



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



ZNAČAJ I ULOGA TERESTRIČNIH CIJANOBAKTERIJA U SEMI-ARIDNIM SREDINAMA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Zorica Svirčev

Kandidat:
Tamara Palanački Malešević

Novi Sad, 2021. godine

Zahvalnica

Zahvaljujem se Prirodno-matematičkom fakultetu, Departmanu za biologiju i ekologiju i Departmanu za geografiju, na omogućenoj izradi ove doktorske disertacije u okviru projekta "Transformacije geoprostora Srbije - prošlost, savremeni problemi i predlozi rešenja" koji je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, Prof. dr Zorici Svirčev, na pruženoj prilici da budem deo istraživačkog tima pod njenim rukovodstvom. Hvala za svaki savet, sugestiju, pomoć i podršku tokom saradnje koja me je uvela u svet nauke; za svaku uspostavljenu saradnju sa drugim institucijama; za nesebičnu podršku tokom izrade i pisanja doktorske disertacije; za svaki savet, životni i poslovni.

Zahvaljujem se predsedniku komsije Prof. dr Jelici Simeunović na sugestijama tokom izrade doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem docent dr Zorani Trivunović na nesebično prenesenom znanju, strpljenu i razumevanju. Zahvaljujem se rukovodiocu projekta u okviru kog je izrađena ova doktorska disertacija, akademiku prof. dr Slobodanu Marković, na poverenju da me zaposli i pomoći prilikom izrade ove disertacije. Veliko hvala Prof. dr Jussi Meriluoto sa Åbo Akademi Univerziteta u Turku (Finska) što je uvek bio tu da posavetuje i podrži moj naučno-istraživački rad. Hvala velikom stručnjaku iz oblasti cijanobakterija, Prof. dr Geoffrey Codd, na svakom poslatom radu.. Veliku zahvalnost dugujem dr Igoru Obreht na nesebično prenesenom znanju i svakoj sugestiji iz koje sam mogla puno da naučim. Hvala Prof. dr Tamari Jurci na podršci tokom rada na Departmanu za biologiju i ekologiju. Zahvaljujem se Ivani Mijić Oljač i Prof. dr Qingzhen Hao na pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Veliko hvala dr Tamari Važić za svaki savet, ohrabrenje, podršku, razgovor i pomoć; Rastku Marković za svu pomoć i entuzijizam tokom naučno-istraživačkog rada; Tamari Dulić za pomoć i saradnju tokom naših istraživanja. Hvala kolegicama dr Damjani Drobac Backović, dr Nadi Tokodi i dr Dijani Lalić na saradnji, razumevanju i strpljenju za svako moje pitanje. Hvala Dobrili Nedeljković na pomoći tokom eksperimentalnog rada. Zahvaljujem se profesorima i kolegama sa Katedre za mikrobiologiju i Katedre za botaniku na omogućenom korišćenju laboratorijske opreme i pomoći.

VELIKO HVALA mojoj porodici koja mi je bila najveća podrška na ovom naučno-istraživačkom putu. Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima i sestri koji su bili moj vetar u leđa za sve u životu, što su svaki moj životni korak učinili lakšim, što su mi pokazali značaj porodice i naučili me da takvu gradim i sama. Hvala im sto su mi zajedno sa svekrvom i svekrom omogućili istovremeno građenje svoje male porodice i izradu ove disertacije. Hvala Milici što me ne pušta da odrastem i Vukašinu što je nezamenljiv brat mom sinu.

HVALA Nikoli i Petru što me svojim postojanjem usmeravaju na prave životne odluke i svakodnevno pokazuju da ova doktorska disertacija bez porodice nema vrednost. IZVINITE za svaki trenutak proveden bez mene! Ova disertacija je naša zajednička pobeda na jednom od životnih puteva!

Mojim roditeljima, Mimi i Lazici

Mojim momcima, Nikoli i Petru

LISTA SKRAĆENICA

AEG	N-(2-aminoetil) glicin
BI	Indeks osvetljenosti (na engleskom: Brightness Index)
BMAA	β -metilamino-L-alanin
BLP	Biološke lesne pokorice
BZP	Biološke zemljišne pokorice
DAB	2,4-diaminobutirična kiselina
CPS	Kapsularni polisaharidi (na engleskom: capsular polysaccharides)
cc H₂SO₄	Koncentrovana sumporna kiselina
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi
HPLC-DAD	Tečna hromatografija visokih performansi sa detektorom sa nizom diode
HSPs	Proteini toplotnog šoka (na engleskom: heat shock proteins)
LC-MS/MS	Tečna hromatografija-masena spektrometrija
MC-LR	Mikrocistin-LR
MOMA	Metaboliti u Opsegu Mikosporin Apsorbance
MOSA	Metaboliti u Opsegu Scitonemin Apsorbance
NDVI indeks	Normalizovani indeks razlike u vegetaciji (na engleskom: Normalized Difference Vegetation Index)
NSCCC	Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija (na engleskom: Novi Sad Cyanobacterial Culture Collection)
OD	Optička gustina (na engleskom: optical density)
RPS	Izlučeni polisaharidi (na engleskom: released polysaccharides)

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Тамара Паланачки Малешевић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	др Зорица Свирчев, редовни професор, Природно-математички факултет, Нови Сад
Наслов рада:	Значај и улога терестричних цијанобактерија у семи-аридним срединама
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 213 Поглавља: 7 Референци: 385 Табела: 20 Слика: 68 Графикона: 43 Прилога: /
Научна област:	екологија, биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	микробиологија
Кључне речи / предметна одредница:	Цијанобактерије, BLOCDUST хипотеза, биолошке покорице, формирање леса, стабилизација леса, ресторација лесних површина
Резиме на језику рада:	Дезертификација и деградација лесних површина представљају значајне еколошке проблеме који узрокују здравствене и социјално-економске проблеме широм света. Уобичајено коришћене методе за обнављање деградираних површина умерених региона показале су се неприкладним за примену у аридним и семи-аридним условима животне средине, попут оних присутних у лесним регионима и подручјима захваћеним дезертификацијом. Циљ ове дисертације је био да се истражи фундаментална и практична улога цијанобактерија у семи-аридним срединама, укључујући њихов значај у формирању леса и потенцијал у обнављању оштећених лесних површина кроз потпомогнути развој биолошких лесних покорица. Цијанобактеријски сојеви су изоловани из биолошких лесних покорица из Србије, Кине и Ирана и анализирани на следеће особине: продукцију биомасе, продукцију полисахарида, продукцију УВ заштитних пигмената и токсичност. Након тога, процењен је потенцијал одабраних сојева српског порекла у развоју биолошких покорица и проучени су механизми стабилизације лесног седимента у посебно дизајнираној комори која симулира семи-аридне услове. Истраживање се састојало од анализе акумулираних пигмената, микроскопског испитивања, гранулометријских анализа и симулације

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>ерозије ветром. Ова студија је потврдила потенцијал изолованих сојева цијанобактерија у успостављању биолошких покорица на лесу и подручјима захваћених дезертификацијом. Описана је интеракција изолованих цијанобактеријских сојева са честицама у формирању биолошких покорица, као и улога сојева у имобилизацији и стабилизацији честица и стварању вештачког компактног лесног седимента. Предложени модел обнове деградираних лесних површина и подручја захваћених дезертификацијом састоји се од низа активности развијених у оквиру ове студије. Ова дисертација представља важан корак у експерименталном описивању биогеног порекла лесног седимента (поред укључених еолских процеса), и на тај начин у развоју BLOCDUST хипотезе према теорији.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	07.06.2018.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник: др Јелица Симеуновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Нови Сад Члан: др Зорица Свирчев, редовни професор, Природно-математички факултет, Нови Сад Члан: академик проф. др Слободан Марковић, редовни професор, Природно-математички факултет, Нови Сад Члан: др Зорана Тривуновић, доцент, Технолошки факултет Нови Сад, Нови Сад</p>
Напомена:	нема

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Tamara Palanački Malešević
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Zorica Svirčev, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Thesis title:	Importance and role of cyanobacteria in semi-arid environments
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 213 Chapters: 7 References: 385 Tables: 20 Illustrations: 68 Graphs: 43 Appendices: /
Scientific field:	Ecology, Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Microbiology
Subject, Key words:	Cyanobacteria, BLOCDUST hypothesis, biocrusts, loess formation, loess stabilization, loess restoration
Abstract in English language:	Desertification and loess sediment degradation are significant environmental problems causing health and socioeconomic problems worldwide. Commonly used methods for restoration of degraded lands in temperate regions seem unsuitable for use in arid and semi-arid environmental conditions, such as those present in loess regions and areas affected by desertification. This study aims to investigate the fundamental and practical role of cyanobacteria in semi-arid environmental conditions including their significance in loess formation and the potential for restoration of exposed loess surfaces through assisted development of biological loess crusts. Cyanobacterial strains were isolated from biological loess crusts from Serbia, China, and Iran and screened for biomass production, polysaccharide production, production of UV-protective pigments, as well as toxicity. Thereafter, a selected mixture of cyanobacterial strains of Serbian origin was assessed in assisted development of biocrusts and the mechanisms of loess stabilization were studied in a specially designed chamber simulating semi-arid environmental conditions. The investigation consisted of analysis of pigment accumulation, microscopic examination, granulometric analyses, and simulation of wind erosion. This study confirmed the potential of isolated cyanobacterial strains in establishment of biological crusts on loess and areas affected by desertification. Interaction of isolated cyanobacterial strains with particles in biocrust formation, role of the strains in particle immobilization and stabilization, and creation of artificial compact loess sediment were

² 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 the faculty and are not included into the printed thesis.

	described. The proposed model of restoration of exposed loess surfaces and areas affected by desertification consists of a sequence of activities developed within this study. This study represents an important step in experimentally describing the biogenic origin of loess sediment (besides the aeolian processes involved) and thus developing the BLOCDUST hypothesis towards a theory.
Accepted on Scientific Board on:	07.06.2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Dr Jelica Simeunović, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad Member: Dr Zorica Svirčev, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad Member: Academician Dr Slobodan Marković, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad Member: Dr Zorana Trivunović, assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad, Novi Sad.
Note:	none

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opšte karakteristike cijanobakterija	1
1.2. Terestrične cijanobakterije u biološkim pokoricama	6
1.2.1. Značaj bioloških pokorica	6
1.2.2. Značaj cijanobakterija u biološkim pokoricama	10
1.3. Biološke lesne pokorice	16
1.3.1. Opšte karakteristike lesnog sedimenta	16
1.3.2. Formiranje lesnog sedimenta	18
1.4. Problemi izazvani dezertifikacijom i degradacijom površina pokrivenih biološkim pokoricama	24
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Uzorkovanje bioloških lesnih pokorica i lesnog sedimenta sa opisom lokaliteta	30
3.2. Izolacija i kultivacija lesnih cijanobakterijskih sojeva	34
3.3. Skrining ekofizioloških svojstava izolovanih cijanobakterijskih sojeva	36
3.3.1. Detekcija toksičnosti izolovanih cijanobakterijskih sojeva primenom <i>Artemia salina</i> biološkog testa toksičnosti	37
3.3.2. Određivanje produkcije biomase	38
3.3.3. Određivanje produkcije polisaharida	40
3.3.4. Određivanje viskoziteta medijuma	43
3.3.5. Određivanje produkcije UV zaštitnih pigmenata	45
3.3.6. Statistička obrada podataka	48
3.4. Procena sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da vežu i stabilizuju čestice prašine	49
3.4.1. Dizajn komora	49
3.4.2. Razvijanje cijanobakterijskog pokrivača	50
3.4.3. <i>Ex-situ</i> eksperiment vezivanja i stabilizacije čestica	51
3.4.4. Određivanje veličine čestica lesnog sedimenta	52
3.4.5. Mikroskopska analiza razvijenih bioloških lesnih pokorica	53
3.4.6. Određivanje akumulacije hlorofila <i>a</i> , karotenoida i scitonemina u	53

biološkim lesnim pokoricama	
3.4.7. Uloga cijanobakterijskih bioloških lesnih pokorica u sprečavanju erozije	55
4. REZULTATI	56
4.1. Izolacija, determinacija i morfološki opis lesnih cijanobakterijskih sojeva	56
4.2. Skringing izolovanih cijanobakterijskih sojeva	61
4.2.1. Detekcija toksičnosti - <i>Artemia salina</i> biološki test toksičnosti	61
4.2.2. Produkcija biomase izolovanih cijanobakterijskih sojeva	64
4.2.3. Produkcija polisaharida	73
4.2.3.1. Količina izlučenih i ukupnih polisaharida	74
4.2.3.2. Udeo izlučenih polisaharida	79
4.2.3.3. Prinos ukupnih i izlučenih polisaharida	81
4.2.4. Viskozitet medijuma	87
4.2.5. Produkcija zaštitnih pigmenata	90
4.2.5.1. Produkcija MOSA	91
4.2.5.2. Produkcija MOMA	92
4.3. <i>Ex-situ</i> eksperiment vezivanja i stabilizacije čestica prašine od strane cijanobakterija	93
4.3.1. Razvoj i morfologija bioloških lesnih pokorica	93
4.3.2. Interakcija cijanobakterija sa česticama prašine	98
4.3.2.1. Vezivanje čestica prašine	98
4.3.2.2. Akumulacija i taloženje čestica prašine	99
4.3.2.3. Stabilizacija čestica prašine cijanobakterijama	101
4.3.3. Zajednica i mikromorfologija bioloških lesnih pokorica eksperimentalne komore	102
4.3.4. Uticaj cijanobakterija na veličinu čestica u komorama	112
4.3.5. Akumulacija pigmenata nakon navejavanja	118
4.3.6. Uloga bioloških lesnih pokorica u sprečavanju erozije lesnog sedimenta	119
5. DISKUSIJA	121
5.1. Produkcija toksina, biomase, polisaharida i zaštitnih pigmenata izolovanih cijanobakterijskih sojeva	121
5.1.1. Ekofiziologija izolovanih cijanobakterijskih sojeva	121
5.1.2. Toksičnost cijanobakterijskih sojeva	122

5.1.3. Produkcija biomase cijanobakterijskih sojeva	125
5.1.4. Produkcija polisaharida cijanobakterijskih sojeva	128
5.1.5. Produkcija zaštitnih pigmenata cijanobakterijskih sojeva	134
5.2. Morfologija i diverzitet veštački razvijenih bioloških lesnih pokorica	137
5.3. Stabilizacija čestica cijanobakterijama	140
5.4. Predlog za stabilizaciju i obnovu degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom	144
5.4.1. Procena problema degradacije površina lesnih sedimenata i pregled mogućeg rešenja	146
5.4.2. Istraživanje ekosistema (analize na terenu)	153
5.4.3. Sastav uzorkovanih bioloških pokorica i analiza sedimenta	155
5.4.4. Skringing izolovanih sojeva - odabir optimalnih sojeva za inokulaciju	157
5.4.5. Inokulacija cijanobakterijske biomase	162
5.4.6. Monitoring rasta bioloških pokorica i procena uspeha primenjenih aktivnosti stabilizacije i obnove	165
5.4.7. Odabrani sojevi nakon skringinga u cilju restoracije degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom	167
5.5. Uvođenje nove BLOCDUST teorije bazirane na ulozi i značaju cijanobakterija u formiraju lesnog sedimenta	175
6. ZAKLJUČCI	179
7. LITERATURA	182

REZIME

Dezertifikacija i degradacija lesnih površina predstavljaju značajne ekološke probleme koji uzrokuju zdravstvene i socijalno-ekonomske probleme širom sveta. Uobičajeno korišćene metode za obnavljanje degradiranih površina umerenih regiona pokazale su se neprikladnim za primenu u aridnim i semi-aridnim uslovima životne sredine, poput onih prisustnih u lesnim regionima i područjima zahvaćenim dezertifikacijom. Cilj ove disertacije je bio da se istraži fundamentalna i praktična uloga cijanobakterija u semi-aridnim sredinama, uključujući njihov značaj u formiranju lesa i potencijal u obnavljanju oštećenih lesnih površina kroz potpomognuti razvoj bioloških lesnih pokorica. Cijanobakterijski sojevi su izolovani iz bioloških lesnih pokorica iz Srbije, Kine i Irana i analizirani na sledeće osobine: produkciju biomase, produkciju polisaharida, produkciju UV zaštitnih pigmenata i toksičnost. Nakon toga, procenjen je potencijal odabranih sojeva srpskog porekla u razvoju bioloških pokorica i proučeni su mehanizmi stabilizacije lesnog sedimenta u posebno dizajniranoj komori koja simulira semi-aridne uslove. Istraživanje se sastojalo od analize akumuliranih pigmenata, mikroskopskog ispitivanja, granulometrijskih analiza i simulacije erozije vetrom. Ova studija je potvrdila potencijal izolovanih sojeva cijanobakterija u uspostavljanju bioloških pokorica na lesu i područjima zahvaćenih dezertifikacijom. Opisana je interakcija izolovanih cijanobakterijskih sojeva sa česticama u formiranju bioloških pokorica, kao i uloga sojeva u imobilizaciji i stabilizaciji čestica i stvaranju veštačkog kompaktnog lesnog sedimenta. Predloženi model obnove degradiranih lesnih površina i područja zahvaćenih dezertifikacijom sastoji se od niza aktivnosti razvijenih u okviru ove studije. Ova disertacija predstavlja važan korak u eksperimentalnom opisivanju biogenog porekla lesnog sedimenta (pored uključenih eolskih procesa), i na taj način u razvoju BLOCDUST hipoteze prema teoriji.

ABSTRACT

Desertification and loess sediment degradation are significant environmental problems causing health and socioeconomic problems worldwide. Commonly used methods for restoration of degraded lands in temperate regions seem unsuitable for use in arid and semi-arid environmental conditions, such as those present in loess regions and areas affected by desertification. This study aims to investigate the fundamental and practical role of cyanobacteria in semi-arid environmental conditions including their significance in loess formation and the potential for restoration of exposed loess surfaces through assisted development of biological loess crusts. Cyanobacterial strains were isolated from biological loess crusts from Serbia, China, and Iran and screened for biomass production, polysaccharide production, production of UV-protective pigments, as well as toxicity. Thereafter, a selected mixture of cyanobacterial strains of Serbian origin was assessed in assisted development of biocrusts and the mechanisms of loess stabilization were studied in a specially designed chamber simulating semi-arid environmental conditions. The investigation consisted of analysis of pigment accumulation, microscopic examination, granulometric analyses, and simulation of wind erosion. This study confirmed the potential of isolated cyanobacterial strains in establishment of biological crusts on loess and areas affected by desertification. Interaction of isolated cyanobacterial strains with particles in biocrust formation, role of the strains in particle immobilization and stabilization, and creation of artificial compact loess sediment were described. The proposed model of restoration of exposed loess surfaces and areas affected by desertification consists of a sequence of activities developed within this study. This study represents an important step in experimentally describing the biogenic origin of loess sediment (besides the aeolian processes involved) and thus developing the BLOCDUST hypothesis towards a theory.

1. UVOD

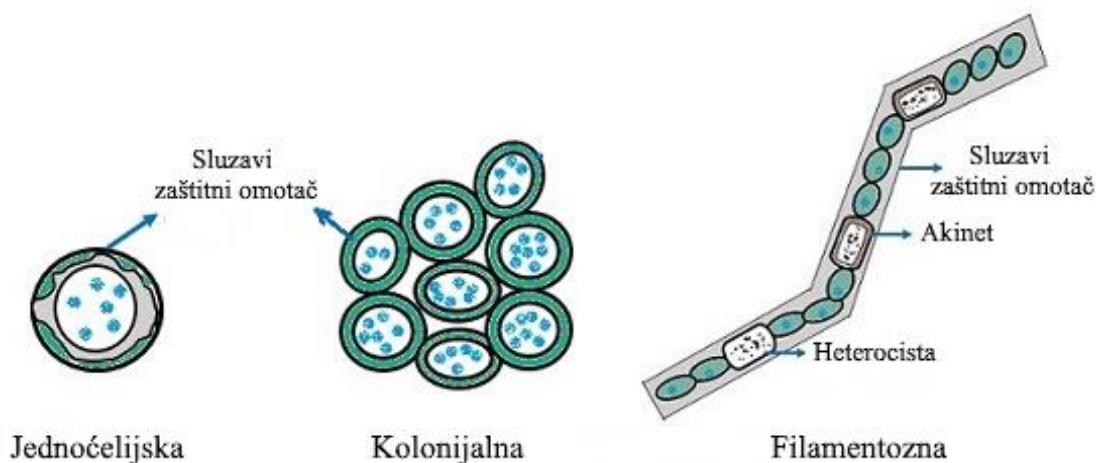
1.1. Opšte karakteristike cijanobakterija

Cijanobakterije (*Cyanobacteria*), poznate još kao modro-zelene alge, su grupa fotoautotrofnih prokariotskih organizama. Smatraju se organizmima odgovornim za stvaranje kiseonične atmosfere pre 2200-2400 miliona godina. Cijanobakterije i danas imaju važnu ulogu u kruženju ugljenika, azota i minerala u akvatičnim i terestričnim ekosistemima (Codd i sar., 2017).

Ćelije cijanobakterija imaju prokariotski tip organizacije. Njihove vegetativne ćelije se sastoje od ćelijskog zida i protoplasta. Protoplast je izdiferenciran na nukleoplazmu (prokarion, centroplazmu) i hromatoplazmu (procitoplazmu). Nukleoplazma zauzima centralni deo ćelije i u njoj se nalazi DNK. Hromatoplazma, obavijajući nukleoplazmu, zauzima periferni deo ćelije i u njoj se nalazi fotosintetički aparat. Njihov fotosintetički aparat sadrži pigmente, među kojima su najčešći hlorofil *a*, fikobilini i karotenoidi. Ćelijski zid je višeslojan u čiji sastav ulaze peptidoglikani. Na ćelijski zid naleže sluzavi omotač koji štiti ćelije od isušivanja. Može imati i ulogu u puzećem kretanju ili udruživanju većeg broja jedinki u kolonije različitog oblika (Cvijan i Blaženčić, 1996). Cijanobakterije imaju sposobnost akumuliranja hranljivih materija i metabolita u citoplazmi u vidu glikopeptida, karboksizoma, cijanoficinskih zrna i polifosfatnih tela (Mur i sar., 1999).

U odnosu na građu talusa, cijanobakterije se javljaju kao jednoćelijske, kolonijalne ili filamentozne (trihalne) (Slika 1). Agregirane ćelije, u nepravilnim ili uređenim kolonijama, drži sluzavi omotač koji cijanobakterije luče tokom rasta (Mur i sar., 1999). Filamentozne cijanobakterije su sačinjene od ćelija raspoređenih u nizu čineći trihom. U odnosu na sastav ćelija koje čine trihom, njihov talus može biti homocitni ili heterocitni. Niz identičnih vegetativnih ćelija čini homocitni talus cijanobakterija. Specijalizovane ćelije kao što su akineti (spore) i heterociste zajedno sa vegetativnim ćelijama čine heterocitni tip talusa. Akineti su specijalizovane ćelije koje nastaju diferenciranjem od vegetativnih ćelija. Služe za preživljavanje nepovoljnih uslova i shodno tome imaju zadebljao ćelijski zid. Bogate su rezervnim hranljivim materijama i imaju do 20-30 puta veći sadržaj DNK nego vegetativne ćelije. Heterociste su ćelije specijalizovane za vezivanje atmosferskog elementarnog azota (azotofiksaciju) koje takođe imaju zadebljao ćelijski zid (Cvijan i Blaženčić, 1996).

U heterocistama se pomoću enzima nitrogenaze atmosferski elementarni azot (N_2) prevodi u amonijum jon (NH_4^+), oblik azota dostupan drugim organizmima (Mur i sar., 1999). Azotofiksirajuće cijanobakterije su naročito zastupljene među filamentoznim predstavnicima koje formiraju heterociste (na primer *Nostoc* i *Anabaena*) (Stewart, 1973). Sposobnost azotofiksacije je primećena i među cijanobakterijskim predstavnicima koji ne formiraju heterociste (Carpenter i sar., 1992).



Slika 1. Morfološka organizacija cijanobakterija

(<https://biologyreader.com>)

Cijanobakterije se ne razmnožavaju polno. Jednoćelijske i kolonijalne cijanobakterije se razmnožavaju prostom ćelijskom deobom. Filamentozni predstavnici se najčešće razmnožavaju hormogonijama. Hormogonije nastaju razdvajanjem filamenta na kratke pokretne fragmente (hormogonije) koji izrastaju u nove jedinice. Neki predstavnici cijanobakterija se razmnožavaju gonidijama, kokama, planokokama, endosporama ili egzosporama (Cvijan i Blaženčić, 1996).

Proces fotosinteze cijanobakterija se odigrava u tilakoidima koji su ekvivalentni hloroplastima algi i biljaka. U membranama tilakoida se nalazi hlorofil *a*, dok su karoteonidi i filikobilini vezani sa spoljašnje strane tilakoida. Pomoćni fotosintetički pigmenti pospešuju efikasnost fotosinteze tako što imaju ulogu da apsorbuju svetlost talasnih dužina koju hlorofil *a* nije u mogućnosti (Blaženčić, 2007). Boja ćelija varira od plavo-zelene do ljubičasto-crvene. Zelena boja koju daje hlorofil *a* može biti maskirana karotenoidima i pomoćnim pigmentima fikobiliproteinima (fikocijanin, alofikocijanin i fikoeritrin) (Mur i sar., 1999).

Pored osnovnih pigmenata koji čine fotosintetički aparat, cijanobakterije imaju sposobnost da sintetišu UV zaštitne pigmente scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline.

Scitonemin je žuto-smeđi zaštitni pigment koji se nalazi u ekstracelularnom polisaharidnom matriksu cijanobakterija (Sinha i Hader, 2008). Grupa scitonemina obuhvata nekoliko strukturno sličnih molekula: scitonemin (javlja se u dva oblika: oksidovani i redukovani) (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Garcia-Pichel i sar., 1992), dimetoksiscitonemin, tetrametoksiscitonemin, scitonin (Butel-Ponce i sar., 2004) i scitonemin-3-imin (Grant i Louda, 2013). Scitonemin pretežno proizvode cijanobakterije (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Rastogi i sar., 2014). Prvi pronalazak scitonemina je bio kod terestričnih cijanobakterija (Nägeli, 1849). Sinteza scitonemina je primarno stimulirana UV-A zračenjem (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991). Iako on ima najveći stepen apsorpcije u UV-A delu spektra (315-400 nm), snažan stepen apsorpcije je pokazao i u UV-B (280-320 nm) i UV-C delu spektra (190-280 nm) (Proteau i sar., 1993; Dillon i Castenholz, 1999). Prečišćeni scitonemin je pokazao maksimalnu apsorpciju na 386 nm, dok značajan stepen apsorpcije ima i na 252, 278 i 300 nm (Sinha i Hader, 2008). Scitonemin može da čini 5% suve biomase cijanobakterijskih kultura, dok taj sadržaj kod prirodnih cijanobakterijskih zajednica može biti veći (Castenholz, 1997). Mikosporinu slične aminokiseline su bezbojni i u vodi rastvorljivi molekuli koji imaju sposobnost apsorpcije u UV delu spektra između 230 i 400 nm, sa apsorpcionim maksimumom između 310 i 360 nm (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993). Sinteza mikosporinu sličnih aminokiselina je rezultat različitih faktora životne sredine, UV zračenja, temperature, pH vrednosti, sadržaja azota (Lalić i sar., 2020). Sposobnost sinteze ovih molekula pokazali su različiti organizmi od polarnih do tropskih područja (Sinha i sar., 2007). Sinteza mikosporinu sličnih aminokiselina je utvrđena kod heterotrofnih bakterija, lišajeva, cijanobakterija, gljiva, mikro i markoalgi, čak i nekoliko vrsta životinja. Prisustvo ovih supstanci kod životinja se pripisuje njihovim unošenjem putem lanca ishrane. Produkcija mikosporinu sličnih aminokiselina je uočena kod različitih cijanobakterijskih vrsta poreklom sa različitih staništa (Rastogi i sar., 2014).

Pored primarnih metabolita, neophodnih za rast, razvoj i razmnožavanje, cijanobakterije proizvode i sekundarne metabolite. Cijanobakterije proizvode sekundarne metabolite kao odgovor na biotički ili abiotički stres, što im zatim pruža zaštitu i omogućava preživljavanje (Kultschar i Liewellyn, 2018). Sekundarni metaboliti imaju širok spektar funkcija za zaštitu ćelija, kao što su odbrana od predatora, fotozaštita i antioksidativna zaštita (Kultschar i Liewellyn, 2018). Neki od sekundarnih metabolita cijanobakterija su egzopolisaharidi i cijanotoksini. Egzopolisaharidi doprinose strukturnoj stabilnosti zajednice, vlažnosti okoline, kao i fizičkoj i hemijskoj zaštiti od biotičkih i abiotičkih faktora sredine (Rossi i De Philippis, 2015). Cijanotoksini su biološki aktivna jedinjenja čiji je negativan

uticaj na zdravlje ljudi, životinja i biljaka poznat (Svirčev i sar., 2009; 2015; 2016a; Metcalf i Codd, 2012). Cijanotoksine produkuju cijanobakterije poreklom iz vodenih i kopnenih ekosistema. Produkcija cijanotoksina u vodenim ekosistemima i biofilmovima je dobro istražena (Codd i sar., 2005a; 2005b). U odnosu na organe na koje deluju cijanotoksini se dele na hepatotoksine, neurotoksine, dermatotoksine i citotoksine (Carmichael, 1992; Codd i sar., 2005c). Hepatotoksini (mikrocistini i nodularini) inhibicijom protein fosfataze oštećuju jetru, ali mogu uticati i na druge organe (Carmichael, 1992; Codd i sar., 2005c). Neurotoksini utiču na centralni nervni sistem tako što imitiraju efekat neurotransmitera acetilholin-a (anatoksin-a i homoanatoksin-a), inhibiraju acetilholin esterazu (anatoksin-a(S)) ili inhibiraju natrijumove jonske kanale (saksitoksini) (Sivonen i Jones, 1999). Dermatotoksini (aplaziatoksin, dermoaplaziatoksin i lingbiatoksin) su uzročnici dermatitisa, oralnih i gastrointestinalnih inflamacija (Carmichael, 1992; Codd i sar., 2005c). Citotoksini (cilindrospermopsin i lipopolisaharidi) su izročnici alergijskih reakcija koji oštećuju jetru, bubrege i kožu (Carmichael, 1992; Codd i sar., 2005c). Za razliku od akvatičnih ekosistema, produkcija cijanotoksina u terestričnim ekosistema zahteva više pažnje. Iako su cijanobakterije glavna komponenta pustinjačkih ekosistema, prisustvo cijanotoksina u njima je slabo istraženo (Powell i sar., 2015). Cox i sar. (2009) su identifikovali prisustvo cijanotoksina u pustinjačkim biološkim pokoricama. Međutim, sprovedene analize cijanotoksina u pustinjačkim biološkim pokoricama su skoncentrisane na pustinju u Kataru (na primer: Metcalf i sar., 2012; 2015; Richer i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2020), dok je njihovo prisustvo u biološkim pokoricama drugih aridnih i semi-aridnih ekosistemima slabije istraženo. Imajući u vidu negativan uticaj cijanotoksina, njihovo istraživanje je neophodno u svim ekosistemima gde cijanobakterije imaju važnu ulogu.

Cijanobakterije naseljavaju vodene ekosisteme (slatke, slane i brakične vode), terestrične ekosisteme, kao i polarne regione (sneg i led) (Blaženčić, 2000). One su pionirski i ekstremofilni organizmi mineralnih voda, termalnih izvora, zemljišta, golih stena, peščara, slatina, pećina, planinskih vrhova, fasada, lesnih sedimenata i drugih nepristupačnih staništa (Whitton i Potts, 2000; 2012). Za cijanobakterije je karakteristično da mogu da prežive na Antarktiku na -83°C , ali i u termalnim izvorima gde temperature dostiže čak 70°C (Blaženčić, 1998). Zbog sposobnosti da vrše fotosintezu, fiksiraju atmosferski elementarni azot i prežive nepovoljne uslove sredine, cijanobakterije su česti primarni kolonizatori (Codd i sar., 2017). One imaju važnu ulogu u funkcionisanju terestričnih ekosistema i kruženju hranljivih materija (Whitton, 1992). Široku rasprostranjenost cijanobakterija omogućava njihova sposobnost da prežive nepovoljne uslove sredine kao što su isušivanje, visoke temperature i

povećano UV zračenja. Tri glavne životne strategije cijanobakterija za smanjenje mortaliteta usled izloženosti štetnom UV zračenju su izbegavanje, oporavak i zaštita (Cockell i Knowland, 1999). Prva linija odbrane cijanobakterija od štetnog UV zračenja je sposobnost migracije u okviru svoje zajednice i lučenje egzopolisaharida (Singh i sar., 2010; Rastogi i sar., 2014). Cijanobakterije imaju sposobnost da migriraju iz viših delova mikrobiološke zajednice u niže delove gde je intenzitet štetnog UV zračenja niži (Bebout i Garcia-Pichel, 1995; Bowker i sar., 2002; Singh i sar., 2010; Rastogi i sar., 2014). Cijanobakterije sa debljim sluzavim omotačem bolje podnese štetno UV zračenje, ali i sušne uslove (Rastogi i sar., 2014). Cijanobakterije su razvile antioksidativni sistem kako bi se izborile sa oksidativnim stresom koji nastaje kao posledica interakcije UV zračenja sa kiseonikom i drugim organskim molekulima u ćeliji i proizvode toksične slobodne radikale. Njihov antioksidativni sistem obuhvata neenzimske i enzimске antioksidante. Enzimski antioksidanti uključuju superoksid dismutazu, katalaze, glutation peroksidaze, dok su neki od neenzimskih antioksidanata karotenoidi, askrobinska kiselina, redukovani glutation (Rastogi i sar., 2014). Cijanobakterije imaju sposobnost da popravljaju oštećene delove DNK ili sintetišu nove proteine i zamene oštećene kopije (Sinha i Häder, 2002; Singh i sar., 2010). Jedan od mehanizama zaštite cijanobakterija jesu proteini toplotnog šoka (na engleskom: heat shock proteins, HSPs), koji daju stabilnost tilakoidima pri intenzivnom osvetljenju (Hossain i Nakamoto, 2003). Značajan mehanizam zaštite cijanobakterija od štetnosti UV zračenja jesu UV zaštitni pigmenti koji se dele u tri glavne grupe: scitonemini, mikosporinu slične aminokiseline i karotenoidi (Bowker i sar., 2002). Karotenoidi su žuto do narandžasto-crveni pigmenti koji imaju ulogu u uslovima slabije i jače osvetljenosti. Pri jačem osvetljenju karotenoidi štite ćeliju od fotooksidativnog oštećenja, dok pri slabijem osvetljenju imaju ulogu pomoćnih pigmenata u fotosintezi gde sakupljaju svetlost i prenose je na hlorofil *a* (Hirschberg i Chamovitz, 1994). Mikosporinu slične aminokiseline i scitonemin su dobro poznate UV zaštitne supstance koje pružaju zaštitu protiv UV-A i/ili UV-B zračenja (Sinha i Häder, 2008).

1.2. Terestrične cijanobakterije u biološkim pokoricama

1.2.1. Značaj bioloških pokorica

Terestrične cijanobakterije su jedna od glavnih komponenti bioloških pokorica aridnih i semi-aridnih ekosistema (Belnap i Lange, 2001). Biološke zemljišne pokorice (BZP) (na engleskom: biological soil crusts, BSCs) predstavljaju zajednicu organizama (cijanobakterija, zelenih algi, lišajeva, mahovina, mikrogljiva i bakterija) povezanih sa česticama tla (Eldridge i Greene, 1994; Belnap i sar., 2001; Williams i sar., 2012). BZP su u naučnoj literaturi poznate i pod sledećim nazivima: kriptogamske, kriptobiotičke, mikrobiotičke ili mikrofitske zemljišne pokorice (Belnap i sar., 2001). Biološke pokorice formiraju koru u površinskim delovima tla debljine od nekoliko milimetara ili centimetara (Belnap i Lange, 2003). Javljaju se na svih sedam kontinenata u svim klimatskim zonama od arktičkih, borealnih, umerenih, mediteranskih do tropskih (Belnap i Lange, 2003; Veste, 2005). Naročito su važne u aridnim, semi-aridnim, polarnim i alpskim predelima gde klimatski uslovi ograničavaju razvoj vaskularnih biljaka (Büdel i Veste, 2008; Williams i sar., 2016). One u sušnim predelima kolonizuju delove tla između grupacija viših biljaka koji su siromašni hranljivim materijama (Belnap i sar., 2001). Čest su biološki pokrivač u aridnim i semi-aridnim područjima koje karakteriše slab vegetacijski pokrivač ili čak njegovo odsustvo (Belnap i sar., 2001; Zhao i Xu, 2013). Biološke pokorice u ovim regionima prave čvrst i neujednačen biološki pokrivač na površini tla, visine od 1 do 10 cm (Belnap i sar., 2001), čineći jednu od najuočljivijih i najvažnijih biotičkih komponenti ovih područja (Maestre i sar., 2011). U nekim ekosistemima mogu činiti 70% biološkog pokrivača (Belnap, 1994). Biološke pokorice pokrivaju oko 12% Zemljine kopnene površine (Rodríguez-Caballero i sar., 2018).

Biološke pokorice čine organizmi koji imaju sposobnost da prežive sušne periode. Po nastupanju suše oni prelaze u stanje mirovanja, dok nekoliko minuta nakon vlaženja postaju fotosintetički aktivni (Belnap i sar., 2001). U ekosistemima sa nepovoljnim uslovima sredine biološke pokorice imaju značajnu ulogu: poboljšavaju plodnost i stabilnost tla, smanjuju eroziju izazvanu vetrom i vodom (Malam Issa i sar., 1999; 2001); povećavaju infiltraciju vode i odlažu njeno oticanje (Xiao i sar., 2011); utiču na povećanje sadržaja zemljišnih gljiva i bakterija (Lan i sar., 2013).

U svim biološkim pokoricama cijanobakterije su primarni kolonizatori, stabilizatori i azotofiksatori (Belnap i Lange, 2003), koje kontrolišu sadržaj vode u ekosistemu (Chamizo i sar., 2013). Nakon uspostavljanja cijanobakterijske zajednice, pojavljuju se eukariotske alge koje zajedno sa cijanobakterijama doprinose povećanju sadržaja ugljenika u tlu (Colesie i sar., 2016). Lišajevi zahtevaju stabilnu sredinu za svoj rast i razvoj zbog čega se javljaju nakon stabilizacije tla cijanobakterijama i algama (Eldridge i Greene, 1994; Belnap i sar., 2001). Poslednji sukcesivni stadijum u razvoju bioloških pokorica su mahovine, iako se često mogu razviti pre lišajeva (Eldridge i Greene, 1994).

Biološke pokorice predstavljaju visokospecijalizovanu zajednicu različitih organizama. U odnosu na dominantnu grupu organizama biološke pokorice mogu biti sledeće (Belnap i sar., 2001):

➤ *Cijanobakterijske biološke pokorice* koje su obično tamne ili crne boje. U vlažnom stanju se mogu videti tamne niti na površini ili u blizini površine tla. U slučaju manjeg broja prisutnih ćelija ove pokorice se vide kao crne ćelije pomešane sa česticama tla. U slučaju boljeg razvoja cijanobakterijskih pokorice, površina koju one pokrivaju postaje blago do jako hrapava.

➤ *Biološke pokorice zelenih algi* nisu uvek vidljive na površini tla, često se nakon vlaženja vide kao zelena "fleka". Često je pojava zelenih algi povezana sa hladnijim i vlažnijim uslovima, pa ih je teško uočiti u suvom stanju.

➤ *Biološke pokorice lišajeva* su prepoznatljive po raznovrsnosti boja i oblika u kojima se javljaju. Mogu se javiti kao glatke ili trodimenzionalne strukture na površini tla.

➤ *Biološke pokorice mahovina* se javljaju kao debeo tepih sa delovima zelene, smeđe, zlatne i/ili crne boje. U slučaju nestabilizovanog tla, pojavljivanje mahovina i lišajeva je ograničeno na deo ispod vaskularnih biljaka koje ih štite od zatrpavanja česticama ili na severnim padanima gde dostupnost vlage omogućava njihov rast.

➤ *Biološke pokorice jetrenjača* su teško uočljive jer se ovi organizmi obično javljaju u zajednici sa drugim organizmima bioloških pokorica.

