacije;
- Parametri oksidativnog stresa;
- Produkti biotransformacije;

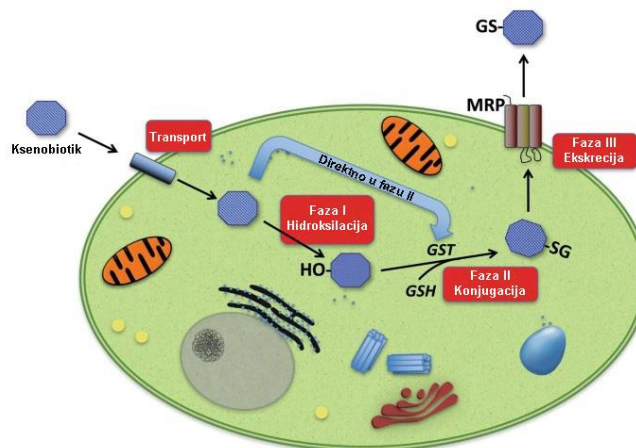
- Proteini stresa;
- Hematološki parametri;
- Imunološki parametri;
- Reproductivni i endokrini parametri;
- Neuromuskularni parametri;
- Genotoksičnost;
- Fiziološki i morfološki parametri.

U nastavku će biti detaljnije opisani markeri koji su korišćeni u ovoj disertaciji.

#### 2.5.2.1 *Enzimi biotransformacije*

Nakon usvajanja ksenobiotika iz spoljašnje sredine, organizmi moraju da imaju određeni način na koji mogu da odstrane tj. da eliminišu ksenobiotike iz tela. Osnovni načini eliminacije ksenobiotika su ekskrecija u originalnoj formi, ili biotransformacijom (van der Oost *i sar.*, 2003). S obzirom da je većina usvojenih ksenobiotika lipofilna što im omogućava lak prolaz kroz membrane i usvajanje, njihova ekskrecija u originalnoj formi je veoma teška, i zahteva određen nivo hidrofilitnosti. Proces tokom kojeg dolazi do određenih strukturnih promena akumuliranih lipofilnih supstanci čime one postaju hidrofilne se naziva biotransformacija (Dekant, 2009). Primarna uloga biotransformacije je detoksikacija, tj. smanjenje toksičnosti datog jedinjenja (van der Oost *i sar.*, 2003; Dekant, 2009). Međutim, u određenim okolnostima dolazi i do povećanja toksičnosti ksenobiotika u procesu koji se naziva bioaktivacija (Cooper i Hanigan, 2010; Gerba, 2019). Kod kičmenjaka, biotransformacija se uglavnom odvija u jetri (Beiras, 2018).

Biotransformacija se uglavnom dešava dejstvom enzima biotransformacije. Ovi enzimi se razlikuju od svih ostalih enzima po veoma širokom spektru supstrata koje mogu da procesuju, ali sa druge strane imaju nisku stopu katalisanja reakcija (Dekant, 2009). S obzirom da postoji veoma velik broj ovih enzima, oni se mogu podeliti u dve osnovne grupe: enzime I faze i enzime II faze (van der Oost *i sar.*, 2003; Testa, 2008; Dekant, 2009; Beiras, 2018; Gerba, 2019). Tokom I faze biotransformacije dolazi do funkcionalne reakcije kao što je hidroliza, oksidacija ili redukcija tokom koje dolazi do dodavanja funkcionalne grupe na ksenobiotik (Slika 12). Ova grupa dalje omogućava spajanje sa određenim polarnim endogenim metabolitom tokom II faze biotransformacije.



**Slika 12.** Shematski prikaz faza biotransformacije ksenobiotika. Preuzeto i modifikovano iz Allocati *i sar.* (2018).

CYP450 predstavlja grupu membranskih hem proteina koji su zaduženi za fazu I biotransformacije. Locirani su u glatkom endoplazmatskom retikulumu hepatocita, retko kod drugih ćelija (van der Oost *i sar.*, 2003; Rourke i Sinal, 2014; Beiras, 2018; Kedderis, 2018). Ovi enzimi igraju ulogu i u oksidaciji i u redukciji i metabolišu oko 75-80% reakcija faze I biotransformacije (Sim i Ingelman-Sundberg, 2010). Osim oksidacije i redukcije, ovi enzimi su uključeni i u procese alifatične hidroksilacije, aromatične hidroksilacije, epoksidacije, oksidativne deaminacije, oksidativne dehalogenacije, oksidativne denitrifikacije i oksidativne desulfacije (Rourke i Sinal, 2014).

CYP450 enzimi oksiduju i redukuju različite supstrate tj. supstance usled čega postoji i velik broj izoformi ovog enzima. Do sada su opisane hiljade gena koji kodiraju različite izoforme, tako da je nomenklatura, kao i funkcija različitih izoformi konfuzna. Međutim, danas postoje uređene baze izoformi (Nelson, 2009; Sim i Ingelman-Sundberg, 2010) na osnovu kojih postoji ukupno 18 familija ovih enzima gde su prve tri familije uglavnom zadužene za metabolizam egzogenih supstanci, dok su ostale familije zadužene za metabolizam endogenih supstanci (Sim i Ingelman-Sundberg, 2010; Rourke i Sinal, 2014).

Familija CYP1A je možda najvažnija familija ovih enzima kod riba (van der Oost *i sar.*, 2003). Čine je samo dva proteina, CYP1A1 i CYP1A2. S obzirom da prisustvo određenih ksenobiotika inicira transkripciju i translaciju CYP1A, detekcija ekspresije gena pomoću PCR metoda i detekcija prisustva proteina pomoću western blot-a ili imunohistohemije je postala deo standardnih ekotoksikoloških metoda. Međutim, testiranje katalitičke aktivnosti ovog enzima je postao dominantan način ispitivanja prisustva CYP enzima. Najosetljivija metoda za testiranje odgovora CYP enzima je merenje aktivnosti etoksirezorufin *O*-deetilaze (EROD) pri

čemu se aktivnost EROD-a meri emisijom fluorescencije od strane produkta rezorufina (Goksøyr i Förlin, 1992). EROD je danas jedna od standardnih biomarkera riba i koristi se u raznim ekotoksikološkim ispitivanjima.

Tokom faze II biotransformacije dolazi do konjugacije ksenobiotika ili njegovih metabolita sa endogenim ligandom. Tokom konjugacije najčešće dolazi do dodavanja amino-kiselina, šećera ili nekih drugih polarnih grupa na ksenobiotik čime on postaje hidrofilniji (van der Oost *i sar.*, 2003; Rourke i Sinal, 2014; Beiras, 2018; Kedderis, 2018). Endogeni ligandi mogu da se dodaju na ksenobiotik u svojoj nativnoj formi, ali i na određenu funkcionalnu grupu dodatu tokom faze I biotransformacije. Najdominantniji metabolički put faze II kod riba je konjugacija ksenobiotika sa glutationom (GSH), dok ostali metabolički putevi imaju manji značaj i najčešće su veoma specifični za pojedine ksenobiotike (van der Oost *i sar.*, 2003).

GSH je tripeptid i sastoji se od *g*-glutamina, cisteina i glicina (Commandeur *i sar.*, 1995; Kretzschmar, 1996; van der Oost *i sar.*, 2003; Pizzorno, 2014; Beiras, 2018). U organizmu se nalazi u redukovanoj ili oksidovanoj formi i njegova funkcija zavisi od forme koju ima. Redukovana forma je uključena u fazu II biotransformacije, dok oksidovana forma kruži organizmom i učestvuje u odbrani organizma od oksidativnog stresa (van der Oost *i sar.*, 2003; Pizzorno, 2014). Odnos između redukovanog (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa se naziva redoks status i on može da pokaže da na organizam/ćeliju deluju ksenobiotici, ili se ćelija nalazi u oksidativnom stresu (Pizzorno, 2014). Kod riba, ovaj odnos je najčešće veći od 10:1 (van der Oost *i sar.*, 2003).

Što se tiče detoksikacije, tj. faze II biotransformacije, GSH se vezuje za elektrofilne delove ksenobiotika pomoću glutation-S transferaze (GST) gde GSH reaguje sa elektrofilnim delom i zamenjuje vodonik, hlor ili nitro-grupu (van der Oost *i sar.*, 2003; Rourke i Sinal, 2014; Beiras, 2018; Kedderis, 2018). Konjugat se potom izlučuje preko žučnih kiselina ili se dalje degradira do merkapturnih kiselina koje se potom izlučuju preko mokraćne.

GST je deo familije multifunkcionalnih enzima koji su najviše uključeni u fazu II biotransformacije. Ovi enzimi se svrstavaju u dve superfamilije; jednu citosolnu, a drugu membransku (Ketterer, 2001; Gertsch, 2007). Mogu biti homo- ili heterodimeri i veoma su raznovrsni u strukturi, aktivnosti, ćelijskoj i međućelijskoj distribuciji i biološkoj aktivnosti (Ketterer, 2001; Tsuchida, 2002; Gertsch, 2007; Allocati *i sar.*, 2018). Ova raznovrsnost potiče od činjenice da postoji sedam različitih subjedinica koje imaju različite katalitičke funkcije i vezuju se za različite substrate (Kedderis, 2018). U dimernoj strukturi, jedna subjedinica se vezuje za GSH, dok se druga vezuje za substrat. Kod riba se najčešće nalaze četiri familije ovih enzima: a, m, p i q koje se uglavnom nalaze u citosolu hepatocita (van der Oost *i sar.*, 2003).



U ekotoksikološkim studijama se najčešće meri ukupna aktivnost ovih enzima tako što se meri konjugacija GSH sa substratom 1-hloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) (Van Der Aar *i sar.*, 1996; van der Oost *i sar.*, 2003).

#### 2.5.2.2 Parametri oksidativnog stresa

Mnogi ksenobiotici ili njihovi metaboliti uzrokuju oksidativni stres u ćelijama, a posledično toksičnost vezanu za oksidativni stres. Ova toksičnost je posledica delovanja citotoksičnih ROS-a koji nastaju redukcijom molekularnog kiseonika (van der Oost *i sar.*, 2003; Sies, 2019). U ROS spadaju superoksidni anjon ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) (van der Oost *i sar.*, 2003; Gagné, 2014; Shankar i Mehendale, 2014; Sies, 2019). Sva tri molekula su veoma potentni oksidanti koji mogu da dovedu do inaktivacije enzima, oštećenja DNK, lipidne peroksidacije, pa čak i ćelijske smrti (Winston i Di Giulio, 1991; Valavanidis *i sar.*, 2006; Gagné, 2014).

S obzirom da su ROS veoma reaktivni i mogu vrlo brzo da izazivaju promene unutar ćelija, prisustvo antioksidativnih sistema koji će ukloniti nastale ROS je neophodno za normalno funkcionisanje ćelija i organizama. Antioksidativni sistem riba se sastoji od antioksidanata male molekulske mase, ali i proteina tj. enzima velike molekulske mase (Livingstone, 2001; Lushchak, 2011). U antioksidante male molekulske mase spadaju redukovani GSH, askorbinska kiselina (vitamin C), karotenoidi, retinol (vitamin A) i drugi (López-Torres *i sar.*, 1993). Oni najčešće kruže organizmom i vezuju tj. neutrališu ROS na koje naiđu. U antioksidante velike molekulske mase spadaju enzimi koji specifično neutrališu ROS, a to su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza (van der Oost *i sar.*, 2003; Lushchak, 2011).

Superoksid dismutaze (SOD, *engl.* Superoxide Dismutase) su grupa metaloproteina koji katališu dismutaciju superoksidnog anjona do molekula kiseonika i vodonik-peroksida (van der Oost *i sar.*, 2003). Postoje ukupno 4 poznata oblika ovog enzima koji se razlikuju po metalu prisutnom u aktivnom centru i po efikasnosti razgradnje superoksidnog anjona.

Vodonik-peroksid se metaboliše do vode i molekularnog kiseonika. Enzimi koji kataliziraju ovu reakciju su katalaze (CAT, *engl.* Catalase) i glutation peroksidaze (GPx, *engl.* Glutathione Peroxidase) (Filho, 1996; van der Oost *i sar.*, 2003). CAT su izgrađene od četiri subjedinice, poseduju molekul hema i dominantno se nalaze unutar peroksizoma. Ovi enzimi imaju sposobnost da metabolišu samo vodonik-peroksid. Sa druge strane, GPx imaju sposobnost metabolisanja i lipidnih peroksida, te samim tim imaju vodeću ulogu u odbrani

membrana od oštećenja izazvanih lipidnom peroksidacijom (Filho, 1996; van der Oost *i sar.*, 2003). Ovo je grupa citosolnih tetramernih enzima koji sadrže seleno-cisteinski ostatak. Tokom redukcije vodonik-peroksida, ovi enzimi istovremeno oksiduju glutation stvarajući njegovu oksidovanu formu (GSSG). GSSG može dalje da se redukuje do redukovanog glutationa (GSH) delovanjem glutation reduktaze (GR, *engl.* Glutathione Reductase). Ovi enzimi nemaju aktivnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti kao prethodno opisani, ali imaju veoma važnu ulogu s obzirom da održavaju visoku koncentraciju GSH koji je kosupstrat za GPx. Pored ovih enzima, i GST može da učestvuje u odbrani ćelija od oksidativnog stresa gradeći konjugate glutationa sa elektrofilima koji su produkti oksidativnog metabolizma kao što su neki lipidni peroksidi (Sherratt i Hayes, 2001).

### 2.5.2.3 Morfološki parametri - histopatologija

Histopatologija se bavi izučavanjem promena koje nastaju u tkivu (Chiang i Au, 2013). Na ovaj način, histopatološki biomarkeri mogu da ukazuju na ćelijske promene koje utiču na pojedine organe, ili pak ceo organizam, a koje ne mogu da se detektuju prethodno opisanim ćelijskim markerima. Prema Slici 11, histopatološki markeri se nalaze na sredini u odnosu na nivo organizacije organizma i ekološki značaj, ali i vremenski okvir delovanja (Adams *i sar.*, 1989; van der Oost *i sar.*, 2003; Sanchez i Porcher, 2009). Stoga, histopatologija predstavlja veoma važnu sponu između molekularnih i ćelijskih biomarkera, kao i studija koje ispituju uticaj ksenobiotika na organizam ili zajednicu. Takođe, histopatologija može da ukaže na brzo tj. akutno delovanje ksenobiotika, ali isto tako može da ukaže i na dugotrajno tj. hronično delovanje.

Histopatologija riba je počela intenzivno da se koristi u toksikologiji tokom 1980-ih godina, i od tada se koristi u raznim terenskim i laboratorijskim studijama, ali i u pojedinim nacionalnim i regionalnim programima monitoringa u Evropi i SAD (Schwaiger *i sar.*, 1997; Bernet *i sar.*, 1999; Au, 2004; Lang *i sar.*, 2006; Van Dyk *i sar.*, 2012; Chiang i Au, 2013; Pereira *i sar.*, 2013). Promene koje se uočavaju tokom histoloških analiza nisu specifične za određene polutante. Da bi se utvrdilo da li određeni polutant specifično izaziva neke promene, koristi se niz laboratorijskih ispitivanja, koja se potom ekstrapoliraju i koriste kao referentni materijal tokom terenskih ispitivanja. Međutim, tokom terenskih ispitivanja histopatološke promene retko ukazuju na uticaj pojedinačnih ksenobiotika, već najčešće ukazuju na delovanje čitave smese različitih jedinjenja.

Dakle, histopatologija je veoma važna komponenta ekotoksikologije i monitoringa životne sredine. Najvažnija prednost ove metode jeste njena mogućnost da jasno vizuelno ukaže na promene unutar ćelija, tkiva i organa i na taj način ukaže na moguće posledice i na drugim nivoima organizacije i time ih poveže (Wester *i sar.*, 2002; Chiang i Au, 2013). S obzirom da histološke promene mogu da se jave i tokom delovanja veoma niskih koncentracija ksenobiotika, ovi biomarkeri su veoma bitni za ranu identifikaciju oštećenja pojedinih organa i opasnosti po zdravlje (Chiang i Au, 2013). Takođe, putem imunohistohemije mogu da se ustanove specifične promene unutar organizma, ali i distribucija pojedinih toksina ukoliko su razvijena antitela na dati toksin. S obzirom da histološki blokovi trajno čuvaju strukturu tkiva, oni mogu ponovo da se pregledaju i kasnije ponovo koriste. Međutim, ograničavajući faktor ove metode jeste da se jedinke žrtvuju, te nije moguće kontinuirano pratiti promene i dejstvo ksenobiotika. Poređenje rezultata između različitih studija može u pojedinim slučajevima biti komplikovano s obzirom na moguće razlike u načinu procesiranja uzoraka, bojenja, ali i sklonosti ili količini iskustva istraživača koji radi datu analizu. Neki od ovih problema mogu da se prevaziđu standardizovanjem metodologije, ali i standardizovanjem načina ocenjivanja histopatoloških promena gde postoje jasno definisani termini i načini ocene promena kao što je polukvantitativna analiza predložena od strane Bernet *i sar.* (1999). Iako je i ova metoda podložna subjektivnim razlikama u proceni istraživača, ipak može da se koristi u svrhu delimične kvantifikacije promena.

## **2.6 Lokaliteti Srbije i Mađarske od posebnog značaja**

### **2.6.1 Lokalitet Srbije od posebnog značaja (jezero Ludaš)**

Jezero Ludaš je drugo najveće eolsko jezero u Srbiji (Ćirić *i sar.*, 2020). S obzirom na svoj značaj, ono je pod određenim stepenom zaštite još od 1955. godine, a trenutno ima status specijalnog rezervata prirode (Tokodi *i sar.*, 2018; Ćirić *i sar.*, 2020). Takođe spada i u močvarna područja sa međunarodnim značajem (tzv. Ramsar područje), ali i u područja značajna za ptice i biodiverzitet (IBA, *engl.* Important Bird and Biodiversity Area) (Grba *i sar.*, 2017; Tokodi *i sar.*, 2018). Ovaj ekosistem je stanište za mnoge endemske i reliktnne vrste biljaka, ali i velik broj ptica koje se nalaze na IUCN crvenoj listi zaštićenih vrsta. Stoga, stabilnost i dobar kvalitet vode ovog ekosistema su od velikog značaja.

Tokom poslednjih nekoliko decenija, došlo je do značajnog pogoršanja kvaliteta vode jezera Ludaš, prvenstveno usled antropogenih aktivnosti. Među njima, najznačajnije su eutrofizacija i zagađenje vode, promene u hidrološkom režimu i introdukcija invazivnih i

alohtonih vrsta (Ćirić *i sar.*, 2020). Zagađenje i eutrofizacija su primarno povezani sa ulivanjem vode niskog kvaliteta iz jezera Palić nakon konstrukcije kanala Palić-Ludaš. Takođe, spiranje organskih i neorganskih materija sa okolnog poljoprivrednog zemljišta doprinosi pojačanoj koncentraciji nutrijenata.

Usled povećanja nutrijenata u jezeru i pojačane eutrofizacije, došlo je i do pojave prenamnožavanja cijanobakterija. Prvo intenzivno cvetanje cijanobakterija je zabeleženo 1970-ih godina kada je masovno cvetala vrsta *Microcystis aeruginosa* (Seleši, 1981). Slično je beleženo i 1980-ih godina (Đukić *i sar.*, 1991). Tokom 1990-ih dolazi do cvetanja vrsta *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae* i *Anabaena spiroides* (Seleši, 2006; Tokodi *i sar.*, 2018), dok tokom 2000-ih dolazi i do cvetanja vrsta *Microcystis flos-aquae*, *Microcystis wesenbergii*, *Lyngbya limnetica*, *Planktothrix agardhii* (Simeunović, 2009), *Microcystis viridis* i *Pseudanabaena limnetica* (Sedmak i Svirčev, 2011, citirano iz Tokodi *i sar.*, 2018). Dve invazivne vrste cijanobakterija su takođe zabeležene u jezeru skorijih godina: *Cylindrospermopsis raciborskii* i *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Jovanović *i sar.*, 2016; Tokodi *i sar.*, 2018). Pomenute studije ukazuju na kontinuirani problem cvetanja cijanobakterija koji se dešava gotovo svake godine, pogotovo tokom letnjih meseci. Studija iz 2018. godine dodatno potvrđuje ovaj zaključak ukazujući na loš kvalitet vode, cvetanje cijanobakterija, prisustvo cijanotoksina, akumulaciju cijanotoksina u biljkama i ribama, kao i na oštećenja tkiva riba (Tokodi *i sar.*, 2018). S obzirom da je jezero Ludaš i dalje zaštićeno kao Specijalni rezervat prirode, Ramsarsko područje i IBA područje, a da trenutna situacija lošeg kvaliteta vode može veoma negativno da utiče na ceo živi svet ovog jezera, postavlja se pitanje da li je zaštita ovako narušenog ekosistema opravdana i da li se njegovom zaštitom samo dalje nastavlja očuvanje tog lošeg stanja bez naznake ka oporavku. Zbog velikog značaja ali i višedecenijske borbe sa cvetanjem cijanobakterija, jezero Ludaš izabrano je kao odgovarajuće za istraživanje u okviru ove doktorske disertacije.

### 2.6.2 Lokaliteti Mađarske od posebnog značaja (Sistem Kiš-Balaton, jezero Balaton i jezero Fehervarčurgo)

Jezero Balaton je najveće jezero u centralnoj Evropi i nalazi se u zapadnoj Mađarskoj (Dömötörfy *i sar.*, 2003; Kovács *i sar.*, 2010). S obzirom na svoju veličinu, ima čak 51 pritoku, od kojih su 20 stalne i ulivaju se u jezero tokom cele godine (Hajnal i Padisák, 2008). Najveća od njih je reka Zala koja unosi oko polovine ukupnog dotoka vode u jezero. S obzirom na kapacitet dotoka i činjenicu da ova reka unosi 35-40% ukupnog organskog opterećenja (Kovács

*i sar.*, 2010), ona ima značajan uticaj na kvalitet vode jezera. Na ušću reke Zale se nalazi veliko močvarno područje pod nazivom „močvarno područje Kiš-Balaton“ (KBW, *engl.* Kis-Balaton Wetland). U 18. i 19. veku, ovo područje je obuhvatalo veliko jezero koja je bilo okruženo vodenom vegetacijom uključujući i veliku šumu koja je zaklanjala ušće reke Zale u Balaton. KBW je filtrirao sedimente i nutrijente koji bi u suprotnom ušli u jezero što je pružalo hidrauličku zaštitu i omogućavalo je da se eutrofizacija desi pre nego što voda uđe u Balaton, a samim tim je imao određeno zaštitno svojstvo (Dömötörfy *i sar.*, 2003). Međutim, pomenuti kapacitet filtracije je počeo da se narušava 1863. godine kada je izgrađen kanal Šio (*mađ.* Sió) kako bi se smanjio nivo jezera u cilju sprečavanja plavljenja novoizgrađene pruge Budimpešta-Rijeka (Kovács *i sar.*, 2010). Ovo je uzrokovalo i smanjenje nivoa vode jezera Kiš-Balaton, koje je dalje isušivano kako bi se ovo područje zamenilo poljoprivrednim područjem. Ubrzo nakon isušivanja jezera Kiš-Balaton i narušavanjem ovog prirodnog filtracionog mehanizma došlo je do ubrzane eutrofizacije jezera Balaton tokom 1930-ih i 1940-ih godina. Tokom sredine 20-og veka je došlo do pojačanja eutrofizacije kada je počelo intenzivnije da se koristi đubrivo bogato nitratima i fosfatima na okolnom poljoprivrednom zemljištu (Dömötörfy *i sar.*, 2003; Hatvani *i sar.*, 2014). Takođe, otpadne vode lokalnih farmi kao i kanalizacija većih gradova koji su počeli da se grade na obalama jezera, a koja se izlivala u Balaton, su dodatno doprineli pogoršanju kvaliteta vode. Između 1977. i 1985. godine, u proseku je iz reke Zale ulazilo 92 tone fosfora, 816 tona azota, 14400 tona suspendovanih čestica (Hatvani *i sar.*, 2011). Tada je postalo jasno da je neophodno sprovesti određene mere kako bi se smanjilo zagađenje jezera Balaton koje je počelo da preti ekonomskom i turističkom potencijalu jezera.

U cilju zaustavljanja cvetanja cijanobakterija, prvenstveno je bilo neophodno zaustaviti dotok velike količine organskih materija (Kovács *i sar.*, 2010). S obzirom da je poznato da močvarna područja zadržavaju nutrijente pomoću nekoliko fizičkih, hemijskih i bioloških faktora kao što su taloženje, adsorpcija nutrijenata od strane sedimenta, denitrifikacija i usvajanje nutrijenata od strane vodene vegetacije ili algi (Hatvani *i sar.*, 2014), predloženo je ponovno plavljenje područja KBW pod okvirom projekta KBWPS (*engl.* Kis-Balaton Water Protection System) ili zaštitnog sistema Kiš-Balaton (Dömötörfy *i sar.*, 2003; Hatvani *i sar.*, 2011). Plavljenje je planirano u dve faze: prva faza je podrazumevala plavljenje donje doline reke Zale, dok je druga faza podrazumevala plavljenje basena jezera Kiš-Balaton (Dömötörfy *i sar.*, 2003). Prva faza je započeta 1985. godine kada je napravljeno jezero Hidvegi (*mađ.* Hídvégi) koje je veličine 18 km<sup>2</sup> i ima vreme zadržavanja od 30 dana (Tátrai *i sar.*, 2000; Nguyen *i sar.*, 2005; Kovács *i sar.*, 2010; Hatvani *i sar.*, 2011). Druga faza je započeta 1992. godine kada je poplavljen deo Feneki (*mađ.* Fenéki) jezera; poplavljeno je svega 16 km<sup>2</sup> od

planiranih 57 km<sup>2</sup> a vreme zadržavanja vode je 90 dana. Ovo plavno područje je tipična močvara pokrivena makrofitama, prvenstveno trskom. U prvoj fazi se zadržava gotovo 60% ukupnih suspendovanih čestica reke Zale, dok se posle druge faze zadržava dodatnih 75% ukupnih suspendovanih čestica (Nguyen *i sar.*, 2005). Pored izgradnje KBWPS-a, dodatni koraci su preduzeti tokom 1980-ih godina kako bi se zaustavilo zagađivanje Balatona. Ovi koraci su bili postavljanje fabrika za prečišćavanje otpadnih voda kod Zalaegersega i Kestheja koje su uklanjale fosfor iz kanalizacije ova dva grada, preusmeravanje kanalizacije gradova na istočnoj i južnoj obali, zabrana korišćenja fosfatnog đubriva i smanjenje velikih farmi za uzgoj domaćih životinja (Hatvani *i sar.*, 2014, 2020). Svi ovi koraci su smanjili organsko opterećenje koje se ulivalo u Balaton, pogotovo ukupni fosfor koji je smanjen za više od 50% (Hatvani *i sar.*, 2014, 2020). Nakon ovog dolazi do oporavka kvaliteta vode jezera i njegove oligotrofizacije. Sistem Kiš-Balaton i jezero Balaton predstavljaju područja od izuzetnog značaja u Mađarskoj, a zbog čestog problema cvetanja u prošlosti, izabrana su za istraživanje prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Što se tiče jezera Fehervarčurgo, ova akumulacija je veoma bitna za županiju Bakonj koja se nalazi u severozapadnoj Mađarskoj. Akumulacija je nastala pregrađivanjem reke Gaja tokom 1971-1972. godine kako bi se sprečilo plavljenje rudarskih tunela u ovoj oblasti. Međutim, nakon zatvaranja tunela i prestanka rudarskih aktivnosti, glavna funkcija ove akumulacije je zaustavljanje plavnih maksimuma i sprečavanje plavljenja brojnih iskopina peska iz kojih se iskopavaju visoko kvalitetan kvarcni pesak koji je pogodan za pravljenje stakla, ali i grub pesak iz kojeg se prerađuju rutil, ilmenit, cirkon i monazit (Nagy *i sar.*, 2014). Pored toga, jezero ima veliki značaj za navodnjavanje i ribolov. Najčešće izlovljavane vrste riba su omnivorne ciprinidne vrste šaran (*Cyprinus carpio*) i deverika (*Abramis brama*), ali i grabljivice kao što su som (*Silurus glanis*) i smuđ (*Sander lucioperca*). Takođe, jezero privlači i brojne turiste i važno je lokalno rekreativno mesto. S obzirom da je tokom prethodnih decenija zabeleženo cvetanje cijanobakterija za koje je pokazano da imaju sposobnost produkcije cijanotoksina (Kozma Törökné, 1999; Torokne *i sar.*, 2001), jezero Fehervarčurgo je izabrano za istraživanje prilikom izrade ove doktorske disertacije.

### 3 Ciljevi rada

Osnovni cilj doktorske disertacije jeste ispitivanje pojave cvetanja cijanobakterija na odabranim lokalitetima Srbije i Mađarske i sagledavanje uticaja cvetanja na ribe. Ciljevi će se ostvariti na sledeći način:

- Ispitivanjem fizičko-hemijskog sastava vode jezera Ludaš, Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo;
- Ispitivanjem kvalitativnog i kvantitativnog sastava zajednice cijanobakterija u jezerima Ludaš, Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo;
- Ispitivanjem prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija jezera Ludaš, Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo;
- Ispitivanjem prisustva i kvantifikacijom cijanotoksina u vodama ovih ekosistema i procenom akumulacije ovih toksina u tkivima riba izlovljenih iz jezera Ludaš, Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo;
- Procenom strukturnih oštećenja pojedinih organa riba (jetra, bubrezi, škrge, creva, slezina, gonade i mišići) i kvantifikacijom ovih oštećenja koja će omogućiti poređenje nivoa oštećenja, kao i prisustva reverzibilnih ili ireverzibilnih promena između različitih sezona ili različitih vrsta riba izlovljenih iz jezera Ludaš, Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo;
- Procenom oštećenja DNK, kao i ispitivanjem aktivnosti sistema detoksikacije i antioksidativnih sistema u pojedinim organima riba (jetra, škrge, gonade) izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton

Ovakvim pristupom, disertacija može potencijalno da pruži odgovor na sledeća pitanja:

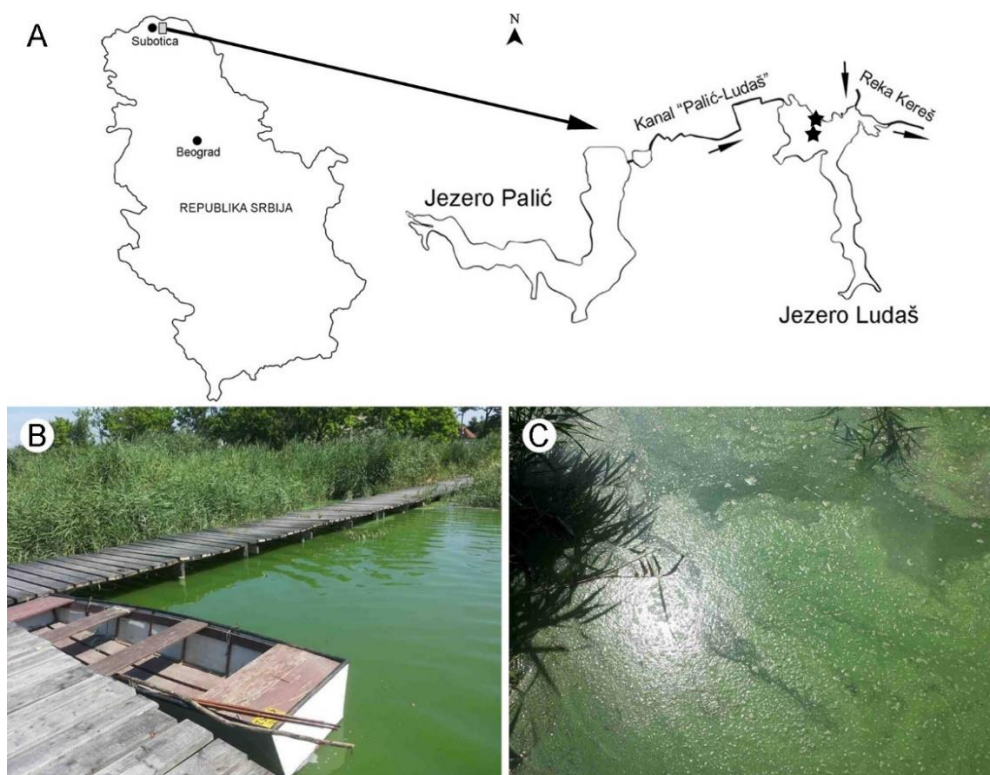
- Da li je zaštita jezera Ludaš kao specijalnog rezervata prirode opravdana i na koji način može potencijalno da se razreši problem kontinuiranog cvetanja cijanobakterija u ovom jezeru?
- Da li rekonstrukcija jezera Kiš-Balaton efikasno štiti jezero Balaton od toksičnog cvetanja cijanobakterija?
- Da li se u jezeru Fehervarčurgo i dalje javljaju toksična cvetanja cijanobakterija koja mogu predstavljati opasnost korisnicima ovog važnog rekreativnog ekosistema?

## 4 Materijal i metode

### 4.1 Opis lokaliteta

#### 4.1.1 Opis jezera Ludaš

Jezero Ludaš se nalazi na samom severu Srbije, u blizini grada Subotice (Slika 13). Ovo je veoma plitko jezero sa maksimalnom dubinom od 2,25 m, a na većini mesta dubina ne premašuje 1 m. Jezero je izduženo, dužine 4,5 km i ukupne površine od 3,28 km<sup>2</sup> (Grba *i sar.*, 2017; Ćirić *i sar.*, 2020). Glavna pritoka je reka Kereš, međutim, deo vode se uliva iz kanala „Palić-Ludaš“ iz Palićkog jezera.



**Slika 13.** Mapa jezera Ludaš (A). Lokaliteti uzorkovanja su prikazani zvezdicom. Slika je zasnovana na mapama prezentovanim u radovima Gavrilović *i sar.* (2021) i Horvat i Horvat (2020) uz odobrenje izdavača. (B, C) Izgled vode jezera Ludaš koja svojom zelenom bojom i skramom na površini prikazuje cvetanje cijanobakterija. Slike: Dr. Damjana Drobac Backović.

#### 4.1.2 Opis jezera Kiš-Balaton i Balaton

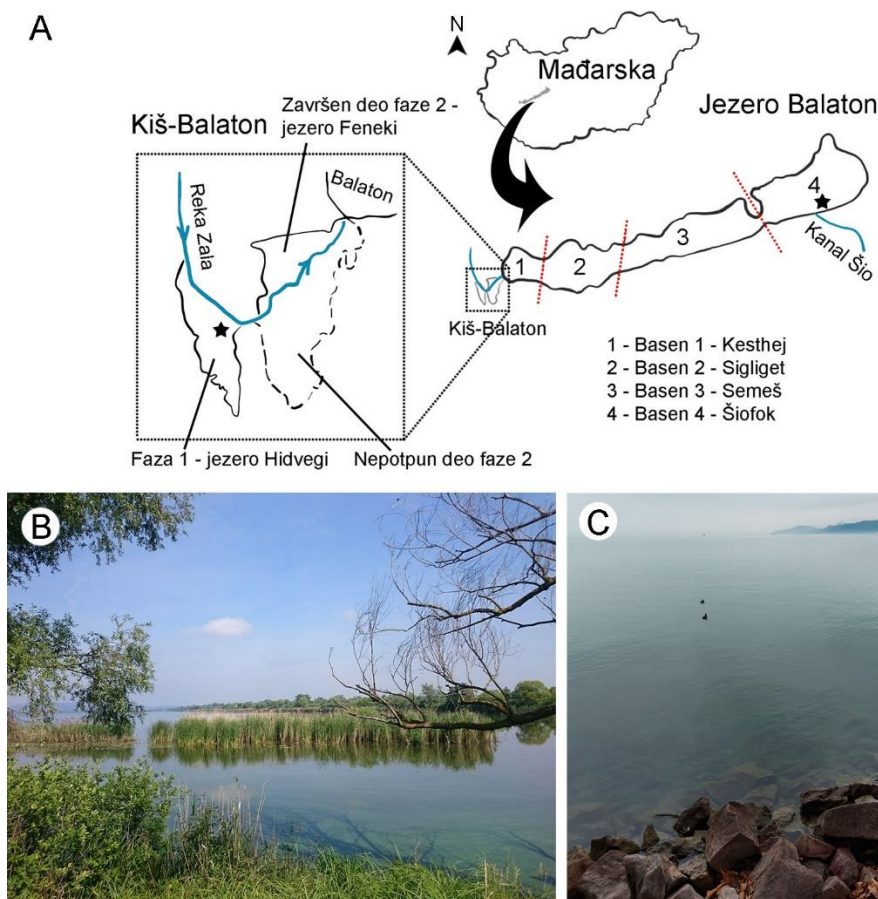
Ukupna površina jezera Balaton iznosi 596 km<sup>2</sup>, dok se ceo sliv prostire na 5180 km<sup>2</sup> (Dömötörfy *i sar.*, 2003; Kovács *i sar.*, 2010; Hatvani *i sar.*, 2020). Jezero je veoma plitko sa prosečnom dubinom od 3,2 m. Na osnovu istorijskih aspekata i jasnog trofičkog gradijenta, jezero je podeljeno na četiri basena (Slika 14): (1) Basen 1 – Kesthej (*mađ.* Keszthely); (2)



Basen 2 – Sigliget (*mađ.* Szigliget); (3) Basen 3 – Semeš (*mađ.* Szemes); i (4) Basen 4 – Šiofok (*mađ.* Siófok). Najzapadniji basen (basen 1 – Kesthej) je najeutrofniji, dok su ostali baseni manje eutrofni kako se ide prema istoku. Najveća pritoka, reka Zala, se uliva u zapadni deo Balatona, u zaliv Kestheja. Kao što je prethodno opisano, zaštitni sistem Kiš-Balaton (KBWPS) se nalazi na ušću Zale u Balaton, i sastoji se iz dva dela (Slika 14):

- Faza 1 – jezero Hidvegi (*mađ.* Hídvégi) koje sačinjava otvorena voda površine 18 km<sup>2</sup> i prosečne dubine 1,1 m;
- Faza 2 – jezero Feneki (*mađ.* Fenéki) površine 16 km<sup>2</sup> koje predstavlja tipično močvarno područje i koje je pokriveno makrofitama, prvenstveno trskom.

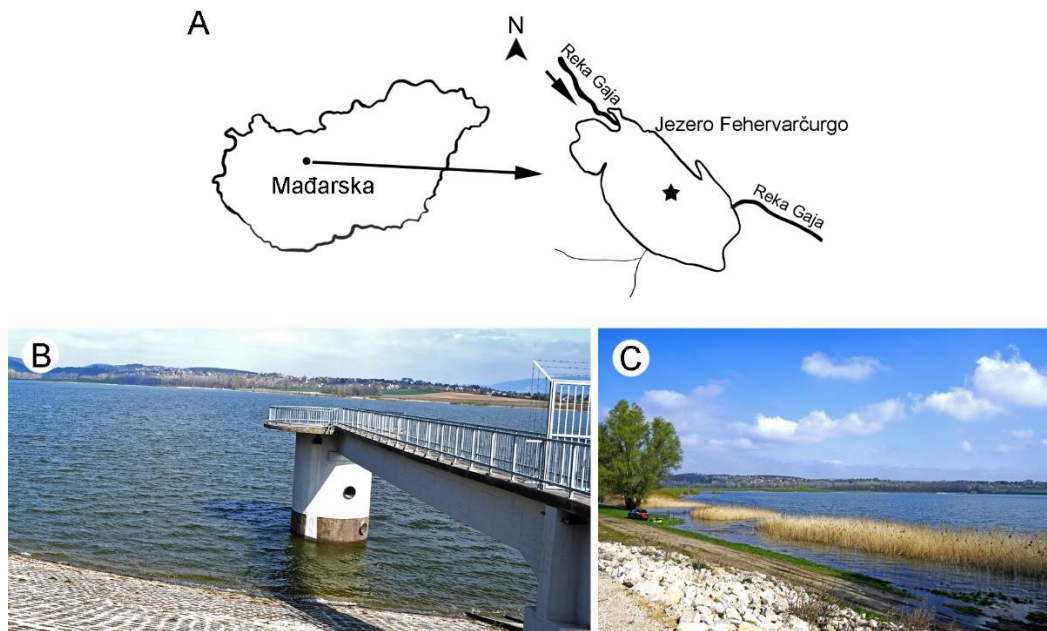
Uprkos mnogim pritokama, voda otiče iz jezera Balaton samo na jednom mestu. To je kanal Šio (*mađ.* Sió) koji se nalazi na jugoistočnom delu, u basenu 4.



**Slika 14.** Mapa jezera Kiš-Balaton i Balaton (A). Lokaliteti uzorkovanja su prikazani zvezdicom. Slika je zasnovana na mapama prezentovanim u radovima Kovács *i sar.* (2010) i Hatvani *i sar.* (2020) uz odobrenje izdavača. (B) Izgled vode jezera Kiš-Balaton u kojoj se vidi zelena skrama koja ukazuje na cvetanje cijanobakterija. Slika: Dr. Árpád Ferincz. (C) Izgled vode jezera Balaton..

### 4.1.3 Opis jezera Fehervarčurgo

Jezero Fehervarčurgo (*mađ.* Fehérvárcsurgó) se nalazi u istočnom delu okruga Bakonj u Mađarskoj (Slika 15). Ono se nalazi severno od reke Gaja koja je najveća reka u ovom okrugu. Ovo je veštačko jezero formirano 1971. godine u cilju navodnjavanja okolnog poljoprivrednog zemljišta. Površina jezera je oko 2,23 km<sup>2</sup>, prosečna dubina je 6 do 8 metara, dok je maksimalna dubina oko 15 m.



**Slika 15.** Mapa jezera Fehervarčurgo (A). Lokalitet uzorkovanja je prikazan zvezdicom. (B, C) Izgled vode jezera Fehervarčurgo. Slike: Dr. Árpád Ferincz.

## 4.2 Uzorkovanje vode i riba

### 4.2.1 Uzorkovanje na jezeru Ludaš

Uzorkovanje na jezeru Ludaš je sprovedeno pod okriljem dozvole 140-501-1316/2017-04 izdate od strane Pokrajinskog sekretarijata za zaštitu prirode autonomne pokrajine Vojvodine (Republika Srbija). Uzorci su prikupljeni slično kao u prethodnom istraživanju na ovom jezeru (Tokodi, 2016; Tokodi *i sar.*, 2018). Naime, uzorci su prikupljeni sa dva lokaliteta: uz obalu tj. kod pristaništa (46° 6' 11,5" N; 19° 49' 16,9" E), i na sredini jezera (46° 6' 7,8" N; 19° 49' 16,1" E; Slika 13) tokom četiri meseca 2018. godine: marta, maja, jula i septembra. Za ispitivanje kvalitativne i kvantitativne strukture zajednice cijanobakterija, voda je uzorkovana planktonskom mrežicom (dijametar okvira je bio 25 cm, dok je promer okaca bio 23 μm) na dubini od oko 30 cm. Uzorci su potom fiksirani u Lugolovom rastvoru. Dve litre vode za

analizu cijanotoksina u vodi su takođe prikupljene i zamrznute na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalje analize. Isti uzorci su korišćeni i za analizu prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena.

Ribe su uzorkovane samo na sredini jezera tokom marta i septembra 2018. godine (tj. pre i posle leta) radi analize akumulacije cijanotoksina u različitim tkivima riba, ali i histološke procene uticaja cvetanja cijanobakterija na različita tkiva. Ribe su izlovljene mrežama različitih promera okaca i standardnom opremom za elektroribolov, a potom žrtvovane udarcem tupog predmeta u glavu. Ukupno je uhvaćeno 30 jedinki vrste srebrni karaš *Carassius gibelio*, od toga 12 jedinki tokom marta (TL:  $179\pm 13$  mm; 3 mužjaka/ 9 ženki) i 18 jedinki tokom septembra (TL:  $152\pm 22$  mm, 8 mužjaka/ 10 ženki). Uzorkovanje tkiva je urađeno odmah na terenu sterilnim priborom za disekciju. Rez je napravljen blizu analnog otvora i koža i trbušni mišići su presečeni duž trupa kako bi se otvorila telesna duplja. Uzorci jetre, bubrega, škrge, slezine, creva, gonada (testisa ili ovarijuma) i mišića su prikupljeni, držani na ledu tokom transporta do laboratorije (oko 1 h), a potom zamrznuti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljih analiza. Uzorci jetre, bubrega, škrge, slezine, creva, gonada i mišića za histološke analize su prikupljeni i fiksirani u 10% neutralno-puferisanog formalina.

#### 4.2.2 Uzorkovanje na jezerima Kiš-Balaton i Balaton

Uzorkovanje na jezerima Kiš-Balaton i Balaton je sprovedeno pod okriljem dozvole OKTF-KP/8294-14/2016 izdate od strane Nacionalne kancelarije za životnu sredinu i očuvanje vode i prirode Republike Mađarske, i dozvole HHgF/122-1/2018 izdate od strane Ministarstva za poljoprivredu Republike Mađarske. Uzorci vode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu zajednice cijanobakterija sa jezera Kiš-Balaton su prikupljeni tokom aprila, maja, jula i septembra 2018. godine i juna 2019. godine na Hidvegi jezeru ( $46^{\circ} 38.1' \text{ N}$ ;  $17^{\circ} 9.8' \text{ E}$ ; Slika 14), dok su uzorci sa jezera Balaton prikupljeni tokom juna 2018. godine u Šiofok basenu blizu kanala Šio ( $46^{\circ} 55' \text{ N}$ ;  $18^{\circ} 3.1' \text{ E}$ ; Slika 14). Iako se pod terminom 'Kiš-Balaton' podrazumeva ceo sistem iz dve faze koji je prethodno opisan, u daljem tekstu će termin 'jezero Kiš-Balaton' označavati samo fazu I u kojoj je rađeno uzorkovanje. Voda je uzorkovana planktonskom mrežicom (dijametar okvira je bio 25 cm, dok je promer okaca bio  $23\text{ }\mu\text{m}$ ) i potom fiksirana u 10% neutralno-puferisanom formalinu (v/v). Dve litre vode za analizu cijanotoksina su prikupljene tokom juna 2018. godine sa jezera Balaton, i tokom jula i septembra 2018., kao i tokom juna 2019. godine sa jezera Kiš-Balaton. Uzorci su potom zamrznuti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljih analiza. Analiza prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena je sprovedena samo na uzorcima prikupljenim 2018. godine.

Ribe su uzorkovane istih datuma i na istim lokacijama kao i voda za analizu zajednice cijanobakterija. Izlovljavanje je izvršeno kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Ukratko, ribe su izlovljene standardnom opremom za elektroribolov, a jedinke su žrtvovane udarcem tupim predmetom u glavu. Izlovljene su jedinke šarana *Cyprinus carpio*, deverike *Abramis brama* i babuške *Carassius gibelio* (Tabela 1). Za analizu akumulacije cijanotoksina su prikupljeni delovi sledećih organa: jetra, bubreg, škrge, slezina, crevo i gonade (testisi i ovarijumi). Uzorci su držani na ledu tokom transporta do laboratorije (~2 h), a potom su zamrznuti na -20 °C. Uzorci jetre, bubrega, škrge, slezine, gonada i mišića su prikupljeni za histološku analizu i fiksirani su u 10% neutralno-puferisanog formalina. Dodatne molekularne i biohemijske analize su urađene na uzorcima jetre, škrge i gonada riba izlovljenih tokom juna 2019. godine. Uzorci za merenje fragmentacije DNK, aktivnosti enzima biotransformacije i antioksidativnih enzima su trenutno zamrznuti u tečnom azotu, a potom su čuvani zamrznuti na -80 °C. Uzorci za analize metilacije DNK su čuvani u 100% EtOH do daljih analiza.

**Tabela 1.** Vrsta, broj jedinki, odnos polova i prosečna totalna dužina (TL; mm) riba izlovljenih na jezerima Kiš-Balaton i Balaton tokom 2018. i 2019. godine.

Lokalitet	Mesec	Vrsta	Br. jedinki	Pol (mužjaci:ženke)	TL (mm)
Kiš-Balaton	April 2018	<i>Cyprinus carpio</i>	5	2:3	438±62
	Maj 2018	<i>Cyprinus carpio</i>	2	2:0	475±35
		<i>Carassius gibelio</i>	5	2:3	384±51
	Jul 2018	<i>Carassius gibelio</i>	5	2:3	355±37
	Septembar 2018	<i>Abramis brama</i>	5	2:3	364±42
	Jun 2019	<i>Cyprinus carpio</i>	4	2:2	380±26
Balaton	Jun 2018	<i>Abramis brama</i>	5	2:3	234±12

#### 4.2.3 Uzorkovanje na jezeru Fehervarčurgo

Uzorkovanje na jezeru Fehervarčurgo je sprovedeno pod okriljem dozvole HHgF/122-1/2018 izdate od strane Ministarstva za poljoprivredu Republike Mađarske. Voda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu zajednice cijanobakterija je prikupljena tokom četiri meseca: aprila, maja, jula i septembra 2018. godine iz centra jezera (47° 17' 10,4" N; 18° 14' 50,6" E) planktonskom mrežicom (dijametar okvira je bio 25 cm, dok je promer okaca bio 23 µm) na dubini od oko 30 cm. Uzorci su potom fiksirani u 10% neutralno-puferisanom formalinu (v/v). Dve litre vode za analizu cijanotoksina i genetičku analizu prisustva

cijanotoksin-kodirajućih gena su prikupljene tokom jula i septembra 2018. godine. I ovi uzorci su zamrznuti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalje analize.

Ribe su izlovljene tokom aprila, maja, jula i septembra 2018. godine iz centra jezera. Izlovljavanje je izvršeno kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Izlovljene su jedinke deverike *Abramis brama* i babuške *Carassius gibelio* (Tabela 2). S obzirom da je tokom septembra izlovljena samo jedna jedinka, dalje analize tkiva riba nisu rađene za ovaj mesec. Za analizu akumulacije cijanotoksina su prikupljeni delovi sledećih organa: jetra, bubreg, škrge, mišići, crevo i gonade (testisi i ovarijumi). Uzorci su držani na ledu tokom transporta do laboratorije (~2 h), a potom su zamrznuti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uzorci istih organa su prikupljeni za histološku analizu i fiksirani su u 10% neutralno-puferisanog formalina.

**Tabela 2.** Vrsta, broj jedinki, odnos polova i prosečna totalna dužina (TL; mm) riba izlovljenih na jezeru Fehervarčurgo tokom 2018. godine.

Mesec	Vrsta	Br. jedinki	Pol (mužjaci:ženke)	TL (mm)
April	<i>Abramis brama</i>	5	3:2	285±58
Maj	<i>Abramis brama</i>	7	5:2	305±51
Jul	<i>Carassius gibelio</i>	5	1:4	112±6
Septembar	<i>Abramis brama</i>	1	/	135

#### 4.2.4 Kontrolne jedinke za molekularne, biohemijske i histološke analize

Kao kontrolne jedinke u ovom istraživanju korišćene su jedinke šarana *Cyprinus carpio* (6 jedinki; 3 mužjaka/ 3 ženke; TL: 320±88 mm) uzgajane na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univeziteta za poljoprivredu i prirodne nauke (Gedele, Mađarska). Izlovljene jedinke su deo stalnog matičnog jata koje se održava na Departmanu (donete su na Departman minimum 3 godine pre uzorkovanja). Ribe se čuvaju na  $24\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  u režimu 12 h svetla/ 12 h mraka, i hrane se dva puta dnevno komercijalnom hranom obogaćenom proteinima i karakterističnom za pastrmske vrste. Uzorkovanje je izvršeno kao što je prethodno opisano. Uzorci jetre, bubrega, škrge, slezine, creva, gonada i mišića za histološke analize su prikupljeni i fiksirani u 10% neutralno-puferisanog formalina. Uzorci jetre, škrge i gonada za molekularne i biohemijske analize su trenutno zamrznuti u tečnom azotu, a potom su čuvani zamrznuti na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3 Analiza fizičko-hemijskih parametara vode

Fizičko-hemijski parametri vode jezera Ludaš su mereni multiparametarskim WTW sondama direktnim *in situ* merenjem sledećih parametara: temperatura, pH, koncentracija i saturacija O<sub>2</sub>. Ukupna količina suspendovanih čestica (TSS; *engl.* Total Suspended Solids), ukupni organski ugljenik (TOC; *engl.* Total Organic Carbon), nitrati (NO<sub>3</sub>), deterdženti, hemijska potrošnja kiseonika (COD; *engl.* Chemical Oxygen Demand) i biološka potrošnja kiseonika (BOD; *engl.* Biological Oxygen Demand) su mereni u laboratoriji sa aparatom Pastel Ultraviolet (UV; Secomam).

Fizičko-hemijski parametri vode jezera Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo su mereni multiparametarskom sondom Hanna HI 98194 direktnim *in situ* merenjem sledećih parametara: temperatura, pH, koncentracija i saturacija O<sub>2</sub>. Koncentracije amonijuma (NH<sub>4</sub>-N), nitrata (NO<sub>3</sub>-N), nitrita (NO<sub>2</sub>-N) i ortofosfata (PO<sub>4</sub>-P) su mereni Machery-Nagel PF-12 Plus spektrofotomerom.

### 4.4 Kvalitativna i kvantitativna analiza zajednice cijanobakterija

Kvalitativna i kvantitativna analiza zajednice cijanobakterija je rađena slično istraživanju Tokodi (2016) sa minimalnim izmenama. Naime, kvalitativna analiza se zasnivala na mikroskopskom pregledu uzoraka i determinaciji taksona u odnosu na taksonomske ključeve. Identifikacija cijanobakterija je rađena pomoću Motic BA310 svetlosnog mikroskopa povezanog sa Bresser (9MP) digitalnom kamerom i pomoću Micro Cam Lab softvera. Korišćeni su sledeći taksonomski ključevi: Komárek i Anagnostidis (1998, 2005) i Komárek (2013).

Kvantitativna analiza je urađena Utermöhl-ovom metodom (Utermöhl, 1958) prema standardu (SRPS EN 15204:2008). Analiza je urađena pomoću Motic AE2000 inverznog mikroskopa i pod različitim uvećanjem (100× ili 400×). Koncentracija ćelija je izražena kao broj ćelija po mililitru.

Obe analize su rađene na Institutu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

### 4.5 Određivanje prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena

#### 4.5.1 Referentni sojevi

Referentni sojevi za analizu prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena su dobijeni iz Pasterove kolekcije kultura (PCC, *engl.* Pasteur Culture Collection), Australijske nacionalne

kolekcije algalnih kultura (CS, *engl.* Australian National Algae Culture Collection) i Finskog Instituta za životnu sredinu (SYKE, *engl.* Finnish Environment Institute). Sledeći referentni sojevi su bili korišteni u ovom istraživanju: PCC7820 (*Microcystis aeruginosa*), CS-506 (*Cylindrospermopsis raciborskii*), CS-537/13 (*Dolichospermum circinale*) i SYKE-123 (*Dolichospermum circinale*).