Uloge i značaj bioloških pokorica su različiti u zavisnosti od organizama koji dominiraju u biološkim pokoricama datog ekosistema. Sadržaj ugljenika je veći u biološkim pokoricama u kojima dominiraju lišajevi i mahovine, dok je sadržaj azota veći kada je biološki pokrivač pretežno sačinjen od cijanobakterija i cijanolišajeva (Belnap i sar., 2001). Stabilnost agregata tla je veća kada je tlo prekriveno bolje razvijenim pokoricama (cijanobakterija, lišajeva ili mahovina) u odnosu na fizičke pokorice ili početne stadijume bioloških pokorica (Chamizo i sar., 2012). Biološke pokorice utiču i na kvalitet tla ispod

pokorica. Sadržaj vode, organskog ugljenika i azota u samim pokoricama i tlu ispod njih se značajno povećava sa razvojem pokorica (Chamizo i sar., 2012).

Zbog svojih karakteristika biološke pokorice imaju potencijal da služe kao odlično nastavno sredstvo (Faist i sar., 2021). One mogu da funkcionišu kao prenosni, dinamični mini ekosistemi za podučavanje o organizmima, biodiverzitetu, biotičkim interakcijama, procesima u ekosistemu i globalnim promenama (Faist i sar., 2021). Dodavanjem vode može se pratiti promena forme bioloških pokorica, dok se isušivanjem može pratiti reakcija bioloških pokorica na sušu. Posmatranjem pod mikroskopom omogućena je identifikacija prisutnih taksona, dok istraživanje na terenu omogućava identifikaciju raznolikosti bioloških pokorica i uticaj različitih načina upotrebe okolnog zemljišta na njih (Faist i sar., 2021). To sve ukazuje da procesi koji se dešavaju u okviru bioloških pokorica su veoma brzi i efikasni odgovori na promene ekoloških faktora. Ponekad se ove reakcije dešavaju samo nakon nekoliko minuta od nastanka promene ekoloških faktora.

Svirčev i sar. (2019) su ukazali na problematiku terminologije bioloških pokorica. Smene suvih i vlažnih uslova sredine dovode i do promene izgleda bioloških pokorica. Pomenuta grupa naučnika je predložila posmatranje *bioloških pokorica* (na engleskom: biocrusts) kao očvrsele i oštre strukture nastale isušivanjem, koje se sastoje od živih, ali fiziološki slabo aktivnih visokospecijalizovanih organizama u interakciji sa česticama zemljišta ili sedimenta. Nakon kvašenja biološke pokorice postaju vlažne i počinju da deluju kao *biološki terestrični biofilomovi* (na engleskom: biological terrestrial mats), čineći tada funkcionalnu biološku zajednicu. Transformacija bioloških pokorica iz suve (Slika 2) u vlažnu fazu (Slika 3) je relativno brz proces u laboratoriji, ali i prirodnim uslovima. Nakon biofilma se razvija moćan sloj vlažne pokorice u uslovima odgovarajućih ekoloških faktora.



Slika 2. Biološke pokorice na lesu sa lesnog profila napuštene ciglane u Rumi
(Svirčev i sar., 2019)



Slika 3. Vlažna biološka pokorica uzgajana u laboratoriji
(Svirčev i sar., 2019)

Svirčev i saradnici su takođe istakli da je upotreba naziva BZP (*biološke zemljišne pokorice*) za sve vrste bioloških pokorica diskutabilna imajući u vidu da su biološke pokorice razvijene na zemljištu, pesku, lesnom sedimentu, stenama i drugim podlogama morfološki i ekofiziološki različite (Svirčev i sar., 2019). Iz tog razloga je potrebna preciznija terminologija bioloških pokorica. U skladu sa tim, izdvojen je poseban tip bioloških pokorica

koje se razvijaju na lesnom sedimentu-*biološke lesne pokorice* (BLP) (na engleskom: biological loess crusts, BLCs) (Slika 4).



Slika 4. Lesni profil Titelskog lesnog platoa prekriven BLP

(Lokalitet: Vilovo, Srbija)

(Foto: autor)

1.2.2. Značaj cijanobakterija u biološkim pokoricama

Značaj cijanobakterija u biološkim pokoricama se ogleda u njihovoj sposobnosti da prežive i rastu u surovim uslovima životne sredine, što im omogućavaju njihove specifične osobine (sposobnost migriranja unutar bioloških pokorica, sposobnost preživljavanja isušivanja i ekstremnih temperature, produkcija UV zaštitnih pigmenata i produkcija polisaharida) (Garcia-Pichel i Pringault, 2001; Lan i sar., 2010; Rao i sar., 2011; Rossi i De Philippis, 2015). Cijanobakterije imaju sposobnost da deaktiviraju i ponovo aktiviraju svoje metaboličke procese u skladu sa uslovima sredine (Doudle i Williams, 2010). U zajednici bioloških pokorica one mogu da koriste ne samo kišu već i rosu kao izvor vode za potrebe svojih metaboličkih procesa (Rao i sar., 2009). Zaady i Offer (2010) su pokazali da

cijanobakterije u biološkim pokoricama mogu da prežive, zaštite površinu tla i učestvuju u sakupljanju čestica prašine koristeći isključivo rosu kao izvor vode. Jedna od strategija preživljavanja cijanobakterija u nepovoljnim uslovima sredine je njihova sposobnost da migriraju unutar bioloških pokorica. Cijanobakterije imaju sposobnost da prate dostupnost vode, migrirajući u površinske delove pokorice tokom vlažnih perioda i vraćajući se u dublje delove tokom sušnih perioda (Garcia-Pichel i Pringault, 2001). Pored sposobnosti da migriraju, vertikalna distribucija cijanobakterijskih vrsta unutar bioloških pokorica je takođe zaštitni mehanizam protiv nepovoljnih uslova sredine (Dulić i sar., 2017). Preživljavanje cijanobakterija u uslovima povećanog UV zračenja omogućava njihova sposobnost da produkuju UV zaštitne supstance kao što su pigmenti scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Sinha i sar., 1998; Lalić i sar., 2020). Cijanobakterije imaju sposobnost da luče egzopolisaharide koji služe kao zaštitni omotač između ćelija i okoline (De Philippis i Vincenzini, 1998).

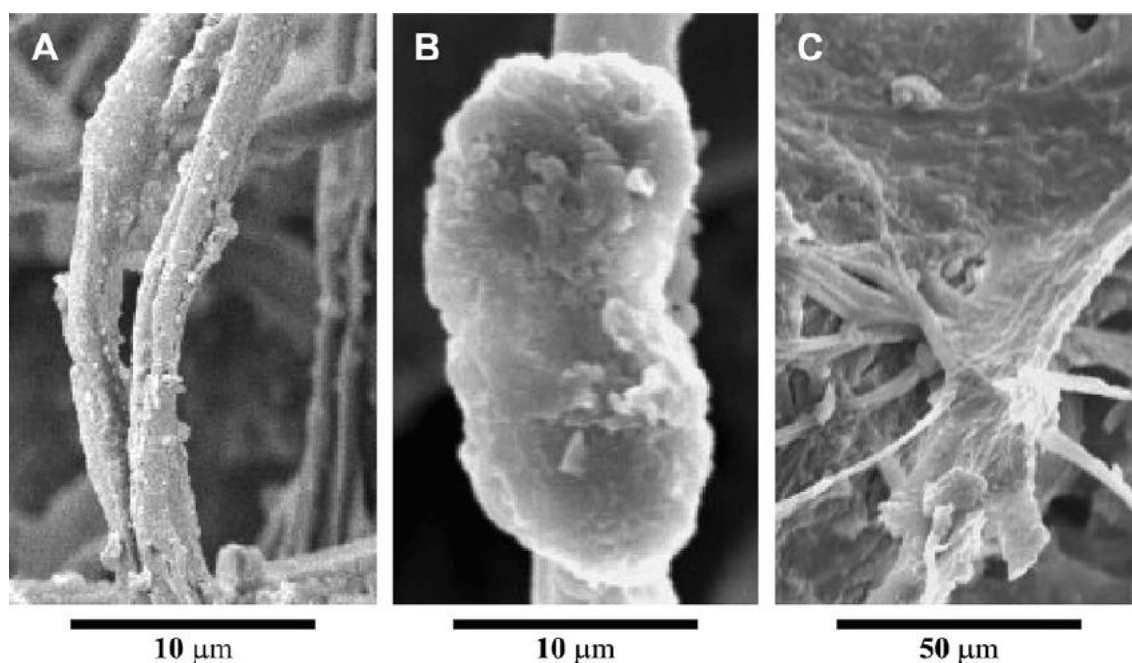
Egzopolisaharidi cijanobakterija

Cijanobakterije su vrlo često glavni producenti egzopolimernih supstanci u različitim mikrobiološkim zajednicama, zbog čega njihovi egzopolisaharidi imaju ključnu ulogu u uspostavljanju i održavanju zajednica kao što su biološke pokorice i fototrofni biofilmovi. Lučenje egzopolisaharida je ključni korak u vezivanju cijanobakterijskih ćelija za čvrstu površinu, čime se omogućava uspostavljanje ovakvih zajednica (Rossi i De Philippis, 2015).

Cijanobakterije tokom svog životnog ciklusa izlučuju egzopolimerni materijal sastavljen od heteropolisaharida i manje količine ne-ugljenohidratnih komponenti kao što su peptidi, DNK i masne kiseline (De Philippis i Vincenzini, 1998; Pereira i sar., 2009). Egzopolisaharide cijanobakterija karakterišu sledeća svojstva: većinom su anjonske prirode zbog sadržaja uronskih kiselina (glukuronske i galakturonske kiseline) i sulfatnih grupa koje im daju lepljiv karakter; prisustvo pentoza (riboze, ksiloze i arabinoze) koje se obično ne mogu naći u egzopolisaharidima drugih prokariotskih organizama; prisustvo deoksi šećera (ramnoze i fukoze), peptida i estrom povezanim acetil grupa usled kojih imaju hidrofobni karakter koji im omogućava vezivanje za čvrste površine; negativno naelektrisane površine cijanobakterijskih egzopolisaharida zbog čega imaju visok afinitet za vezivanje metalnih katjona i drugih pozitivno naelektrisanih i polarnih molekula (sumirano u Rossi i De Philippis, 2015). Većina egzopolisaharida cijanobakterija su složeni heteropolimeri koji se

sastoje od šest ili više različitih monosaharida, za razliku od egzopolisaharida drugih bakterija i mikroalgi koji obično sadrže manje od četiri različita monomera (De Philippis i Vincenzini, 1998). U sastavu polisaharida cijanobakterija se od heksoza mogu naći glukoza, galaktoza, manoz, fruktoza, dok se od pentoz mogu naći riboza, ksiloza, arabinoza (De Philippis i Vincenzini, 1998; Pereira i sar., 2009). Najčešće pronađeni monosaharid u izlučenim egzopolisaharidima cijanobakterija je glukoza (dominira u više od 90% testiranih polimera), zatim galaktoza, manoz i ramnoza koji su pronađeni u 80-85% testiranih polimera (De Philippis i Vincenzini, 1998; 2003). Glukoza je i najzastupljeniji monosaharid u izlučenim egzopolisaharidima, čineći oko 60% izlučenih egzopolisaharida (De Philippis i Vincenzini, 2003).

Uočena su tri morfološka oblika egzopolisaharida cijanobakterija: *omotač* (na engleskom: sheath) je tanak sloj koji okružuje ćeliju ili grupu ćelija, za njih je labavije vezan i obično se vidi pod svetlosnim mikroskopom bez bojenja; *kapsula* (na engleskom: capsule) predstavlja deo sloj povezan sa površinom ćelija; *sluz* (na engleskom: slime) je raspršeni sluzavi materijal oko organizama koji ne odražava oblik ćelija (De Philippis i Vincenzini, 1998; 2003). Tokom rasta cijanobakterija u kulturama može doći do izlučivanja polisaharida kapsule i sluzi u okolni kultivacioni medijum, uzrokujući progresivno povećanje njegove viskoznosti. Cijanobakterije proizvode dva tipa egzopolisaharida u kulturi: hidrofobne kapsularne polisaharide i hidrofilne, u vodi rastvorljive, izlučene polisaharide (De Philippis i Vincenzini, 1998). Ovi izlučeni polisaharidi (na engleskom: released polysaccharides, RPSs) mogu se lako izdvojiti iz tečne kulture, zbog čega su cijanobakterije jedan od najatraktivnijih izvora ovih polimera (De Philippis i Vincenzini, 1998). Kada su u pitanju cijanobakterijski egzopolisaharidi u biološkim pokoricama, Mager i Thomas (2010; 2011) su klasifikovali ove polimere u tri grupe: *kapsule*, *granule* i *sluz* (Slika 5).



Slika 5. Morfološki oblici egzopolisaharida u biološkim pokoricama: kapsula (A), granula (B) i sluz (C)
(Mager i Thomas, 2011)

Uloga egzopolisaharida u biološkim pokoricama

Dva najvažnija limitirajuća faktora primarne produkcije u sušnim predelima su voda i azot (Whitford, 2002). Predstavljajući zaštitnu barijeru između ćelije i spoljašnje sredine (De Philippis i Vincenzini, 1998) egzopolisaharidi cijanobakterijskih pokorica vezuju čestice tla (Malam Issa i sar., 2007) i obezbeđuju nutrijente i vodu (Mazor i sar., 1996; Potts, 2001). Ovi egzopolisaharidi su korisni i za druge organizme mikrobiološke zajednice datog ekosistema, obezbeđujući im vodu, hranljive materije, zaštitu od štetnog UV zračenja i fizičkih oštećenja, kao i izvor ugljenika za heterotrofni deo zajednice (Mazor i sar., 1996; Rossi i De Philippis, 2015).

Egzopolisaharidi zahvaljujući svojim hidrofилnim i hidrofobnim karakteristikama regulišu usvajanje i gubitak vode iz ćelije (Pots, 1999; Tamaru i sar., 2005; Rossi i De Philippis, 2015). Oni imaju značajnu ulogu u održavanju vlage u biološkim pokoricama, naročito tokom sušnih perioda (Mazor i sar., 1996). Tokom vlažnih perioda polisaharidni omotač upija vodu, bubri, a filamenti često budu istisnuti iz njega. Nastupanjem sušnih uslova dolazi do produkcije novih zaštitnih omotača. Upijanjem vode polisaharidni omotač može da poveća svoju težinu i do osam puta (Belnap i Gardner, 1993).

Ugljeni-hidrati cijanobakterijskih pokorica mogu da predstavljaju čak 70% organskog ugljenika u površinskim delovima tla (Mager, 2010). Egzopolisaharidi imaju značajnu ulogu u čuvanju nutrijenata. Negativno naelektrisane čestice gline se vezuju za polisaharidni zaštitni materijal. Nakon toga, pozitivno naelektrisani makronutrijenti se vezuju za prethodno vezane negativne čestice gline i za negativno naelektrisane delove polisaharidnog omotača, što doprinosi čuvanju nutrijenata i sprečava njihovo odnošenje (Belnap i Gardner, 1993). Ovako sačuvani nutrijenti su dostupni ne samo članovima mikrobiološke zajednice, nego i biljkama u datom ekosistemu (Belnap i Gardner, 1993; Harper i Belnap, 2001).

Egzopolisaharidni omotač oko heterociste ima ulogu da štiti enzim nitrogenazu od moguće inaktivacije usled atmosferskog kiseonika (Prosperi, 1994). Štiteći nitrogenazu, egzopolisaharidi obezbeđuju fiksiranje azota od strane cijanobakterija u datoj mikrobiološkoj zajednici. Cijanobakterijski egzopolisaharidi su poznati i po stimulaciji enzimske aktivnosti (de Caire i sar., 2000).

Egzopolisaharidi učestvuju u pokretljivosti ćelija unutar bioloških pokorica (Rossi i De Philippis, 2015). Njihov hidrofobni karakter omogućava vezivanje cijanobakterija za čvrste površine, gde zajedno sa filamentima učestvuje u stvaranju mreže u kojoj su ćelije i čestice tla zarobljene, pružajući strukturnu stabilnost tlu (Rossi i De Philippis, 2015). Povezujući cijanobakterijske ćelije i čestice tla, egzopolisaharidi obezbeđuju potporu cijanobakterijama i predstavljaju mehanizam za povezivanje površinskih slojeva tla (Mazor i sar., 1996). Cijanobakterijski egzopolisaharidi imaju ulogu da vezuju čestice i agregiraju ih u veće, manje erozivne čestice (Belnap i Gardner, 1993; Harper i Marble, 1988). Cijanobakterije i njihovi egzopolisaharidi imaju ključnu ulogu u stabilizaciji tla sušnih predela (Mager i Thomas, 2011), zbog čega se često koriste kao mera stabilnosti tla (Belnap i sar., 2008; Bowker i sar., 2008).

Faktori koji utiču na sintezu egzopolisaharida cijanobakterija

Hemijski sastav, kvalitet i kvantitet cijanobakterijskih egzopolisaharida zavisi od vrste cijanobakterije, uslova gajenja, starosti kulture (De Philippis i Vincenzini, 1998; Nicolaus i sar., 1999; Otero i Vincenzini, 2003; Trabelsi i sar., 2009; Mota i sar., 2013; Sharma i Chahar, 2013). Karakteristike egzopolisaharida jednog istog soja se mogu razlikovati u zavisnosti da li se soj gaji u laboratorijskim ili prirodnim uslovima (De Philippis i Vincenzini, 1998). Gajenjem sojeva u laboratorijskim uslovima, gde nema ograničenja u pogledu

nutrijenata, mogu se proizvoditi složeniji polimeri, za razliku od prirodnih uslova (na primer u sušnim predelima) gde su organizmi izloženi nedostatku nutrijenata (Huang i sar., 1998; Brüll i sar., 2000). U ograničenim uslovima cijanobakterije proizvode samo osnovne proizvode metabolizma kao što su glukoza i galaktoza (Brüll i sar., 2000).

Dostupnost, količina, mogući nedostatak i međusobni odnos nutrijenata utiču na proizvodnju egzopolisaharida (Rossi i De Philippis, 2015). Veća količina ugljenika u odnosu na azot može stimulirati proizvodnju egzopolisaharida u cilju skladištenja ugljenika (Otero i Vincenzini, 2004). Količina i učestalost padavina u sušnim predelima može imati jedan od najznačajnijih uticaja na sudbinu ugljenika (gubitak ili akumulacija ugljenika), a samim tim i na proizvodnju egzopolisaharida (Thomas i sar., 2008; Mager i Thomas, 2011). Kratkotrajni kišni periodi dovode do akumulacije ugljenika jer na ovakav sadržaj vode reaguju samo autotrofni organizmi u površinskim slojevima tla, dok pri produženim vlažnim periodima dolazi do aktiviranja heterotrofne zajednice u dubljim delovima tla koji u procesima respiracije dovode do gubitka ugljenika (Thomas i sar., 2008). Primećeni su stimulirajući efekti nedostatka azota (Moreno i sar., 1998; Nicolaus i sar., 1999), kao i prisustva izvora azota (Lama i sar., 1996; Yu i sar., 2010) na proizvodnju egzopolisaharida. Uticaj azota na proizvodnju polisaharida može biti različit i specifičan je za vrstu ili soj (De Philippis i Vincenzini, 1998; Otero i Vincenzini, 2003). Promene dostupnosti azota u cijanobakterijskim pokoricama mogu uticati na sintezu egzopolisaharida, što se može odraziti na proces azotifikacije u kom cijanobakterije koriste ugljenik iz polisaharida kao izvor energije (Mager i Thomas, 2011). Proizvodnja egzopolisaharida se može stimulirati aeracijom kultura prilikom gajenja sojeva (Su i sar., 2007). Povećanjem intenziteta svetlosti (Trabelsi i sar., 2009; Yu i sar., 2010) ili trajanja svetlog perioda (Khattar i sar., 2010) se takođe može poboljšati proizvodnja ovih ekstracelularnih polimera. Optimalan intenzitet svetlosti za proizvodnju egzopolisaharida soja *Cyanothece* sp. 113 iznosi 43×10^2 lux-a, dok intenzitet svetlosti ispod ili iznad pomenute vrednosti negativno utiče na rast i proizvodnju egzopolisaharida (Su i sar., 2007). Faza rasta kulture takođe utiče na proizvodnju egzopolisaharida, ulaskom cijanobakterija u stacionarnu fazu rasta povećava se proizvodnja (Moreno i sar., 1998; Su i sar., 2007).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je proizvodnja egzopolisaharida specifična za svaki soj, kao i odgovor soja na promenu uslova kultivacije. Svaki soj je potrebno pažljivo testirati kako bi se pronašli uslovi kultivacije koji će omogućiti optimalnu proizvodnju egzopolisaharida datog soja (De philippis i Vincenzini, 1998). Imajući u vidu značaj cijanobakterijskih egzopolisaharida u biološkim pokoricama semi-aridnih uslova, inokulacija

cijanobakterijskih sojeva u takve ekosisteme zahteva detaljno ispitivanje efikasnosti svakog soja u produkciji egzopolisaharida.

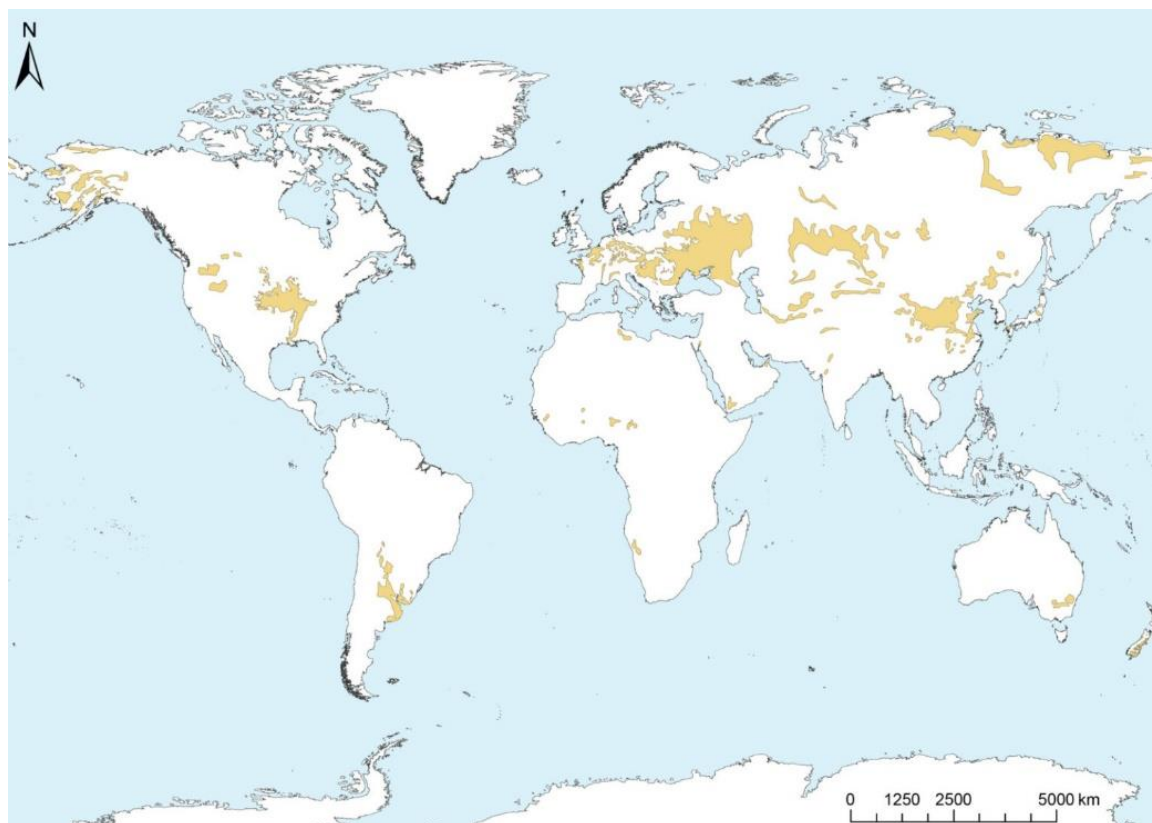
1.3. Biološke lesne pokorice

BLP predstavljaju poseban tip bioloških pokorica koje kolonizuju lesni sediment i mogu predstavljati značajnu biomasu na lesnim površinama (Smalley i sar., 2011; Svirčev i sar., 2013b) (Slika 4). Rezultati istraživanja BLP iz Srbije pokazuju da cijanobakterije čine čak 90% biomase (*Nostoc*, *Phormidium*, *Gloeocapsa*, *Stigonema*, *Oscillatoria*), dok preostalih 10% čine drugi organizmi, većinom bakterije (Svirčev i sar., 2013b). BLP su uobičajna pojava na lesnim površinama gde predstavljaju bitan element u genezi lesa, kao i početne stadijume u procesu sukcesije vegetacije. Imaju značajnu ulogu u sprečavanju erozije vetrom ili vodom na oštećenim i ogoljenim lesnim površinama (Svirčev i sar., 2013b).

1.3.1. Opšte karakteristike lesnog sedimenta

Les je nevezani, rastresit, bledo žuti, homogen, porozan sediment koji je podložan eroziji. Pojedinačni lesni horizonti su obično nestratifikovani, ali često sa umetnutim slojevima paleosola, ilovače ili peska. Lesni sediment se pretežno sastoji od čestica veličine 10-50 μ m (40-70%), sa nešto manjim udelom peska i gline (5-25%) (Pécsi, 1990; 1995; Smalley i sar., 2011). Prisustvo krupnijih čestica je takođe karakteristično za les kao posledica međusobnog lepljenja čestica i njihove cementacije (Pécsi, 1995). Sastav minerala lesnog sedimenta zavisi od samog horizonta, kao i od regiona gde se nalazi. Dominantan mineral u sastavu lesa jeste kvarc (40-80%, prosečno 60-70%), dok su ostali minerali zastupljeni sa manjim udelom, feldspati (5-20%), kalcit i dolomit (2-25%), liskun i hlorit (4-10%), kao i teški metali (1-6%) (Pécsi, 1990). Prisustvo karbonata se smatra jednim od najvažnijih svojstava lesa, čije se učešće u lesu kreće između 1% i 20% zavisno od sredine gde se lesni horizont nalazi (Pécsi, 1990; Smalley i sar., 2011). Les takođe sadrži organske materije (0.1-0.3%) (Pécsi, 1990). U lesnim nanosima se mogu pronaći ostaci kopnene, uglavnom kriofilne flore i faune (Pécsi, 1990).

Les predstavlja jedan od najrasprostranjenih kontinentalnih sedimentnih formacija kvartara (Pécsi, 1990). Lesni sediment prekriva 10% (Pécsi, 1990), odnosno 6% Zemljine kopnene površine (Li i sar., 2020) (Slika 6). Les je rasprostranjen u aridnim i semi-aridnim regionima srednjih geografskih širina severne i južne hemisfere (Li i sar., 2020). Moćni nanosi lesa se pored semi-aridnih regiona nalaze i u drugim zonama umerenog klimatskog pojasa, kao sto su stepe, šumo-stepe i šume (Pécsi, 1990). Najveći lesni nanosi se nalaze u ravninama, visoravnima i rečnim slivovima (Kineski Lesni Plato, Sibirski Lesni Plato, Ruska nizija, Srednji i Donji podunavski sliv, sliv Srednje Rajne, sliv Misisipija, Kolumbijski Plato u Severnoj Americi, sliv La Plate u Južnoj Americi) (Pécsi, 1990). Izolovana područja lesnog sedimenta su uobičajna u centralnom delu Evrope, duž srednjeg toga reke Vistula, Odre, Labe, Majne i njihovih pritoka. U Mediteranskom pojasu razvili su se netipični oblici lesa sa većim sadržajem gline ili peska i braonkasto-ružičaste boje (Pakistan, Iran, Izrael, Tunis, Novi Zeland) (Pécsi, 1990). Najveće područje prekriveno lesom se nalazi u Aziji, zatim u Evropi, Severnoj i Južnoj Americi (Li i sar., 2020). Približna pokrivenost lesa u Evropi iznosi 16,6%, u Aziji 10,6%, u Severnoj Americi 6% i 2,6% u Južnoj Americi (Li i sar., 2020) (Slika 6). Les i sediment nalik lesu pokrivaju više od 60% Vojvodine (Marković i sar., 2008). Uglavnom pokriva područja od nekoliko stotina do nekoliko desetina hiljada kvadratnih kilometara i dostiže visinu od nekoliko desetina do nekoliko stotina metara (Pécsi, 1990, Smalley i sar., 2011). Najmoćniji i najkontinuiraniji nanosi lesa se nalaze u Kini gde im se debljina obično kreće od nekoliko desetina do 300 m, ali na nekim mestima dostižu i debljinu od maksimum 505 m. Debljine lesnih nanosa u Sibiru i Centralnoj Aziji su od desetina metara do <200 m. Les u Evropi i Severnoj Americi obično ne prelazi debljinu od 20 m, dok na nekim mestima može biti visine blizu 100 m. Debljine lesnih nanosa u Južnoj Americi su manje od 50 m, na Novom Zelandu i u Africi su manje od 20 m, dok su u Australiji manje od 3 m (Li i sar., 2020).



Slika 6. Rasprostranjenost lesa na Zemlji

(<https://blogs.egu.eu>)

Pored rasprostranjenosti lesa i sedimenta nalik lesu na Zemlji, les može biti prisutan i na nebeskim telima Sunčevog Sistema (Mars, Titan, a možda i Venera i Io) (Svirčev i sar., 2016b). Les na Zemlji predstavlja značajan izvor informacija o paleoklimatskim i paleoekološkim promenama (Marković i sar., 2009; 2011; 2016; Hao i sar., 2012; Obreht i sar., 2016; 2017).

1.3.2. Formiranje lesnog sedimenta

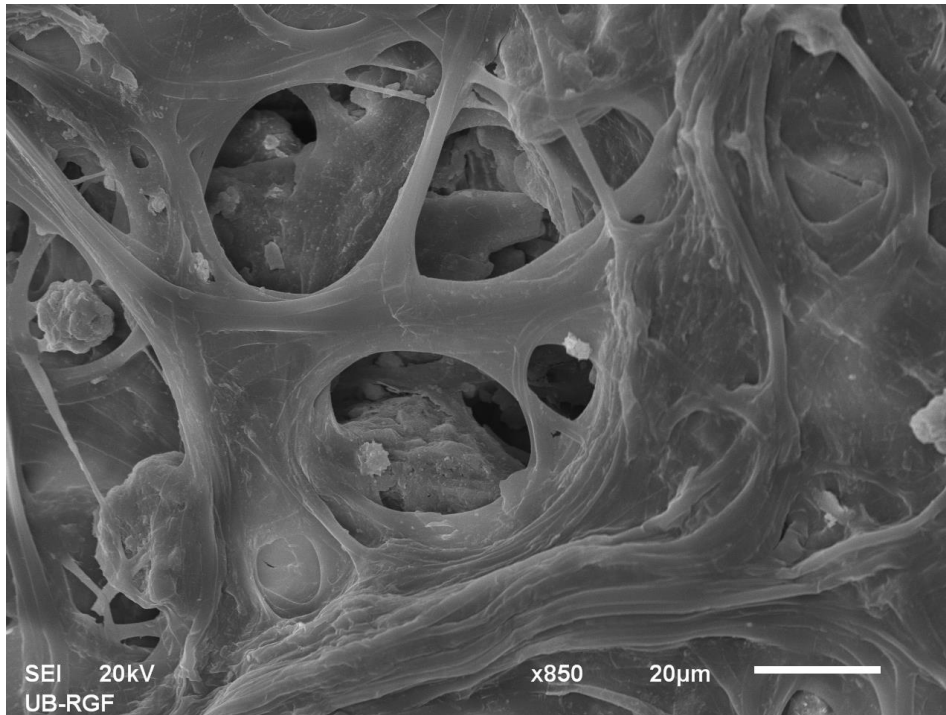
Uprkos širokoj rasprostranjenosti i značaju lesnog sedimenta, proces formiranja lesa još uvek nije u potpunosti razjašnjen (Smalley i Marković, 2014; Sprafke i Obreht, 2016). Proces formiranja lesa danas predstavlja jedan od najistraživanijih problema geografije, geologije i pedologije (Smalley i Obreht, 2018). Kroz istoriju su date različite definicije lesa i njihov pregled se nalazi u studiji Sprafke i Obreht (2016). Početak 19. veka se smatra početkom izučavanja lesa kada je les posmatran čisto kao geološki objekat od strane Leonhard (1824) i Lyell (1834), koji su ukazivali na aluvijalno poreklo čestica koje čine lesni

sediment. Razvoj definicije lesa je tekao u pravcu ukazivanja na eolsko poreklo lesa (Richthofen, 1882). Međutim, definicija eolskog porekla lesnog sedimenta zanemaruje procese koji učestvuju u transformaciji čestica prašine u formu stabilnog lesnog sedimenta (Sprafke i Obreht, 2016). Sa početkom interesovanja pedologa za lesni sediment postavljena je *'in situ'* teorija formiranja lesa (Berg, 1916). Prema ovoj definiciji les se smatra proizvodom eluvijalnih i pedogenetskih procesa. Ložek (1965) i Kukla (1987) su dali jednak značaj eolskim procesima i pedogenetskim procesima u formiranju lesa. Iako se kasnije još uvek spekulisalo o isključivo eolskom poreklu lesa, *'les je samo akumulacija prašine'* (Pye, 1987; 1995), do značajnog preokreta u definiciji lesa dovelo je objavljivanje naučne publikacije *'Les nije samo nakupljanje prašine'* (Pécsi, 1990). U pomenutoj publikaciji ukazalo se na složenost procesa formiranja lesa, te da les ne može biti samo akumulacija vetrom nanete prašine. Pécsi (1990) je istakao da se eolsko poreklo lesa odnosi samo na prašinu od koje je les formiran, a da se nataložena eolska prašina dalje pretvara u les u samo određenim uslovima sredine tipičnim za semi-aridne pašnjake ili stepe, ili čak šumske stepe. Akumulirane čestice prašine se u određenom geografskom okruženju procesima umerene karbonatno-silikatne dijageneze pretvaraju u lesni sediment (Pécsi, 1995). Takođe, samo deo akumulirane eolske prašine ostaje u sredini koja je pogodna za formiranje lesa i podlože različitim procesima transformacije, dok se deo prašine dalje transportuje u novu sredinu gde podlože procesima transformacije eolske prašine u les (Pécsi, 1990).

Iako se danas prihvata primarno eolsko poreklo lesnog sedimenta (Muhs i sar., 2014), sve se veći značaj pridaje *'in situ'* procesima kojima se izlaže akumulirana prašina (Sprafke i Obreht, 2016). Prema Smalley i Marković (2014), primarni proces u formiranju lesa jeste eolsko taloženje čestica prašine. Međutim, oni ističu da posle deponovanja čestica prašine one postaju deo različitih procesa prilikom kojih se svojstva lesa razvijaju (Smalley i Marković, 2014). Lesifikacija se smatra ključnim procesom u formiranju lesa (Berg, 1916; Pécsi, 1990; 1995; Smalley i sar., 2011; Svirčev i sar., 2013b; Smalley i Marković, 2014; Sprafke i Obreht, 2016). Ona uključuje procese posle deponovanja vetrom nanete prašine koji su odgovorni za transformaciju čestica prašine u les (Smalley i Marković, 2014). Prema tome, definicija lesa bi trebala da obuhvati i eolske procese akumulacije prašine i procese lesifikacije (Smalley i Marković, 2014; Sprafke i Obreht, 2016). Les je eolski akumulirana prašina koja se izlaže procesima lesifikacije (Sprafke i Obreht, 2016; Smalley i Obreht, 2018). Pregled dostupne literature ukazuje da su neophodna dalja istraživanja još uvek nedovoljno poznatih procesa i faktora koji učestvuju u formiranju lesnog sedimenta.

Uloga cijanobakterija u formiranju lesnog sedimenta - BLOCDUST hipoteza

Svirčev i sar. (2013b) su ukazali na problematiku opšte prihvaćene definicije da je samo vetar neophodan za taloženje čestica prašine u procesu formiranja lesa. Imajući u vidu da vetar, u slučaju slabog vegetacijskog pokrivača, može predstavljati glavnu erozivnu silu u određenom predelu (Stevens i sar., 2006; 2008), Svirčev i sar. (2013b) su istakli značaj specifičnih uslova sredine na površini sedimenta koji sprečavaju eroziju nataloženih čestica prašine i omogućavanju njihovu sedimentaciju. Međutim, ova grupa naučnika ne zanemaruje ulogu eolskih procesa u formiranju lesa. Kao neophodne uslove za formiranje lesa izdvojili su: 1) izvor čestica prašine; 2) atmosferski transportni mehanizam (vetar); 3) odgovarajući granični sloj na površini sedimenta koji ima ulogu u hvatanju čestica prašine i pretvaranju tog eolskog materijala u deponovani lesni sediment (Svirčev i sar., 2013b). Hvatanje, zarobljavanje i cementiranje čestica prašine predstavlja deo životne strategije bioloških pokorica (Williams i sar., 2012; Zaady i Offer 2010; Svirčev i sar., 2013b). Čestice suspendovane u atmosferskoj prašini mogu biti zarobljene pomoću lepljivih cijanobakterijskih omotača, stabljika mahovina ili talusa lišajeva (Belnap i Lange, 2001). Uloga cijanobakterijskih bioloških pokorica u akumulaciji, stabilizaciji i čuvanju sedimenta kopnenih površina je odavno poznata (Belnap i Gardner, 1993). Stoga, BLOCDUST hipoteza (Svirčev i sar., 2013b; 2019) opisuje ulogu lepljivih cijanobakterijskih egzopolisaharida (Slika 5) u formiranju lesa kroz hvatanje i akumulaciju čestica prašine. Prema ovom modelu, BLP i biološki lesni biofilmovi cijanobakterija imaju ulogu u inicijalnim procesima formiranja i stabilizacije lesa u aridnim i semi-aridnim sredinama (Svirčev i sar., 2013b; 2019). Proces taloženja i čuvanja čestica prilikom formiranja lesa je pod uticajem metaboličkih aktivnosti organizama BLP, a naročito egzopolisaharida (Svirčev i sar., 2013b; 2019) (Slika 7). Cijanobakterije, i jednoćelijske i filamentozne, stvaraju egzopolisaharidni zaštitni omotač. Egzopolisaharidi u biološkim pokoricama su većinom sintetisani od strane cijanobakterija (Rossi i De Philippis, 2015).

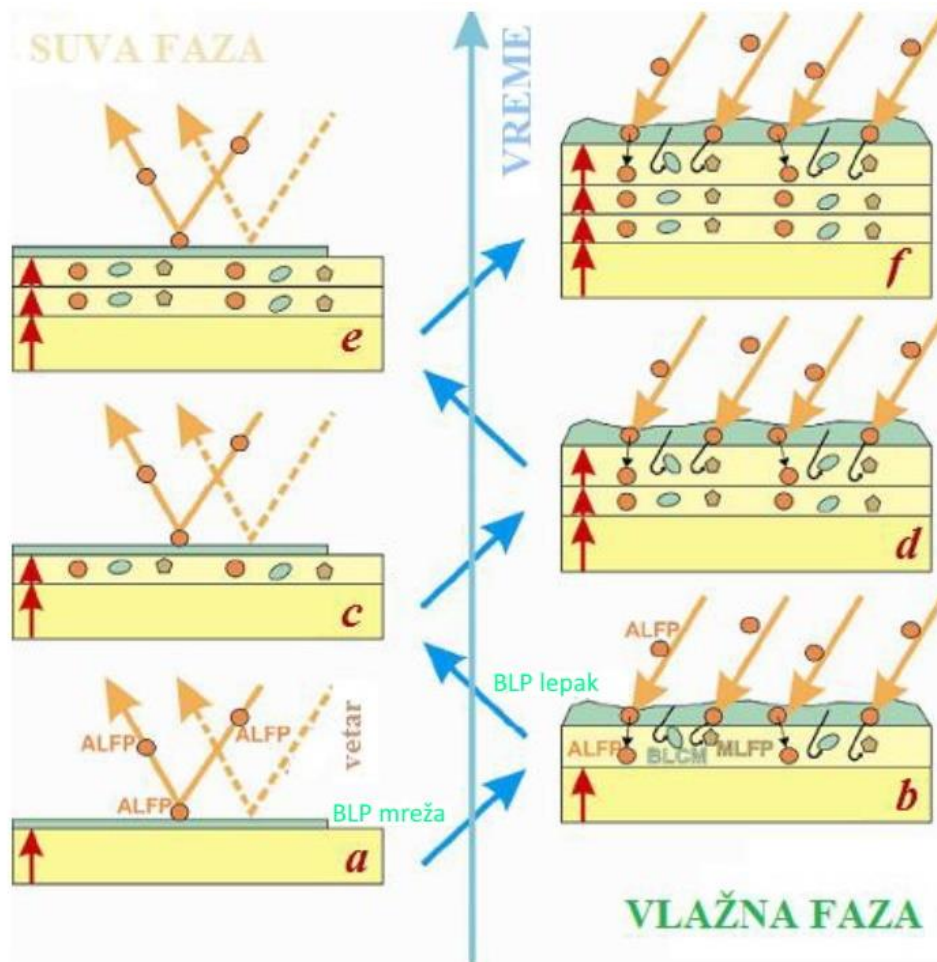


Slika 7. Egzopolisaharidni zaštitni materijal cijanobakterijskih BLP

Prema BLOCDUST modelu o formiranju lesnog sedimenta, lepljivi polisaharidni materijal na površini sedimenta izlučen od strane cijanobakterija može da zarobi čestice prašine suspendovane u vazduhu (Slika 8b, 8d, 8f-BLP lepak). Hvatanje ovih čestica prašine, koje učestvuju u formiranju lesa, je deo životne strategije organizama BLP čime se obezbeđuju neophodni minerali ovim organizmima za dalji razvoj BLP. Vezivanjem čestica prašine povećava se kapacitet zadržavanja vode i obezbeđuju se mineralne materije neophodne za rast i razvoj BLP. Čestice gline zbog svog negativnog naelektrisanja vezuju pozitivno naelektrisane nutrijente (K, Ca₂) i sprečavaju njihovo ispiranje u dublje slojeve tla. Egzopolisaharidi vezuju čestice unutar zajednice BLP i na taj način formiraju kohezivnu koru koja je otporna na erozivne sile vode ili vetra tokom sušnih perioda (Slika 8a, 8c, 8e-BLP mreža). Zarobljene čestice zatim bivaju metabolisane od strane cijanobakterija i potisnute u dublje slojeve kao posledica kretanja cijanobakterija ka izvoru svetlosti. Metabolisanje čestica podrazumeva izmenu početne strukture zarobljenih čestica rastvaranjem i taloženjem čestica kao posledica različitih metaboličkih procesa cijanobakterija (Svirčev i sar., 2013b; 2019). Metabolički procesi, aerobna respiracija i fotosinteza, dovode do promena u mikroklimatskim uslovima unutar BLP kroz regulaciju odnosa O₂/CO₂ i uspostavljanje alkalne (fotosinteza) i kisele sredine (aerobno disanje) koje promovišu rastvaranje minerala u kontaktnoj zoni sa egzopolisaharidima. Tokom aerobne respiracije cijanobakterija stvara se

kisela sredina koja dovodi do rastvaranja minerala u kontaktnoj zoni sa egzopolisaharidima. Ovim rastvaranjem minerala cijanobakterije obezbeđuju esencijalne nutrijente za potrebe fotosinteze. Fotosinteza dovodi do promene mikroklimatskih uslova u alkalno stanje i omogućava vezivanje katjona (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) za egzopolisaharide. U momentu zasićenja, preostali katjoni u alkalnoj sredini reaguju sa karbonatima, dovode do njihove precipitacije i stvaranja mineralnog cementa između čestica i egzopolisaharida. Na taj način se obezbeđuje imobilizacija i čuvanje čestica (Svirčev i sar., 2019).

Metabolisane čestice prašine (Slika 8: MLFP) zajedno sa izlučenim metabolitima (Slika 8: BLCM) i neiskorišćenim česticama prašine (Slika 8: ALFP) postaju gornji soj lesnog sedimenta prekrivenog BLP (Slika 8c, 8e). Tokom vlažnih sezona veoma je aktivna akumulacija prašine i ostalih čestica koje formiraju les (Slika 8b, 8d, 8f), dok tokom sušnih perioda BLP stvaraju stabilnu čvrstu strukturu-pokoricu koja sprečava eroziju čestica vetrom ili vodom (Slika 8a, 8c, 8e). Isušivanje inicira sintezu egzopolisaharida koji tokom sušnih perioda imaju ulogu zaštitnog materijala (Svirčev i sar., 2013b; 2019). Egzopolisaharidni zaštitni omotač reguliše postepeno usvajanje vode nakon vlaženja sprečavajući na taj način da dodje do naglog povećanja turgora i pucanja ćelijskih zidova (Rossi i De Phillipis, 2015). Cijanobakterijska komponenta bioloških pokorica može da poveća svoju zapreminu i do 13 puta nakon vlaženja (Shields i Durrell, 1964; Campbell, 1977). Nastupanjem vlažnih perioda, egzopolisaharidi postaju lepljivi praveći od BLP novi lepljivi sloj za vezivanje i akumulaciju prašine i na taj način se pokreće novi ciklus lesifikacije (Slika 8b, 8d, 8f). Smena suvih i vlažnih uslova sredine i opisani procesi tokom pomenutih sezona predstavljaju jedan ciklus akumulacije čestica. Ponavljanje ovih ciklusa rezultira početnim rastom lesnog sedimenta (Svirčev i sar., 2013b; 2019).



Slika 8. BLOCDUST model (**B**iological **L**Oess **C**rusts **D**USt **T**rapping model)-model uticaja BLP na proces formiranja lesa. Tokom početne sušne sezone mreža BLP sprečava akumulaciju (puna linija) i deflekciju (isprekidana linija) čestica (a); tokom početnog vlažnog perioda polisaharidni lepak hvata čestice prašine (b); nagomilane čestice prethodnih vlažnih perioda su tokom sušnih sezona očuvane pomoću BLP (c, e); svake sledeće vlažne sezone formira se novi polisaharidni lepljivi sloj koji vezuje čestice iz vazduha i dolazi do transformacije starijih slojeva akumulirane prašine u protolesne naslage (d, f). BLP mreža-biolška lesna pokorica; BLP lepak-lepljivi polisaharidni sloj; ALFP-čestice iz vazduha koje formiraju les; MLFP-metabolisane čestice koje formiraju les; BLCM-metaboliti, biomarkeri

(Svirčev i sar., 2013b)

Prethodno opisanu zajednicu organizama BLP i lesnih čestica su Svirčev i sar. (2019) nazvali sinergoza (*synergosis*). Sinergoza je zajednica žive i nežive komponente prirode koje se nalaze u direktnom kontaktu. Kao rezultat ove fizičke i održive zajednice organizama BLP i čestica stvara se stabilizovani lesni sediment. Snaga i jačina sinergoze lesnog sedimenta se

ogleda u stabilizaciji, održivosti i širenju stabilizovanog lesnog sedimenta i lesnih područja (Svirčev i sar., 2019). Organizmi BLP predstavljaju živu (biotičku) komponentu koja je tokom procesa formiranja lesa uključena u akumulaciju i stabilizaciju čestica iz vazduha. Les i njegove gradivne čestice istovremeno predstavljaju podlogu i izvor hranljivih materija za rast BLP (Svirčev i sar., 2019). Na taj način sinergoza predstavlja produktivnu, održivu zajednicu u kojoj postoji obostrana korist žive i nežive komponente (Svirčev i sar., 2019). Termin sinergoza je nastao kao paralela već odavno poznatom terminu simbioza (Svirčev i sar., 2019).

1.4. Problemi izazvani dezertifikacijom i degradacijom površina pokrivenih biološkim pokoricama

Prema Konvenciji Ujedinjenih nacija o borbi protiv dezertifikacije (United Nations Convention to Combat Desertification, UNCCD) dezertifikacija predstavlja “degradaciju zemljišta u sušnim područjima kao rezultat različitih faktora, uključujući klimatske promene i ljudske aktivnosti” (UNCCD, 1994). Sušna područja prema definiciji obuhvataju regione kod kojih je odnos godišnje količine padavina u odnosu na potencijalnu evapotranspiraciju između 0,05 i 0,65 (UNCCD, 2000). Prema ovoj definiciji, sušna područja obuhvataju aridne, semi-aridne i suve sub-humidne regione. Sušna područja imaju globalni značaj jer čine 41% Zemljine površine (Reynolds i sar., 2007). Većina ovih područja pripada semi-aridnim regionima (44,3%), od kojih se 34,4% nalazi u Aziji (Sivakumar, 2007). Stoga, najveći deo područja zahvaćenih dezertifikacijom su područja lesnih naslaga. Pregled problema dezertifikacije i degradacije lesnih područja opisan je u studiji Palanački Malešević i sar. (2021).

Područja pogođena dezertifikacijom čine 29% Zemljine površine sa tendencijom povećanja u budućnosti (Huang i sar., 2020). Studija iz 2006. godine pokazuje da se dezertifikacija u Kini tada širila brzinom od 3100 km² godišnje (Chen i sar., 2006). Između 1982. i 2015. godine od 44,5 miliona km² sušnih područja, 6% područja je pogođeno dezertifikacijom usled neodrživog korišćenja zemljišta i antropogenih klimatskih promena, dok su antropogene klimatske promene doprinele dezertifikaciji kod 12,6% sušnih područja (Burrell i sar., 2020). Dezertifikacija dovodi do smanjenja vegetacijskog pokrivača (Maestre i sar., 2012), što rezultira smanjenjem plodnosti tla, biodiverziteta, količine vlage, useva itd.

Svake godine se izgubi 24 milijarde tona plodnog tla zbog degradacije zemljišta usled dezertifikacije (UNCCD, 2015). Nedostatak vegetacijskog pokrivača (Slika 9) dovodi do povećanja koncentracije prašine u vazduhu. Mineralne i organske materije koje se prenose prašinom utiču i na akvatične ekosisteme (Rashki i sar., 2013). Procene iz 2007. godine pokazuju da regioni pogođeni dezertifikacijom trpe ekonomske gubitke od oko 42 milijarde američkih dolara godišnje (Sivakumar, 2007), dok samo Kina gubi milijarde dolara godišnje zbog pogođenosti dezertifikacijom (Al-Quraishi i sar., 2004).

Čestice prašine utiču na zdravlje ljudi direktno ili indirektno izazivajući određene probleme u ekosistemima. Neki od indirektnih problema su: oštećenje vegetacije (Slika 10), izazivanje saobraćajnih nezgoda usled slabe vidljivosti zbog visoke koncentracije prašine u vazduhu i ubrzavanje eutrofizacije vodenih ekosistema stimulišući toksično cvetanje algi (Goudie, 2014). Prašina je čest direktni uzročnik različitih srčanih, oftamoloških i kožnih oboljenja (Goudie, 2014). Čestice prašine u vazduhu se povezuju sa povećanom stopom oštećenja DNK (Shahsavani i sar., 2011). One mogu biti transportovane na velike udaljenosti od izvora, a zatim uticati na zdravlje ljudi i stanje ekosistema udaljenih predela (Goudie, 2014). Prisustvo cijanotoksina u biološkim pokoricama je slabije istraženo, kao i njihov uticaj na zdravlje ljudi i životinja. Međutim, preliminarna istraživanja ukazuju da postoji rizik od izlaganja mikrocistinima udisanjem. Koncentracija mikrocistina u prašini u vazduhu koja sadrži delove bioloških pokorica može premašiti izračunat tolerantni dnevni unos (TDI) od 1-2 ng/kg/dan za prosečnu odraslu osobu i na taj način predstavljati pretnju po zdravlje (Metcalf i sar., 2012). Niske, ali toksikološki relevantne količine mikrocistina (od 3 do 56 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) su pronađene u pustinjskim pokoricama u Kataru (Metcalf i sar., 2012).

Pored dezertifikacije, veliki problem predstavlja oštećenje sedimentnog pokrivača lesnih područja (Palanački Malešević i sar., 2021). Na primer, kao posledica neodgovornog odnosa prema površinskom sloju lesnih sedimenata i ratnih sukoba, koji su doveli do oštećenja i uklanjanja lesnih pokorica na Velikom Lesnom Platou u Kini, došlo je do erozije velike količine sedimenta u Žutu reku i izazivanja čestih poplava (Mostern, 2019). Degradirani lesni predeli, bez vegetacijskog pokrivača, mogu predstavljati glavni izvor prašine (Sweeney i Mason, 2013) (Slika 9). Velike brzine vetra u ovim degradiranim područjima dovode do povećanja erozije (Munson i sar., 2011), veće koncentracije prašine u vazduhu i oštećenja okolnog vegetacijskog pokrivača (Slika 10). Veliki Lesni Plato u Kini predstavlja jedan od najerozivnijih regiona na Zemlji. Od oko 650000 km^2 lesnog pokrivača u Centralnoj Kini, oko 470000 km^2 je erodirano (NDRC i sar., 2010). Ovaj lesni plato karakteriše veoma slab vegetacijski pokrivač (Shi i Shao, 2000). Postojanje veće biomase i

vegetacije bi moglo da kontroliše gubitak vode i eroziju. Međutim, zbog trenutnog stanja životne sredine oko 12,8% ovog područja je imalo eroziju veću od 10000 t/km²/a (Cai, 2002). Velika koncentracija sedimenta u Žutoj Reci (oko 16,4 milijarde tona godišnje) je rezultat erozije sedimenta sa Velikog Lesnog Platoa (Shi i Shao, 2000).



Slika 9. Les kao izvor prašine. Degradiran vegetacijski pokrivač ostavlja nezaštićenu površinu lesnog sedimenta koja tada predstavlja izvor prašine

(Lokalitet: Luochuan Xiefeng, Kina)

(Foto: Prof. Zorica Svirčev)

Zdravstvene posledice oštećenja površinskog pokrivača u lesnim predelima su već zabeležene. Pre više od decenije uočena je veza između lesa i sedimenta nalik lesu sa karcinomom jednjaka (Derbyshire, 2001; Raghimi i Ramezani Mojaveri, 2006; Wang i sar., 2012; Keshavarzi, 2014). U Iranskoj provinciji Golestan kao faktor rizika za razvoj kancera jednjaka smatraju se čestice lesnog sedimenta (Keshavarzi, 2014). Dugotrajno unošenje čestica silicijum dioksida iz vazduha dovodi po povećanog rizika od razvoja kancera jednjaka (Jabbari i sar., 2008). Takođe, kvarc koji je dominantan mineral u lesu (Pesci, 1990) se smatra uzročnikom bolesti pluća-silikoze (Norboo i sar., 1991; Saiyed i sar., 1991; Derbyshire, 2007). Kada je u pitanju prisustvo cijanotoksina u BLP u semi-aridnim sredinama postoje dve studije (Tokodi, 2016; Dulić i sar., 2017) koje nisu ukazale na prisustvo cijanotoksina u BLP.



Slika 10. Vegetacija oštećena lesom. Prašina poreklom sa degradiranih lesnih površina nanosi štetu vegetacijskom pokrivaču

(Lokalitet: Luochuan Xiefeng, Kina)

(Foto: Prof. Zorica Svirčev)

Imajući u vidu probleme izazvane procesom dezertifikacije i degradacije lesnog pokrivača, neophodno je pronaći odgovarajuće rešenje za suzbijanje dezertifikacije i ublažavanje već nastalih negativnih posledica. Najčešće korišćena metoda za obnovu degradiranih površina, sprečavanje oluja prašine i dezertifikacije je sadnja biljaka (Cao i sar., 2011). Takav jedan projekat primenjen je na Kineskom Lesnom Platou u cilju sprečavanja i suzbijanja erozije. Projekat pod nazivom „Grain for Green“ sa budžetom od 40 milijardi dolara se smatra najvećom ekonomskom investicijom u oporavak ekosistema (Ostwald i sar., 2011; Gao i sar., 2017). Iako je Kina uložila mnogo truda i novca u ovaj projekat, kao rezultat projekta došlo je do negativnih posledica po životnu sredinu. Uočeno je smanjenje vegetacijskog pokrivača i gubitak vlažnosti tla (Cao i sar., 2009), došlo je do povećanja erozije tla i širenja dezertifikacije (Wang i sar., 2010), dok su se oluje prašine nastavile

dešavati (Cao i sar., 2011). Pored toga što je Kina za samo jednu deceniju uložila više od 100 milijardi američkih dolara u pošumljavanje, dugotrajni pozitivni efekti nisu uočeni (Ahrends i sar., 2017).

Ekološki, zdravstveni, ekonomski i socijalni problemi uzrokovani dezertifikacijom i degradacijom stabilizovanog površinskog sloja u semi-aridnim sredinama pokazuju da je pronalazak prirodnog i ekološki prihvatljivog rešenja za obnovu lesnih, ali i pustinjaških i drugih degradiranih regiona, od suštinskog značaja. Implementacija funkcionalnog rešenja za obnovu degradiranih lesnih površina bi poboljšala stanje životne sredine, zdravlje ljudi i životinja, a samim tim i socio-ekonomsko stanje država zahvaćenih ovim problemom, kao i inicijalnom dezertifikacijom. Sprovođenje aktivnosti obnove i stabilizacije površinskog dela sedimenta bi imalo pozitivan uticaj i na udaljene države jer bi sprečilo eroziju tla, emisiju čestica i njihovo prenošenje vetrom. Nepovoljni uslovi sredine u semi-aridnim sredinama za rast i razvoj viših biljaka i neuspeli pokušaji stabilizacije lesnog sedimenta njegovim pošumljavanjem ukazuju na potrebu da se pronađe rešenje koje je prilagođeno uslovima sredine gde je potrebno izvršiti obnovu i stabilizaciju tla.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje fundamentalnog i praktičnog značaja terestričnih cijanobakterijskih sojeva u semi-aridnim sredinama kroz analizu ekofizioloških svojstava ovih sojeva i njihovog potencijala da u interakciji sa česticama prašine formiraju biološke lesne pokorice. Glavni cilj će biti ostvaren kroz sledeće specifične ciljeve:

1. Formiranje kolekcije kultura lesnih cijanobakterijskih sojeva

Izolacija cijanobakterijskih sojeva iz BLP sakupljenih sa lesnih profila Srbije, Kine i Irana i formiranje kolekcija kultura lesnih cijanobakterijskih sojeva u okviru već postojeće Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija (NSCCC).

2. Procena sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da interreaguju sa česticama prašine u eksperimentalnim uslovima

Procena sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da ostvare interakciju sa česticama, formiraju BLP, vežu, metabolišu, istalože i stabilizuju čestice sprovođenjem *ex-situ* eksperimenta u specijalno dizajniranim komorama. Procena uloge cijanobakterijskih BLP u BLOCDUST modelu i predlog naučno zasnovanog i ekološki prihvatljivog plana za obnovu degradiranih lesnih površina.

3. Skrining ekofizioloških svojstava izolovanih cijanobakterijskih sojeva

Analiza efikasnosti izolovanih cijanobakterijskih sojeva u produkciji biomase, ukupnih polisaharida, egzopolisaharida, UV zaštitnih pigmenata i cijanotoksina. Odabir cijanobakterijskih sojeva sa potencijalom da se koriste za obnovu degradiranih lesnih površina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje bioloških lesnih pokorica i lesnog sedimenta sa opisom lokaliteta

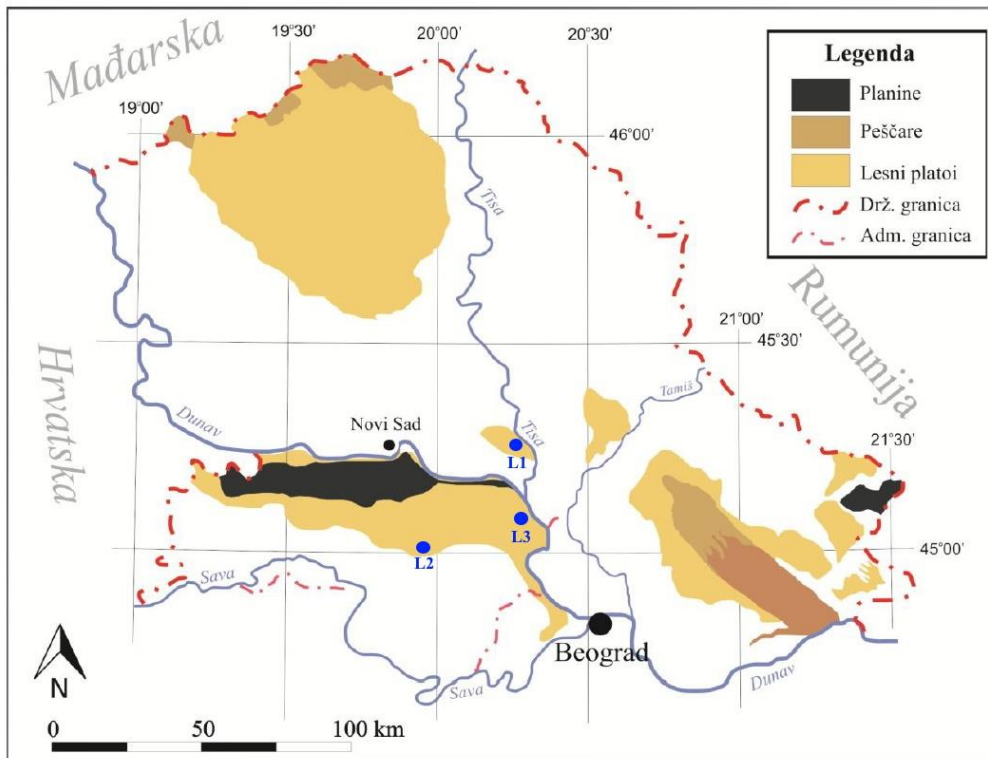
U okviru ove studije rađena je izolacija cijanobakterijskih sojeva iz BLP sakupljenih sa lesnih profila Srbije, Kine i Irana. BLP su sakupljane zajedno sa oko 10 cm sedimenta ispod njih, koji je pružao potporu i sprečavao pucanje BLP prilikom njihovog transporta i čuvanja. Uzorkovanje je vršeno upotrebom špatule, nakon čega su BLP spakovane u zip kese u kojima su transportovane do laboratorije. Broj sakupljenih uzoraka na svakom lokalitetu određen je u zavisnosti od prisustva različitih tipova BLP, što je procenjeno vizuelnim posmatranjem (Tabela 1).

Tabela 1. Lokalizeti BLP korišćenih za izolaciju lesnih cijanobakterijskih sojeva

Lokalizeti	Broj uzoraka
Srbija	
Napuštena ciglana Ruma, Veliki Surduk Mošorin, Mali	12
Surduk Slankamen	
Kina	
Luochuan geološki park, Zhaojiachuan lesni profil	5
Iran	
lesni profili Kaspijske nizije	5

Sakupljanje lesnog sedimenta za potrebe *ex-situ* eksperimenata vezivanja i stabilizacije čestica vršeno je na lesnom profilu napuštene ciglane u Rumi. Sediment je spakovan je u plastične neprovidne džakove u kojima je transportovan u laboratoriju. BLP i lesni sediment su do upotrebe čuvani na tamnom i suvom mestu.

BLP su u Srbiji uzorkovane na Titelskom i Sremskom lesnom platou, na sledećim profilima: Veliki Surduk kod Mošorina (Slika 11, oznaka L1), napuštena ciglana u Rumi (Slika 11, oznaka L2) i Mali Surduk kod Starog Slankamena (Slika 11, oznaka L3). Pored navedenih lokaliteta uzorkovanja BLP u Srbiji, u okviru ove disertacije izolovani su i cijanobakterijski sojevi iz BLP sa Velikog Kineskog Lesnog Platoua i lesnih profila Kaspijske nizije na severu Irana.



Slika 11. Geomorfološka karta Vojvodine sa označenim lokalitetima uzorkovanja BLP: Veliki Surduk Mošorin (L1), napuštena ciglana Ruma (L2), Mali Surduk-Slankamen (L3) (Marković i sar., 2005, modifikovano; Vasiljević, 2015; Tokodi, 2016)

Titelski lesni plato

Titelski lesni plato (Titelski breg) je jedinstveni geomorfološki fenomen koji se nalazi u međurečju Dunava i Tise na krajnjem jugoistoku Bačke. Titelski breg predstavlja lesno ostrvo čija maksimalna dužina iznosi 16 km i maksimalna širina 7,2 km (Vasiljević, 2015). Visine lesnih profila Titelskog lesnog platoa se kreću između 35 i 55 m. Ovaj plato predstavlja značajnu arhivu informacija za razumevanje klimatskih i ekoloških promena ovog regiona tokom srednjeg i donjeg Pleistocena (Marković i sar., 2008). Titelski lesni plato je od 2012. godine zaštićen kao Specijalni rezervat prirode (Vasiljević, 2015).

Lesni plato Veliki Surduk Mošorin nalazi se na periferiji sela Mošorin i predstavlja sastavni deo Titelskog lesnog platoa. Ovaj lesni profil odlikuje se vrlo moćnim lesnim horizontima navejanim tokom poslednja dva glacijalna perioda (Vasiljević, 2015).

Sremski lesni plato

Sremski lesni plato (Sremska lesna zaravan ili Frušogorska lesna zaravan) predstavlja lesni pojas oko Fruške Gore (Bukurov, 1953). Prosečna visina se kreće od 120 m do 140 m (Višnić i sar., 2016). Ova lesna zaravan je na severnim padinama Fruške Gore veoma distancirana, te ima izgled brojnih izolovanih ostrva. Dejstvom severnog, severozapadnog i jugoistočnog vetra izduvan je materijal iz aluvijalne ravni Dunava od čega su se akumulirali lesno-paleozemljišni horizonti. Geohemijska istraživanja su pokazala da sastav akumuliranog materijala odgovara prosečnom sastavu gornjeg dela Zemljine kore. Ovi nalazi ukazuju na značaj ovog lesnog platoa u paleoklimatskoj i paleoekološkoj rekonstrukciji Pleistocena, ali i u analizi globalnih geomorfoloških procesa tokom Zemljine istorije (Jovanović i Zvizdić, 2009).

Lesni profil ciglana u Rumi (Slika 12) (N 45° 00' 43,8''; E 19° 51' 28,8'') nalazi se u okviru površinskog kopa "IGM" Ruma, udaljen oko jedan kilometar od periferije naselja. Kao posledica tridesetogodišnje intenzivne eksploatacije kop je od ivice puta pomeren ka severu za preko 500 m. Kop zauzima 35 ha, obezbeđujući oko 1,5 km otvorenih profila čija visina dostiže i 20 m (Jovanović i Zvizdić, 2009). Značaj ovo lokaliteta ogleda se u sadržaju informacija bitnih za paleoklimatsku i paleoekološku rekonstrukciju mlađeg dela srednjeg i gornjeg Pleistocena, odnosno poslednjih 350000 godina (Vasiljević, 2015).



Slika 12. Lesni profil napuštene ciglanae u Rumi

(Foto: autor)

Lesni profil Surduk (Slika 13) (N 45° 07' 56,0''; 20° 15' 48,7'') nalazi se u selu Surduk koje je udaljeno 10 km od Novog Slankamena prema Belegišu. Visina lesnih odseka doseže i do 40 m. Ovaj profil odlikuje moćni lesni horizont poslednjeg glacijala (Jovanović i Zvizdić, 2009).



Slika 13. Lesni profil Surduk
(Foto: autor)

Kineski Lesni Plato

Kineski Lesni Plato predstavlja najveću površinu lesnih naslaga na svetu i zauzima površinu od 624000 km². Nalazi se u gornjem i srednjem toku Žute reke. Prosečna godišnja količina padavina na ovom području se kreće između 200 i 600 mm. Najveći deo ovih padavina (60-70%) padne tokom jula, avgusta i septembra (Shi i Shao, 2000). Ovaj lesni plato karakteriše složena topografija, sa nadmorskom visinom između 60 i 5200 m (Wu i sar., 2019).

Louchuan geološki park (N 35° 42.561', E 109° 23.952') je prvi lesni geološki park u Kini (Slika 14). Poznat je po svojim geološko-paleološkim sekvencama, naučno-istraživačkim vrednostima, ali i jedinstvenim lesnim pejzažima. Ovaj geološki park se nalazi južno od grada Yan'an, na severu Kineske provincije Shaanxi (Wang i sar., 2019). Usled opasnosti od obrušavanja, ovaj geopark predstavlja opasnot za turiste.

Lesni profil Zhangjiachuan (N 34°-41°, E 100°-114°) nalazi se u najvećem ravničarskom delu centralnog Kineskog Lesnog platoa (Sun i sar., 2006).



Slika 14. Lesni geološki park Luochuan u Kini
(Foto: Prof. Zorica Svirčev)

Lesne naslage Kaspijske nizije

Lesne naslage Kaspijske nizije nalaze se na severnom delu Irana i prekrivaju severne padine planinskog venca Alborz. Visine lesnih naslaga u ovom predelu dosežu i preko 70 m (Kehl i sar., 2005). Srednja godišnja temperatura u Kaspijskoj niziji je 17°C. Srednje godišnje padavine u pokrajini Gorgan iznose 600 mm, dok su u blizini Neke 750 mm. Usled različitih uslova životne sredine, ovi lesni profili svojom morfologijom, minerologijom i fizičko-hemijskim karakteristikama ukazuju na različit stepen formiranja tla (Khormali i Kehl, 2011).

3.2. Izolacija i kultivacija lesnih cijanobakterijskih sojeva

Izolacija i kultivacija lesnih cijanobakterijskih sojeva rađena je u sterilnoj, sintetičkoj, mineralnoj hranljivoj podlozi BG11 (Tabela 2). Pre upotrebe za izolaciju i kultivaciju sojeva podešena je pH vrednost podloge na optimalnih 7,5, zatim je sterilisana i ohlađena.

Tabela 2. Sastav mineralne hranjive podloge BG11 (Rippka i sar., 1979)

Sastojci podloge	Količina u medijumu (g/L)
NaNO ₃ **	1,500
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O	0,040
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,036
Na ₂ CO ₃	0,020
Limunska kiselina	0,006
Fe amonijum citrat	0,006
EDTA (magnezijum-	0,001
A ₅ (rastvor oligoelemenata) *	1ml/L

**Podloga BG11 N- je bez dodatka NaNO₃

*A₅ –rastvor oligoelemenata sadrži (g/L): H₃BO₃(2,86); MnCl₂ × 4H₂O (1,81); ZnSO₄ × 7H₂O (0,222); MoO₃ × 2H₂O (0,390); CuSO × 5H₂O (0,079); Co (NO₃)₂ × 6H₂O (0,0494).

Izolacija je vršena zasejavanjem 1 cm² BLP u hranjivu podlogu BG11 N- (podloga bez izvora azota) i BG11 N+ (podloga sa izvorom azota od 1,5 g/L NaNO₃). Nakon adaptacije lesnih cijanobakterijskih sojeva na rast u tečnoj hranljivoj podlozi i inicijalne kultivacije rađena je izolacija dominantnih sojeva u podlozi naizmeničnim zasejavanjem kultura na tečnu i čvrstu (agarizovana podloga sa 1,5% agara) hranjivu podlogu BG11 (Rippka, 1988). Izdvajanje dominantnih sojeva vršeno je ručno pod lupom (Motic, SMZ-168), razdvajanjem i prenošenjem pojedinačnih kolonija sa čvrste u tečnu podlogu. Postupci razdvajanja su nastavljeni do dobijanja monokultura cijanobakterija. Mikroskopskim posmatranjem (Olympus BX 51) vršen je pregled izolovanih sojeva.

Izolovani sojevi su determinisani upotrebom mikroskopa (Olympus BX 51) uz pomoć ključeva za identifikaciju cijanobakterija (Komárek i Anagnostidis 1998; 2005; Komárek 2013). Upotrebom CellB kamere i odgovarajućeg softvera izolovani sojevi su fotografisani i priključeni već postojećoj kolekciji cijanobakterijskih kultura NSCCC (Slika 15).



Slika 15. Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija
(NSCCC-Novi Sad Cyanobacterial Culture Collection)

Kultivacija izolovanih cijanobakterijskih sojeva za potrebe skrininga njihovih ekofizioloških svojstava rađena je u erlenmajer posudama od 500 mL. Sojevi su kultivisani u podlogama BG11 N+ i BG11 N-, upotrebom tri erlenmajer posude za svaki tretman. Svaki izolovani soj je inokulisan prebacivanjem po 5 mL kulture izolovanog soja u 500 mL podloge BG11 N+ i BG11 N-. Prvih sedam nedelja kultivacije sojevi su gajeni u mirnoj kulturi, na temperaturi koja se kretala između 22°C i 25°C, pod svetlosnim režimom od 14 časova svetlosti i 10 časova tame. Osvetljenje je obezbeđeno upotrebom hladnih fluorescentnih lampi (Philips, Holandija) koje daju intenzitet svetlosti od 720 lux-a. Nakon sedam nedelja kultivacije, nastavljeno je gajenje sojeva na istoj temperaturi, pod istim svetlosnim režimom ali pod nižim intenzitetom svetlosti (450 lux-a) i intenzivnijim mešanjem narednih devet nedelja.

3.3. Skrining ekofizioloških svojstava izolovanih cijanobakterijskih sojeva

Ekofiziološka svojstva izolovanih lesnih sojeva su ispitivana zbog analize fundamentalnog značaja ovih mikroorganizama u terestričnim ekosistemima, a posebno u procesu lesifikacije. Takođe, ove analize su veoma korisne i za procenu aplikativnog

potencijala lesnih sojeva i njihovih pokorica u restoraciji oštećenih površina i u smanjenju negativnih posledica dezertifikacije.

Ekofiziološka svojstva izolovanih cijanobakterijskih sojeva i njihov potencijal da se koriste za obnovu degradiranih površina procenjeni su na osnovu sposobnosti sojeva da produkuju određene metabolite i uticaja prisustva izvora azota u kultivacionom medijumu na produkciju istih. U te svrhe, analizirana je toksičnost, produkcija biomase, produkcija polisaharida i produkcija UV zaštitnih pigmenata izolovanih lesnih cijanobakterijskih sojeva. Selekcija pogodnih sojeva za analize fundamentalnog i aplikativnog tipa je započeta detekcijom ukupne toksičnosti izolovanih sojeva jer upotreba toksičnih i potencijalno toksičnih mikroorganizama nije preporučljiva za biotehnošku primenu u cilju restoracije oštećenih površina i smanjenje negativnog uticaja dezertifikacije. Neophodno je izbeći unošenje takvih sojeva u ekosisteme i zato se na samom početku skrininga odstranjuju sojevi koji pokazuju bilo kakav toksični efekat.

3.3.1. Detekcija toksičnosti izolovanih cijanobakterijskih sojeva primenom *Artemia salina* biološkog testa toksičnosti

Ukupna toksičnost (intracelularna i ekstracelularna) izolovanih cijanobakterijskih sojeva procenjena je upotrebom biološkog testa toksičnosti *Artemia salina*. Toksičnost je testirana u dva kultivaciona perioda, nakon sedam i 16 nedelja kultivacije. Toksičnost svakog cijanobakterijskog soja testirana je u tri ponavljanja.

Priprema uzoraka

U cilju izlučivanja unutarćelijskog sadržaja vršeno je razbijanje ćelijskog zida cijanobakterija primenom 5 ciklusa naizmeničnog zamrzavanja i odmrzavanja 10 mL svake kulture i sonifikacijom (10 minuta konstantno) na sonikatoru Branson 12. Nakon razbijanja ćelijskih zidova cijanobakterija, uzorci su homogenizovani, a zatim centrifugirani (Tehtnica, Železniki, Slovenia) na 3000 obrtaja tokom 10 minuta. Supernatant, koji sadrži intracelularne i ekstracelularne toksine, korišćen je za određivanje ukupne toksičnosti izolovanih sojeva.

Postupak biološkog testa toksičnosti *Artemia salina*

Test akutne toksičnosti *Artemia salina* rađen je po metodi Kiviranta i sar. (1991), upotrebom larvi račića *Artemia salina* (DAJANA, Czech Republic), u mikrotitar pločama. U 200 mL mešavine destilovane i odstajale vode (1:1) inkubirano je 2 g mešavine jaja larvi račića i soil. Inkubacija jaja je trajala oko 22 časa, na 28°C, u uslovima aeracija i osvetljenja. Izlegli račići *Artemia salina* su se koristili za testiranje toksičnosti izolovanih cijanobakterijskih sojeva.

Pre izvođenja samog testa, mikrotitar ploče su sterilisane i isprane destilovanom vodom. U velove mikrotitar ploče aplicirano je 50 µL svakog uzorka, nakon čega je dodato 150 µL medijuma sa 10-20 račića. Kao kontrola korišćeno je 200 µL medijuma sa 10-20 račića, dok je kao referentni soj za produkciju cijanotoksina korišćen soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Uzorci soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 su pripremljeni na isti način kao i uzorci ostalih sojeva. Mikrotitar ploče su potom inkubirane 48 časova u istim uslovima u kojima su račići inkubirani.

Nakon 24 i 48 časova inkubacije vršeno je prebrojavanje uginulih larvi posmatranjem pod lupom. Nakon drugog brojanja, u svaki vel je dodato 50 µl 100% metanola u cilju ubijanja svih račića. Prebrojavanje ukupnog broja račića urađeno je 10-15 minuta nakon apliciranja metanola u velove. Toksičnost izolovanih sojeva određena je kao procenat mortaliteta larvi račića, oduzimajući procenat mortaliteta u kontroli od mortaliteta izazvanog u uzorcima. Rezultati toksičnosti su predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja.

Nivo toksičnosti testiranih uzoraka određen je prema sledećim kriterijumima (Simeunović, 2009; 2010):

- Vrlo visoka toksičnost (mortalitet veći od 90%);
- Značajan nivo toksičnosti (mortalitet u opsegu između 50% i 90%);
- Nizak mortalitet (mortalitet manji od 50%).

3.3.2. Određivanje produkcije biomase

Selekcija sojeva je rađena u odnosu na produkciju biomase sa razlogom da se u daljim istraživanjima koriste oni sojevi koji nisu toksični, a imaju značajnu produkciju biomase zbog brzine rasta na tretiranim podlogama. Produkcija biomase izolovanih cijanobakterijskih sojeva prilikom kultivacije u BG11 N+ i BG11 N- medijumu određena je izračunavanjem

koncentracije hlorofila *a*, spektrofotometrijski (SPECTROstar Nano), na svakih sedam dana tokom sedam nedelja kultivacije i nakon 16 nedelja kultivacije. Koncentracija hlorofila *a* određena je prema metodi Mackinney (1941), dok je odgovarajuća biomasa izračunata indirektno koristeći metodu APHA (APHA, 1992). Produkcija biomase svakog soja prikazana je kao srednja vrednost tri ponavljanja.

Priprema uzoraka

Po 10 mL svake kulture je filtrirano kroz filter papir (Filtratech QL05; France) i postavljeno na ekstrakciju u 5 mL 100% metanola tokom 24 časa u mraku na 4°C. Nakon 24 časa ekstrakcije, razaranje ćelijskih zidova vršeno je sonifikacijom (Bransonic 12), konstantno tokom 10 minuta. Ćelijski ostaci su potom sakupljeni centrifugiranjem (Tehtnica, Železniki, Slovenia) na 3000 obrtaja tokom 10 minuta, dok je supernatant korišćen za određivanje koncentracije hlorofila *a*.

Postupak određivanja koncentracije biomase

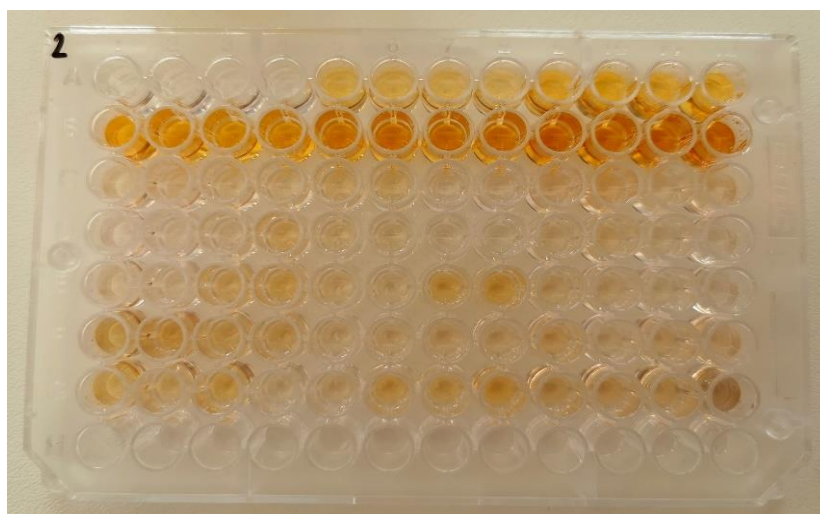
U sakupljenim supernatantima očitavana je optička gustina (OD) uzoraka na talasnoj dužini od 663 nm. Kao slepa proba korišćen je 100% metanol. Nakon određivanja optičke gustine uzoraka određena je koncentracija hlorofila *a* pomoću jednačine po Mackinney (1941).

$$\text{Koncentracija hlorofila } a \text{ (}\mu\text{g)} = \text{OD}_{663} \times 12,64 \times V_1/V_2$$

Chl *a* predstavlja izračunatu koncentraciju hlorofila *a* izraženu u μg . V_1 predstavlja zapreminu uzorka, V_2 zapreminu metanola, dok je 12,64 korekcija apsorbance, a OD_{663} optička gustina uzorka na talasnoj dužini od 663 nm. Produkcija biomase sojeva je zatim izračunata množenjem koncentracije hlorofila *a* svakog uzorka sa faktorom 67 (APHA, 1992).