#### 4.5.2 Ekstrakcija DNK

Kako bi se prikupio materijal za izolaciju DNK, između 30 i 400 ml vode (u zavisnosti od koncentracije ćelija) je filtrirano kroz filtere poroziteta 2-3  $\mu\text{m}$ . Biomasa skupljena na filterima je liofilizirana i čuvana na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljih analiza. Pored uzoraka, DNK je izolovana i iz 10 mg liofilizirane biomase referentnih sojeva. Genomska DNK uzoraka i referentnih sojeva je izolovana pomoću komercijalnog kompleta DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemačka) prateći uputstva proizvođača. Tokom izolovanja DNK uzoraka, izvršene su minimalne promene ogledane u dupliranju AP1 pufera, RNaze i P3 pufera tokom resuspendovanja uzoraka. Naime, liofilizirani uzorci su homogenizovani korišćenjem cirkonsilikatnih kuglica za mlevenje/homogenizaciju (0.5 mm) i vorteksiranjem u trajanju od jednog minuta. Na homogenate je dodato 800  $\mu\text{l}$  AP1 pufera i 8  $\mu\text{l}$  RNaze A nakon čega su uzorci vorteksirani i inkubirani 10 min na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Potom je dodato 260  $\mu\text{l}$  pufera P3, i uzorci su inkubirani 5 min na ledu. Uzorci su potom centrifugirani 5 min na  $20000\times\text{g}$ , supernatanti su prebačeni u QIAshredder kolonice za centrifugiranje i centrifugirani 2 min na  $20000\times\text{g}$ . Protočna frakcija je stavljena u nove tubice i dodato je 1,5 puta zapremine AW1 pufera. 650  $\mu\text{l}$  mešavine svakog uzorka je prebačeno na DNeasy Mini kolonicu za centrifugiranje i centrifugirano 1 min na  $6000\times\text{g}$ . Protočna frakcija je bačena i korak je ponovljen. U kolonicu je potom dodat AW2 pufer, uzorci su centrifugirani na  $6000\times\text{g}$  i ovaj korak je ponovljen još jednom. Na kraju je na kolonicu dodato 100  $\mu\text{l}$  AE pufera, uzorci su inkubirani 5 min na RT, a potom su centrifugirani 1 min na  $6000\times\text{g}$  kako bi se sprala DNK vezana za kolonice. Ovaj korak je ponovljen još jednom, i uzorci su bili spremni za dalje analize. Nakon izolovanja, koncentracija DNK je određivana merenjem apsorbance rastvora na 260 nm pomoću NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotometra. Kvalitet izolovane DNK je određivan merenjem optičke gustine rastvora na 280 nm i izračunavanjem odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm.

### 4.5.3 Kvalitativna lančana reakcija polimeraze (PCR)

Kvalitativna lančana reakcija polimeraze je rađena kako bi se ustanovilo prisustvo gena koji kodiraju mikrocistin- (MC-; *mcyE*), cilindropermopsin- (CYN-; *cyrJ*), saksitoksin- (STX-; *sxtA*, *sxtG*, *sxtS*) i anatoksin- (ATX-; *anaC*) sintetaze. Sledeći sojevi su korišćeni kao kontrolna matrica: soj PCC7820 za *mcyE*, soj CS-506 za *cyrJ*, soj CS-537/13 za *sxtA*, *sxtG* i *sxtS* i soj SYKE-123 za *anaC*. Lančana reakcija polimeraze je izvršena na C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Helsinki, Finska) aparatu. Ukupna zapremina reakcije je bila 20 µl i sadržala je 1× Phire reakcioni pufer, 0.4 µl Phire II HotStart polimeraze (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mM dNTP (Thermo Fisher Scientific), 0.5 µl direktne i reverzne početnice (Tabela 3), i po 2 µl matrice i dejonizovane vode. Protokol PCR reakcije je prikazan u Tabeli 4.

**Tabela 3.** Lista početnica korišćenih u kvalitativnoj PCR analizi prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi izolovanoj iz uzoraka vode.

Gen	Početnica	5'-3' sekvenca	Referenca
<i>mcyE</i>	HEPF	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC	Dittman <i>i sar.</i> , 2017
	HEPR	AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	
<i>cyrJ</i>	<i>cyrJ</i> _F	TTCTCTCCTTTCCCTATCTCTTTATC	Mazmouz <i>i sar.</i> , 2010
	<i>cyrJ</i> _R	GCTACGGTGCTGTACCAAGGGGC	
<i>sxtA</i>	<i>sxtA</i> 855_F	GACTCGGCTTGTTGCTTCCCC	Savela <i>i sar.</i> , 2015
	<i>sxtA</i> 1480_R	GCCAAACTCGCAACAGGAGAAGG	
<i>sxtG</i>	<i>sxtG</i> 432_F	AATGGCAGATCGCAACCGCTAT	Savela <i>i sar.</i> , 2015
	<i>sxtG</i> 928_R	ACATTCAACCCTGCCCATTCCT	
<i>sxtS</i>	<i>sxtS</i> 205_F	GGAGTATTDGCGGGTGACTATGA	Savela <i>i sar.</i> , 2017
	<i>sxtS</i> 566_R	GGTGGCTACTTGGTATAACTCGCA	
<i>anaC</i>	<i>anaC</i> -genF	TCTGGTATTCAGTCCCCTCTAT	Rantala-Ylinen <i>i sar.</i> , 2011
	<i>anaC</i> -genR	CCCAATAGCCTGTCAATCAA	

Uspešnost umnožavanja ispitivanih molekularnih markera je proveravana agaroznom gel elektroforezom. Korišćen je 1.5% Top Vision agarozni gel (Thermo Fisher Scientific) sa dodatkom boje za gel SYBR Safe DNA kako bi se vizualizovali produkti PCR reakcije. Elektroforeza je izvedena upotrebom 1× TAE pufera pod naponom od 120 V. Dobijeni fragmenti su očitavani na Gel Doc™ XR (Bio-Rad) transluminatoru, uz pomoć Quantity One (v. 4.6.9) softvera.

Analize prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena su rađene na Departmanu za prirodne nauke i biotehnologiju Univerziteta u Turku-u (Finska).



**Tabela 4.** Protokol kvalitativne PCR analize prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi izolovanoj iz uzoraka vode.

Korak	Početnica	Temperatura	Vreme	Br. ciklusa
Inicijalna denaturacija	sve	98 °C	30 s	1
Denaturacija	sve	98 °C	5 s	40
Vezivanje početnica	<i>cyrJ</i> , <i>sxtG</i> i <i>sxtS</i>	62 °C	5 s	
	<i>mcyE</i> i <i>sxtA</i>	61 °C	5 s	
	<i>anaC</i>	52 °C	5 s	
Sinteza DNK lanca	sve	72 °C	10 s	
Finalna elongacija	sve	72 °C	1 min	1
Hlađenje	sve	4 °C	~	~

#### 4.6 Analize prisustva cijanotoksina

Analiza prisustva cijanotoksina, kao i njihova kvantifikacija, su rađeni pomoću tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS, *engl.* Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry). Priprema uzoraka, kao i sprovođenje same analize su bili slični kao što je opisano u Tokodi (2016) i Važić (2020). Priprema uzoraka je delimično rađena na Departmanu za biologiju i ekologiju Univerziteta u Novom Sadu, dok su završna priprema i LC-MS/MS analiza rađene na Åbo Akademi Univerzitetu u Turku-u (Finska).

##### 4.6.1 Standardi za određene cijanotoksine

Standardi MC-a neophodni za LC-MS/MS analizu su dobijeni prečišćavanjem ekstrakata dva soja roda *Microcystis*: NIES-107 dobijen od Nacionalnog instituta za studije životne sredine u Tskubi (Japan) i PCC 7820 dobijen od Pasterovog instituta u Parizu (Francuska). Ekstrakti soja NIES-107 su korišteni za dobijanje standarda za MC-LR, dm-MC-LR, MC-RR, dm-MC-RR, MC-YR i dm-MC-YR, dok su ekstrakti soja PCC 78720 korišteni za dobijanje standarda za MC-LR, MC-LY, MC-LW i MC-LF. Ekstrakcija i prečišćavanje standarda je rađena prema metodi opisanoj u Meriluoto i Spoofo (2005a, 2005b). Ekstrakti su rastvoreni u 75% MeOH i razblaženi u odgovarajuće koncentracije za analizu.

Standard za CYN (NRC-CRM-CYN) je nabavljen od Instituta za marinsku bionauku (*engl.* Institute for Marine Biosciences; NRC-IMB, Halifaks, Kanada). Različita razblaženja su pravljena razblaživanjem štoka sa dH<sub>2</sub>O.

#### 4.6.2 Priprema uzoraka vode za analizu prisustva cijanotoksina

Kako bi se prikupila biomasa iz vode, između 30 i 400 ml vode (u zavisnosti od koncentracije ćelija) je filtrirano kroz filtere poroziteta 2-3  $\mu\text{m}$ . Biomasa skupljena na filterima je liofilizirana (Slika 16A) i čuvana na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalje analize. Filteri sa biomasom su stavljeni u staklene epruvete u koje je potom dodato 3 ml 75% MeOH radi ekstrakcije. Ekstrakcija toksina je prvo rađena ultrasonikacijom 15 min, a potom ekstrakcijom sa Bandelin Sonopuls HD 2070 sonikatorom sa 'micro-tip' sondom u trajanju od jednog minuta (30% puls i 30% energija; Slika 16B). Ekstrakti su zatim centrifugirani 10 min na  $10000 \times g$  na sobnoj temperaturi (RT; *engl.* Room Temperature), i po 1 ml supernatanta je evaporisan u staklenim epruветama na struji azota ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Uzorci za analizu mikrocistina su rastvoreni u 200  $\mu\text{l}$  75% MeOH, dok su uzorci za analizu cilindrospermopsina rastvoreni u 200  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Uzorci su vorteksirani do potpunog rastvaranja. Nakon toga, finalno prečišćavanje uzoraka je rađeno filtriranjem u inserte pomoću špriceva na čije vršne delove su dodati nastavci sa filterima (0,2  $\mu\text{m}$ ; GHP Acrodisc 13; Pall Corporation, Port Washington, NY, USA).

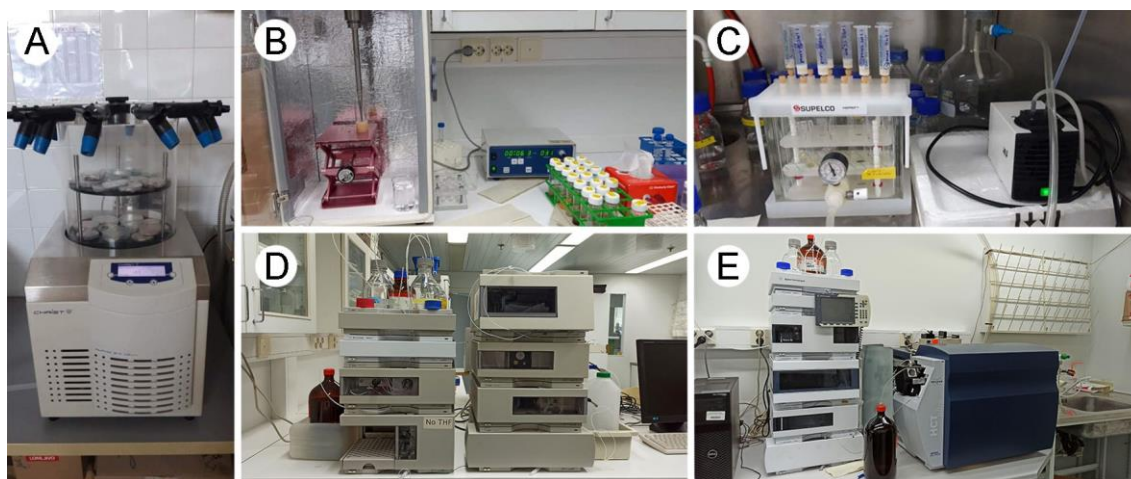
Osim biomase cijanobakterija, inicijalno profiltrirana voda je takođe procesirana kako bi se kvantifikovali toksini rastvoreni u vodi. Filtrirana voda je koncentrovana ekstrakcijom u čvrstoj fazi (SPE, *engl.* Solid Phase Extraction) pomoću Water Oasis HBL aparata (Slika 16C). Uzorci su potom rastvoreni u 5 ml 90% MeOH, i 2 ml svakog uzorka je prebačeno u staklene epruvete u kojima su evaporisani na struji azota ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Uzorci za analizu mikrocistina su rastvoreni u 200  $\mu\text{l}$  75% MeOH, dok su uzorci za analizu cilindrospermopsina rastvoreni u 200  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Nakon toga, finalno prečišćavanje uzoraka je rađeno filtriranjem u inserte (0,2  $\mu\text{m}$ ; GHP Acrodisc 13; Pall Corporation, Port Washington, NY, USA). Ovako pripremljeni uzorci su bili spremni za LC-MS/MS analizu.

#### 4.6.3 Priprema uzoraka riba za analizu prisustva cijanotoksina

U zavisnosti od količine uzorkovanog tkiva, LC-MS/MS analiza je rađena po organu zasebno za svaku jedinku, ili spojeno za sve jedinke. Nakon pristizanja u laboratoriju, tkiva su liofilizirana i čuvana na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalje analize. Nakon odmrzavanja, oko 100-400 mg tkiva je stavljeno u staklenu epruvetu i 5-10 ml 75% MeOH je dodato u zavisnosti od veličine tkiva. Uzorci su prvo homogenizovani na ledu u trajanju od 30 sekundi, a potom je rađena ultrasonikacija u vodenom kupatilu 15 min i ekstrakcija sa Bandelin Sonopuls HD 2070 sonikatorom sa 'micro-tip' sondom u trajanju od jednog minuta. Uzorci su centrifugirani 10 min na  $10000 \times g$  na RT. Supernatanti su potom izvađeni i stavljeni u nove tubice, i dodat je

heksan u upola manjoj zapremini (u 2 ml supernatanta je dodat 1 ml heksana). Nakon jasnog odvajanja slojeva, lipidni sloj heksana je uklonjen staklenom pipetom, a uzorci su prvo rastvoreni u vodi i koncentrovani SPE metodom pomoću Water Oasis HBL aparata. Uzorci su potom rastvoreni u 5 ml 90% MeOH, i 2 ml svakog uzorka je evaporisano na struji azota (50 °C). Nakon evaporacije, uzorci su rastvoreni u 200-300 µl 75% MeOH i finalno prečišćeni filtriranjem u inserte pomoću špriceva na čije vršne delove su dodati nastavci sa filterima (0,2 µm; GHP Acrodisc 13; Pall Corporation, Port Washington, NY, USA). Ovako pripremljeni uzorci su bili spremni za LC-MS/MS analizu.

Pojedini uzorci iz jezera Ludaš su tretirani MC-om tako što su prskani sa 50 µl toksina na početku pripreme uzorka. Ovakav tretman uzorka omogućava proveru metodologije pripreme uzorka.



**Slika 16.** Procedura pripreme i analiza uzoraka za kvantifikaciju cijanotoksina u vodi i tkivima riba. Filtrirana biomasa i uzorci su liofilizirani (A), a potom su macerirani pomoću sonikatora (B). Filtrirana voda je koncentrovana ekstrakcijom u čvrstoj fazi (C). Standardi i uzorci su prvo analizirani pomoću HPLC-DAD metode (D), a potom kvantifikovani pomoću LC-MS/MS metode (E). Slike: A, B, C – Dr Nada Tokodi; D, E – Tamara Dulić.

#### 4.6.4 Tečna hromatografija visoke moći razdvajanja sa UV detektorom na bazi fotoosetljivih dioda (HPLC-DAD)

Standardi tj. ekstrakti referentnih sojeva kao i svi uzorci su analizirani na Agilent 1100 series HPLC-DAD sistemu (Valdbron, Nemačka; Slika 16D) koji se sastojao iz vakuumske degasera, kvaternarne pumpe, termoregulisane kolone nameštene na 40 °C i detektora na bazi niza fotoosetljivih dioda koji je radio u opsegu od 200 do 300 nm (talasna dužina za kvantifikaciju je nameštena na 238 nm). Stacionarnu fazu je sačinjavala Merck Purospher

STAR RP-18e kolona (Darmstadt, Nemačka) dimenzija 55 mm × 4 mm I.D. sa česticama od 3 μm. Mobilna faza se sastojala od dva rastvarača: (1) rastvarača A koji je sadržao Mili-Q vodu sa 0,05% trifluorosirćetne kiseline (TFA) i (2) rastvarača B koji je sadržao acetonitril sa 0,05% TFA. Za analizu je korišten sledeći linearni program: 0 min 25 % B, 5 min 70 % B, 6 min 70 % B, 6.1 min 25 % B; injekcioni interval od 9 min; brzina mobilne faze od 1 ml/min; zapremina injekcije je bila 10 μl.

MC su detektovani na osnovu vremena zadržavanja i UV spektra koji su detaljno opisani u standardnom operativnom postupku (SOP; *engl.* Standard Operating Procedure) SOP\_TOXIC\_AAU\_06F (Meriluoto i Codd, 2005) (Prilog 1, 2). Identifikacija je naknadno potvrđena tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Identiteti MC-a iz referentnih sojeva su prethodno potvrđeni poređenjem hromatografskih i spektralnih podataka sa prečišćenim MC-ima (Meriluoto *i sar.*, 2000; Spooft *i sar.*, 2003; Meriluoto i Codd, 2005). Kalibracione krive za MC su napravljene procedurom opisanom u SOP\_TOXIC\_AAU\_03F i SOP\_TOXIC\_AAU\_06F (Meriluoto i Codd, 2005).

#### 4.6.5 Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS)

Sama procedura LC-MS/MS analize je prethodno opisana u Caixach *i sar.* (2017), Tokodi (2016) i Važić (2020). Ukratko, analiza je rađena na Agilent 1200 Rapid Resolution (RR) tečnom hromatografu udruženim sa Bruker Daltonics HCT Ultra masenim spektrometrom (Slika 16E). Za razdvajanje jona i kvantifikaciju toksina je korištena Ascentis C18 HPLC kolona (Supelco, Bellefonte, PA, SAD) dimenzije 50 mm × 3 mm I.D. sa česticama od 3 μm. Mobilna faza se sastojala od dva rastvarača: (1) rastvarač A koji se sastoji od 1% acetonitrila i 0,1% mravlje kiseline rastvorenih u MiliQ vodi, dok se (2) rastvarač B sastoji od acetonitrila sa 0,1 % mravlje kiseline. Za analizu je korišten sledeći linearni program: 0 min 25 % B, 5 min 70 % B, 6 min 70 % B, 6.1 min 25 % B; injekcioni interval od 10 min; brzina mobilne faze od 0,5 ml/min; zapremina injekcije je bila 5 μl.

Parametri jonskog izvora su bili sledeći:

- temperatura gasa za sušenje – 350 °C;
- protok gasa za sušenje – 10 l/min;
- pritisak raspršivača – 40 psi;
- kapilarna voltaža – 4 kV;
- ICC cilj – 300000 sa maksimalnim vremenom akumulacije od 100 ms;
- MS/MS spektar –  $m/z$  180 do 1200

Kvantifikacija MC-a je zasnovana na MS podacima protonovanih MC jona (dvostruko naelektrisano za MC-RR i demetilovane strukturne varijante, a jednostruko naelektrisano za sve ostale strukturne varijante). Kalibracione krive su pripremljene kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Identifikacija strukturnih varijanti MC-a je zasnovana na MS podacima i MS/MS spektrima pomoću Compass 1.3 software (Bruker Daltonics) (Prilog 3, 4).

Za detekciju CYN-a je korištena delimično modifikovana metodologija (Kokociński *i sar.*, 2013). Za analizu je korišten sledeći linearni program: 0 min 0 % B, 2.5 min 0 % B, 2.6 min 50 % B, 4 min 50 % B, 4.1 min 0 % B; ICC cilj je bio podešen na 200000; MS/MS spektar je bio u opsegu  $m/z$  150-400 (Prilog 5).

## 4.7 Histološke analize

### 4.7.1 Priprema uzoraka

Kao što je prethodno opisano (Poglavlje 4.2), uzorci uzeti za histologiju su fiksirani u 10% neutralno-puferisanom formalinu (~4% formaldehid). S obzirom da škrge imaju dosta hrskavičavog tkiva koje je previše tvrdo i može da dovede do problema tokom sečenja, škrge i mišići su dekalcifikovana u 75% RDO Rapid Decalcifier rastvoru (Apex Engineering Products Corporation) u trajanju od 30 minuta. Uzorci su procesirani standardnom histološkom procedurom (Suvarna *i sar.*, 2019). Ukratko, uzorci fiksirani u formalinu su stavljeni u plastične kasete i isprani u tekućoj vodi u trajanju od sat vremena. Nakon toga, uzorci su automatski procesirani u aparatu Shandon Citadel 2000 Automatic tissue processor (Thermo Fisher Scientific; Slika 17A) prema protokolu opisanom u Tabeli 5. Procesirani uzorci su potom kalupljeni koristeći aparat HistoCore Arcadia Embedding Station (Leica; Slika 17B). Kalupi montirani na plastične držače su potom sečeni na Leica RM2245 rotacionom mikrotomu (Slika 17C). Sečeni su preseći debljine 5  $\mu\text{m}$  koji su stavljeni nekoliko sekundi u vodeno kupatilo na temperaturi od 55 °C kako bi došlo do ispravljanja parafina, i potom su smeštani na mikroskopske pločice. Pločice su čuvane u inkubatoru na 40 °C kako bi se u potpunosti isušile do bojenja. Sve pločice su bojene hematoksilin i eozin tehnikom bojenja u aparatu Shandon Varistain 24-4 (Thermo Fisher Scientific; Slika 17D) prema protokolu opisanom u Tabeli 6. Nakon pripreme, pločice su posmatrane na Nikon Eclipse 600 svetlosnom mikroskopu povezanim sa QImaging Micro Publisher 3.0 digitalnom kamerom (Slika 17E).

Obrada histoloških preseka je rađena na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke (Gedele, Mađarska).

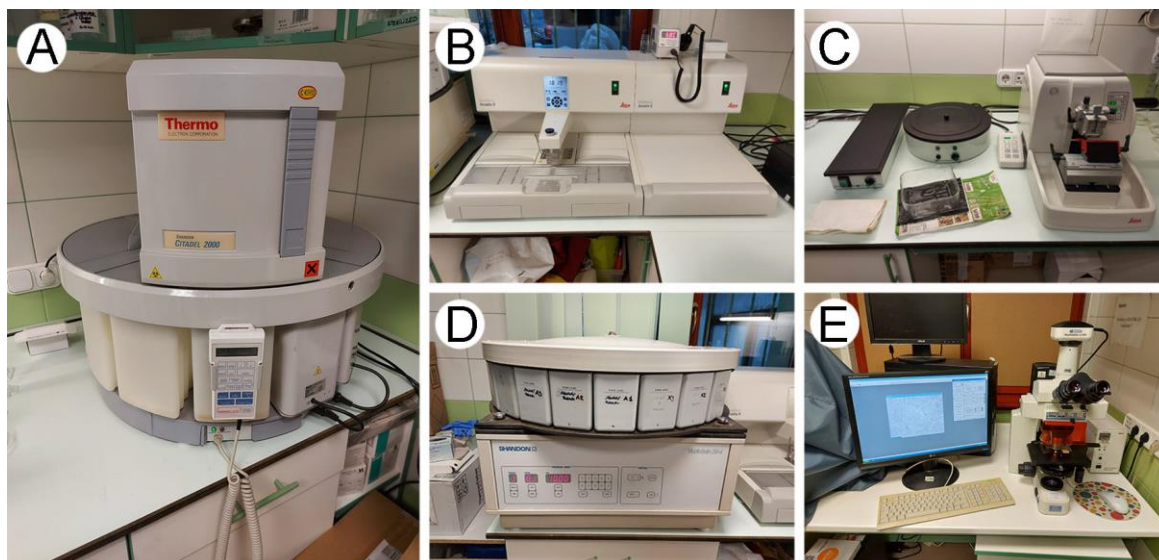
**Tabela 5.** Protokol za procesiranje uzoraka za histološku analizu.

<b>Hemikalija</b>	<b>Vreme (h)</b>
70% Patosolv*	1:00
90% Patosolv	1:30
100% Patosolv	1:30
100% Patosolv	2:00
Patoclear**	2:00
Patoclear	1:00
Ksilol	2:00
Parafin (58 °C)	2:00
Parafin (58 °C)	2:00

\*Patosolv je zamena za EtOH; \*\*Patoclear je zamena za ksilol.

**Tabela 6.** Protokol za bojenje hematoksilin/eozin tehnikom bojenja.

<b>Korak</b>	<b>Hemikalija</b>	<b>Vreme</b>	<b>Ponavljjanje</b>
Prosvetljivanje	Patoclear	10 min	×3
Rehidracija	Patosolv	5 min	
	70% Patosolv	5 min	
	50% Patosolv	10 min	
	Tekuća voda	3 min	×2
Bojenje	Hematoksilin	30 sec	
Ispiranje	Tekuća voda	5 min	×3
Bojenje	Eozin	30 sec	
Dehidracija	50% Patosolv	5 min	
	70% Patosolv	5 min	
	Patosolv	5 min	
Prosvetljivanje	Patoclear	5 min	×3
	Ksilol	10 min	



**Slika 17.** Procedura pripreme histoloških preparata. Uzorci su prvo automatski procesirani (A) i kalupljeni u parafinske blokove (B). Dobijeni blokovi su sečeni na mikrotomu (C) i preseči su automatski bojani standardnom H&E tehnikom bojenja (D). Na kraju, uzorci su posmatrani svetlosnim mikroskopom (E).

#### 4.7.2 Polukvantitativna analiza

Kako bi se omogućilo poređenje histopatoloških promena između različitih vrsta i sezona, histološki preseči jetre, bubrega i škrge su ocenjivani korišćenjem polukvantitativne metode prema Bernet *i sar.* (1999). Protokol je neznatno modifikovan izostavljanjem zapaljenja i tumora s obzirom da ove promene nisu uočene tokom analize. Praćene su sledeće kategorije promena (RP, *engl.* Reaction Pattern): (1) cirkulatorne promene koje predstavljaju patološka stanja krvnih sudova; (2) regresivne promene koje dovode do smanjenja funkcije organa; i (3) progresivne promene koje dovode do povećanja aktivnosti organa (Tabela 7).

Patološki značaj svake promene tj. način na koji data promena utiče na funkciju organa je bio izražen faktorom značajnosti (IF, *engl.* Importance Factor) koji je imo tri vrednosti:

- 1 – minimalan značaj, tj. promene nestaju nakon prestanka delovanja iritanta;
- 2 – umeren značaj, tj. promene nestaju u najvećem broju slučajeva nakon prestanka delovanja iritanta;
- 3 – velik značaj, tj. promene ostaju i nakon prestanka delovanja iritanta.

Pored faktora značajnosti, za svaku promenu je određivan i intenzitet zahvaćenosti (SV, *engl.* Score Value) koji se kretao od 0 (nema promene tj. morfologija je normalna) do 6 (ozbiljna morfološka promena tkiva). Za svaku promenu je računat indeks promene (AI, *engl.* Alteration Index) množenjem faktora značajnosti i intenziteta zahvaćenosti:  $AI = IF \times SV$ . Indeks

kategorije promena je računat kao zbir svih promena unutar te kategorije, dok je indeks organa računat kao zbir svih promena beleženih na tom organu.

**Tabela 7.** Klasifikacija histoloških promena u jetri, bubrezima i škragama analiziranih polukvantitativnom metodom i njihovi faktori značajnosti (IF).

<b>Organ</b>	<b>Kategorija promene</b>	<b>Histopatološka promena</b>	<b>IF</b>	
Jetra	Cirkulatorne promene	Hemoragije/hiperemije/aneurizme	1	
		Regresivne promene tkiva jetre	Promene arhitekture i strukture	1
		Promene citoplazme	1	
		Promene jedara	2	
		Atrofija	2	
		Nekroza	3	
	Progresivne promene tkiva jetre	Hipertrofija	1	
		Hiperplazija	2	
	Bubrezi	Cirkulatorne promene	Hemoragije/hiperemije/aneurizme	1
			Regresivne promene tubula	Promene arhitekture i strukture
		Promene citoplazme	1	
		Promene jedara	2	
		Atrofija	2	
		Nekroza	3	
Regresivne promene bubrežnog telašca		Promene arhitekture i strukture	1	
		Promene citoplazme	1	
		Promene jedara	2	
		Atrofija	2	
		Nekroza	3	
Progresivne promene tubula		Hipertrofija	1	
		Hiperplazija	2	
Progresivne promene bubrežnog telašca		Hipertrofija	1	
		Hiperplazija	2	



**Tabela 7.** Nastavljeno

Škrge	Cirkulatorne promene	Hemoragije/hiperemije/aneurizme	1
	Regresivne promene epitela	Promene arhitekture i strukture	1
		Promene citoplazme	1
		Promene jedara	2
		Atrofija	2
		Nekroza	3
		Promene arhitekture i strukture	1
	Regresivne promene potpornih ćelija	Promene citoplazme	1
		Promene jedara	2
		Atrofija	2
		Nekroza	3
		Hipertrofija	1
	Progressivne promene epitela	Hiperplazija	2
		Hipertrofija	1
	Progressivne promene potpornih ćelija	Hiperplazija	2

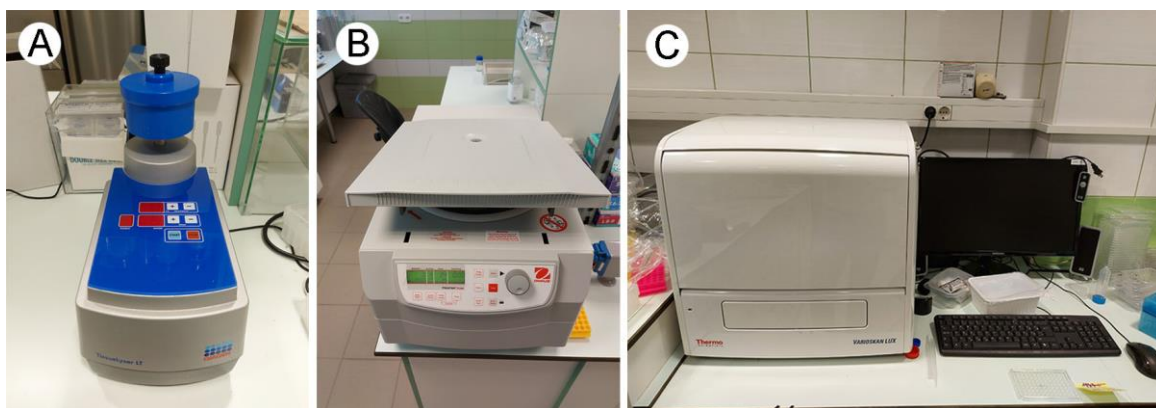
## 4.8 Molekularne i biohemijske analize

### 4.8.1 Priprema uzoraka

Kao što je prethodno opisano, jetre, škrge i gonade (testisi i ovarijumi) uzorkovani u junu 2019. godine na jezeru Kiš-Balaton su korišteni za molekularne i biohemijske analize. Za sve analize sem za analizu ukupnih metilacija DNK su korišteni komadići tkiva veličine ~ 15-20 mg. Tkiva su homogenizovana u 500 µl pufera koji je sadržao 10 mM Tris-HCl, 0,15 M KCl, 0,5 M saharoze, 1 mM EDTA, DTT i 40 µg/ml aprotinina (pH 7,5) u homogenizatoru sa kuglicama (Slika 18A; TissueLyser LT, Qiagen, Germantown, MD, USA). Poduzorci sirovog homogenata su zamrznuti na -80 °C i korišteni su za analize lipidne peroksidacije, fragmentacije DNK i procenu ukupne koncentracije proteina. Ostatak homogenata je centrifugiran na 12000 ×g tokom 30 min na 4 °C (Slika 18B), a potom su prikupljni supernatanti i zamrznuti su na -80 °C.

Koncentracija ukupnih proteina je određena pomoću Bradfordove metode (Bradford, 1976). Ukratko, albumin goveđeg seruma (BSA) je korišten kao standard, a metoda je prilagođena eseju u mikrotitar pločici. Apsorbanca je merena na 595 nm 10 min nakon

inkubacije uzoraka sa bojom Comassie brilliant blue. Koncentracija u uzorcima je izračunata pomoću parametara linearne regresije na osnovu standardne krive i korištena je za izražavanje molekularnih i biohemijskih analiza. Sve analize osim analize ukupnih metilacija DNK su rađene na čitaču mikrotitar pločica Thermo Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Slika 18C; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), i rađene su u triplikatima.



**Slika 18.** Procedura pripreme uzoraka za molekularne i biohemijske analize. Tkiva su prvo homogenizovana (A), a potom centrifugirana (B). Analize su rađene na čitaču mikrotitar pločica (C).

#### 4.8.2 Analize oštećenja DNK

##### 4.8.2.1 Fragmentacija DNK

Jednolančani i dvolančani prekidi DNK su kvantifikovani adaptacijom eseja alkalne precipitacije (Olive, 1988). 25  $\mu$ l uzorka je pomešano sa 200  $\mu$ l pufera koji je sadržao 2% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM Tris i 40 mM NaOH. Nakon mućkanja u trajanju od jednog minuta, dodato je 200  $\mu$ l KCl, rastvor je zagrejan na 60 °C i mućkan inverzijom u trajanju od 10 min. Rastvor je potom rashlađen na 4 °C u trajanju od 30 min, i centrifugiran na 8000  $\times$ g na 4 °C tokom 5 min. Supernatanti su potom izdvojeni, i 50  $\mu$ l supernatanta je dodato na 150  $\mu$ l rastvora koji je sadržao 1  $\mu$ g/ml Hoechst fluorescentne boje, 0,4 M NaCl, 4 mM natrijum holata i 0,1 M Tris (pH 8,5-9). Fluorescencija je merena na filteru ekscitacije na 360 nm i emisije na 450 nm. Slepa proba je sadržala 25  $\mu$ l Hepes pufera umesto uzorka, za konstrukciju standardne krive je korišten DNK standard sperme lososa (Sigma-Aldrich). Dobijeni rezultati su izraženi kao  $\mu$ g DNK po mg ukupnog proteina.

##### 4.8.2.2 Metilacije DNK

DNK je izolovana pomoću EZNA kompleta za izolaciju DNK iz tkiva (Omega Bio-Tek). Oko 30 mg uzorkovanog tkiva je rastvoreno u 200  $\mu$ l TL pufera u koji je dodato 25  $\mu$ l

proteinaze K. Rastvor je vorteksiran i tkivo je digestirano preko noći na 55 °C uz blago mešanje. Nakon inkubacije, rastvor je centrifugiran na 12000 ×g 5 min na RT. Supernatant je potom izdvojen, u njega je dodato 220 µl BL pufera, i rastvor je inkubiran na 70 °C u trajanju od 10 min. Nakon toga je dodato 220 µl EtOH, rastvor je stavljen na HiBind® kolonicu za centrifugiranje, i centrifugiran je na 16000 ×g u trajanju od jednog minuta. Protočna frakcija je bačena, dodato je 500 µl HBC pufera na kolonicu, i opet je centrifugirano na 16000 ×g u trajanju od 30 s. Protočna frakcija je bačena, a na kolonicu je dodato 700 µl pufera za ispiranje. Protočna frakcija je bačena, i proces je ponovljen još jednom. Nakon toga, dodato je 100 µl pufera za eluiranje zagrejanog na 70 °C. Uzorci su centrifugirani na 16000 ×g u trajanju od jednog minuta, i proces eluiranja DNK je ponovljen još jednom. Nakon ovog, DNK je bila spremna za dalje analize.

Kvalitet izolovane DNK je određivan merenjem optičke gustine rastvora na 280 nm i izračunavanjem odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm na NanoDrop One (Thermo-Fisher Scientific) aparatu. Koncentracija DNK je proverena na NanoDrop aparatu, kao i propustanjem kroz gel-elektroforezu. S obzirom da je koncentracija izolovane DNK bila veoma niska i gotovo nepostojeća (Poglavlje 5.2.6.1 „Analize oštećenja DNK“), dalje analize nisu rađene.

#### 4.8.3 Aktivnost enzima biotransformacije

##### 4.8.3.1 Aktivnost Cyp1A1 enzima

Aktivnost CYP enzima je merena pomoću EROD metode (Burke i Mayer, 1974). Ukratko, 50 µl uzorka je dodato u 200 µl 100-mM fosfatnog pufera koji je sadržao 100 µM redukovano NADPH i 10 µM 7-etoksirezorufina i rastvor je inkubiran 60 min na 30 °C. Nakon inkubacije, mikrotitar pločica je stavljena u čitač mikrotitar pločica, i reakcija je otpočeta dodavanjem NADPH, a zaustavljena je dodavanjem 100 µl 0,5 M NaOH. Kao rezultanta reakcije je fluorometrijski merena koncentracija 7-hidroksirezorufina na filteru ekscitacije na 520 nm i emisije na 590 nm. Kalibracija je urađena pravljenjem standardne krive merenjem ekscitacije različitih razblaženja 7-hidroksirezorufina, a koncentracija u uzorku je izračunata linearnom regresijom i izražena je kao µM hidroksirezorufina po mg ukupnog proteina.

##### 4.8.3.2 Aktivnost GST

Aktivnost GST je merena prema Habig *i sar.* (1974) esejom prilagođenim za mikrotitarske pločice. Rastvor 100 mM glutationa (GSH) rastvorenog u fosfatnom puferu (pH 6,5) i rastvor 60 mM 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB,  $\epsilon = 9.6 / \text{mMcm}$ ) rastvorenog u EtOH

su pripremljeni neposredno pred analizu. Reakcioni miks se sastojao iz 4,95 ml fosfatnog pufera, 900 µl rastvora GSH i 150 µl rastvora CDNB. U mikrotitarsku pločicu je dodato 200 µl reakcione smeše i 100 µl uzorka, a aktivnost GST-a je merena neposredno nakon dodavanja reakcionog miksa na uzorak. Merenje je vršeno svakih 20 s tokom prvih 5 min reakcije na 340 nm. GST iz konjske jetre je korišćen kao pozitivna kontrola. Aktivnost GST-a je izražena kao jedinica (U) po mg ukupnog proteina gde jedna jedinica GST-a (1 U) predstavlja hidrolizu jednog µmol CDNB-a po minuti.

#### 4.8.4 Parametri oksidativnog stresa

##### 4.8.4.1 Lipidna peroksidacija (LPO)

LPO je merena na osnovu reakcije formiranja malonaldehida u homogenatima tkiva pomoću tiobarbiturne kiseline (Wills, 1987). Ukratko, 150 µl homogenata je pomešano sa 300 µl 10% TCA koji sadrži 1 mM FeSO<sub>4</sub> i sa 150 µl 0,67% tiobarbiturne kiseline. Smeša je zagrevana 10 min na 80 °C, a precipitati su uklonjeni centrifugiranjem 10 s na 10000 ×g. Fluorescencija je merena na filteru ekscitacije na 516 nm i emisije na 600 nm. Slepe probe i standardi tetrametoksiopropana su pripremljeni u homogenizacionom puferu. Rezultati su izraženi kao µM reaktanata tiobarbiturne kiseline (TBARS) po mg ukupnog proteina.

##### 4.8.4.2 Aktivnost CAT

Aktivnost CAT je merena prema metodi opisanoj od strane Aebi (1984), a koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ukratko, 10 µl uzorka je dodato u 50 mM fosfatni pufer (pH 7,8) koji sadrži 50 mM rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = -0.0436$  /mMcm). Reakcija je praćena spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 240 nm na svakih 10 s tokom prvog minuta reakcije. Rezultati su prikazani kao jedinice (U) po mg ukupnog proteina gde je jedna jedinica CAT (1 U) definisana kao količina enzima koja katališe dismutaciju 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti.

##### 4.8.4.3 Aktivnost SOD

Aktivnost SOD je merena prema metodi opisanoj od strane Crapo *i sar.* (1978). Ukratko, reakcioni miks se sastojao iz 46,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufera (pH 8,6), 0,1 mM EDTA, 195 mM hipoksantina, 16 mM citohroma c, i 2,5 mU ksantin oksidaze. Na 200 µl reakcionog miksa je dodato 50 µl uzorka, i redukcija citohroma C pomoću superoksid anjona je merena apsorpcijom na 550 nm. Enzimaska aktivnost je računata pomoću standardne krive

apsorbance i izražena je kao jedinice (U) po mg ukupnog proteina gde je jedna jedinica (1 U) SOD definisana kao količina enzima koja uzrokuje 50%-inhibiciju redukcije citohroma C.

#### 4.8.4.4 *Aktivnost GPx*

Aktivnost GPx je merena prema metodi opisanoj od strane Paglia i Valentine (1967), a modifikovanoj od strane Lawrence i Burk (1976) i prilagođenoj eseju za mikrotitarske pločice (Faria *i sar.*, 2009). Reakcioni miks je sadržao 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,5), 2 mM GSH, 2 U GR, 0,12 mM NADPH, 0,5 mM natrijum azida, 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili 3 mm kumen hidroperoksida (CHP) i 50 µl uzorka. Reakcija smanjenja koncentracije NADPH je praćena merenjem apsorbanca na 340 nm. Merena je aktivnost selen-zavisne GPx gde je supstrat bio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ukupne GPx gde je supstrat bio CHP. Aktivnost oba enzima je izražena kao jedinica (U) po mg ukupnog proteina gde jedna jedinica (1 U) GPx korespondira hidrolizi 1 µM NADPH po minuti.

#### 4.8.4.5 *Aktivnost GR*

Aktivnost GR je merena prema metodi opisanoj od strane Carlberg i Mannervik (1975). Reakcioni miks je sadržao 100 mM fosfatnog pufera (pH 7,4), 0,1 mM NADPH i 60 µl uzorka, a reakcija je praćena merenjem apsorbanca na 340 nm. Aktivnost enzima je izražena u jedinicama (U) po mg ukupnog proteina gde jedna jedinica (1 U) GR odgovara hidrolizi 1 µM supstrata tokom jednog minuta.

### 4.9 *Statistička analiza podataka*

Indeksi dobijeni polukvantitativnom histološkom metodom, kao i rezultati molekularnih i biohemijskih metoda su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Indeksi dobijeni polukvantitativnom metodom su poređeni među lokalitetima, sezonama, kao i sa kontrolom korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) praćene Tukey's HSD post-hoc testom. Faktor značajnosti je bio na  $p < 0,05$ . Takođe, rezultati svih molekularnih i biohemijskih analiza su statistički obrađeni pomoću jednofaktorske ANOVA-e sa faktorom značajnosti od  $p < 0,05$ .

## 5 Rezultati i diskusija

### 5.1 Jezero Ludaš

#### 5.1.1 Fizičko-hemijski parametri vode jezera Ludaš

Istraživanje sprovedeno na jezeru Ludaš 2018. godine je potvrdilo loše stanje koje preovlađuje ovim ekosistemom predhodnih godina (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014, 2016, 2018, 2020). pH i elektroprovodljivost su bili povišeni tokom celog perioda istraživanja, a saturacija kiseonika je bila povišena tokom marta i jula (Tabela 8).

**Tabela 8.** Fizičko-hemijski parametri vode uzorkovane iz jezera Ludaš tokom 2018. godine.

Fizičko-hemijski parametar	Mart	Maj	Jul	Septembar
Temperatura (°C)	10,5	20,3	25,9	17,5
pH	8,3	8,9	8,9	8,6
Koncentracija O <sub>2</sub> (mg/l)	16,2	9,5	26,9	8,5
Saturacija O <sub>2</sub> (%)	146,7	99,7	>300	90,5
Elektroprovodljivost (µs/cm)	873,5	915	874,5	967,5
TSS (mg/l)	43	104,5	46,8	48,4
TOC (mg/l)	8,45	10,4	9,5	13,2
NO <sub>3</sub> (mg/l)	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Deterdženti (mg/l)	2,05	2,5	2,1	3,1
COD (mgO <sub>2</sub> /l)	23,85	31,8	27,7	38
BOD (mgO <sub>2</sub> /l)	12	15	13,5	18,9

TSS – ukupna količina suspendovanih čestica; TOC – ukupni organski ugljenik; COD – hemijska potrošnja kiseonika; BOD – biološka potrošnja kiseonika.

Visok pH od skoro 9 tokom maja i jula je najverovatnije uzrokovan aktivnošću fitoplanktona i ovo je česta pojava tokom cvetanja cijanobakterija (Huisman *i sar.*, 2018; Burdick *i sar.*, 2020a). Takođe, česta pojava tokom cvetanja cijanobakterija, koja nastaje kao posledica fotosintetske aktivnosti cijanobakterija, je povećana koncentracija kiseonika koja može da dovede i do supersaturacije što je zabeleženo tokom jula 2018. godine. Tokom prethodnih nekoliko godina, u periodu od 2013. do 2019. godine, nivo pH se kretao u sličnom opsegu od 8 do 9, dok je supersaturacija beležena tokom letnjih, a ponekad i tokom jesenjih meseci (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014, 2016, 2018, 2020). U pomenutom periodu je

takođe uočljiv trend povećanja elektroprovodljivosti. Promene provodljivosti mogu da dovedu do smanjenja količine zooplanktona što posledično može da pogoduje razvoju fitoplanktona (Bos i sar., 1996).

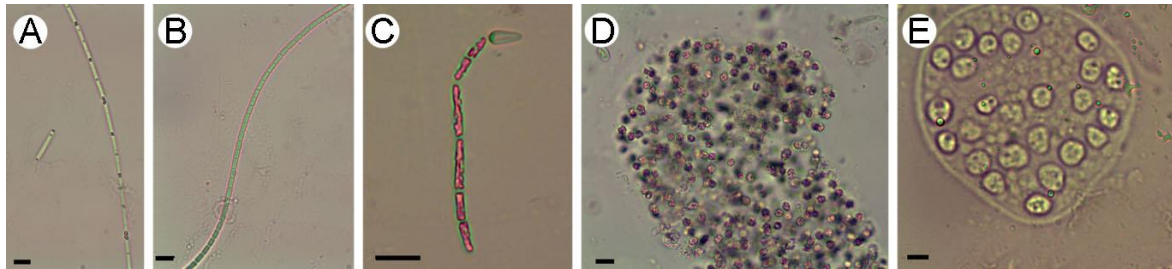
Vrednosti COD su bile ekstremno visoke, slično vrednostima koje se detektuju u otpadnim vodama, što ukazuje na izuzetno loš kvalitet vode jezera Ludaš, te je generalna preporuka da se jezero ne koristi ni u kakve svrhe (Službeni glasnik Republike Srbije 50/12). Vrednosti BOD su bile nestalne tokom celog perioda istraživanja što može da ukazuje na nestabilnost celog ekosistema. Voda jezera Ludaš je veoma bogata azotnim jedinjenjima (prevashodno organskim azotom) što je dovelo do povećane biološke produkcije u samom jezeru. Beležene koncentracije nitrata su bile neujednačene tokom celog perioda istraživanja i najverovatnije su zavisile od dotoka iz kanala Palić-Ludaš. Fosfati su pokazali sličan trend kao i nitrati, sa napomenom da su koncentracije fosfata u porastu s obzirom na loš kvalitet vode. Analize sedimenta su pokazale da je sediment veoma bogat nutrijentima što ukazuje na veliko unutrašnje opterećenje koje može da doprinese do kontinualnog hipereutrofnog statusa jezera, čak iako se smanji dotok organskog opterećenja u ekosistem (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014, 2016, 2018, 2020).

Generalan kvalitet vode slatkovodnih ekosistema može da se pokaže Srpskim indeksom kvaliteta vode (SWQI – *engl.* Serbian Water Quality Index). Ova vrednost je zasnovana na 10 parametara kvaliteta vode kao što su temperatura, pH, elektroprovodljivost, saturacija kiseonika, BOD za 5 dana, suspendovane čestice, ukupni azotni oksidi, ortofosfati, joni amonijaka i količina koliformnih bakterija pri čemu se svi ovi podaci grupišu u složen indikator kvaliteta vode (Službeni glasnik Republike Srbije 50/12). Na osnovu ovog indeksa, kvalitet vode jezera Ludaš spada u kategoriju lošeg ili veoma lošeg kvaliteta. Slično je beleženo i u periodu od 2013. do 2019. godine (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014, 2016, 2018, 2020).

### 5.1.2 Sastav zajednice cijanobakterija jezera Ludaš

Najdominantnije vrste cijanobakterija tokom istraživanja su bile *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Slika 19A) i *Pseudanabaena limnetica* (Lemmermann) Komárek (Slika 19B). Tokom svih sezona, broj ovih cijanobakterija je prevazilazio 10 miliona ćelija/ml (Tabela 9). Takođe, obe vrste roda *Microcystis* (*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Slika 19D) i *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek (Slika 19E)) su bile brojne tokom perioda istraživanja. Krajem leta, uočena je i pojava invazivne vrste *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique i Salerno (bazonom

*Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya i Subba Raju; Slika 19C). Tokom svih sezona, iste vrste cijanobakterija su bile detektovane i u centru jezera i kod pristaništa. Najčešće je nešto veći broj ćelija/ml uočen kod doka, međutim razlike nisu značajne i verovatno su uzrokovane razlikama u dubini, temperaturi i efektima talasa i vetra. Ukupan broj cijanobakterija je u svim sezonama sem marta prevazilazio 25 miliona ćelija/ml ukazujući na kontinualno cvetanje tokom svih sezona.



**Slika 19.** Dominantne vrste iz jezera Ludaš. (A) *Limnothrix redekei*; (B) *Pseudanabaena limnetica*; (C) *Raphidiopsis raciborskii*; (D) *Microcystis aeruginosa*; (E) *Microcystis wesenbergii*. Razmera:10 µm. Slike: Nevena Đorđević.

Tokom prethodnih godina, u periodu od 2013. do 2019. godine, slične vrste su uočene, međutim, uočene su i druge vrste kao što su *Microcystis delicatissima*, *Oscillatoria agardhii* (curr. *Planktothrix agardhii*), *Oscillatoria putrida*, *Lyngbya limnetica* i *Anabaena spiroides* (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014, 2016, 2018, 2020). U našem prethodnom istraživanju sprovedenom tokom 2011. i 2012. godine su zapažene slične vrste i one uključuju *L. redekei*, *P. limnetica*, *P. agardhii* i *Microcystis* spp. (Tokodi *i sar.*, 2018). Sve zabeležene vrste su poznate po produkciji cijanotoksina (Huang i Zimba, 2019).

Tokom jeseni 2018. godine, vrsta *R. raciborskii* je takođe zabeležena. Ova invazivna i potencijalno toksična vrsta je prvi put detektovana u Srbiji 2006. godine (Cvijan i Fužinato, 2012), a neposredno posle toga i u jezeru Ludaš (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014), i od tada je redovno beležena tokom cvetanja. Prisustvo ove vrste je od posebnog značaja s obzirom da veoma brzo širi svoj areal rasprostranjenja (Burford *i sar.*, 2016), ali i što produkuje veoma potentant toksin, CYN (Buratti *i sar.*, 2017; Adamski *i sar.*, 2020). Toksičnost veoma zavisi od specifičnog soja; Južno Američki sojevi produkuju STX, Australijski i Azijski sojevi produkuju CYN, dok su Severno Američki i Evropski sojevi najčešće netoksični (Burford *i sar.*, 2016). S obzirom da ova ekspanzivna vrsta brzo širi svoju distribuciju u Evropi, ali i u Srbiji (Đorđević *i sar.*, 2015; Đorđević, 2021), neophodno je ustanoviti i ispitati toksičnost i potencijalnu opasnost po životnu sredinu koju predstavljaju beleženi sojevi.



**Tabela 9.** Kvalitativni i kvantitativni sastav zajednice cijanobakterija jezera Ludaš u 2018. godini.

Takson cijanobakterija	Mart		Maj		Jul		Septembar	
	Centar	Pristanište	Centar	Pristanište	Centar	Pristanište	Centar	Pristanište
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann	13.980	15.100	13.210	17.650	31.000	53.700	68.100	82.300
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique i Salerno	-	-	-	-	-	-	48.000	65.000
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> (Brébisson ex Bornet i Flahault) Wacklin, Hoffman i Komárek	-	-	-	-	86.500	58.300	21.000	187.300
<i>Limnothrix redekei</i> (Van Goor) Meffert	10.140.000	9.855.000	10.983.000	10.287.000	11.180.000	13.100.000	9.983.100	10.150.000
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing	205.410	320.210	198.310	285.400	185.600	232.160	185.300	213.100
<i>Microcystis wesenbergii</i> (Komárek) Komárek	104.670	200.930	163.750	210.820	321.700	485.300	1.504.100	1.756.100
<i>Oscillatoria</i> sp. Vaucher ex Gomont	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis i Komárek	43.000	74.600	51.000	62.600	62.700	70.200	85.400	91.300
<i>Pseudanabaena limnetica</i> (Lemmermann) Komárek	12.785.000	14.521.000	13.956.000	15.281.000	15.813.000	17.323.000	13.685.000	15.321.000
<i>Woronichinia</i> sp. A. A. Elenkin	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Σ</b>	<b>23.292.060</b>	<b>24.986.840</b>	<b>25.365.270</b>	<b>26.144.470</b>	<b>27.680.500</b>	<b>31.322.660</b>	<b>25.580.000</b>	<b>27.866.100</b>

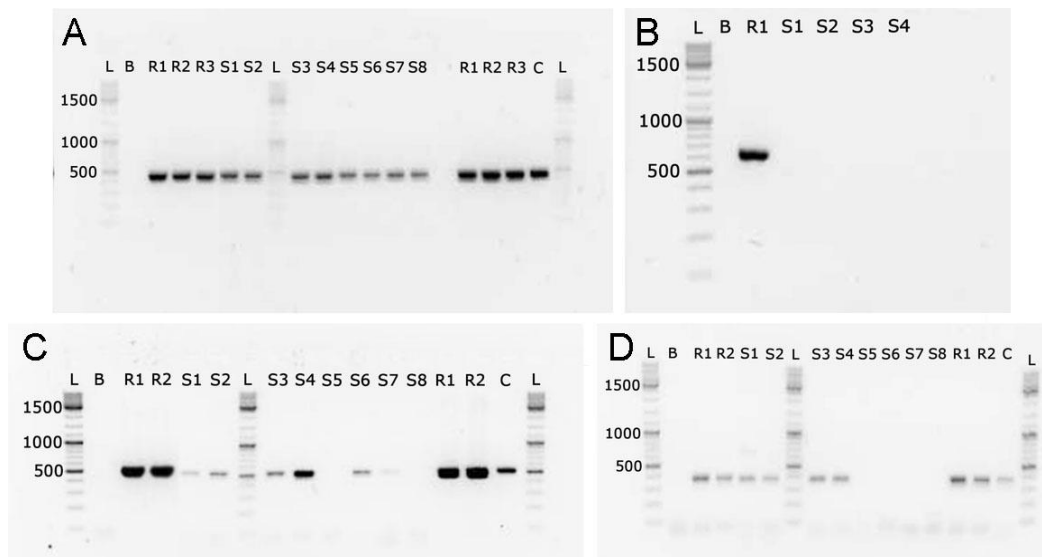
### 5.1.3 Prisustvo cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija jezera Ludaš

Prisustvo MC-sintetaze (*mcyE*) je detektovano tokom celog perioda istraživanja, u uzorcima sa centra jezera, i sa pristaništa (Tabela 10; Slika 20A). Prisustvo gena *sxtA* za STX-sintetazu nije detektovano u ispitivanim uzorcima (Slika 20B), dok u istom periodu prisustvo gena *sxtG* (Slika 20C) i *sxtS* (Slika 20D) jeste pronađeno (Tabela 10). *sxtG* je još beležen u centru jezera u martu i uzorcima pristaništa u maju. Geni za CYN-sintetazu (*cyrJ*) i ATX-sintetazu (*anaC*) nisu detektovani.