3.3.3. Određivanje produkcije polisaharida

Određivanje produkcije polisaharida je rađeno da se utvrdi efikasnost izolovanih lesnih cijanobakterija u sakupljanju, vezivanju i stabilizovanju čestica prašine iz vazduha, kao i procesuiranju istih tokom procesa lesifikacije ili obnove oštećenih površina. Potencijal izolovanih cijanobakterijskih sojeva u odnosu na produkciju polisaharida procenjen je kvantifikacijom ukupnih i izlučenih polisaharida u medijumu, prilikom kultivacije sojeva u podlogama BG11 N+ i BG11 N-, u kulturama starim sedam i 16 nedelja. Produkcija polisaharida analizirana je spektrofotometrijski (SPECTROstar Nano), upotrebom metode u kojoj se koriste fenol i sumporna kiselina za kvantifikaciju ugljenih hidrata (Dubois i sar., 1956), modifikovane za rad u mikrotitar pločama (Masuko i sar., 2005) (Slika 16). Ovo je kolorimetrijska metoda u kojoj ugljeni hidrati (monosaharidi, oligosaharidi i polisaharidi) i neki njihovi derivati u reakciji sa sumpornom kiselinom i fenolom daju žuto-narandžasto obojena jedinjenja (Dubois i sar., 1956).



Slika 16. Određivanje sadržaja polisaharida u mikrotitar ploči

Priprema uzoraka za kvantifikaciju izlučenih polisaharida

Izlučeni polisaharidi izolovanih cijanobakterijskih sojeva kvantifikovani su u kultivacionom medijumu, nakon odvajanja ćelija i polisaharida povezanih sa ćelijama (na engleskom: capsular polysaccharides, CPSs) centrifugiranjem na 8000 obrtaja (Eppendorf 5810 R) tokom 15 minuta. U dobijenom supernatantu izvršena je precipitacija

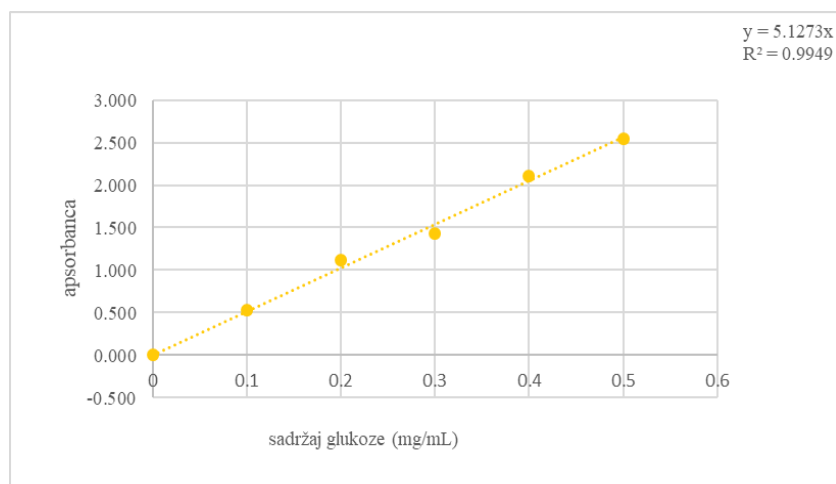
polisaharida upotrebom hladnog 96% etanola, u odnosu 1:3 (uzorak:etanol). U cilju što boljeg raspoređivanja etanola u uzorku etanol je dodavan uz lagano mešanje uzorka na mešalici. Precipitacija je vršena na 4°C tokom 18 časova. Uzorci su sledećeg dana centrifugirani na 8000 obrtaja tokom 10 minuta u cilju oslobađanja etanola. Kako bi se iz uzoraka u potpunosti odstranio etanol uzorci su evaporisani na 37°C, a zatim su rastvoreni u sterilnoj destilovanoj vodi. Rastvoreni uzorci polisaharida čuvani su u zamrzivaču do kvantifikacije.

Priprema uzoraka za kvantifikaciju ukupnih polisaharida

Ukupna količina polisaharida (intracelularni, vezani za ćeliju i izlučeni ekstracelularni) određena je nakon razaranja ćelijskih zidova primenom 5 ciklusa naizmeničnog odmrzavanja i zamrzavanja. Nakon razaranja ćelijskih zidova uzorci su centrifugirani na 8000 obrtaja tokom 15 minuta kako bi se izdvojili ćelijski ostaci, a supernatant u kome se nalaze polisaharidi postavio na precipitaciju. Precipitacija, sakupljanje i rastvaranje sakupljenih polisaharida vršena je na isti način kao prethodno opisana priprema izlučenih polisaharida.

Postupak određivanja koncentracije polisaharida

Kao standard korišćena je D-glukoza početne koncentracije 1 mg/mL. Standardna kriva (Slika 17) je konstruisana upotrebom očitanih apsorbanci za odgovarajuća razblaženja osnovnog rastvora. Apsorbance analiziranih uzoraka nalazile su se u opsegu između najmanje i najveće apsorbance sa konstruisane standardne krive. Kao kontrola korišćena je destilovana voda (bez šećera), čija je apsorbance oduzeta od apsorbanci svih uzoraka. Količina polisaharida predstavljena je kao srednja vrednost tri ponavljanja.



Slika 17. Standardna kriva D - glukoze (mg/mL)

Postupak i redosled dodavanja reagenasa prikazan je u Tabeli 3. Nakon dodavanja uzoraka, destilovane vode kao kontrole i odgovarajućih koncentracija šećera za konstruisanje standardne krive, u sve velove je dodata koncentrovana sumporna kiselina (cc H_2SO_4). Dodavanje cc H_2SO_4 vršeno je pod jačim mlazom kako bi se omogućilo maksimalno mešanje šećera i sumporne kiseline. Odmah po dodavanju kiseline, u svaki vel je dodat 5% rastvor fenola. Mikrotitar ploče su inkubirane u vodenom kupatilu na $85^\circ C$, nakon čega je usledilo njihovo hlađenje na sobnoj temperature. Uzorci iz ohlađenih mikrotitar ploča su preneti u nove mikrotitar ploče u kojima je vršeno spektrofotometrijsko očitavanje apsorbance na 490 nm.

Tabela 3. Postupak određivanja sadržaja polisaharida

Standardna kriva	Kontrola	Uzorci
50 μL odgovarajućih koncentracija glukoze	50 μL destilovane vode	50 μL uzorka
150 μL cc H_2SO_4		
30 μL 5% fenola		
Inkubacija na $85^\circ C$ tokom 10 minuta u vodenom kupatilu		
Hlađenje na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta		
Prebacivanje u novu mikrotitar ploču		
Očitavanje apsorbance na 490 nm		

Određivanje udela izlučenih polisaharida, prinosa izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida

Potencijal sojeva da izlučuju polisaharide u spoljašnju sredinu (produkuju izlučene polisaharide) je pored merenja njihove količine u kultivacionom medijumu procenjen i određivanjem udela izlučenih polisaharida u ukupnoj količini polisaharida. Udeo izlučenih polisaharida je predstavljen procentualno (%), za svaki soj gajen u podlozi BG11 N+ i BG11 N-, u sedmoj i 16. nedelji kultivacije.

U cilju dobijanja sveobuhvatnije slike potencijala svakog pojedinačnog soja da produkuje polisaharide, određena je specifična produkcija izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida. Specifična produkcija polisaharida je predstavljena kao prinos izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida po jedinici biomase. Prinos je izračunat za svaki soj gajen u podlozi sa i bez izvora azota (BG11 N+ i BG11 N-), u oba posmatrana kultivaciona perioda (sedmoj i 16. nedelji kultivacije).

3.3.4. Određivanje viskoziteta medijuma

Viskozitet medijuma izolovanih cijanobakterijskih sojeva meren je u cilju potvrde produkcije izlučenih polisaharida. Reološka merenja vršena su pomoću rotacionog viskozimetra Reotest 2 RV-2 (Medingen GmbH, Nemačka) (Slika 18) sa koaksijalnim cilindričnim mernim priborom oznake N (Dodić i Grahovac, 2013). Viskozitet je određen na osnovu napona smicanja pri različitim brzinama smicanja u tri ponavljanja.



Slika 18. Viskozimetar Reotest 2 RV-2
(Medingen GmbH, Nemačka)
(Foto: Doc. Zorana Trivunović)

Priprema uzoraka

Viskozitet je određivan u kultivacionom medijumu nakon odvajanja ćelija centrifugiranjem (Eppendorf 5810 R) kultura svakog soja na 8000 obrtaja tokom 15 minuta. Za dobijene supernatante izmereni su otkloni kazaljke za različite brzine smicanja.

Postupak određivanja viskoziteta

Merni cilindar uronjen je u prethodno pripremljene uzorke kultivacionih tečnosti. Prilikom svog obrtanja merni cilindar nailazi na otpor koji se beleži na skali. U zavisnosti od očitanih otklona kazaljke za različite brzine smicanja mernog cilindra određen je napon smicanja pomoću sledeće jednačine:

$$\tau = 0,1 \times z \times \alpha$$

τ predstavlja napon smicanja (Pa), 0,1 je faktor konverzije dyn/cm^2 u Pa, z je konstanta koja iznosi $3,08 \text{ dyn/cm}^2/\text{Skt}$, dok α predstavlja očitani otklon kazaljke (Skt).

Dobijeni podaci napona smicanja za svaki uzorak su fitovani stepenim zakonom koristeći Microsoft® Excel 2010 softver (MS Office, Microsoft Corporation, USA), u cilju da se utvrdi faktor konzistencije ($K, \text{Pa}\cdot\text{s}^n$) i indeks toka (n):

$$\tau = K \times D^n$$

D^n predstavlja brzinu smicanja (1/s).

Poklapanje dobijenih podataka sa navedenom funkcionalnom zavisnošću procenjeno je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije (R^2). Zatim su utvrđeni reološki parametri korišćeni za izračunavanje prividnog viskoziteta η_a ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) prema sledećoj jednačini:

$$\eta_a = K \times D^{n-1}$$

Prividni viskozitet je izračunat pri brzini smicanja od 10 1/s.

3.3.5. Određivanje produkcije UV zaštitnih pigmenta

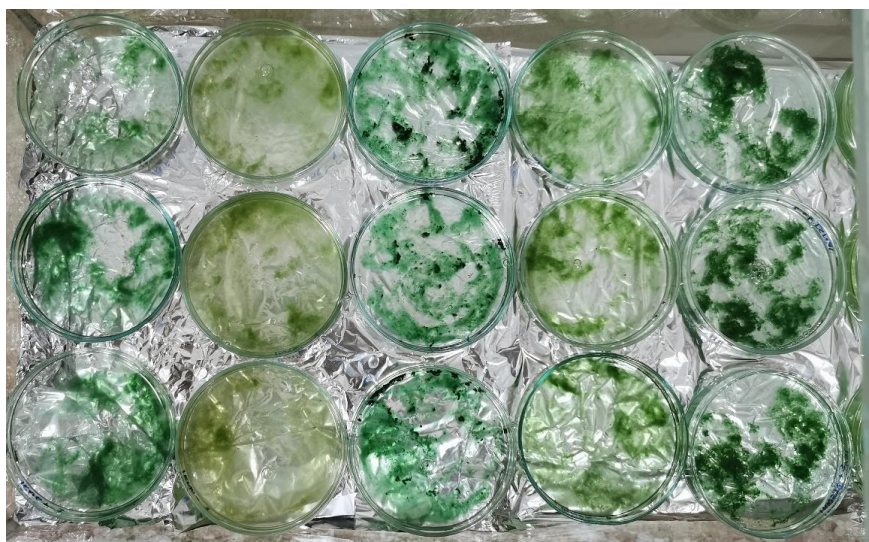
Selekcija sojeva je rađena u odnosu na sposobnost produkcije zaštitnih pigmenta u cilju odabira sojeva sa većom sposobnošću da prežive nepovoljne uslove sredine. Ovim bi se obezbedila veća stopa preživljavanja cijanobakterija tokom procesa lesifikacije ili obnove degradiranih površina. Sposobnost izolovanih cijanobakterijskih sojeva da produkuju UV zaštitne pigmente, scitonemin i mikosporinu slične aminokiseline, analizirana je spektrofotometrijski (SPECTROstar Nano), analizirajući produkciju ovih pigmenta pre i posle izlaganja sojeva kombinaciji UVA/UVB svetlosti (36% UVA i 8% UVB). Usled nemogućnosti pronalaska standarda scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina, kao i kompleksnosti ovih molekula, u okviru ove studije rađeno je određivanje Metabolita u Opsegu Scitonemin Apsorbance (MOSA) i Metabolita u Opsegu Mikosporin Apsorbance (MOMA). Priprema uzoraka i određivanje sadržaja ovih molekula je rađena prema utvrđenim metoda za određivanje scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina. MOSA su kvantifikovani prema metodi Garcia-Pichel i Castenholz (1991), dok su vrednosti potom korigovane upotrebom specifičnih koeficijenata korekcije prema Garcia-Pichel i sar. (1992).

Sadržaj MOMA je procenjen upotrebom metode Garcia-Pichel i Castenholz (1993). Sva merenja su rađena u tri ponavljanja.

Opis eksperimenta

Izolovani sojevi su inicijalno kultivisani po prethodno opisanoj proceduri i pod istim uslovima tokom 28 dana (poglavlje 3.2. *Izolacija i kultivacija lesnih cijanobakterijskih sojeva*). Nakon inicijalne kultivacije sojeva vršeno je njihovo izlaganje kombinaciji UVA/UVB svetlosti (Slika 19). Izlaganje kultura je rađeno u otvorenim petri pločama (prečnika 9 cm, dubine 1,5 cm) u dve specijalno konstruisane UV staklene komore. Jedna komora je služila za izlaganje kultura u cilju stimulisanja produkcije MOMA, dok je druga bila namenjena za produkciju MOSA. Komore su bile opremljene sa po jednom specijalnom fluorescentnom terarijumskom neonkom (JBL, Solar Reptile Sun, T8, Nemačka) čiji spektar svetlosti sadrži 36% UVA i 8% UVB osvetljenja. Udaljenost petri ploča od izvora svetlosti bio je 30 cm.

Kulture su izlagane UV zračenju konstantno tokom sedam dana na temperaturi koja se kretala između 22°C i 25°C. Kako bi se sprečilo taloženje ćelija ili njihovo međusobno zasenčenje sve petri ploče su mešane svakodnevno. U slučaju isparavanje podloge iz petri ploča, vršeno je dolivanje odgovarajućeg BG11 medijuma u razblaženju 1:1 (destilovana voda:BG11 medijum). Kontrola u okviru ovog eksperimenta podrazumevala je analizu sadržaja pigmenata u kulturama koje nisu bile izložene UV zračenju.



Slika 19. Izlaganje izolovanih cijanobakterijskih sojeva UV osvetljenju

Priprema uzoraka za kvantifikaciju MOSA

Priprema uzoraka za kvantifikaciju MOSA rađena je prema metodi Dillon i Castenholz (1999). Kulture izložene UV zračenju i kontrolne kulture su profiltrirane kroz filter papire (Filtratech QL05; France), koji su potom osušeni na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija MOSA je rađena u 5 mL acetona tokom 24 časa na 4°C u mraku. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani (Tehtnica, Železniki, Slovenia) na 3000 obrataja tokom 10 minuta. Supernatant je odliven i korišćen za određivanje sadržaja MOSA.

Priprema uzoraka za kvantifikaciju MOMA

Priprema uzoraka za kvantifikaciju MOMA vršena je po uzoru na metodu Garcia-Pichel i Castenholz (1993). Nakon filtracije kultura kroz filter papir (Filtratech QL05; France) i njihovog sušenja na sobnoj temperature, MOMA su ekstrahovani u 20% metanolu u vodenom kupatilu na 45°C u trajanju od dva časa. Ekstrakcija je nastavljena u frižideru tokom 24 časa, nakon čega su uzorci centrifugirani (Tehtnica, Železniki, Slovenia) na 3000 obrataja tokom 10 minuta. Dobijeni supernatant je dalje korišćen za određivanje sadržaja MOMA.

Postupak određivanja sadržaja MOSA

U pripremljenim uzorcima za određivanje sadržaja MOSA upotrebom spektrofotometra očitane su vrednosti OD na sledećim talasnim dužinama: 384 nm, 490 nm i 663 nm. Očitane vrednosti su zatim korigovane oduzimanjem OD na 750 nm. Sadržaj MOSA je izračunat upotrebom trihromatske jednačine (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991) i faktora korekcije za scitonemin (Garcia-Pichel i sar., 1992): Jednačina za određivanje sadržaja scitonemina je:

$$Scy = 1,04 \times A_{384} - 0,79 \times A_{663} - 0,27 \times A_{490}$$

Scy predstavlja koncentraciju scitonemina, dok su A_{384} , A_{663} i A_{490} očitane vrednosti apsorbance na talasnim dužinama 384, 663 i 490 nm.

Postupak određivanja sadržaja MOMA

Sadržaj MOMA je određen spektrofotometrijski očitavanjem OD na 260 nm, kao i određivanjem talasne dužine maksimalne OD MOMA. Koncentracija MOMA je potom određena prema sledećoj jednačini (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993):

$$A_{\lambda}^* = A_{\lambda} - A_{260} (1,85 - 0,005 \times \lambda)$$

A_{λ}^* predstavlja korigovanu vrednost apsorbance na maksimumu, A_{λ} je izmerena vrednost apsorbance na maksimumu, A_{260} je apsorbance očitana na 260 nm, dok je λ je talasna dužina (nm) na kojoj je izmerena maksimalna apsorbance.

U nedostatku apsorpcionog koeficijenta, koncentracija mikosporinu sličnih aminokiselina se izražava kao A (apsorbance ili optička gustina). Jedan A odgovara vrednosti apsorbance kada je supstanca rastvorena u 1 mL rastvarača i apsorbance izmerena u kiveti od 1 cm svetlosnog puta. Specifičan sadržaj MOMA u ovoj studiji je izražen kao A_{λ} /mg suve biomase.

3.3.6. Statistička obrada podataka

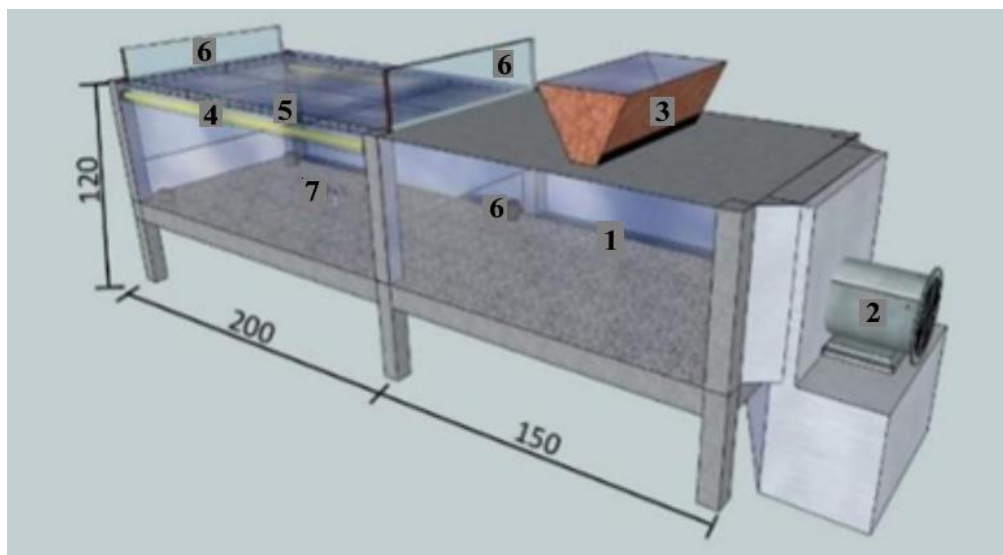
Sva merenja u okviru ove studije su urađena u tri ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ponavljanja. Rezultati produkcije biomase, polisaharida i viskoziteta kultivacionih medijuma su analizirani statistički dvofaktorijalnom analizom varijanse (na engleskom: Two-Way ANOVA) na nivou značajnosti od $\alpha=0,05$ pomoću softvera Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc., USA).

3.4. Procena sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da vežu i stabilizuju čestice prašine

3.4.1. Dizajn komora

U cilju procene sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da ostvare interakciju sa česticama prašine (da vežu i stabilizuju čestice) i zajedno sa njima formiraju biološke pokorice sproveden je *ex-situ* experiment. Eksperiment je rađen u dve specijalno konstruisane komore. Jedna komora je služila za procenu sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da vežu i stabilizuju čestice prašine (u daljem tekstu nazvana esperimentalnom komorom). U eksperimentalnoj komori su inokulisani cijanobakterijski sojevi u cilju razvijanja biofilma. Druga komora (u daljem tekstu nazvana kontrolnom komorom) nije inokulisana cijanobakterijskim sojevima i služila je kao kontrola.

Pravougaone staklene komore sa metalnom osnovom, površine 3,5 m², sastojale su se iz dva dela (Slika 20). Prednji deo komore (Slika 20, oznaka 1), konstruisan za simulaciju oluja prašine, opremljen je ventilatorima koji pravi vetar brzine 12 m/s (Slika 20, oznaka 2) i otvorom na vrhu za ubacivanje prašine u komoru (Slika 20, oznaka 3). Ventilator je služio za usmeravanje čestica prašine ka zadnjem delu komore gde je proučavana sposobnost cijanobakterijskih sojeva da vezuju čestice prašine iz vazduha i formiraju biološke pokorice. Na taj način je analiziran mehanizam stabilizacije čestica biološkim pokoricama. Zadnji deo komore je bio opremljen belim, hladnim, fluorescentnim lampama (Philips, Holandija) (Slika 20, oznaka 4) koje su obezbeđivale osvetljenje intenziteta između 560 i 700 lux-a u različitim tačkama i sistemom za simulaciju kiše (Slika 20, oznaka 5) koji je obezbeđivao neophodnu vlagu za rast i razvoj bioloških pokorica. Prednji i zadnji deo komore su bili odvojeni pokretnim vratima koja su se otvarala prilikom simulacija oluja prašine (Slika 20, oznaka 6). Površina dna zadnjeg dela komora je bila obložena pločom od hrapavog stakla (Slika 20, oznaka 7), dok su svi ostali delovi bili od stakla glatke površine. Postavljanje stakla neravne površine imalo je za cilj uspešniju inokulaciju i lakšu kolonizaciju cijanobakterijskih sojeva u eksperimentalnoj komori.



Slika 20. Šematski prikaz specijalno dizajniranih komora za procenu sposobnosti cijanobakterijskih sojeva da vežu i stabilizuju čestice prašine. Prednji deo komore (1) sa ventilatorima (2) i otvorom za prašinu (3). Pokretna vrata (6) koja odvajaju prednji i zadnji deo komore. Zadnji deo komore osvetljen fluorescentnim lampama (4) i obezbeđen sistemom za simulaciju kiše (5). Neravna površina (7) zadnjeg dela komore za formiranje bioloških pokorica

3.4.2. Razvijanje cijanobakterijskog pokrivača

Konzorcijum cijanobakterijskih sojeva (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6) izolovanih iz BLP sakupljenih sa lesnog profila napuštene ciglane Ruma (N 45° 00' 43.8'', E 19° 51' 28.8'') inokulisan je u zadnji deo eksperimentalne komore, u cilju formiranja cijanobakterijskog biofilma. Biofilm je razvijan do pokrivanja površine od 2 m² i dostizanja debljine od oko 1 mm (Slika 21). Tokom kultivacije, biofilm je zalivan sa 250 mL destilovane vode tokom pet dana i sa istom količinom BG11 medijuma (0.9 g/L NaNO₃) jednom mesečno. Simulacija suvih uslova rađena je isušivanjem biofilma jednom nedeljno.



Slika 21. Eksperimentalna komora (A) sa razvijenim cijanobakterijskim biofilmom (B)

3.4.3. *Ex-situ* eksperiment vezivanja i stabilizacije čestica

Procena uloge cijanobakterija u vezivanju i stabilizaciji čestica prašine vršena je simulacijom oluja prašine sa smenama sušnih i vlažnih perioda. Oluje prašine su simulirane upotrebom lesnog sedimenta sa Sremskog lesnog platoa, lesnog profila napuštene ciglane u Rumi. Uzorkovanje i čuvanje lesnog sedimenta za potrebe *ex-situ* eksperimenta je opisano u poglavlju 3.1. *Uzorkovanje bioloških lesnih pokorica i lesnog sedimenta sa opisom lokaliteta*. Pre apliciranja sakupljeni les je usitnjen upotrebom mlina. Oluje prašine su simulirane u obe komore (kontrolnoj i eksperimentalnoj) svake treće nedelje, sat vremena nakon zalivanja, upotrebom 400 g prašine. Simulacije oluja prašine su vršene u cilju razvoja bioloških pokorica inicirajući interakciju razvijenog cijanobakterijskog biofilma i čestica. Nakon inicijalnog kontakta čestica i cijanobakterijskog biofilma i formiranja bioloških pokorica, dalji razvoj bioloških pokorica stimulisan je redovnim dodavanjem novih čestica (simulacijom oluja prašine), odgovarajuće količine vode (zalivanjem) i simulacijom suvih uslova (isušivanjem). Tokom *ex-situ* eksperimenta zadnji delovi obe komore su zalivani i isušivani na isti način kao zadnji deo eksperimentalne komore tokom razvijanja biofilma. Upotrebljena količina vode (250 mL) se pokazala kao optimalna za rast cijanobakterija i pri ovoj količini vode nije došlo do izdvajanja viška vode na donjim unutrašnjim delovima komora. Eksperiment je trajao 10 meseci, tokom kojih je simulirano 37 oluja prašine. Oduzimanjem količine prašine zaostale na površini dna prednjeg dela obe komore (dela za simulaciju oluja prašine) od ukupne količine prašine upotrebljene za simulaciju oluja prašine izračunata je količina prašine koja je dospela u zadnji deo kontrolne komore (2850 g) i eksperimentalne komore (3225 g).

3.4.4. Određivanje veličine čestica lesnog sedimenta

Uzorkovanje

Interakcija cijanobakterija sa česticama prašine procenjena je određivanjem veličine čestica iz eksperimentalne komore pre i posle procesuiranja od strane cijanobakterija kako bi se ispitaio uticaj cijanobakterija na veličinu čestica, kao i određivanjem veličine čestica iz kontrolne komore. Veličina čestica određena je u sledećim uzorcima: 1) prašina pripremljena za simulaciju oluja prašine, uzorkovana sa lesnog profila i usitnjena mlinom (u daljem tekstu nazvana “navejavane čestice”); 2) prašina koja je navejana na površinu prednjeg dela eksperimentalne komore nakon simulacije oluja prašine (u daljem tekstu nazvana “navejane čestice”); 3) sediment istaložen ispod formiranih BLP zadnjeg dela eksperimentalne komore (u daljem tekstu nazvan “istaložene čestice”); 4) prašina navejana u zadnjem delu kontrolne komore (u daljem tekstu nazvana “navejane čestice kontrolne komore“. Uzorak navejavanih čestica (1) je analiziran pre početka eksperimenta. Uzorci navejavanih čestica (2) su uzeti sa površine prednjeg dela eksperimentalne komore nakon završenih simulacija oluja prašine. Uzorkovanje je započeto od mesta ulaska prašine u komoru do kraja prednjeg dela komore, odnosno do samog ulaska prašine u zadnji deo komore sa razvijenim biofilmom, na svakih 10 cm. Ovakvo uzorkovanje je rađeno kako bi se stekao uvid u veličinu čestica koje su dospеле do biofilma (čestice navejane neposredno pred ulazak u zadnji deo komore sa biofilmom), u odnosu na čestice navejane ispod ulaza prašine, kao i uticaj udaljenosti izvora vetra na veličinu čestica. U zadnjem delu eksperimentalne komore, gde su se formirale BLP, uzorkovana su dva uzorka istaloženog sedimenta za analizu veličine istaloženih čestica (3). Uzorkovanje je izvršeno odizanjem BLP i struganjem sedimenta ispod. U zadnjem delu kontrolne komore, gde nisu formirane BLP, uzorkovan je uzorak navejavanih čestica (4). Uzorci su pakovani u kese i čuvani na suvom i tamnom mestu do merenja.

Priprema uzoraka i merenje

Veličina čestica uzoraka prašine i sedimenta određena je koristeći laserski uređaj za određivanje veličine čestica Malvern Mastersizer 2000 koji ima opseg merenja 0.02-2000 μm sa preciznošću od $\pm 1\%$. Refraktivni i indeksi apsorpcije korišćeni tokom merenja su 1,52 i 0,1, redom. Oko 200 mg svakog uzorka, osušenog na vazduhu, tretirano je sa 10 mL 10%

H₂O₂ u cilju uklanjanja organske materije. Nakon toga, uklanjanje karbonata je urađeno tretiranjem uzoraka sa 10 mL 10% HCl. U uzorke je dodato oko 2000 mL dejonizovane vode i suspenzija uzoraka je ostavljena da odstoji 48 časova do pipetiranja u cilju uklanjanja kiselih jona. Uzorci su zatim dispergovani sa 10 mL 0.05 M (NaPO₃)₆ i stavljeni u ultrazvučno kupatilo tokom 10 minuta, nakon čega se pristupilo merenju veličine čestica (Konert i Vandenberghe, 1997; Hao i sar., 2012).

3.4.5. Mikroskopska analiza razvijenih bioloških lesnih pokorica

Nakon 10 meseci simulacije oluja prašine izvršeno je uzorkovanje u zadnjim delovima obe komore. Razvoj BLP, mehanizam vezivanja i stabilizacije čestica prašine proučen je vizuelno, pomoću stereomikroskopa (Leica M205 C), svetlosnog mikroskopa (Olympus BX51) i skening elektronskog mikroskopa (SEM; Jeol JSM-6610LV).

Ispitivanje pomoću stereomikroskopa rađeno je na BLP u suvom i vlažnom stanju. Različiti morfološki oblici kolonija uočeni stereomikroskopom su uslikani pomoću digitalne kamere (Leica DFC290 HD) i softvera LAS, verzija V4.11.

Od različitih kolonija koje su formirale BLP pravljeni su preparati za posmatranje pod mikroskopom. Preparati su pripremani posmatranjem pod stereomikroskopom i uzorkovanjem kolonija pomoću tanke igle i pincete. Mikroskopski su posmatrane prisutne kolonije, procenjen je sastav različitih morfoloških oblika BLP i organizacije živih i neživih elemenata unutar BLP. Slike su snimljene pomoću kamere CellB i odgovarajućeg softvera.

Struktura BLP i interakcija cijanobakterija sa česticama utvrđena je njihovim posmatranjem pomoću SEM-a. Priprema uzoraka vršena je na sledeći način: uzorci su prevučeni zlatom do debljine od 15.0 nm i gustine od 19.32 g/cm³, optimizacija je rađena pomoću bakra. Uzorci su posmatrani pod sledećim uslovima: W žica kao izvor elektrona, napon ubrzanja elektrona od 20 kV, snimanje u uslovima ultravisokog vakuma od 10⁻⁹ Pa.

3.4.6. Određivanje akumulacije hlorofila *a*, karotenoida i scitonemina u biološkim lesnim pokoricama

Akumulacija hlorofila *a*, karotenoida i scitonemina analizirana je spektrofotometrijski (SPECTROstar Nano) u uzorcima iz obe komore. Sadržaj ovih pigmenata kvantifikovan je

upotrebom trihromatske jednačine prema Garcia-Pichel i Castenholz (1991), čije su vrednosti potom korigovane upotrebom specifičnih koeficijenata korekcije prema Garcia-Pichel i sar. (1992). Akumulacija pigmenata za svaku komoru je predstavljena kao srednja vrednost 12 nasumično uzorkovanih uzoraka iz svake komore. Sadržaj pigmenata je određen u suvom i vlažnom stanju BLP iz eksperimentalne komore. Sadržaj pigmenata svakog pojedinačnog uzorka iz kontrolne i eksperimentalne komore je određen kao srednja vrednost tri ponavljanja.

Priprema uzoraka

Priprema uzoraka za određivanje sadržaja hlorofila *a*, karotenoida i scitonemina rađena je po uzoru na metodu Lan i sar. (2010). Površina BLP od 1 cm² je pomoću avana i tučka fino usitnjena, a potom je uzorak postavljen na ekstrakciju u 10 mL 100% acetone. Ekstrakcija je trajala 18 časova, u mraku, na 4°C. Uzorci su potom centrifugirani, a dobijeni supernatant je dalje služio za očitavanje OD.

Postupak određivanja sadržaja pigmenata

Pripremljeni uzorci su dalje korišćeni za očitavanje OD na sledećim talasnim dužinama: 663 nm, 384 nm, and 490 nm. Očitane vrednosti su potom korišćene za izračunavanje sadržaja pigmenata pomoću sledećih jednačina (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Garcia-Pichel i sar., 1992):

$$\text{Chl-a} = (1.02 A_{663} - 0.027 A_{384} - 0.01 A_{490}) / C_{\text{Chl-a}} \times V/S$$

$$\text{Car} = (1.02 A_{490} - 0.08 A_{384} - 0.026 A_{663}) / C_{\text{Car}} \times V/S$$

$$\text{Scyt} = (1.04 A_{384} - 0.79 A_{663} - 0.27 A_{490}) / C_{\text{Scyt}} \times V/S$$

Chl-a, Car i Scyt predstavljaju sadržaje hlorofila *a*, karotenoida i scitonemina, izražene u mg/m²; C_{chl a}, C_{car} i C_{scyt} su koeficijenti korekcije (L g⁻¹ cm⁻¹) za chl *a*, karotenoide i scitonemin, iznose 92.5, 250 and 112.6, redom; A₆₆₃, A₄₉₀ and A₃₈₄ predstavljaju očitane absorbance na sledećim talasnim sužinama 663 nm, 490 nm i 384 nm; V is zapremina ekstrakcionog sredstva (mL), S površina uzorka (cm²).

3.4.7. Uloga cijanobakterijskih bioloških lesnih pokorica u sprečavanju erozije

Uloga cijanobakterijskih BLP u stabilizaciji čestica lesa i sprečavanju erozije izazvane vetrom ispitana je poredeći uticaj simulirane oluje vetra na lesni sediment prekriven cijanobakterijskim BLP u odnosu na lesni sediment bez biološkog pokrivača. Eksperimentet je rađen u petri pločama.

Opis eksperimenta

Za potrebe eksperimenta korišćene su plastične petri ploče. Petri ploče sa lesnim materijalom planirane kao eksperimentalne ploče su bile inokulisane cijanobakterijskom biomasom, dok kontrolne petri ploče nisu imale biološki zaštitni sloj. Svaka petri ploča je bila napunjena sa 7,3 g fino usitnjenog lesnog sedimenta. Biomasa soja *Nostoc* sp. IRN5D je korišćena za indukciju razvoja BLP. Eksperimentalne petri ploče su inokulisane sa 15 mL soja *Nostoc* sp. IRN5D (20 mg suve biomase) upotrebom pipete i raspoređivanjem biomase po površini sedimenta metodom kap po kap. Kontrolne petri ploče su inokulisane istom količinom destilovane vode. Sve petri ploče su zatim sušene u termostatu na temperaturi 27-28°C, u mraku tokom 24 časa. Suve petri ploče su izložene simuliranoj oluji vetra tokom jednog časa, na udaljenosti od ventilatora od oko 25 cm, u mikrobiološkom laminaru.

Postupak određivanja efikasnosti cijanobakterijskih bioloških lesnih pokorica u sprečavanju erozije vetrom

Procena sposobnosti cijanobakterijskih BLP da drže čestice u kompaktnom stanju izvršena je na osnovu razlike u težini petri ploča pre i nakon izlaganja simuliranoj oluji vetra. Efikasnost cijanobakterijskog pokrivača u stabilizaciji lesa predstavljena je kao srednja vrednost tri ponavljanja.

4. REZULTATI

4.1. Izolacija, determinacija i morfološki opis lesnih cijanobakterijskih sojeva

Vršena je izolacija cijanobakterijskih sojeva koji su pokazali dominaciju rasta nakon inokulacije BLP u BG11 medijum. Izolovani su dominantni sojevi radi njihove potencijalne upotrebe za obnovu degradiranih lesnih površina. Cilj izolacije samo dominantnih sojeva je bio da se selektuju sojevi koji se lako kultiviraju i umnožavaju u tečnom medijumu, radi njihove ekonomičnije i efikasnije pripreme (masovne produkcije biomase) za inokulaciju na terenu.

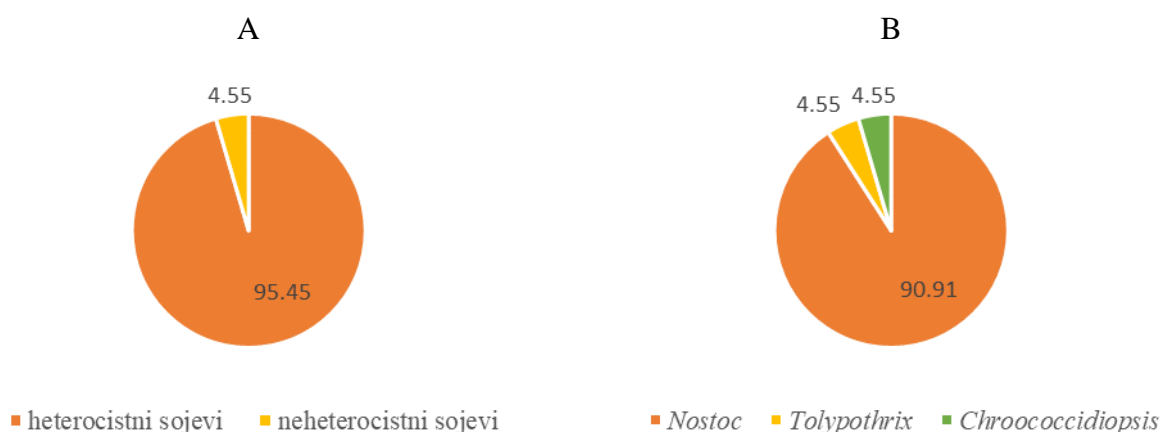
Za izolaciju lesnih cijanobakterijskih sojeva izabrane su 22 BLP sa 10 lokaliteta iz Srbije, Kine i Irana. Od ukupno 22 izolovana cijanobakterijska soja, 12 sojeva je izolovano iz BLP poreklom iz Srbije, pet sojeva poreklom iz Kine i pet sojeva poreklom iz Irana (Tabela 4).

Tabela 4. Izolovani cijanobakterijski sojevi iz BLP Srbije, Kine i Irana

Cijanobakterijski soj	Zemlja porekla	Rod
L1	Srbija	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
L2	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
L2-2	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
L4	Srbija	<i>Tolypothrix</i> sp.
L5	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
L6	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
L6-2	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
M1	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
R1	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
R5-2	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
SS1	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
SS4	Srbija	<i>Nostoc</i> sp.
GP14	Kina	<i>Nostoc</i> sp.

LP4	Kina	<i>Nostoc</i> sp.
LP8-2	Kina	<i>Nostoc</i> sp.
LR7	Kina	<i>Nostoc</i> sp.
ZJ1	Kina	<i>Nostoc</i> sp.
IRN5D	Iran	<i>Nostoc</i> sp.
IRN5I	Iran	<i>Nostoc</i> sp.
IRN5K	Iran	<i>Nostoc</i> sp.
IRN6	Iran	<i>Nostoc</i> sp.
IRN8	Iran	<i>Nostoc</i> sp.

Determinacija izolovanih sojeva je rađena na osnovu morfoloških karakteristika koje su u fikološkim determinatorima predstavljene kao bitni taksonomski karakteri. Primećena je apsolutna dominacija heterocistnih sojeva, sa izolovanim 21 heterocistnim sojem (95.45%) i jednim neheterocistnim sojem (Grafikon 1A). Najzastupljeniji su bili predstavnici roda *Nostoc* sa izolovanih čak 20 sojeva (90,91%), dok su rodovi *Tolypothrix* i *Chroococcidiopsis* imali po jednog predstavnika (Grafikon 1B).



Grafikon 1. Procentualna zastupljenost (%) heterocistnih i neheterocistnih cijanobakterijskih sojeva (A) i pojedinačnih rodova (B) u okviru ove studije

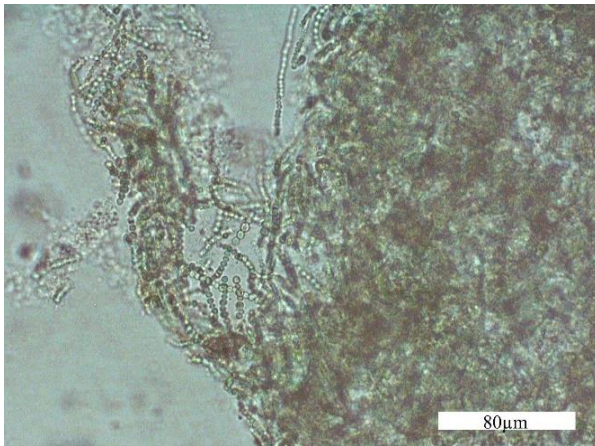
Izolovani sojevi iz BLP poreklom iz Srbije su predstavnici tri roda (*Chroococcidiopsis*, *Tolypohrix* i *Nostoc*) (Slike 22-33) sa dominacijom roda *Nostoc* (83.33%). Svi izolovani sojevi iz BLP Kine (Slike 34-38) i Irana (Slike 39-43) su pripadnici roda *Nostoc*.



Slika 22. *Chroococidiopsis* sp. L1



Slika 23. *Nostoc* sp. L2



Slika 24. *Nostoc* sp. L2-2



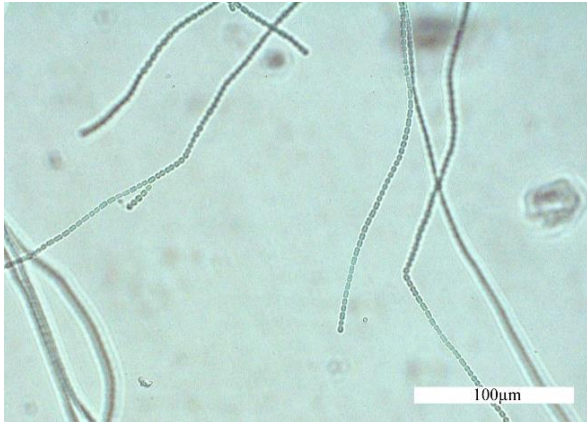
Slika 25. *Tolypothrix* sp. L4



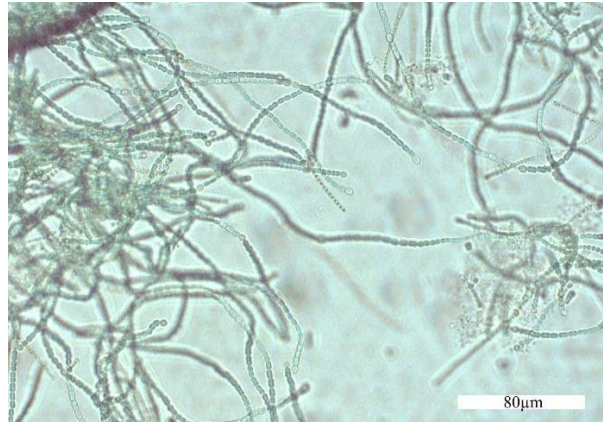
Slika 26. *Nostoc* sp. L5



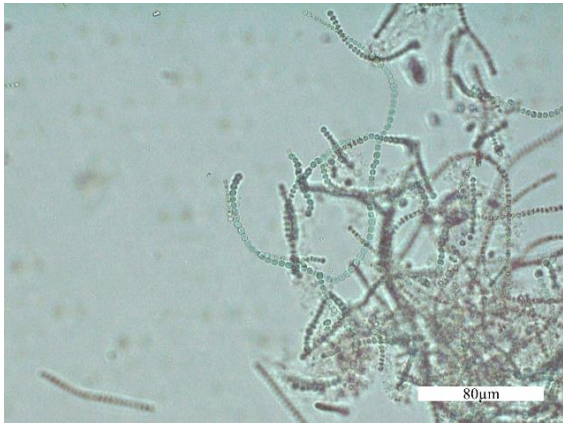
Slika 27. *Nostoc* sp. L6



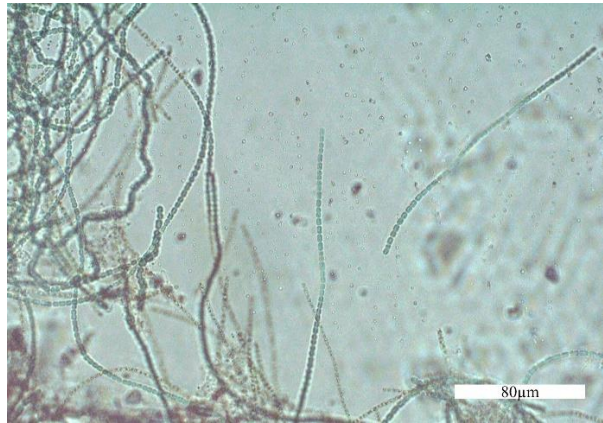
Slika 28. *Nostoc* sp. L6-2



Slika 29. *Nostoc* sp. M1



Slika 30. *Nostoc* sp. R1



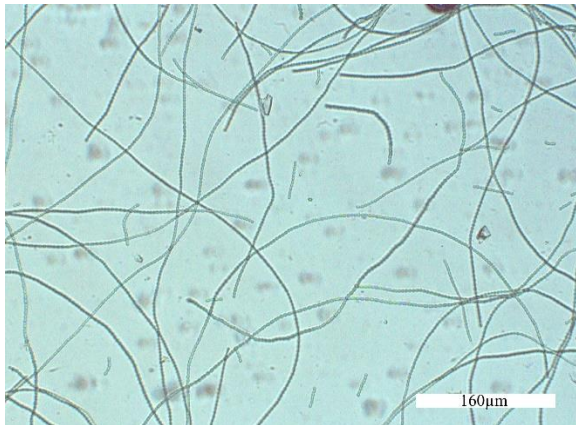
Slika 31. *Nostoc* sp. R5-2



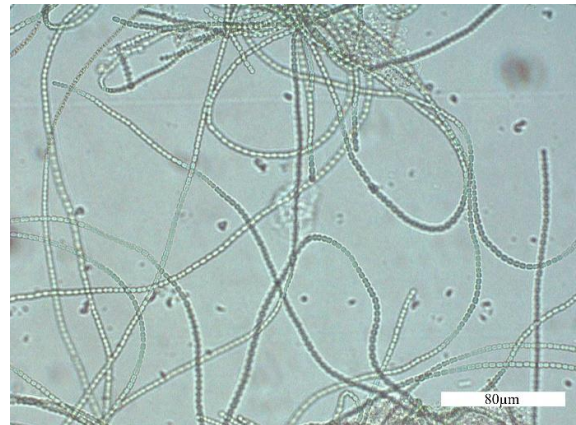
Slika 32. *Nostoc* sp. SS1



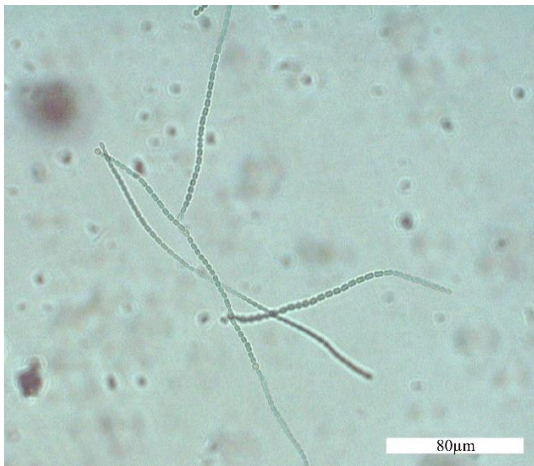
Slika 33. *Nostoc* sp. SS4



Slika 34. *Nostoc* sp. GP14



Slika 35. *Nostoc* sp. LP4



Slika 36. *Nostoc* sp. LP8-2



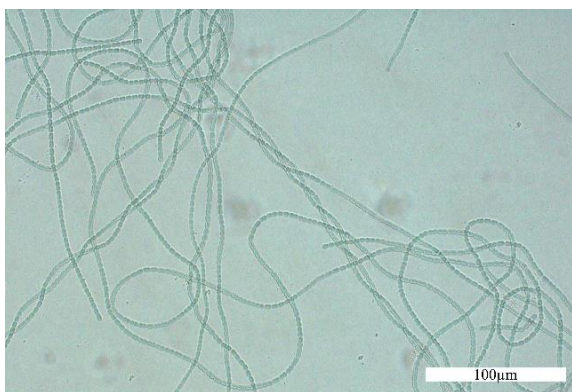
Slika 37. *Nostoc* sp. LR7



Slika 38. *Nostoc* sp. ZJ1



Slika 39. *Nostoc* sp. IRN5D



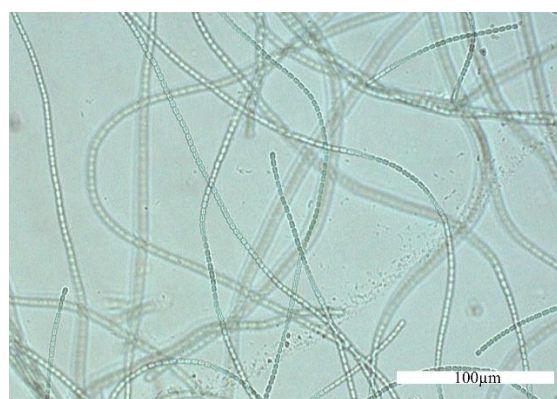
Slika 40. *Nostoc* sp. IRN5I



Slika 41. *Nostoc* sp. IRN5K



Slika 42. *Nostoc* sp. IRN6



Slika 43. *Nostoc* sp. IRN8

4.2. Skrining izolovanih cijanobakterijskih sojeva

4.2.1. Detekcija toksičnosti - *Artemia salina* biološki test toksičnosti

Svi izolovani sojevi, u ispitivanim fazama rasta (sedma i 16. nedelja kultivacije) i kultivacijom u oba testirana medijuma (BG11 N+ i BG11 N-), su pokazali nizak mortalitet (<50%) nakon 24 i 48 časova izloženosti larvi račića (Tabela 5). Kulture referentnog soja za produkciju cijanotoksina (*Microcystis* PCC7806 iz Pasterove kolekcije kultura) su nakon 48 časova izazvale mortalitete larvi račića od 95,96% i 97,92% (kulture stare sedam i 16 nedelja), što ukazuje na vrlo visoku toksičnost ovog soja. Mortalitet manji od 10% je zabeležen kod 17 izolovanih sojeva, dok se mortalitet izazvan od strane preostalih pet sojeva kretao u rasponu 10-16%. Najveći mortalitet izazvao je soj *Tolypothrix* sp. L4 u podlozi BG11 N- (16%). Pomenuti soj je izazvao mortalitet veći od 10% i u podlozi BG11 N+ (10,2%). Kod preostala četiri soja mortaliteti veći od 10% su zabeleženi prilikom uzgajanja

soja *Nostoc* sp. R1 u podlozi BG11 N+, i preostalih sojeva (*Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN6) prilikom uzgajanja u podlozi BG11 N-.

Tabela 5. Rezultati ukupne toksičnosti izolovanih cijanobakterijskih sojeva primenom biološkog testa toksičnosti *Artemia salina*

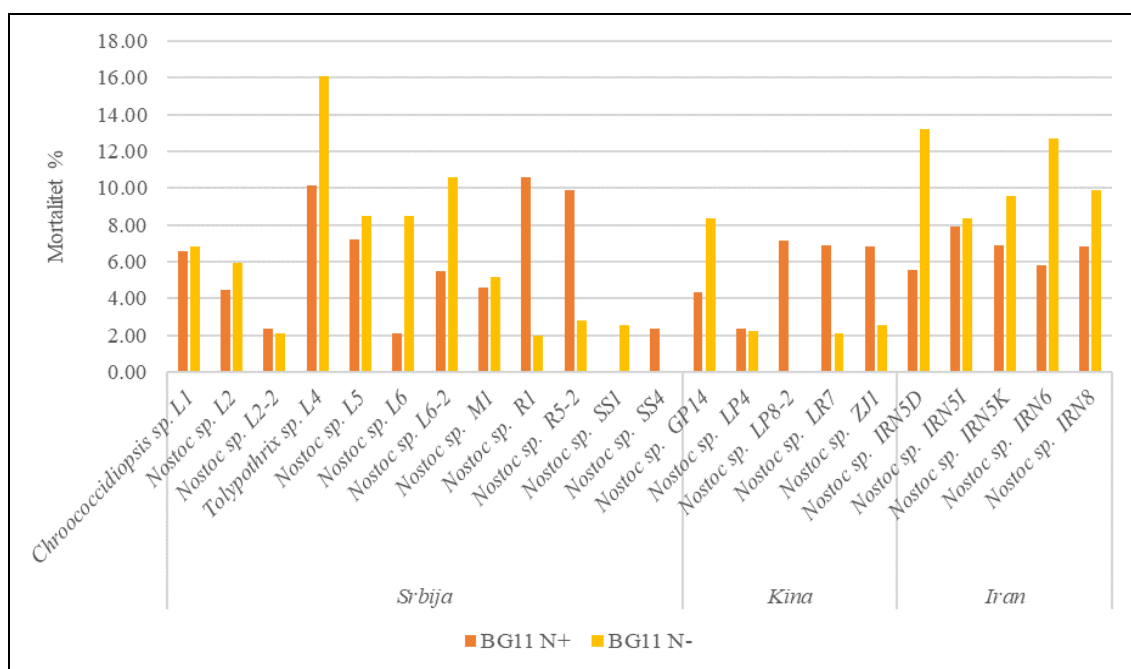
Testirani soj	BG11 medijum	Mortalitet %			
		7. nedelja kultivacije		16. nedelja kutivacije	
		24h	48h	24h	48h
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. L1	N+	0,00	0,00	0,00	6,56
	N-	0,00	0,00	0,00	6,82
<i>Nostoc</i> sp. L2	N+	0,00	0,00	0,00	4,46
	N-	0,00	0,00	0,00	5,93
<i>Nostoc</i> sp. L2-2	N+	0,00	0,00	0,00	2,38
	N-	0,00	1,96	0,00	2,08
<i>Tolypothrix</i> sp. L4	N+	0,00	0,00	0,00	10,18
	N-	0,00	0,00	0,00	16,07
<i>Nostoc</i> sp. L5	N+	0,00	0,00	0,00	7,22
	N-	0,00	0,00	0,00	8,47
<i>Nostoc</i> sp. L6	N+	0,00	0,00	0,00	2,08
	N-	0,00	2,38	6,39	8,47
<i>Nostoc</i> sp. L6-2	N+	0,00	5,47	0,00	0,00
	N-	0,00	4,17	0,00	10,57
<i>Nostoc</i> sp. M1	N+	0,00	4,60	0,00	0,00
	N-	4,79	4,79	0,00	5,16
<i>Nostoc</i> sp. R1	N+	0,00	2,56	5,16	10,57
	N-	0,00	1,96	0,00	0,00
<i>Nostoc</i> sp. R5-2	N+	0,00	2,56	2,38	9,89
	N-	0,00	2,38	0,00	2,78
<i>Nostoc</i> sp. SS1	N+	0,00	0,00	0,00	0,00
	N-	0,00	0,00	2,56	2,56
<i>Nostoc</i> sp. SS4	N+	0,00	0,00	0,00	2,38
	N-	0,00	0,00	0,00	0,00

<i>Nostoc</i> sp. GP14	N+	0,00	4,31	0,00	4,17
	N-	0,00	8,33	0,00	0,00
<i>Nostoc</i> sp. LP4	N+	0,00	0,00	0,00	2,38
	N-	0,00	2,22	0,00	0,00
<i>Nostoc</i> sp. LP8-2	N+	0,00	1,85	0,00	7,14
	N-	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Nostoc</i> sp. LR7	N+	0,00	0,00	6,87	6,87
	N-	0,00	0,00	2,08	2,08
<i>Nostoc</i> sp. ZJ1	N+	2,22	2,22	2,38	6,83
	N-	0,00	2,56	2,22	2,22
<i>Nostoc</i> sp. IRN5D	N+	1,85	5,56	2,78	5,56
	N-	1,75	13,24	0,00	2,08
<i>Nostoc</i> sp. IRN5I	N+	7,91	7,91	0,00	4,76
	N-	0,00	7,54	0,00	8,33
<i>Nostoc</i> sp. IRN5K	N+	0,00	2,38	0,00	6,88
	N-	0,00	7,69	2,56	9,57
<i>Nostoc</i> sp. IRN6	N+	0,00	5,16	0,00	5,77
	N-	5,16	12,70	2,38	6,98
<i>Nostoc</i> sp. IRN8	N+	0,00	6,83	0,00	2,78
	N-	0,00	9,92	0,00	2,22
<i>Microcystis</i> PCC7806*	N±	87,73	95,96	93,75	97,92

*Soj *Microcystis* PCC7806 iz Pasterove kolekcije kultura, korišćen kao referentni soj za procenu toksičnosti obzirom da je poznati producent mikrocistina. Soj je kultivisan u modifikovanom BG11 medijumu (0,9 g/L NaNO₃). Mortaliteti iznad 10% su označeni podebljano.

Iako su svi testirani sojevi izazvali nizak mortalitet larvi *Artemia salina*, u cilju što bezbednije upotrebe sojeva za inokulaciju na terenu i dosadašnjih saznanja o uticaju cijanotoksina na zdravlje ljudi i životinja, pažnja je posvećena i uticaju uslova kultivacije (prisustva izvora azota u medijumu) na toksičnost izolovanih sojeva.

Na grafikonu 2 su prikazane najveće zabeležene vrednosti toksičnosti izazvane testiranim sojevima, nezavisno od starosti kultura. Od ukupnog broja (22) analiziranih cijanobakterijskih sojeva, 14 sojeva (63,63%) je izazvalo veći mortalitet u podlozi bez dodatog izvora azota.



Grafikon 2. Najveća zabeležena toksičnost izolovanih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u kultivacionom medijumu

4.2.2. Produkcija biomase izolovanih cijanobakterijskih sojeva

Kako bi se stekao uvid u osnovne karakteristike rasta izolovanih cijanobakterijskih sojeva praćen je njihov rast u funkciji vremena i u zavisnosti od prisustva izvora azota u podlozi (Tabela 6). Najveća produkcija biomase nakon sedam nedelja kultivacije zabeležena je kod soja *Nostoc* sp. M1 (941,17 mg/L) (Tabela 6). Slična produkcija biomase je zabeležena kod sojeva *Nostoc* sp. SS1 (920,84 mg/L) i *Nostoc* sp. ZJ1 (907,29 mg/L). Nešto niža biomasa je produkovana od strane sojeva *Nostoc* sp. SS4 (819,78 mg/L), *Nostoc* sp. GP14 (790,99 mg/L), *Nostoc* sp. IRN5D (744,69 mg/L), *Nostoc* sp. R5-2 (736,79 mg/L), *Nostoc* sp. L6-2 (702,35 mg/L). Još šest sojeva je produkovalo biomasu iznad 500 mg/L, *Nostoc* sp. LP4 (643,06 mg/L), *Nostoc* sp. LR7 (620,48 mg/L), *Nostoc* sp. R1 (612,01 mg/L), *Nostoc* sp. LP8-2 (588,30 mg/L), *Nostoc* sp. IRN5K (525,07 mg/L) i *Nostoc* sp. L5 (501,35 mg/L). Za razliku od prethodno navedenih sojeva, ostali sojevi su produkovali znatno nižu biomasu. Biomase sojeva izolovanih iz Irana, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN5I i *Nostoc* sp. IRN8 su iznosile 380,53 mg/L, 309,96 mg/L i 247,29 mg/L. U slučaju sojeva izolovanih iz BLP iz Srbije, *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L2-2 i *Tolypothrix* sp. L4, registrovane su sledeće količine biomase: 139,45 mg/L, 160,91 mg/L i 130,42 mg/L. Najmanju biomasu, ispod 100 mg/L,

produkovala su dva soja poreklom iz Srbije, soj *Nostoc* sp. L6 (57,59 mg/L) i kokalni neheterocistni soj *Chroococidiopsis* sp. L1 (63,80 mg/L).

Tabela 6. Produkcija biomase izolovanih cijanobakterijskih sojeva u funkciji vremena u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi

		BIOMASA mg/L							
Testirani soj	BG11 medijum	Nedelje kultivacije							
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	16.
<i>Chroococidiopsis</i> sp. L1	N+	6,21	18,07	23,71	31,62	39,52	50,81	63,80	144,99
	N-	5,65	18,63	23,71	34,44	19,20	14,11	7,90	0
<i>Nostoc</i> sp. L2	N+	16,37	50,25	55,89	69,44	89,77	112,92	139,45	302,05
	N-	14,68	40,09	44,04	51,94	58,15	77,35	80,74	27,66
<i>Nostoc</i> sp. L2-2	N+	20,33	58,15	65,49	80,17	94,85	124,21	160,91	29,92
	N-	9,60	23,71	28,23	32,75	64,93	66,62	70,57	99,37
<i>Tolypothrix</i> sp. L4	N+	19,20	32,75	45,17	71,14	94,29	119,13	130,42	311,65
	N-	7,90	23,15	27,66	39,52	54,76	77,35	89,20	157,52
<i>Nostoc</i> sp. L5	N+	38,96	138,89	247,29	287,94	358,51	394,65	501,35	2683,48
	N-	18,07	37,26	47,43	58,72	84,12	83,56	76,78	2647,91
<i>Nostoc</i> sp. L6	N+	7,34	14,11	14,68	20,33	22,02	24,28	27,66	52,51
	N-	7,90	19,76	21,45	27,10	43,47	57,59	48,55	7,90
<i>Nostoc</i> sp. L6-2	N+	19,76	54,76	80,17	175,02	314,47	596,77	702,35	2297,30
	N-	12,99	32,18	54,20	79,61	131,55	241,64	329,15	511,52
<i>Nostoc</i> sp. M1	N+	35,00	82,43	120,82	231,48	358,51	559,51	941,17	330,85
	N-	18,07	62,67	97,67	186,88	329,15	475,38	591,69	198,17
<i>Nostoc</i> sp. R1	N+	28,79	67,75	90,90	120,26	221,88	345,53	503,61	1478,09
	N-	25,97	68,88	127,60	201,56	316,17	527,89	612,01	656,61
<i>Nostoc</i> sp. R5-2	N+	44,04	106,71	134,37	198,17	328,59	497,97	736,79	2412,48
	N-	22,02	62,10	103,32	153,00	233,74	413,84	550,47	651,53
<i>Nostoc</i> sp. SS1	N+	42,91	105,58	153,57	256,32	352,30	541,44	920,84	1264,67
	N-	19,76	68,88	92,03	184,62	346,09	516,03	602,41	599,59
<i>Nostoc</i> sp. SS4	N+	48,55	119,69	160,91	288,50	350,04	582,09	819,78	1389,45
	N-	22,58	91,46	147,92	252,93	416,10	677,50	714,77	586,61

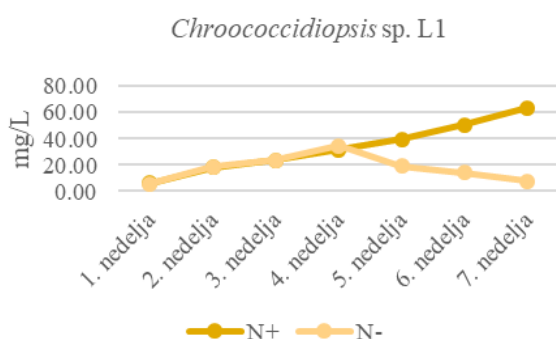
<i>Nostoc</i> sp. GP14	N+	44,04	107,27	147,92	242,77	430,78	626,13	729,45	1835,47
	N-	30,49	78,48	147,92	274,39	435,30	790,99	723,80	905,60
<i>Nostoc</i> sp. LP4	N+	38,39	80,17	97,67	152,44	325,77	429,65	643,06	900,52
	N-	23,71	56,46	111,22	168,25	260,84	457,88	579,27	779,13
<i>Nostoc</i> sp. LP8-2	N+	17,50	41,78	70,01	110,09	159,21	277,78	352,87	909,55
	N-	26,54	66,06	107,27	141,15	262,53	531,84	588,30	626,13
<i>Nostoc</i> sp. LR7	N+	34,44	79,61	108,40	156,39	276,08	442,07	620,48	1295,16
	N-	13,55	60,41	86,38	150,18	271,00	485,54	603,54	658,31
<i>Nostoc</i> sp. ZJ1	N+	51,38	127,60	169,94	265,36	437,55	576,44	907,29	1130,30
	N-	18,07	58,72	114,05	197,04	355,13	471,43	521,11	478,77
<i>Nostoc</i> sp. IRN5D	N+	45,73	119,13	163,17	250,11	429,09	587,17	744,69	1855,80
	N-	27,66	61,54	84,12	117,43	195,35	341,01	404,24	1390,58
<i>Nostoc</i> sp. IRN5I	N+	18,63	50,25	78,10	104,45	160,91	265,36	309,96	2852,29
	N-	6,21	16,37	23,77	42,91	58,72	80,17	98,24	2529,35
<i>Nostoc</i> sp. IRN5K	N+	46,86	145,66	241,65	267,61	364,72	479,90	525,07	2222,78
	N-	3,95	7,34	13,58	18,63	24,28	35,00	44,04	915,76
<i>Nostoc</i> sp. IRN6	N+	15,81	29,36	56,03	99,37	183,49	380,53	363,59	1946,13
	N-	9,60	25,41	38,48	41,21	50,81	59,85	55,89	1225,15
<i>Nostoc</i> sp. IRN8	N+	19,76	42,34	61,12	101,06	146,79	224,71	247,29	3240,73
	N-	9,60	25,41	35,09	54,76	67,19	86,95	115,74	1190,15

Najveće produkcije biomase svakog testiranog soja, za obe testirane podloge, tokom prvih sedam nedelja kultivacije su označene podebljano

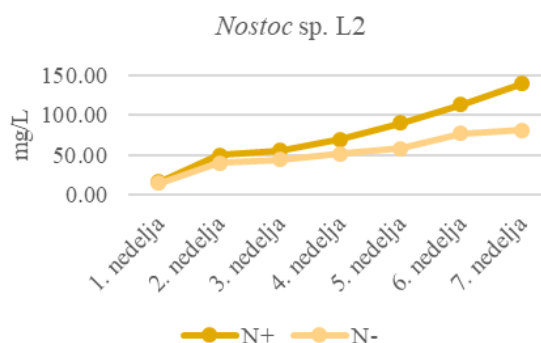
Na grafikonima 3 do 24 prikazane su krive rasta za svaki testirani soj u podlozi BG11 N+ i BG11 N-. Tokom praćenog perioda kultivacije od sedam nedelja primećen je kontinualan rast biomase kod 21 od ukupno 22 testirana soja prilikom kultivacije u medijumu sa NaNO₃ kao izvorom azota (BG11 N+). Jedini soj koji je prilikom kultivacije u podlozi BG11 N+ dostigao maksimalnu produkciju biomase tokom sedam nedelja je *Nostoc* sp. IRN6 (Grafikon 23). Pomenuti soj je maksimalnu produkciju biomase dostigao u šestoj nedelji kultivacije, nakon čega je primećen pad u količini produkovane biomase.

Kultivacija sojeva u podlozi bez izvora azota dovela je do dostizanja maksimalne produkcije biomase tokom sedam nedelja kultivacije kod ukupno pet testiranih sojeva (*Chroococciopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. IRN6)

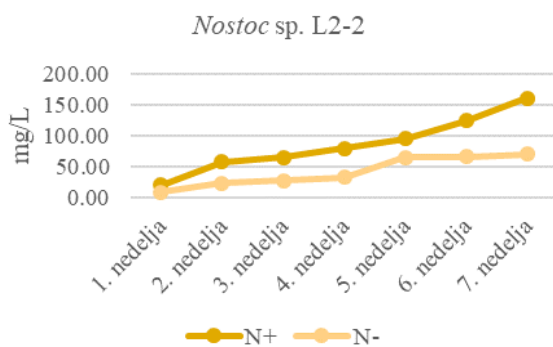
(Grafikon 3, Grafikon 7, Grafikon 8, Grafikon 15, Grafikon 23, redom). Kod tri soja (*Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. IRN6) je dostizanje maksimalne produkcije zabeleženo u šestoj nedelji kultivacije, kod jednog (*Nostoc* sp. L5) u petoj nedelji, dok je najranije dostizanje maksimalne produkcije biomase primećeno kod soja *Chroococidiopsis* sp. L1 u četvrtoj nedelji kultivacije.



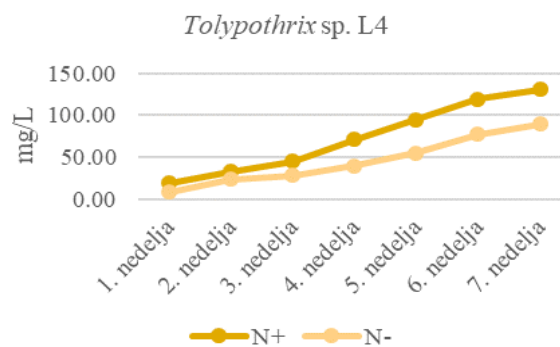
Grafikon 3. Produkcija biomase soja *Chroococidiopsis* L1 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



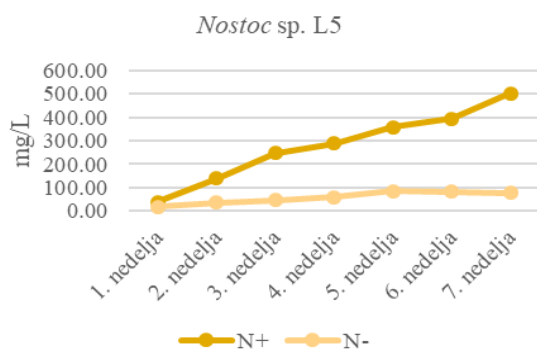
Grafikon 4. Produkcija biomase soja *Nostoc* L2 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



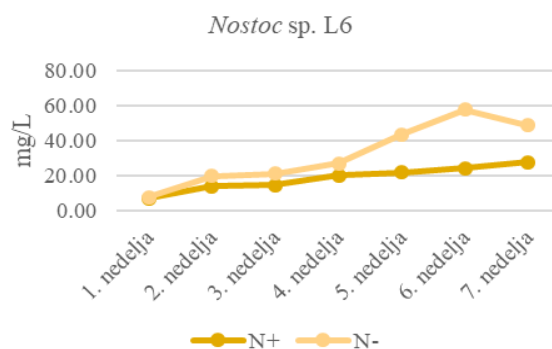
Grafikon 5. Produkcija biomase soja *Nostoc* L2-2 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



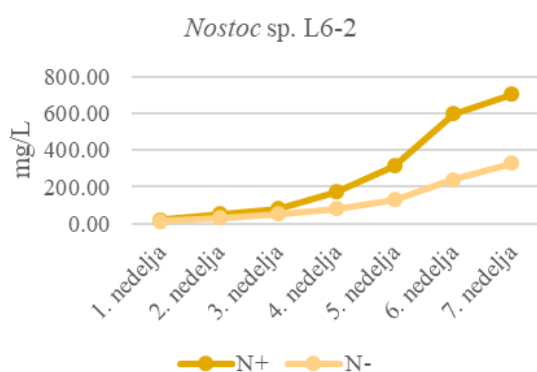
Grafikon 6. Produkcija biomase soja *Tolypothrix* L4 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



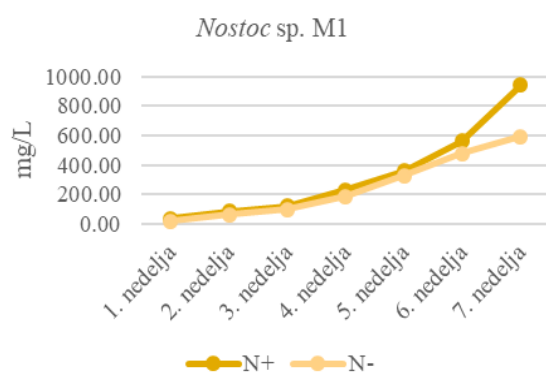
Grafikon 7. Produkcija biomase soja *Nostoc* L5 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



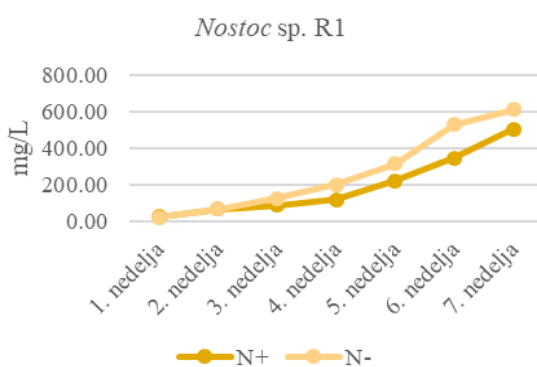
Grafikon 8. Produkcija biomase soja *Nostoc* L6 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



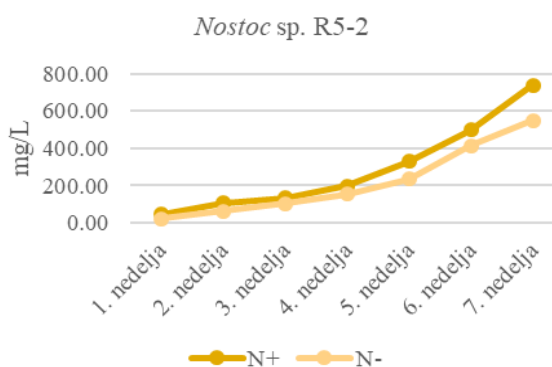
Grafikon 9. Produkcija biomase soja *Nostoc* L6-2 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



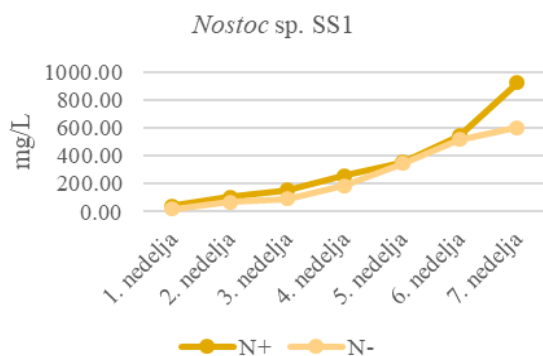
Grafikon 10. Produkcija biomase soja *Nostoc* M1 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



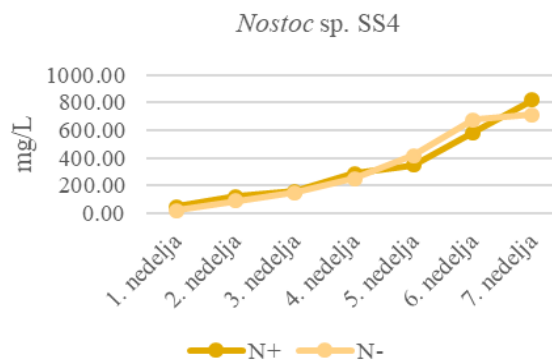
Grafikon 11. Produkcija biomase soja *Nostoc* R1 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



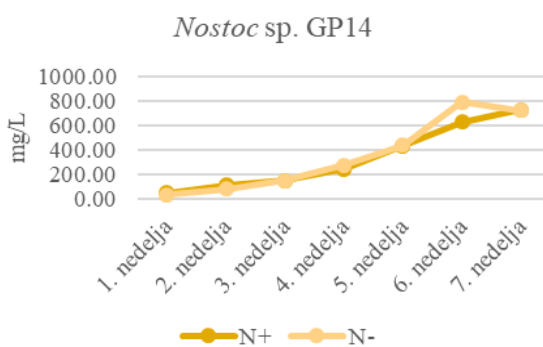
Grafikon 12. Produkcija biomase soja *Nostoc* R5-2 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



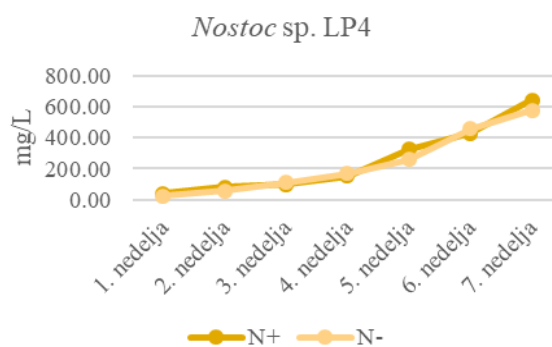
Grafikon 13. Produkcija biomase soja *Nostoc* SS1 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



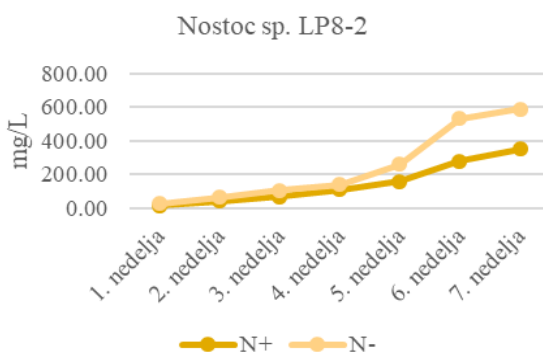
Grafikon 14. Produkcija biomase soja *Nostoc* SS4 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



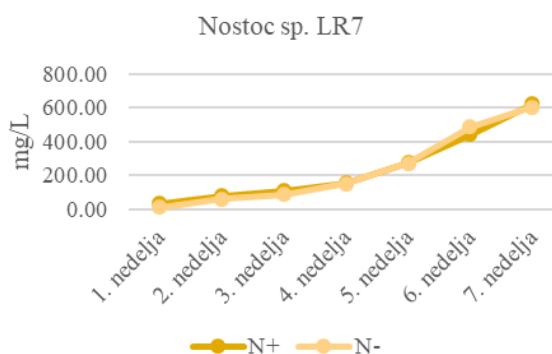
Grafikon 15. Produkcija biomase soja *Nostoc* GP14 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



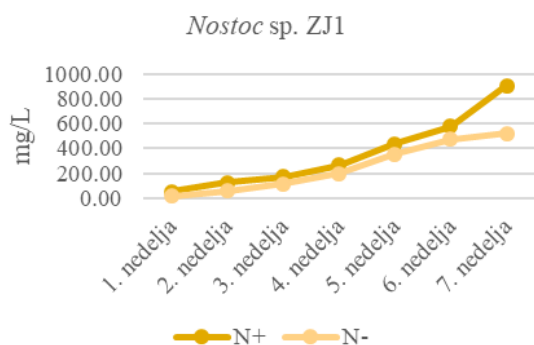
Grafikon 16. Produkcija biomase soja *Nostoc* LP4 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



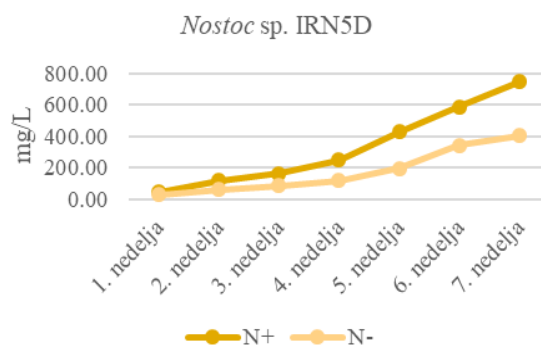
Grafikon 17. Produkcija biomase soja *Nostoc* LP8-2 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



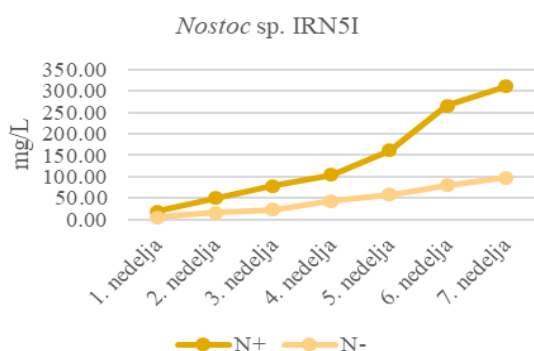
Grafikon 18. Produkcija biomase soja *Nostoc* LR7 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



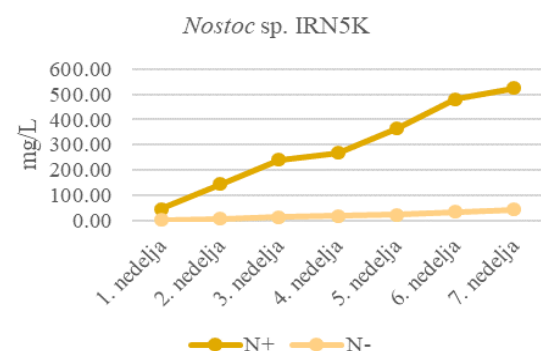
Grafikon 19. Produkcija biomase soja *Nostoc* ZJ1 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



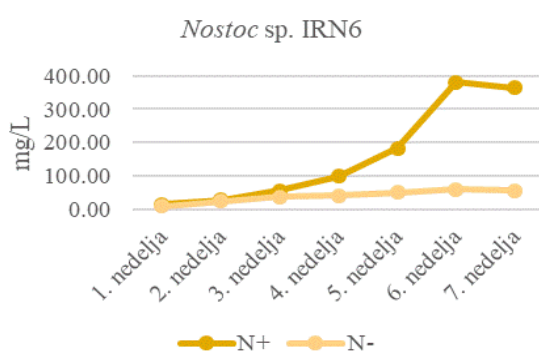
Grafikon 20. Produkcija biomase soja *Nostoc* IRN5D u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



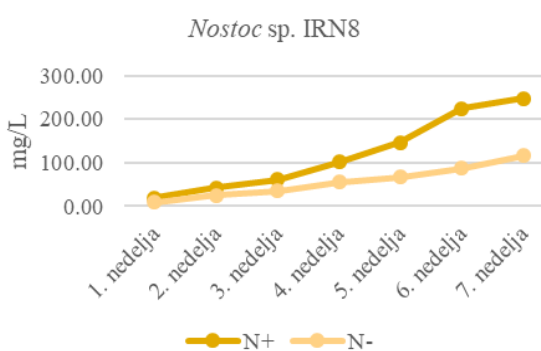
Grafikon 21. Produkcija biomase soja *Nostoc* IRN5I u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



Grafikon 22. Produkcija biomase soja *Nostoc* IRN5K u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



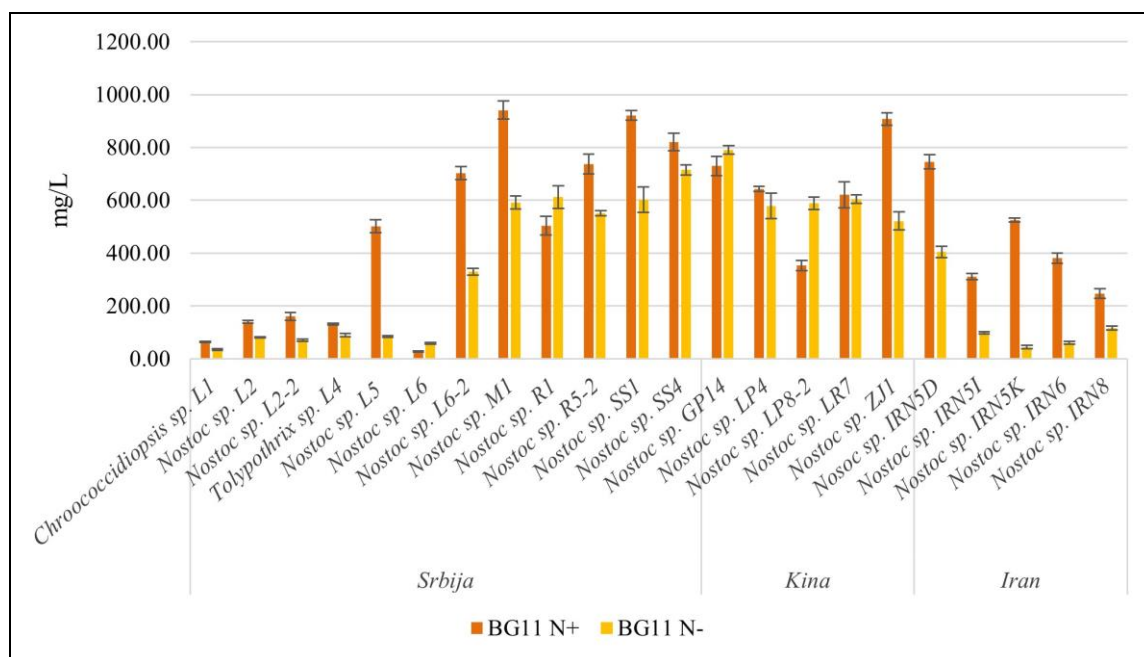
Grafikon 23. Produkcija biomase soja *Nostoc* IRN6 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi



Grafikon 24. Produkcija biomase soja *Nostoc* IRN8 u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi

Uticaj NaNO_3 kao izvora azota na produkciju biomase prikazan je na pojedinačnim grafikonima za svaki ispitivani soj (Grafikoni 3 do 24) i sumiran je za sve sojeve na

grafikonu 25. Prisustvo izvora azota je pospešilo produkciju biomase 16 testiranih sojeva (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L2-2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8). Kod sojeva *Nostoc* sp. LR7 i *Nostoc* sp. LP4 produkcija biomase u podlozi BG11 N+ i BG11 N- bila slična, uz nešto veću količinu produkovane biomase u podlozi sa izvorom azota. Kod soja *Nostoc* sp. GP14 je takođe zabeležena slična produkcija biomase u obe podloge, sa nešto većom produkcijom u podlozi BG11 N-. Sojevi *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. R1 i *Nostoc* sp. LP8-2 su pokazali veću produkciju biomase u podlozi bez izvora azota.