**Tabela 10.** Prisustvo gena za MC- (*mcyE*), STX- (*sxtA*, *sxtG* i *sxtS*), ATX- (*anaC*) i CYN- (*cyrJ*) sintetazu u biomasi izolovanoj iz uzoraka vode.

Gen	Mart		Maj		Jul		Septembar	
	Centar	Pristanište	Centar	Pristanište	Centar	Pristanište	Centar	Pristanište
<i>mcyE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sxtA</i>	/	/	/	/	-	-	-	-
<i>sxtG</i>	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>sxtS</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>cyrJ</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>anaC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) amplifikovano; (-) nije amplifikovano; (/) nije analizirano



**Slika 20.** Fotografija agaroznog gela sa PCR produktima nakon amplifikacije gena za MC-sintetazu (*mcyE*, **A**) i STX-sintetazu (*sxtA*, **B**; *sxtG*, **C**; *sxtS*, **D**) iz biomase jezera Ludaš. L – DNK marker; B – slepa proba; R1 – R3 – referentni sojevi; S1 – uzorak septembar centar; S2 – uzorak septembar pristanište; S3 – uzorak jul centar; S4 – uzorak jul pristanište; S5 – uzorak maj centar; S6 – uzorak maj pristanište; S7 – uzorak mart centar; S8 – uzorak mart pristanište; C – egzogena kontrola amplifikacije.

Ovo je prvi put da su cijanobakterije jezera Ludaš testirane na prisustvo gena za sintetisanje najčešćih cijanotoksina. Detekcija gena za MC-sintetazu je u skladu sa vrstama prisutnim u jezeru, s obzirom da većina ovih vrsta ima sposobnost proizvodnje MC-a. Što se tiče gena koji kodiraju STX-sintetazu, *sxtA* nije uopšte detektovan, dok *sxtG* i *sxtS* jesu. Poznato je da je neophodna ekspresija svih operona koji kodiraju STX-sintetazu kako bi ovaj cijanotoksin bio uspješno sintetisan (Buratti *i sar.*, 2017). S obzirom da je specifičnost početnica za sva tri gena prethodno potvrđena (Savela *i sar.*, 2015, 2017), nedostatak pojedinih gena u uzorku može biti uzrokovan nepoklapanjem početnica i sekvence. Nepoklapanja najčešće mogu biti uzrokovana krupnim mutacijama kao što su delecije ili insercije. Velike delecije klastera gena za kodiranje MC-sintetaze (*mcy*) su prethodno bile potvrđene kod netoksičnih sojeva vrste *Planktothrix* (Christiansen *i sar.*, 2008), tako da su slične mutacije moguće i kod klastera gena koji kodiraju neke druge cijanotoksine. Slično ovoj studiji, nedostatak pojedinih *sxt* gena je detektovan u nekoliko jezera Poljske (Savela *i sar.*, 2017). S obzirom da prisustvo STX-a nije direktno mereno u jezeru Ludaš, nije moguće doneti konkretne zaključke i povezati prisustvo pojedinih *sxt* gena i produkcije toksina. Međutim, s obzirom da je prisustvo STX-a prethodno zabeleženo (Tokodi *i sar.*, 2018) i da su vrste koje proizvode ovaj toksin pronađene u ovom istraživanju, dodatna ispitivanja su neophodna kako bi se utvrdilo da li se ovaj toksin i dalje sintetiše u jezeru Ludaš.

#### 5.1.4 Prisustvo cijanotoksina u uzorcima vode i tkiva riba iz jezera Ludaš

MC-LR je detektovan u vodi jezera Ludaš tokom svih istraživanih meseci sem u martu, dok su dmMC-LR, MC-RR, dmMC-LR i MC-LF sporadično izmereni (Tabela 11). Koncentracije detektovanih toksina su bile generalno niske. Ostale strukturne varijante nisu zabeležene tokom perioda istraživanja. Takođe, prisustvo CYN-a nije detektovano, iako su u vodi bile prisutne vrste cijanobakterija koje su poznate po mogućnosti produkcije ovog toksina. Ni jedna strukturna varijanta MC-a nije izmerena u tkivima riba.

Pojava MC-a, i generalno cijanotoksina u Srbiji je često beležena (Svirčev *i sar.*, 2017, 2014). Prisustvo MC-a u vodi jezera Ludaš je prvi put zabeleženo 2006. godine (Simeunović *i sar.*, 2010), dok je tokom 2011. i 2012. godine zabeleženo prisustvo MC-a i veoma niskih koncentracija STX-a (Tokodi *i sar.*, 2018). Ovaj trend je nastavljen i u ovom istraživanju, što ukazuje na prisustvo i konstantno cvetanje toksičnih sojeva cijanobakterija u jezeru Ludaš.

**Tabela 11.** Prisustvo i koncentracije testiranih strukturnih varijanti MC-a u vodi jezera Ludaš tokom 2018. godine.

Strukturna varijanta ( $\mu\text{g/l}$ )	Mart	Maj	Jul	Septembar
MC-LR	-	0,1	0,022	0,285
dmMC-LR	0,023	-	-	-
MC-RR	-	-	-	0,006
dmMC-RR	0,003	-	0,002	-
MC-YR	-	-	-	-
dmMC-YR	-	-	-	-
MC-LF	-	-	-	+
MC-LW	-	-	-	-
MC-LY	-	-	-	-

(+) detektovano u uzorku; (-) nije detektovano u uzorku.

Što se tiče akumulacije cijanotoksina u tkivima riba, u ovom istraživanju nije uočena akumulacija ni u jednom ispitanom organu. Međutim, u prethodnom istraživanju sprovedenom na jezeru Ludaš tokom 2011. i 2012. godine, akumulacija dve strukturne varijante MC-a (MC-LR i MC-RR) je detektovana u mišićima, crevima, bubrezima i škragama srebrnog karaša *Carassius gibelio* (Tokodi *i sar.*, 2018). Koncentracija akumuliranih cijanotoksina u tkivima riba je u korelaciji sa količinom dostupnih cijanotoksina u vodi (Flores *i sar.*, 2018), stoga je moguće da koncentracija cijanotoksina rastvorenih u vodi jednostavno nije bila dovoljna kako bi došlo do akumulacije u tkivima. Takođe, postoji mogućnost i da je deo toksina ostao vezan za protein fosfataze, ili konjugovan sa GSH ili cisteinom u procesu biotransformacije, te ovako vezan toksin nije moguće detektovati analitičkim metodama (Williams *i sar.*, 1997; Ibelings *i sar.*, 2005; Zhang *i sar.*, 2012; Guo *i sar.*, 2015). Iako akumulacija cijanotoksina nije zabeležena, neophodno je i dalje voditi monitoring s obzirom da ishrana ribom koja sadrži akumulirane cijanotoksine može biti jedan od načina izlaganja ljudi ovim toksinima (Zanchett *i Oliveira-Filho*, 2013).

### 5.1.5 Histopatološke promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Ludaš

Tokom perioda istraživanja, različiti organi vrste *Carassius gibelio* su uzorkovani kako bi se ispitaio uticaj cvetanja cijanobakterija i prisustvo cijanotoksina na tkiva riba. U jetri, bubrezima i škragama izlovljenih riba su uočene značajne histopatološke promene. U daljem

tekstu će biti opisane ove promene, kao i njihova kvantifikacija. Sa druge strane, u ostalim organima (crevima, slezini, mišićima, testisima i ovarijumima) nisu uočene histopatološke promene, i ovi organi su imali normalnu strukturu tkiva.

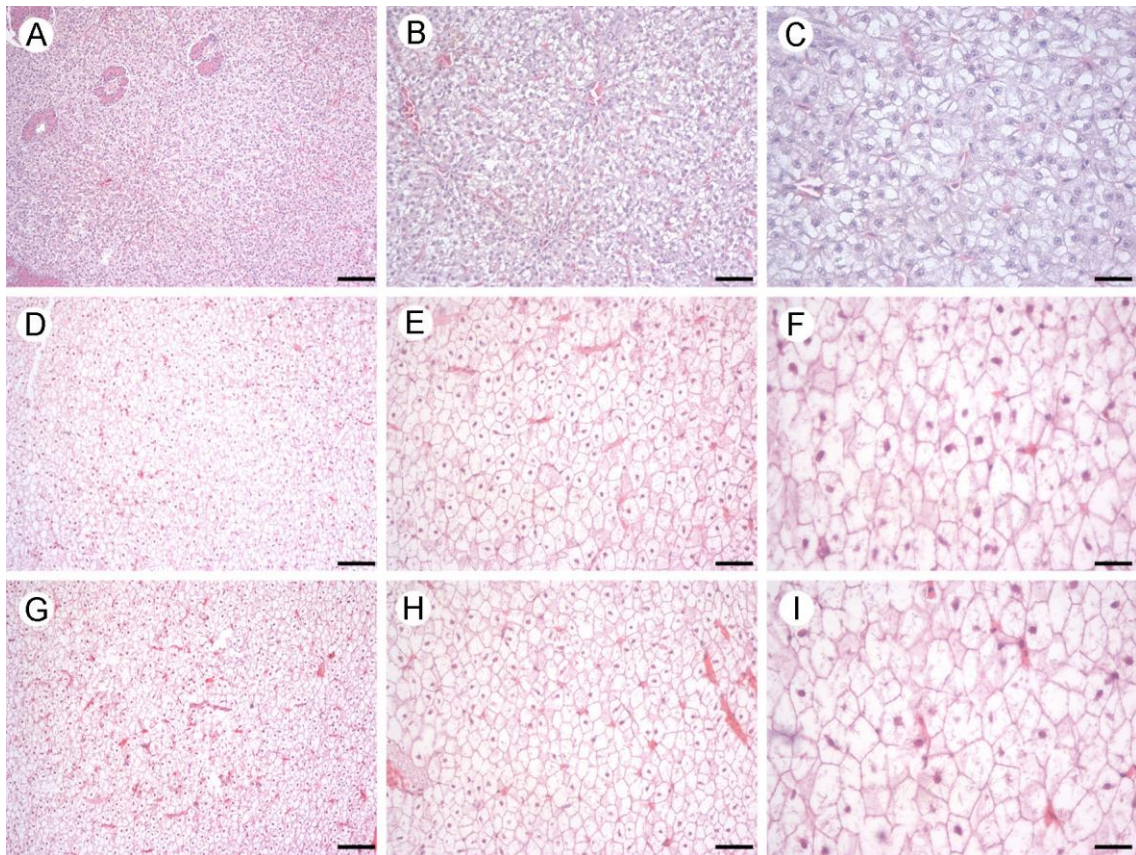
#### 5.1.5.1 *Jetra*

Kontrolne jedinke gajene na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke su imale normalnu strukturu jetri (Slika 21A-C). Hepatociti su bili poligonalnog oblika i pravilno raspoređeni oko kapilara, sinusoida i žučnih kanala formirajući vrpčastu/vretenastu strukturu parenhima (Slika 21A, B). Citoplazma je bila delimično obojena označavajući prisustvo glikogenskih rezervi, ali su masne inkluzije takođe uočljive (Slika 21C). Jedra su bila krupna sa jasno vidljivim jedarcetom (Slika 21C).

U jetrama jedinki izlovljenih iz jezera Ludaš su uočene histopatološke promene. Dominantne promene beležene na jetrama jedinki izlovljenih tokom marta i septembra su bile narušena struktura parenhima, slabije vidljivi sinusoidi i vakuolizacija citoplazme (Slika 21D-I). Dominantna promena zabeležena u martu jeste bilo zaokrugljivanje hepatocita, gde su hepatociti izgubili svoju normalnu poligonalnu strukturu, i izgledali su okruglasto. Jedra ovih hepatocita su neretko bila veoma kondenzovana, i jedarce nije bilo uočljivo (Slika 21F, I). Piknoza koja može da ukazuje na nekrozu hepatocita je bila beležena u septembru (Slika 21I). Jedinke svih sezona su ispoljile vakuolizacije i gubitak glikogena, dok je u nekim slučajevima citoplazma bila gotovo prozirna ukazujući na hipervakuolizaciju.

Što se tiče polukvantitativne analize, narušavanje strukture parenhima i zaobljavanje hepatocita su smatrani promenama arhitekture i strukture tkiva jetre, dok su vakuolizacija i gubitak glikogena smatrani promenama citoplazme hepatocita (tj. tkiva jetre). Ova analiza je potvrdila rezultate dobijene kvalitativnom analizom strukture tkiva jetre. Naime, indeksi organa u obe sezone su bili značajno veći u odnosu na kontrolu (Slika 22A; Tukey's HSD,  $p < 0,01$ ). Iako kvalitativno nije bilo velike razlike između sezona, polukvantitativna analiza je pokazala da je indeks organa bio statistički značajno veći kod riba izlovljenih u septembru u poređenju sa ribama izlovljenim u martu. Posmatrajući raščlanjeno progresivne i regresivne promene, uočeno je da je indeks regresivnih promena bio veći od indeksa progresivnih promena tokom obe sezone (Slika 22B). Indeks regresivnih promena je bio statistički značajno veći u septembru nego u martu (Slika 22B; Tukey's HSD,  $p < 0,01$ ), dok u progresivnim promenama nije bilo razlike između sezona. Što se tiče najčešće beleženih promena, sve

promene sem promena jedara tokom marta su bile značajno veće od kontrole (Tabela 12; Tukey's HSD,  $p < 0,05$ ).

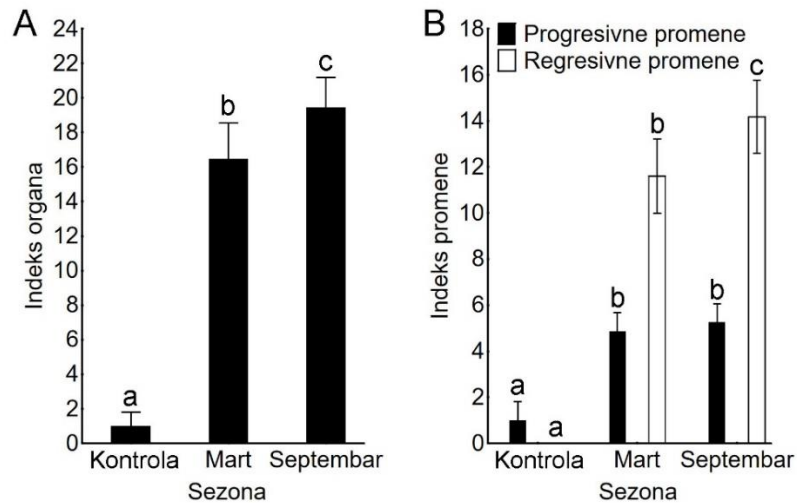


**Slika 21.** Histološki preseki jetri kontrolnih riba (A-C) i riba izlovljenih u jezeru Ludaš tokom marta (D-F) i septembra (G-I). Kontrolne ribe su pokazale normalnu histologiju jetri sa tipičnom 'vretenastom' strukturom parenhima (A, B), hepatocitima poligonalne strukture i jedrima sa izraženim jedarcetom (C). Najizraženija promena kod jedinki izlovljenih tokom marta je bila intenzivna vakuolizacija, gubitak glikogena i prosvetljenje citoplazme (D-F). Čelije su takođe bile znatno veće od kontrolnih (izražena hipertrofija; F), dok su pojedina jedra bila veoma kondenzovana (F). Gotovo identične promene su zabeležene i u jetrama jedinki izlovljenih tokom septembra (G-I). H&E. Razmera: A, D, G – 100  $\mu\text{m}$ ; B, E, H – 50  $\mu\text{m}$ ; C, F, I – 25  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 12.** Indeksi najčešće beleženih promena jetre kod riba izlovljenih iz jezera Ludaš.

Promene	Kontrola	Mart	Septembar
Promene arhitekture	0 <sup>a</sup>	4,60±0,39 <sup>b</sup>	4,37±0,88 <sup>b</sup>
Promene u citoplazmi hepatocita	1±0,82 <sup>a</sup>	5,50±0,53 <sup>b</sup>	5,69±0,37 <sup>b</sup>
Promene jedara hepatocita	0 <sup>a</sup>	1,50±1,18 <sup>a</sup>	4,12±1,55 <sup>b</sup>
Hipertrofija hepatocita	0 <sup>b</sup>	4,85±0,82 <sup>b</sup>	5,25±0,80 <sup>b</sup>

Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0,05$ ).



**Slika 22.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočenih u jetrama riba iz laboratorijske kontrole, kao i riba izlovljenih na jezeru Ludaš tokom marta i septembra. (A) Ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeksi progresivnih i regresivnih promena koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

Histopatološke promene jetre zabeležene u ovoj studiji kao što su narušena struktura parenhima, vakuolizacija, gubitak glikogena, zaokrugljivanje hepatocita i piknoza su često beležene nakon izlaganja riba cijanotoksinima ili cvetanju cijanobakterija (Carbis *i sar.*, 1996, 1997; Kotak *i sar.*, 1996; Fischer i Dietrich, 2000; Ernst *i sar.*, 2006; Li *i sar.*, 2007; Loyda Atencio *i sar.*, 2008; Jiang *i sar.*, 2011; Svirčev *i sar.*, 2015; Drobac *i sar.*, 2016). Ove promene, a posebno vakuolizacija i povećana koncentracija lipida u jetri, su detektovane i u jetrama sisara nakon izlaganja MC-u (Gupta *i sar.*, 2003; Hooser *i sar.*, 1990; Sedan *i sar.*, 2015), i mogu da ukazuju na ozbiljnija oštećenja jetre koja nastaju direktnim uticajem toksina, ali i kao posledica neravnoteže u ishrani (Thoolen *i sar.*, 2010). Pojedina oštećenja jetre mogu da se dovedu u direktnu vezu sa toksičnim dejstvom MC-a, tj. njihovom sposobnošću da se kovalentno vezuje za PP (Vichi *i sar.*, 2016; Buratti *i sar.*, 2017). Naime, istraživanja na sisarima pokazuju da inhibicija PP-a dovodi do poremećaja u funkcionisanju ćelija i oštećenja citoskeleta (Falconer i Yeung, 1992; Hiraga i Tamura, 2000) što može da dovede do narušavanja kontakta između ćelija, zaokrugljivanja hepatocita, kondenzacije hromatina i piknoze koji su beleženi u ovom istraživanju.

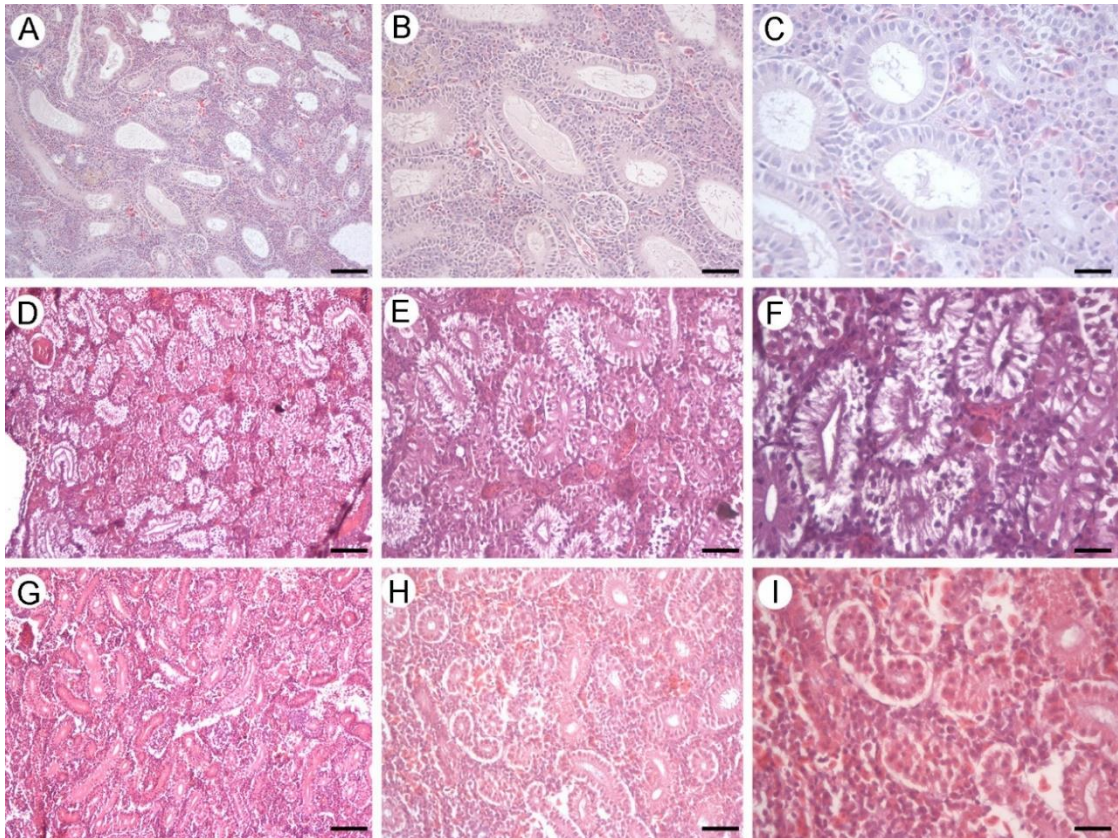
### 5.1.5.2 *Bubreg*

Bubrezi kontrolnih riba gajenih na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke su imali normalnu histološku strukturu (Slika 23A-C). Proksimalni tubuli imaju jedan sloj visokih stubastih epitelnih ćelija sa bazalno postavljenim jedrom i ovi tubuli se sastoje iz dva morfološki različita dela: jedan sa izraženim mikrovilima i drugi sa manje izraženim mikrovilima, ali se u ćelijama nalaze mnogobrojne mitohondrije. Distalni tubuli imaju jedan sloj kratkih kockastih epitelnih ćelija sa centralno postavljenim jedrima (Slika 23C). Jedra epitelnih ćelija su bila krupna sa krupnim jedarcima. Bubrežna telašca su imali krupne glomerule sa veoma tankim kapsularnim prostorom Boumanove čaure. Blage vakuolizacije epitelnih ćelija i zapušnja tubula su uočeni kod nekih kontrolnih jedinki.

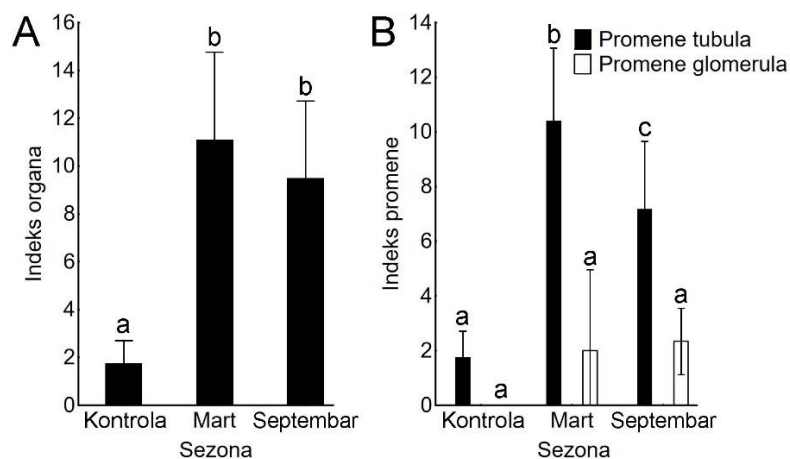
Jedino jedinke uzorkovane u martu su pokazale znatne histopatološke promene bubrega. Ove promene su podrazumevale i degeneraciju nefrona, ali i narušavanje strukture intersticijalnog tkiva (Slika 23D-F). Kod bubrežnih telašaca je uočeno smanjenje veličine glomerula praćeno dilatacijom Boumanove čaure. Epitelne ćelije tubula su bile vakuolizirane, a u pojedinim slučajevima je došlo i do odlublivanja epitelnih ćelija sa bazalne membrane (Slika 23I). Brojni tubuli su bili začepljeni, i u procesu nekroze. Uočena su polja nekrotičnih ćelija koje su imale piknotična jedra i narušenu ćelijsku membranu s obzirom da je bilo teško detektovati granicu između ćelija. Kod pojedinih riba je zabeležena nekroza i hijalinizacija intersticijuma, kao i prisutvo makrofagnih agregata. Kod jedinki izlovljenih tokom septembra su uočene blage promene kao što su vakuolizacije epitelnih ćelija bubrežnih tubula, ali su bile mnogo ređe i manje intenzivne (Slika 23G-I).

Što se tiče polukvantitativne analize, vakuolizacije epitelnih ćelija tubula i njihovo odlublivanje od bazalne membrane su smatrane promenama arhitekture i strukture tubula, dok su dilatacije Boumanove čaure smatrane promenama arhitekture i strukture bubrežnog telašca. Indeksi organa su bili značajno veći u obe sezone u poređenju sa kontrolom (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ), dok razlike nije bilo između sezona (Slika 24A). Progressivne i cirkulatorne promene nisu bile beležene. Regresivne promene tubula su bile znatno izraženije u odnosu na regresivne promene bubrežnih telašaca (Slika 24B). Regresivne promene tubula su bile najveće tokom marta što potvrđuje rezultate kvalitativne analize. Jedino su indeksi arhitekturnih promena tubula i citoplazmatskih promena ćelija tubula bili značajno veći od kontrole, ali i značajno veći tokom marta u poređenju sa septembrom (Tabela 13; Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).





**Slika 23.** Histološki preseki bubrega kontrolnih riba (A-C) i riba izlovljenih iz jezera Ludaš (D-I). Kontrolne ribe su pokazale normalnu histološku strukturu (A-C). Najizraženija promena kod riba izlovljenih tokom marta (D-F) je bila vakuolizacija tubula, kao i blaga piknoza jedara (F). Promene kod riba izlovljenih tokom septembra (G-I) su bile nešto blaže, dok su vakuolizacije bile prisutne i dovodile do odlubljivanja od bazalne membrane (I). H&E. Razmera: A, D, G – 100  $\mu\text{m}$ ; B, E, H – 50  $\mu\text{m}$ ; C, F, I – 25  $\mu\text{m}$ .



**Slika 24.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočenih na bubrezima riba izlovljenih na jezeru Ludaš tokom marta i septembra. (A) Ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeksi regresivnih promena tubula i bubrežnih telašaca koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

**Tabela 13.** Indeksi najčešće beleženih promena bubrega kod riba izlovljenih iz jezera Ludaš.

Promene	Kontrola	Mart	Septembar
Promene arhitekture tubula	1,25±0,50 <sup>a</sup>	5,20±0,89 <sup>b</sup>	3,83±0,75 <sup>c</sup>
Citoplazmatične promene ćelija tubula	0 <sup>a</sup>	3,60±1,07 <sup>b</sup>	2,00±0,89 <sup>c</sup>
Atrofije tubula	0 <sup>a</sup>	1,40±1,26 <sup>a</sup>	1,33±1,63 <sup>a</sup>
Promene arhitekture bubrežnih telašaca	0 <sup>a</sup>	1,00±1,35 <sup>a</sup>	1,67±0,52 <sup>a</sup>
Atrofije bubrežnih telašaca	0 <sup>a</sup>	1,00±1,70 <sup>a</sup>	0,67±0,82 <sup>a</sup>

Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

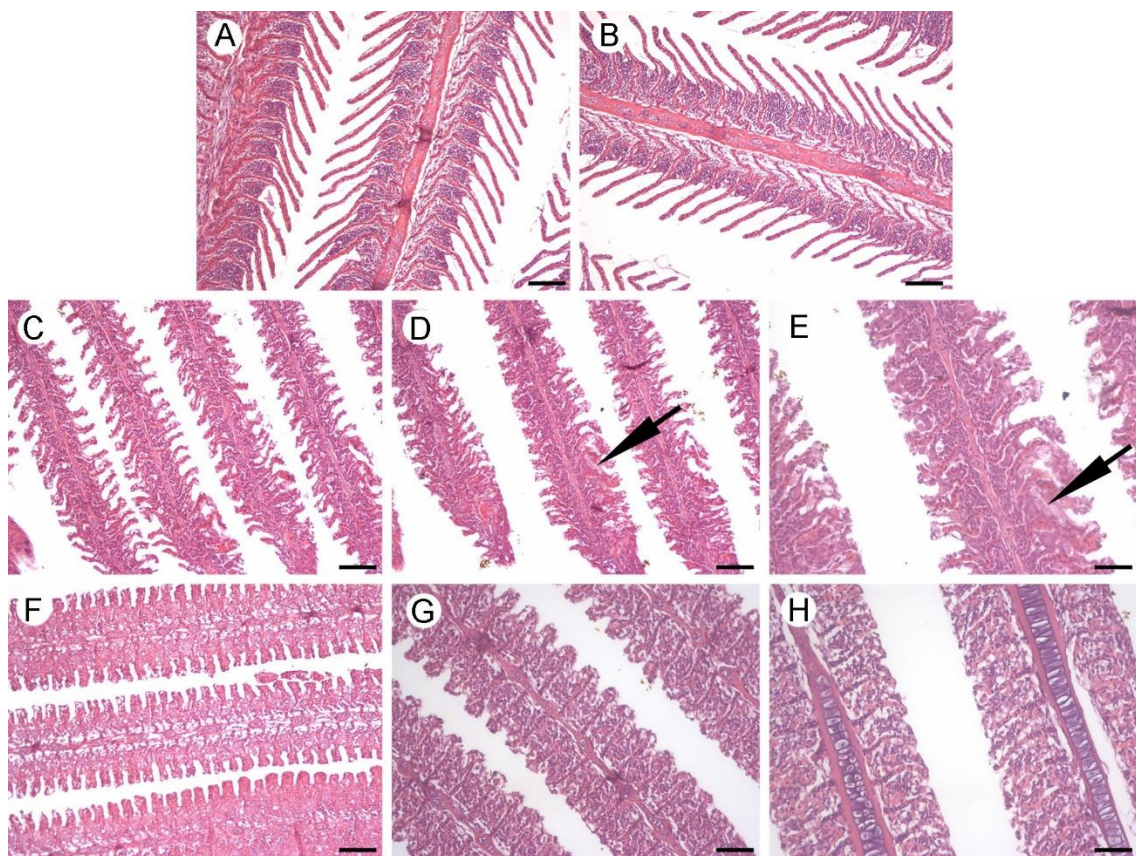
S obzirom da bubrezi primaju veliku količinu postbranhijalne krvi, ovaj organ može biti značajan pokazatelj zagađenja životne sredine (Svirčev *i sar.*, 2015). Takođe, bubrezi poseduju multi-specifične organske anjonske transportne polipeptide (OATP) slično jetri (Mikkaichi *i sar.*, 2004; Sekine *i sar.*, 2006), te MC-i mogu biti usvojeni od strane ćelija bubrega u kojima mogu da izazivaju toksičan efekat vezivanjem za PP. Fischer i Dietrich (2000) su pokazali da bubrezi šaranskih riba usvajaju MC, i da se histopatološke promene kod ovih vrsta javljaju čak pre na bubrezima nego na jetri, i to pri manjim koncentracijama toksina. Slično je uočeno i u ovom istraživanju gde su intenzivnije histopatološke promene uočene na bubrezima nego na jetri, pogotovo kod riba koje su izlovljene tokom proleća kada su koncentracije toksina bile niže. Histopatološke promene uočene u ovom istraživanju su bile slične promenama uočenim i u drugim istraživanjima uticaja cvetanja cijanobakterija na ribe u prirodnim uslovima (Li *i sar.*, 2008; Mitsoura *i sar.*, 2013; Drobac *i sar.*, 2016; Tokodi *i sar.*, 2018). Mnoge detektovane promene su reverzibilne te je oporavak tkiva očekivan nakon prestanka dejstva iritanta, međutim, promene kao što su nekroze i hijalinizacija su stalne promene, te do oporavka tkiva ne dolazi. S obzirom da je nekroza uočena u ćelijama tubula, ali i glomerula, kod ovih riba može da dođe do trajnih teškoća u funkcionisanju tkiva kao npr. regulaciji vode i jona. Međutim, činjenica da su gotovo svi ispitivani indeksi bili veći tokom marta u poređenju sa septembrom ukazuje na trajni problem koji vlada u jezeru Ludaš i na konstantnu prirodu cvetanja cijanobakterija u ovom ekosistemu. Ovoj činjenici takođe svedoče i rezultati ovog istraživanja s obzirom da je broj cijanobakterija prevazilazio 20 miliona ćelija/ml tokom svih ispitivanih meseci, ali i da su MC-i detektovani tokom svih meseci.

### 5.1.5.3 Škrge

Škrge kontrolnih riba gajenih na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke su imale normalnu histološku strukturu (Slika 25A, B). Sa

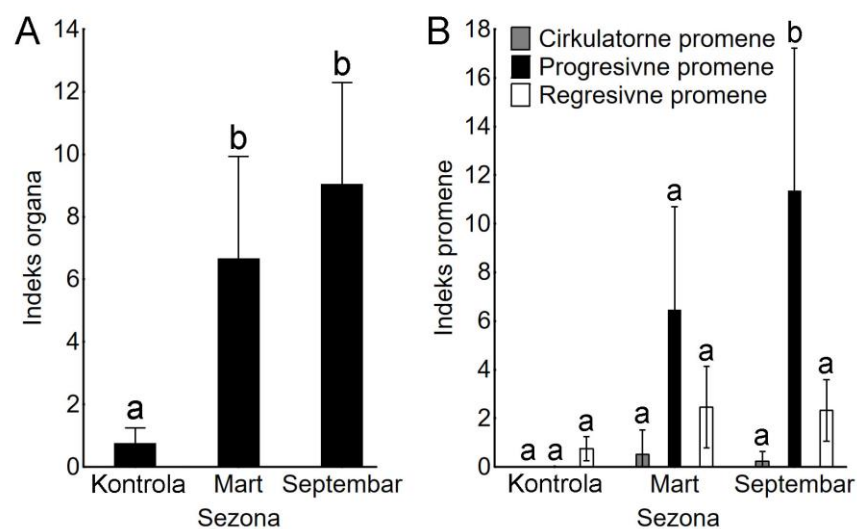
obe strane dugačkih primarnih lamela su se nalazili redovi sekundarnih lamela. Sekundarne lamele su imale jedan sloj tankih epitelnih ćelija, a dijametar lamela je bio dovoljan da propusti prolazak pojedinačnih eritrocita. Interlamelarna masa ćelija je sadržala brojne epitelne ćelije i hloridne i mukusne ćelije.

Škrge jedinki izlovljenih tokom marta i septembra su pokazale značajne histopatološke promene. Hiperplazija interlamelnog epitela je bila najčešće beležena promena (Slika 25C-H), međutim, nije došlo samo do proliferacije epitelnih ćelija, već i do proliferacije hloridnih i mukusnih ćelija (Slika 25D, E). Hiperplazija interlamelnog epitela je dovela i do kompletne fuzije lamela, najčešće beležene tokom septembra (Slika 25H). Hipertrofija epitelnih i mukusnih ćelija je takođe bila česta kod jedinki uzorkovanih u septembru (Slika 25G). Pored ovih promena, uočeni su i odlublјivanje epitela i edem, i hiperplazija i hipertrofija hloridnih ćelija. Kod nekih jedinki su uočene telangiektazije, a retko ruptura epitela i hemoragije.



**Slika 25.** Histološki preseći škrge kontrolnih riba (A, B) i riba izlovljenih iz jezera Ludaš. (C-H). Kontrolne ribe su pokazale normalnu histološku strukturu (A, B). Najčešće beležena promena tokom marta je bila hiperplazija interlamelnog epitela (C-E), gde je došlo do proliferacije epitelnih ćelija, ali i mukusnih ćelija (D, E; strelice). Hiperplazija je bila intenzivnija tokom septembra (F-H) kada je dovela i do potpunih fuzija lamela (H). Hipertrofija je takođe bila veoma izražena (E), kao i odlublјivanje epitela koje se pojavljivalo zajedno sa hiperplazijom (G). H&E. Razmera: A-D, F – 100  $\mu\text{m}$ ; E, G, H – 50  $\mu\text{m}$ .

Tokom polukvantitativne analize, odlublјivanje epitela, zaoblјivanje lamela i ruptura epitela su smatrani strukturnim promenama epitela. Indeksi organa riba izlovlјjenih tokom marta i septembra su bili značajno veći od kontrole (Slika 26A; Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ), dok razlike između sezona nisu uočene. Progresivne promene su bile znatno intenzivnije od regresivnih i cirkulatornih promena (Slika 26B). Indeks progresivnih promena uglavnom ogledan u intenzitetu hiperplazije epitela je bio značajno veći u septembru (Tabela 14), što se poklapa sa kvalitativnim opisom promena. Ostali indeksi pojedinačnih promena nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na kontrolu (osim hipertrofije epitela u septembru; Tabela 14).



**Slika 26.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena škruga riba izlovlјjenih iz jezera Ludaš tokom marta i septembra. (A) Ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeks progresivnih, regresivnih i cirkulatornih promena koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

**Tabela 14.** Indeksi najčešće beleženih promena škruga kod riba izlovlјjenih iz jezera Ludaš.

Promene	Kontrola	Mart	Septembar
Hiperemije/aneurizme	0 <sup>a</sup>	0,50±1,02 <sup>a</sup>	0,23±0,41 <sup>a</sup>
Promene arhitekture i strukture lamela	0,75±0,50 <sup>a</sup>	2,29±1,42 <sup>a</sup>	2,32±1,27 <sup>a</sup>
Hipetrofija epitelnih ćelija	0 <sup>a</sup>	1,12±1,02 <sup>a,b</sup>	1,64±1,07 <sup>b</sup>
Hiperplazija epitelnih ćelija	0 <sup>a</sup>	3,92±3,78 <sup>b</sup>	7,45±3,20 <sup>c</sup>
Hiperplazija mukusnih/hloridnih ćelija	0 <sup>a</sup>	1,42±1,24 <sup>a</sup>	2,27±3,10 <sup>a</sup>

Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

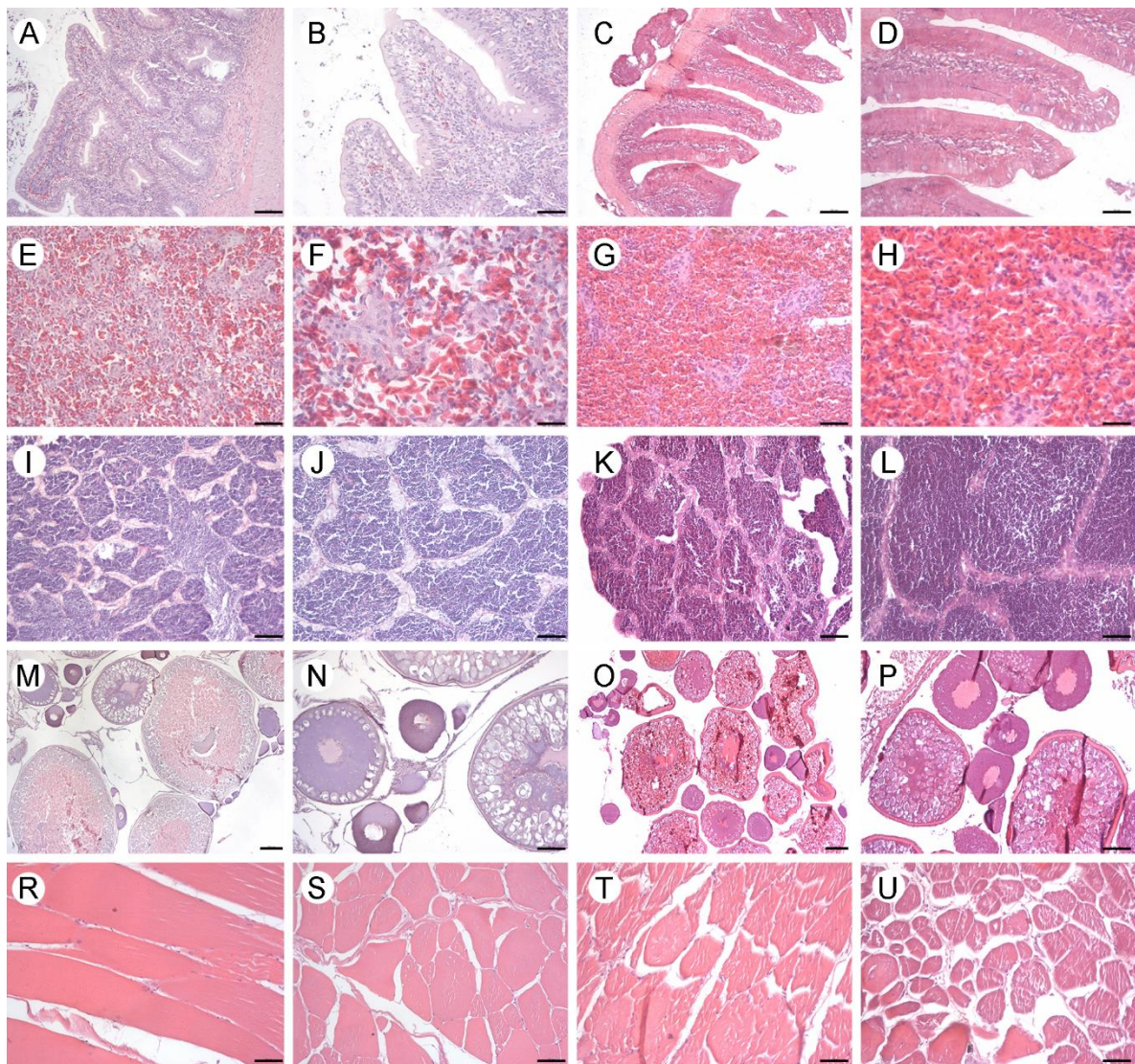
Škrge riba su veoma osjetljive na uticaje toksičnih hemikalija s obzirom da one čine više od 50% ukupne površine riba i da su u direktnom kontaktu sa vodom (Lujčić *i sar.*, 2015). Mnoge promene uočene u ovom istraživanju su uočene i u drugim istraživanjima uticaja cvetanja cijanobakterija na tkiva riba u prirodnim uslovima (Carbis *i sar.*, 1997; Svirčev *i sar.*, 2015; Drobac *i sar.*, 2016; Tokodi *i sar.*, 2018). Hiperplazija koja je bila najčešće beležena promena je odbrambeni mehanizam šrkga kojim dolazi do smanjenja respiratorne površine, a samim tim i površine kroz koju toksini mogu da difunduju. Odlublјivanje epitela je takođe odbrambeni mehanizam kojim se povećava difuziona distanca, tj. barijera između vode i krvi (Agamy, 2013; Lujčić *i sar.*, 2015). MC mogu da inhibišu jonske pumpe hloridnih ćelija što može da dovede do disbalansa u koncentracijama  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , kao i do problema u regulaciji drugih jona (Gaete *i sar.*, 1994; Bury *i sar.*, 1996). Ovo može biti potencijalan uzrok hipertrofije i hiperplazije hloridnih ćelija. Telangiektazije, ruptura epitela i hemoragije mogu potencijalno biti direktna posledica delovanja cijanotoksina na škrge.

#### 5.1.5.4 Ostali organi

U ostalim ispitivanim organima nisu uočene značajne histopatološke promene. Creva jedinki izlovljenih iz jezera Ludaš su pokazala normalnu histološku strukturu sličnu kontrolama (Slika 27A-D). Naime, crevni nabori se sastoje iz tanke *lamina propria* i *lamina epithelialis* koju sačinjava jedan sloj visokoprizmatičnih enterocita sa bazalno postavljenim jedrom i krupne mukozne ćelije. Jedine uočene promene su bili blagi edemi unutar *lamina propria*-e koji su doveli do njene blage dilatacije. U slezinama se jasno razlikuju bela i crvena pulpa, i jedina razlika između kontrolnih i jedinki iz jezera Ludaš jeste intenzivnije prisustvo makrofagnih agregata kod riba izlovljenih iz jezera Ludaš (Slika 27E-H). Gonade (testisi i ovarijumi) nisu pokazale nikakve razlike između kontrolnih jedinki i jedinki izlovljenih iz jezera Ludaš (Slika 27I-P). Kod mišića riba iz jezera Ludaš je češće primećen gubitak kontakta pojedinačnih mišićnih vlakana (Slika 27T, U) u poređenju sa kontrolom (Slika 27R, S).

Crevo je, pored škrge, prvi organ koji dolazi u kontakt sa cijanotoksinima, i na kojem mogu da se uoče posledice delovanja ovih toksina. Brojna istraživanja uticaja MC-a na ribe tokom klјukanja i oralnog unosa toksičnih cijanobakterija su beležila promene u enterocitima (vakuolizacije, apoptozu, nekrozu), ali i promene u samoj strukturi crevnih resica kao što su dilatacija *lamina propria*-e, deskvamacija epitela, gubitak adhezije i posledično odlublјivanje epitelnih ćelija (Fischer i Dietrich, 2000; Molina *i sar.*, 2005; Marie *i sar.*, 2012; Svirčev *i sar.*, 2015). Intenzivne promene su uočene i kod riba iz našeg prethodnog istraživanja na jezeru

Ludaš (Tokodi *i sar.*, 2018) za razliku od samo blagih edema zabeleženih u ovoj studiji. Iako je u oba istraživanja broj ćelija cijanobakterija po mililitru bio sličan, koncentracije MC-a su u prethodnom istraživanju bile daleko veće, te je ovo moguć uzrok intenzivnijih promena zabeleženih u tom periodu. Što se tiče ostalih organa, ni u prethodnom istraživanju nisu beležene znatne histopatološke promene, iako cijanotoksini mogu da izazovu promene u gonadama (Gupta i Guha, 2006; Trinchet *i sar.*, 2011; Acuña *i sar.*, 2012) i mišićima (Nince Ferreira *i sar.*, 2010; Drobac *i sar.*, 2016).



**Slika 27.** Histološki preseći ostalih analiziranih organa. Preseći creva kontrolnih riba (A, B) i riba iz jezera Ludaš (C, D). Preseći slezine kontrolnih riba (E, F) i riba iz jezera Ludaš (G, H). Preseći testisa kontrolnih riba (I, J) i riba iz jezera Ludaš (K, L). Preseći ovarijuma kontrolnih riba (M, N) i riba iz jezera Ludaš (O, P). Preseći mišića kontrolnih riba (R, S) i riba iz jezera Ludaš (T, U). H&E. Razmera: M, O – 200  $\mu\text{m}$ ; A, C, I, K, N, P – 100  $\mu\text{m}$ ; B, D, E, G, J, L, R-U – 50  $\mu\text{m}$ ; F, H – 25  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.6 Opasnost cvetanja cijanobakterija po ptice vodenih ekosistema

Cijanotoksini se mogu prenositi putem lanaca ishrane na različite potrošače, kao što su brojne životinje koje žive u ili oko jezera, uključujući i ptice. U slučaju jezera Ludaš, ovo je posebno bitno s obzirom da je jedan od glavnih razloga za zaštitu ovog jezera njegova funkcija staništa za brojne zaštićene vrste ptica. Naime, jezero spada i u močvarna područja sa međunarodnim značajem (tzv. Ramsar područje), ali i u IBA područja značajna za ptice i biodiverzitet (Grba *i sar.*, 2017; Tokodi *i sar.*, 2018) zbog prisustva brojnih ugroženih i migratornih vrsta ptica. S obzirom na konstantno prisustvo i cvetanje cijanobakterija, kao i na prisustvo cijanotoksina u vodi tokom prethodnih nekoliko decenija (Seleši, 1981; Đukić *i sar.*, 1991; Simeunović, 2009; Tokodi *i sar.*, 2018), zaštita jezera Ludaš kao Specijalnog rezervata prirode je upitna.

Ptice mogu doći u kontakt sa cijanotoksinima putem neposrednog kontakta sa cvetajućom vodom. Rana istraživanja, kao istraživanja na jezeru „Storm Lake“ u Ajovi (SAD), procenjuju da je usled cvetanja vrste *Anabaena flos-aquae* došlo do pomora 5000-7000 galebova, 560 patki, 400 lisica, 200 fazana, 50 veverica, 18 muzgavaca, 15 pasa, 4 mačke, 2 svinje, 2 jastreba, i brojnih ptica pevačica (Firkins, 1953; Rose, 1953). Smatra se da je neurotoksičnost ispoljena u slabosti, grčevima, otežanom disanju i konvulzijama predhodila smrti. U Danskoj su tokom cvetanja cijanobakterija 1993. godine uginula dva gnjurca i crna liska (Henriksen *i sar.*, 1997; Onodera *i sar.*, 1997). U stomaku uginulih ptica su nađene ćelije cijanobakterije *Anabaena lemmermannii*, kao i tragovi jedinjenja sličnih ATX-a(s). Uginuća patki na Shin-ike jezeru je zabeleženo nakon cvetanja vrste *M. aeruginosa* tokom kojeg je detektovano prisustvo MC-a (Matsunaga *i sar.*, 1999). Uginuća flaminga su dovedena u vezu sa cvetanjem cijanobakterija u jezerima Kenije i Tanzanije (Codd *i sar.*, 2003; Krienitz *i sar.*, 2003; Lugomela *i sar.*, 2006). Prisustvo MC-a u brojnim organima je detektovano kod domaćih patki (*Anas platyrhynchos*) i crnovenčane noćne čaplje (*Nycticorax nycticorax*) sa jezera Taihu (Kina) tokom toksičnog cvetanja vrsta roda *Microcystis* (Chen *i sar.*, 2009b). Nakon eksperimentalnog izlaganja biomasi vrste *Microcystis* sp. koja je sadržala različite koncentracije MC-a, zapažene su histopatološke promene u obliku oticanja i vakuolizacije hepatocita, steatoze, hiperplazije limfnih čvorova i vakuolarna degeneracija germinativnog epitela testisa kod muških japanskih prepelica (*Coturnix coturnix japonica*) (Skocovska *i sar.*, 2007).

Osim što ptice mogu da budu izložene cijanobakterijama i cijanotoksinama, one potencijalno mogu da budu i vektori prenosa cijanobakterijskog cvetanja. Postoji verovatnoća

da migratorne ptice koje dolaze na jezero pakupe i prenesu ćelije prisutnih cijanobakterija na nogama, perju, kljunovima ili fecesu, te na taj način omogućavaju dalje prenošenje cijanobakterija na druge ekosisteme (Sukenik *i sar.*, 2012). Ovo je posebno opasno kod veoma invazivnih cijanobakterija kao što je *Raphidiopsis raciborskii* (koja je detektovana u ovom istraživanju) jer se tim omogućava dalje širenje ove veoma opasne i invazivne cijanobakterije. Pomenuta istraživanja pokazuju da ptice vodenih ekosistema mogu da budu izložene cvetanju cijanobakterija i njihovim toksinima, a koji mogu da izazovu brojne negativne posledice, pa čak i uginuće, ali i da potencijalno mogu i same da prenose ovaj problem na druge ekosisteme.

### 5.1.7 Potencijalni načini za poboljšanje statusa jezera Ludaš

Iako cvetanje cijanobakterija predstavlja globalan problem koji se intenzivno proučava kako u svetu, tako i na mnogim lokalitetima Srbije (Milovanović i Živković, 1963; Gajin *i sar.*, 1983; Čomić i Ranković B., 1991; Branković *i sar.*, 1998; Ranković i Simić, 2005; Svirčev *i sar.*, 2006; Nemes i Matavuly, 2006; Ćirić *i sar.*, 2010; Cvijan i Fužinato, 2012; Đorđević i Simić, 2014; Đorđević *i sar.*, 2015; Simić *i sar.*, 2017), do sada nije nađeno ni jedno efektivno i dugoročno rešenje ovog problema. Jezero Ludaš je poznato po neprekidnom cvetanju koje se dešava gotovo tokom cele godine. Ovo je pokazano i u sadašnjoj studiji gde je broj cijanobakterija prevazilazio 20 miliona ćelija/ml u svim ispitivanim mesecima. Takođe, histopatološke promene zabeležene na različitim organima riba u martu 2018. godine, ukazuju na potencijalni problem sa proizvodnjom cijanotoksina i pre početka našeg istraživanja. Pogoršanje u septembru primećeno kod nekih analiza jetre, koja često prva dolazi u kontakt sa ksenobioticima, može da upućuje na to da cvetanje cijanobakterija i cijanotoksini mogu da doprinose opisanim promenama. Histopatološki nalazi dobijeni tokom istraživanja u doktoratu samo još jednom potvrđuju alarmantno stanje u kojem se nalazi jezero Ludaš i neophodnost hitne sanacije. Međutim, iako je problem itekako poznat, potencijalno rešenje i dalje nije na vidiku.

U cilju redukovanja populacije cijanobakterija u jezeru Ludaš, potencijalna efikasnost tretiranja vode vodonik-peroksidom je istražena *in vitro* u ranijim istraživanjima. Incijalna laboratorijska testiranja su pokazala da ova metoda najverovatnije nije podobna za primenu (Tokodi *i sar.*, 2018). Velika koncentracija cijanobakterija i veliko organsko opterećenje bi zahtevali i veoma visoke koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koje mogu biti veoma štetne za životnu sredinu i ostale organizme. Skorija studija sprovedena na jezeru Ludaš je ispitala upotrebu kombinacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji razgrađuje ćelije cijanobakterija i enzima MlrA koji razgrađuje same MC (Dziga *i*



sar., 2019). Rezultati su pokazali da je tretman smanjio brojnost dominantnog soja cijanobakterija, kao i intracelularnu koncentraciju MC-a usled delovanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, međutim, smanjenje ekstracelularnog MC-a nije postignuto u kombinaciji sa MlrA. S obzirom da je pokazano da tretman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukuje ekspresiju *mcyB* i *mcyE* gena, njegovo korišćenje kao efektivne mere u borbi protiv cijanobakterija mora dodatno da se ispita. Mnogi drugi autori su takođe predlagali mere za poboljšanje kvaliteta vode ovog jezera kao što su iznalaženje alternativnog izvora vode koji bi održavao nivo jezera, a koji sadrži manju količinu nutrijenata, uklanjanje taloga (Ćirić *i sar.*, 2020) ili fotoremedijaciju taloga (Radić *i sar.*, 2013). Čak i kada bi se realizovala obnova ovog ugroženog ekosistema i dalje bi bilo poželjno kontinuirano praćenje stanja ekosistema. Takav sistem postoji u Everglades-u (SAD; močvarno područje Južne Floride – Mreža za nadzor (SFVMN)) sa tri hidrološke i meteorološke stanice koje prate stanje ekosistema u realnom vremenu (Zhang *i sar.*, 2017). Pored istraživanja, podaci iz ovih nadzornih stanica pomažu u boljem razumevanju dinamike i funkcije ovih močvarnih područja.

Budućnost ovog jezera je veoma neizvesna i još uvek se ne nazire potencijalno rešenje. Na osnovu ovog istraživanja, a kao nastavka i potvrde prethodnih istraživanja, moguće je predvideti nastavak cvetanja cijanobakterija u jezeru Ludaš, degradacije ovog zaštićenog staništa, kao i negativni uticaj na vodene organizme. Prehrambeni proizvodi dobijeni iz jezera takođe predstavljaju jedan način izlaganja ljudi cijanotoksinima. U našem prethodnom istraživanju smo ustanovili da cijanotoksini mogu da se akumuliraju u tkivima riba, ali i u rizomima biljaka koje rastu u ovom jezeru (Tokodi *i sar.*, 2018). Korišćenje proizvoda od biljaka i životinja u kojima su akumulirani cijanotoksini, zajedno sa direktnim kontaktom i ingestijom zagađene vode, kao i udisanjem, predstavljaju rizik po zdravlje ljudi. Zbog toga je poželjno neprestano nadgledanje ovog jezera, kao i rad na pronalaženju efektivnog tretmana koji će pomoći ovom ekosistemu, ali i mnogim drugim ekosistemima koji imaju isti problem. Vreme je da se ovaj problem reši, ali većina, ako ne i sve mogućnosti koje se razmatraju su ograničene i/ili nemaju jasan uticaj na rešavanje problema (Mitsch, 2017).

## 5.2 Jezera Kiš-Balaton i Balaton

### 5.2.1 Fizičko-hemijski parametri vode jezera Kiš-Balaton i Balaton

Tokom perioda istraživanja, nekoliko ispitivanih fizičko-hemijskih parametara vode jezera Kiš-Balaton je bilo van smernica predloženih Uredbom Vlade Republike Mađarske (“Governmental Decree No 10/2010. (VIII. 18.) of Ministry of Rural Development (VM) on defining the rules for establishment and use of water pollution limits of surface water.”, 2010) (Tabela 15). pH je bio izrazito alkaln tokom celog perioda istraživanja. Nivo kiseonika (i nivo rastvorenog kiseonika i saturacija) je bio unutar predloženih okvira tokom aprila, međutim, u maju počinje da se smanjuje da bi u septembru bila uočena najniža vrednost. Visok nivo amonijaka u septembru, kao i visok nivo ortofosfata u aprilu i septembru ukazuju na visoko organsko opterećenje u jezeru. Sa druge strane, svi ispitivani fizičko-hemijski parametri vode jezera Balaton su bili u okviru predloženih smernica.

**Tabela 15.** Fizičko-hemijski parametri vode jezera Kiš-Balaton i Balaton tokom 2018. i 2019. godine.

Fizičko-hemijski parametar	Kiš-Balaton					Balaton	Granične vrednosti <sup>1</sup>
	April	Maj	Jul	Septembar	Jun*	Jun	
Temperatura (°C)	15,9	24,4	25,5	25,4	24,8	23,1	/
Elektroprovodljivost (µS/cm)	726	729	741	757	731	809	800
pH	9,26	9,42	9,52	9,44	9,38	8,54	9
Saturacija (%)	87,9	76,1	73,9	41,1	72,3	86,1	80
O <sub>2</sub> (mg/l)	8,53	6,3	5,96	3,38	5,87	7,26	7,5
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	0,06
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	/
NH <sub>4</sub> -N (mg/l)	0	0	<0,1	1,6	<0,1	0	0,05
PO <sub>4</sub> -P (mg/l)	1,8	<0,2	<0,2	1,5	<0,2	<0,2	0,01

\*Uzorkovano u 2019. godini. <sup>1</sup>Granične vrednosti predložene Uredbom Vlade Republike Mađarske.

Rezultati dobijeni za jezero Balaton se donekle slažu sa rezultatima publikovanim od strane Sebestyén *i sar.* (2017) s obzirom da su vrednosti pH, elektroprovodljivosti i rastvorenog kiseonika bili u okvirima predloženih uredbom Vlade Republike Mađarske. Koncentracije nitrata, nitrita i ortofosfata je teško diskutovati s obzirom da su predložene granične vrednosti niže od praga detekcije opreme koja je korištena u ovoj studiji. Međutim, studija sporevedena

od strane Sebestyén *i sar.* (2017) pokazuje da su vrednosti pomenutih parametara bile više od predloženih okvira, i da je voda jezera Balaton prvenstveno kontaminirana visokim koncentracijama nitrata, ortofosfata i ukupnih fosfata. Zanimljivo je da su najveće koncentracije ovih nutrijenata merene u basenima 2 i 3, a ne u basenu 1 što bi donekle bilo očekivano. Ovo ukazuje na činjenicu da reka Zala nije jedina koja doprinosi ovako povišenim vrednostima (Sebestyén *i sar.*, 2017; Hatvani *i sar.*, 2020), i da je uzrok povećanih vrednosti najverovatnije difuzno zagađenje koje dolazi sa okolnog poljoprivrednog zemljišta i otpadnih voda, ili je rezultat unutrašnjeg organskog opterećenja jezera.

Što se tiče jezera Kiš-Balaton, nekoliko parametara je bilo van predloženih okvira. Tokom celog perioda istraživanja, vrednosti pH su bile iznad predloženog okvira od pH 9. Visoka alkalnost vode je više puta do sada bila povezana sa cvetanjem cijanobakterija (Carvalho *i sar.*, 2011; Burdick *i sar.*, 2020a, 2020b). Koncentracija rastvorenog kiseonika i saturacija kiseonika su bili unutar predloženih okvira tokom aprila, ali su zato bili znatno niži tokom preostalih meseci. Tokom meseci kada je cvetanje cijanobakterija u jeku, vrednosti pH i rastvorenog kiseonika su najčešće visoke zbog pojačane fotosintetske aktivnosti. Međutim, kada dođe do odumiranja ćelija, i pH i koncentracija kiseonika počinju drastično da opadaju zbog razlaganja cijanobakterija. Pomenuti fizičko-hemijski parametri vode mogu da se objasne cvetanjem tj. prenamnožavanjem cijanobakterija tokom celog perioda istraživanja. Tokom aprila, broj ćelija cijanobakterija je bio najniži (Tabela 16), međutim, tokom maja dolazi do naglog povećanja broja ćelija (više od 30 puta). Broj ćelija dostiže maksimum tokom jula, da bi se u septembru, kada je došlo do masovnog odumiranja cijanobakterija, taj broj prepolovio. Koncentracije kiseonika su bile niske tokom cele godine, međutim, najniže vrednosti su detektovane u septembru kada je došlo da naglog smanjenja broja ćelija cijanobakterija.

Nivoi nitrata i nitrita detektovani u Kiš-Balatonu su bili niži od praga detekcije opreme koja je korištena u ovoj studiji. S obzirom da je prag detekcije daleko viši od graničnih vrednosti, i s obzirom da su Sebestyén *i sar.* (2017) objavili nivoe ovih jedinjenja veće od predloženih vrednosti u jezeru Balaton, možemo da pretpostavimo da su koncentracije nitrata i nitriti takođe bile više i u jezeru Kiš-Balaton. Koncentracije ortofosfata detektovane u Kiš-Balatonu su bile visoke u aprilu i septembru, dok su tokom maja i jula jedva bile iznad praga detekcije. Tokom aprila, visoke koncentracije ortofosfata su se poklapale sa niskim brojem ćelija cijanobakterija, i najverovatnije su rezultat ulivanja reke Zale. Niske koncentracije ortofosfata detektovane u maju su najverovatnije rezultat intenzivne proliferacije cijanobakterija gde se njihov broj povećao čak 20 puta (Tabela 16). S obzirom da su ortofosfati glavni nutrijent koji omogućava proliferaciju cijanobakterija (Schindler, 1974; Jeppesen *i sar.*,

2005; Fastner *i sar.*, 2016), moguće je da je masovna proliferacija cijanobakterija tokom maja uzrokovala smanjenje koncentracije ortofosfata, koje su ostale niske i tokom jula s obzirom da se broj ćelija dodatno duplirao. U septembru, dolazi do naglog povećanja koncentracije ortofosofata što se poklapa sa smanjenjem broja cijanobakterija i propadanjem cvetanja. Tokom razlaganja cijanobakterija i algi dolazi do oslobađanja fosfora iz ćelija, uglavnom u obliku ortofosfata (nekada čak i do 96%) (Zhang *i sar.*, 2018).

### 5.2.2 Sastav zajednice cijanobakterija jezera Kiš-Balaton i Balaton

U jezeru Kiš-Balaton, *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault je bila dominantna vrsta tokom svih sezona osim juna 2019. godine (Tabela 16). Takođe, vrste *Dolichospermum spiroides* (Klebhan) Wacklin, Hoffmann & Komárek i *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing su bile brojne. Broj ćelija je tokom svih sezona prevazilazio broj od 10000 ćelija/ml koji je predložen od strane Falconer (1998) kao granična vrednost za cvetanje cijanobakterija. Najveći broj je detektovan tokom jula 2018., dok je najniži broj detektovan tokom aprila 2018. godine. U jezeru Balaton, samo dve vrste cijanobakterija su nađene (*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing i *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont). Broj ćelija je bio daleko niži od broja koji je uočen na jezeru Kiš-Balaton.

Detekcija samo dve vrste cijanobakterija u jezeru Balaton tokom juna 2018. godine se razlikovala od rezultata istraživanja koje su sproveli Tóth *i sar.* (2020) tokom avgusta 2018. i Farkas *i sar.* (2020) tokom juna 2017. godine. U studiji koju su sproveli Farkas *i sar.* (2020), u basenima 3 i 4 je dominirala vrsta pikocijanobakterija *Synechococcus* sp.. Tóth *i sar.* (2020) su potvrdili ovaj rezultat s obzirom da su u uzorku sa lokaliteta Tihanj dominirale cijanobakterije reda *Synechococcales*. Predstavljena razlika u strukturi zajednice cijanobakterija je najverovatnije posledica različitih metoda determinisanja vrsta. U ovom istraživanju je korišćena tradicionalna metoda mikroskopske determinacije vrsta, dok je u istraživanjima koja su sproveli Tóth *i sar.* (2020) i Farkas *i sar.* (2020) isključivo korišćeno sekvenciranje sledeće generacije. Pikocijanobakterije su veoma male (do 2  $\mu\text{m}$  u prečniku; Somogyi *i sar.*, 2020) i teško ih je detektovati svetlosnom mikroskopijom. S obzirom da su fokus ovog istraživanja bile toksične cijanobakterije, a da su potencijali pikocijanobakterija u produkciji toksina uglavnom nepoznati, u ovom istraživanju su detektovane samo mikrocijanobakterije koje se generalno smatraju glavnim proizvođačima cijanotoksina. Međutim, razlike uočene između istraživanja ukazuju na korist i benefite sekvenciranja u determinacija cijanobakterija, pogotovo ako se koriste kao dopuna tradicionalnoj metodi.

**Tabela 16.** Kvalitativni i kvantitativni sastav zajednice cijanobakterija jezera Kiš-Balaton i Balaton tokom 2018. i 2019. godine.

Takson cijanobakterija	Kiš-Balaton					Balaton
	April	Maj	Jul	Septembar	Jun*	Jun
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault	115.230	3.936.700	10.975.000	1.968.000	12.540	-
<i>Aphanizomenon hungaricum</i> Komárková-Legnerová & Mátyás	24.300	53.640	714.500	241.300	-	-
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> (Usachev) Rajaniemi <i>i sar.</i>	14.500	32.100	110.500	74.200	-	-
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> (Brébisson ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffman i Komárek	26.000	105.000	214.000	96.300	+	-
<i>Dolichospermum spiroides</i> (Klebhan) Wacklin, Hoffmann & Komárek	69.500	1.612.000	956.000	541.000	3.450	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing	104.300	413.600	525.100	375.000	320.200	21.300
<i>Microcystis flos-aquae</i> (Wittrock) Kirchner	44.600	332.400	487.000	124.000	12.400	-
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing	+	12.300	9.600	+	+	-
<i>Oscillatoria tenuis</i> C. Agardh ex Gomont	+	+	+	+	+	10.650
<b>Σ</b>	<b>398.430</b>	<b>6.497.740</b>	<b>13.991.700</b>	<b>3.419.800</b>	<b>456.590</b>	<b>31.950</b>

Broj cijanobakterija je izražen kao broj ćelija/ml. (+) vrsta sa brojnošću manjom od 0,1% ukupnog broja cijanobakterija; (-) vrsta nije uočena. \*Uzorkovano u 2019. godini.

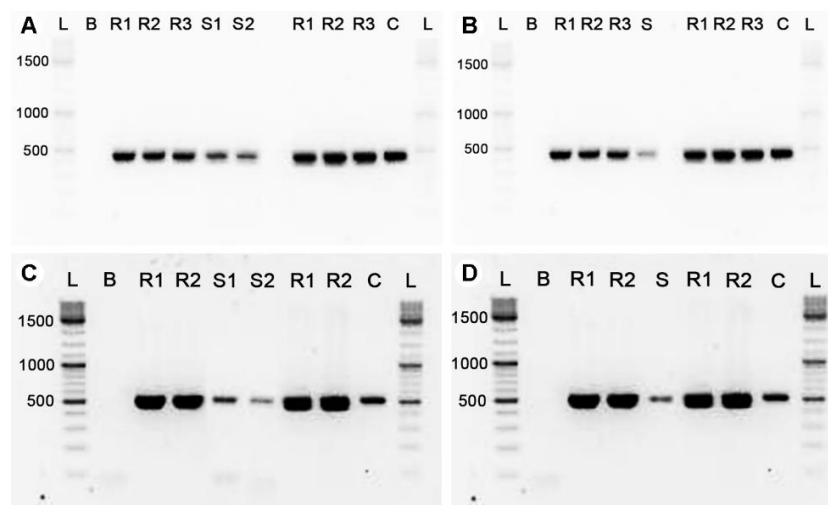
U jezeru Kiš-Balaton, dominantna vrsta koja je uočena tokom cvetanja je bila *Aphanizomenon flos-aquae* sa udelom od čak 78% ukupnog broja ćelija tokom jula 2018. Nešto manji udeo su imale vrste *Aphanizomenon hungaricum*, *Dolichospermum flos-aquae* (ex *Anabaena flos-aquae*), *Microcystis aeruginosa* i *Microcystis flos-aquae*. Slično je primećeno i tokom cvetanja 2009. godine kada je dominantna vrsta bila *Aphanizomenon flos-aquae* sa udelom većim od 70% ukupne biomase, praćena vrstama *Cylindrospermopsis raciborskii* (curr. *Raphidiopsis raciborskii*) i *Anabaena* sp. (Horváth i sar., 2013). Međutim, tokom juna 2019. godine je došlo do bitnog smanjenja udela ove vrste, i dominantna vrsta je bila *Microcystis aeruginosa*. Uzroci ove promene nisu jasni s obzirom da nije došlo do bitnih promena u kvalitetu vode, međutim, moguće je da je došlo i do promena u sezonskoj dinamici fitoplanktonskih vrsta u ovom jezeru a ovo istraživanje je bilo ograničeno na prisustvo i brojnost cijanobakterija.

S obzirom da Kiš-Balaton ne zadržava 100% fitoplanktona, i da se deo preliva u jezero Balaton, detekcija neke od ovih vrsta, pogotovo vrste *Aphanizomenon flos-aquae* je bila očekivana u basenu 1 jezera Balaton. Istraživanje sprovedeno od strane Farkas i sar. (2020) je pokazalo zastupljenost vrste *Aphanizomenon flos-aquae* u basenu 2, dok je istraživanje sprovedeno od strane Tóth i sar. (2020) pokazalo dominaciju vrsta koje pripadaju redu Nostocales. Farkas i sar. (2020) su takođe uočili vrste rodova *Aphanizomenon*, *Anabaena* i *Microcystis* u reci Zala, što se poklapa sa ovim istraživanjem.

Veoma važan rezultat ovog istraživanja je odsustvo vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* (curr. *Raphidiopsis raciborskii*) i u jezeru Kiš-Balaton, i u jezeru Balaton. Ova invazivna vrsta je prvobitno bila introdukovana u Balaton tokom 1978. godine i tokom 1990-tih godina je dominirala tokom cvetanja cijanobakterija u ovom jezeru (Padisák i Reynolds, 1998; Bíró, 2000). Masovna proliferacija ove vrste je potencijalno opasna s obzirom da potencijalno može da produkuje cijanotoksine. Sojevi izolovani iz jezera Balaton nisu proizveli ni CYN, ni ATX-a; međutim, ekstrakti ovih sojeva su pokazali toksičnost u testu toksičnosti na vrsti *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna* testu akutne imobilizacije, testu inhibicije hranjenja *D. magna* i testu toksičnosti razvića embriona zebrice *Danio rerio* (Ács i sar., 2013).

### 5.2.3 Prisustvo cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija iz jezera Kiš-Balaton i Balaton

Analize prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena su rađene na biomasi prikupljenoj tokom jula i septembra 2018. god. na Kiš-Balatonu, i juna 2018. god. na jezeru Balaton. Gen koji kodira MC-sintetazu (*mcyE*; Slika 28A, B) i gen koji kodira STX-sintetazu (*sxtG*; Slika 28C, D) su amplifikovani u svim uzorcima, dok ostali ispitivani geni (*sxtA* i *sxtS* za STX-sintetazu, *cyrJ* za CYN-sintetazu i *anaC* za ATX-sintetazu) nisu amplifikovani.



**Slika 28.** Fotografija agaroznog gela sa PCR produktima nakon amplifikacije gena za MC-sintetazu (*mcyE*) iz biomase jezera Kiš-Balaton (A) i Balaton (B), kao gena za STX-sintetazu (*sxtG*) iz biomase jezera Kiš-Balaton (C) i Balaton (D). L – DNK marker; B – slepa proba; R1 – R3 – referentni sojevi; S – uzorak iz juna (Balaton); S1 – uzorak iz jula (Kiš-Balaton); S2 – uzorak iz septembra (Kiš-Balaton); C – egzogena kontrola amplifikacije.

Ovo je prvi put da su cijanobakterije jezera Balaton i Kiš-Balaton testirane na prisustvo gena za sintetisanje najčešćih cijanotoksina. Gen koji kodira MC-sintetazu (*mcyE*) je nađen na oba lokaliteta, iako su različite vrste bile prisutne (osim vrste *Microcystis aeruginosa*). Ono što je zanimljivo i na ovim lokalitetima jeste da je deo gena za STX-sintetazu (*sxtG*) amplifikovan u uzorku, dok *sxtS* nije amplifikovan. Poznato je da je neophodna ekspresija svih operona koji kodiraju STX-sintetazu kako bi ovaj cijanotoksin bio uspešno sintetisan (Buratti *i sar.*, 2017). Potencijalan uzrok ove pojave može biti nepoklapanje između početnica i date sekvence do kojeg može da dođe u prirodnim populacijama usled većih mutacija poput delecija i insercija u komplementarnom regionu gena.

#### 5.2.4 Prisustvo cijanotoksina u vodi i tkivima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton i Balaton

U jezeru Kiš-Balaton, uočeno je pet strukturnih varijanti MC-a, od kojih je najveću koncentraciju imao MC-LR (Tabela 17). U vodi jezera Balaton nije uočeno prisustvo ni jedne strukturne varijante MC-a (Tabela 17). CYN nije izmeren ni u jednom od pomenuta dva jezera. Akumulacija ni jednog testiranog cijanotoksina nije detektovana u tkivima riba izlovljenih na ova dva lokaliteta.

**Tabela 17.** Prisustvo i koncentracije testiranih strukturnih varijanti MC-a u vodi jezera Kiš-Balaton i Balaton tokom 2018. i 2019. godine.

Strukturna varijanta MC-a (µg/l)	Kiš-Balaton			Balaton
	Jul	Septembar	Jun*	Jun
MC-LR	1,290	0,316	/	/
dmMC-LR	/	/	/	/
MC-RR	0,023	0,015	/	/
dmMC-RR	/	/	/	/
MC-YR	0,051	0,009	/	/
dmMC-YR	/	/	/	/
MC-LF	0,005	/	/	/
MC-LY	/	/	/	/
MC-LW	0,050	/	/	/

\*Uzorkovano u 2019. godini.

U ovoj studiji je prvi put ispitivano prisustvo cijanotoksina u vodi jezera Kiš-Balaton i Balaton. Najveća koncentracija MC-a detektovana u julu 2018. godine se poklapala sa vrhuncem cvetanja cijanobakterija i najvećim brojem ćelija/ml koji je uočen u istom mesecu. Zanimljivo je da se u septembru koncentracija ovog toksina smanjila na četvrtinu vrednosti zabeležene u julu slično broju cijanobakterija koji se takođe smanjio na četvrtinu tokom istog perioda. Gotovo je nemoguće tačno odrediti koja je vrsta ili vrste cijanobakterija odgovorna za produkciju toksina s obzirom da sve beležene vrste rodova *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* i *Microcystis* imaju sposobnost produkcije MC-a. Međutim, kada se detaljnije pogledaju brojevi ćelija pojedinačnih vrsta, samo se broj ćelija vrste *Microcystis flos-aquae* smanjio na četvrtinu u periodu od jula do septembra, dok je kod ostalih vrsta taj broj bio ili veći ili manji. Takođe, geni za MC- i STX-sintetazu su uočeni na oba lokaliteta, a jedino je ova vrsta detektovana na oba lokaliteta. Međutim, vrste roda *Microcystis* nisu dokumentovane da sintetišu STX; produkcija ovog toksina je zabeležena samo kod vrsta rodova *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* (curr. *Raphidiopsis*), *Lyngbya* i *Scytonema* (Wiese i sar., 2010). S obzirom da vrste detektovane u jezeru Kiš-Balaton mogu da proizvode



i druge toksine kao što su ATX-a, BMAA, aeruginozin, cijanopeptolin, mikrociklamid, mikroguanidin, mikroviridin i različiti lipopolisaharidi (Bláha *i sar.*, 2009; Huang i Zimba, 2019; Metcalf i Souza, 2019; Svirčev *i sar.*, 2019), monitoring ovih lokaliteta i detekcija drugih cijanotoksina su veoma važni. Prisustvo gena za MC- i STX-sintetazu dodatno ukazuju na neophodnost redovnog monitoringa s obzirom da prisustvo ovih gena predstavlja latentnu pretnju ukoliko dođe do budućih cvetanja cijanobakterija.

Akumulacija cijanotoksina u tkivima riba izlovljenih na jezerima Kiš-Balaton i Balaton nije detektovana. Ovo je zanimljiv podatak s obzirom da je poznato da omnivorne vrste (sve vrste ispitivane u ovom istraživanju su bile omnivorne) akumuliraju najviše cijanotoksina, čak više i od plaktivornih i fitoplanktivornih (Flores *i sar.*, 2018). Najverovatniji razlog odsustva akumuliranog MC-a u tkivima riba jeste niska koncentracija MC-a u vodi koja nije bila dovoljna da dovede do akumulacije u tkivima, ili tehnički aspekt vezanosti MC-a za PP ili GSH.

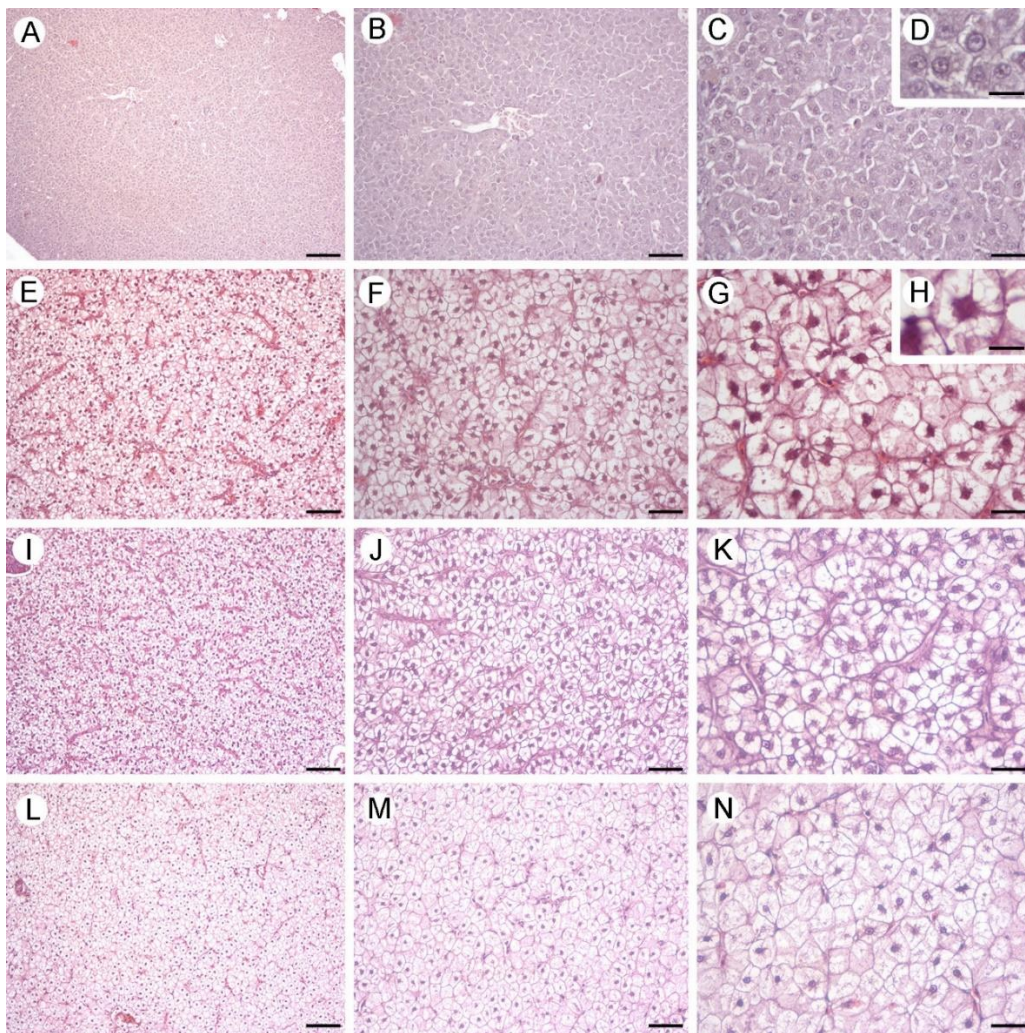
### 5.2.5 *Histopatološke promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton i Balaton*

Tokom čitavog perioda istraživanja, organi različitih vrsta riba (deverika – *Abramis brama*, babuška – *Carassius gibelio* i šaran – *Cyprinus carpio*) izlovljenih na jezerima Kiš-Balaton i Balaton su uzorkovani kako bi se ispitao uticaj cvetanja cijanobakterija na tkiva riba. S obzirom da su sve vrste pripadale istoj porodici (porodici Cyprinidae), da zauzimaju sličan položaj u lancu ishrane, i da nisu uočene nikakve razlike u histopatološkim promenama među vrstama unutar iste sezone (kada je to bilo moguće), rezultati su predstavljeni objedinjeno za sve vrste. Organi kontrolnih riba gajenih na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke su imale normalnu histološku strukturu kao što je prethodno opisano.

#### 5.2.5.1 *Jetra*

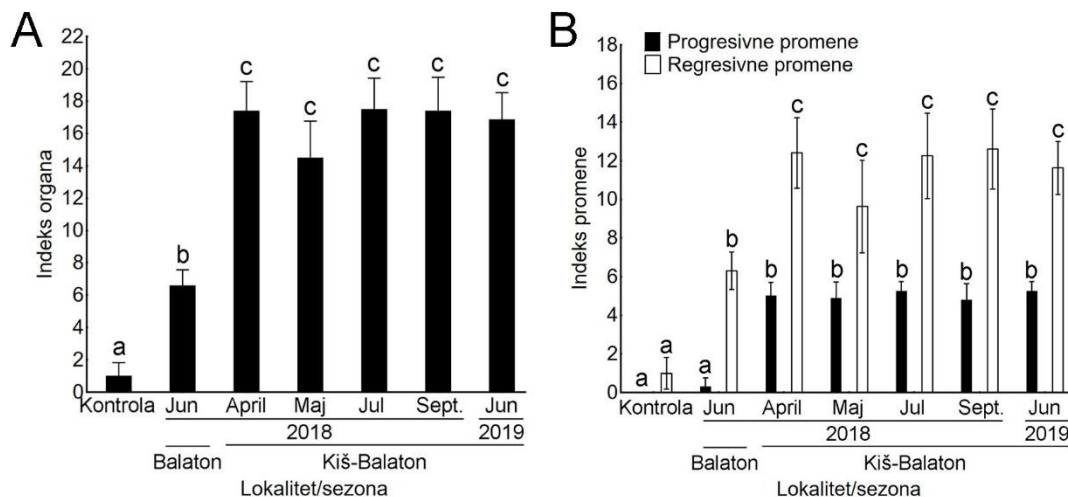
Jedinke iz jezera Balaton i Kiš-Balaton su ispoljile histopatološke promene u tkivu jetre. Kod individua iz jezera Balaton, najizraženija je bila jaka bazofilija citoplazme hepatocita (Slika 29A-D). Zaobljivanje hepatocita i narušena struktura parenhima su takođe primećeni. Jedinke iz jezera Kiš-Balaton su takođe ispoljile intenzivne promene citoplazme hepatocita, međutim, kod njih je bila karakteristična veoma intenzivna vakuolizacija i gubitak glikogena, tako da je citoplazma izgledala gotovo providno (Slika 29E-N). Ovo je dovelo do povećanja veličine

ćelija, tj. do hipertrofije hepatocita (Slika 29G, H, K, N). Narušena struktura parenhima i zaobljavanje hepatocita su očeni, međutim nisu bili intenzivni. Promene su beležene i u jedrima; jedra velikog broja ćelija su bila piknotična sa veoma kondenzovanim jedrom dok jedarca gotovo nije bilo moguće uočiti (Slika 29H). Sve pomenute histopatološke promene su bile ispoljene tokom svih sezona sa veoma sličnim intenzitetom, tako da je odgovor svih vrsta riba na cvetanje bio veoma sličan. Jedina razlika je zabeležena u septembru kada je narušavanje strukture parenhima bilo intenzivnije u odnosu na predhodne sezone.



**Slika 29.** Histološki preseki jetri riba izlovljenih u jezerima Balaton juna 2018. godine (**A-D**) i Kiš-Balaton tokom aprila (**E-H**), septembra 2018. godine (**I-K**) i juna 2019. godine (**L-N**). Najizraženija promena kod jedinki iz jezera Balaton je bila intenzivna bazofilija citoplazme (**A-D**), dok su pojedine ćelije izgubile svoj oblik i postale zaokrugljene (**D**). Jedra su generalno bila nepromenjena (**G**). Najizraženija promena kod jedinki iz jezera Kiš-Balaton je bila intenzivna vakuolizacija, gubitak glikogena i prosvetljenje citoplazme (**E-N**). Ćelije su takođe bile znatno veće od kontrolnih (izražena hipertrofija; **H**), dok su pojedina jedra bila veoma kondenzovana i piknotična (**G**). H&E. Razmera: A, E, I, L – 100 µm; B, F, J, M – 50 µm; C, G, K, N – 25 µm; D, H – 10 µm.

Polukvantitativna analiza je potvrdila deskriptivne rezultate strukture tkiva jetre. Naime, indeks organa koji oslikava ukupne histopatološke promene uočene na organu je bio najveći kod riba izlovljenih na jezeru Kiš-Balaton, bez obzira na sezonu (Tukey's HSD,  $p < 0.01$ ; Slika 30A). Indeksi organa riba sa jezera Balaton su bili nešto niži od riba sa jezera Kiš-Balaton, ali i dalje značajno viši od kontrolnih riba (Tukey's HSD,  $p < 0.01$ ; Slika 30A). Što se tiče progresivnih i regresivnih obrazaca histopatološkog odgovora, regresivne promene su bile znatno veće od progresivnih promena. Oba obrazca su bila znatno veća u jetrama riba izlovljenih u jezeru Kiš-Balaton u poređenju sa kontrolama; progresivne promene su jedva bile uočene u jetrama riba iz jezera Balaton, dok regresivne promene riba iz Balatona su veće od kontrola, ali manje od riba iz jezera Kiš-Balaton (Tukey's HSD,  $p < 0.01$ ; Slika 30B). Posmatrajući indekse najčešćih promena, jasno je da su citoplazmatične promene i hipertrofije bile najučestalije na oba lokaliteta i u svim sezonama (Tabela 18).



**Slika 30.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena nađenih u jetrama riba izlovljenih na jezerima Balaton i Kiš-Balaton kroz koju su predstavljeni (A) ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeksi progresivnih i regresivnih promena koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

**Tabela 18.** Indeksi najčešće beleženih promena jetre kod riba izlovljenih iz jezera Balaton i Kiš-Balaton.

Promene	Kontrola	Balaton	Kiš-Balaton				
		Jun	April	Maj	Jul	Sept.	Jun*
PA	0 <sup>a</sup>	1,30±0,67 <sup>a</sup>	2,20±0,45 <sup>b</sup>	1,25±0,89 <sup>a</sup>	2,00±1,15 <sup>b</sup>	4,80±0,84 <sup>c</sup>	4,00±0,84 <sup>c</sup>
PC	1,00±0,82 <sup>a</sup>	5,00±0,71 <sup>b</sup>	5,80±0,45 <sup>b</sup>	5,00±1,41 <sup>b</sup>	5,75±0,50 <sup>b</sup>	5,40±0,89 <sup>b</sup>	5,62±0,48 <sup>b</sup>
PJ	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4,40±1,67 <sup>b</sup>	3,37±2,07 <sup>b</sup>	4,50±2,52 <sup>b</sup>	2,40±1,67 <sup>a</sup>	2,00±1,63 <sup>a</sup>
HT	0 <sup>a</sup>	0,30±0,45 <sup>a</sup>	5,00±0,71 <sup>b</sup>	4,87±0,83 <sup>b</sup>	5,25±0,50 <sup>b</sup>	4,80±0,84 <sup>b</sup>	5,25±0,50 <sup>b</sup>

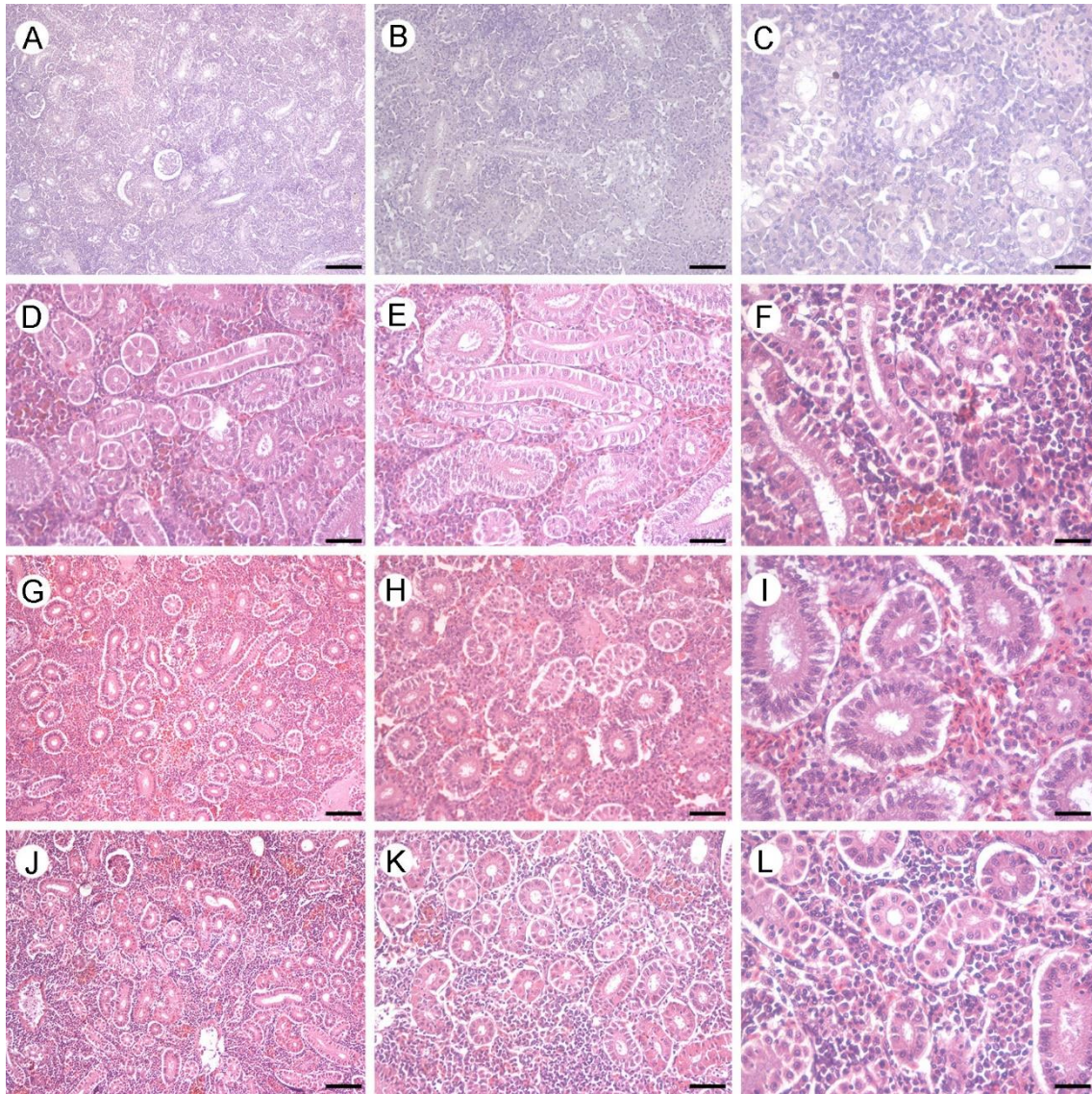
PA – promene arhitekture; CP – promene citoplazme; PJ – promene u jedrima; HT – hipertrofije. \*Uzorkovano tokom 2019. godine. Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

Bazofilija citoplazme koja je uočena u tkivima jetre kod jedinki izlovljenih iz jezera Balaton je često posledica povećane koncentracije mRNK koja se najčešće grupiše u grubom endoplazmatičnom retikulumu ili Goldžijevom aparatu, i ukazuje na pojačanu sintezu proteina koji treba da se uklone iz ćelije (Wester *i sar.*, 2002). Sa druge strane, vakuolizacija citoplazme koja je bila dominantna promena u tkivima jedinki izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton je verovatno rezultat mikrovezikularne akumulacije masti unutar citoplazme. Ova promena može da ukazuje na ozbiljnija oštećenja jetre koja nastaju direktnim uticajem toksina ili kao posledica neravnoteže u ishrani (Thoolen *i sar.*, 2010). S obzirom da je jezero Kiš-Balaton cvetalo tokom celog perioda istraživanja, i da su promene uočene u ovom istraživanju veoma slične promenama beleženim i u drugim studijama, možemo da pretpostavimo da su histopatološke promene jetre najverovatnije posledica kontinualnog cvetanja cijanobakterija na ovom lokalitetu.

#### 5.2.5.2 *Bubreg*

Jedinke iz jezera Balaton i Kiš-Balaton su ispoljile histopatološke promene u tkivu bubrega. Kod jedinki z jezera Balaton, uočene su prvenstveno promene tubula, tj. epitelnih ćelija tubula bubrega (Slika 31A-C). Ćelije pojedinih tubula su bile vakuolizirane, dok su jedra ispoljila karakteristike kariolize s obzirom da je hromatin u nekim slučajevima bio gotovo razgrađen (Slika 31C). U bubrezima jedinki iz jezera Kiš-Balaton su zabeležene slične promene kao i u bubrezima jedinki iz jezera Balaton, samo su bile daleko intenzivnije (Slika 31D-L). Većina epitelnih ćelija i proksimalnih i distalnih tubula je bila vakuolizirana, što je u nekim slučajevima dovelo do odlublivanja od bazalne membrane (Slika 31F, I, L). Oštećenja jedara u obliku kariolize su takođe bila veoma intenzivna i česta (Slika 31F, L). Glomeruli su takođe

ispoljili određen nivo oštećenja; mezengijalne ćelije i viscelarni sloj Boumanove čaure su delovali manji i atrofirani što je dovelo do dilatacije kapsularnog prostora. Sve pomenute histopatološke promene su beležene tokom svih sezona sa veoma sličnim intenzitetom, tako da je odgovor svih vrsta riba na cvetanje bio veoma sličan.

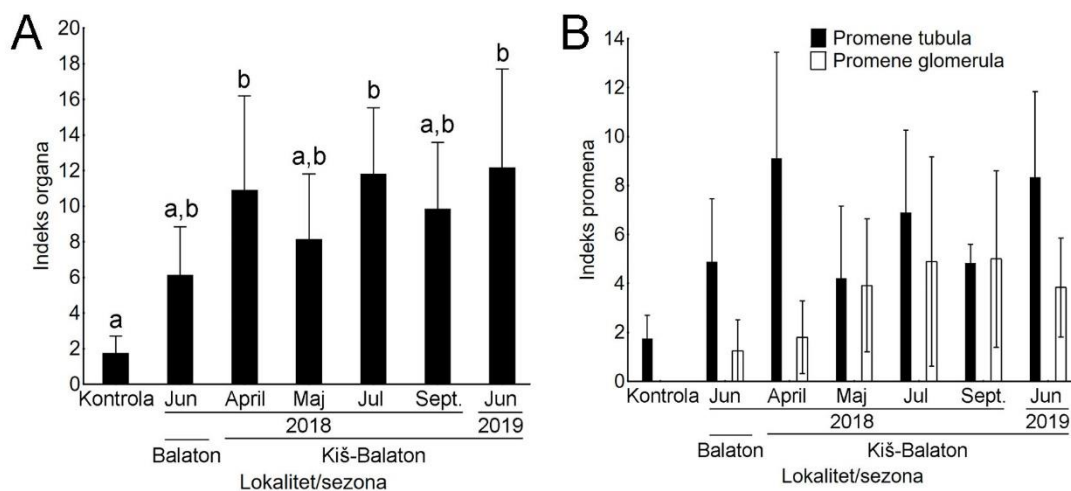


**Slika 31.** Histološki preseki bubrega riba izlovljenih u jezerima Balaton juna 2018. godine (**A-D**) i Kiš-Balaton tokom aprila (**E-H**), septembra 2018. godine (**I-K**) i juna 2019. godine (**L-N**). Kod riba iz jezera Balaton, ćelije tubula su bile vakuolizirane, a jedra su ispoljila znake kariolize (hromatin gotovo razgrađen) (**C**). Kod riba iz jezera Kiš-Balaton su detektovane slične promene, međutim jačeg intenziteta (**D-L**). Vakuolizacije su često dovodile i do odlublivanja od bazalne membrane (**I, L**). Razmera: A, D, G, J – 100  $\mu\text{m}$ ; B, E, H, K – 50  $\mu\text{m}$ ; C, F, I, L – 25  $\mu\text{m}$ .

Indeksi organa riba izlovljenih na jezeru Kiš-Balaton su bili značajno veći od kontrolnih jedinki (Slika 32A; Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Indeksi organa riba iz Kiš-Balatona su takođe bili

veći od indeksa organa riba iz Balatona, međutim jasne statistički značajne razlike nisu uočene. Najveći prosečni indeks su imale ribe izlovljene u julu, što se poklapalo sa najvećim koncentracijama cijanotoksina i najvećim zabeleženim brojem ćelija/ml; međutim, jasne statističke razlike u odnosu na ostale sezone nisu uočene.

Progresivne promene nisu uočene u tkivu bubrega. Indeksi regresivnih promena bubrežnih tubula su bili značajno veći kod riba izlovljenih na jezeru Kiš-Balaton tokom aprila i jula u poređenju sa ostalim sezonama, jedinkama izlovljenih iz Balatona, i kontrolnih jedinki (Slika 32B; Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Indeksi regresivnih promena bubrežnih telašaca nisu bili značajno različiti između lokaliteta i sezona. Odnos između regresivnih promena tubula i bubrežnih telašaca se razlikovao između lokaliteta i sezona. Kod jedinki izlovljenih iz jezera Balaton i Kiš-Balaton tokom aprila, promene unutar tubula su bile znatno veće. Međutim, kod jedinki izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton tokom maja, jula i septembra, indeksi promena tubula i bubrežnih telašaca su bili podjednaki (Slika 32B). Što se tiče pojedinačnih promena, promene arhitekture tubula i bubrežnih telašaca su bile značajno veće kod riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton u poređenju sa kontrolnim ribama, kao i ribama iz jezera Balaton (Tabela 19).



**Slika 32.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočeni u bubrezima riba izlovljenih na jezerima Balaton i Kiš-Balaton kroz koju su predstavljeni (A) ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeks regresivnih promena tubula i indeks promena bubrežnog telašca koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ), dok izostanak slova označava nepostojanje statistički značajnih razlika za dati indeks.

**Tabela 19.** Indeksi najčešće beleženih promena bubrega kod riba izlovljenih iz jezera Balaton i Kiš-Balaton.

Promene	Kontrola	Balaton					
		Jun	April	Maj	Jul	Sept.	Jun*
PAT	1,25±0,50 <sup>a</sup>	1,12±0,63 <sup>a</sup>	3,80±1,04 <sup>b</sup>	3,21±1,22 <sup>a,b</sup>	3,90±1,43 <sup>b</sup>	2,83±0,76 <sup>a,b</sup>	4,33±1,53 <sup>b</sup>
PCT	0,50±0,58	0	2,40±1,52	0,29±0,76	1,60±1,67	0,67±1,15	1,33±1,15
AT	0	0	2,00±1,87	0,57±1,51	0,40±0,89	0	2,33±1,53
PABT	0 <sup>a</sup>	1,00±0,82 <sup>a</sup>	1,40±0,89 <sup>a,b</sup>	2,07±0,84 <sup>b</sup>	1,90±1,02 <sup>b</sup>	1,67±0,58 <sup>a,b</sup>	1,83±0,29 <sup>a,b</sup>
ABT	0	0	0,40±0,89	1,86±2,03	3,00±3,32	3,33±3,05	2,00±2,00

PAT – promene arhitekture tubula; PCT – promene citoplazme ćelija tubula; AT – atrofije tubula; PABT – promene arhitekture bubrežnih telašaca; ABT – atrofije bubrežnih telašaca. \*Uzorkovano tokom 2019. godine. Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ), dok izostanak slova označava nepostojanje statistički značajnih razlika za dati indeks.

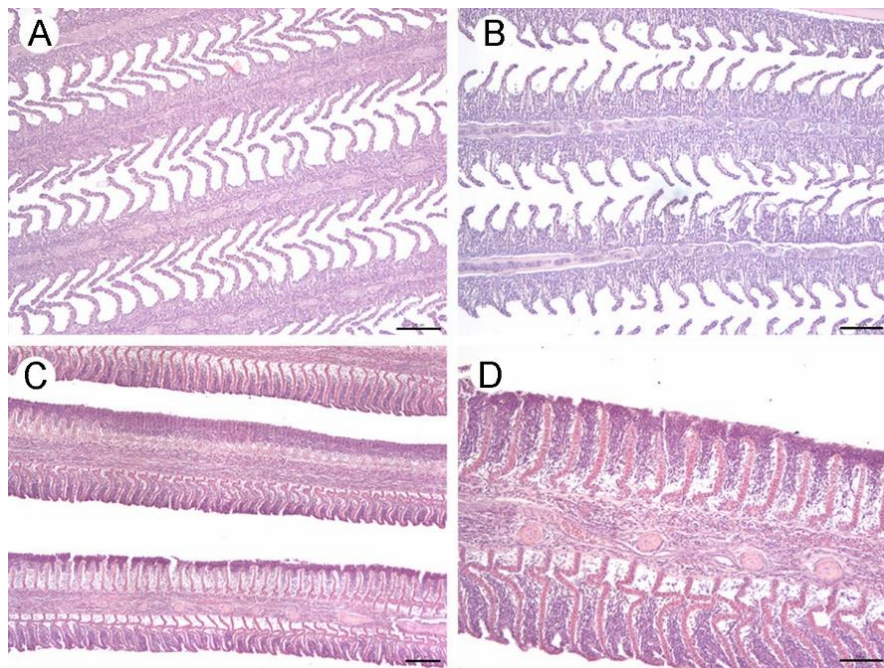
Histopatološke promene na bubrežima riba izlovljenih iz jezera Balaton i Kiš-Balaton su bile slične promenama uočenim i u drugim istraživanjima uticaja cvetanja cijanobakterija na ribe u prirodnim uslovima (Li *i sar.*, 2008; Mitsoura *i sar.*, 2013; Drobac *i sar.*, 2016; Tokodi *i sar.*, 2018), kao i promenama bubrega riba izlovljenih iz jezera Ludaš. S obzirom na sličnosti u histopatološkom odgovoru, ali i u problemu kontinuiranog cvetanja cijanobakterija na jezerima Kiš-Balaton i Ludaš tokom cele godine, može se pretpostaviti da su oštećenja bubrega kod riba sa ovih lokaliteta uzrokovana cvetanjem cijanobakterija tj. cijanotoksinima. Sa druge strane, s obzirom na veoma nizak broj ćelija cijanobakterija, i odsustvo cijanotoksina u jezeru Balaton, oštećenja kod riba ovog jezera verovatno nisu uzrokovana cijanotoksinima. Međutim, s obzirom da su geni za sintezu pojedinih cijanotoksina detektovani, a da u prirodnim ekosistemima vladaju veoma kompleksni odnosi, ne može se u potpunosti isključiti postojanje strukturalnih varijanti MC-a koje nisu detektovane, a koje su potencijalno proizvedene u periodu koji nije bio istraživani prilikom izrade disertacije, a koje mogu predstavljati opasnost po zdravlje akvatičnih organizama.

### 5.2.5.3 Škrge

U škragama jedinki izlovljenih iz jezera Balaton su beležene blage histopatološke promene kao što su blaga hipertrofija epitelnih ćelija i retke hiperemije (Slika 33A, B). U škragama riba iz jezera Kiš-Balaton su zabeležene intenzivnije promene. Najistaknutija promena koja je bila zabeležena kod gotovo svih riba jezera Kiš-Balaton tokom svih sezona je

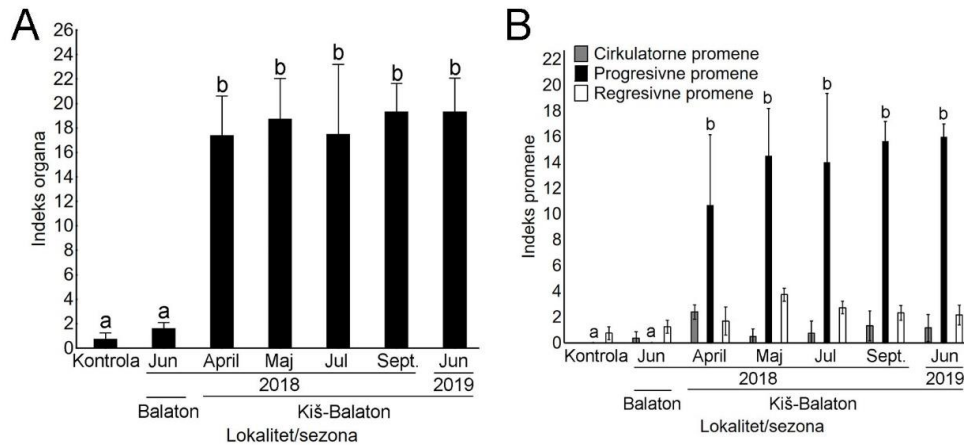
hiperplazija interlamelnog epitela koji je vrlo često dovela do potpunih fuzija sekundarnih lamela (Slika 33C, D). Proliferacija interlamelnog epitela se neretko pojavljivala zajedno sa odlubljivanjem epitela i hipertrofijom epitelnih ćelija. Hiperemija koju karakteriše pojačana prokrvljenost sekundarnih lamela je takođe bila česta. Sve pomenute histopatološke promene su beležene tokom svih sezona sa veoma sličnim intenzitetom, tako da je odgovor svih vrsta riba na cvetanje koje je beleženo tokom svih sezona bio veoma sličan.

Indeksi organa kod jedinki izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton su bili značajno veći od riba izlovljenih iz Balatona i kontrolnih riba (Slika 34A; Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Razlike između sezona nisu uočene. Indeksi organa riba iz jezera Balaton su bili veoma niski i veoma slični kontrolnim jedinkama. Što se tiče specifičnih promena, samo su progresivne promene kod riba iz jezera Kiš-Balaton bile značajno veće od kontrole (Slika 34B; Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ). Prema indeksima pojedinačnih promena, najintenzivnije promene su bile hipertrofije i hiperplazije epitela kod riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton (Tabela 20) što potvrđuje rezultate deskriptivne analize.



**Slika 33.** Histološki preseki bubrega riba izlovljenih u jezerimu Balaton (**A, B**) i Kiš-Balaton (**C, D**). Riba sa jezera Balaton su pokazale strukturu sličnu kontrolnim ribama. Glavna promena kod riba sa jezera Kiš-Balaton bila proliferacija interlamelnog epitela i fuzije lamela, sa veoma izraženim edemom primarnog epitela. H&E. Razmera: A, B, D – 100  $\mu\text{m}$ ; C – 200  $\mu\text{m}$ .