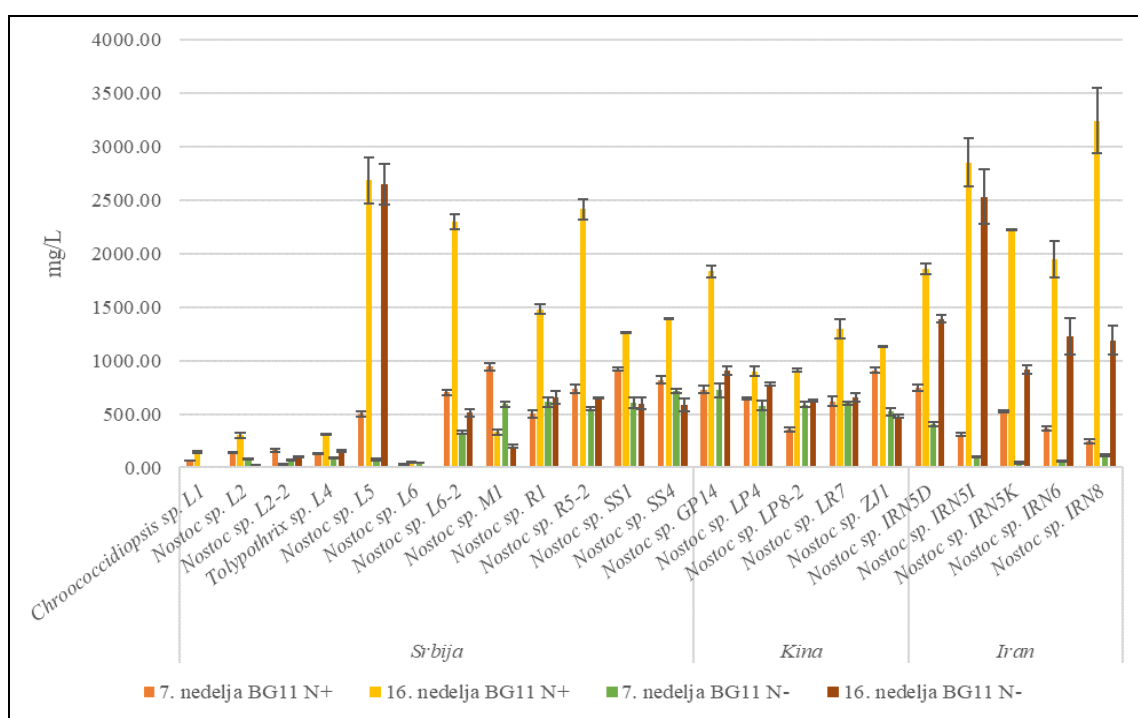


Grafikon 25. Maksimalna produkcija biomase testiranih sojeva tokom sedam nedelja kultivacije u zavisnosti od prisustva/odustva izvora azota u kultivacionom medijumu. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Obzirom da kod većine testiranih sojeva nije zabeležena maksimalna produkcija biomase tokom prvih sedam nedelja kultivacije, izmerena je biomasa i u kulturama starim 16 nedelja (Grafikon 26). Uginuće kultura je zabeleženo kod samo jednog soja, neheterocistnog soja *Chroococcidiopsis* sp. L1, prilikom kultivacije u podlozi BG11 N-. Kod pomenutog soja je u podlozi BG11 N+ uočeno povećanje biomase u 16. nedelji u odnosu na sedmu nedelju kultivacije. 14 testiranih sojeva (*Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2,

Nostoc sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8) je u obe testirane podloge, BG11 N+ i BG11 N-, pokazalo veću produkciju biomase u 16. nedelji kultivacije. Za razliku od njih, kod soja *Nostoc* sp. M1 je došlo do smanjenja biomase između sedme i 16. nedelje kultivacije u obe posmatrane podloge. Kod ostalih sojeva je tip podloge uticao na produkciju biomase između dva posmatrana perioda. Prisustvo NaNO₃ kao izvora azota u podlozi je pospešilo produkciju biomase između sedme i 16. nedelje kultivacije, dok je u podlozi BG11 N- došlo do smanjenja kod sojeva *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4 i *Nostoc* sp. ZJ1. Soj *Nostoc* sp. L2-2 je pokazao obrnuto ponašanje u odnosu na ponašanje prethodno opisanih sojeva.

Povećanje produkcije biomase od čak 34,5 puta, između dva posmatrana kultivaciona perioda, je zabeleženo kod soja *Nostoc* sp. L5 u podlozi BG11 N-. Sojevi *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8 su u istoj podlozi povećali svoju biomasu za 25,7 puta, 20,8 puta, 21,9 puta i 10,3 puta. U podlozi BG11 N+ najveće povećanje biomase je primećeno kod soja *Nostoc* sp. IRN8 (13,1 put). U pomenutoj podlozi, sojevi *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN6 i *Nostoc* sp. L5 su povećali biomasu za 9,2 puta, 5,4 puta i 5,4 puta. Povećanje biomase kod ostalih sojeva, u obe podloge, iznosilo je do 4,2 puta.



Grafikon 26. Produkcija biomase testiranih cijanobakterijskih sojeva u sedmoj i 16. nedelji kultivacije u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Statistička analiza rezultata produkovane biomase nakon sedam i 16 nedelja kultivacije (Tabela 7) pokazuje da analizirani faktori (izolovani soj i sastav mineralne podloge) i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na produkciju biomase izolovanih sojeva starih sedam i 16 nedelja. Od svih navedenih faktora najveći uticaj ima sastav mineralne podloge, odnosno izvor azota u kultivacionom medijumu (MS vrednost).

Tabela 7. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na produkciju biomase u zavisnosti od starosti kultura

	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja kultivacije	Soj	8862942,30	21	422044,87	674,84	<0,000001
	Mineralna podloga	875521,49	1	875521,49	1399,93	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	1120186,18	21	53342,20	85,29	<0,000001
	Greška	55035,50	88	625,40	-	-
16. nedelja kultivacije	Soj	79316641.42	21	3776982.92	391.71	<0,000001
	Mineralna podloga	13445568.48	1	13445568.48	1394.43	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	11665828.83	21	555515.66	57.61	<0,000001
	Greška	848526.47	88	9642.35	-	-

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

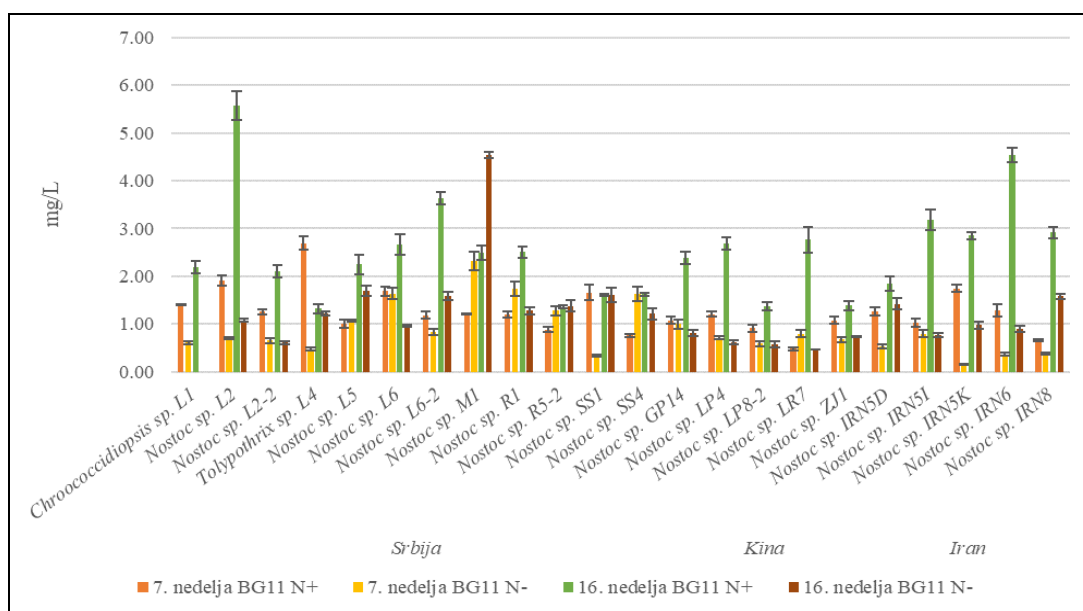
4.2.3. Produkcija polisaharida

Sinteza polisaharida procenjena je kvantitativnim analizama egzopolisaharida i ukupnih polisaharida. Egzopolisaharidi su procenjeni merenjem izlučenih polisaharida. Potencijal izolovanih sojeva u sintezi polisaharida procenjen je na osnovu sledećih rezultata: 1) količine izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida u zapremini uzgajanih kultura; 2) sposobnosti sojeva da izlučuju polisaharide u medijum (udeo izlučenih polisaharida); 3) rezultata specifične produkcije polisaharida svakog pojedinačnog soja (prinos izlučenih polisaharida i prinos ukupnih polisaharida u odnosu na količinu biomase). U cilju ispitivanja uticaja izvora azota (NaNO_3) i perioda kultivacije na sposobnost sinteze polisaharida analize su rađene u kulturama uzgajanim u podlogama BG11 N+ i BG11 N-, u sedmoj i 16. nedelji kultivacije.

4.2.3.1. Količina izlučenih i ukupnih polisaharida

Količina izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu izolovanih sojeva, u zavisnosti od prisustva nitrata u podlozi i perioda kultivacije, prikazana je na grafikonu 27. Najveća količina u prvom kultivacionom periodu (sedmoj nedelji kultivacije) zabeležena je kod soja *Tolypothrix* sp. L4 u podlozi BG11 N+ (2,70 mg/L), zatim kod soja *Nostoc* sp. M1 u podlozi BG11 N- (2,32 mg/L). Ostali sojevi nisu produkovali više od 2 mg/L izlučenih polisaharida u sedmoj nedelji kultivacije. Prisustvo izvora azota je stimulisalo produkciju veće količine izlučenih polisaharida kod 16 testiranih sojeva, dok je kod šest sojeva produkcija veće količine izlučenih polisaharida u medijumu bila stimulisana odsustvom izvora azota u podlozi.

Nakon 16 nedelja kultivacije soj *Nostoc* sp. L2 je produkovao najveću količinu izlučenih polisaharida (5,58 mg/L) prilikom kultivacije u podlozi BG11 N+, što predstavlja i najveću izmerenu količinu izlučenih polisaharida u ovoj studiji. Sledeći po količini izlučenih polisaharida su bili sojevi *Nostoc* sp. M1 u podlozi BG11 N- i *Nostoc* sp. IRN6 u podlozi BG11 N+. Oba soja su produkovala 4,54 mg/L izlučenih polisaharida. Količina izlučenih polisaharida je samo kod jednog soja bila veća u podlozi BG11 N- (*Nostoc* sp. M1). Soj *Nostoc* sp. SS1 je produkovao istu količinu izlučenih polisaharida u obe podloge, dok je soj *Nostoc* sp. R5-2 produkovao sličnu količinu sa neznatno više u podlozi bez izvora azota. U podlozi BG11 N- je bilo onemogućeno pratiti produkciju izlučenih polisaharida kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 zbog uginuća kultura. Količina izlučenih polisaharida kod ostalih sojeva (18 sojeva) je bila stimulisana prisustvom izvora azota u podlozi.



Grafikon 27. Količina izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu testiranih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi i starosti kulture. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Statistička analiza podataka količine izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu (Tabela 8) pokazuje da svi analizirani faktori, pojedinačni sojevi, sastav mineralne podloge i njihova interakcija, imaju statistički značajan uticaj na količinu izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu. MS vrednost ukazuje da od svih analiziranih faktora, najveći uticaj ima kultivacioni medijum, odnosno prisustvo izvora azota u podlozi za kultivaciju.

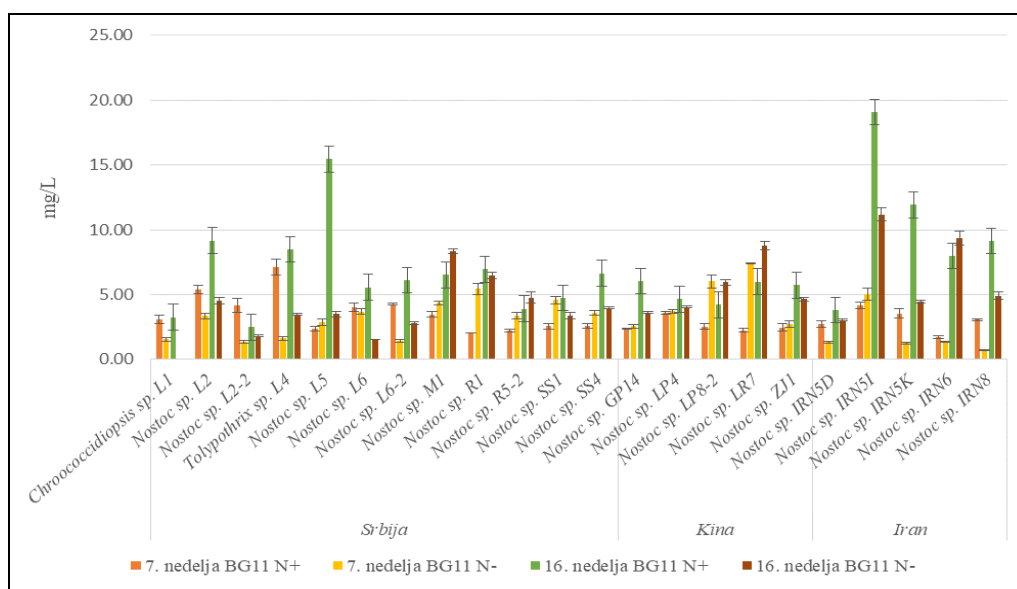
Tabela 8. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na količinu izlučenih polisaharida u zavisnosti od starosti kultura

	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja kultivacije	Soj	12,79	21	0,61	90,93	<0,000001
	Mineralna podloga	4,68	1	4,68	699,53	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	19,87	21	0,95	141,27	<0,000001
	Greška	0,59	88	0,01	-	-
16. nedelja kultivacije	Soj	58,33	21	2,78	194,35	<0,000001
	Mineralna podloga	58,43	1	58,43	4088,09	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	59,09	21	2,81	196,87	<0,000001
	Greška	1,26	88	0,01	-	-

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

Količina ukupnih polisaharida u kulturama izolovanih sojeva, u zavisnosti od prisustva nitrata kao izvora azota u mineralnoj podlozi i perioda kultivacije, prikazana je na grafikonu 28. Nakon sedam nedelja kultivacije odsustvo izvora azota u podlozi je stimulisalo veću količinu ukupnih polisaharida kod 12 testiranih sojeva. Kod preostalih 10 sojeva, prisustvo izvora azota u podlozi je dovelo do produkcije veće količine ukupnih polisaharida u kultivacionom medijumu. Količina ukupnih polisaharida kod soja *Tolypothrix* sp. L4 je bila srazmerna količini izlučenih polisaharida nakon sedam nedelja kultivacije, produkujući najviše ukupnih polisaharida u podlozi BG11 N+ (7,11 mg/L). Najviše ukupnih polisaharida u podlozi BG11 N-, u istom kultivacionom periodu, izmereno je kod soja *Nostoc* sp. LR7 (7,14 mg/L). Kod većine sojeva je količina ukupnih polisaharida u prvom kultivacionom periodu bila ispod 5 mg/L. Sojevi koji su produkovali ukupne polisaharide iznad pomenute količine, osim već navedenih sojeva, su *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. LP8-2 i *Nostoc* sp. IRN5I.

Nakon 16 nedelja kultivacije najviše ukupnih polisaharida u podlogama BG11 N+ i BG11 N- je izmereno kod soja *Nostoc* sp. IRN5I (19,08 mg/L i 11,18 mg/L, redom). Približnu količinu su ostvarila još dva soja u podlozi BG11 N+, *Nostoc* sp. L5 (15,45 mg/L) i *Nostoc* sp. IRN5K (11,94 mg/L). Kod većine sojeva (16 sojeva) je nakon 16 nedelja kultivacije zabeležena veća količina ukupnih polisaharida u podlozi BG11 N+, dok je pet sojeva veću količinu dostiglo u podlozi BG11 N-. Kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 je bilo onemogućeno meriti količinu ukupnih polisaharida nakon 16 nedelja kultivacije zbog uginuća kultura.



Grafikon 28. Količina ukupnih polisaharida u kultivacionom medijumu testiranih cijanobakterijskih sojeva zavisno od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi i starosti kulture. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Iz rezultata statističke analize podataka (Tabela 9) se može videti da analizirani faktori (pojedinačni sojevi, sastav mineralne podloge i njihova interakcija) imaju statistički značajan uticaj na količinu ukupnih polisaharida u kulturama testiranih sojeva. Međutim, MS vrednosti (Tabela 9) pokazuju da je sastav mineralne podloge (izvor azota u medijumu) imao najmanji uticaj kod mlađih kultura (7. nedelja kultivacije), dok je u starijim kulturama (16. nedelja kultivacije) imao najveći uticaj na količinu ukupnih polisaharida u cijanobakterijskim kulturama.

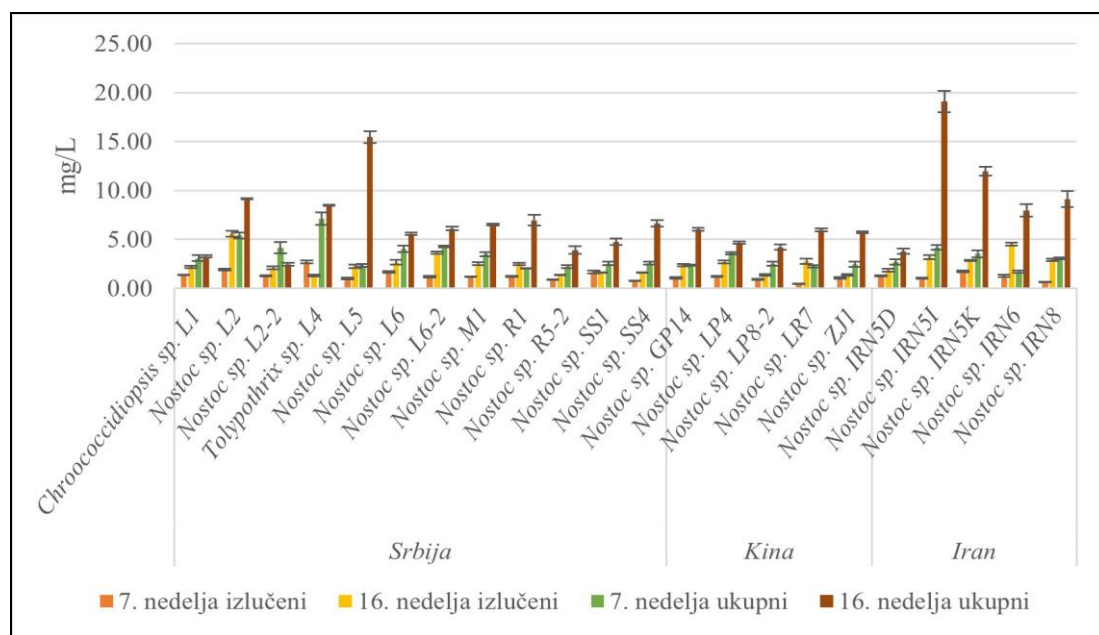
Tabela 9. Dvosmerna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na količinu ukupnih polisaharida u zavisnosti od starosti kultura

	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja kultivacije	Soj	115,59	21	5,50	83,40	<0,000001
	Mineralna podloga	0,37	1	0,37	5,69	0,019242
	Soj i tip mineralne podloge	185,94	21	8,85	134,16	<0,000001
	Greška	5,81	88	0,07	-	-
16. nedelja kultivacije	Soj	1050,69	21	50,03	427,85	<0,000001
	Mineralna podloga	193,46	1	193,46	1654,38	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	403,51	21	19,21	164,31	<0,000001
	Greška	10,29	88	0,12	-	-

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

Promene u količini izlučenih i ukupnih polisaharida između dva posmatrana perioda kultivacije, u zavisnosti od prisustva izvora azota u mineralnoj podlozi, prikazane su na grafikonu 29 (podloga BG11 N+) i grafikonu 30 (podloga BG11 N-).

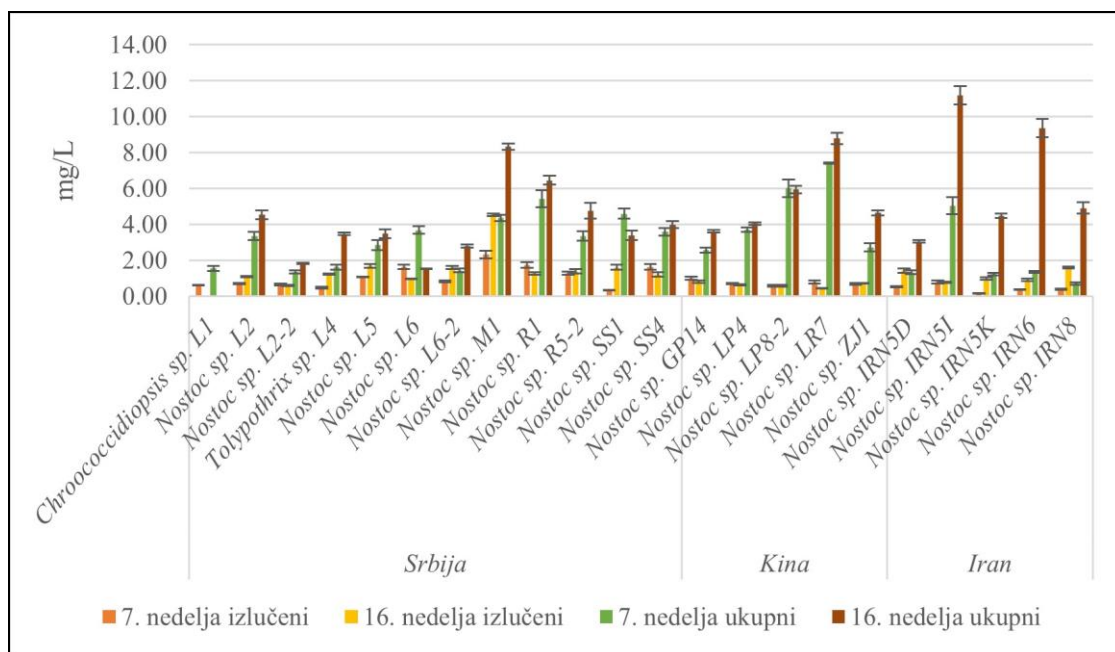
Kultivacija sojeva u podlozi BG11 N+ je pokazala povećanje količine izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida između dva kultivaciona perioda kod 19 testiranih sojeva. Izuzetak su bili sojevi *Nostoc* sp. L2-2, *Tolypothrix* sp. L4 i *Nostoc* sp. SS1. U kulturama sojeva *Tolypothrix* sp. L4 i *Nostoc* sp. SS1 je došlo do smanjenja količine izlučenih polisaharida, a povećanja količine ukupnih polisaharida. Kod soja *Nostoc* sp. L2-2 uočeno je smanjenje ukupnih polisaharida između dva kultivaciona perioda, a povećanje izlučenih polisaharida.



Grafikon 29. Količina izlučenih i ukupnih polisaharida u kulturama testiranih sojeva u podlozi BG11 N+ u dva kultivaciona perioda (sedma i 16. nedelja). Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Prilikom kultivacije sojeva u podlozi BG11 N- uočeno je povećanje količine izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida između dva posmatrana perioda kultivacije kod 11 sojeva, dok je jedan soj (*Nostoc* sp. L6) pokazao smanjenje obe vrste polisaharida. Izmerene količine izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida soja *Nostoc* sp. LP8-2 su bile slične u oba posmatrana kultivaciona perioda, sa blagim smanjenjem u 16. nedelji kultivacije. Kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 je bilo onemogućeno meriti količinu polisaharida u 16. nedelji kultivacije u podlozi BG11 N- obzirom da je došlo do uginuća kultura. Promene količine

ukupnih polisaharida i izlučenih polisaharida između dva kultivaciona perioda nisu bile srazmerne kod ostalih sojeva. Kod nekih sojeva je uočeno povećanje ukupnih polisaharida ali smanjenje količine izlučenih polisaharida (*Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5I). Kod soja *Nostoc* sp. SS1 je zabeleženo smanjenje ukupnih polisaharida, ali je došlo do povećanja izlučenih polisaharida.



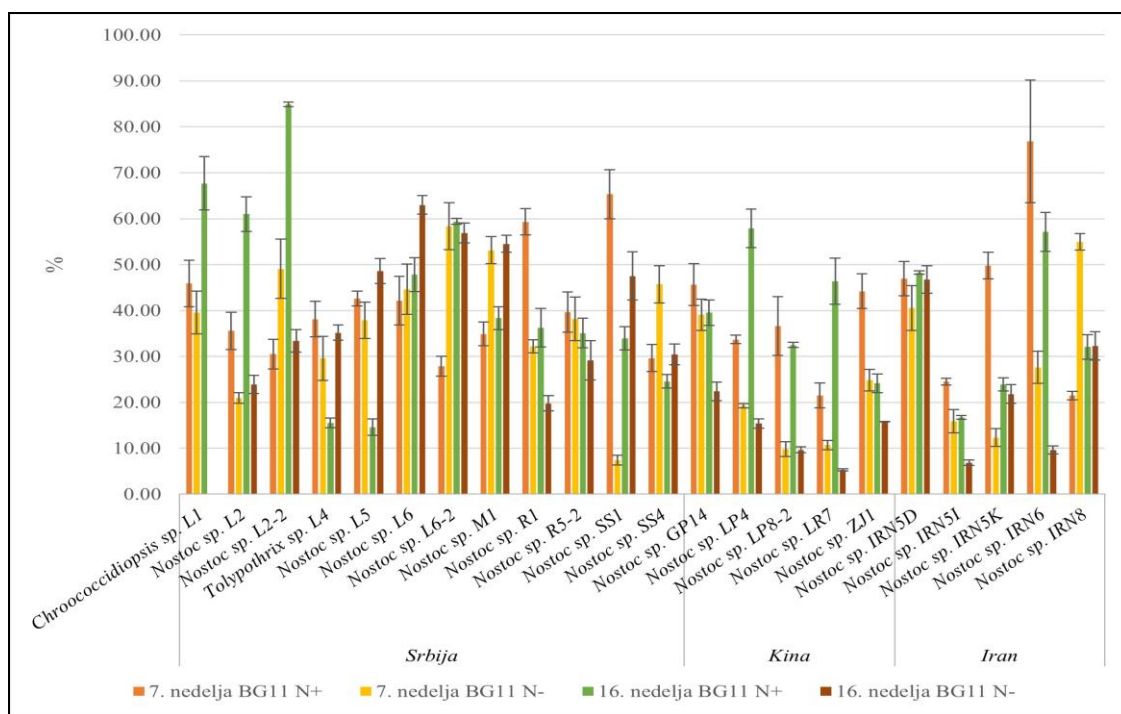
Grafikon 30. Količina izlučenih i ukupnih polisaharida u kulturama testiranih sojeva u podlozi BG11 N- u dva kultivaciona perioda (sedma i 16. nedelja). Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

4.2.3.2. Udeo izlučenih polisaharida

Potencijal testiranih sojeva da produkuju egzopolisaharide procenjen je i na osnovu udela izlučenih polisaharida u ukupnoj količini polisaharida (%), u zavisnosti od tipa podloge i starosti kulture (Grafikon 31). Prisustvo izvora azota u podlozi je dovelo do izlučivanja veće količine polisaharida, u oba posmatrana kultivaciona perioda, kod 12 testiranih sojeva (*Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6). Veću sposobnost izlučivanja polisaharida u podlozi BG11 N-, u oba posmatrana perioda, su pokazala četiri testirana soja (*Nostoc* sp. L6,

Nostoc sp. M1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. IRN8). Na udeo izlučenih polisaharida kod ostalih sojeva je pored prisustva izvora azota u podlozi uticala i starost kulture. Udeo izlučenih polisaharida soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 u prvom kultivacionom periodu je bio veći u podlozi BG11 N+, dok kasnije to nije bilo moguće porediti zbog uginuća kultura gajenih u podlozi BG11 N-. Kod tri soja (*Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. SS1) je udeo izlučenih polisaharida bio veći u podlozi BG11 N+ u sedmoj nedelji kultivacije, dok je u starijim kulturama (16. nedelja kultivacije) taj udeo bio veći u podlozi BG11 N-. Nasuprot njima, sojevi *Nostoc* sp. L2-2 i *Nostoc* sp. L6-2 su prvobitno pokazali veću sposobnost izlučivanja u podlozi BG11 N-, dok je kasnije taj udeo bio veći u podlozi BG 11 N+.

Udeo izlučenih polisaharida u ukupnim polisaharidima veći od 50% pokazalo je šest sojeva nakon sedam nedelja kultivacije (*Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8), dok je nakon 16 nedelja kultivacije tu sposobnost pokazalo osam sojeva (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. IRN6).



Grafikon 31. Udeo izlučenih polisaharida u ukupnoj količini polisaharida testiranih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odusustva izvora azota u podlozi i starosti kultura. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Statistički rezultati prikazani u tabeli 10 pokazuju da su p -vrednosti za analizirane faktore i njihovu međusobnu interakciju niže od 0,05, što ukazuje da pojedinačni sojevi,

sastav mineralne podloge (izvor azota) i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na udeo izlučenih polisaharida u ukupnoj količini polisaharida. Takođe, iz iste tabele MS vrednosti pokazuju da najveći uticaj na udeo izlučenih polisaharida ima sastav mineralne podloge, odnosno prisustvo izvora azota u kultivacionom medijumu.

Tabela 10. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na udeo izlučenih polisaharida u zavisnosti od starosti kultura

		Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja	kultivacije	Soj	10250,71	21	488,13	28,97	<0,000001
		Mineralna podloga	2236,33	1	2236,33	132,74	<0,000001
		Soj i tip mineralne podloge	17002,16	21	809,63	48,06	<0,000001
		Greška	1482,57	88	16,85	-	-
16. nedelja	kultivacije	Soj	20078,49	21,00	956,12	137,85	<0,000001
		Mineralna podloga	4952,45	1	4952,45	714,02	<0,000001
		Soj i tip mineralne podloge	21925,93	21,00	1044,09	150,53	<0,000001
		Greška	610,37	88,00	6,94	-	-

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

4.2.3.3. Prinos ukupnih i izlučenih polisaharida

Izračunata je specifična produkcija polisaharida svakog soja, u podlogama BG11 N+ i BG11 N-, u dva kultivaciona perioda (Tabela 11). Specifična produkcija polisaharida predstavljena je kao prinos izlučenih polisaharida i prinos ukupnih polisaharida po jedinici biomase.

Tabela 11. Prinos izlučenih polisaharida i ukupnih polisaharida testiranih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi i starosti kulture

Testirani soj	Prinos polisaharida mg/g biomase				
	BG11 medijum	Izlučeni polisaharidi		Ukupni polisaharidi	
		7. nedelja	16. nedelja	7. nedelja	16. nedelja
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. L1	N+	22,08	15,22	48,33	22,60
	N-	77,95	-	198,43	-

Značaj i uloga terestričnih cijanobakterija u semi-aridnim sredinama

<i>Nostoc</i> sp. L2	N+	13,70	18,63	38,71	30,46
	N-	8,66	38,97	41,40	164,05
<i>Nostoc</i> sp. L2-2	N+	7,83	70,67	25,94	83,25
	N-	9,30	6,10	19,13	18,37
<i>Tolypothrix</i> sp. L4	N+	20,66	4,23	54,56	27,25
	N-	5,34	7,76	18,26	22,12
<i>Nostoc</i> sp. L5	N+	1,98	0,85	4,66	5,77
	N-	14,02	0,64	37,18	1,32
<i>Nostoc</i> sp. L6	N+	61,34	50,88	146,51	106,61
	N-	33,72	122,31	75,97	193,73
<i>Nostoc</i> sp. L6-2	N+	1,69	1,58	6,07	2,66
	N-	2,53	3,12	4,35	5,49
<i>Nostoc</i> sp. M1	N+	1,29	7,58	3,69	19,72
	N-	3,91	22,97	7,37	42,19
<i>Nostoc</i> sp. R1	N+	2,41	1,70	4,05	4,70
	N-	2,86	1,95	8,87	9,90
<i>Nostoc</i> sp. R5-2	N+	1,19	0,56	3,02	1,61
	N-	2,32	2,11	6,12	7,32
<i>Nostoc</i> sp. SS1	N+	1,80	1,27	2,76	3,75
	N-	0,56	2,68	7,68	5,70
<i>Nostoc</i> sp. SS4	N+	0,93	1,17	3,15	4,78
	N-	2,29	2,07	5,02	6,82
<i>Nostoc</i> sp. GP14	N+	1,48	1,30	3,25	3,29
	N-	1,40	0,89	3,58	4,00
<i>Nostoc</i> sp. LP4	N+	1,88	2,99	5,57	5,18
	N-	1,24	0,80	6,43	5,19
<i>Nostoc</i> sp. LP8-2	N+	2,58	1,51	7,18	4,64
	N-	1,00	0,92	10,21	9,50
<i>Nostoc</i> sp. LR7	N+	0,78	2,14	3,62	4,63
	N-	1,31	0,71	12,29	13,36
<i>Nostoc</i> sp. ZJ1	N+	1,19	1,22	2,70	5,07
	N-	1,29	1,53	5,25	9,69

<i>Nostoc</i> sp. IRN5D	N+	1,71	0,99	3,65	2,05
	N-	1,32	1,02	3,27	2,19
<i>Nostoc</i> sp. IRN5I	N+	3,31	1,12	13,50	6,71
	N-	8,06	0,30	51,25	4,45
<i>Nostoc</i> sp. IRN5K	N+	3,32	1,28	6,70	5,37
	N-	3,48	1,06	28,68	4,89
<i>Nostoc</i> sp. IRN6	N+	3,54	2,34	4,66	4,10
	N-	6,63	0,74	23,99	7,74
<i>Nostoc</i> sp. IRN8	N+	2,65	0,90	12,40	2,82
	N-	3,34	1,34	6,10	4,16

Rezultati pokazuju da je odsustvo izvora azota u mineralnoj podlozi stimulisalo prinos izlučenih polisaharida kod 14 testiranih sojeva starosti sedam nedelja (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8). Prisustvo azota je, u istom kultivacionom periodu, stimulisalo prinos izlučenih polisaharida kod osam testiranih sojeva (*Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2 i *Nostoc* sp. IRN5D). Nakon 16 nedelja kultivacije opisani obrazac prinosa izlučenih polisaharida je ostao isti kod 10 sojeva (*Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN8). Jedan soj je skoro izjednačio svoj prinos u testiranim podlogama (*Nostoc* sp. IRN5D), dok je kod jednog soja (*Chroococcidiopsis* sp. L1) usled uginuća kulture bilo onemogućeno izmeriti prinos izlučenih polisaharida u mineralnoj podlozi bez azota u 16. nedelji kultivacije. Kod ostalih 10 sojeva uočen je suprotan obrazac ponašanja nego u sedmoj nedelji kultivacije-sojevi koji su pokazali veći prinos izlučenih polisaharida u podlozi BG11 N+ u sedmoj nedelji kultivacije, u 16. nedelji je taj prinos bio veći u podlozi BG11 N-, i obrnuto.