**Slika 34.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočeni u škragama riba izlovljenih na jezerima Balaton i Kiš-Balaton kroz koju su predstavljeni (A) ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeksi progresivnih i regresivnih promena koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ), dok izostanak slova označava nepostojanje statistički značajnih razlika.

**Tabela 20.** Indeksi najčešće beleženih promena škrga kod riba izlovljenih iz jezera Balaton i Kiš-Balaton.

Promene	Kontrola	Balaton					
		Jun	April	Maj	Jul	Sept.	Jun*
H/A	0 <sup>a</sup>	0,37±0,48 <sup>a</sup>	2,40±0,55 <sup>b</sup>	0,50±0,58 <sup>a</sup>	0,75±0,96 <sup>a</sup>	1,33±1,15 <sup>a,b</sup>	1,67±1,04 <sup>a,b</sup>
PAE	0,75±0,50 <sup>a</sup>	1,25±0,50 <sup>a</sup>	1,70±1,09 <sup>a</sup>	3,75±0,50 <sup>b</sup>	2,75±0,50 <sup>a,b</sup>	2,33±0,58 <sup>a,b</sup>	2,17±0,76
HTE	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2,70±0,84 <sup>b</sup>	3,75±1,26 <sup>b</sup>	3,75±1,26 <sup>b</sup>	4,33±0,58 <sup>b</sup>	3,67±0,58 <sup>b</sup>
HPE	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	9,60±2,60 <sup>b</sup>	10,25±2,36 <sup>b</sup>	9,00±3,46 <sup>b</sup>	10,67±1,15 <sup>b</sup>	11,00±1,00 <sup>b</sup>
HPP	0	0	0,80±1,09	0,50±1,00	1,25±1,50	0,67±1,15	1,33±1,15

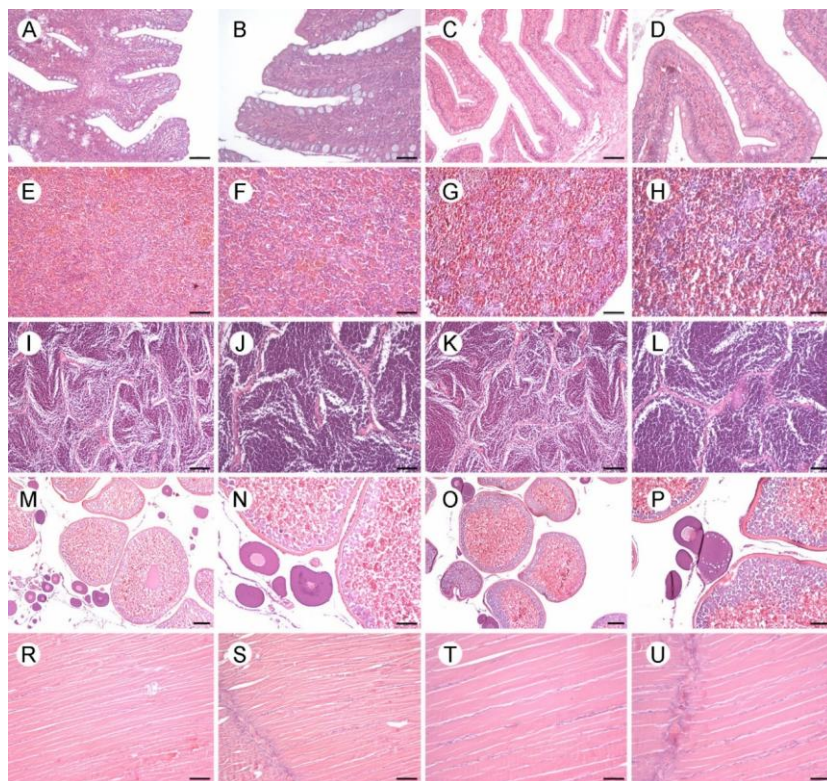
H/A – hiperemije/aneurizme; PAE – promene erhitekture epitela; HTE – hipertrofije epitela; HPE – hiperplazije epitela; HPP – hiperplazije potpornih ćelija. \*Uzorkovano tokom 2019. godine. Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ), dok izostanak slova označava nepostojanje statistički značajnih razlika za dati indeks.

Mnoge promene uočene na škragama riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton, a prvenstveno intenzivne hiperplazije epitela, su opisane i u drugim istraživanjima uticaja cvetanja cijanobakterija na tkiva riba u prirodnim uslovima (Svirčev *i sar.*, 2015; Drobac *i sar.*, 2016; Tokodi *i sar.*, 2018), kao i kod riba izlovljenih na jezeru Ludaš. Kao što je prethodno opisano, hiperplazije i odlublivanje epitela predstavljaju odbambeni mehanizam škrga koji otežavaju prodor toksičnih materija u krvotok (Lujčić *i sar.*, 2015), i ove promene su među prvim koje se uočavaju na škragama. Najčešće su markeri akutnog delovanja, te javljanje ove

promene na lokalitetima sa veoma intenzivnim cvetanjem mogu da ukažu da delovanje cijanotoksina, ali takođe mogu ukazivati i na dugotrajno izlaganje određenim toksinima. Odsustvo intenzivnijih promena kod riba izlovljenih iz jezera Balaton ukazuje na prevashodno pogodnije uslove i manje koncentracije toksina u ovom ekosistemu.

#### 5.2.5.4 *Ostali organi*

U crevima (Slika 35A-D), slezini (Slika 35E-H), testisima (Slika 35I-L), ovarijumima (Slika 35M-P) i mišićima (Slika 35R-U) riba iz jezera Balaton i Kiš-Balaton nisu uočene značajne histopatološke promene, i struktura ovih organa je bila slična strukturi kontrolnih jedinki. I na lokalitetu Kiš-Balaton je zapažena slična histološka slika kao i na jezeru Ludaš; jetre, bubrezi i škrge su iskazali znatne histopatološke promene, dok u ostalim organima nisu beležene značajne promene. Uzrok ovakvih razlika u odgovoru organa nije poznat, ali najverovatnije ima veze sa prisustvom različitih tipova nosača za cijanotoksine u različitim organima, ili cijanotoksini i njihove strukturne varijante drugačije deluju na pomenute organe.

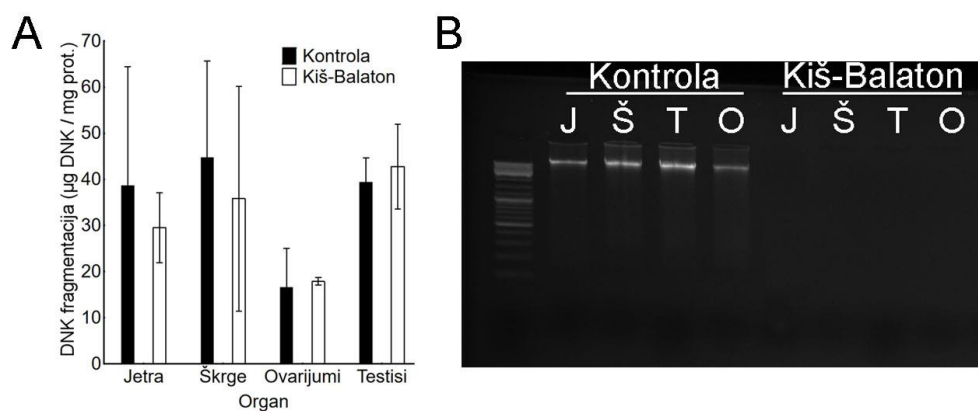


**Slika 35.** Histološki preseći ostalih analiziranih organa. Preseći creva riba iz jezera Balaton (A, B) i Kiš-Balaton (C, D). Preseći slezine riba iz jezera Balaton (E, F) i Kiš-Balaton (G, H). Preseći testisa riba iz jezera Balaton (I, J) i Kiš-Balaton (K, L). Preseći ovarijuma riba iz jezera Balaton (M, N) i Kiš-Balaton (O, P). Preseći mišića riba iz jezera Balaton (R, S) i Kiš-Balaton (T, U). H&E. Razmera: M, O – 200  $\mu\text{m}$ ; A, C, I, K, N, P – 100  $\mu\text{m}$ ; B, D, E, G, J, L, R-U – 50  $\mu\text{m}$ ; F, H – 25  $\mu\text{m}$ .

## 5.2.6 Molekularne i biohemijske promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton

### 5.2.6.1 Analize oštećenja DNK

Fragmentacija DNK nije uočena ni u jednom analiziranom organu riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton tokom 2019. godine (Slika 36A). Što se analize ukupnih metilacija tiče, analiza nije mogla uspešno da se izvrši s obzirom da je DNK bila degradirana i nije mogla da se izmeri ni pomoću gel-elektroforeze (Slika 36B) ni pomoću NanoDrop aparata.



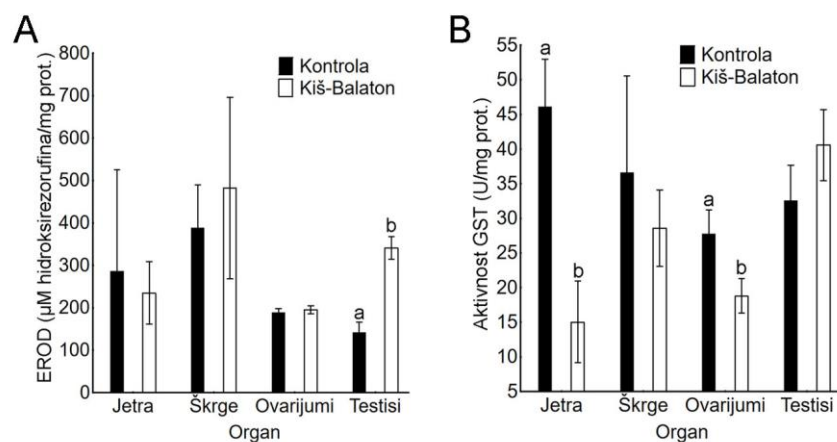
**Slika 36.** Analize oštećenja DNK pojedinih organa riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton tokom 2019. godine. **(A)** Fragmentacija DNK. Nedostatak slova iznad stubića označava nepostojanje statistički značajnih razlika za dati organ (jednofaktorska ANOVA,  $p < 0.05$ ). **(B)** Gel-elektroforeza izolovane DNK iz jetre (J), škrge (Š), testisa (T) i ovarijuma (O).

Cijanotoksini, a pogotovo MC, mogu da uzrokuju genotoksičnost izazivajući mutacije ili fragmentaciju DNK (Buratti *i sar.*, 2017). Fragmentacije DNK usled dejstva MC-a su pokazane kod sisara (Rao i Bhattacharya, 1996; Gupta *i sar.*, 2003; Rao *i sar.*, 2005; Gaudin *i sar.*, 2008), ali i kod riba (Tokodi *i sar.*, 2018). Međutim, odsustvo oštećenja DNK može biti usled niskih koncentracija cijanotoksina, ili usled određenih fizioloških procesa zbog kojih je došlo do drugih oštećenja unutar tkiva, ali ne i lezija DNK. Potencijalna genotoksičnost najverovatnije nije posledica direktnog delovanja cijanotoksina, već nastaje indirektno delovanjem ROS-a oksidativnom lezijom DNK ili inhibicijom DNK-zavisne protein kinaze (Buratti *i sar.*, 2017).

### 5.2.6.2 Aktivnost enzima biotransformacije

Aktivnost enzima CYP1A je bila veća kod riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton tokom 2019. godine u poređenju sa kontrolom jedino u testisima, dok u ostalim organima nije uočena značajna promena (Slika 37A). Što se tiče GST, značajno niže vrednosti su izmerene u jetri i ovarijumima riba iz jezera Kiš-Balaton (Slika 37B).

Enzim CYP1A spada u enzime I faze biotransformacije. Pojačana aktivnost ovog enzima je izmerena u jetri i škragama pojedinih riba izloženih cijanotoksinima (Garcia i Martinez, 2012; Li *i sar.*, 2013; Isibor, 2017), dok u ovom istraživanju nije bila izmerena promena u aktivnosti ovog enzima u ova dva organa. Glavni mehanizam biotrasformacije MC-a jeste preko enzima faze II biotransformacije, i to stvaranjem konjugata sa GSH pomoću GST-a. Smanjena aktivnosti ovog enzima je izmerena u jetri i ovarijumima riba iz jezera Kiš-Balaton se poklapa sa drugim istraživanjima delovanja cijanotoksina na ribe (Guzmán-Guillén *i sar.*, 2013; Hou *i sar.*, 2015; Calado *i sar.*, 2017; Paulino *i sar.*, 2020). Razlike u aktivnosti enzima biotransformacije mogu biti posledica delovanja cijanotoksina, a njihova inhibicija ili aktivacija zavise od samog cijanotoksina koji deluje na organizam.



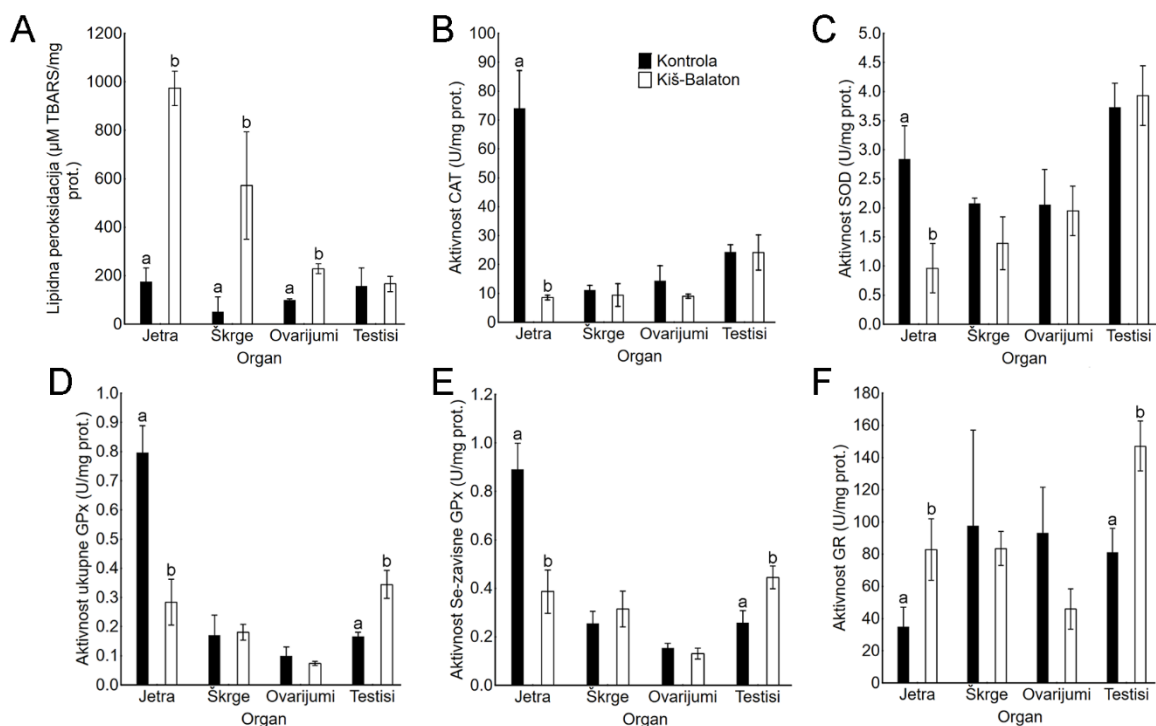
**Slika 37.** Aktivnost CYP1A (EROD; **A**) i GST (**B**) kontrolnih riba i riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati organ (jednofaktorska ANOVA,  $p < 0.05$ ), dok izostanak slova označava nepostojanje statistički značajnih razlika za dati organ.

### 5.2.6.3 Parametri oksidativnog stresa

Svi organi sem testisa riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton tokom juna 2019. godine su pokazali visoke nivoe lipidne peroksidacije (Slika 38A). Najviši nivoui su izmereni u jetri i škragama. Aktivnost CAT (Slika 38B) i SOD (Slika 38C) su bile značajno niže u jetrama riba iz jezera Kiš-Balaton, dok u ostalim organima nije izmerena značajna razlika. Što se tiče

aktivnosti totalne (Slika 38D) i Se-zavisne GPx (Slika 38E), značajno manja aktivnost je izmerena u jetri, dok je značajno veća aktivnost izmerena u testisima. Povećana aktivnost GR je izmerena u jetri i testisima riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton (Slika 38F).

Jedan od glavnih načina delovanja cijanotoksina i izazivanja oštećenja u ćelijama i organizmu jeste uzrokovanjem pojačane produkcije slobodnih radikala i izazivanjem oksidativnog stresa. Kada dođe do intenzivne produkcije ROS-a, ovi molekuli počinju da se vezuju za proteine, lipide i nukleinske kiseline i izazivaju oštećenja. LPO predstavlja vezivanje peroksida za lipide, najčešće membrane, gde uzrokuju disbalanse u fluksu jona, permeabilnosti i strukture membrane (Martins *i sar.*, 2017). Povećan nivo LPO se često javlja kao posledica delovanja cijanotoksina, i može se uočiti u jetri (Prieto *i sar.*, 2006, 2007; Atencio *i sar.*, 2008; Jiang *i sar.*, 2011; Hou *i sar.*, 2015; Lin *i sar.*, 2018), bubrezima (Prieto *i sar.*, 2006, 2007) i škragama (Prieto *i sar.*, 2006, 2007) riba nakon izlaganja cijanotoksinima (prvenstveno MC-u). Značajno povećanje LPO izmereno u ovom istraživanju se poklapa sa pomenutim istraživanjima i ukazuje na oksidativni stres u jetri, škragama i ovarijumima riba izlovljenim iz jezera Kiš-Balaton.



**Slika 38.** Lipidna peroksidacija (A) i aktivnost CAT (B), SOD (C), totalne GPx (D), Se-zavisne GPx (E) i GR (F) kontrolnih riba i riba izlovljenih iz jezera Kiš-Balaton. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati organ (jednofaktorska ANOVA,  $p < 0.05$ ), dok izostanak slova označava nepostojanje statistički značajnih razlika za dati organ.

SOD je enzim koji aktivno traga za superoksidnim jonom i pretvara ga u molekul kiseonika i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Smanjenje aktivnosti ovog enzima u jetri se poklapa sa pojedinim studijama izlaganja riba cijanotoksinima (Prieto *i sar.*, 2007; Atencio *i sar.*, 2008; Martins *i sar.*, 2017; Paulino *i sar.*, 2020), međutim, određeni broj studija govori i o povećanju aktivnosti ovog enzima nakon izlaganja cijanotoksinima (Jos *i sar.*, 2005; Prieto *i sar.*, 2006; Chen *i sar.*, 2012; Garcia i Martinez, 2012; Hou *i sar.*, 2015). Uzrok ovakvih razlika nije jasan i može biti rezultat delovanja različitih cijanotoksina u različitim koncentracijama, ali može biti i specifično za datu vrstu ribe. U škragama i gonadama nije došlo do značajne promene u aktivnosti ovog enzima, što ukazuje i na razlike u odgovoru različitih organa na oksidativni stres.

CAT i GPx su enzimi koji metabolišu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i lipidne perokside (GPx). U ovom istraživanju su izmerene značajno manje aktivnosti oba enzima u jetri u poređenju sa kontrolom. Slično su zabeležili i Prieto *i sar.* (2007), Atencio *i sar.* (2008), Perendija *i sar.* (2011), Chen *i sar.* (2012) i Hou *i sar.* (2015). GPx redukuje perokside oksidujući glutation time stvarajući njegovu oksidovanu formu. Aktivost GR-a je neophodna kako bi se oksidovana forma ovog enzima ponovo redukovala. U ovom istraživanju je uočena pojačana aktivnost GR-a u jetri i testisima ukazujući na povećanu potrebu za sintetisanjem GSH u ova dva organa. Povećana aktivnost GR-a u jetri nakon izlaganja riba cijanotoksinima je zabeležena i u drugim studijama (Jos *i sar.*, 2005; Prieto *i sar.*, 2006, 2007; Chen *i sar.*, 2012).

Intenzivna LPO, kao i promene u aktivnosti antioksidativnih enzima ukazuju da su ribe izlovljene iz jezera Kiš-Balaton izložene oksidativnom stresu. S obzirom da su se najveće promene desile u jetri, ovaj organ je verovatno osetljiviji ka oksidativnom stresu u poređenju sa škragama i gonadama. Promene u aktivnosti antioksidativnih enzima slične onim zabeleženim u ovom istraživanju se često javljaju kod riba izloženim cijanotoksinima. Međutim, odgovor antioksidativnih enzima na delovanje cijanotoksina nije uniforman. Smatra se da je aktivnost ovih enzima najčešće inhibisana tokom akutnog delovanja većih koncentracija cijanotoksina, dok dugotrajno hronično izlaganje najčešće dovodi do aktivacije ovih enzima kao rezultat odbrambenog sistema (Atencio *i sar.*, 2008). U ovom istraživanju je uglavnom uočena inhibicija aktivnosti antioksidativnih enzima potencijalno ukazujući na akutno delovanje. S obzirom da tokom juna 2019. godine nije izmereno prisustvo MC-a ni CYN-a, moguće je da su u vodi bile prisutne strukturne varijante MC-a koje nisu bile analizirane tokom ovog istraživanja, ili neki drugi zagađivači koji takođe mogu da izazivaju oksidativni stres.

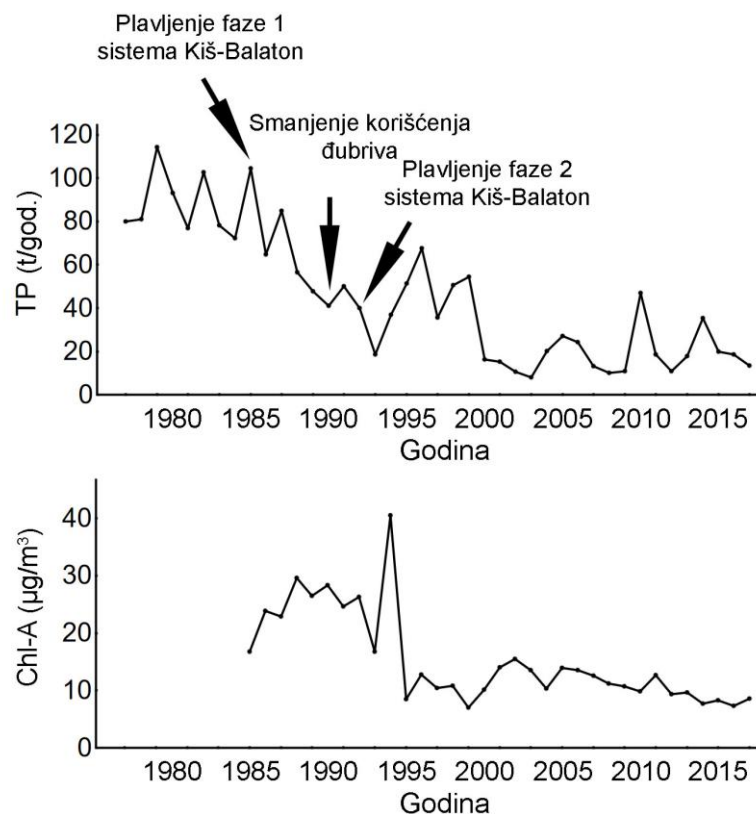
### 5.2.7 Uloga jezera Kiš-Balaton u zaštiti kvaliteta vode jezera Balaton

Ponovno plavljenje jezera Kiš-Balaton je počelo tokom 1980-ih godina kada je organsko opterećenje postalo veliko usled antropogenih aktivnosti i kada je kvalitet vode jezera Balaton bio znatno narušen (Hatvani *i sar.*, 2014, 2020). Glavni cilj ponovnog plavljenja jezera Kiš-Balaton je bilo da se opet oživi njegova uloga u filtriranju upliva vode reke Zala i na taj način smanji organsko opterećenje samog jezera Balaton.

Istraživanja o promenama trofičkog stanja i organskog opterećenja vode jezera Balaton tokom prethodnih nekoliko decenija ukazuju na postojanje nekoliko ključnih momenata i perioda koji su uticali na kvalitet vode jezera. Jedan od ključnih momenata je 1994. godina koja predstavlja prekretnicu u pogledu koncentracija hlorofila-a i ukupnog fosfora (Slika 39; Hatvani *i sar.*, 2020). U ovom trenutku dolazi do jasnog pada u prosečnim godišnjim vrednostima hlorofila-a, ukupnog azota, ukupnog fosfora i rastvorenog reaktivnog fosfora (Istvánovics *i sar.*, 2007; Hatvani *i sar.*, 2014, 2020). Koncentracije hlorofila-a su se smanjile za oko 60% u svima basenima. U periodu od 1985. god. do 1994. god. dolazi do jasnog smanjenja i ukupnog fosfora i rastvorenog reaktivnog fosfora (Hatvani *i sar.*, 2020) samo u zapadnim basenima (Kesthej i Sigliget), a prvenstveno u basenu Kesthej. Poboljšanje kvaliteta vode ovog basena je direktno povezano sa smanjenjem upliva organskih materija iz reke Zala i sa preduzetim merama kao što su izgradnja KBWPS-a i postavljanje fabrika za prečišćavanje fosfora iz otpadnih voda (Istvánovics *i sar.*, 2007; Hatvani *i sar.*, 2014, 2020). U periodu od 1995. do 2003. godine parametri zapadnih basena se ne menjaju, dok u istočnim dolazi do blagog povećanja hlorofila-a, dok u periodu od 2004 do 2017. godine dolazi do dodatnog smanjenja koncentracije hlorofila-a (Hatvani *i sar.*, 2020). Ovi podaci pokazuju da je do poboljšanja kvaliteta vode u zapadnim basenima (pogotovo basenu Kesthej u koji se direktno uliva reka Zala) došlo odmah nakon izgradnje KBWPS-a i sprovođenja ostalih mera, dok je za poboljšanje kvaliteta istočnih basena trebalo oko 10 godina. Ovo kašnjenje može da se objasni činjenicom da jezerima generalno treba više vremena da reaguju na smanjenje eksternog organskog opterećenja (Sas, 1990), ali i da smanjenjem eksternog opterećenja kvalitet vode počinje značajno da zavisi of internog organskog opterećenja i resuspenzije-desorpcije materija iz/u sediment (Clement *i sar.*, 1998). Što se tiče prostorne komponente jezera Balaton, očigledno je postojanje trofičkog gradijenta gde su zapadni baseni, pogotovo basen 1 veoma eutrofni, a istočni baseni, pogotovo basen 4 su manje eutrofni. U periodu of 1985-1994, zapadni baseni (baseni 1 i 2) su bili hipereutrofni, dok su istočni baseni (baseni 3 i 4) bili eutrofni/mezotrofni. Nakon 1994. godine dolazi do smanjenja trofičkog statusa i zapadni baseni

postaju eutrofni, dok istočni baseni postaju dominantno mezotrofni sa pojedinim oligotrofnim karakteristikama (u odnosu na koncentracije hlorofila-a) (Hatvani *i sar.*, 2020).

S obzirom da je došlo do značajnog smanjenja upliva organskog opterećenja u jezero Balaton u poslednjih nekoliko godina, kvalitet vode dominantno zavisi od internog opterećenja i hidrometeoroloških parametara (Hatvani *i sar.*, 2020). Usled klimatskih promena, reka Zala trenutno nije stalna pritoka, i ona utiče u jezero samo tokom zimskih i prolećnih meseci, te njen uticaj na kvalitet vode postaje limitiran. Stoga, glavni izvori organskog opterećenja pored internog opterećenja jesu difuzni zagađivači kao što su kanalizacione otpadne vode, kao i otpadne vode koje potiču sa farmi domaćih životinja ili sa okolnog poljoprivrednog područja. Ovu činjenicu je dodatno potvrdilo istraživanje koje su sprovedeli Sebestyén *i sar.* (2017) koje pokazuje da unutrašnji baseni (Sigliget i Semeš) imaju najveću koncentraciju ukupnih fosfata, ortofosfata i nitrata, čak veću od basena Kesthej. Međutim, ova činjenica ne oduzima od značaja izgradnju sistema Kiš-Balaton, jer prisustvo ovog područja i dalje znatno smanjuje upliv eksternog organskog opterećenja u Balaton.



**Slika 39.** Prosečne godišnje koncentracije ukupnog fosfora (TP) i hlorofila-a (Chl-A) u sva četiri basena jezera Balaton. Slika zasnovana na podacima i slici iz Hatvani *i sar.* (2020) uz odobrenje izdavača.



### 5.3 Jezero Fehervarčurgo

#### 5.3.1 Fizičko-hemijski parametri vode jezera Fehervarčurgo

Tokom istraživanja, pojedini ispitivani fizičko-hemijski parametri vode su bili van graničnih vrednosti predloženih Uredbom Vlade Republike Mađarske (“Governmental Decree No 10/2010. (VIII. 18.) of Ministry of Rural Development (VM) on defining the rules for establishment and use of water pollution limits of surface water.”, 2010) (Tabela 21). pH je tokom prolećnih meseci bio alkaln, i veći od predviđenih graničnih vrednosti. Količina kisonika i saturacija su sa druge strane tokom septembra bili manji od predviđenih smernica. Koncentracije azotnih jedinjenja su bile unutar predviđenih okvira, dok je nivo ortofosfata bio daleko veći, pogotovo tokom aprila kada višestruko premašuje propisanu vrednost.

**Tabela 21.** Fizičko-hemijski parametri vode uzorkovane iz jezera Fehervarčurgo tokom 2018. godine.

Fizičko-hemijski parametar	April	Maj	Jul	Septembar	Granične vrednosti <sup>1</sup>
Temperatura (°C)	16,2	26,1	24,3	14,3	/
Elektroprovodljivost (μS/cm)	717	731	734	711	800
pH	9,06	9,59	8,78	8,51	9
Saturacija (%)	144,4	172	121,3	45,5	80
O <sub>2</sub> (mg/l)	13,89	13,77	9,98	6,12	7.5
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	<1	<1	<1	<1	0.06
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	0,02	0,03	<0,01	<0,01	/
NH <sub>4</sub> -N (mg/l)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0.05
PO <sub>4</sub> -P (mg/l)	>5	<0,2	0.3	0.2	0.01

<sup>1</sup>Granične vrednosti predložene Uredbom Vlade Republike Mađarske.

Visoka alkalnost vode, kao i visoka koncentracija O<sub>2</sub> su često povezani sa cvetanjem cijanobakterija (Carvalho *i sar.*, 2011; Burdick *i sar.*, 2020a, 2020b). Visoke vrednosti ovih parametara su najčešće posledica povećane fotosintetičke aktivnosti cijanobakterija koja se javlja usled uklanjanja CO<sub>2</sub> iz vode (Axelsson, 1988). Međutim, nije u potpunosti jasno povećanje pH i koncentracije O<sub>2</sub> tokom aprila kada je broj cijanobakterija bio najmanji, i skoro 20 puta manji od izmerenog maksimuma u julu, te je moguće da je uzrok ovog povećanja nezavistan od koncentracije cijanobakterija.

Što se neorganskih jedinjenja tiče, prethodno je opisano da su azot i fosfor glavni limitirajući nutrijenti za rast i proliferaciju cijanobakterija (Conley *i sar.*, 2009). S obzirom da su ortofosfati glavni nutrijent koji omogućava proliferaciju cijanobakterija (Schindler, 1974; Jeppesen *i sar.*, 2005; Fastner *i sar.*, 2016), naglo smanjenje koncentracije ovog nutrijenta u maju u odnosu na april je najverovatnije posledica gotovo desetostrukog uvećanja broja cijanobakterija koji se desio u ovom periodu (Tabela 22).

### 5.3.2 Sastav zajednice cijanobakterija jezera Fehervarčurgo

Tokom celog perioda istraživanja detektovano je samo 6 vrsta cijanobakterija (Tabela 22). Vrsta *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault i obe vrste roda *Microcystis* su nađene tokom svih sezona. *Aphanizomenon flos-aquae* je bila najzastupljenija vrsta sa najvećim brojem ćelija/ml. Broj ćelija je bio najniži u aprilu, dok je taj broj bio čak desetostruko veći u maju kada je počelo intenzivnije cvetanje cijanobakterija. Pik cvetanja je bio tokom jula kada je detektovan najveći broj ćelija, dok je taj broj počeo da se smanjuje u septembru. Tokom svih sezona, broj ćelija je prevazilazio 10000 ćelija/ml što ukazuje na cvetanje cijanobakterija (Falconer, 1998).

**Tabela 22.** Kvalitativni i kvantitativni sastav zajednice cijanobakterija jezera Fehérvárcsurgó u 2018. godini.

Takson cijanobakterija	April	Maj	Jul	Septembar
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> Ralfs ex Bornet & Flahault	93.500	970.000	2.124.000	1.110.000
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> (Usachev) Rajaniemi <i>i sar.</i>	-	75.000	287.600	189.000
<i>Dolichospermum flos-aquae</i> (Brébisson ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffman i Komárek	-	4.200	15.200	12.100
<i>Microcystis flos-aquae</i> (Wittrock) Kirchner	1.100	158.000	205.700	162.000
<i>Microcystis wesenbergii</i> (Komárek) Komárek ex Komárek	10.800	46.000	158.300	154.000
<i>Snowella litoralis</i> (Häyrén) Komárek & Hindák	-	-	31.200	11.800
<b>Σ</b>	<b>165.400</b>	<b>1.418.600</b>	<b>2.822.000</b>	<b>1.638.900</b>

Broj cijanobakterija je predstavljen kao broj ćelija/ml.

Kao i kod većine slatkovodnih ekosistema, i u jezeru Fehervarčurgo je došlo do promene u sastavu zajednice cijanobakterija tokom sezona. Tokom marta su detektovane samo vrste *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* i *M. wesenbergii*, dok je tokom ostalih sezona detektovano svih 6 vrsta. *A. flos-aquae* koja je dominirala tokom celog perioda

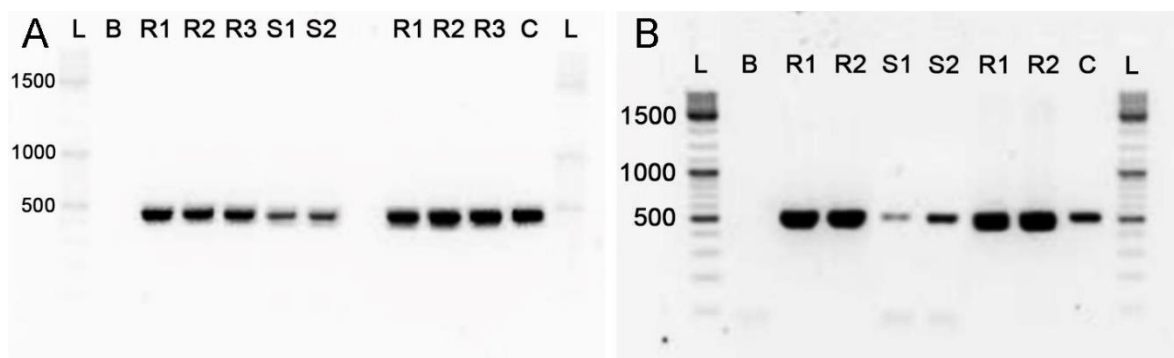
istraživanja je jedna od najčešće beleženih vrsta cijanobakterija u slatkovodnim ekosistemima. Vrste roda *Microcystis* se takođe veoma često nalaze u slatkovodnim ekosistemima, i poznato je da su najčešće među glavnim vrstama koje cvetaju u eutrofnim jezerima (Svirčev *i sar.*, 2019). Vrste detektovane u jezeru Fehervarčurgo imaju globalnu distribuciju (Svirčev *i sar.*, 2019), međutim, vrsta *M. wesenbergii* je češće beležena u Kini nego u Evropi (Xu *i sar.*, 2008).

Tokom maja i jula, tri vrste su se pojavile u zajednici cijanobakterija, *Cuspidothrix issatschenkoi* (sinonim: *Aphanizomenon issatschenkoi*), *Dolichospermum flos-aquae* (sinonim: *Anabaena flos-aquae*) i *Snowella litoralis*. *C. issatschenkoi* se retko javlja u slatkovodnim ekosistemima severnog umerenog pojasa, za razliku od južnog umerenog pojasa gde je mnogo češći (Ballot *i sar.*, 2018). Ova vrsta je autohtona na dalekom istoku, posebno u Japanu, dok se u Evropi smatra za invazivnu vrstu koja ubrzano širi areal rasprostranjenja (Hodoki *i sar.*, 2012). Ova vrsta je poznata po svojoj sposobnosti da sintetiše ATX-a, HATX-a i STX u jezerima Japana, Kine, Novog Zelanda, Portugala i Nemačke, te je njen pronalazak u Mađarskoj veoma interesantan. Vrste roda *Snowella* se najčešće beleže u jezerima centralne Evrope i Skandinavije sa vrlo niskom brojnošću i malom biomasom, dok je njihovo masovnije prisustvo tokom cvetanja veoma retko (Rajaniemi-Wacklin *i sar.*, 2006). Ova cijanobakterija je najčešće prisutna u jezerima tokom kasnog leta i jeseni (Rajaniemi-Wacklin *i sar.*, 2006), kao što je bio slučaj i u ovom istraživanju.

### 5.3.3 Prisustvo cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi cijanobakterija jezera Fehervarčurgo

Gen klastera za MC-sintetazu (*mcyE*; Slika 40A) kao i gen klastera za STX-sintetazu (*sxtG*; Slika 40B) su detektovani u biomasi cijanobakterija jezera Fehervarčurgo tokom jula i septembra. Drugi testirani gen za STX-sintetazu (*sxtS*), gen za CYN-sintetazu (*cyrJ*) i gen za ATX-sintetazu (*anaC*) nisu amplifikovani.

Ovo je prvi put da su cijanobakterije jezera Fehervarčurgo, ali i generalno ekosistema Mađarske, testirani na prisustvo gena za sintetisanje najčešćih cijanotoksina. Prisustvo gena koji kodira MC-sintetazu nije iznenađujuće s obzirom da je ovaj gen detektovan kod sojeva vrste *Aphanizomenon flos-aquae*, ali i vrsta roda *Microcystis* (Lyon-Colbert *i sar.*, 2018). Što se tiče gena koji kodiraju STX-sintetazu, gen *sxtG* je amplifikovan u obe sezone dok *sxtS* nije detektovan. Potencijalni uzroci amplifikacije samo jednog gena za STX sintetazu diskutovani su u predhodnim poglavljima.



**Slika 40.** Fotografija agaroznog gela sa PCR produktima nakon amplifikacije gena za MC-sintetazu (*meyG*, **A**) i STX-sintetazu (*sxtG*, **B**) iz biomase jezera Fehervarčurgo. L – DNK marker; B – slepa proba; R1 – R3 – referentni sojevi; S1 – uzorak iz jula; S2 – uzorak iz septembra; C – egzogena kontrola amplifikacije.

### 5.3.4 Prisustvo cijanotoksina u uzorcima vode i tkiva riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo

Među 9 testiranih strukturnih varijanti MC-a, jedino je izrazito niska koncentracija MC-RR (<0,01  $\mu\text{g/l}$ ) detektovana u vodi jezera Fehervarčurgo tokom jula 2018. godine, dok CYN nije detektovan. S obzirom da veće koncentracije cijanotoksina nisu izmerene u vodi, nije iznenađujuće da akumulacija MC-a nije detektovana u tkivima riba izlovljenih na ovom lokalitetu.

Tokom prethodnih decenija, prisustvo MC-a je detektovano u biomasi cijanobakterija jezera Fehervarčurgo. Tokom septembra 1995. godine, produkcija MC-a je detektovana u uzorku vrste *Microcystis aeruginosa* (Kozma Törökné, 1999); u uzorku su zabeležene tri strukturne varijante: MC-RR (0.17 mg/g), MC-LR (0.38 mg/g) i MC-YR (0.33 mg/g). Toksikološki testovi sprovedeni sa izolovanim MC-om su pokazali mortalitet larvi *Tamnocephalus*-a, minimalnu letalnu dozu od 50 mg/kg nakon intraperitonealne injekcije kod miševa (Kozma Törökné, 1999), sterilitet kod 30% albino zamorčića, i iritaciju kože i oka kod albino zečeva (Torokne *i sar.*, 2001). U ovom istraživanju nije detektovana vrsta *M. aeruginosa*, ali jesu pronađene druge vrste koje su poznate po sintezi MC-a kao što su *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* i *Dolichospermum flos-aquae*. Iako je poznato da mnoge vrste roda *Microcystis* proizvode cijanotoksine, prvenstveno MC, sposobnost sinteze ovih toksina veoma zavisi od vrste. Naime, kod nekih vrsta kao što su *M. aeruginosa* i *M. flos-aquae* je primećen znatno veći broj toksičnih sojeva od netoksičnih, dok je sa druge strane kod vrste *M. wesenbergii* koja je nađena u ovom istraživanju primećen znatno veći broj netoksičnih sojeva (Otsuka *i sar.*, 1999; Via-Ordorika *i sar.*, 2004). Pored MC-a, poznato je da sojevi vrsta *A. flos-aquae*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Dolichospermum flos-*

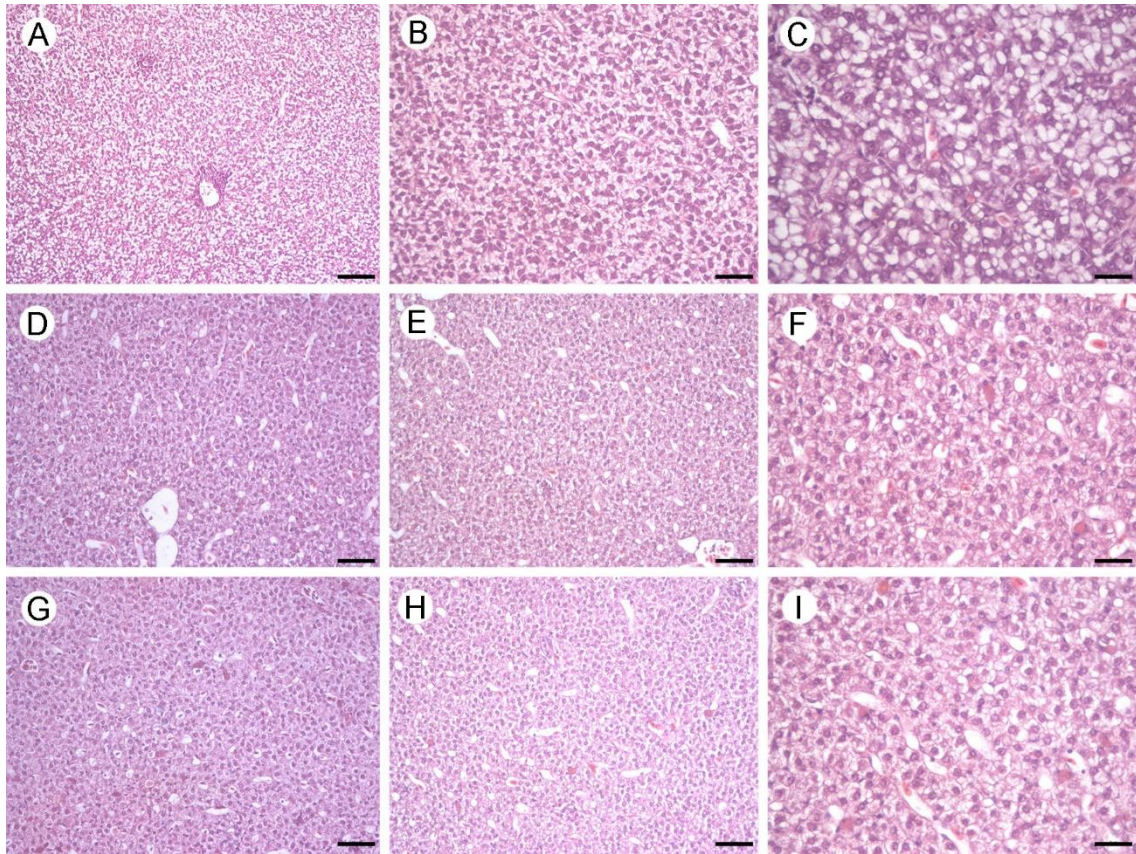
*aquae* proizvode i druge toksine kao što su ATX-a, STX, BMAA i drugi (Buratti *i sar.*, 2017; Huang i Zimba, 2019), te je redovan monitoring ovog ekosistema i dalje neophodan kako bi se detaljnije utvrdila dinamika cvetanja cijanobakterija i produkcije toksina u ovom ekosistemu.

### 5.3.5 Histopatološke promene u tkivima riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo

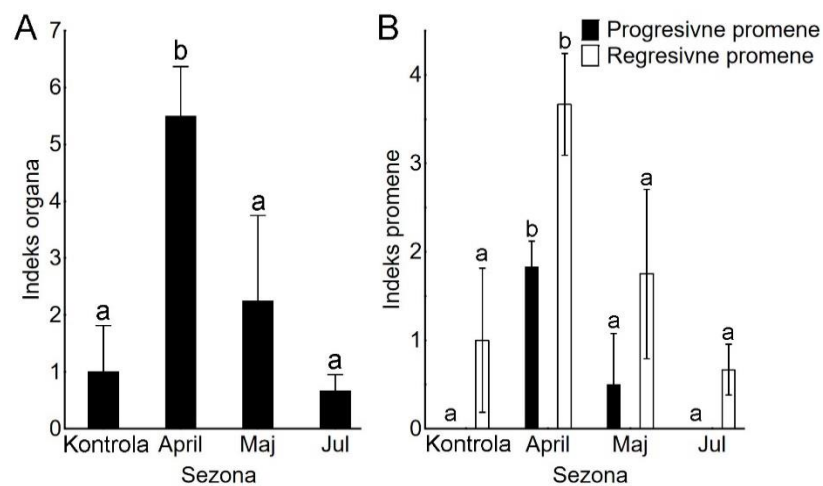
S obzirom da obe izlovljene vrste iz jezera Fehervarčurgo (deverika – *Abramis brama* i babuška – *Carassius gibelio*), kao i kontrolni šarani – *Cyprinus carpio* pripadaju istoj porodici riba (Cyprinidae), i da zauzimaju sličan ekološki položaj i položaj u lancima ishrane, rezultati su predstavljeni objedinjeno za sve vrste. S obzirom da je u septembru 2018. godine, zbog problema sa izlovom, ulovljena samo jedna riba, podaci o ovom uzorkovanju nisu detaljnije prikazani u daljim poglavljima. Organi kontrolnih riba gajenih na Departmanu za akvakulturu, Mađarskog univerziteta za poljoprivredu i prirodne nauke su imale normalnu histološku strukturu kao što je prethodno opisano.

#### 5.3.5.1 Jetra

Jetre riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo su imale sličnu strukturu parenhima sa poligonalnim hepatocitima pravilno raspoređenim oko kapilara i sinusoida kao i jetre kontrolnih riba (Slika 41). Većina hepatocita je imala centralno postavljena jedra sa jasno vidljivim jedarcem. Najčešća promena je bila vakuolizacija hepatocita različitog intenziteta, koja je bila najizraženija tokom aprila (Slika 41A-C). Tokom maja (Slika 41D-F) i jula (Slika 41G-I) gotovo da nisu uočene histopatološke promene. Polukvantitativna analiza je potvrdila ove nalaze. Indeks organa je bio značajno veći od kontrole jedino kod riba izlovljenih tokom aprila (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Slika 42A). Takođe, indeksi progresivnih i regresivnih promena su bili značajno veći od kontrole samo tokom aprila (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Slika 42B). Što se tiče pojedinačnih promena, citoplazmatične promene hepatocita i hipertrofije su imale značajno veći indeks u odnosu na ostale sezone (Tabela 23), ukazujući upravo na pomenutu vakuolizaciju. Iako se vakuolizacija često javlja uled izlaganja riba i sisara cijanotoksinima kao što je prethodno pomenuto (Hooser *i sar.*, 1990; Carbis *i sar.*, 1996; Fischer i Dietrich, 2000; Gupta *i sar.*, 2003; Li *i sar.*, 2007; Jiang *i sar.*, 2011; Svirčev *i sar.*, 2015; Drobac *i sar.*, 2016), ova promena je veoma nespecifična, i može da se javlja usled delovanja različitih agenasa, ali i usled stresa, ili usled neravnoteže u ishrani (Thoolen *i sar.*, 2010). Takođe, intenzivne promene uočene u martu mogu biti rezultat cvetanja cijanobakterija koje se desilo pre ovog istraživanja, te je moguće da su ove promene akumulacija prethodnog delovanja toksina.



**Slika 41.** Histološki preseki jetre riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo. Riba izlovljene tokom aprila (A-C) su pokazale histološke promene u vidu vakuolizacije citoplazme. Riba izlovljene tokom maja (D-F) i jula (G-I) nisu pokazale gotovo nikakve histopatološke promene. H&E. Razmera: A, D, G – 100  $\mu\text{m}$ ; B, E, H – 50  $\mu\text{m}$ ; C, F, I – 25  $\mu\text{m}$ .



**Slika 42.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočениh u jetrama riba izlovljenih na jezeru Fehervarčurgo tokom aprila, maja i jula. (A) Ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeks progresivnih i regresivnih promena koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

**Tabela 23.** Indeksi najčešće beleženih promena jetre kod riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo.

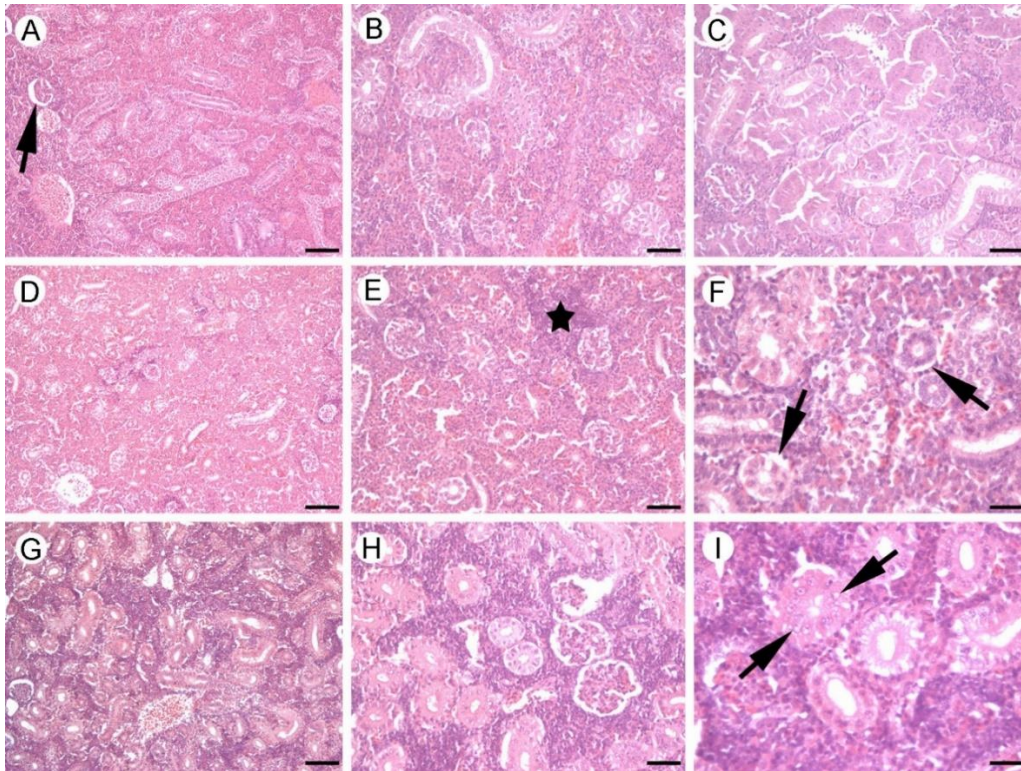
Promene	Kontrola	April	Maj	Jul
Promene arhitekture	0	0,83±0,29	1,00±0,82	0,67±0,29
Citoplazmatične promene	1,00±0,82 <sup>a</sup>	2,83±0,29 <sup>b</sup>	0,75±0,96 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Promene jedara	0	0	0	0
Hipertrofije	0 <sup>a</sup>	1,83±0,29 <sup>b</sup>	0,50±0,58 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

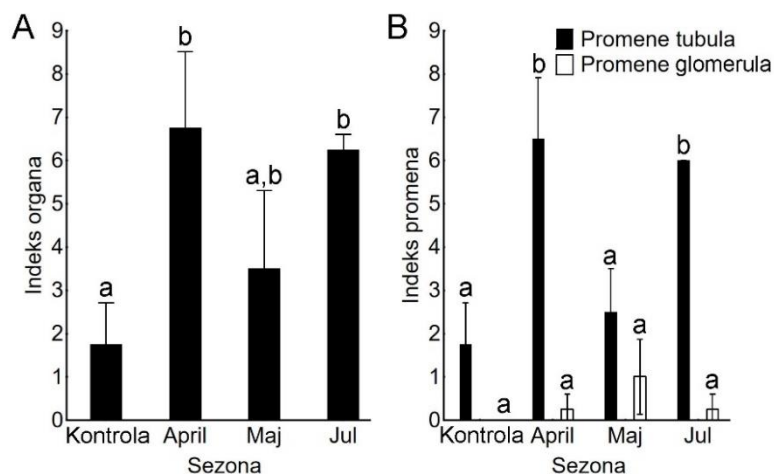
### 5.3.5.2 *Bubrezi*

Najčešća promena je bila vakuolizacija tubularnog epitela (i proksimalnih i distalnih tubula; Slika 43) koja je u pojedinim slučajevima dovela do odlublivanja od bazalne membrane (Slika 43F). Takođe su uočene promene unutar bubrežnih telašaca. One su podrazumevale dilatacije Boumanove čaure (Slika 43A) i blage atrofije glomerula. Zabeležene su i infiltracija limfocita (Slika 43E) i makrofaga. Navedene promene su bile najintenzivnije tokom maja i jula, kada su detektovane veoma intenzivne vakuolizacije tubula i dilatacije Boumanove čaure. Međutim, u aprilu su uočene samo blage vakuolizacije. Oštećenja jedara u obliku kariolize su takođe bila veoma intenzivna i česta, uglavnom tokom aprila, ali i tokom jula (Slika 43I). Polukvantitativnom analizom su ovi nalazi i potvrđeni s obzirom da je indeks organa bio najveći tokom aprila i jula (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Slika 44A). Promene tubula su bile značajno veće u aprilu i julu u poređenju sa kontrolom (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Slika 44B), dok sezonske razlike u promenama glomerula nisu uočene. Što se tiče pojedinačnih promena, jedino su jedarne promene pokazale značajnu razliku između sezona (Tabela 24).