Rezultati prinosa izlučenih polisaharida pokazuju da je kod tri testirana soja (*Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. ZJ1) došlo do porasta prinosa u periodu između sedme i 16. nedelje kultivacije u oba kultivaciona medijuma. Kod mnogo više sojeva, 10 sojeva, uočen je pad prinosa izlučenih polisaharida u oba medijuma između dva pomenuta kultivaciona perioda (*Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. GP14,

Nostoc sp. LP8-2, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8). Na prinos izlučenih polisaharida ostalih sojeva u periodu između dva termina kultivacije je uticalo prisustvo izvora azota u kultivacionoj podlozi. Četiri soja (*Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LR7) su u podlozi BG11 N+ pokazala povećanje prinosa izlučenih polisaharida, dok su isti sojevi u podlozi BG11 N- pokazali smanjenje prinosa sa produženom kultivacijom. Za razliku od ova četiri soja, kod preostala četiri soja (*Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. SS1) je uočen suprotan obrazac ponašanja. Kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 došlo je do smanjenja prinosa izlučenih polisaharida u podlozi BG11 N+ između dva kultivaciona perioda.

Statistička analiza rezultata prinosa izlučenih polisaharida (Tabela 12) pokazuje da su pojedinačni sojevi, sastav mineralne podloge (izvor azota) i interakcija ova dva faktora imali statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) na prinos izlučenih polisaharida u oba testirana kultivaciona perioda. Srednje vrednosti kvadrata (MS) pokazuju da je prinos izlučenih polisaharida soj-specifičan.

Tabela 12. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na prinos izlučenih polisaharida u zavisnosti od starosti kultura

	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja kultivacije	Soj	23408,58	21	1114,69	393,24	<0,000001
	Mineralna podloga	75,08	1	75,08	26,49	0,000002
	Soj i tip mineralne podloge	6436,17	21	306,48	108,12	<0,000001
	Greška	249,45	88	2,83	-	-
16. nedelja kultivacije	Soj	49511,93	21	2357,71	229,05	<0,000001
	Mineralna podloga	60,82	1	60,82	5,91	0,017101
	Soj i tip mineralne podloge	15215,71	21	724,56	70,39	<0,000001
	Greška	905,84	88	10,29	-	-

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

Odsustvo azota u medijumu je stimulisalo prinos ukupnih polisaharida kod 16 testiranih sojeva starosti sedam nedelja (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6). Prisustvo NaNO_3 kao izvora azota je stimulisalo prinos ukupnih polisaharida kod šest sojeva (*Nostoc* sp. L2-2,

Tolypothrix sp. L4, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN8). U kulturama starim 16 nedelja, isti uticaj azota na prinos ukupnih polisaharida kao u sedmoj nedelji kultivacije uočen je kod 14 testiranih sojeva, s tim da je primećeno skoro izjednačenje prinosa ukupnih polisaharida soja *Nostoc* sp. LP4. Kod sedam sojeva je uočen suprotan efekat prisustva izvora azota u podlozi na prinos ukupnih polisaharida nego u sedmoj nedelji kultivacije.

Prinos ukupnih polisaharida između dva kultivaciona perioda testiranih sojeva je porastao u oba kultivaciona medijuma kod šest sojeva (*Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. ZJ1), dok je kod sedam sojeva uočen pad (*Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8). Na promenu prinosa ukupnih polisaharida kod ostalih sojeva uticalo je prisustvo azota u medijumu. Porast u podlozi BG11 N+, a pad u podlozi BG11 N- je izmeren kod sojeva *Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. SS1, dok je suprotno ponašanje primećeno kod sojeva *Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. R5-2. Kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 došlo je do smanjenja prinosa ukupnih polisaharida u podlozi BG11 N+ između dva kultivaciona perioda.

Statistička analiza rezultata (Tabela 13) pokazuje da pojedinačni sojevi, sastav mineralne podloge (izvor azota) i njihova interakcija statistički značajno utiču na prinos ukupnih polisaharida ($p < 0,05$). Od svih navedenih faktora najznačajniji uticaj ima specifičnost cijanobakterijskog soja (MS vrednost).

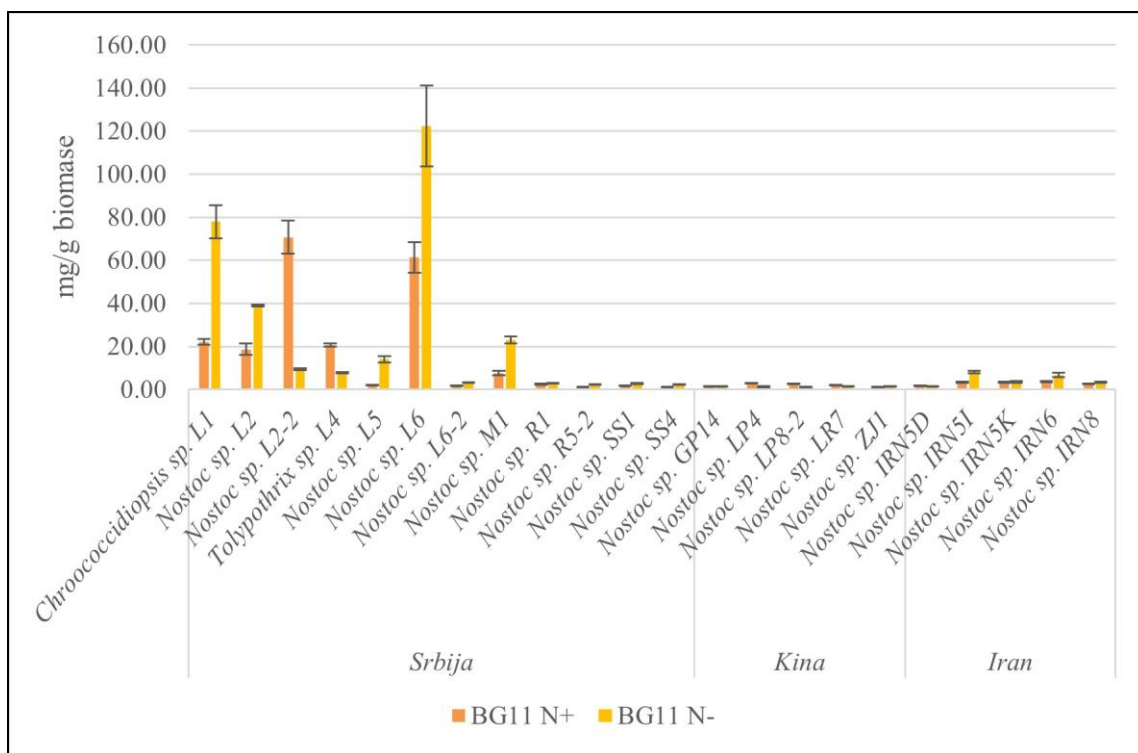
Tabela 13. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na prinos ukupnih polisaharida u zavisnosti od starosti kultura

	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja kultivacije	Soj	134801,17	21	6419,10	228,71	<0,000001
	Mineralna podloga	2115,29	1	2115,29	75,37	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	46524,43	21	2215,45	78,93	<0,000001
	Greška	2469,87	88	28,07	-	-
16. nedelja kultivacije	Soj	165543,80	21	7883,04	361,64	<0,000001
	Mineralna podloga	2337,48	1	2337,48	107,23	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	44050,44	21	2097,64	96,23	<0,000001
	Greška	1918,21	88	21,80	-	-

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

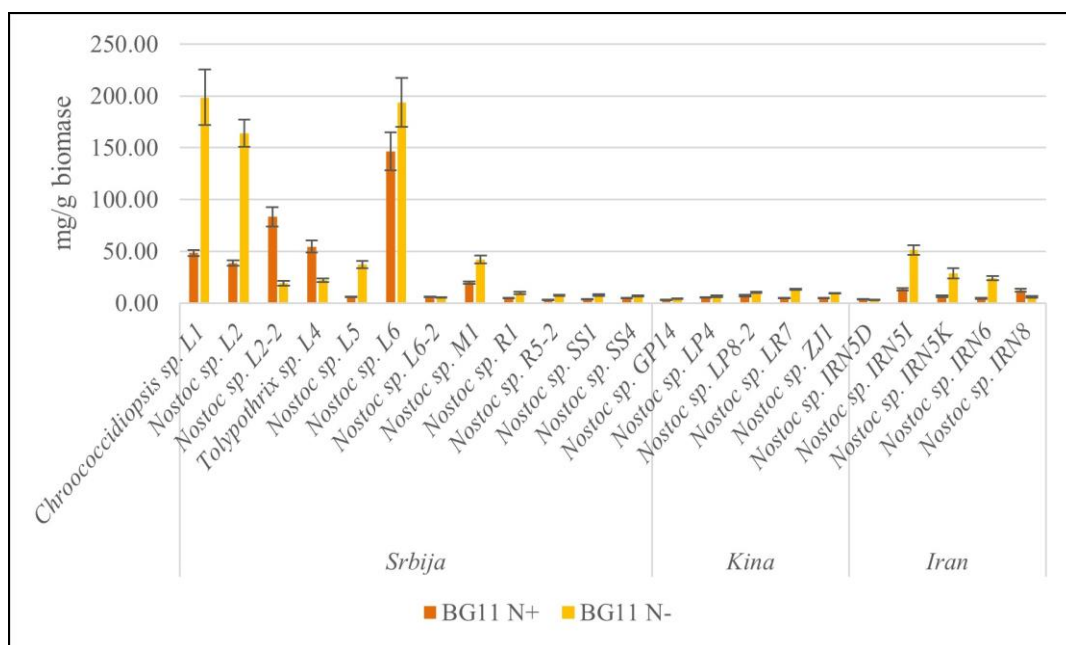
Prema prinosu izlučenih polisaharida (Grafikon 32) i ukupnih polisaharida (Grafikon 33) najznačajniji sojevi su *Chroococcidiopsis* sp. L1 i *Nostoc* sp. L2 u podlozi BG11 N-, *Nostoc* sp. L2-2 u podlozi BG11 N+ i *Nostoc* sp. L6 u obe podloge. Sojevi *Tolythrix* sp. L4 i *Nostoc* sp. IRN5I su se istakli po prinosu ukupnih polisaharida u podlogama BG11 N+ i BG11 N-, redom.

Najveći ostvareni prinosi izlučenih polisaharida svakog soja u zavisnosti od prisustva izvora azota u podlozi, nezavisno od starosti kultura, su prikazani na grafikonu 32. Prinos soja *Nostoc* sp. L6 u podlozi BG11 N- (120,77 mg/g biomase) je najveći zabeleženi prinos izlučenih polisaharida u ovoj studiji. Sojevi *Chroococcidiopsis* sp. L1 u podlozi BG11 N- (77,35 mg/g biomase) i *Nostoc* sp. L2-2 u podlozi BG11 N+ (70,39 mg/g biomase) su bili sledeći po prinosu izlučenih polisaharida. Nešto niže prinose su postigli *Nostoc* sp. L6 u podlozi BG11 N+ (60,95 mg/g biomase) i *Nostoc* sp. L2 (38,96 mg/g biomase) u podlozi BG11 N-. Kod ostalih sojeva je prinos izlučenih polisaharida bio malo iznad 20 mg/g biomase (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Tolythrix* sp. L4 u podlozi BG11 N+ i *Nostoc* sp. M1 u podlozi BG11 N-) ili niži od 20 mg/g biomase.



Grafik 32. Najveći prinosi izlučenih polisaharida testiranih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Najveći prinos ukupnih polisaharida zabeležen je kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 (196,62 mg/g biomase), a zatim kod soja *Nostoc* sp. L6 (191,79 mg/g biomase) u podlogama BG11 N- (Grafikon 33). Sledeći po prinosu su bili sojevi *Nostoc* sp. L2 u podlozi BG11 N- (163,78 mg/g biomase) i *Nostoc* sp. L6 u podlozi BG11 N+ (145,61 mg/g biomase). Soj *Nostoc* sp. L2-2 je postigao prinos od 82,91 mg/g biomase u podlozi BG11 N+. Kod sojeva *Tolythrix* sp. L4 (BG11 N+) i *Nostoc* sp. IRN5I (BG11 N-) su zabeleženi prinosi od 54,49 i 51,25 mg/g biomase. Ostali sojevi su ostvarili niži prinos ukupnih polisaharida.



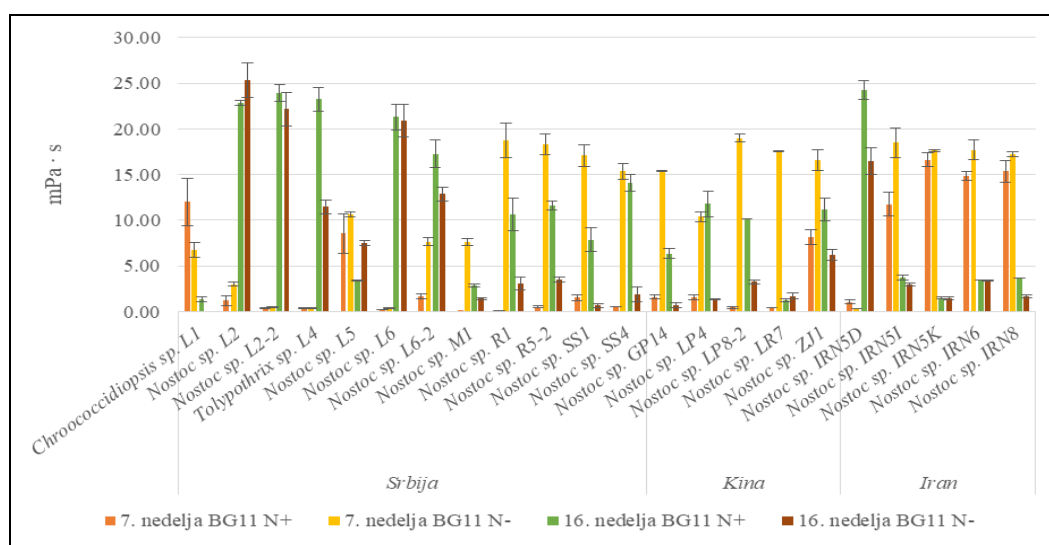
Grafikon 33. Najveći prinosi ukupnih polisaharida testiranih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u podlozi. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

4.2.4. Viskozitet medijuma

Viskozitet medijuma kao posledica aktivnosti ćelija izolovanih sojeva u zavisnosti od prisustva izvora azota u mineralnoj podlozi i perioda kultivacije je prikazan na grafikonu 34. U prvom kultivacionom periodu (sedma nedelja kultivacije) kod većine sojeva (18 sojeva) je uočen veći viskozitet u podlozi BG11 N-. Kod dva soja (*Nostoc* sp. L2-2 i *Tolythrix* sp. L4) je viskozitet bio sličan u oba medijuma, ali sa nešto višim vrednostima u podlozi bez izvora azota. Veći viskozitet u podlozi BG11 N+ su imali sojevi *Chroococcidiopsis* sp. L1 i *Nostoc* sp. IRN5D. Najveći viskozitet u sedmoj nedelji kultivacije je izmeren u podlozi bez izvora azota, u kulturi soja *Nostoc* sp. LP8-2 (18,99 mPa·s). Malo

niže vrednosti viskoziteta su uočene kod sojeva *Nostoc* sp. R1 (18,76 mPa·s), *Nostoc* sp. IRN5I (18,53 mPa·s) i *Nostoc* sp. R5-2 (18,34 mPa·s), u istom medijumu. U slučaju još šest sojeva (*Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN6) u podlozi BG11 N- je izmereni viskozitet bio veći od 15 mPa·s, dok su dva soja (*Nostoc* sp. IRN5K i *Nostoc* sp. IRN8) taj viskozitet postigla u oba medijuma. Viskozitet iznad 10 mPa·s je izmeren kod još dva soja u BG11 N- (*Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. LP4) i tri soja u podlozi BG11 N+ (*Chroococciopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN6).

U drugom kultivacionom periodu je uočen suprotan odgovor metaboličke aktivnosti ćelija u pogledu viskoziteta, u odnosu na prisustvo izvora azota u medijumu. Kod većine sojeva (18 sojeva) je izmereni viskozitet bio veći u podlozi sa izvorom azota. Veći viskozitet u podlozi bez azota (BG11 N-) su pokazala tri soja (*Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. LR7). Najveći viskozitet je uočen kod soja *Nostoc* sp. L2 (25,34 mPa·s) u podlozi BG11 N-. Kod pomenutog soja je viskozitet iznad 20 mPa·s izmeren i u podlozi sa azotom. Pored soja *Nostoc* sp. L2, viskozitet iznad 20 mPa·s u oba medijuma je izmeren kod još dva soja *Nostoc* sp. L2-2 i *Nostoc* sp. L6. Slične vrednosti viskoziteta su imali i sojevi *Tolypothrix* sp. L4 i *Nostoc* sp. IRN5D, ali samo u podlogama BG11 N+. Viskozitet iznad 10 mPa·s je izmeren kod još jednog soja u obe podloge (*Nostoc* sp. L6-2) i šest sojeva u podlozi sa azotom (*Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2 i *Nostoc* sp. ZJ1).



Grafikon 34. Viskozitet medijuma nakon uklanjanja ćelija testiranih cijanobakterijskih sojeva u zavisnosti od prisustva/odsustva izvora azota u mineralnoj podlozi i starosti kulture. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

Testirani sojevi su pokazali različitu promenu viskoziteta tokom vremena između dva kultivaciona perioda (sedme i 16. nedelje). Kod pet sojeva (*Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6 i *Nostoc* sp. IRN8) je došlo do smanjenja viskoziteta između dva posmatrana perioda u oba testirana medijuma, dok je kod šest sojeva (*Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L2-2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. IRN5D) uočen porast viskoziteta. Merenje viskoziteta medijuma BG11 N- soja *Chroococcidiopsis* sp. L1 u 16. nedelji kultivacije je bilo onemogućeno usled uginuća soja, dok je pomenuti soj u podlozi BG11 N+ pokazao smanjenje viskoziteta između dva posmatrana kultivaciona perioda. Na odgovor preostalih 10 sojeva je uticalo prisustvo izvora azota u medijumu, u podlozi sa azotom uočen je porast viskoziteta između sedme i 16. nedelje kultivacije, dok je u podlozi bez izvora azota došlo do smanjenja viskoziteta.

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima statističke obrade podataka (Tabela 14) koji pokazuju da svi ispitivani faktori (specifičnost izolovanog soja, sastav mineralne podloge u odnosu na izvor azota) i njihova interakcija imaju statistički značajan uticaj ($p < 0,05$) na viskozitet medijuma nastalog pod uticajem metaboličke aktivnosti ćelija testiranih cijanobakterijskih sojeva. Najveći uticaj na viskozitet medijuma ima sastav mineralne podloge, odnosno prisustvo izvora azota u medijumu (MS vrednosti).

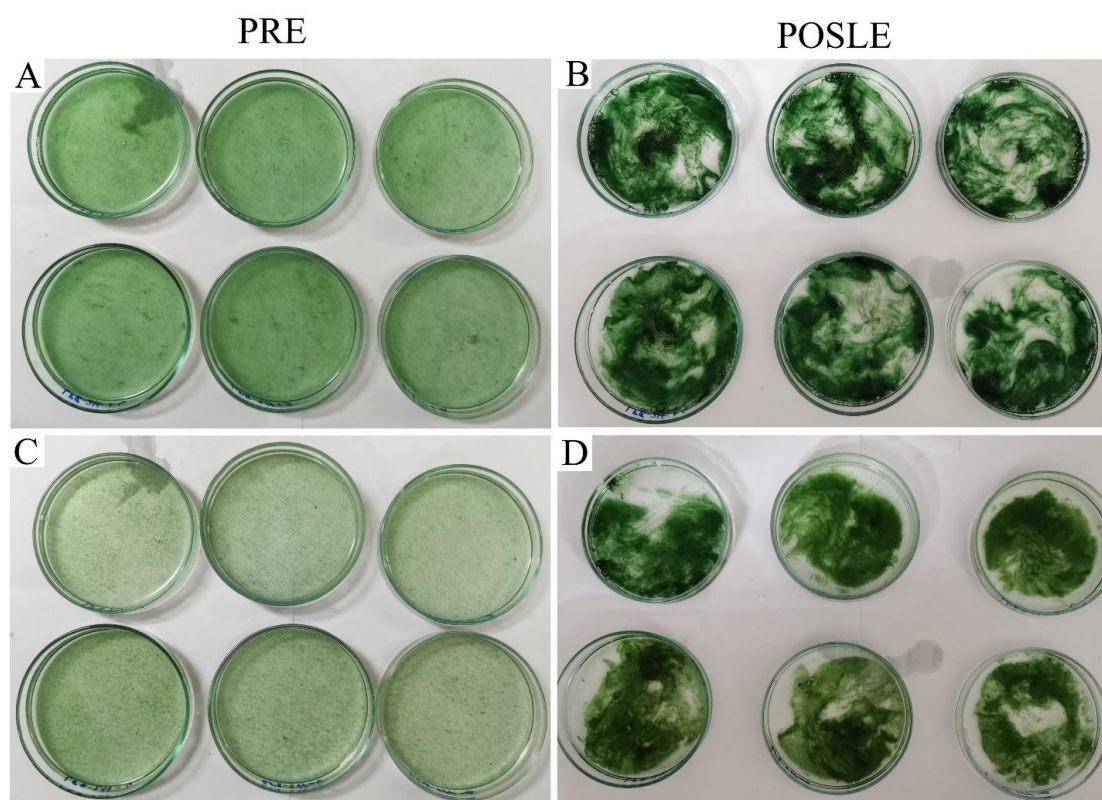
Tabela 14. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja izolovanih cijanobakterijskih sojeva i sastava mineralne podloge na viskozitet medijuma u zavisnosti od starosti kultura

	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	P-vrednost
7. nedelja kultivacije	Soj	3602,93	21,00	171,57	248,62	<0,000001
	Mineralna podloga	1703,92	1	1703,92	2469,18	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	1744,41	21,00	83,07	120,37	<0,000001
	Greška	60,73	88	0,69	-	-
16. nedelja kultivacije	Soj	7346,44	21	349,83	463,90	<0,000001
	Mineralna podloga	527,49	1	527,49	699,49	<0,000001
	Soj i tip mineralne podloge	659,62	21	31,41	41,65	<0,000001
	Greška	66,36	88	0,75		

SS-suma kvadrata; DF-stepen slobode; MS-srednja vrednost kvadrata

4.2.5. Produkcija zaštitnih pigmenata

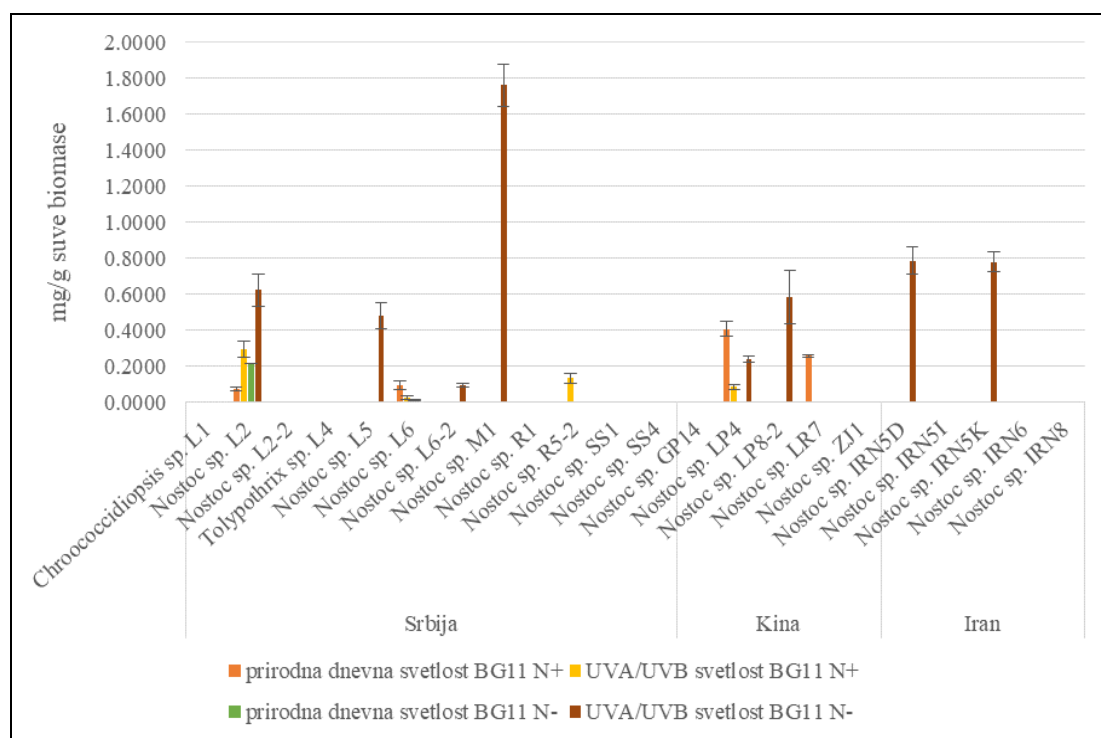
Produkcija UV zaštitnih pigmenata od strane ispitivanih cijanobakterijskih sojeva procenjena je merenjem metabolita u opsegu scitonemin apsorbanca (MOSA) i metabolita u opsegu mikosporin apsorbanca (MOMA). Merenja su rađena nakon gajenja kultura na dnevnoj svetlosti tokom 28 dana i nakon njihovih izlaganja kombinaciji UVA/UVB svetlosti tokom sedam dana. Preliminarnim istraživanjima je detektovan uticaj UV svetlosti na izgled i rast cijanobakterijskih kultura (na primer, soj *Nostoc* sp. LP8-2 (slika 44)). Statistička obrada rezultata produkcije zaštitnih pigmenata nije rađena jer je preliminarno ispitivanje vršeno u svrhu provere sposobnosti sojeva da produkuju zaštitne pigmente, a ne količine produkovanih pigmenata.



Slika 44. Izgled cijanobakterijske kulture *Nostoc* sp. LP8-2 pre i posle izlaganja kombinaciji UVA/UVB osvetljenja

4.2.5.1. Produkcija MOSA

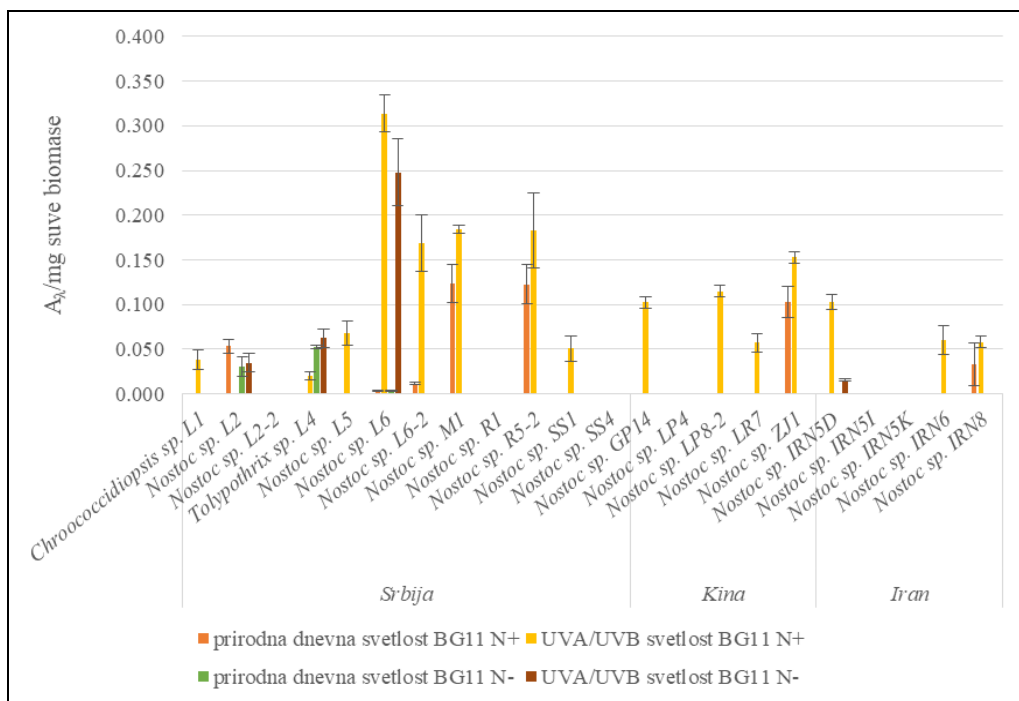
Produkcija MOSA od strane testiranih cijanobakterijskih sojeva prilikom kultivacije pod dnevnim svjetlom i nakon izlaganja UVA/UVB svjetlosti, u podlogama BG11 N+ i BG11 N-, prikazana je na grafikonu 35. Zabeležena je produkcija MOSA kod 11 od 22 testirana soja. Kod soja *Nostoc* sp. L2 je zabeležena produkcija MOSA u obe testirane podloge u odnosu na prisustvo izvora azota, u kulturama koje nisu bile izlagane UV osvetljenju i nakon izlaganja UV osvetljenju. Primećen je stimulirajući efekat UV svjetlosti na sadržaj MOSA kod ovog soja. UV osvetljenje je iniciralo produkciju MOSA kod sedam sojeva (*Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. IRN5D i *Nostoc* sp. IRN5K) u podlozi BG11 N-. Pomenuti efekat je uočen kod soja *Nostoc* sp. R5-2 u podlozi BG11 N+. Najveći sadržaj MOSA je zabeležen kod soja *Nostoc* sp. M1 u podlozi bez izvora azota (1,76 mg/g suve biomase).



Grafikon 35. Uticaj kombinacije UVA/UVB osvetljenja na produkciju MOSA od strane testiranih cijanobakterijskih sojeva. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

4.2.5.2. Produkcija MOMA

Produkcija MOMA zabeležena je kod 16 od 22 testirana cijanobakterijska soja (Grafikon 36). Najveći sadržaj je zabeležen u kulturi soja *Nostoc* sp. L6, u podlozi sa izvorom azota (0,314 A_{λ} /mg) i podlozi bez izvora azota (0,248 A_{λ} /mg). Prisustvo MOMA je zabeleženo i u kulturama ovog soja pre izlaganja UV osvetljenju, nakon kultivacije pod dnevnim svetlom. Zabeležen je stimulirajući efekat UV osvetljenja na sadržaj MOMA ovog soja. Stimulirajući efekat UVA/UVB svetlosti je zabeležen kod još pet sojeva u podlozi BG11 N+ (*Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN8) i dva soja u podlozi BG11 N- (*Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4). UVA/UVB osvetljenje je iniciralo produkciju MOMA kod devet testiranih sojeva, što znači da oni nisu produkovali ove zaštitne pigmente tokom izlaganja dnevnoj svetlosti (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN6). Samo je kod soja *Nostoc* sp. IRN5D UV osvetljenje iniciralo produkciju MOMA u obe testirane podloge, dok je kod ostalih sojeva UV osvetljenje dovelo do produkcije MOMA samo u podlozi sa izvorom azota.



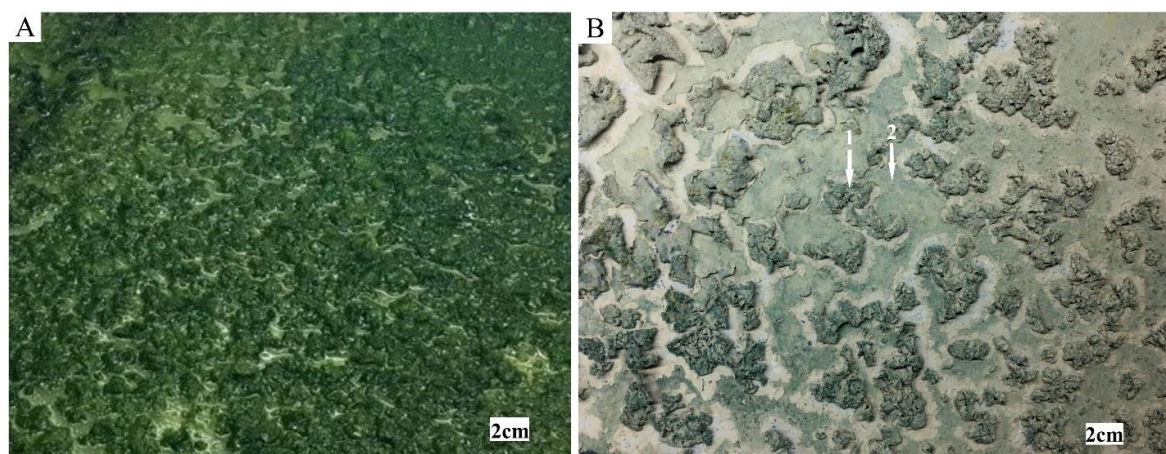
Grafikon 36. Uticaj kombinacije UVA/UVB osvetljenja na produkciju MOMA od strane testiranih cijanobakterijskih sojeva. Opsezi odstupanja su prikazani standardnom devijacijom

4.3. *Ex-situ* eksperiment vezivanja i stabilizacije čestica prašine od strane cijanobakterija

Vezivanje i stabilizacija čestica od strane cijanobakterija procenjena je nakon razvijanja cijanobakterijskog biofilma simulacijom oluja prašine. Izvršena je procena vezivanja i stabilizacije čestica pripremljenih nakon uzorkovanja sa lesnog profila napuštene ciglane u Rumi od strane cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz BLP sa istog lokaliteta. Biofilm je razvijen inokulacijom konzorcijuma cijanobakterijskih sojeva (*Chroococciopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. L6). Međutim, sukcesivni procesi tokom razvoja biofilma i razvoja BLP su doveli do promene u sastavu zajednice, pojavljivanja novih cijanobakterijskih sojeva i potiskivanja sojeva koji su inicijalno učestvovali u razvijanju biofilma. Detaljniji opis promene sastava mikrobiološke zajednice je dat u poglavlju 4.3.3. *Zajednica i mikromorfologija bioloških lesnih pokorica eksperimentalne komore.*

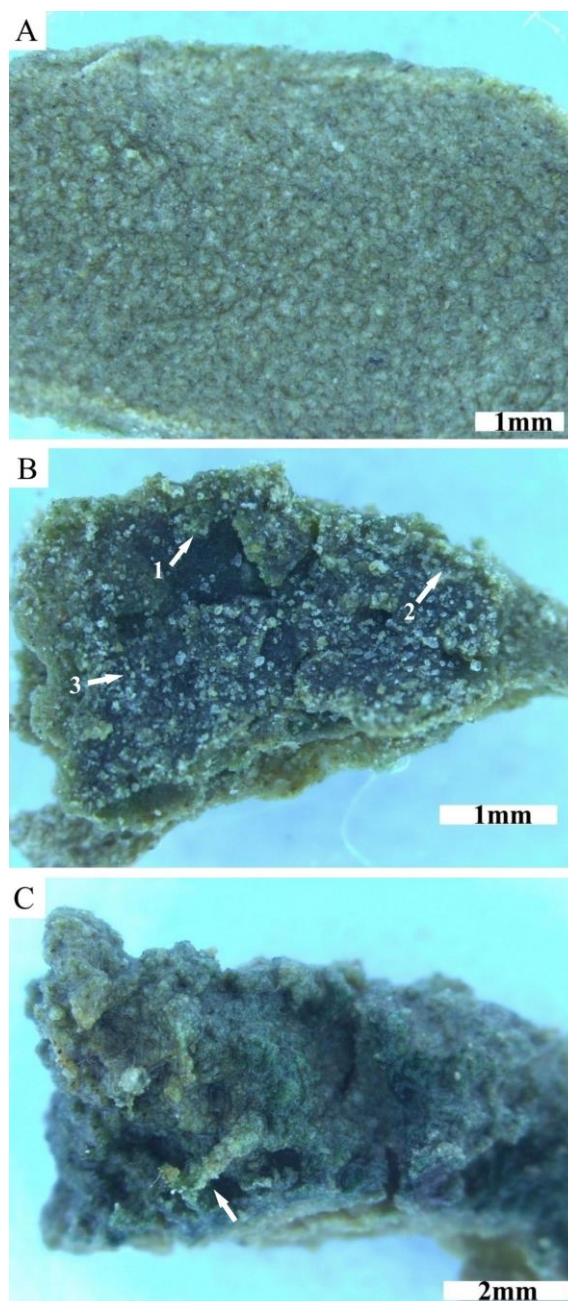
4.3.1. Razvoj i morfologija bioloških lesnih pokorica

Tokom simuliranih oluja prašine u eksperimentalnoj komori došlo je do vezivanja čestica prašine između cijanobakterijskih kolonija ranije razvijenog biofilma (Slika 45A). Nastala zajednica organizama i čestica prašine je tokom sušnih perioda formirala čvrste strukture poznate kao BLP. Razvijeni biološki pokrivač je menjao svoj morfološki izgled tokom kultivacije. Neujednačen biološki pokrivač sastavljen od ljuspastih, uvijenih i izdignutih BLP (Slika 45B, strelica 1) je prekrivao najveći deo površine zadnjeg dela eksperimentalne komore. Između pomenutih struktura ostali su nekolonizovani delovi deponovanih čestica, koje su kasnije kolonizovane glatkim BLP (Slika 45B, strelica 2).



Slika 45. Razvoj BLP. Kao rezultat interakcija cijanobakterijskog biofilma (A) i čestica prašine razvile su se BLP (B). Neravnomerni pokrivač bioloških pokorica sastojao se od izolovanih površina ljustastih, uvijenih i izdignutih BLP (B, strelica 1). Glatke pokorice (B, strelica 2) su se razvile kasnije između prethodno razvijenih BLP

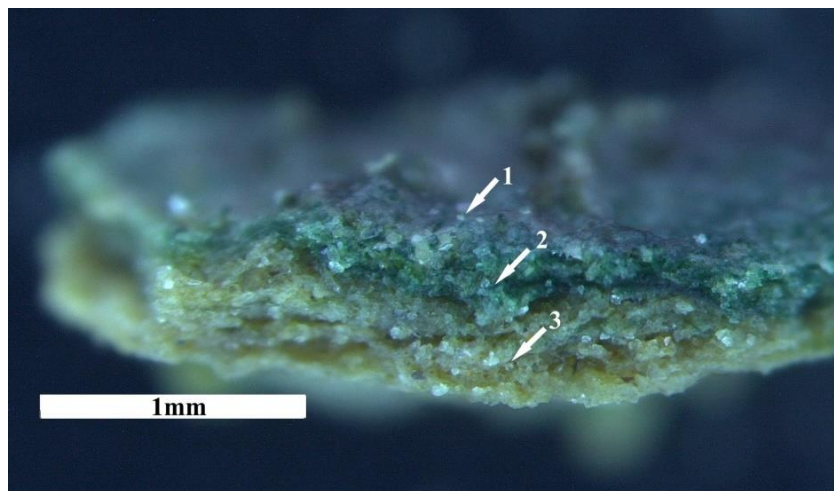
Različiti oblici rasta cijanobakterijskih kolonija su uočeni u biološkim pokoricama eksperimentalne komore (Slika 46). Vizuelnim posmatranjem uočeni su sledeći morfološki oblici: a) glatke BLP (46A); b) BLP sastavljene od izdignutih (46B, strelica 1), uvijenih (46B, strelica 2) i glatkih struktura (46B, strelica 3); c) izdignute BLP (46C, strelica) nalik izbočinama sastavljenim od cijanobakterijskih filamenata.