Promene zapažene na bubrezima su bile intenzivnije od promena na jetri. S obzirom da su Fischer i Dietrich (2000) ustanovili da se kod šaranskih riba pri delovanju MC-a pre javljaju promene na bubrezima nego na jetri, i činjenicu da bubrezi poseduju nosače za MC, moguće je da su zabeležene promene nastale delovanjem MC-a. Međutim, s obzirom da su detektovane veoma niske koncentracije MC-a, nije jasno da li su te koncentracije dovoljne da izazovu oštećenja bubrega.



**Slika 43.** Histološki preseki bubrega riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo. Ribe izlovljene tokom aprila (A-C) su pokazale histološke promene u vidu dilatacije Boumanove čaure (A; strelica) i vakuolizacije epitelnih ćelija tubula. Ribe izlovljene tokom maja (D-F) i jula (G-I) su pokazale intenzivnije vakuolizacije koje su u pojedinim slučajevima dovodile i do odlublivanja epitelnih ćelija od bazalne membrane (F; strelice), kao i infiltraciju limfocita (E; zvezdica) i oštećenja jedara u obliku kariolize (I; strelice). H&E. Razmera: A, D, G – 100  $\mu\text{m}$ ; B, E, H – 50  $\mu\text{m}$ ; C, F, I – 25  $\mu\text{m}$ .



**Slika 44.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočenih u bubrezima riba izlovljenih na jezeru Fehervarčurgo tokom aprila, maja i jula. (A) Ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeksi regresivnih promena tubula i glomerula koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).



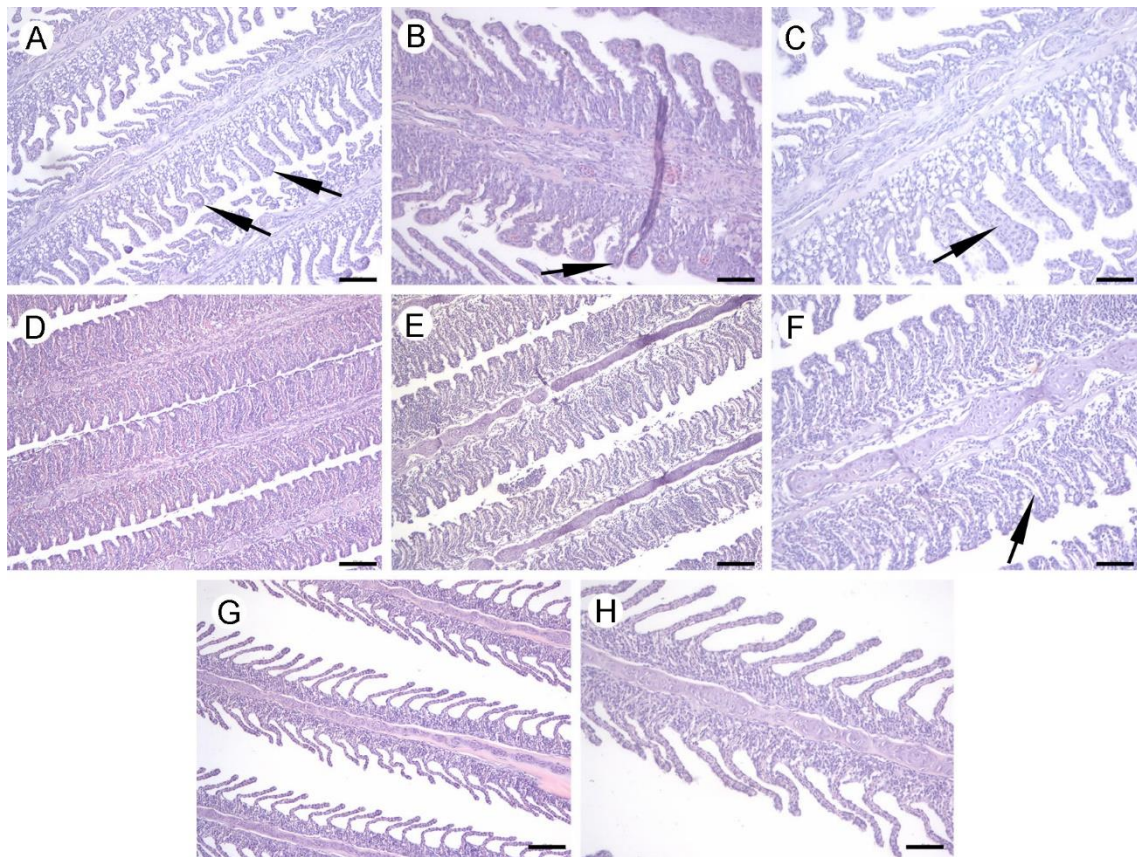
**Tabela 24.** Indeksi najčešće beleženih promena bubrega kod riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo.

Promene	Kontrola	April	Maj	Jul
Promene arhitekture tubula	1,25±0,50	2,25±0,35	1,83±0,58	1,75±1,06
Naslage unutar tubula	0,50±0,58	0,75±0,35	0	0,75±0,35
Promene jedara tubula	0 <sup>a</sup>	3,50±0,71 <sup>b</sup>	0,67±0,58 <sup>a</sup>	3,50±0,71 <sup>b</sup>
Promene arhitekture bubrežnih telašaca	0	0,25±0,35	1,00±0,87	0,25±0,35

Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

### 5.3.5.3 Škrge

Najčešće beležena promena škrge kod jedinki izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo su bile hipertrofija epitela (Slika 45A), zaobljivanje sekundarnih lamela (Slika 45B), telangiektazije, edem i odlubljivanje epitela, hiperemije (Slika 45C) kao i hiperplazija lamelarnog i interlamelarnog epitela. Sve ove promene su bile beležene tokom aprila. Tokom maja su hiperplazije bile znatno izraženije i često su dovodile do kompletnih fuzija sekundarnih lamela (Slika 45D, E). Takođe, u pojedinim slučajevima su se zajedno javljale hiperplazije sa odlubljivanjem epitela (Slika 45F). Međutim, tokom jula, histopatološke promene nisu beležene, i škrge su morfološki izgledale kao kod kontrolnih riba. Indeks organa potvrđuje ovaj nalaz s obzirom da je ovaj indeks bio značajno veći od kontrole samo tokom maja (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Slika 46A). Takođe, nakon razlaganja na pojedinačne obrasce odgovora, progresivne i regresivne promene su bile veće od kontrole samo tokom maja (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Slika 46B). Promene arhitekture lamela, hipertrofije i hiperplazije epitela su bile značajno veće tokom maja u poređenju sa ostalim mesecima (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ; Tabela 25). Većina pomenutih promena predstavljaju odbrambene mehanizme škrge kojim se smanjuje respiratorna površina i samim tim smanjuje ulaz toksičnih jedinjenja (Lujčić *i sar.*, 2015). Ove promene se javljaju nakon izlaganja riba cijanotoksinima (Svirčev *i sar.*, 2015), i najčešće su akutnog karaktera. Međutim, usled kompleksnih odnosa koji se dešavaju unutar ekosistema, moguće je da su uočene promene rezultat hroničnog izlaganja određenim toksinima koji nisu izmereni u ovom istraživanju, ali su sintetisani od strane cijanobakterija prisutnih u ekosistemu.

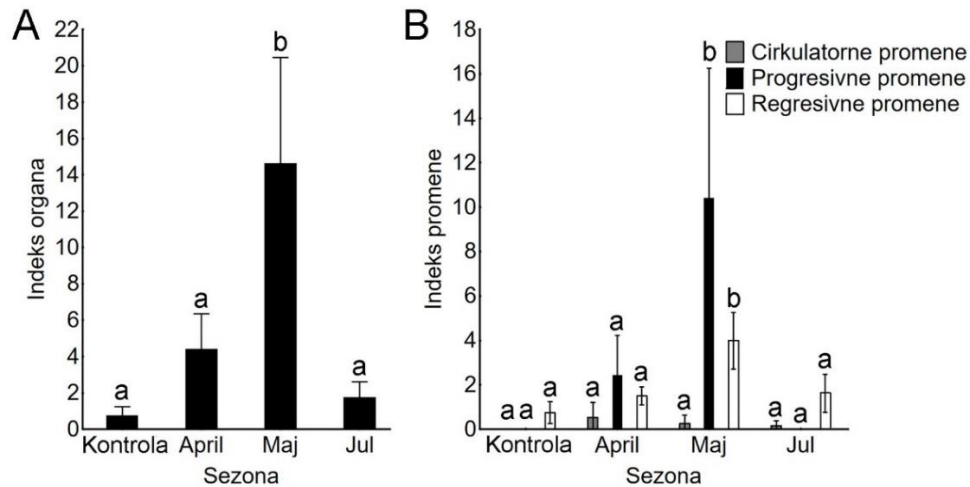


**Slika 45.** Histološki preseki škrga riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo. Najčešće beležene promene tokom aprila (A-C) su bile hipertrofije epitela (A; strelice), zaobljivanje sekundarnih lamela (B; strelica), hiperemije (C; strelica) kao i hiperplazija lamelarnog i interlamelarnog epitela. Tokom maja (D-F) hiperplazije su bile znatno izraženije i često su dovodile do kompletnih fuzija sekundarnih lamela (D, E), a neretko su se javljale i zajedno sa odlublivanjem epitela (F; strelica). Tokom jula histopatološke promene nisu beležene, i škрге su morfološki izgledale kao kod kontrolnih riba (G, H). H&E. Razmera: A, D, E, G – 100  $\mu$ m; B, C, F, H – 50  $\mu$ m.

**Tabela 25.** Indeksi najčešće beleženih promena škrga kod riba izlovljenih iz jezera Fehervarčurgo.

Promene	Kontrola	April	Maj	Jul
Hiperemije/aneurizme	0	0,50±0,71	0,25±0,39	0,12±0,64
Promene arhitekture lamela	0,75±0,50 <sup>a</sup>	1,50±0,41 <sup>a</sup>	3,33±1,40 <sup>b</sup>	1,25±0,64 <sup>a</sup>
Nekroze	0	0	0,65±0,74	0,37±0,75
Hipertrofija epitelnih ćelija	0 <sup>a</sup>	0,92±0,79 <sup>a,b</sup>	2,83±1,74 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
Hiperplazija epitelnih ćelija	0 <sup>a</sup>	1,50±1,91 <sup>a</sup>	7,07±4,03 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>

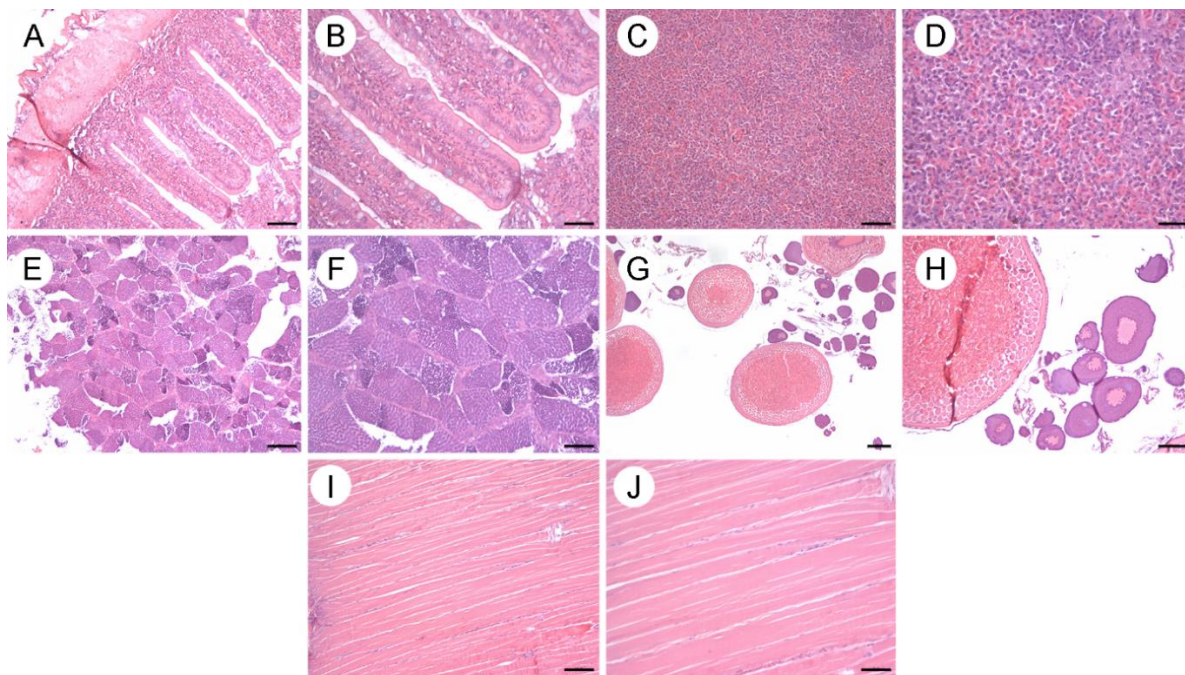
Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku za datu promenu (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).



**Slika 46.** Polukvantitativna analiza histopatoloških promena uočeni na škragama riba izlovljenih na jezeru Fehervarčurgo tokom aprila, maja i jula. (A) Ukupni indeks organa koji predstavlja skup svih histopatoloških promena, i (B) indeksi progresivnih, regresivnih i cirkulatornih promena koji predstavljaju skup svih promena unutar datog obrasca histopatološkog odgovora. Različita slova iznad stubića označavaju statistički značajnu razliku za dati indeks (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

#### 5.3.5.4 *Ostali organi*

Kod riba iz jezera Fehervarčurgo nisu uočene značajne histopatološke promene u ostalim ispitivanim organima. Creva (Slika 47A, B), slezina (Slika 47C, D), testisi (Slika 47E, F), ovarijumi (Slika 47G, H) i mišići (Slika 47I, J) su pokazali strukturu sličnu strukturi tkiva kontrolnih riba. Izostanak promena na ovim organima kod riba iz jezera Fehervarčurgo nije iznenađujuć. S obzirom da su promene na jetri, bubrezima i škragama riba iz ovog jezera bile veoma blage u poređenju sa ostalim lokalitetima, i da je cvetanje cijanobakterija bilo mnogo manjeg intenziteta nego u jezerima Ludaš i Kiš-Balaton, odsustvo histopatoloških promena na crevima, slezini, testisima, ovarijumima i mišićima je očekivano.



**Slika 47.** Histološki preseći creva (A, B), slezine (C, D), testisa (E, F), ovarijuma (G, H) i mišića (I, J) riba izlovljenih na jezeru Fehervarčurgo. H&E. Razmera: G – 200  $\mu\text{m}$ ; A, E, H, I – 100  $\mu\text{m}$ ; B, C, F, J – 50  $\mu\text{m}$ ; D – 25  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.6 Posledice cvetanja cijanobakterija na upotrebu jezera Fehervarčurgo

Jezero Fehervarčurgo je važna akumulacija u okrugu Bakonj Republike Mađarske s obzirom na svoju funkciju u zaštiti okolnog područja od plavljenja. Usled rudarskih aktivnosti, i postojanja velikog broja peščara u okolini, veliki broj otpadnih voda usled navedenih aktivnosti završavaju u jezeru Fehervarčurgo (Nagy *i sar.*, 2014). Takođe, u jezero dospevaju i otpadne vode okolnih naselja, kao i organske i neorganske materije koje se spiraju sa okolnog poljoprivrednog zemljišta. Ovome svedoči najveća koncentracija ortofosfata zabeležena u ovom istraživanju izmerena tokom aprila 2018. godine (čak iznad 5 mg/l).

Kao što je nekoliko puta do sada pomenuto, povećane koncentracije nutrijenata pogoduju proliferaciji tj. cvetanju cijanobakterija. Cvetanje cijanobakterija je detektovano tokom poslednjih nekoliko decenija, međutim, publikacije vezane za ovo jezero su veoma malobrojne, i gotovo da ih nema. Istraživanja publikovana od strane Kozma Törökné (1999) i Torokne *i sar.* (2001) pokazuju da su cijanobakterije izolovane iz jezera Fehervarčurgo uzrokovale intoksikacije zamorčića i miševa, kao i smrtnost u testovima toksičnosti sa *Daphnia magna* i *Thamnocephalus platyurus*. Stoga, postoje podaci koji ukazuju na toksično cvetanje cijanobakterija u ovom jezeru. Međutim, do sada ne postoji ni jedna publikacija koja jasno opisuje cvetanje, kao ni produkciju toksina u ovom jezeru.

U ovom istraživanju je potvrđeno intenzivno cvetanje cijanobakterija tokom svih analiziranih sezona, sa najvećim brojem cijanobakterija zabeleženim tokom jula 2018. godine (nešto više od 2,8 miliona ćelija/ml). Ove koncentracije višestruko premašuju koncentraciju ćelija predloženu od strane Svetske zdravstvene organizacije kao visok rizik za zdravlje ljudi od 100.000 ćelija/ml (WHO, 2003). U jezeru su uočeni sojevi koji poseduju gene za MC- i STX-sintetazu, međutim, samo veoma niske koncentracije MC-RR-a su kvantifikovane u vodi, dok akumulacija cijanotoksina u tkivima riba izlovljenih iz ovog jezera nije izmerena. S obzirom da se jezero najviše koristi za ribolov, ovi podaci pokazuju da je riba izlovljena iz ovog jezera trenutno najverovatnije pogodna za konzumaciju. Međutim, velika brojnost cijanobakterija i prisustvo potencijalno toksičnih sojeva ukazuju da jezero ne bi trebalo da se koristi u druge rekreativne svrhe, ili da je neophodan oprez prilikom plivanja, ili bilo kojih drugih aktivnosti ukoliko se dolazi u direktan kontakt sa vodom. Takođe, važno je da se vrši redovan monitoring ovog ekosistema kako bi se utvrdilo da li dolazi do dugotrajnog cvetanja cijanobakterija i da li sojevi prisutni u ovom jezeru produkuju cijanotoksine u višim koncentracijama, kako bi se sprečilo potencijalno izlaganje i negativne posledice organizama i ljudi u budućnosti.

## 5.4 Opšta diskusija

### 5.4.1 Uporedni pregled fizičko-hemijskih parametara vode i cvetanja cijanobakterija

Na svim lokalitetima ovog istraživanja je došlo do antropogene eutrofizacije, tj. eutrofizacije uslovljene ljudskim delovanjem. Glavni izvor zagađenja sva četiri analizirana ekosistema su otpadne kanalizacione vode i spiranje organskih i neorganskih materija sa okolnog poljoprivrednog zemljišta koji doprinose pojačanoj koncentraciji nutrijenata. Takođe, kod svih analiziranih ekosistema se najveća količina nutrijenata uliva vodosnabdevajućim vodotokom (kanal Palić-Ludaš za Ludaš, reka Gaja za Fehervarčurgo, reka Zala za Kiš-Balaton i Balaton). Jedina razlika se javlja kod jezera Balaton gde usled postojanja sistema Kiš-Balaton i svoje veličine najveći deo nutrijenata se ne uliva preko reke Zala, već je tačkastog karaktera.

Jezera Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo su imala loš kvalitet vode, i mogu se smatrati eutrofnim/hipereutrofnim, dok je jezero Balaton oligomezotrofno. Vrednosti hemijske i biološke potrošnje kiseonika na jezeru Ludaš su bile veoma visoke tokom celog perioda istraživanja i ukazuju na izrazitu ekološku nestabilnost ovog jezera. Azotna i fosfatna jedinjenja su takođe bila znatno povišena (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014, 2016, 2018). Slično je uočeno i na jezerima Kiš-Balaton i Fehervarčurgo gde su količine azotnih jedinjenja (Sebestyén *i sar.*, 2017), a pogotovo fosfatnih jedinjenja bile značajno više od predloženih graničnih vrednosti (“Governmental Decree No 10/2010. (VIII. 18.) of Ministry of Rural Development (VM) on defining the rules for establishment and use of water pollution limits of surface water.”, 2010). Na svim jezerima je bila očigledna alkalnost vode, a na jezerima Kiš-Balaton i Fehervarčurgo je čak i prevazilazila pH 9.

Fizičko-hemijski parametri vode su povezani sa cvetanjem i brojem ćelija cijanobakterija. Tokom intenzivne proliferacije cijanobakterija i na vrhuncu cvetanja tokom letnjih meseci, koncentracije kiseonika i pH su veoma visoki usled intenzivne fotosintetske aktivnosti (Winfield, 2015; Burdick *i sar.*, 2020b). Međutim, tokom jesenjih meseci najčešće dolazi do odumiranja cijanobakterija, razlaganja ćelija, i posledično do naglog smanjenja koncentracije kiseonika. Ovaj trend je donekle bio uočen u sva tri cvetajuća jezera. Najveće koncentracije kiseonika su izmerene u julu (u jezeru Ludaš je čak došlo i do supersaturacije), dok su značajno manje koncentracije izmerene u septembru. Tokom razlaganja ćelija cijanobakterija takođe dolazi i do povećanja koncentracije totalnog amonijaka u vodi (Burdick *i sar.*, 2020b). Znatno veće koncentracije amonijum jona su uočene na jezeru Kiš-Balaton, međutim, ova protonizovana forma koja se javlja pri visokim pH nije toksična, te ne predstavlja opasnost za ribe i ostale vodene organizme.

U sva tri eutrofna/hipereutrofna jezera je cvetanje cijanobakterija bilo čak i makroskopski očigledno, dok je u jezeru Balaton broj ćelija/ml blago premašivao graničnu vrednost niskog rizika po zdravlje ljudi (WHO, 2003). Od cvetajućih ekosistema, najintenzivnije cvetanje je bilo u jezeru Ludaš gde je prilikom svakog uzorkovanja bilo izbrojano preko 20 miliona ćelija/ml, a maksimalna vrednost izmerena u ovom istraživanju je bila 31 milion u julu 2018. godine. U jezeru Kiš-Balaton je cvetanje bilo nešto nižeg intenziteta sa najvišom vrednošću od skoro 14 miliona ćelija/ml izmerenom tokom jula 2018. godine, dok je u jezeru Fehervarčurgo intenzitet bio još niži sa maksimalnom vrednošću od skoro 3 milion ćelija/ml izmerenom takođe u julu 2018. godine. U sva tri jezera je najveća koncentracija ćelija izmerena tokom jula, a najmanja tokom marta/aprila. Najmanja razlika u brojnosti cijanobakterija između meseci je izmerena u jezeru Ludaš, dok je u ostalim jezerima izmerena višestruka razlika između pojedinih meseci.

#### 5.4.2 Uporedni pregled sastava zajednica cijanobakterija

Vrste cijanobakterija koje najčešće cvetaju na teritoriji Srbije su *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* i *Planktothrix rubescens* (Svirčev *i sar.*, 2007, 2017b). Među ovim vrstama, prisustvo vrsta roda *Microcystis* je zabeleženo na svim lokalitetima ovog istraživanja. Ovo nije iznenađujuće s obzirom da su vrste ovog roda kosmopolitske i njihovo prisustvo je beleženo na svim kontinentima sem Antarktika (Harke *i sar.*, 2016b; Svirčev *i sar.*, 2019). Pripadnici ovog roda su jednoćelijske kokoidne cijanobakterije dijametra od 1 do 9  $\mu\text{m}$  koje se često grupišu u kolonije (Komárek i Komárková, 2002; Harke *i sar.*, 2016b) i pripadaju redu Chroococcales (Vincent, 2009). Veoma često cvetaju, a s obzirom da sintetišu MC, ATX, STX, BMAA, cvetanja su često toksična (Svirčev *i sar.*, 2017b, 2019; Huang i Zimba, 2019). U ovom istraživanju, uočene su vrste *M. aeruginosa* (Ludaš, Kiš-Balaton i Balaton), *M. flos-aquae* (Kiš-Balaton i Fehervarčurgo) i *M. wesenbergii* (Ludaš i Fehervarčurgo). Kao što je pomenuto, *M. aeruginosa* i *M. flos-aquae* su veoma česte na teritoriji Srbije i Mađarske, dok je *M. wesenbergii* češće beležena u Kini nego u Evropi (Xu *i sar.*, 2008).

Što se tiče nutritivnih potreba roda *Microcystis*, ove cijanobakterije opstaju i mogu intenzivno da proliferišu u uslovima veoma ograničenog fosfora (Wilhelm *i sar.*, 2003; Saxton *i sar.*, 2012; Gobler *i sar.*, 2016; Harke *i sar.*, 2016a). Međutim, one nemaju sposobnost azotifikacije, te azot može biti veoma važan limitirajući nutrijent tokom njihove proliferacije (Harke *i sar.*, 2016b). S obzirom da pripadnici rodova *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* i

*Cylindrospermopsis* imaju sposobnost azotofiksacije, moguće je da ove vrste preovladaju u odnosu na *Microcystis* tokom cvetanja u uslovima limitiranog azota. Međutim, određena istraživanja pokazuju da azot može biti ograničavajući nutrijent za i pojedine sojeve azotofiksirajućih vrsta (Conley *i sar.*, 2009; Simić *i sar.*, 2017), te njihova dominacija ne mora biti nužna u uslovima ograničenog azota.

Pored roda *Microcystis*, prisustvo vrste *Dolichospermum flos-aquae* (ex *Anabaena flos-aquae*) je takođe zabeleženo na svim lokalitetima ovog istraživanja (sem jezera Balaton). Rod *Dolichospermum* je karakterističan po svojoj kosmopolitskoj prirodi i jedan je od najčešćih rodova koji cvetaju (Li *i sar.*, 2016). Ovo su filamentozne cijanobakterije koje pripadaju redu Nostocales (Vincent, 2009; Li *i sar.*, 2016). Imaju heterocitne taluse i poseduju heterociste i akinete, te zbog svoje sposobnosti azotofiksacije tolerišu veoma niske koncentracije azota i imaju kompetitivnu prednost u uslovima ograničenog azota. Međutim, vrste ovog roda su osetljive na nizak intenzitet svetlosti (Reynolds *i sar.*, 2002; Li *i sar.*, 2016), te ovo može biti razlog zbog kojeg ni na jednom lokalitetu vrsta *D. flos-aquae* nije dominirala, već je bila prisutna sa manjim procentom zastupljenosti.

Na cvetajućim lokalitetima Mađarske je dominirala vrsta *Aphanizomenon flos-aquae*. I ova vrsta je kosmopolitska, i često se nalazi u cvetajućim ekosistemima (Svirčev *i sar.*, 2019). Vrste roda *Aphanizomenon* su filamentozne, heterocitne cijanobakterije koje pripadaju redu Nostocales (Vincent, 2009; Cirés i Ballot, 2016). Talusi ovih cijanobakterija su pravi i u zavisnosti od vrste mogu da budu solitarni (*A. gracile*) ili da se grupišu (*A. flos-aquae*). S obzirom da formiraju heterociste, imaju sposobnost azotofiksacije što im omogućava opstanak i proliferaciju čak i u uslovima niskih koncentracija azota (Cirés i Ballot, 2016). Međutim, s obzirom da azotofiksacija zahteva mnogo energije, efikasnost azotofiksacije, pa samim tim i otpornost na niske koncentracije azota zavise od vrste. Dolman *i sar.* (2012) su pokazali da *A. gracile* preferira visok N:P odnos, dok *A. flos-aquae* preferira nizak N:P odnos. Nizak N:P koji je preovladavao u jezerima Kiš-Balaton i Fehervarčurgo može da objasni dominaciju vrste *A. flos-aquae* u ova dva jezera. Takođe, grupisanje talusa *A. flos-aquae* može dodatno da štiti ovu vrstu od predacije s obzirom da pripadnici zooplanktona preferiraju ishranu jedinkama čiji su talusi izolovani tj. pojedinačni (Xinyao *i sar.*, 2006).

Pored prisustva najčešće cvetajućih cijanobakterija, važno je napomenuti prisustvo tj. odsustvo invazivne vrste *Raphidiopsis raciborskii* (ex. *Cylindrospermopsis raciborskii*). Ova vrsta ima filamentozan heterocitan talus i pripada redu Nostocales (Burford *i sar.*, 2016). Autohtona je za tropska i subtropska staništa (McGregor i Fabbro, 2000; Figueredo i Giani, 2009; Burford *i sar.*, 2016), međutim, u poslednjih nekoliko decenija se sve češće javlja i u



ekosistemima umerenog pojasa u kojima se smatra izrazito invazivnom vrstom. Invazivnost ove vrste je najverovatnije rezultat otpornosti na niske koncentracije azotnih i fosfatnih jedinjenja, sposobnosti azotofiksacije, fenotipske plastičnosti i postojanja nekoliko različitih ekotipova (Padisák, 1997; Bonilla *i sar.*, 2012; Burford *i sar.*, 2016). U ovom istraživanju, *R. raciborskii* je zapažen samo u septembru 2018. godine na jezeru Ludaš. Kao što je napomenuto, u Srbiji je ova vrsta prvi put primećena 2006. godine (Cvijan i Fužinato, 2012) a neposredno posle i u jezeru Ludaš (Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014), dok je njeno toksično cvetanje primećeno na Aleksandrovačkom jezeru (Đorđević *i sar.*, 2015; Đorđević, 2021). U Mađarskoj je prvi put introdukovana 1970-ih godina, i nakon toga je dominirala tokom cvetanja cijanobakterija u jezeru Balaton (Padisák i Reynolds, 1998; Bíró, 2000; Antal *i sar.*, 2011). S obzirom da različiti sojevi ove vrste mogu da proizvode CYN i STX, neophodno je pratiti rasprostranjenje ove vrste i ispitati toksičnost i potencijalnu opasnost po životnu sredinu koju predstavljaju beleženi sojevi.

#### 5.4.3 Uporedni pregled prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena, cijanotoksina u vodi i akumulacije cijanotoksina u tkivima riba

Kao što je prethodno napomenuto, jedna od najopasnijih karakteristika cijanobakterija, pogotovo tokom cvetanja, jeste njihov potencijal da sintetišu toksične sekundarne metabolite, tj. cijanotoksine. Sinteza cijanotoksina je regulisana na genetičkom, ćelijskom i populacionom nivou (Zurawell *i sar.*, 2005). Osnovni (genetički) nivo podrazumeva prisustvo gena koji kodiraju dati cijanotoksin, tj. s obzirom da su cijanotoksini ne-ribozomalni proteini, neophodno je prisustvo kompleksa gena koji kodiraju čitavu mašineriju za sintezu datog cijanotoksina (Pacheco *i sar.*, 2016; Buratti *i sar.*, 2017). Stoga, identifikacija klastera gena ili pojedinačnih gena za određeni cijanotoksin može da ukaže na potencijal sojeva za produkciju datog cijanotoksina. Ovakav pristup identifikaciji prisustva cijanotoksina je upotrebljen u nekoliko istraživanja, i rezimiran je od strane Pacheco *i sar.* (2016).

U ovom istraživanju, gen koji kodira MC-sintetazu (*mcyE*) je detektovan na svim analiziranim lokalitetima. Ovo se slaže sa nalazima prisutnih cijanobakterija s obzirom da su na svim lokalitetima identifikovane vrste koje prema literaturi imaju sposobnost produkcije MC-a. Što se tiče klastera gena koji kodiraju STX-sintetazu, geni *sxtG* i *sxtS* su amplifikovani na jezeru Ludaš, dok je na jezerima Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo amplifikovan samo gen *sxtG*. Mogući tehnički uzrok izostanka PCR produkta za pomenute gene kao što je nepoklapanje početnica i sekvence može da se isključi pošto je specifičnost početnica za sva

tri gena prethodno potvrđena na referentnim sojevima (Savela *i sar.*, 2015, 2017). Stoga su najverovatniji uzrok ove pojave krupne mutacije kao što su velike delecije ili insercije koje mogu uzrokovati nepodudarnost između početnica i sekvence. S obzirom da su geni *sxtA*, *sxtB*, *sxtG* i *sxtS* konzervirani u svim rodovima koji sintetišu STX, i da je prisustvo celog klastera neophodno za njegovu sintezu (Buratti *i sar.*, 2017), odsustvo pojedinih gena ovog klastera može da ukaže na prisustvo netoksičnih sojeva, tj. sojeva koji ne mogu na sintetišu STX. Ovo se slaže sa filogenetskim istraživanjima vezanim za *mcy* klaster gena koja su pokazala da je ovaj klaster nastao veoma rano u evoluciji i da je prisustvo netoksičnih gena rezultat gubitka pojedinih gena ovog klastera (Rantala *i sar.*, 2004). Prisustvo gena za CYN-sintetazu (*cyrJ*) i ATX-sintetazu (*anaC*) nisu amplifikovani ni na jednom analiziranom lokalitetu.

Pored genetičkog nivoa, ćelijski nivo regulacije sinteze cijanotoksina koji uglavnom podrazumeva uslove životne sredine je od presudnog značaja. Ćelijski nivo određuje da li će soj koji ima potencijal da sintetiše određen toksin (prisustvo klastera gena za njegovu sintezu) zapravo i sintetisati taj toksin. Ukoliko su uslovi odgovarajući, dolazi do sinteze toksina koji se prvenstveno nalaze unutar ćelija cijanobakterija, a tokom odumiranja i raspadanja ćelija, dolazi do oslobađanja ovih metabolita u vodu (Pham i Utsumi, 2018). U ovom trenutku, cijanotoksini se nalaze u 4 moguće forme: (1) vezani za ćelije cijanobakterija, (2) rastvoreni u vodi, (3) akumulirani u akvatičnim organizmima ili (4) akumulirani u sedimentu (Song *i sar.*, 2015; Pham i Utsumi, 2018).

U ovom istraživanju su mereni cijanotoksini vodenog stuba i toksini akumulirani u tkivima riba. Što se tiče cijanotoksina vodenog stuba, predstavljene su ukupne koncentracije toksina, koje uključuju unutarćelijsku (biomasa) i vanćelijsku (voda) koncentraciju. MC je detektovan u jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, dok CYN nije izmeren ni u jednom od analiziranih lokaliteta. Od 9 analiziranih strukturnih varijanti, u jezeru Ludaš su izmerene 4 varijante (MC-LR, MC-RR, dmMC-LR i dmMC-RR), u jezeru Kiš-Balaton 5 varijanti (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF i MC-FW), a u jezeru Fehervarčurgo samo jedna (MC-LR). Strukturne varijante MC-LR i MC-RR su najčešće merene u analizama prisustva cijanotoksina (Pearson *i sar.*, 2010; Buratti *i sar.*, 2017; Svirčev *i sar.*, 2019), te njihova detekcija nije iznenađujuća. Međutim, detekcija pomenutih strukturnih varijanti nije bila ravnomerna u svim sezonama, već su se neke varijante javljale samo u pojedinim mesecima. Uzrok ovakvom nalazu su varijabilni uslovi životne sredine tokom istraživanja, kao i sezonska dinamika prisutnih cijanobakterijskih vrsta. Takođe, MC nije izmeren u jezeru Balaton, iako je amplifikovan gen za MC-sintetazu. Stoga, jasno je da faktori životne sredine imaju veliki uticaj na sintezu cijanotoksina, ali i da odsustvo određenog toksina u vodi ne mora nužno da znači da

cijanobakterije tog lokaliteta nemaju sposobnost da ga sintetišu, kao i da prisustvo klastera gena ne znači nužno da će toksin biti sintetisan (Zurawell *i sar.*, 2005). Stoga je tokom monitoringa ekosistema poželjno koristiti obe metodologije kako bi se ustanovilo prisustvo toksičnih ili netoksičnih sojeva, a potom i utvrdilo da li toksični sojevi zaista i proizvode toksine.

Kao što je prethodno pomenuto, akumulacija cijanotoksina iz vodenog stuba u tkivima riba je često beležena (Magalhães *i sar.*, 2003; Cazenave *i sar.*, 2005; Lei *i sar.*, 2008; Vuorinen *i sar.*, 2009; Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011; Flores *i sar.*, 2018; Pham i Utsumi, 2018). Riba su izložene cijanotoksinima direktnim kontaktom preko škrge, kao i preko hrane s obzirom da su cijanobakterije deo ishrane pojedinih vrsta riba, ili mogu biti akumulirani u organizmima kojima se riba hrani. U ovom istraživanju, ni na jednom lokalitetu nije izmerena akumulacija MC-a. S obzirom da akumulacija toksina primarno zavisi od koncentracije i strukturne varijante dostupne u vodi, odsustvo akumuliranog toksina kod riba iz jezera Fehervarčurgo i Balaton je očekivano s obzirom da toksini nisu detektovani ni u vodi. Što se tiče jezera Ludaš i Kiš-Balaton, moguće je da koncentracije MC-a u vodi nisu bile dovoljno visoke kako bi se akumulirale u tkivu (Flores *i sar.*, 2018), s obzirom da je u našem prethodnom istraživanju pri daleko većim koncentracijama MC-a u vodi jezera Ludaš izmerena i akumulacija u tkivima riba (Tokodi *i sar.*, 2018). Kao što je prethodno objašnjeno, postoji mogućnost da je deo MC-a vezan za protein fosfataze, ili je konjugovan sa GSH ili cisteinom u procesu biotransformacije, te ovako vezan toksin nije moguće detektovati analitičkim metodama (Williams *i sar.*, 1997; Ibelings *i sar.*, 2005; Zhang *i sar.*, 2012; Guo *i sar.*, 2015). Takođe, pojedine komponente kompleksnih matriksa, kao što su tkiva ili zemlja, mogu da interaguju sa hemikalijama koje se koriste tokom ekstrakcije toksina, te je procenat izmerenog MC-a manji od realnih vrednosti. U našem prethodnom istraživanju je testiran procenat detekcije poznate koncentracije MC-a iz tkiva riba nakon što su pomenuta tkiva obogaćena MC-om (Drobac *i sar.*, 2016). Procenat ekstrakcije je iznosio od 34 do 94%. Nizak procenat ekstrakcije je posebno karakterističan za hidrofilnije strukturne varijante MC-a kao što su MC-RR ili demetilovane forme. Stoga, iako akumulacija MC-a nije izmerena u tkivima, ne mora nužno da znači da do akumulacije nije došlo s obzirom da i dalje postoji niz nerešenih prepreka u kvantifikaciji toksina u tkivima životinja i biljaka.

#### 5.4.4 Uticaj cvetanja cijanobakterija na pojedine biomarkere riba

Tokom istraživanja, praćeno je nekoliko biomarkera riba: histopatološke promene pojedinih organa riba na svim ispitivanim lokalitetima iz Srbije i Mađarske tokom 2018. godine, kao i enzimi biotransformacije i parametri oksidativnog stresa kod riba iz jezera Kiš-Balaton uzorkovanih tokom juna 2019. godine. Razlike u intenzitetu histopatoloških promena su bile slične razlikama u intenzitetu cvetanja cijanobakterija na datim lokalitetima. Na jezerima Ludaš i Kiš-Balaton gde je cvetanje cijanobakterija bilo najintenzivnije i koje se odvijalo tokom cele godine, uočene su i najintenzivnije histopatološke promene. Sa druge strane, na jezerima Balaton i Fehervarčurgo gde cvetanje cijanobakterija nije bilo intenzivno, ili gotovo da ga nije ni bilo, pomenute histopatološke promene nisu bile primećene ili su bile veoma niskog intenziteta. Polukvantitativna analiza potvrđuje ove nalaze. Indeksi jetre riba iz jezera Ludaš (~18) i iz jezera Kiš-Balaton (~17) su bili znatno veći od indeksa jetre riba iz jezera Fehervarčurgo (najviši indeks tokom aprila je iznosio ~5,5). Slično se vidi i kod bubrega, dok je indeks škruga bio najveći kod riba iz jezera Kiš-Balaton (~18), a znatno niži kod riba jezera Ludaš (~8) i Fehervarčurgo (najviši indeks je iznosio ~7). Iz priloženog je jasno da su odgovori riba na cvetanje cijanobakterija u različitim lokalitetima delimično različiti. Međutim, kada se sagledaju histopatološke promene samih organa, moguće je uočiti da postoji opšti obrazac odgovora, iako su intenziteti promena bili različiti u odnosu na lokalitet. Ovo je donekle očekivano s obzirom da su sve analizirane vrste riba (deverika – *Abramis brama*, babuška – *Carassius gibelio* i šaran – *Cyprinus carpio*) pripadale istoj familiji (familiji Cyprinidae), i da su zauzimale sličan položaj u lancima ishrane.

Što se tiče konkretnih histopatoloških promena koje su beležene, promene na jetri su podrazumevale prvenstveno vakuolizaciju i posledičnu hipertrofiju hepatocita, narušavanje strukture parenhima, zaokrugljivanje hepatocita, kondenzaciju jedra i piknozu. Promene na bubrezima su prvenstveno podrazumevale vakuolizaciju ćelija bubrežnih tubula, dilataciju Boumanove čaure, atrofiju glomerula, kao i promene na jedrima bubrežnih tubula u vidu kariolize. Na škragama su najčešće beležene promene bile hiperplazija epitela koja je često dovodila do kompletne fuzije sekundarnih lamela, hipertrofije epitela kao i odlublivanje, i u određenim slučajevima hipertrofije i hiperplazije mukusnih ili hloridnih ćelija. Pomenute histopatološke promene jetre, bubrega i škruga su bile često zapažane i u drugim istraživanjima uticaja cvetanja cijanobakterija na ribe (Carbis *i sar.*, 1996; Fischer i Dietrich, 2000; Li *i sar.*, 2007; Jiang *i sar.*, 2011; Svirčev *i sar.*, 2015; Drobac *i sar.*, 2016).

Pojedina oštećenja jetre, bubrega i škruga mogu direktno da se dovedu u vezu sa delovanjem MC-a ili NOD-a. Naime, preko ADDA grupe koju poseduju, ovi toksini se vezuju za PP i tim utiču na pojedine veoma bitne procese unutar ćelija (Buratti *i sar.*, 2017). Modifikacije citoskeleta i aktinskih filamenata su česta pojava nakon MC-indukovane inhibicije PP-a (Sun *i sar.*, 2014; Buratti *i sar.*, 2017), a posledice ovih modifikacija mogu morfološki da se ispolje u vidu narušene strukture parenhima jetre ili narušavanja morfologije hepatocita ili epitelnih ćelija škruga. Takođe, poznato je da MC mogu da indukuju apoptozu preko  $Ca^{2+}$ /kalamodulin-zavisne protein kinaze II ili kaspaza (Kleppe *i sar.*, 2015; Liu i Sun, 2015; Liu *i sar.*, 2016). Apoptoza je bila uočena u bubrežnim glomerulima i u škrugama riba iz jezera Ludaš i Kiš-Balaton. Oštećenja jedra (piknoza jedra hepatocita i karioliza jedara bubrečnih tubula) mogu da se dovedu u vezu sa genotoksičnim delovanjem MC-a i smanjenjem kapaciteta DNK-zavisne protein kinaze usled delovanja MC-a (Douglas *i sar.*, 2001; Buratti *i sar.*, 2017). Takođe, vakuolizacija hepatocita i ćelija bubrežnih tubula se često javljaju nakon delovanja MC-a i NOD-a (Svirčev *i sar.*, 2015).

Oštećenja tkiva detektovana pomoću histopatologije često nisu specifična za određeni ksenobiotik, i mogu da se jave usled delovanja različitih toksičnih supstanci. Jedan od važnih primera jeste vakuolizacija hepatocita koja može da se javi usled delovanja različitih toksičnih materija, ali i patogena (Nayak *i sar.*, 1996), te jasna diskriminacija uzroka ove promene nije moguća. Kako bi se utvrdilo da li određene promene izaziva određen toksin, potrebno je sprovesti niz laboratorijskih ispitivanja, koja se potom ekstrapoliraju i koriste kao referentni materijal tokom terenskih istraživanja. Uticaj prečišćenih cijanotoksina i ekstrakata cijanobakterija na ribe je do sada mnogo puta testiran u laboratorijskim uslovima. Histopatološke promene na različitim tkivima riba nastale usled delovanja cijanotoksina u laboratorijskim uslovima su sumirani u istraživanju Svirčev *i sar.* (2015). Ukratko, najintenzivnije promene su se ispoljavale u jetri i bubrezima riba, dok su oštećenja ostalih organa bila mnogo blaža. Najčešće ispoljene promene jetre su bile narušavanje strukture parenhima jetre, zaobljavanje hepatocita, vakuolizacija, hipertrofija i piknoza. Kao što je napomenuto, ove promene su jasna posledica inhibicije PP-a delovanjem MC-a. U bubrezima su najčešće beležene promene bile dilatacija Boumanove čaure, atrofija glomerula i vakuolizacija ćelija tubula. Škrge su najčešće pokazale odlublivanje, hipertrofije i hiperplazije epitelnih ćelija. Sve ove promene su bile ispoljene i kod riba izlovljenim na lokalitetima sa intenzivnim cvetanjem cijanobakterija (Ludaš i Kiš-Balaton). Shodno tome, moguće je pretpostaviti da su cijanotoksini, kao i samo cvetanje cijanobakterija, imali veliki uticaj na pojavu ovih promena.

Većina histopatoloških promena uočenih u ovom istraživanju su reverzibilnog karaktera, i oporavak tkiva može da se očekuje nakon prestanka dejstva iritanata. Ovo se odnosi na strukturne promene tkiva jetre i bubrega, vakuolizacije, kao i odbrambene mehanizme škruga. Međutim, rezultati su pokazali da su date promene bile konstantno beležene, i da su bile ispoljene tokom svih analiziranih sezona što može da znači da su i iritanti koji ih izazivaju najverovatnije konstantno prisutni u vodi i da neprekidno deluju na ribe ovih ekosistema. S obzirom da je cvetanje cijanobakterija na jezerima Ludaš i Kiš-Balaton neprekidno i traje tokom cele godine sa određenim padom i rastom broja ćelija, može da se pretpostavi da je najverovatnije ova pojava odgovorna za ispoljene histopatološke promene.

Osim uticaja na strukturu tkiva, cijanotoksini mogu da uzrokuju promene biomarkera različitih nivoa strukturne organizacije. U ovom istraživanju je ustanovljeno da su ribe iz jezera Kiš-Balaton izlovljene tokom juna 2019. godine pokazale promene u aktivnosti enzima biotransformacije, kao i da su bile izložene oksidativnom stresu. Slične promene biohemijskih markera su uočene kod riba izlaganih cijanotoksinima u laboratorijskim uslovima (Jos *i sar.*, 2005; Prieto *i sar.*, 2006; Chen *i sar.*, 2012; Garcia i Martinez, 2012; Hou *i sar.*, 2015). U poređenju sa ostalim istraživanjima, parametri oksidativnog stresa su ukazivali na akutni uzrok ovih promena. Međutim, s obzirom da je broj cijanobakterija bio veoma nizak tokom ove sezone, i da MC i CYN nisu detektovani u vodi, postoji mogućnost da su u vodi bile prisutne strukturne varijante koje nisu bile analizirane u ovom istraživanju. Takođe, u prirodnim uslovima ribe različito mogu da reaguju na polutante, te je moguće da su uočene promene i rezultat dugotrajnog hroničnog izlaganja riba cvetanju cijanobakterijama i cijanotoksinima.

Uticaj toksičnog cvetanja cijanobakterija na različita tkiva riba zavisi od prirode samih toksina koji su sintetisani. Postoji generalan konsenzus da se cijanotoksini dele u odnosu na tkivo u kojem ispoljavaju toksični efekat. MC i NOD se smatraju hepatotoksinima s obzirom da toksičnost najviše ispoljavaju u jetri, dok se ATX i STX smatraju neurotoksinima s obzirom da svoju toksičnost ispoljavaju u centralnom nervnom sistemu i perifernim sinapsama (Codd *i sar.*, 2005b; Pearson *i sar.*, 2010; Buratti *i sar.*, 2017; Du *i sar.*, 2019; Metcalf i Souza, 2019). Međutim, postoji i velika razlika između strukturnih varijanti pojedinih toksina, kao i u specifičnosti nosača koji ih transportuju u ćelije, a koji mogu biti specifični za dati organ. Steiner *i sar.* (2016) su na OATP nosačima zebrića pokazali da različiti nosači ove familije prenose različite strukturne varijante MC-a. Naime, nosač zfOATP1d1 je prenosio u ćelije strukturne varijante MC-LR, MC-RR, MC-LF i MC-LW, dok je nosač zfOATP1f4-1 prenosio samo strukturnu varijantu MC-LF. Sa druge strane, dok MC-LR prenosi samo zfOATP1d1, strukturnu varijantu MC-LF prenose zfOATP1d1, zfOATP1f2-1, zfOATP1f4-1 i zfOATP1f4-

2. Što se lokalizacije ovih nosača tiče, zFOATP1d1 je najviše ekspresovan u mozgu i jetri, a nešto manje u škrgama i bubrezima, dok je podfamilija zFOATP1f ekspresovana isključivo u bubrezima. Iz ovog se vidi da je uticaj cijanotoksina veoma kompleksan i da toksičnost ovih toksina zavisi od mnogo faktora. Ova pojava takođe može da objasni činjenicu da su oštećenja tkiva ispoljena samo u jetri, bubrezima i škrgama, a ne i u ostalim organima, dok su pojedini autori beležili promene i u crevima, mišićima i gonadama (Svirčev *i sar.*, 2015; Drobac *i sar.*, 2016).

Iako je produkcija cijanotoksina najopasnija komponenta cvetanja cijanobakterija, nije jedini stresni faktor za ribe. Pored cijanotoksina, niske koncentracije kiseonika, visok pH i visoke koncentracije amonijaka koje su posledica cvetanja cijanobakterija mogu da imaju veoma negativan efekat na ribe. Usled delovanja hipoksije, ribe ubrzavaju brzinu ventilacije (Heath, 1995) i dolazi do preuređivanja unutar škrge gde se interlamelarna masa ćelija povlači i dolazi do povećanje respiratorne površine (Nilsson, 2007), a samim tim dolazi i do povećane apsorpcije toksičnih materija. Sa druge strane, jedan od osnovnih odbrambenih mehanizama škrge od toksičnih materija (uključujući i cijanotoksine) jeste hiperplazija interlamelnog epitela, odlublivanje epitela i posledično smanjenje respiratorne površine. Ukoliko je delovanje toksičnih materija kontinuirano, i ribe konstantno održavaju minimalnu respiratornu površinu (fuzijom lamela) kao što je pokazano u ovom istraživanju na jezerima Ludaš i Kiš-Balaton, akutna hipoksija uzrokovana urušavanjem cvetanja cijanobakterija može da dovede do masovnog uginuća riba. Amonijak i visok pH najčešće imaju sinergistički efekat s obzirom da je koncentracija toksične nejonizovane forme amonijaka veća pri većoj pH (Heath, 1995). Ova forma može lako da difunduje kroz škrge, i time se povećava koncentracija u krvi koja može da postane toksična (Burdick *i sar.*, 2020b). Stoga, cvetanje cijanobakterija može da ima mnogo veće negativno dejstvo na ribe, i smatra se da je dejstvo cijanotoksina na ribe generalno subakutno, ali da do mortaliteta može da dođe usled sinergističkog delovanja nekoliko stresogenih faktora uzrokovanih cvetanjem cijanobakterija (Jos *i sar.*, 2017).

#### 5.4.5 Potencijalni zdravstveni rizici uzrokovani cvetanjem cijanobakterija

U predhodnim poglavljima je detaljno objašnjena pojava cvetanja cijanobakterija, i uticaj ove pojave na životnu sredinu i ribe. Međutim, cvetanje cijanobakterija i prisustvo cijanotoksina ne predstavljaju opasnost i zdravstveni rizik samo za organizme koji naseljavaju cvetajuće ekosisteme, već za sve organizme koji koriste vodu ovakvih ekosistema, uključujući i ljude (Drobac, 2015; Svirčev *i sar.*, 2017a; Codd *i sar.*, 2020). Ekosistemi analizirani u ovom

istraživanju su veoma važni za rekreaciju ljudi, ribolov, vodosnabdevanje, te izlaganje ljudi cijanotoksinima korišćenjem ovih ekosistema može biti veoma izvesno. Jezero Balaton je najvažniji rekreativni ekosistem Mađarske i koristi se za rekreaciju, ribolov, navodnjavanje. Jezero Fehervarčurgo se koristi za rekreaciju i ribolov, dok se Ludaš kao Specijalni rezervat prirode koristi samo za ribolov. S obzirom da je sistem Kiš-Balaton zaštićeno prirodno dobro, korišćenje ovog ekosistema nije dozvoljeno.

Ljudi mogu biti izloženi cijanotoksinima preko kontaminirane vode za piće, ishranom vodenim organizmima koji su akumulirali cijanotoksine, ishranom kontaminiranog voća i povrća, dermalnim kontaktom tokom rekreativnih aktivnosti u cvetajućim ekosistemima, konzumiranjem dijetetskih suplemenata na bazi cijanobakterija, intravenozno tokom dijalize (Drobac, 2015; Svirčev *i sar.*, 2017a; Codd *i sar.*, 2020). Shodno načinima na koje se analizirani ekosistemi koriste, najverovatniji putevi izlaganja među prethodno pomenutim su preko kontaminirane hrane i dermalnim kontaktom tokom rekreativnih aktivnosti.

Jezeru Ludaš, Balaton i Fehervarčurgo su redovno posećivani od strane lokalnih ribolovaca. Na osnovu dostupnih podataka otkriveno je da se kumulativna izloženost ribolovaca kontaminiranoj vodi (direktni dermalni kontakt, inhalacija, oralno) i hrani može pretvoriti u vrstu trovanja sa dugoročnim posledicama. Takav ishod je demonstriran kroz biohemijske promene biomarkera oštećenja jetre kod ribara i dece koja su pored vode konzumirala patke, ribu, škampe, puževe i druge vodene organizme uzgajane u cvetajućim jezerima u Kini (Chen *i sar.*, 2009a; Li *i sar.*, 2011). U ovim studijama je pokazano da je MC bio prisutan u serumu ribara koji su lovili ribu na cvetajućim jezerima i da su koncentracije MC-a kod ovih ljudi značajno veće u poređenju sa ljudima koji nisu bili izlagani cvetanju. Takođe je pokazano da su ovi ljudi imali veću incidencu kancera. Akumulacija cijanotoksina je zabeležena i u konzumnoj ribi izlovljenoj na jezeru Pamvotis u Grčkoj (Kagalou *i sar.*, 2008), jezeru Albufera u Španiji (Romo *i sar.*, 2012), ribnjacima Egipta (Mohamed *i sar.*, 2003), jezerima Brazila (Deblois *i sar.*, 2008) i drugim, te ishrana ovom ribom može da dovede do intoksikacija cijanotoksinima.

Pored ishrane kontaminiranom hranom, direktan kontakt sa cijanotoksinima tokom rekreacije je jedan od glavnih načina izlaganja ljudi. Postoji nekoliko načina na koji ljudi mogu biti izloženi cijanotoksinima tokom rekreacije. Naravno, direktan kontakt kožom je prvi i osnovni način, i on može da izazove osip, alergijske reakcije, iritacije očiju, konjuktivitis, groznicu, malaksalost, zapaljenje uha i drugo (Drobac, 2015). Takođe tokom rekreacije može da dođe i do gutanja kontaminirane vode što može da izazove povraćanje, dijareju, bolove u stomaku, infekcije uho-grlo-nos i drugo (Dillenberg i Dehnel, 1960; Carmichael, 1994). U



Australiji je npr. registrovano više od 850 pacijenata sa blažim posledicama nakon rekreacije u cvetajućim ekosistemima (Pilotto *i sar.*, 1997). Pored navedenog, cijanotoksini su detektovani i u aerosolu iznad cvetajućih ekosistema (Wood i Dietrich, 2011; Codd *i sar.*, 2020). Nakon rekreacije u cvetajućoj vodi jezera u Kaliforniji, Backer *i sar.* (2010) su detektovali prisustvo cijanotoksina u brisevima iz nosa i krvnoj plazmi kod 81. čoveka. Kontakt sa cijanotoksinima tokom rekreacije najčešće dovodi do lakših posledica kao što su malaksalost, mučnina, dijareja, osip, i slično (Falconer, 1999; Codd, 2000; Codd *i sar.*, 2005a; Stewart *i sar.*, 2006), međutim, skora istraživanja sprovedena od strane Drobac Backović *i sar.* (2020) pokazuju da postoji potencijalna uzročno-posledična veza između rekreacije u cvetajućoj vodi i pojave melanoma.

Cvetanje cijanobakterija i cijanotoksini mogu da imaju veoma negativan efekat na životnu sredinu, kao i na zdravlje ljudi koji su u neposrednom kontaktu sa cvetajućim ekosistemima, te je neophodno razviti načine sprečavanja izlaganja ljudi cvetanju cijanobakterija. Prema Codd *i sar.* (2020), postoji nekoliko koraka ka razvijanju strategije smanjenja ili sprečavanja izlaganja ljudi cijanobakterijama, a to su: (1) poznavanje prethodnih incidenzi intoksikacija na datom lokalitetu; (2) predznanje o istoriji cvetanja cijanobakterija i produkcije cijanotoksina na datom lokalitetu; (3) predviđanje budućih cvetanja cijanobakterija u datom ekosistemu i u kojim mesecima cvetanje može da se očekuje; i (4) upotreba savremenih znanja i metoda upravljanja ekosistemima, o cvetanju cijanobakterija, kao i o merama poboljšanja kvaliteta ekosistema. Jedan od prvih koraka ka poznavanju istorije cvetanja cijanobakterija jeste pravljanje nacionalnih, ali i međunarodnih baza koje će sumirati izveštaje o cvetanjima cijanobakterija, pojavi cijanotoksina, kao i o mogućim intoksikacijama ljudi ili životinja. U Srbiji je takva baza već napravljena (Svirčev *i sar.*, 2017b), dok u Mađarskoj još uvek ne postoji. Regularan monitoring lokaliteta na kojima je dolazilo do cvetanja je neophodan. Kao što je već predloženo, tokom monitoringa je poželjno ispitati taksone cijanobakterija koji su prisutni, potencijal detektovanih sojeva za produkciju cijanotoksina (prvenstveno testiranjem prisustva gena za cijanotoksin-sintetaze), kao i kvantifikacija samih cijanotoksina i njihovih strukturnih varijanti u vodi datog lokaliteta. Takođe, neophodna je edukacija i širenje svesti o postojanju problema cijanobakterija i cijanotoksina kako među upravljačima ekosistema, tako i među lokalnim stanovništvom. Na ovaj način je moguće razviti neophodne načine upravljanja cvetajućim ekosistemima, kao i prevencije eutrofizacije, kako bi se sprečili negativni efekti koje kontakt sa cvetajućim ekosistemima može da donese.

## 6 Zaključci

Na osnovu ispitivanja fizičko-hemijskih parametara vode, kvalitativnog i kvantitativnog sastava zajednice cijanobakterija, prisustva cijanotoksin-kodirajućih gena u biomasi, prisustva cijanotoksina u vodi i tkivima riba, kao i uticaja cvetanja cijanobakterija na ribe pomoću histoloških, molekularnih i biohemijskih metoda na jezerima Ludaš, Kiš-Balaton, Balaton i Fehervarčurgo tokom 2018. i 2019. godine, došlo se do sledećih zaključaka:

- Voda jezera Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo je bila lošeg kvaliteta, i imala je karakteristike eutrofnih ekosistema, dok je voda jezera Balaton oligomezotrofnog karaktera. U cvetajućim ekosistemima je primećeno da su fizičko-hemijski parametri vode bili povezani sa cvetanjem i brojem cijanobakterija, i oslikavali su standardnu dinamiku interakcije broja ćelija i parametara vode;
- Intenzivno cvetanje cijanobakterija je primećeno u jezerima Ludaš, Kiš-Balaton i Fehervarčurgo, dok je koncentracija cijanobakterija jezera Balaton (~30.000 ćelija/ml) blago premašivala graničnu vrednost niskog rizika po zdravlje ljudi (20.000 ćelija/ml) predloženu od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2003). Vrste cijanobakterija zabeležene u analiziranim ekosistemima (prevažodno vrste rodova *Microcystis*, *Aphanizomenon* i *Dolichospermum*) su kosmopolitske vrste i često se javljaju u ekosistemima umerenog pojasa, a u jezeru Ludaš je primećeno i prisustvo invazivne vrste *Raphidiopsis raciborskii*;
- U biomasi cijanobakterija svih analiziranih lokaliteta su amplifikovani gen klastera za MC-sintetazu (*mcyE*) i gen klastera za STX-sintetazu (*sxtG*), dok geni za CYN- (*cyrJ*) i ATX- (*anaC*) sintetazu nisu amplifikovani ni na jednom lokalitetu;
- Različite strukturne varijante MC-a su kvantifikovane u jezerima Ludaš (4 varijante), Kiš-Balaton (5 varijanti) i Fehervarčurgo (1 varijanta), dok u jezeru Balaton nije kvantifikovan MC. CYN nije kvantifikovan ni na jednom analiziranom lokalitetu. MC ni CYN nisu izmereni u tkivima riba ni jednog analiziranog lokaliteta;
- Intenzivne histopatološke promene jetre, bubrega i škrge su primećene kod riba izlovljenih na jezerima Ludaš i Kiš-Balaton, dok su promene pomenutih organa riba iz jezera Fehervarčurgo bile niskog intenziteta, a kod riba iz jezera Balaton nisu beležene. Promene jetre i bubrega su bile najintenzivnije na jezerima Ludaš i Kiš-Balaton, dok su promene škrge bile najintenzivnije na jezeru Kiš-Balaton u poređenju sa ostalim lokalitetima. Histopatološke promene creva, slezine, gonada i mišića nisu zabeležene ni na jednom od analiziranih lokaliteta. Polukvantitativna analiza je omogućila

statističku potvrdu deskriptivne analize, ali i poređenje intenziteta promena između različitih lokaliteta. Zapažene promene su bile slične promenama uočenim i u drugim istraživanjima delovanja cijanotoksina na ribe u laboratorijskim i prirodnim uslovima i ukazivale su na verovatno toksično dejstvo MC-a;

- Kod riba iz jezera Kiš-Balaton tokom 2019. godine nije primećena fragmentacija DNK, dok zbog tehničkih problema nije bilo moguće utvrditi uticaj cvetanja cijanobakterija na metilaciju DNK. U jetri, škragama i gonadama ovih riba su ustanovljene promene u aktivnosti enzima uključenih u proces detoksikacije, kao i u aktivnosti antioksidativnih enzima. Lipidna peroksidacija i promene aktivnosti antioksidativnih enzima su ukazivale na oksidativni stres u ispitivanim organima ovih riba.

Ovakvim pristupom, disertacija je potvrdila da:

- Zaštita jezera Ludaš kao specijalnog rezervata prirode je veoma diskutabilna s obzirom da se trenutnom zaštitom omogućava kontinuitet cvetanja cijanobakterija i održava veoma loš kvalitet vode. Međutim, u ovom trenutku se ne nazire jasno rešenje s obzirom da većina mera ameliorizacije kvaliteta vode i suzbijanja cvetanja cijanobakterija koje su testirane u drugim istraživanjima nisu bile efektivne. Stoga, nastavak monitoringa ovog ekosistema je neophodan, i potreban je novi sveobuhvatni i holistički pristup kako bi se došlo do rešenja lošeg kvaliteta vode i kontinuiranog cvetanja cijanobakterija u ovom važnom ekosistemu.
- Rekonstrukcija sistema Kiš-Balaton ima vodeću ulogu u očuvanju dobrog kvaliteta vode jezera Balaton. Sistem Kiš-Balaton omogućava zadržavanje nadolazećih nutrijenata iz reke Zala čime dolazi do veoma intenzivnog cvetanja cijanobakterija i iskorišćavanje ovih nutrijenata unutar sistema, a pre ulivanja u jezero Balaton. Ovim se sprečava cvetanje toksičnih cijanobakterija unutar jezera Balaton, i omogućava da se ovaj veoma važan ekosistem za Mađarsku slobodno koristi u rekreativne svrhe.
- S obzirom da cijanotoksini nisu kvantifikovani u ribama jezera Fehervarčurgo, korišćenje ove akumulacije za ribolov trenutno deluje opravdano. Međutim, zbog cvetanja cijanobakterija, i prisustva toksičnih sojeva koji potencijalno imaju mogućnost sinteze cijanotoksina, preporučuje se oprez u korišćenju ovog jezera u rekreativne svrhe usled potencijalne opasnosti hroničnog izlaganja cijanotoksinima.

## 7 Literatura

- Ács, A., Kovács, A.W., Csepregi, J.Z., Tőro, N., Kiss, G., Gyori, J., Vehovszky, Á., Kovács, 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.04.019
- Acuña, S., Baxa, D., Teh, S., 2012. Sublethal dietary effects of microcystin producing *Microcystis* on threadfin shad, *Dorosoma petenense*. *Toxicon* 60, 1191–1202. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.08.004
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Hinton, D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 459–464. DOI: 10.1016/0141-1136(89)90284-5
- Adamski, M., Wołowski, K., Kaminski, A., Hindáková, A., 2020. Cyanotoxin cylindrospermopsin producers and the catalytic decomposition process: A review. *Harmful Algae* 98, 101894. DOI: 10.1016/j.hal.2020.101894
- Adeyemo, O.M., Sirén, A.L., 1992. Cardio-respiratory changes and mortality in the conscious rat induced by (+)- and (±)-anatoxin-a. *Toxicon* 30, 899–905. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90388-L
- Aebi, H., 1984. [13] Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- 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. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.02.010
- Ali, H., Khan, E., 2019. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs - Concepts and implications for wildlife and human health. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 25, 1353–1376. DOI: 10.1080/10807039.2018.1469398
- Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B., Gonzalez, C., 2006. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta* 69, 302–322. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.09.043
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L., 2018. Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 7, 8.

DOI: 10.1038/s41389-017-0025-3

- Antal, O., Karisztl-Gácsi, M., Farkas, A., Kovács, A., Ács, A., Tőro, N., Kiss, G., Saker, M.L., Gyori, J., Bánfalvi, G., Vehovszky, Á., 2011. Screening the toxic potential of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Lake Balaton, Hungary. *Toxicon* 57, 831–840. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.02.007
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M., 2008. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 52, 1–12. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.05.009
- Atencio, Loyda, Moreno, I., Prieto, A.I., Moyano, R., Molina, A.M., Cameán, A.M., 2008. Acute effects of microcystins MC-LR and MC-RR on acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Toxicol. Pathol.* 36, 449–458. DOI: 10.1177/0192623308315356
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817–834. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.032
- Axelsson, L., 1988. Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae. *Mar. Biol.* 97, 287–294. DOI: 10.1007/BF00391314
- Backer, L.C., McNeel, S. V., Barber, T., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B., Nierenberg, K., Aubel, M., LePrell, R., Chapman, A., Foss, A., Corum, S., Hill, V.R., Kieszak, S.M., Cheng, Y.S., 2010. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* 55, 909–921. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.07.006
- Ballot, A., Scherer, P.I., Wood, S.A., 2018. Variability in the anatoxin gene clusters of *Cuspidothrix issatschenkoi* from Germany, New Zealand, China and Japan. *PLoS One* 13, e0200774. DOI: 10.1371/journal.pone.0200774
- Beattie, K.A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S., 2003. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62, 219–226. DOI: 10.1016/S0166-445X(02)00091-7
- Beiras, R., 2018. Biotransformation, in: Beiras, R. (Ed.), *Marine Pollution*. Elsevier, pp. 205–214. DOI: 10.1016/b978-0-12-813736-9.00012-x
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P., 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00029-

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquaculture pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- Berry, J., Gantar, M., Perez, M., Berry, G., Noriega, F., 2008. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Mar. Drugs* 6, 117–146. DOI: 10.3390/md6020117
- Beversdorf, L.J., Miller, T.R., McMahon, K.D., 2013. The role of nitrogen fixation in cyanobacterial bloom toxicity in a temperate, eutrophic lake. *PLoS One* 8, e56103. DOI: 10.1371/journal.pone.0056103
- Bhagowati, B., Ahamad, K.U., 2019. A review on lake eutrophication dynamics and recent developments in lake modeling. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 19, 155–166. DOI: 10.1016/j.ecohyd.2018.03.002
- Bíró, P., 2000. Long-term changes in Lake Balaton and its fish populations. *Adv. Ecol. Res.* 31, 599–613. DOI: 10.1016/s0065-2504(00)31032-7
- Bittner, M., Štern, A., Smutná, M., Hilscherová, K., Žegura, B., 2021. Cytotoxic and genotoxic effects of cyanobacterial and algal extracts - microcystin and retinoic acid content. *Toxins (Basel)*. 13, 107. DOI: 10.3390/toxins13020107
- Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B., 2009. Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 36–41. DOI: 10.2478/v10102-009-0006-2
- Blank, C.E., Sánchez-Baracaldo, P., 2010. Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria - a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology* 8, 1–23. DOI: 10.1111/j.1472-4669.2009.00220.x
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lüring, M., Antoniadis, D., Padisák, J., Kruk, C., 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 594–607. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x
- Bornikoel, J., Staiger, J., Madlung, J., Forchhammer, K., Maldener, I., 2018. LytM factor Alr3353 affects filament morphology and cell-cell communication in the multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 108, 187–203. DOI: 10.1111/mmi.13929
- Bos, D.G., Cumming, B.F., Watters, C.E., Smol, J.P., 1996. The relationship between zooplankton, conductivity and lake-water ionic composition in 111 lakes from the Interior

- Plateau of British Columbia, Canada. *Int. J. Salt Lake Res.* 5, 1–15. DOI: 10.1007/BF01996032
- Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M.G., Newton, W.E., 2010. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 529–551. DOI: 10.1128/membr.00033-10
- Bouaïcha, N., Miles, C., Beach, D., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N., Nguyen-Quang, T., 2019. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins (Basel)*. 11, 714. DOI: 10.3390/toxins11120714
- 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. *Toxicon* 21, 45–48. DOI: 10.1016/0041-0101(83)90151-4
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Branković, D., Budakov, L., Sekulić, N., 1998. Fitoplankton kao indikator saprobioloških karakteristika vode nekih zaštićenih vodenih ekosistema. *Zaštita Prir.* 50, 291–296.
- Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 91, 1049–1130. DOI: 10.1007/s00204-016-1913-6
- Burdick, S.M., Hereford, D.M., Conway, C.M., Banet, N. V., Powers, R., Martin, B.A., Elliott, D.G., 2020a. Mortality of endangered juvenile Lost River suckers associated with cyanobacteria blooms in mesocosms in Upper Klamath Lake, Oregon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 149, 245–265. DOI: 10.1002/tafs.10227
- Burdick, S.M., Hewitt, D.A., Martin, B.A., Schenk, L., Rounds, S.A., 2020b. Effects of harmful algal blooms and associated water-quality on endangered Lost River and shortnose suckers. *Harmful Algae* 97, 101847. DOI: 10.1016/j.hal.2020.101847
- Burford, M.A., Beardall, J., Willis, A., Orr, P.T., Magalhaes, V.F., Rangel, L.M., Azevedo, S.M.F.O.E., Neilan, B.A., 2016. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 54, 44–53. DOI: 10.1016/j.hal.2015.10.012
- Burke, M.D., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2, 583–588.

- Burkholder, J.M., 2009. Harmful algal blooms, in: Likens, G.E. (Ed.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier Inc., pp. 264–285. DOI: 10.1016/B978-012370626-3.00239-8
- Burns, J.M., Hall, S., Ferry, J.L., 2009. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in fresh and saline waters. *Water Res.* 43, 1899–1904. DOI: 10.1016/j.watres.2009.02.004
- Bury, N., Flik, G., Eddy, F., Codd, G., 1996. The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on  $\text{Ca}^{2+}$  transport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in tilapia gills. *J. Exp. Biol.* 199, 1319–1326.
- Caixach, J., Flores, C., Spooof, L., Meriluoto, J., Schmidt, W., Mazur-Marzec, H., Hiskia, A., Kaloudis, T., Furey, A., 2017. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, in: Meriluoto, J., Spooof, L., Codd, G.A. (Eds.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 218–257. DOI: 10.1002/9781119068761.ch23
- Calado, S.L. de M., Wojciechowski, J., Santos, G.S., Magalhães, V.F. de, Padial, A.A., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C. da, 2017. Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health. *Toxicon* 126, 12–22. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.12.002
- Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 268–287. DOI: 10.3390/ijms11010268
- 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. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1996.tb00126.x
- Carbis, C.R., Tawlin, 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.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41206-4
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 78–86. DOI: 10.1038/scientificamerican0194-78
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–459. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x
- Carmichael, W.W., Beasley, V., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K. ichi, Krishnamurthy, T., Min-Juan, Y., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M.,



- Skulberg, O.M., Watanabe, M., 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26, 971–973. DOI: 10.1016/0041-0101(88)90195-X
- Carpenter, S.R., 2008. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11039–11040.
- Carvalho, L., McDonald, C., de Hoyos, C., Mischke, U., Phillips, G., Borics, G., Poikane, S., Skjelbred, B., Solheim, A.L., Van Wichelen, J., Cardoso, A.C., 2013. Sustaining recreational quality of European lakes: minimizing the health risks from algal blooms through phosphorus control. *J. Appl. Ecol.* 50, 315–323. DOI: 10.1111/1365-2664.12059
- Carvalho, L., Miller, C.A., Scott, E.M., Codd, G.A., Davies, P.S., Tyler, A.N., 2011. Cyanobacterial blooms: Statistical models describing risk factors for national-scale lake assessment and lake management. *Sci. Total Environ.* 409, 5353–5358. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.030
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.D.L.Á., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178–190. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.08.002
- Chellappa, N.T., Chellappa, S.L., Chellappa, S., 2008. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 51, 833–841. DOI: 10.1590/S1516-89132008000400022
- Chen, G., Wang, L., Wang, M., Hu, T., 2021. Comprehensive insights into the occurrence and toxicological issues of nodularins. *Mar. Pollut. Bull.* 162, 111884. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111884
- Chen, J., Xie, P., Li, L., Xu, J., 2009a. 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. DOI: 10.1093/toxsci/kfp009
- Chen, J., Zhang, D., Xie, P., Wang, Q., Ma, Z., 2009b. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Sci. Total Environ.* 407, 3317–3322. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.005
- Chen, T., Cui, J., Liang, Y., Xin, X., Owen Young, D., Chen, C., Shen, P., 2006. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology* 220, 71–80. DOI: 10.1016/j.tox.2005.12.001
- Chen, Y., Zeng, S.F., Cao, Y.F., 2012. Oxidative stress response in zebrafish (*Danio rerio*) gill

- experimentally exposed to subchronic microcystin-LR. *Environ. Monit. Assess.* 184, 6775–6787. DOI: 10.1007/s10661-011-2457-0
- Chiang, M.W.-L., Au, D.W.-T., 2013. Histopathological approaches in ecotoxicology, in: Féraud, J.-F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 597–614. DOI: 10.1007/978-94-007-5704-2\_56
- Chong, M.W.K., Wong, B.S.F., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Seawright, A.A., 2002. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicol.* 40, 205–211. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00228-8
- Christensen, V.G., Khan, E., 2020. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. *Sci. Total Environ.* 736, 139515. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139515
- Christiansen, G., Molitor, C., Philmus, B., Kurmayer, R., 2008. Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1695–1704. DOI: 10.1093/molbev/msn120
- Cirés, S., Ballot, A., 2016. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria). *Harmful Algae* 54, 21–43. DOI: 10.1016/j.hal.2015.09.007
- Ćirić, M., Gavrilović, B., Dojčinović, B., Reh, S.Č., Zhou, Y., Song, C., Cao, X., 2020. Past studies and potential measures for rehabilitation of the shallow lake (Lake Ludaš). *J. Geogr. Inst. "Jovan Cvijić"* 70, 71–80. DOI: 10.2298/IJGI2001071C
- Ćirić, M., Marković, Z., Dulić, Z., Subakov-Simić, G., 2010. First report of cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from carp ponds in Serbia, in: *The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8)*. Istanbul, Turkey, p. 14.
- Clarke, P.B.S., Reuben, M., 1996. Release of [<sup>3</sup>H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: Mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [<sup>3</sup>H]-dopamine release. *Br. J. Pharmacol.* 117, 595–606. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15232.x
- Clement, A., Somlyódy, L., Koncsos, L., 1998. Modeling the phosphorus retention of the Kis-Balaton upper reservoir. *Water Sci. Technol.* 37, 113–120. DOI: 10.1016/S0273-1223(98)00062-6
- Codd, G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 16, 51–60. DOI: 10.1016/S0925-8574(00)00089-6
- Codd, G., Metcalf, J., Morrison, L., Krienitz, L., Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K., 2003. Susceptibility of flamingos to cyanobacterial toxins via feeding. *Vet.*

- Rec. 152, 722–723.
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005a. Harmful cyanobacteria, in: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer-Verlag, pp. 1–23. DOI: 10.1007/1-4020-3022-3\_1
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005b. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 264–272. DOI: 10.1016/j.taap.2004.02.016
- Codd, G.A., Testai, E., Funari, E., Svirčev, Z., 2020. Cyanobacteria, cyanotoxins, and human health, in: Hiskia, A.E., Triantis, T.M., Antoniou, M.G., Kaloudis, T., Dionysiou, D.D. (Eds.), *Water Treatment for Purification from Cyanobacteria and Cyanotoxins*. Wiley, pp. 37–68. DOI: 10.1002/9781118928677.ch2
- Colas, S., Marie, B., Lance, E., Quiblier, C., Tricoire-Leignel, H., Mattei, C., 2021. Anatoxina: Overview on a harmful cyanobacterial neurotoxin from the environmental scale to the molecular target. *Environ. Res.* 193, 110590. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110590
- Čomić Lj, Ranković B., 1991. Changes in bacteria population and phytoplankton and their relationships in accumulative Lake Gruža, in: Burchardt, L. (Ed.), *Seria Biologia: Evolution of Freshwater Lakes*. Adam Mickijevicz University Press, Poznan, Poland, pp. 129–139.
- Commandeur, J.N., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* 47, 271–330.
- Conley, D.J., Paerl, H.W., Howarth, R.W., Boesch, D.F., Seitzinger, S.P., Havens, K.E., Lancelot, C., Likens, G.E., 2009. Controlling eutrophication: phosphorus and nitrogen. *Science (80-. )*. 323, 1014–1015.
- Cooper, A.J.L., Hanigan, M.H., 2010. Enzymes involved in processing glutathione conjugates, in: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology*, Second Edition. pp. 323–366. DOI: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00417-6
- Craig, M., Luu, H.A., McCready, T.L., Williams, D., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B., 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochem. Cell Biol.* 74, 569–578. DOI: 10.1139/o96-061
- Crapo, J.D., McCord, J.M., Fridovich, I., 1978. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 53, 382–393. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)53044-9
- Cusick, K.D., Sayler, G.S., 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics,

- molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar. Drugs* 11, 991–1018. DOI: 10.3390/md11040991
- Cvijan, M., 2013. Algologija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Cvijan, M., Fužinato, S., 2012. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota) - potential invasive and toxic species in Serbia. *Bot. Serbica* 36, 3–8.
- Davies, W.R., Siu, W.H.L., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., Nugegoda, D., 2005. Comparative effects of the blue green algae *Nodularia spumigena* and a lysed extract on detoxification and antioxidant enzymes in the green lipped mussel (*Perna viridis*). *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1026–1033. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.01.008
- 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.10.017
- Dekant, W., 2009. The role of biotransformation and bioactivation in toxicity, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Birkhäuser Basel, pp. 57–86. DOI: 10.1007/978-3-7643-8336-7\_3
- Dillenberg, H.O., Dehnel, M.K., 1960. Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can. Med. Assoc. J.* 83, 1151–1154.
- Ding, W.-X., Nam Ong, C., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 1–7. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00100-9
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2001. Pivotal role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1155–1161. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5309
- Dittman, E., Mankiewicz-Boczek, J., Gaęala, I., 2017. SOP 6.2: PCR detection of microcystin and nodularin biosynthesis genes in the cyanobacterial orders Oscillatoriales, Chroococcales, Stigonematales, and Nostocales, in: Kurmayer, R., Sivonen, K., Wilmotte, A., Salmaso, N. (Eds.), *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxicogenic Cyanobacteria*. John Willey & Sons, Ltd., Chichester, UK, pp. 175–178.
- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T., Thornbrugh, D.J., 2009. Eutrophication of U. S. freshwaters: Analysis of potential economic damages. *Environ. Sci. Technol.* 43, 12–19. DOI: 10.1021/es801217q
- Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., Wiedner, C., 2012. Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* 7, e38757. DOI: 10.1371/journal.pone.0038757

- Dömötörfy, Z., Reeder, D., Pomogyi, P., 2003. Changes in the macro-vegetation of the Kis-Balaton Wetlands over the last two centuries: A GIS perspective. *Hydrobiologia* 506–509, 671–679. DOI: 10.1023/B:HYDR.0000008598.56151.5e
- Dorđević, N., 2021. Uticaj promena ekoloških faktora na sastav i dinamiku fitoplanktonskih cijanobakterija (Cyanobacteria) u malim akumulacijama. Univerzitet u Kragujevcu.
- Dorđević, N., Simić, S., 2014. Cyanobacterial blooms in oligosaline and alkaline microaccumulation before and after rehabilitation. *Polish J. Environ. Stud.* 23, 1975–1982.
- Dorđević, N., Simić, S., Ćirić, A., 2015. First identification of the cylindrospermopsin (CYN) producing by cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju in Serbia. *Fresenius Environ. Bull.* 24, 3736–3742.
- Dorđević, N.B., Matić, S.L., Simić, S.B., Stanić, S.M., Mihailović, V.B., Stanković, N.M., Stanković, V.D., Ćirić, A.R., 2017. Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats *in vivo*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 14259–14272. DOI: 10.1007/s11356-017-8940-6
- Douglas, P., Moorhead, G.B.G., Ye, R., Lees-Miller, S.P., 2001. Protein Phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* 276, 18992–18998. DOI: 10.1074/jbc.M011703200
- Drobac Backović, D., Tokodi, N., Nikolin, B., Svirčev, Z., 2020. Cyanobacteria - Insidious foe of the skin? *J. Water Health* 18, 314–330. DOI: 10.2166/wh.2020.001
- Drobac, D., 2015. Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima i njihov uticaj na zdravlje. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Drobac, D., Tokodi, N., Lujić, J., Marinović, Z., Subakov-Simić, G., Dulić, T., Važić, T., Nybom, S., Meriluoto, J., Codd, G.A., Svirčev, Z., 2016. Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae* 55, 66–76. DOI: 10.1016/j.hal.2016.02.007
- Du, X., Liu, H., Yuan, L., Wang, Y., Ma, Y., Wang, R., Chen, X., Losiewicz, M.D., Guo, H., Zhang, H., 2019. The diversity of cyanobacterial toxins on structural characterization, distribution and identification: A systematic review. *Toxins (Basel)*. 11, 530. DOI: 10.3390/toxins11090530
- 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 “Ludoš.” *Zb. Rad. Instituta za Biol.* 31, 73–75.
- Dvořák, P., Pouličková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D.A., Papini, A., 2015. Species

- concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodivers. Conserv.* 24, 739–757. DOI: 10.1007/s10531-015-0888-6
- Dziga, D., Tokodi, N., Drobac, D., Kokociński, M., Antosiak, A., Puchalski, J., Strzałka, W., Madej, M., Svirčev, Z., Meriluoto, J., 2019. The effect of a combined hydrogen peroxide-MlrA treatment on the phytoplankton community and microcystin concentrations in a mesocosm experiment in Lake Ludoš. *Toxins (Basel)*. 11, 725. DOI: 10.3390/toxins11120725
- Edwards, C., Graham, D., Fowler, N., Lawton, L.A., 2008. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* 73, 1315–1321. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.07.015
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2006. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat. Toxicol.* 79, 31–40. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.04.013
- Falconer, I.R., 1998. Algal toxins and human health, in: Hrubec, J. (Ed.), *Quality and Treatment of Drinking Water II*. pp. 53–82. DOI: 10.1007/978-3-540-68089-5\_4
- 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. DOI: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<5::AID-TOX3>3.0.CO;2-0
- Falconer, I.R., Yeung, D.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. DOI: 10.1016/0009-2797(92)90033-H
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 281–288. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.07.012
- Farkas, M., Kaszab, E., Radó, J., Háhn, J., Tóth, G., Harkai, P., Ferincz, Á., Lovász, Z., Táncsics, A., Vörös, L., Kriszt, B., Szoboszlai, S., 2020. Planktonic and benthic bacterial communities of the largest central European shallow lake, Lake Balaton and its main inflow Zala River. *Curr. Microbiol.* 77, 4016–4028. DOI: 10.1007/s00284-020-02241-7
- Farley, M., 2012. Eutrophication in fresh waters: An international review, in: Bengtsson, L., Herschy, R.W., Fairbridge, R.W. (Eds.), *Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer Netherlands, pp. 258–270. DOI: 10.1007/978-1-4020-4410-6\_79
- Farrington, J.W., 1991. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic

- pollutant compounds in aquatic organisms. *Environ. Health Perspect.* 90, 75–84.
- Fastner, J., Abella, S., Litt, A., Morabito, G., Vörös, L., Pálffy, K., Straile, D., Kümmerlin, R., Matthews, D., Phillips, M.G., Chorus, I., 2016. Combating cyanobacterial proliferation by avoiding or treating inflows with high P load - experiences from eight case studies. *Aquat. Ecol.* 50, 367–383. DOI: 10.1007/s10452-015-9558-8
- Ferrão-Filho, A.D.S., Kozłowsky-Suzuki, B., 2011. Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Mar. Drugs* 9, 2729–2772. DOI: 10.3390/md9122729
- Fessard, V., Bernard, C., 2003. Cell alterations but no DNA strand breaks induced *in vitro* by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environ. Toxicol.* 18, 353–359. DOI: 10.1002/tox.10136
- 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. DOI: 10.1016/j.taap.2008.10.011
- Figueredo, C.C., Giani, A., 2009. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologia* 39, 264–272. DOI: 10.1016/j.limno.2009.06.009
- Filho, D.W., 1996. Fish antioxidant defenses - A comparative approach. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 29, 1735–1742.
- Firkins, G.S., 1953. Toxic algae poisoning. *Iowa State Univ. Vet.* 15, 5.
- Fischer, A., Hoeger, S.J., Stemmer, K., Feurstein, D.J., Knobeloch, D., Nussler, A., Dietrich, D.R., 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 9–20. DOI: 10.1016/j.taap.2010.02.006
- Fischer, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73–81. DOI: 10.1006/taap.1999.8861
- 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, 257–263. DOI: 10.1016/j.taap.2004.08.012
- Flores, N.M., Miller, T.R., Stockwell, J.D., 2018. A global analysis of the relationship between concentrations of microcystins in water and fish. *Front. Mar. Sci.* 5, 30. DOI: 10.3389/fmars.2018.00030
- Foss, A.J., Butt, J., Fuller, S., Cieslik, K., Aubel, M.T., Wertz, T., 2017. Nodularin from benthic

- freshwater periphyton and implications for trophic transfer. *Toxicon* 140, 45–59. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.10.023
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18, 243–251. DOI: 10.1002/tox.10121
- Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N., Zambrano, F., 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* 32, 121–127. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90028-0
- Gagné, F., 2014. Oxidative stress, in: Gagné, F. (Ed.), *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*. Elsevier Inc., pp. 103–115. DOI: 10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4
- Gajin, S., Gantar, M., Petrović, O., Matavulj, M., 1983. Procena stanja vode nekih vojvođanskih jezera na osnovu mikrobioloških pokazatelja, in: *Zbornik Radova Konferencije o Akutelnim Problemima Zaštite Voda “Zaštita Voda '83.”* Opatija, Hrvatska, pp. 49–54.
- Garcia, C.Z., Martinez, C.B.R., 2012. Biochemical and genetic alterations in the freshwater neotropical fish *Prochilodus lineatus* after acute exposure to *Microcystis aeruginosa*. *Neotrop. Ichthyol.* 10, 613–622. DOI: 10.1590/S1679-62252012000300015
- Gaudin, J., Huet, S., Jarry, G., Fessard, V., 2008. *In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 652, 65–71. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.10.024
- Gavrilović, B.R., Petrović, T.G., Radovanović, T.B., Despotović, S.G., Gavrić, J.P., Krizmanić, I.I., Ćirić, M.D., Prokić, M.D., 2021. Hepatic oxidative stress and neurotoxicity in *Pelophylax* kl. *esculentus* frogs: Influence of long-term exposure to a cyanobacterial bloom. *Sci. Total Environ.* 750, 141569. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141569
- Gaysina, L.A., Saraf, A., Singh, P., 2019. Cyanobacteria in diverse habitats, in: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Eds.), *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Ltd., pp. 1–28. DOI: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5
- Gehringer, M.M., Adler, L., Roberts, A.A., Moffitt, M.C., Mihali, T.K., Mills, T.J.T., Fieker, C., Neilan, B.A., 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized *in planta* by symbiotic *Nostoc* sp. *ISME J.* 6, 1834–1847. DOI: 10.1038/ismej.2012.25
- Gerba, C.P., 2019. Environmental toxicology, in: Brusseau, M.L., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (Eds.), *Environmental and Pollution Science*. Elsevier, pp. 511–540. DOI: 10.1016/B978-



0-12-814719-1.00028-8

- Gertsch, J., 2007. Glutathione-S-transferase, in: Enna, S.J., Bylund, D.B. (Eds.), *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier Inc., pp. 1–17. DOI: 10.1016/B978-008055232-3.60523-9
- Gobas, F.A.P.C., Muir, D.C.G., Mackay, D., 1988. Dynamics of dietary bioaccumulation and faecal elimination of hydrophobic organic chemicals in fish. *Chemosphere* 17, 943–962. DOI: 10.1016/0045-6535(88)90066-5
- Gobler, C.J., Burkholder, J.A.M., Davis, T.W., Harke, M.J., Johengen, T., Stow, C.A., Van de Waal, D.B., 2016. The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 54, 87–97. DOI: 10.1016/j.hal.2016.01.010
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 22, 287–311. DOI: 10.1016/0166-445X(92)90046-P
- Gong, Z., Xie, P., 2001. Impact of eutrophication on biodiversity of the macrozoobenthos community in a chinese shallow lake. *J. Freshw. Ecol.* 16, 171–178. DOI: 10.1080/02705060.2001.9663802
- Goodman, K.M., Hay, M.E., 2013. Activated chemical defenses suppress herbivory on freshwater red algae. *Oecologia* 171, 921–933. DOI: 10.1007/s00442-012-2455-0
- Governmental Decree No 10/2010. (VIII. 18.) of Ministry of Rural Development (VM) on defining the rules for establishment and use of water pollution limits of surface water. [WWW Document], 2010.
- Graham, J.L., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Ziegler, A.C., 2010. Cyanotoxin mixtures and taste-and-odor compounds in cyanobacterial blooms from the midwestern United States. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7361–7368. DOI: 10.1021/es1008938
- Grba, N., Krčmar, D., Maletić, S., Bečelić-Tomin, M., Grgić, M., Pucar, G., Dalmacija, B., 2017. Organic and inorganic priority substances in sediments of Ludaš Lake, a cross-border natural resource on the Ramsar list. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 1938–1952. DOI: 10.1007/s11356-016-7904-6
- Guo, X., Chen, L., Chen, J., Xie, P., Li, S., He, J., Li, W., Fan, H., Yu, D., Zeng, C., 2015. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystin-LR through the glutathione (GSH) pathway in SD rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 19273–19284. DOI: 10.1007/s11356-015-5531-2
- Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V.L., 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice.

- Toxicology 188, 285–296. DOI: 10.1016/S0300-483X(03)00112-4
- Gupta, U.S., Guha, S., 2006. Microcystin toxicity in a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Curr. Sci.* 91, 1261–1271.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto, A.I., Vasconcelos, V.M., Cameán, A.M., 2013. Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 90, 1184–1194. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.027
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases - The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)42083-8
- Hajnal, É., Padisák, J., 2008. Analysis of long-term ecological status of Lake Balaton based on the ALMOBAL phytoplankton database. *Hydrobiologia* 599, 227–237. DOI: 10.1007/s10750-007-9207-x
- Hamilton, D.P., Wood, S.A., Dietrich, D.R., Puddick, J., 2013. Costs of harmful blooms of freshwater cyanobacteria, in: Sharma, N.K., Rai, A.K., Stal, L.J. (Eds.), *Cyanobacteria: An Economic Perspective*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 245–256. DOI: 10.1002/9781118402238.ch15
- 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. DOI: 10.2216/i0031-8884-35-6s-83.1
- Harke, M.J., Davis, T.W., Watson, S.B., Gobler, C.J., 2016a. Nutrient-controlled niche differentiation of western Lake Erie cyanobacterial populations revealed via metatranscriptomic surveys. *Environ. Sci. Technol.* 50, 604–615. DOI: 10.1021/acs.est.5b03931
- Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A., Paerl, H.W., 2016b. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae* 54, 4–20. DOI: 10.1016/j.hal.2015.12.007
- Hatvani, I.G., Kovács, J., Székely Kovács, I., Jakusch, P., Korponai, J., 2011. Analysis of long-term water quality changes in the Kis-Balaton Water Protection System with time series, cluster analysis and Wilks' lambda distribution. *Ecol. Eng.* 37, 629–635. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2010.12.028
- Hatvani, I.G., Clement, A., Kovács, J., Kovács, I.S., Korponai, J., 2014. Assessing water-quality data: The relationship between the water quality amelioration of Lake Balaton and

- the construction of its mitigation wetland. *J. Great Lakes Res.* 40, 115–125. DOI: 10.1016/j.jglr.2013.12.010
- Hatvani, I.G., de Battos, V.D., Tanos, P., Kovács, J., Székely Kovács, I., Clement, A., 2020. Spatiotemporal changes and drivers of trophic status over three decades in the largest shallow lake in Central Europe , Lake Balaton. *Ecol. Eng.* 151, 105861. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2020.105861
- Heath, A.G., 1995. Water pollution and fish physiology, Second edition. ed, *Water Pollution and Fish Physiology, Second Edition.* CRC Press. DOI: 10.1201/9780203718896
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., Jisi, A., Moestrup, Ø., 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach content of poisoned birds. *Toxicon* 35, 901–913. DOI: 10.1016/S0041-0101(96)00190-0
- Hiraga, A., Tamura, S., 2000. Protein phosphatase 2A is associated in an inactive state with microtubules through 2A1-specific interaction with tubulin. *Biochem. J.* 346, 433–439. DOI: 10.1042/0264-6021:3460433
- Hodoki, Y., Ohbayashi, K., Kobayashi, Y., Okuda, N., Nakano, S. ichi, 2012. Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria: Ubiquitous distribution of *Microcystis aeruginosa* and *Cuspidothrix issatschenkoi* in Japanese lakes. *Harmful Algae* 16, 49–57. DOI: 10.1016/j.hal.2012.01.003
- Hooser, S.B., Beasley, V.R., Basgall, E.J., Carmichael, W.W., Haschek, W.M., 1990. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Vet. Pathol.* 27, 9–15. DOI: 10.1177/030098589002700102
- Horvat, M., Horvat, Z., 2020. Implementation of a monitoring approach: the Palic-Ludas lake system in the Republic of Serbia. *Environ. Monit. Assess.* 192, 150. DOI: 10.1007/s10661-019-7927-9
- Horváth, H., Mátyás, K., Süle, G., Présing, M., 2013. Contribution of nitrogen fixation to the external nitrogen load of a water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System, Hungary). *Hydrobiologia* 702, 255–265. DOI: 10.1007/s10750-012-1329-0
- Hou, J., Li, L., Xue, T., Long, M., Su, Y., Wu, N., 2015. Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR. *Chemosphere* 120, 729–736. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.079
- Huang, I.S., Zimba, P. V., 2019. Cyanobacterial bioactive metabolites - A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae* 83, 42–94. DOI: 10.1016/j.hal.2018.11.008
- Hudon, C., 2013. Eutrophication, in: Férard, J.-F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic*

- Ecotoxicology. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 491–498. DOI: 10.1007/978-94-007-5704-2\_46
- Huguet, A., Lanceleur, R., Quenault, H., Le Hégarat, L., Fessard, V., 2019. Identification of key pathways involved in the toxic response of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in human hepatic HepaRG cells. *Toxicol. Vitro*. 58, 69–77. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.03.023
- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H., Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 471–483. DOI: 10.1038/s41579-018-0040-1
- Humpage, A.R., Fontaine, F., Froschio, S., Burcham, P., Falconer, I.R., 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A* 68, 739–753. DOI: 10.1080/15287390590925465
- Ibelings, B.W., Bruning, K., De Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio Pires, L.M., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. *Microb. Ecol.* 49, 487–500. DOI: 10.1007/s00248-004-0014-x
- Isibor, P.O., 2017. Oxidative stress biomarkers in *Clarias gariepinus* (Burchel, 1822) exposed to Microcystin-LR. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 6, 69–75. DOI: 10.1016/j.bjbas.2017.01.005
- Ismael, A.A., 2012. Benthic bloom of cyanobacteria associated with fish mortality in Alexandria waters. *Egypt. J. Aquat. Res.* 38, 241–247. DOI: 10.1016/j.ejar.2013.01.001
- Istvánovics, V., Clement, A., Somlyódy, L., Specziár, A., G.-Tóth, L., Padisák, J., 2007. Updating water quality targets for shallow Lake Balaton (Hungary), recovering from eutrophication. *Hydrobiologia* 581, 305–318. DOI: 10.1007/s10750-006-0509-1
- Janz, D.M., 2013. Biomarkers in fish ecotoxicology, in: Féraud, J.-F., Blaise, C. (Eds.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 211–220. DOI: 10.1007/978-94-007-5704-2\_21
- Jeppesen, E., Søndergaard, M., Jensen, J.P., Havens, K.E., Anneville, O., Carvalho, L., Coveney, M.F., Deneke, R., Dokulil, M.T., Foy, B., Gerdeaux, D., Hampton, S.E., Hilt, S., Kangur, K., Köhler, J., Lammens, E.H.H.R., Lauridsen, T.L., Manca, M., Miracle, M.R., Moss, B., Nöges, P., Persson, G., Phillips, G., Portielje, R., Romo, S., Schelske, C.L., Straile, D., Tatrai, I., Willén, E., Winder, M., 2005. Lake responses to reduced nutrient loading - An analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.* 50, 1747–1771. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x

- Jewel, M.A.S., Affan, M.A., Khan, S., 2003. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan J. Biol. Sci.* 6, 1046–1050. DOI: 10.3923/pjbs.2003.1046.1050
- Jiang, J., Gu, X., Song, R., Zhang, Q., Geng, J., Wang, X., Yang, L., 2011. Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology* 20, 1000–1009. DOI: 10.1007/s10646-011-0646-9
- Jones, G.J., Negri, A.P., 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Res.* 31, 525–533. DOI: 10.1016/S0043-1354(96)00134-0
- Jos, Á., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, I., Cameán, A.M., 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261–271. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.01.003
- Jos, A., Camean, A.M., Akcaalan, R., Albay, M., 2017. The effect of cyanobacteria and their toxins on fish, in: *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*. Bentham Science Publisher, pp. 182–226. DOI: 10.2174/9781681085807117010011
- Jovanović, J., Karadžić, V., Predojević, D., Blagojević, A., Popović, S., Trbojević, I., Subakov Simić, G., 2016. Morphological and ecological characteristics of potentially toxic invasive cyanobacterium *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Forti) Zapomelová, Jezberová, Hrouzek, Hisem, Reháková & Komárková (Nostocales, Cyanobacteria) in Serbia. *Rev. Bras. Bot.* 39, 225–237. DOI: 10.1007/s40415-015-0223-1
- 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, 185–195. DOI: 10.1007/s10661-007-9739-6
- Kangur, K., Kangur, A., Kangur, P., Laugaste, R., 2005. Fish kill in Lake Peipsi in summer 2002 as a synergistic effect of a cyanobacterial bloom, high temperature, and low water level. *Proc. Est. Acad. Sci.* 67–80.
- Kedderis, G.L., 2018. Toxicokinetics: Biotransformation of toxicants, in: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp. 128–142. DOI: 10.1016/b978-0-12-801238-3.01888-2
- Ketterer, B., 2001. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem. Biol. Interact.* 138, 27–42. DOI: 10.1016/S0009-2797(01)00277-0
- Kieninger, A.K., Maldener, I., 2021. Cell–cell communication through septal junctions in

- filamentous cyanobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 61, 35–41. DOI: 10.1016/j.mib.2021.02.002
- Klaassen, C.D., Lu, H., 2008. Xenobiotic transporters: Ascribing function from gene knockout and mutation studies. *Toxicol. Sci.* 101, 186–196. DOI: 10.1093/toxsci/kfm214
- Kleppe, R., Herfindal, L., Doskeland, S.O., 2015. Cell death inducing microbial protein phosphatase inhibitors - Mechanisms of action. *Mar. Drugs.* DOI: 10.3390/md13106505
- Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J.I., Tsuji, A., Tamai, I., 2003. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 703–708. DOI: 10.1124/jpet.103.051300
- Kokociński, M., Mankiewicz-Boczek, J., Jurczak, T., Spoof, L., Meriluoto, J., Rejmonczyk, E., Hautala, H., Vehniäinen, M., Pawełczyk, J., Soininen, J., 2013. *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5243–5264. DOI: 10.1007/s11356-012-1426-7
- Komárek, J., 2013. Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera, in: Budel, B., Gartner, G., Krienitz, L., Schagerl, M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Springer Spektrum Verlag, Heidelberg/Berlin, Germany, pp. 1–1130.
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 1998. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales, in: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Germany, pp. 1–548.
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales, in: Budel, B., Krienitz, L., Gartner, G., Schagerl, M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Germany, pp. 1–759.
- Komárek, J., Komárková, J., 2002. Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Fottea - A J. Czech Phycol. Soc.* 2, 1–24.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K. ichi, 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. DOI: 10.1021/tx00029a002
- Kotak, B.G., Semalulu, S., Fritz, D.L., Prepas, E.E., Hrudey, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34, 517–525. DOI: 10.1016/0041-0101(96)00009-8
- Kovács, J., Hatvani, I.G., Korponai, J., Székely Kovács, I., 2010. Morlet wavelet and

- autocorrelation analysis of long-term data series of the Kis-Balaton water protection system (KBWPS). *Ecol. Eng.* 36, 1469–1477. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2010.06.028
- Kozma Törökné, A., 1999. A new culture-free microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins. *Environ. Toxicol.* 14, 466–472. DOI: 10.1002/(SICI)1522-7278(199912)14:5<466::AID-TOX3>3.0.CO;2-1
- Kramer, V.J., Etterson, M.A., Hecker, M., Murphy, C.A., Roesijadi, G., Spade, D.J., Spromberg, J.A., Wang, M., Ankley, G.T., 2011. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 64–76. DOI: 10.1002/etc.375
- Kretzschmar, M., 1996. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48, 439–446. DOI: 10.1016/S0940-2993(96)80054-6
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Putz, 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. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01053.x
- Kultschar, B., Llewellyn, C., 2018. Secondary metabolites in cyanobacteria, in: Vijayakumar, R., Raja, S.S.S. (Eds.), *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. InTech. DOI: 10.5772/intechopen.75648
- Kumar, K., Mella-Herrera, R.A., Golden, J.W., 2010. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000315. DOI: 10.1101/cshperspect.a000315
- Lang, T., Wosniok, W., Baršienė, J., Broeg, K., Kopecka, J., Parkkonen, J., 2006. Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 488–496. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.11.008
- Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958. DOI: 10.1016/0006-291X(76)90747-6
- Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F., Pannard, A., Souchu, P., Lefebvre, A., Pinay, G., 2019. Eutrophication: A new wine in an old bottle? *Sci. Total Environ.* 651, 1–11. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.139
- Leão, P.N., Vasconcelos, M.T.S.D., Vasconcelos, V.M., 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 271–282. DOI: 10.3109/10408410902823705
- Lei, H., Xie, P., Chen, J., Liang, G., Dai, M., Zhang, X., 2008. Distribution of toxins in various

- tissues of crucian carp intraperitoneally injected with hepatotoxic microcystins. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1174. DOI: 10.1897/07-522.1
- Leibold, M.A., 1999. Biodiversity and nutrient enrichment in pond plankton communities. *Evol. Ecol. Res.* 1, 73–95.
- Li, L., Xie, P., Chen, J., 2007. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. *Toxicon* 49, 1042–1053. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.01.013
- Li, L., Xie, P., Guo, L., Ke, Z., Zhou, Q., Liu, Y., Qiu, T., 2008. Field and laboratory studies on pathological and biochemical characterization of microcystin-induced liver and kidney damage in the phytoplanktivorous bighead carp. *Sci. World J.* 8, 121–137. DOI: 10.1100/tsw.2008.32
- Li, X., Ma, J., Fang, Q., Li, Y., 2013. Transcription alterations of microRNAs, cytochrome P4501A1 and 3A65, and AhR and PXR in the liver of zebrafish exposed to crude microcystins. *Toxicon* 73, 17–22. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.07.002
- Li, X., Dreher, T.W., Li, R., 2016. An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum (Anabaena)* species. *Harmful Algae* 54, 54–68. DOI: 10.1016/j.hal.2015.10.015
- Li, Y., Chen, J. an, Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z., Zhang, R., Shu, W., 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, 1483–1488. DOI: 10.1289/ehp.1002412
- Lin, W., Hou, J., Guo, H., Li, L., Wang, L., Zhang, D., Li, D., Tang, R., 2018. The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish. *Environ. Pollut.* 235, 197–206. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.059
- Liu, J., Sun, Y., 2015. The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Lett.* 236, 1–7. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.04.010
- Liu, J., Wang, H., Wang, B., Chen, T., Wang, X., Huang, P., Xu, L., Guo, Z., 2016. Microcystin-LR promotes proliferation by activating Akt/S6K1 pathway and disordering apoptosis and cell cycle associated proteins phosphorylation in HL7702 cells. *Toxicol. Lett.* 240, 214–225. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.10.015
- Liu, J., Hernández, S.E., Swift, S., Singhal, N., 2018. Estrogenic activity of cylindrospermopsin and anatoxin-a and their oxidative products by Fe<sup>III</sup>-B\*/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Water Res.* 132, 309–319. DOI: 10.1016/j.watres.2018.01.018



- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666. DOI: 10.1016/S0025-326X(01)00060-1
- Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* DOI: 10.1039/b501296c
- López-Torres, M., Pérez-Campo, R., Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G., 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. - Part B Comp. Biochem.* 105, 757–763. DOI: 10.1016/0305-0491(93)90117-N
- Lu, H., Choudhuri, S., Ogura, K., Csanaky, I.L., Lei, X., Cheng, X., Song, P., 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, 35–45. DOI: 10.1093/toxsci/kfn038
- Lugomela, C., Pratap, H.B., Mgya, Y.D., 2006. Cyanobacteria blooms - A possible cause of mass mortality of Lesser Flamingos in Lake Manyara and Lake Big Momela, Tanzania. *Harmful Algae* 5, 534–541. DOI: 10.1016/j.hal.2005.10.001
- Lujić, J., Matavulj, M., Poleksić, V., Rašković, B., Marinović, Z., Kostić, D., Miljanović, B., 2015. 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. *Anat. Histol. Embryol.* 44, 128–137. DOI: 10.1111/ah.12119
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Lyon-Colbert, A., Su, S., Cude, C., 2018. A systematic literature review for evidence of *Aphanizomenon flos-aquae* toxigenicity in recreational waters and toxicity of dietary supplements: 2000–2017. *Toxins (Basel)*. 10, 254. DOI: 10.3390/toxins10070254
- Lyons, B.P., Thain, J.E., Stentiford, G.D., Hylland, K., Davies, I.M., Vethaak, A.D., 2010. Using biological effects tools to define Good Environmental Status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1647–1651. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2010.06.005
- MacKay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. *Environ. Pollut.* 110, 375–391. DOI: 10.1016/S0269-7491(00)00162-7
- 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, 187–192. DOI: 10.1016/0014-

---

5793(90)80245-E

- Magalhães, 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. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00144-2
- Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 72–86. DOI: 10.1897/05-029R.1
- 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.09.003
- Marie, B., Huet, H., Marie, A., Djediat, C., Puiseux-Dao, S., Catherine, A., Trinchet, I., Edery, M., 2012. Effects of a toxic cyanobacterial bloom (*Planktothrix agardhii*) on fish: Insights from histopathological and quantitative proteomic assessments following the oral exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 114–115, 39–48. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.02.008
- Marsac, N.T., 1994. Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes, in: Bryant, D.A. (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 825–842. DOI: 10.1007/978-94-011-0227-8\_28
- Martins, N.D., Yunes, J.S., Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2017. Microcystin-LR leads to oxidative damage and alterations in antioxidant defense system in liver and gills of *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829). *Toxicon* 139, 109–116. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.10.006
- Matsunaga, H., Harada, K.I., Senma, M., Ito, Y., Yasuda, N., Ushida, S., Kimura, Y., 1999. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: Sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Nat. Toxins* 7, 81–84. DOI: 10.1002/(SICI)1522-7189(199903/04)7:2<81::AID-NT44>3.0.CO;2-O
- Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W., 1989. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8021–8023. DOI: 10.1021/ja00202a057
- Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Méjean, A., Ploux, O., 2010. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: Identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4943–4949. DOI: 10.1128/AEM.00717-10

- McGregor, G.B., Fabbro, L.D., 2000. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes Reserv. Res. Manag.* 5, 195–205. DOI: 10.1046/j.1440-1770.2000.00115.x
- McGregor, G.B., Sendall, B.C., 2017. *Iningainema pulvinus* gen nov., sp nov. (Cyanobacteria, Scytonemataceae) a new nodularin producer from Edgbaston Reserve, north-eastern Australia. *Harmful Algae* 62, 10–19. DOI: 10.1016/j.hal.2016.11.021
- Meeks, J.C., Elhai, J., 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66, 94–121. DOI: 10.1128/MMBR.66.1.94-121.2002
- Meier-Abt, F., Hammann-Hänni, 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. DOI: 10.1016/j.taap.2006.11.015
- Méjean, A., Mann, S., Maldiney, T., Vassiliadis, G., Lequin, O., Ploux, O., 2009. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7512–7513. DOI: 10.1021/ja9024353
- Méjean, A., Mann, S., Vassiliadis, G., Lombard, B., Loew, D., Ploux, O., 2010. *In vitro* reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: From free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline. *Biochemistry* 49, 103–113. DOI: 10.1021/bi9018785
- Méjean, A., Paci, G., Gautier, V., Ploux, O., 2014. Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria. *Toxicon* 91, 15–22. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.07.016
- Meriluoto, J., Codd, G.A., 2005. *TOXIC Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Åbo Akademi Förlag – Åbo Akademi University Press, Turku (Finland).
- Meriluoto, J., Lawton, L., Harada, K., 2000. Isolation and detection of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, in: Holst, O. (Ed.), *Bacterial Toxins: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa (NJ, USA), pp. 65–87. DOI: 10.1385/1-59259-052-7:65
- Meriluoto, J., Spoof, L., 2005a. Extraction of microcystins in biomass filtered on glassfibre filters or in freeze-dried cyanobacterial biomass, in: Meriluoto, J., Codd, G.A. (Eds.), *TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Åbo Akademi University Press, Turku, pp. 69–71.

- Meriluoto, Jussi, Spoof, L., 2005b. Purification of microcystins by high-performance liquid chromatography, in: Meriluoto, J., Codd, G.A. (Eds.), TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Åbo Akademi University Press, Turku, pp. 93–104.
- Metcalf, J.S., Bell, S.G., Codd, G.A., 2001. Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 904–909. DOI: 10.1128/AEM.67.2.904-909.2001
- Metcalf, J.S., Souza, N.R., 2019. Cyanobacteria and their toxins, in: Separation Science and Technology. Elsevier Inc., pp. 125–148. DOI: 10.1016/B978-0-12-815730-5.00006-5
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Neilan, B.A., 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochem.* 10, 8. DOI: 10.1186/1471-2091-10-8
- Mikkaichi, T., Suzuki, T., Tanemoto, M., Ito, S., Abe, T., 2004. The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 171–179. DOI: 10.2133/dmpk.19.171
- Milovanović, D., Živković, A., 1963. Phytoplankton composition and dynamics in Jegrička fishpond in 1959-1960 period. *Arch. Biol. Sci.* 6, 3–30.
- Mitrovic, S.M., Pflugmacher, S., James, K.J., Furey, A., 2004. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquat. Toxicol.* 68, 185–192. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.017
- Mitsch, W.J., 2017. Solving Lake Erie's harmful algal blooms by restoring the Great Black Swamp in Ohio. *Ecol. Eng.* 108, 406–413. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2017.08.040
- 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. *Int. Aquat. Res.* 5, 8. DOI: 10.1186/2008-6970-5-8
- Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6353–6362. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6353-6362.2004
- 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, 137–141. DOI: 10.1002/tox.10111
- Molina, R., Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., Monterde, J.G., Cameán, A., 2005. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon* 46, 725–735. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.07.012

- Molloy, L., Wonnacott, S., Gallagher, T., Brough, P.A., Livett, B.G., 1995. Anatoxin-a is a potent agonist of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenal chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 289, 447–453. DOI: 10.1016/0922-4106(95)90153-1
- Nagy, S., Csőke, B., Zajzon, N., Kristály, F., Márkus, I.R., Gombkoto, I., Pap, Z., Kaliczné Papp, K., Szép, L., Duber, N., Schupler, H., Gaga, I., 2014. Heavy minerals from glass sand tailings, Fehérvárcsurgó, in: Földessy, J. (Ed.), *Basic Research of the Strategic Raw Materials in Hungary*. Millagrossa Kft., Miskolc, pp. 120–150.
- Namikoshi, M., Choi, B.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Evans, W.R., Carmichael, W.W., 1993. Chemical characterization and toxicity of dihydro derivatives of nodularin and microcystin-LR, potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 151–158. DOI: 10.1021/tx00032a003
- Nayak, N.C., Sathar, S.A., Mughal, S., Duttagupta, S., Mathur, M., Chopra, P., 1996. The nature and significance of liver cell vacuolation following hepatocellular injury - An analysis based on observations on rats rendered tolerant to hepatotoxic damage. *Virchows Arch.* 428, 353–365. DOI: 10.1007/BF00202202
- Nelson, D.R., 2009. The cytochrome P450 homepage. *Hum. Genomics* 4, 59–65. DOI: 10.1186/1479-7364-4-1-59
- Nemes, K., Matavuly, M., 2006. Plankton composition of Palics and Ludas alkaline lakes, in: *Balkan Conference BALWOIS 2006*. Ohrid, Macedonia, pp. 23–26.
- Nguyen, H.L., Leermakers, M., Kurunczi, S., Bozo, L., Baeyens, W., 2005. Mercury distribution and speciation in Lake Balaton, Hungary. *Sci. Total Environ.* 340, 231–246. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.08.016
- Nilsson, G.E., 2007. Gill remodeling in fish - a new fashion or an ancient secret? *J. Exp. Biol.* 210, 2403–2409. DOI: 10.1242/jeb.000281
- Nince Ferreira, M.F., Oliveira, V.M., Oliveira, R., Vieira da Cunha, P., Grisolia, C.K., Pires Júnior, O.R., 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.01.016
- Nürnberg, D.J., Mariscal, V., Parker, J., Mastroianni, G., Flores, E., Mullineaux, C.W., 2014. Branching and intercellular communication in the Section V cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, a complex multicellular prokaryote. *Mol. Microbiol.* 91, 935–949. DOI: 10.1111/mmi.12506
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cyindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cyindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941–

7942. DOI: 10.1021/ja00046a067
- Olive, P.L., 1988. DNA precipitation assay: A rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 487–495. DOI: 10.1002/em.2850110409
- Olson, J.M., 2006. Photosynthesis in the Archean era. *Photosynth. Res.* DOI: 10.1007/s11120-006-9040-5
- Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S., 2018. Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin—What we know so far. *Toxin Rev.* 37, 87–105. DOI: 10.1080/15569543.2017.1326059
- Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P., Yasumoto, T., 1997. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 35, 1645–1648. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00038-X
- Oswald, S., 2019. Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine. *Pharmacol. Ther.* 195, 39–53. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.007
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M.M., 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 15–21. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13443.x
- Pacheco, A.B.F., Guedes, I.A., Azevedo, S.M.F.O., 2016. Is qPCR a reliable indicator of cyanotoxin risk in freshwater? *Toxins (Basel)*. 8, 172. DOI: 10.3390/toxins8060172
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. für Hydrobiol.* 107, 563–593.
- Padisák, J., Reynolds, C.S., 1998. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. *Hydrobiologia* 384, 41–53. DOI: 10.1023/a:1003255529403
- Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci. Total Environ.* 409, 1739–1745. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.02.001
- Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful cyanobacterial blooms: Causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65, 995–1010. DOI: 10.1007/s00248-012-0159-y
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.

DOI: 10.5555/uri:pii:0022214367900765

- Paulino, M.G., Tavares, D., Terezan, A.P., Sakuragui, M.M., Pesenti, E., Giani, A., Cestari, M.M., Fernandes, J.B., Fernandes, M.N., 2020. Biotransformations, antioxidant system responses, and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 1041–1051. DOI: 10.1002/etc.4696
- Peakall, D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157–160. DOI: 10.1007/BF00117080
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin, *Marine Drugs*. DOI: 10.3390/md8051650
- Percival, Steven L., Williams, David W., 2013. Cyanobacteria, in: Percival, S.L., Yates, M.V., Williams, D.W., Chalmers, R.M., Gray, N.F. (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*. Elsevier Ltd., pp. 79–88. DOI: 10.1016/B978-0-12-415846-7.00005-6
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 157–166. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.12.023
- Perendija, B.R., Despotović, S.G., Radovanović, T.B., Gavrić, J.P., Mitić, S.S.B., Pavlović, S.Z., Ognjanović, B.I., Simić, S.B., Pajović, S.B., Saičić, Z.S., 2011. Biochemical and ultrastructural changes in the liver of European perch (*Perca fluviatilis* L.) in response to cyanobacterial bloom in the Gruž Reservoir. *Arch. Biol. Sci.* 63, 979–990. DOI: 10.2298/ABS1104979P
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1425, 527–533. DOI: 10.1016/S0304-4165(98)00107-X
- Pham, T.-L., Utsumi, M., 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *J. Environ. Manage.* 213, 520–529. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.01.077
- Pierangelini, M., Sinha, R., Willis, A., Burford, M.A., Orr, P.T., Beardall, J., Neilan, B.A., 2015. Constitutive cylindrospermopsin pool size in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different light and CO<sub>2</sub> partial pressure conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3069–3076. DOI: 10.1128/AEM.03556-14
- 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-related activities. *Aust. N. Z. J. Public Health* 21, 562–566. DOI: 10.1111/j.1467-842X.1997.tb01755.x
- Pizzorno, J., 2014. Glutathione! *Integr. Med. A Clin. J.* 13, 8–12. DOI: 10.1201/b11653
- Poniedziałek, B., Rzymiski, P., Wiktorowicz, K., 2012. First report of cylindrospermopsin effect on human peripheral blood lymphocytes proliferation *in vitro*. *Cent. J. Immunol.* 37, 314–317. DOI: 10.5114/ceji.2012.32717
- Poniedziałek, B., Rzymiski, P., Wiktorowicz, K., 2014. Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: Proliferation, viability and cell cycle studies. *Toxicol. Vitr.* 28, 968–974. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.04.015
- Popovic, M., Zaja, R., Smital, T., 2010. Organic anion transporting polypeptides (OATP) in zebrafish (*Danio rerio*): Phylogenetic analysis and tissue distribution. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 155, 327–335. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.11.011
- Prieto, A.I., Jos, Á., Pichardo, S., Moreno, I., Cameán, A.M., 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.* 77, 314–321. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.12.012
- Prieto, A.I., Pichardo, S., Jos, Á., Moreno, I., Cameán, A.M., 2007. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 84, 337–345. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.06.012
- Radić, D., Gujaničić, V., Petričević, J., Raičević, V., Lalević, B., Rudić, Z., Božić, M., 2013. Macrophytes as remediation technology in improving Ludas lake sediment. *Fresenius Environ. Bull.* 22, 1787–1791.
- Rajaniemi-Wacklin, P., Rantala, A., Mugnai, M.A., Turicchia, S., Ventura, S., Komarkova, J., Lepisto, L., Sivonen, K., 2006. Correspondence between phylogeny and morphology of *Snowella* spp. and *Woronichinia naegeliana*, cyanobacteria commonly occurring in lakes. *J. Phycol.* 42, 226–232. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2006.00179.x
- Ranković, B., Simić, S., 2005. Fitoplankton akumulacionog jezera Gruža, in: Comić, L., Ostojčić, A. (Eds.), *Akumulaciono Jezero Gruža*. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Serbia, pp. 65–77.
- Rantala-Ylinen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, K., 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7271–7278. DOI: 10.1128/AEM.06022-11



- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K., 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 568–573. DOI: 10.1073/pnas.0304489101
- Rao, L.P., Bhattacharya, R., Gupta, N., Parida, M., Bhaskar, A., Dubey, R., 2002. Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells. *Arch. Toxicol.* 76, 227–235. DOI: 10.1007/s00204-002-0330-1
- Rao, P.V.L., Bhattacharya, R., 1996. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver *in vivo*. *Toxicology* 114, 29–36. DOI: 10.1016/S0300-483X(96)03413-0
- Rao, P.V.L., Gupta, N., Jayaraj, R., Bhaskar, A.S.B., Jatav, P.C., 2005. Age-dependent effects on biochemical variables and toxicity induced by cyclic peptide toxin microcystin-LR in mice. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 140, 11–19. DOI: 10.1016/j.cca.2004.11.008
- Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microb. Ecol.* 36, 181–192. DOI: 10.1007/s002489900105
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, 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.
- Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M., Sukenik, A., 2004. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicol. Sci.* 82, 620–627. DOI: 10.1093/toxsci/kfh267
- Rexroth, S., Nowaczyk, M.M., Rögner, M., 2017. Cyanobacterial photosynthesis: The light reactions, in: Hallenbeck, P.C. (Ed.), *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics*. Springer International Publishing, pp. 163–191. DOI: 10.1007/978-3-319-51365-2\_5
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* 24, 417–428. DOI: 10.1093/plankt/24.5.417
- Romo, S., Fernández, F., Ouahid, Y., Barón-Sola, Á., 2012. Assessment of microcystins in lake water and fish (*Mugilidae*, *Liza* sp.) in the largest Spanish coastal lake. *Environ. Monit. Assess.* 184, 939–949. DOI: 10.1007/s10661-011-2011-0

- Rose, E.T., 1953. Toxic algae in Iowa lakes. *Proc. Iowa Acad. Sci.* 60, 738–745.
- Rourke, J.L., Sinal, C.J., 2014. Biotransformation/Metabolism, in: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, pp. 490–502. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00007-5
- Rowell, P.P., Wonnacott, S., 1990. Evidence for functional activity of up-regulated nicotine binding sites in rat striatal synaptosomes. *J. Neurochem.* 55, 2105–2110. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb05802.x
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon* 50, 800–809. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.06.019
- Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Lu, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225. DOI: 10.1016/S0006-2952(94)00466-8
- Sanchez, W., Porcher, J.M., 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 150–158. DOI: 10.1016/j.trac.2008.10.012
- Sas, H., 1990. Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, experiences, extrapolations. *SIL Proceedings, 1922-2010* 24, 247–251. DOI: 10.1080/03680770.1989.11898731
- Savela, H., Spoof, L., Perälä, N., Preede, M., Lamminmäki, U., Nybom, S., Häggqvist, K., Meriluoto, J., Vehniäinen, M., 2015. Detection of cyanobacterial *sxt* genes and paralytic shellfish toxins in freshwater lakes and brackish waters on Åland Islands, Finland. *Harmful Algae* 46, 1–10. DOI: 10.1016/j.hal.2015.04.005
- Savela, H., Spoof, L., Höysniemi, N., Vehniäinen, M., Mankiewicz-Boczek, J., Jurczak, T., Kokociński, M., Meriluoto, J., 2017. First report of cyanobacterial paralytic shellfish toxin biosynthesis genes and paralytic shellfish toxin production in polish freshwater lakes. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 8, 61–70. DOI: 10.4081/aiol.2017.6319
- Saxton, M.A., Arnold, R.J., Bourbonniere, R.A., McKay, R.M.L., Wilhelm, S.W., 2012. Plasticity of total and intracellular phosphorus quotas in *Microcystis aeruginosa* cultures and Lake Erie algal assemblages. *Front. Microbiol.* 3, 1–9. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00003
- Schindler, D.W., 1974. Eutrophication and recovery in experimental lakes: Implications for lake management. *Science (80-)*. 184, 897–899. DOI: 10.1126/science.184.4139.897
- Schindler, D.W., 2012. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *Proc. R.*

- Soc. B Biol. Sci. 279, 4322–4333. DOI: 10.1098/rspb.2012.1032
- Schirrneister, B.E., Gugger, M., Donoghue, P.C.J., 2015. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* 58, 769–785. DOI: 10.1111/pala.12178
- Schlenk, D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 48–53. DOI: 10.1016/S0025-326X(99)00015-6
- Schopf, J.W., 1993. Microfossils of the early Archean apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science* (80-. ). 260, 640–646. DOI: 10.1126/science.260.5108.640
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Hönnen, W., Tribskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 75–86. DOI: 10.1023/A:1008212000208
- Sebestyén, V., Németh, J., Juzsakova, T., Domokos, E., Kovács, Z., Rédey, Á., 2017. Aquatic environmental assessment of Lake Balaton in the light of physical-chemical water parameters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 25355–25371. DOI: 10.1007/s11356-017-0163-3
- Sedan, D., Laguens, M., Copparoni, G., Aranda, J.O., Giannuzzi, L., Marra, C.A., Andrinolo, D., 2015. Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR. *Toxicol.* 104, 26–33. DOI: 10.1016/j.toxicol.2015.07.011
- Sekine, T., Miyazaki, H., Endou, H., 2006. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 290, 251–261. DOI: 10.1152/ajprenal.00439.2004
- Seleši, Đ., 1981. Limnološka istraživanja Ludoškog jezera. *Vode Vojv.* 9, 333–352.
- Seleši, Đ., 2006. *Voda Ludaškog jezera*. Subotica.
- Shankar, K., Mehendale, H.M., 2014. Oxidative stress, in: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, pp. 735–737. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00345-6
- Sherratt, P.J., Hayes, J.D., 2001. Glutathione S-transferases, in: Ioannides, C. (Ed.), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons Ltd., pp. 319–352.
- Sies, H., 2019. Oxidative stress: Eustress and distress in redox homeostasis, in: Fink, G. (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*. Handbook of Stress Series. Elsevier, pp. 153–163. DOI: 10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8
- Sim, S.C., Ingelman-Sundberg, M., 2010. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genomics* 4, 278–281. DOI: 10.1186/1479-7364-4-4-278

- Simeunović, J., 2009. Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Simeunović, J., Svirčev, Z., Karaman, M., Knežević, P., Melar, M., 2010. Cyanobacterial blooms and first observation of microcystin occurrences in freshwater ecosystems in Vojvodina region (Serbia). *Fresenius Environ. Bull.* 19, 198–207.
- Simić, S.B., Dordević, N.B., Milošević, D., 2017. The relationship between the dominance of Cyanobacteria species and environmental variables in different seasons and after extreme precipitation. *Fundam. Appl. Limnol.* 190, 1–11. DOI: 10.1127/fal/2017/0975
- Singh, A., Babel, P.K., 2020. Dynamics of harmful cyanobacterial blooms and their toxins: Environmental and human health perspectives and management strategies, in: Singh, P.K., Kumar, A., Singh, V.K., Shrivastava, A.K. (Eds.), *Advances in Cyanobacterial Biology*. Elsevier Inc., pp. 301–317. DOI: 10.1016/b978-0-12-819311-2.00020-6
- Singh, P., Khan, A., Srivastava, A., 2020. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria: a view toward cyanobacterial symbiosis, in: Singh, K.P., Kumar, A., Singh, V.K., Shrivastava, A.K. (Eds.), *Advances in Cyanobacterial Biology*. Elsevier Inc., pp. 235–248. DOI: 10.1016/b978-0-12-819311-2.00016-4
- Singh, S.P., Montgomery, B.L., 2011. Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends Microbiol.* DOI: 10.1016/j.tim.2011.03.001
- Sipiä, V.O., Kankaanpää, H.T., Pflugmacher, S., Flinkman, J., Furey, A., James, K.J., 2002. Bioaccumulation and detoxication of nodularin in tissues of flounder (*Platichthys flesus*), mussels (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*), and clams (*Macoma balthica*) from the northern Baltic Sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 305–311. DOI: 10.1006/eesa.2002.2222
- Skocovska, B., Hilscherova, K., Babica, P., Adamovsky, O., Bandouchova, H., Horakova, J., Knotkova, Z., Marsalek, B., Paskova, V., Pikula, J., 2007. Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon* 49, 793–803. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.032
- Službeni glasnik Republike Srbije 50/12, n.d. Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje [WWW Document]. URL <http://www.pravno-informacioni-sistem.rs/SlGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/vlada/uredba/2012/50/1/reg> (accessed 4.2.21).
- Somogyi, B., Felföldi, T., Tóth, L.G., Bernát, G., Vörös, L., 2020. Photoautotrophic picoplankton – a review on their occurrence, role and diversity in Lake Balaton. *Biol. Futur.* 71, 371–382. DOI: 10.1007/s42977-020-00030-8

- Song, H., Coggins, L., Reichwaldt, E., Ghadouani, A., 2015. The importance of lake sediments as a pathway for microcystin dynamics in shallow eutrophic lakes. *Toxins (Basel)*. 7, 900–918. DOI: 10.3390/toxins7030900
- Soule, T., Garcia-Pichel, F., 2019. Cyanobacteria, in: Schmidt, T.A. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Ltd., pp. 799–817. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20886-8
- Spoof, 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. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00428-X
- Steiner, K., Hagenbuch, B., Dietrich, D.R., 2014. Molecular cloning and functional characterization of a rainbow trout liver Oatp. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 534–542. DOI: 10.1016/j.taap.2014.08.031
- Steiner, K., Zimmermann, L., Hagenbuch, B., Dietrich, D., 2016. Zebrafish Oatp-mediated transport of microcystin congeners. *Arch. Toxicol.* 90, 1129–1139. DOI: 10.1007/s00204-015-1544-3
- Stewart, I., Webb, P.M., Schluter, P.J., Shaw, G.R., 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria - A review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ. Heal.* 5, 6. DOI: 10.1186/1476-069X-5-6
- Stolerman, I.P., Albuquerque, E.X., Garcha, H.S., 1992. Behavioural effects of anatoxin, a potent nicotinic agonist, in rats. *Neuropharmacology* 31, 311–314. DOI: 10.1016/0028-3908(92)90182-O
- Stumpf, R.P., Wynne, T.T., Baker, D.B., Fahnenstiel, G.L., 2012. Interannual variability of cyanobacterial blooms in Lake Erie. *PLoS One* 7, e42444. DOI: 10.1371/journal.pone.0042444
- Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A., Quesada, A., 2012. Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes – physiological, regional, and global driving forces. *Front. Microbiol.* 3, 86. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00086
- Sukenik, A., Rücker, J., Maldener, I., 2019. Dormant cells (akinetes) of filamentous cyanobacteria demonstrate a great variability in morphology, physiology, and ecological function, in: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Eds.), *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Ltd., pp. 65–77. DOI: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00004-0
- Sun, Y., Zheng, Q., Sun, Y.-T., Huang, P., Guo, Z.-L., Xu, L.-H., 2014. Microcystin-LR

- induces protein phosphatase 2A alteration in a human liver cell line. *Environ. Toxicol.* 29, 1236–1244. DOI: 10.1002/tox.21854
- Sun, Y., Liu, J., Huang, P., Guo, Z., Xu, L., 2015. Alterations of tau and VASP during microcystin-LR-induced cytoskeletal reorganization in a human liver cell line. *Environ. Toxicol.* 30, 92–100. DOI: 10.1002/tox.21898
- Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D., 2019. Bancroft's theory and practice of histological techniques, Eighth edi. ed, *Techniques in Histopathology and Cytopathology*. Elsevier. DOI: 10.5005/jp/books/14170\_7
- Svirčev, Z., Mikov-Miladinov, M., Simeunović, J., Vidović, M., Matavulj, M., Petrović, D., Radojčić, B., Stojanović, D., 2006. PLC epidemiological studies in Central Serbia potentially connected with cyanobacterial blooms in drinking water suppliers, in: *Proc. Int. Conf. Danubius Pannonico Mysicus - Space of Challenges*. Novi Sad, Serbia, pp. 38–39.
- Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Vidović, M., 2007. Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. *Geogr. Pannonica* 32–38. DOI: 10.5937/geopan0711032s
- Svirčev, Z., Baltić, V., Gantar, M., Juković, M., Stojanović, D., Baltić, M., 2010. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 28, 39–59. DOI: 10.1080/10590500903585382
- Svirčev, Z.B., Tokodi, N., Drobac, D., Codd, G.A., 2014. Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: Effects on water quality, human health and biodiversity. *Syst. Biodivers.* 12, 261–270. DOI: 10.1080/14772000.2014.921254
- 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. Heal. Part C* 33, 125–167. DOI: 10.1080/10590501.2015.1003000
- 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., 2016. Massive fish mortality and *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in Aleksandrovac Lake. *Ecotoxicology* 25, 1353–1363. DOI: 10.1007/s10646-016-1687-x
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G.A., Meriluoto, J., 2017a. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 91, 621–650. DOI: 10.1007/s00204-016-1921-6

- Svirčev, Z., Tokodi, N., Drobac, D., 2017b. Review of 130 years of research on cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia presented in a Serbian Cyanobacterial Database. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 8, 153–160. DOI: 10.4081/aiol.2017.6360
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J., Codd, G.A., 2019. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings, *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/s00204-019-02524-4
- Tamai, I., Nezu, J.I., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., 2000. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 251–260. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2922
- Tátrai, I., Mátyás, K., Korponai, J., Paulovits, G., Pomogyi, P., 2000. The role of the Kis-Balaton Water Protection System in the control of water quality of Lake Balaton. *Ecol. Eng.* 16, 73–78. DOI: 10.1016/S0925-8574(00)00091-4
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Schlatter, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 30, 215–224. DOI: 10.1016/0166-445X(94)90059-0
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E., Watanabe, M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32, 833–843. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90008-6
- Testa, B., 2008. Biotransformation reactions and their enzymes, in: Wermuth, C.G. (Ed.), *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd, pp. 655–673. DOI: 10.1016/B978-0-12-374194-3.00032-9
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F.M., Funari, E., 2016. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* 46, 385–419. DOI: 10.3109/10408444.2015.1137865
- Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D.E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M.P., Brix, A.E., Singh, B., Belpoggi, F., Ward, J.M., 2010. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol. Pathol.* 38, 5–81. DOI: 10.1177/0192623310386499
- Tokodi, N., 2016. Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije. *Prirodno-*

matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

- Tokodi, N., Drobac, D., Meriluoto, J., Lujčić, J., Marinović, Z., Važić, T., Nybom, S., Simeunović, J., Dulić, T., Lazić, G., Vuković-Gačić, B., Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolavić, M., Subakov-Simić, G., Miljanović, B., Codd, G.A., Svirčev, Z., 2018. Cyanobacterial effects in Lake Ludoš, Serbia - Is preservation of a degraded aquatic ecosystem justified? *Sci. Total Environ.* 635, 1047–1062. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.177
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., Ohno, T., 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5442–5447. DOI: 10.1073/pnas.0600999103
- Torokne, A., Palovics, A., Bankine, M., 2001. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria - Experimental evidence. *Environ. Toxicol.* 16, 512–516. DOI: 10.1002/tox.10011
- Torres, R., Pizarro, L., Csendes, A., García, C., Lagos, N., 2007. GTX 2/3 epimers permeate the intestine through a paracellular pathway. *J. Toxicol. Sci.* 32, 241–248.
- Tóth, E., Toumi, M., Farkas, R., Takáts, K., Somodi, C., Ács, É., 2020. Insight into the hidden bacterial diversity of Lake Balaton, Hungary. *Biol. Futur.* 71, 383–391. DOI: 10.1007/s42977-020-00040-6
- Trinchet, I., Djediat, C., Huet, H., Dao, S.P., Edery, M., 2011. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reprod. Toxicol.* 32, 329–340. DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.07.006
- Tsuchida, S., 2002. Glutathione Transferases, in: Bertino, J.R. (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*. Elsevier, pp. 297–307. DOI: 10.1016/B0-12-227555-1/00513-X
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton - Methodik. *Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Mitteilungen* 9, 1–38. DOI: 10.1080/05384680.1958.11904091
- Vachard, D., 2021. Cyanobacteria, in: Alderton, D., Elias, S.A. (Eds.), *Encyclopedia of Geology*. Elsevier Ltd., pp. 446–460. DOI: 10.1016/b978-0-12-409548-9.11843-3
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
- Van Der Aar, E.M., Buikema, D., Commandeur, J.N.M., Te Koppele, J.M., Van Ommen, B., Van Bladeren, P.J., Vermeulen, N.P.E., 1996. Enzyme kinetics and substrate selectivities of rat glutathione S-transferase isoenzymes towards a series of new 2-substituted 1-chloro-



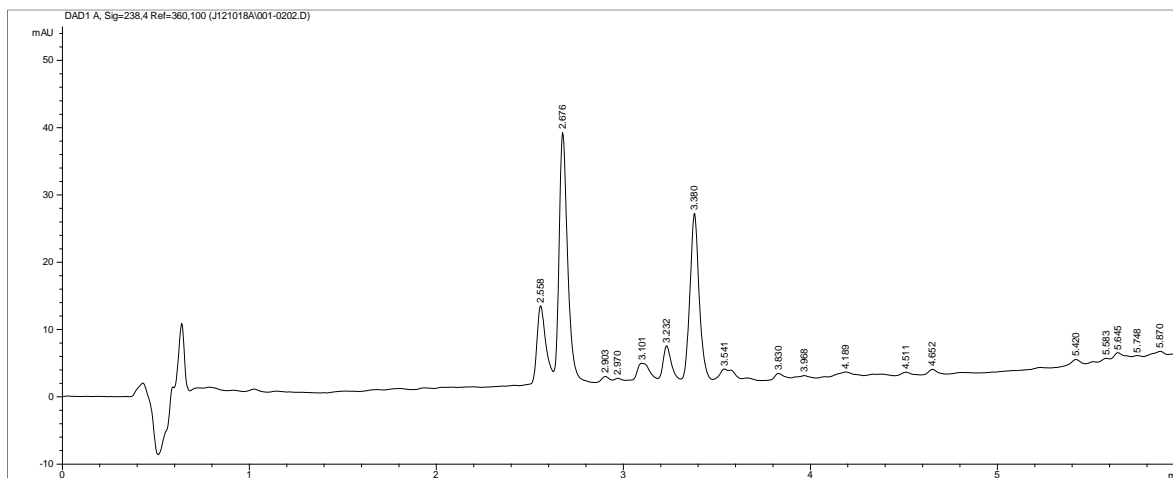
- 4-nitrobenzenes. *Xenobiotica* 26, 143–155. DOI: 10.3109/00498259609046696
- van der Merwe, D., 2014. Freshwater cyanotoxins, in: Gupta, R.C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier Inc., pp. 539–548. DOI: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00031-2
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Van Dyk, J.C., Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere* 87, 301–311. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.002
- Važić, T., 2020. Smanjenje ukupnog kapaciteta vodenih ekosistema i primena vodonik-peroksida u regulaciji ubrzane eutrofizacije i cvetanja cijanobakterija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Via-Ordorika, L., Fastner, J., Kurmayer, R., Hisbergues, M., Dittmann, E., Komarek, J., Erhard, M., Chorus, I., 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 592–602. DOI: 10.1078/0723202041748163
- Vichi, S., Buratti, F.M., Testai, E., 2016. Microcystins: Toxicological profile, in: Gopalakrishnakone, P. (Ed.), *Marine and Freshwater Toxins*. Springer., pp. 219–238.
- Vincent, W.F., 2009. Cyanobacteria, in: Likens, G.E. (Ed.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier Inc., pp. 226–232. DOI: 10.1016/B978-012370626-3.00127-7
- Vinçon-Leite, B., Casenave, C., 2019. Modelling eutrophication in lake ecosystems: A review. *Sci. Total Environ.* 651, 2985–3001. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.320
- Vuorinen, P.J., Sipiä, V.O., Karlsson, K., Keinänen, M., Furey, A., Allis, O., James, K., Perttilä, U., Rimaila-Pärnänen, E., Meriluoto, J.A.O., 2009. Accumulation and effects of nodularin from a single and repeated oral doses of cyanobacterium *nodularia spumigena* on flounder (*Platichthys flesus* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 164–173. DOI: 10.1007/s00244-008-9258-7
- Wang, L., Robertson, D.M., Garrison, P.J., 2007. Linkages between nutrients and assemblages of macroinvertebrates and fish in wadeable streams: Implication to nutrient criteria development. *Environ. Manage.* 39, 194–212. DOI: 10.1007/s00267-006-0135-8
- Wang, L., Wang, Q., Xiao, G., Chen, G., Han, L., Hu, T., 2020. Adverse effect of cylindrospermopsin on embryonic development in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 241, 125060. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125060
- Watanabe, M.M., Kaya, K., Takamura, N., 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the

- microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J. Phycol.* 28, 761–767. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1992.00761.x
- Watson, S.B., Whitton, B.A., Higgins, S.N., Paerl, H.W., Brooks, B.W., Wehr, J.D., 2015. Harmful algal blooms, in: Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, J.P. (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier Inc., pp. 873–920. DOI: 10.1016/B978-0-12-385876-4.00020-7
- Wester, P.W., Van Der Ven, L.T.M., Vethaak, A.D., Grinwis, G.C.M., Vos, J.G., 2002. Aquatic toxicology: Opportunities for enhancement through histopathology. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 289–295. DOI: 10.1016/S1382-6689(02)00021-2
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs* 8, 2185–2211. DOI: 10.3390/md8072185
- Wilhelm, S.W., DeBruyn, J.M., Gillor, O., Twiss, M.R., Livingston, K., Bourbonniere, R.A., Pickell, L.D., Trick, C.G., Dean, A.L., McKay, R.M.L., 2003. Effect of phosphorus amendments on present day plankton communities in pelagic Lake Erie. *Aquat. Microb. Ecol.* 32, 275–285. DOI: 10.3354/ame032275
- Williams, D.E., Craig, M., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B., 1997. <sup>14</sup>C-Labeled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides *in vivo* evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicol.* 35, 985–989. DOI: 10.1016/S0041-0101(96)00196-1
- Wills, E.D., 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes, in: Snell, B., Mullock, K. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC, pp. 127–152.
- Winfield, I.J., 2015. Eutrophication and freshwater fisheries, in: Craig, J.F. (Ed.), *Freshwater Fisheries Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 779–793. DOI: 10.1002/9781118394380.ch54
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161. DOI: 10.1016/0166-445X(91)90033-6
- Wonnacott, S., Kaiser, S., Mogg, A., Soliakov, L., Jones, I.W., 2000. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 51–58. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00005-4
- Wood, S.A., Dietrich, D.R., 2011. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *J. Environ. Monit.* 13, 1617–1624. DOI: 10.1039/c1em10102a
- World Health Organization (WHO), 2003. Guidelines for safe recreational water environments. World Health Organization.

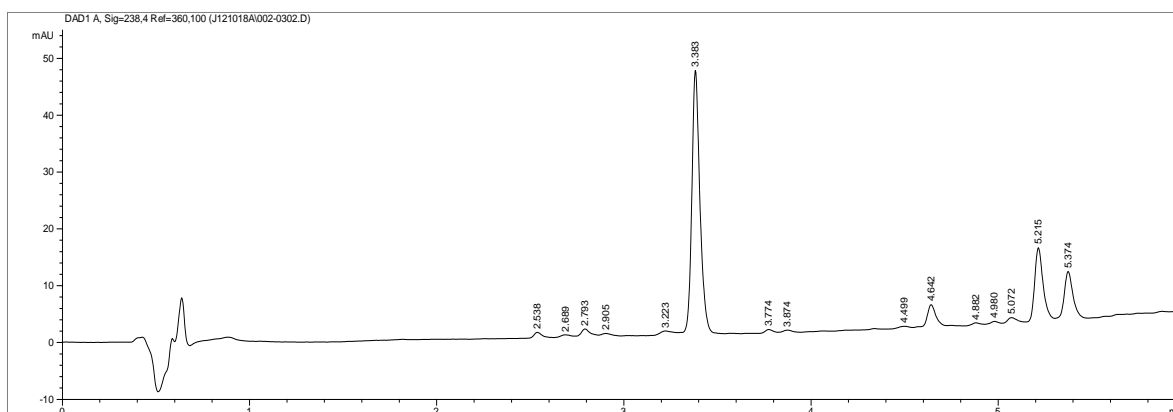
- Xinyao, L., Miao, S., Yonghong, L., Yin, G., Zhongkai, Z., Donghui, W., Weizhong, W., Chencai, A., 2006. Feeding characteristics of an amoeba (*Lobosea: Naegleria*) grazing upon cyanobacteria: Food selection, ingestion and digestion progress. *Microb. Ecol.* 51, 315–325. DOI: 10.1007/s00248-006-9031-2
- Xu, Y., Wu, Z., Yu, B., Peng, X., Yu, G., Wei, Z., Wang, G., Li, R., 2008. Non-microcystin producing *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters. *Environ. Pollut.* 156, 162–167. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.12.027
- Yang, R., Brauner, C., Thurston, V., Neuman, J., Randall, D.J., 2000. Relationship between toxicant transfer kinetic processes and fish oxygen consumption. *Aquat. Toxicol.* 48, 95–108. DOI: 10.1016/S0166-445X(99)00050-8
- Yang, Y., Yu, G., Chen, Y., Jia, N., Li, R., 2021. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin. *J. Hazard. Mater.* 406, 124653. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124653
- 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, 374–380. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.02.006
- Yunes, J.S., 2019. Cyanobacterial Toxins, in: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Eds.), *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Inc., pp. 443–458. DOI: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00022-2
- Zanchett, G., Oliveira-Filho, E.C., 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins (Basel)*. 5, 1896–1917. DOI: 10.3390/toxins5101896
- Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2014. Monitoring kvaliteta vode jezera Palić i Ludaš i potoka Kereš u 2013. godini. Subotica.
- Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2016. Monitoring kvaliteta vode jezera Palić, Ludaš i kanala Kereš u 2015. godini. Subotica.
- Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2018. Monitoring kvaliteta vode jezera Palić, Ludaš i kanala Kereš u 2017. godini. Subotica.
- Zavod za Javno Zdravlje Subotica, 2020. Monitoring kvaliteta vode jezera Palić, Ludaš i kanala Kereš u 2019. godini. Subotica.
- Žegura, B., Štraser, A., Filipič, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 727, 16–41. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.01.002

- 
- Zhang, D., Yang, Q., Xie, P., Deng, X., Chen, J., Dai, M., 2012. The role of cysteine conjugation in the detoxification of microcystin-LR in liver of bighead carp (*Aristichthys nobilis*): A field and laboratory study. *Ecotoxicology* 21, 244–252. DOI: 10.1007/s10646-011-0783-1
- Zhang, H., Fang, W., Xiao, W., Lu, L., Jia, X., 2014. Protective role of oligomeric proanthocyanidin complex against hazardous nodularin-induced oxidative toxicity in *Carassius auratus* lymphocytes. *J. Hazard. Mater.* 274, 247–257. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.04.020
- Zhang, L., Thomas, S., Mitsch, W.J., 2017. Design of real-time and long-term hydrologic and water quality wetland monitoring stations in South Florida, USA. *Ecol. Eng.* 108, 446–455. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2017.06.021
- Zhang, S., Wang, W., Zhang, K., Xu, P., Lu, Y., 2018. Phosphorus release from cyanobacterial blooms during their decline period in eutrophic Dianchi Lake, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 13579–13588. DOI: 10.1007/s11356-018-1517-1
- 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. Heal. - Part B Crit. Rev.* 8, 1–37. DOI: 10.1080/10937400590889412

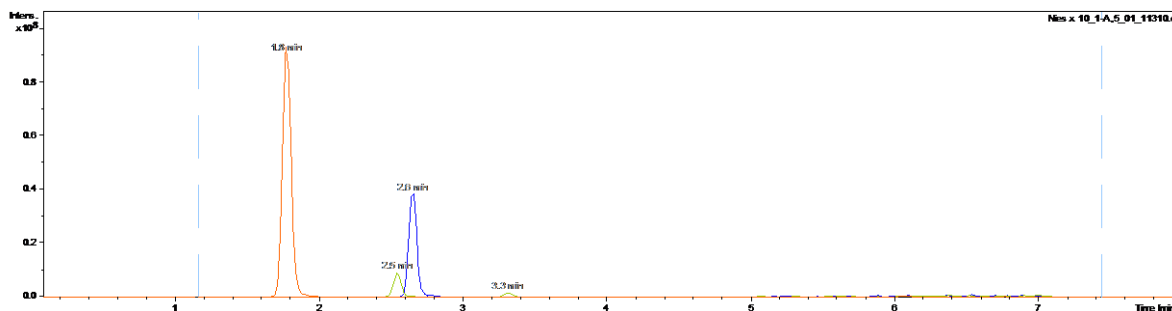
## Prilozi



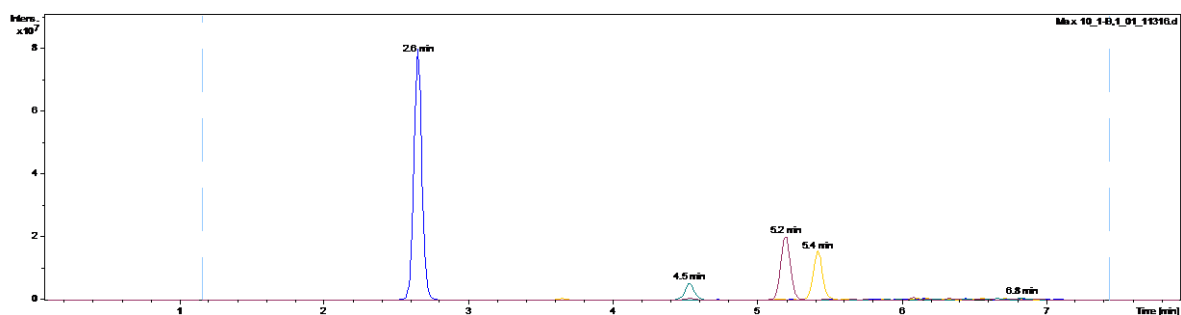
**Prilog 1.** HPLC-DAD hromatogram ekstrakata soja roda *Microcystis* NIES-107 (detekcija na 238 nm).



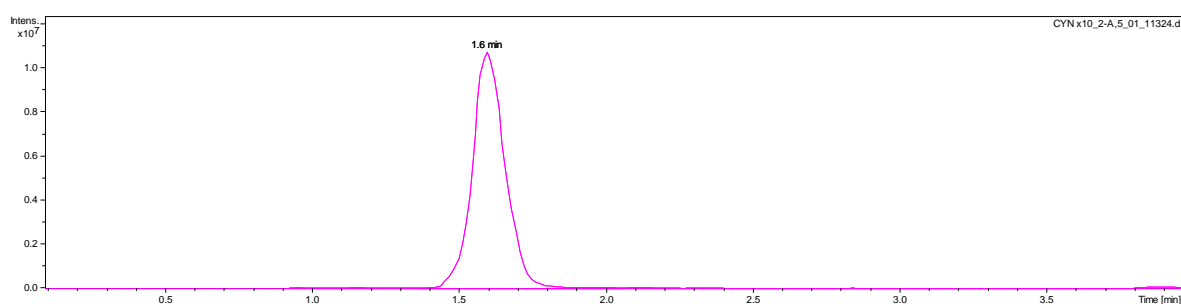
**Prilog 2.** HPLC-DAD hromatogram ekstrakata soja roda *Microcystis* PCC 7820 (detekcija na 238 nm).



**Prilog 3.** LC-MS hromatogram ekstrakata soja roda *Microcystis* NIES-107 (razblazeno 10 puta).



**Prilog 4.** LC-MS hromatogram ekstrakata soja roda *Microcystis* PCC 7820 (razblazeno 10 puta).



**Prilog 5.** LC-MS hromatogram standarda za CYN (razblazeno 10 puta).

## Plan tretmana podataka

<b>Naziv projekta/istraživanja</b>
<b>„Cvetanje cijanobakterija, prisustvo cijanotoksina i njihov uticaj na ribe u pojedinim jezerskim ekosistemima Srbije i Mađarske“</b>
<b>Naziv institucije/institucija u okviru kojih se sprovodi istraživanje</b>
a) Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija b) Mađarski univerzitet za poljoprivredu i prirodne nauke, Departman za Akvakulturu, Gedele, Mađarska v) Åbo Akademi Univerzitet, Departman Bionauka, Turku, Finska g) Univerzitet u Turku-u, Departman prirodnih nauka i biotehnologije, Turku, Finska d) Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Srbija
<b>Naziv programa u okviru kog se realizuje istraživanje</b>
<b>Doktorske akademske studije biologije, uža naučna oblast Hidrobiologija Bilateralni projekat Mađarska-Srbija (451-03-02294/2015-09/3; TÉT 16-1-2016-0176)</b>
<b>1. Opis podataka</b>
<p>1.1 Vrsta studije</p> <p><i>Ukratko opisati tip studije u okviru koje se podaci prikupljaju</i></p> <p><b>Studija se bavi itraživanjem cvetanja cijanobakterija, prisustva cijanotoksina i uticaja cijanotoksina na ribe. U studiji su rađena terenska i laboratorijska ispitivanja. Tokom terenskih istraživanja su mereni fizičko-hemijski parametri vode i prikupljeni su uzorci vode i tkiva riba kako bi se u daljim laboratorijskim ispitivanjima ustanovilo prisustvo cijanobakterija, cijanotoksin-kodirajućih gena, i cijanotoksina, kao i uticaj cvetanja cijanobakterija na molekularne, biohemijske i histopatološke biomarkere riba.</b></p> <p>1.2 Vrste podataka</p> <p>a) <b>kvantitativni</b> b) <b>kvalitativni</b></p> <p>1.3. Način prikupljanja podataka</p> <p>a) ankete, upitnici, testovi b) kliničke procene, medicinski zapisi, elektronski zdravstveni zapisi v) genotipovi: navesti vrstu: <b>biomasa cijanobakterija; ribe vrsta <i>Cyprinus carpio</i>, <i>Carassius gibelio</i>, <i>Abramis brama</i></b> g) administrativni podaci: navesti vrstu d) uzorci tkiva: navesti vrstu: <b>biomasa cijanobakterija; jetra, bubrezi, škrge, creva, slezina, gonade i mišići pomenutih vrsta riba</b> đ) snimci, fotografije: navesti vrstu: <b>fotografije i mikrofotografije</b> e) tekst, navesti vrstu: <b>literaturni navodi</b> ž) mapa, navesti vrstu: <b>mapa istraživanih lokaliteta</b> z) ostalo: opisati</p> <p>1.3 Format podataka, upotrebljene skale, količina podataka</p>

### 1.3.1 Upotrebljeni softver i format datoteke:

- a) Excel fajl, datoteka **.xlsx**
- b) SPSS fajl, datoteka /
- c) PDF fajl, datoteka **.pdf**
- d) Tekst fajl, datoteka **.docx**
- e) JPG fajl, datoteka **.jpg**
- f) Ostalo, datoteka **.tiff**

### 1.3.2. Broj zapisa (kod kvantitativnih podataka)

- a) broj varijabli: **14 fizičko-hemijskih parametara vode, jedna za sastav cijanobakterija, 6 za ekspresiju cijanotoksin-kodirajućih gena, 10 za kvantifikaciju cijanotoksina, 47 za histopatološke analize, 2 za molekularne analize i 8 za biohemijske analize**
- b) broj merenja (ispitanika, procena, snimaka i sl.): **uzorkovanja na jezerima Ludaš i Fehervarčurgo su sprovedena 4 puta, na jezeru Kiš-Balaton 5 puta, a na jezeru Balaton jednom**

### 1.3.3. Ponovljena merenja

- a) **da**
- b) ne

Ukoliko je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

- a) vremenski razmak između ponovljenih mera je **merenje je rađeno od marta/aprila do septembra 2018. godine, kao i u junu 2019. godine**
- b) varijable koje se više puta mere odnose se na: **sve navedene varijable su više puta merene**
- v) nove verzije fajlova koji sadrže ponovljena merenja su imenovane kao: **nisu imenovane kao novi fajl već su na osnovu njih računate srednje vrednosti i rađena je statistička analiza**

Napomene:

*Da li formati i softver omogućavaju deljenje i dugoročnu validnost podataka?*

- a) **Da**
- b) *Ne*

*Ako je odgovor ne, obrazložiti*

## 2. Prikupljanje podataka

### 2.1 Metodologija za prikupljanje/generisanje podataka

#### 2.1.1. U okviru kog istraživačkog nacrta su podaci prikupljeni?

- a) eksperiment, navesti tip /
- b) korelaciono istraživanje, navesti tip **korelacija između različitih staništa u Srbiji i Mađarskoj, korelacija između različitih sezona tokom istraživanja, korelacija sa standardom/kontrolom**
- c) analiza teksta, navesti tip: **Pregled dostupne naučne literature**
- d) ostalo, navesti šta: **Terensko istraživanje i laboratorijska ispitivanja**



2.1.2 Navesti vrste mernih instrumenata ili standarde podataka specifičnih za određenu naučnu disciplinu (ako postoje).

#### **Instrumenti**

Aparat za elektroribolov (Hans Grassel EL 63 II i Hans Grassel IG200/2B), aparati za kvantifikaciju fizičko-hemijskih parametara vode (WTW sonde, Pastel Ultraviolet (UV; Secomam), Hanna HI 98194, Machery-Nagel PF-12 Plus spektrofotometar), svetlosni mikroskopi (Motic BA310, Motic AE2000, Nikon Eclipse 600) sa digitalnim kamerama (Bresser (9MP), QImaging Micro Publisher 3.0), PCR aparat (C1000 Touch Thermal Cycler), transiluminator (Gel Doc™ XR), sonikator (Bandelin Sonopuls HD 2070), Water Oasis HBL aparat, HPLC-DAD sistem (Agilent 1100), tečni hromatograf (Agilent 1200 Rapid Resolution) udružen sa masenim spektrometrom (Bruker Daltonics HCT Ultra), aparat za procesiranje histoloških uzoraka (Shandon Citadel 2000 Automatic tissue processor), aparat za kalupljenje histoloških uzoraka (HistoCore Arcadia Embedding Station), mikrotom (Leica RM2245), aparat za bojenje histoloških pločica (Shandon Varistain 24-4), homogenizator (TissueLyser LT), centrifuga (Ohaus Frontier 5718R), čitač mikrotitar pločica (Thermo Varioskan™ LUX).

#### **Standardi**

Referentni sojevi cijanobakterija za genetičke analize (PCC7820 (*Microcystis aeruginosa*), CS-506 (*Cylindrospermopsis raciborskii*), CS-537/13 (*Dolichospermum circinale*) i SYKE-123 (*Dolichospermum circinale*)), referentni sojevi za kvantifikaciju cijanotoksina (NIES-107 i PCC 7820) i standard za kvantifikaciju cilindrospermopsina (NRC-CRM-CYN).

### 2.2 Kvalitet podataka i standardi

#### 2.2.1. Tretman nedostajućih podataka

a) Da li matrica sadrži nedostajuće podatke? **Da Ne**

Ako je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

a) Koliki je broj nedostajućih podataka? **Broj nije meren. Podaci nedostaju usled problema u izlovljavanju ili nemogućnosti analize uzorka**

b) Da li se korisniku matrice preporučuje zamena nedostajućih podataka? **Da Ne**

v) Ako je odgovor da, navesti sugestije za tretman zamene nedostajućih podataka

#### 2.2.2. Na koji način je kontrolisan kvalitet podataka? Opisati

**Kvalitet aparata kojim su generisani podaci je kontrolisan kalibracijom mernih uređaja, a kvalitet podataka je kontrolisan ponovljenim merenjima (3 merenja po varijabli).**

#### 2.2.3. Na koji način je izvršena kontrola unosa podataka u matricu?

**Proverom validnosti svakog pojedinačnog podatka.**

### 3. Tretman podataka i prateća dokumentacija

#### 3.1. Tretman i čuvanje podataka

3.1.1. **Podaci će biti deponovani u zajednički portal svih doktorskih disertacija i izveštaja komisija o njihovim ocenama na Univerzitetima u Srbiji (NaRDUS) i u repozitorijumu doktorskih disertacija u Novom Sadu (CRIS).**

#### 3.1.2. URL adresa

**<https://open.uns.ac.rs/>**

#### 3.1.3. DOI

3.1.4. Da li će podaci biti u otvorenom pristupu?

- a) **Da**
- b) *Da, ali posle embarga koji će trajati do*
- v) *Ne*

*Ako je odgovor ne, navesti razlog*

3.1.5. Podaci neće biti deponovani u repozitorijum, ali će biti čuvani.

*Obrazloženje*

3.2 Metapodaci i dokumentacija podataka

3.2.1. Koji standard za metapodatke će biti primenjen?

**Opisni**

3.2.1. Navesti metapodatke na osnovu kojih su podaci deponovani u repozitorijum.

**Naziv fajla: Disertacija**

**Kreator: Zoran Marinović**

3.3 Strategija i standardi za čuvanje podataka

3.3.1. Do kog perioda će podaci biti čuvani u repozitorijumu? **Trajno**

3.3.2. Da li će podaci biti deponovani pod šifrom? Da **Ne**

3.3.3. Da li će šifra biti dostupna određenom krugu istraživača? Da **Ne**

3.3.4. Da li se podaci moraju ukloniti iz otvorenog pristupa posle izvesnog vremena?

Da **Ne**

Obrazložiti

#### 4. Bezbednost podataka i zaštita poverljivih informacija

Ovaj odeljak MORA biti popunjen ako vaši podaci uključuju lične podatke koji se odnose na učesnike u istraživanju. Za druga istraživanja treba takođe razmotriti zaštitu i sigurnost podataka.

4.1 Formalni standardi za sigurnost informacija/podataka

Istraživači koji sprovode ispitivanja s ljudima moraju da se pridržavaju Zakona o zaštiti podataka o ličnosti

([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) i odgovarajućeg institucionalnog kodeksa o akademskom integritetu.

4.1.2. Da li je istraživanje odobreno od strane etičke komisije? Da **Ne**

Ako je odgovor Da, navesti datum i naziv etičke komisije koja je odobrila istraživanje

4.1.2. Da li podaci uključuju lične podatke učesnika u istraživanju? Da **Ne**

Ako je odgovor da, navedite na koji način ste osigurali poverljivost i sigurnost informacija vezanih za ispitanike:

- a) Podaci nisu u otvorenom pristupu
- b) Podaci su anonimizirani
- c) Ostalo, navesti šta

## 5. Dostupnost podataka

### 5.1. Podaci će biti

a) javno dostupni

**b) dostupni samo uskom krugu istraživača u određenoj naučnoj oblasti**

c) zatvoreni

*Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti pod kojim uslovima mogu da ih koriste:*

**Uz prethodnu komunikaciju i pismeno odobrenje vlasnika podataka**

*Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti na koji način mogu pristupiti podacima:*

**Po zahtevu će zainteresovanim istraživačima materijal biti poslat elektronskim putem**

5.4. Navesti licencu pod kojom će prikupljeni podaci biti arhivirani.

**Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**

## 6. Uloge i odgovornosti

6.1. Navesti ime i prezime i mejl adresu vlasnika (autora) podataka

**Zoran Marinović (zor.marinovic@gmail.com)**

6.2. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja održava matricu s podacima

**Zoran Marinović (zor.marinovic@gmail.com)**

6.3. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja omogućuje pristup podacima drugim istraživačima

**Zoran Marinović (zor.marinovic@gmail.com)**