Slika 46. Morfološki oblici formiranih BLP. Slike sa stereomikroskopa pokazuju morfološki različite kolonije koje su prekrile površinu zadnjeg dela eksperimentalne komore: a) glatke BLP (A); b) BLP izdignutih (B, strelice 1), uvijenih (B, strelica 2) i glatkih struktura (B, strelica 3); c) izdignute BLP (C, označeno strelicom)

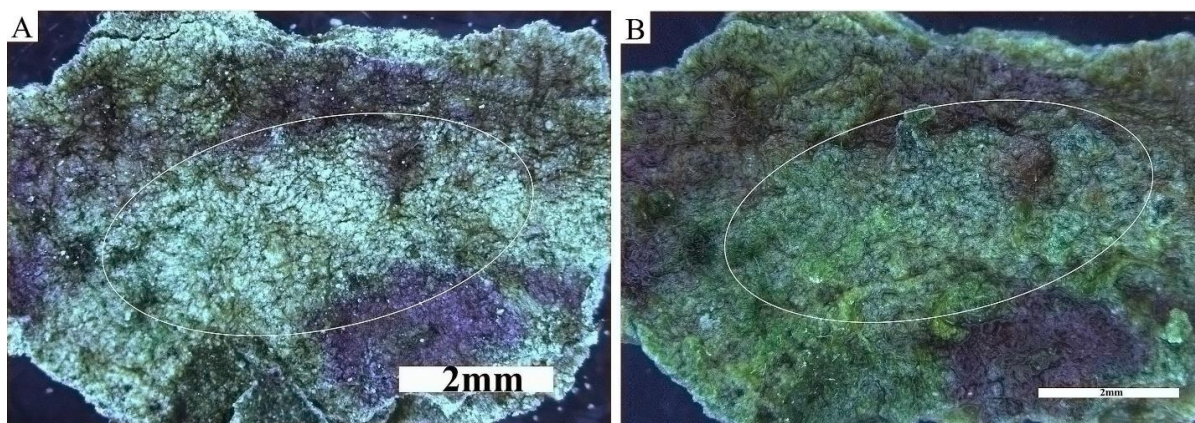
Posmatranjem BLP pod stereomikroskopom uočena je njihova vertikalna stratifikacija na površinski (gornji) i podpovršinski (donji) sloj. Površinski sloj sastojao se iz slojeva živih cijanobakterijskih kolonija povezanih sa česticama, gde je došlo do vezivanja čestica od strane lepljivih polisaharida cijanobakterijskih kolonija (Slika 47, strelica 1) i akumulacije prethodno vezanih čestica (Slika 47, strelica 2). Podpovršinski sloj predstavlja stare

površinske slojeve BLP i sastoji se od istaloženih i stabilizovanih čestica lesnog sedimenta, kao i zaostalog, delimično mineralizovanog egzopolisaharidnog materijala (Slika 47, strelica 3). Posmatrana vertikalna stratifikacija BLP, akumulacija i stabilizacija čestica su posledica načina života cijanobakterija. Tokom simuliranih oluja prašine, metabolički aktivne cijanobakterijske kolonije površinskog sloja BLP su vezivale čestice. Kao rezultat vezivanja čestica dolazi do zatrpavanja cijanobakterija česticama, što inicira migraciju cijanobakterija ka izvoru svetlosti. Kao rezultat migracije došlo je do potiskivanja/akumulacije zarobljenih čestica u organski, cijanobakterijski sloj. Rastući prema gore, cijanobakterije su formirale novi površinski sloj BLP, dok je stari i zaostali egzopolisaharidni materijal ostao u dubljim slojevima pokorice koji zajedno sa prethodno akumuliranim česticama čini stabilizovani podpovršinski sloj istaloženih čestica.



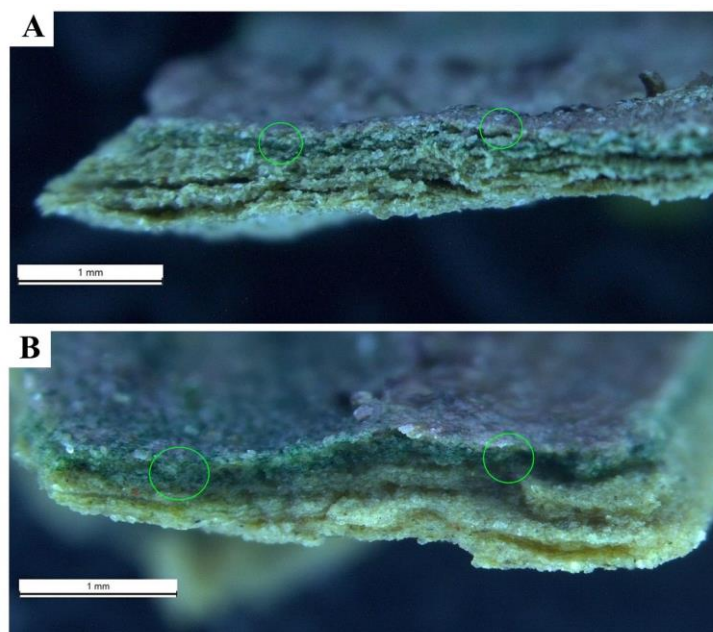
Slika 47. Poprečni presek BLP iz eksperimentalne komore. Slika sa stereomikroskopa pokazuje tri sloja: prvi sloj u kom dolazi do vezivanja čestica površinskim lepljivim kolonijama cijanobakterija (strelica 1), drugi sloj akumulacije čestica u organskom sloju cijanobakterija (strelica 2) i treći sloj koji pokazuje potiskivanje čestica ispod navedenih slojeva (strelica 3)

Formirane BLP su menjale svoj izgled u odnosu na dostupnost vode. Površina i zapremina BLP se povećavala nakon vlaženja (Slika 48). Tokom sušnih perioda zapremina BLP se smanjivala, boja je postajala bleđa, a biološki pokrivač deponovanog lesnog sedimenta je postajao neujednačen (Slika 48A). Nakon vlaženja uočeno je povećanje zapremine i transformacija neujednačenog biološkog pokrivača (Slika 48A) u kontinuirani, deblji biološki pokrivač tamno zelene boje (Slika 48B). Slabije kolonizovani sediment (Slika 48A, zaokruženo) je nakon vlaženja postajao pokriven tamnim i kontinualnim BLP (Slika 48B, zaokruženo).



Slika 48. Promene u BLP nakon vlaženja. Slike sa stereomikroskopa pokazuju izgled BLP u suvom stanju (A) i 15 minuta nakon vlaženja (B). Zalivanje je dovelo do promene izgleda biološkog pokrivača iz svetlog, neujednačenog (A) u nabubren, tamni kontinuirani biološki pokrivač (B)

Poprečni presek BLP u suvom stanju i nakon vlaženja se razlikuje u debljini površinskog sloja cijanobakterija (Slika 49). Vlaženjem je došlo do povećanja volumena cijanobakterijskog sloja. Debljina površinskog sloja BLP u suvom stanju je iznosila 0,124 mm (Slika 49A, označeno zelenim krugovima), dok je 15 minuta nakon vlaženja iznosila oko 0,201 mm (Slika 49B, označeno zelenim krugovima).



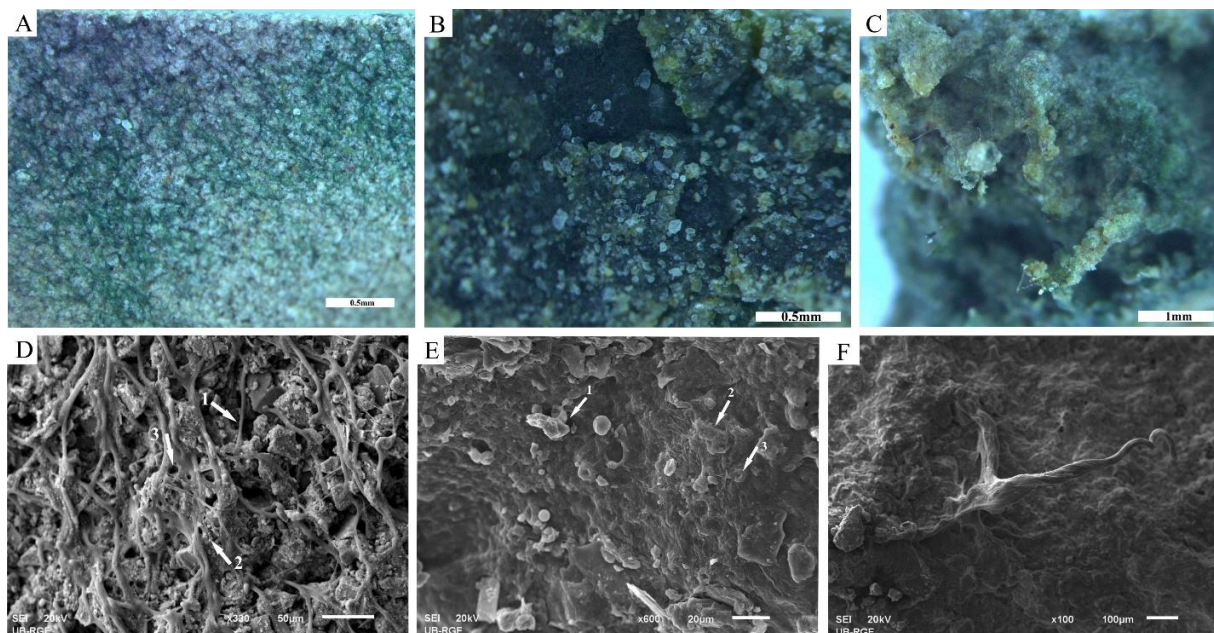
Slika 49. Promene u BLP nakon vlaženja. Poprečni presek BLP sa stereomikroskopa u suvom stanju (A) i 15 minuta nakon vlaženja (B)

4.3.2. Interakcija cijanobakterija sa česticama prašine

Cijanobakterije su pokazale sposobnost da ostvare različite interakcije sa česticama prašine. Rezultati stereomikroskopije i skening elektronske mikroskopije su pokazali da cijanobakterije svojim filamentima i lepljivim egzopolisaharidima vezuju, akumuliraju, talože i stabilizuju čestice prašine.

4.3.2.1. Vezivanje čestica prašine

Hvatanje i vezivanje čestica prašine (poreklom iz vazduha) od strane cijanobakterijskih pokorica posmatrano je tokom simuliranih vlažnih perioda. Uočena su tri načina vezivanja čestica u zavisnosti od morfologije cijanobakterijskih kolonija: *vezivanje pomoću „mreže“* (Slika 50A; 50D), *vezivanje pomoću „tepiha“* (Slika 50B; 50E) i *vezivanje pomoću „izdignutih struktura“* (Slika 50C; 50F).



Slika 50. Vezivanje čestica prašine cijanobakterijama. Fotografije sa stereomiskoskopa (A, B i C) i SEM mikrografije (D, E i F) vezivanja čestica prašine: *vezivanje pomoću „mreže“* (A i D); *vezivanje pomoću „tepiha“* (B i E); *vezivanje pomoću „izdignutih struktura“* (C i F)

Vezivanje pomoću „mreže“: cijanobakterijski filament i egzopolisaharidni materijal prave organsku mrežu kojom vezuju čestice tako što ih prekrivaju, okružuju i povezuju

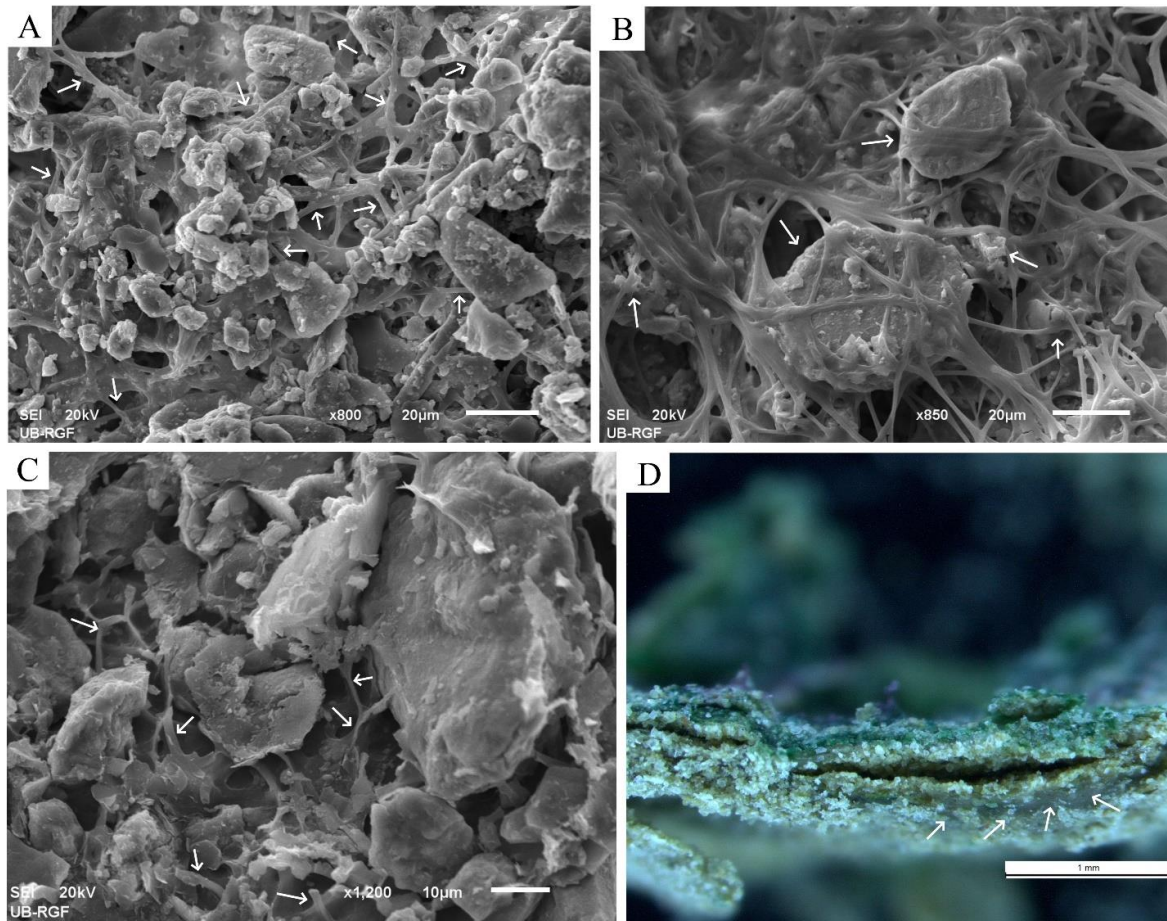
(Slika 50D, strelica 1). Uočeno je vezivanje sitnih, finih čestica njihovim lepljenjem na površinu egzopolisaharidnog materijala (Slika 50D, strelica 2). Posmatrana organska mreža pravi pore, čime je vezivanje čestica dodatno pospešeno (Slika 50D, strelica 3).

Vezivanje pomoću „tepiha“: cijanobakterijske kolonije (Slika 50E, strelica 3) i njihov sluzavi egzopolisaharidni materijal su napravile homogeni, amorfni biološki pokrivač nalik tepihu, pomoću kog su vezivane čestice (Slika 50B; 50E). Primećene su zalepljene čestice na površini ovog biološkog pokrivača (Slika 50E, strelica 1). Nije primećeno zarobljavanje pojedinačnih čestica cijanobakterijskim filamentima, ali je uočeno prerastanje čestica amorfnim sluzavim cijanobakterijskim kolonijama i pojava kontura zarobljenih čestica (Slika 50E, strelica 2).

Vezivanje pomoću „izdignutih struktura“: Pored horizontalnih struktura BLP, u eksperimentalnoj komori su primećene i vertikalne strukture. BLP su povećavale svoju površinu spajanjem filamenata u snopove i rastom prema gore (Slika 50C; 50F). Samim tim, i površine za hvatanje čestica su povećane. Snopovi cijanobakterijskih filamenata i njihovog egzopolisaharidnog materijala su sa česticama prašine formirali bio-mineralne agregate (Slika 50C; 50F).

4.3.2.2. Akumulacija i taloženje čestica prašine

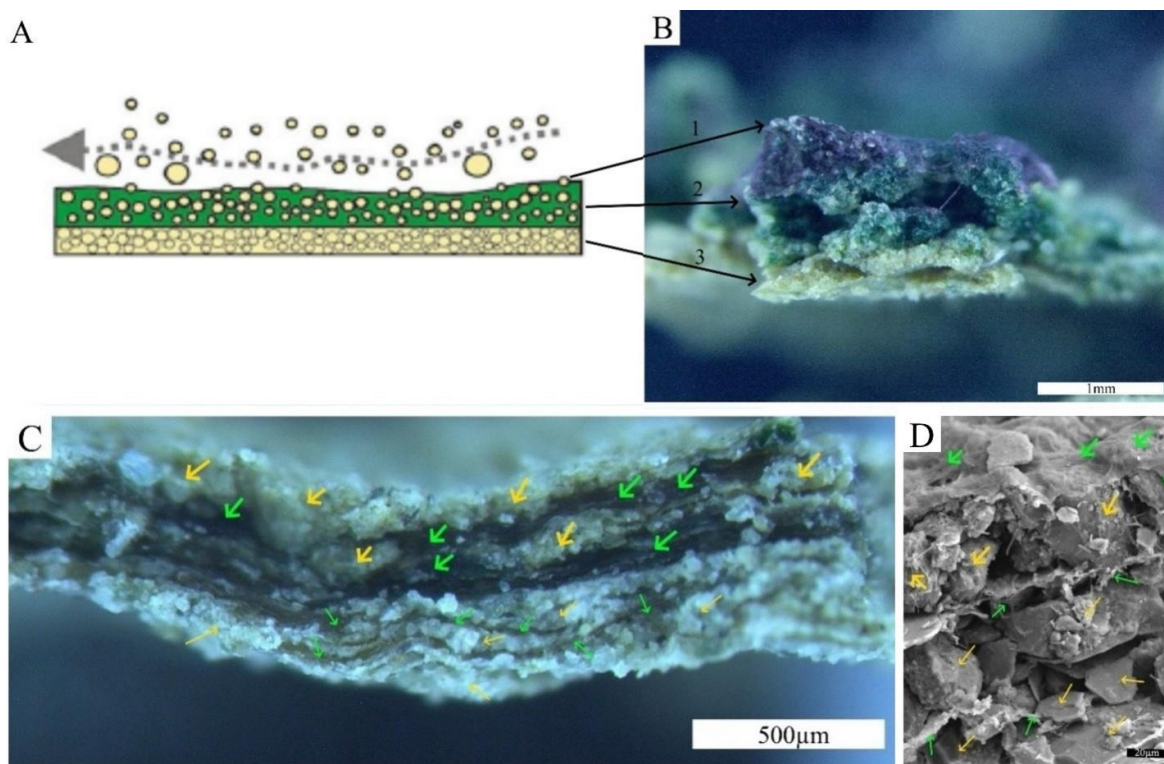
Cijanobakterijski filament i njihovi egzopolisaharidi protežući se između čestica, imobilisali su ih, predstavljajući „skelet“ BLP (Slika 51A, strelice). Direktan kontakt cijanobakterijskih kolonija i njihovih egzopolisaharida sa česticama doveo je do stvaranja organo-mineralnih agregata (Slika 51B, strelice) različitih veličina. Ovako imobilisane čestice u površinskom sloju BLP (Slika 47, strelica 1 i 2) su sačuvane i stabilizovane. Rast cijanobakterija ka izvoru svetlosti je rezultirao taloženjem prethodno akumuliranih čestica u podpovršinski sloj BLP (Slika 47, strelica 3). Ove istaložene čestice su bile zaštićene površinskim kolonijama cijanobakterija. Stabilizaciji ovih čestica značajno doprinose ostaci egzopolisaharidnog materijala (Slika 51C; 51D). Migrirajući unutar BLP po horizontalnoj osi i prema izvoru svetlosti (po vertikalnoj osi), cijanobakterijski filament ostavljaju svoj zaštitni egzopolisaharidni omotač (Slika 51C; 51D). Ovi ostaci egzopolisaharida kasnije predstavljaju „armaturu“ podpovršinskog sloja BLP.



Slika 51. Akumulacija i stabilizacija čestica prašine cijanobakterijama. SEM mikrografija (A) pokazuje cijanobakterijsku mrežu (strelice) koja predstavlja „skelet“ površinskog sloja BLP. Direktni kontakt filamenata i egzopolisaharida sa česticama u formiranju organo-mineralnih agregata (B, strelice) vidi se na SEM mikrografiji (B). Zaostali egzopolisaharidni materijal kao „armatura“ u podpovršinskom sloju prikazan je na SEM mikrografiji (C, strelice) i slici sa stereomiskoskopa (D, strelice)

Redovne simulacije oluja prašine rezultirale su povećanjem debljine sloja istaloženih čestica u podpovršinskom sloju BLP. U skladu sa BLOCDUST modelom (Slika 52A) o formiranju i rastu lesnog sedimenta, vezane (Slika 52B, strelica 1) i akumulirane čestice (Slika 52B, strelica 2) površinskog sloja BLP eksperimentalne komore su rastom cijanobakterija transportovane u podpovršinski sloj zajedno sa ostacima egzopolisaharidnog materijala (Slika 52B, strelica 3). Slika sa stereomiskoskopa i SEM mikrografija pokazuju da se površinski i podpovršinski slojevi BLP sastoje iz više podslojeva. Površinski sloj BLP se sastojao iz više podslojeva cijanobakterijskih kolonija (52C; 52D, debele zelene strelice) i akumuliranih čestica (Slika 52C; 52D, debele žute strelice). U podpovršinskom sloju

izdvojeno je više slojeva starih BLP i zaostalog egzopolisaharidnog materijala (Slika 52C; 52D, tanke zelene strelice) i istaloženih čestica (Slika 52C; 52D, tanke žute strelice).



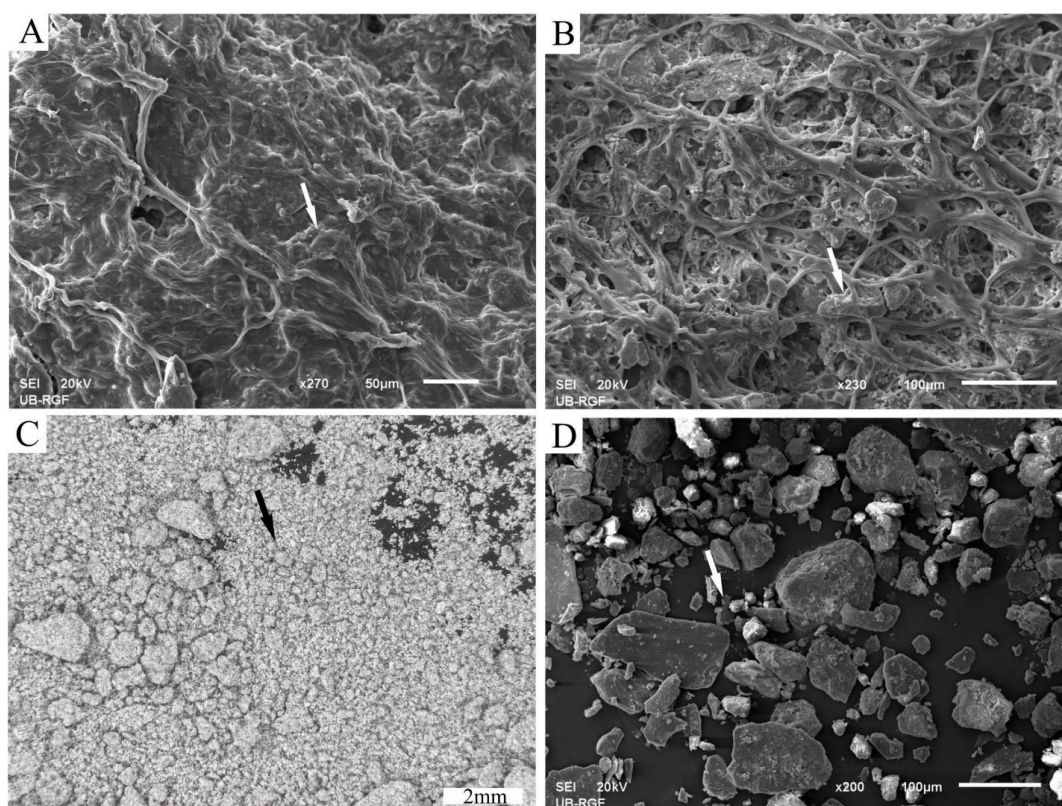
Slika 52. Taloženje čestica prašine cijanobakterijama. Taloženje čestica u eksperimentalnoj komori (B) je u skladu sa BLOCDUST modelom (A) o formiranju lesnog sedimenta kroz prethodno vezivanje čestica (B, strelica 1), akumulaciju (B, strelica 2) i na kraju taloženje (B, strelica 3) ispod biološkog pokrivača. Izdvajanje više slojeva cijanobakterijske biomase je prikazano na slici sa stereomikroskopa (C, debele zelene strelice) i SEM mikrografiji (D, debele zelene strelice), vezanih i akumuliranih čestica (C i D, debele žute strelice), egzopolisaharidnog materijala (C i D, tanke zelene strelice) i istaloženih čestica (C i D, tanke žute strelice) kao rezultat periodičnog navejavanja prašine

4.3.2.3. Stabilizacija čestica prašine cijanobakterijama

U cilju ispitivanja efikasnosti BLP tokom stabilizacije čestica prašine u eksperimentalnoj komori urađene su SEM analize i stereomikroskopija sadržaja iz eksperimentalne i kontrolne komore.

Na SEM mikrografijama BLP iz eksperimentalne komore vide se različite cijanobakterijske kolonije i njihovi egzopolisaharidi (Slika 53A; 53B). Površinske kolonije cijanobakterija i njihovi egzopolisaharidi su imobilisali čestice prašine tako što su ih zalepili

(Slika 53A) ili okružili i vezali (Slika 53B) svojim koherentnim organskim slojem. Na ovaj način, čestice koje su došle u kontakt sa cijanobakterijskom biomasom i egzopolisaharidima ostale su imobilisane (slika 53A; 53B, strelice), za razliku od čestica iz kontrolne komore koje nisu ostvarile interakciju sa cijanobakterijama ili egzopolisaharidima (slika 53C; 53D, strelice).



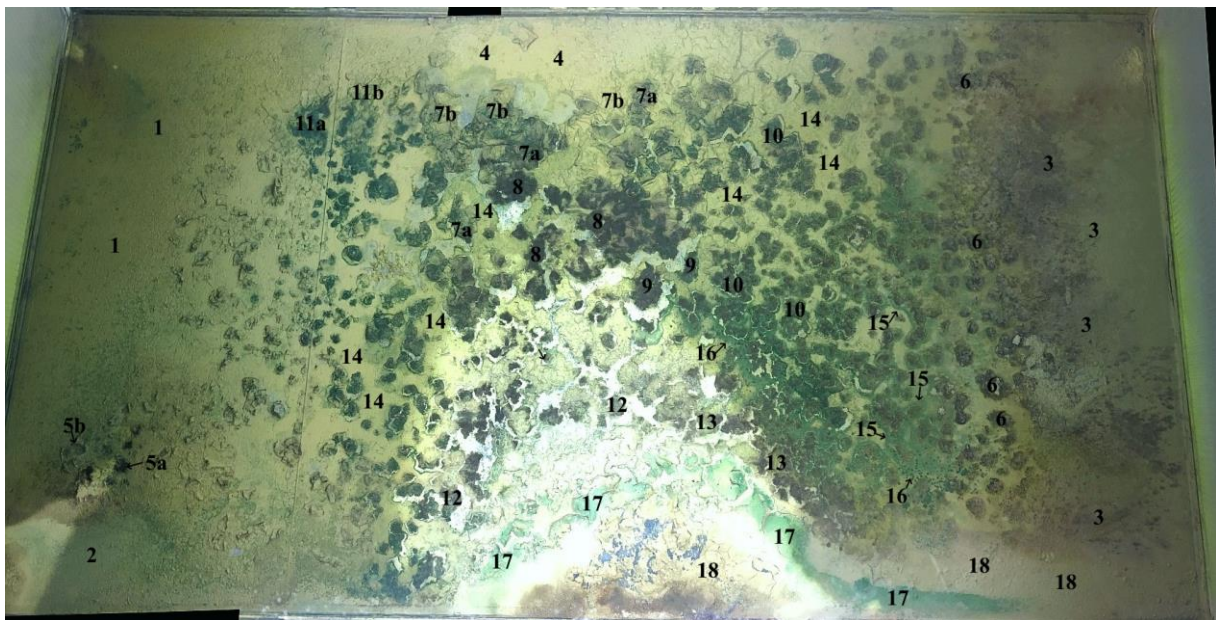
Slika 53. Stabilizacija čestica prašine cijanobakterijama. Razlika između kolonizovane površine u eksperimentalnoj (A, B) i nekolonizovane površine u kontrolnoj komori (C, D). SEM mikrofotografije pokazuju cijanobakterijske pokrivače nalik tepihu (A) i mreži (B) kako vezuju čestice u eksperimentalnoj komori (označeno strelicama). Fotografija sa stereomirkoskopa (C) i SEM mikrofotografija (D) pokazuju nepovezane čestice u kontrolnoj komori (označeno strelicama)

4.3.3. Zajednica i mikromorfologija bioloških lesnih pokorica eksperimentalne komore

Biološki pokrivač eksperimentalne komore je bio sastavljen od neravnomerno raspoređenih morfološki različitih BLP. Kao što je prethodno opisano, u eksperimentalnoj komori su uočeni različiti morfološki oblici BLP. Izolovane, izdignute, uvijene i glatke BLP,

različite starosti, pravile su nehomogen biološki pokrivač koji je prekrivao površinu zadnjeg dela eksperimentalne komore (Slika 54). Hrapaviji biološki pokrivač je prekrivao centralni deo komore, dok su bočni delovi većinom bili prekriveni glatkim BLP. Hrapavi biološki pokrivač su činile izdignute i uvijene tamne do crvene i intezivnije zelene BLP, između kojih su se razvile mlade i glatke BLP. Sporadično pojavljivanje ovih izdignutih i uvijenih BLP primećeno je u delu komore koji je bio najudaljeni od izvora prašine. Glatke tamne do crvene BLP su kolonizovale deo komore koji je bio najbliži izvoru prašine, dok su svetlo zelene BLP zauzimale periferne delove komore. U odnosu na boju BLP, u eksperimentalnoj komori su izdvojene tri grupe: svetlo zelene do blede, intezivno zelene i tamne do crvene BLP.

Primećena je promena sastava cijanobakterijske zajednice u odnosu na početni inokulum. Početni inokulum za razvijanje cijanobakterijskog biofilma su činili tri soja roda *Nostoc* i po jedan soj rodova *Chroococidiopsis* i *Tolypothrix*. Međutim, u formiranim BLP nisu primećeni rodovi *Nostoc* i *Tolypothrix*, već su njihov sastav činili rodovi *Leptolyngbia*, *Chroococidiopsis*, *Scytonema*, *Chlorogloeocapsa*.

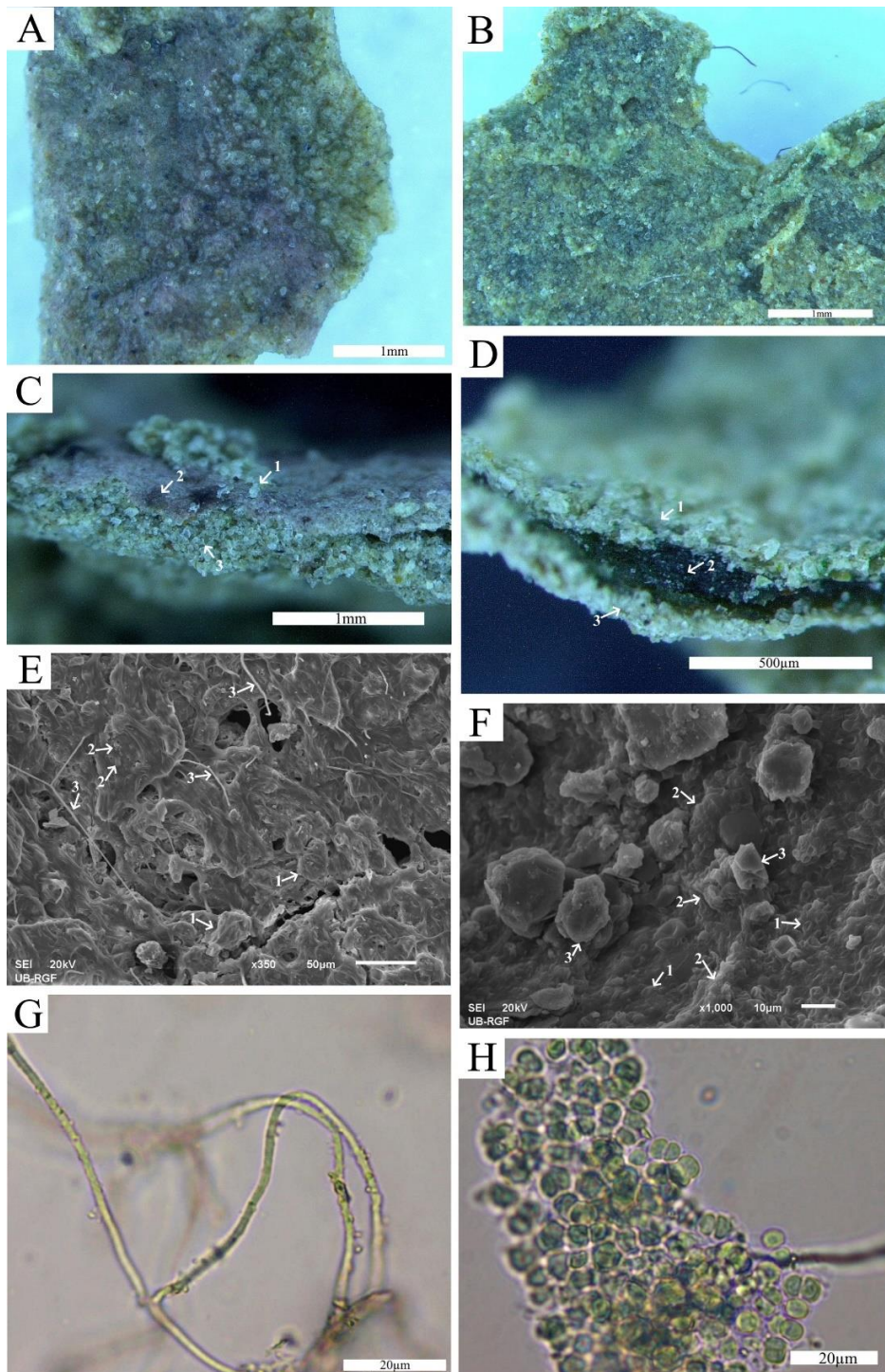


Slika 54. Biološki pokrivač zadnjeg dela eksperimentalne komore sa različitim morfološkim oblicima BLP. Analizirani uzorci BLP su označeni brojevima

Bočni delovi eksperimentalne komore su većinom bili prekriveni tanjim, glatkim ili blago uvijenim i izdignutim svetlo zelenim (Slika 54, (1) i (2)) i tamnim do crvenim BLP (Slika 54, (3)). Tamne do crvene BLP su prekrivale segment komore najbliži izvoru prašine, dok su svetlo zelene BLP prekrivale segment najudaljeniji od izvora prašine. Zajednicu

tamnih BLP (Slika 55A) su činile kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (Slika 55G) zajedno sa kolonijama *Leptolyngbia* sp. tipa 1. Svetle pokorice (Slika 55B) su bile sačinjene od kolonije *Chroococidiopsis* sp. (Slika 55H), uz malo prisustvo kolonija *Leptolyngbia* sp. tipa 1. Pomenute kolonije roda *Leptolyngbia* nisu bile deo konzorcijuma koji je inokulisan za razvijanje biofilma, već su se javile kao posledica naknadnih sukcesivnih procesa. Na poprečnom preseku tamnih (Slika 55C) i svetlih BLP (Slika 55D) razlikovao se površinski, organski sloj cijanobakterijskih kolonija za koji su vezane (Slika 55C; 55D, strelice 1) i unutar koga su akumulirane čestice (Slika 55C; 55D, strelice 2), kao i podpovršinski neogranski sloj čestica lesnog sedimenta (Slika 55C; 55D, strelice 3).

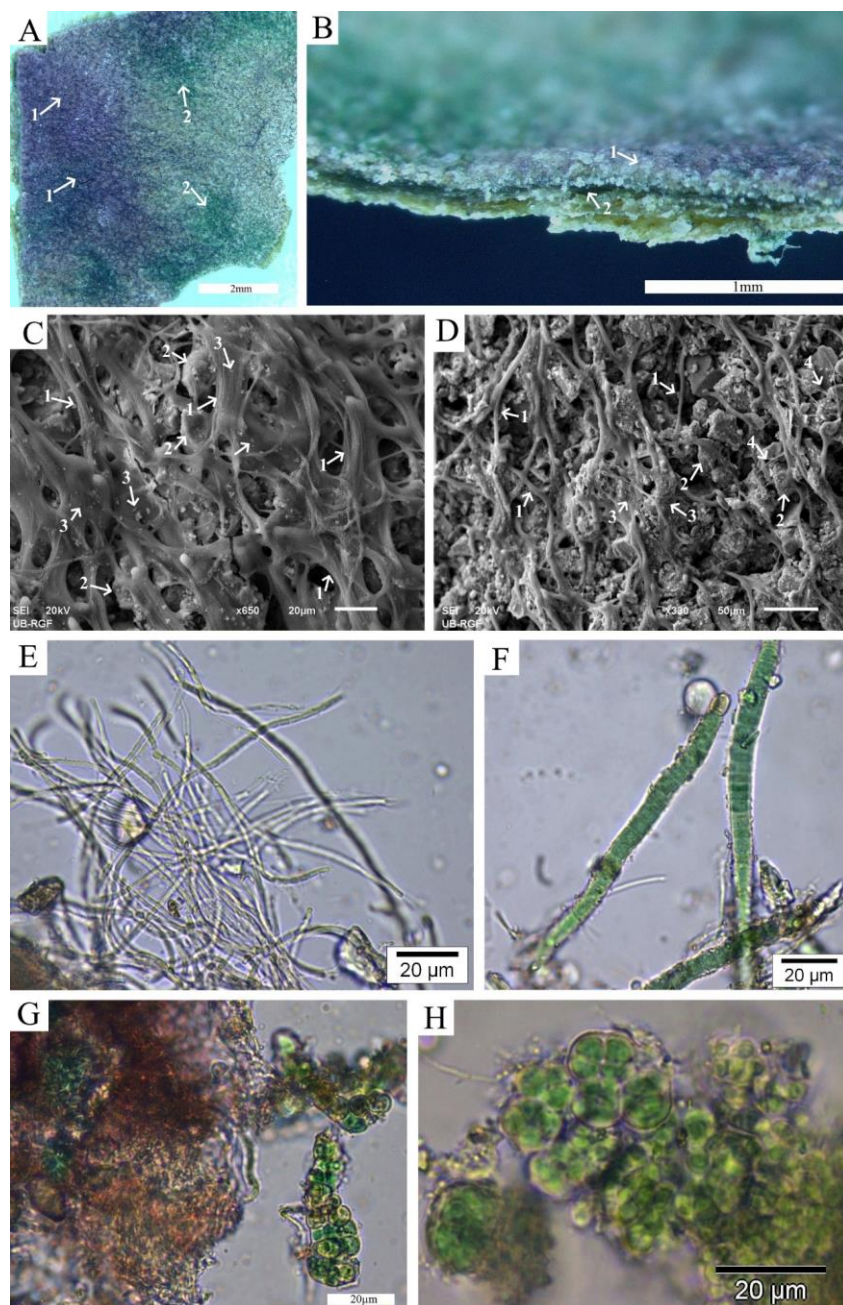
Cijanobakterijska zajednica tamnih pokorica (*Leptolyngbia* sp. tipa 2 i tipa 1) je sa svojim egzopolisaharidima formirala cijanobakterijsku mrežu (Slika 55E) koja je imobilisala čestice, okruživanjem i prerastanjem krupnijih čestica (Slika 55E, strelice 1), vezivanjem finih čestica za površinu filamenata i egzopolisaharida (Slika 55E, strelica 2) i povezivanjem udaljenih čestica (Slika 55E, strelica 3). Čelije *Chroococidiopsis* sp. (Slika 55H; 55F, strelica 1) i njihov egzopolisaharidni matriks su napravili homogeni, amorfni biološki pokrivač (Slika 55F) zelenih BLP koji je imobilisao čestice tako što je vezivao 'vetrom nanete' čestice za svoju površinu (Slika 55F, strelica 3) i prerastao ih ostavljajući konture zarobljenih čestica (Slika 55F, strelica 2).



Slika 55. BLP bočnih delova eksperimentalne komore. Slike sa stereomikroskopa pokazuju površinu tamnih do crvenih BLP (A) i svetlije zelenih BLP (B). Na poprečnim preseccima tamnih (C) i svetlih (D) BLP vidi se izdvojen površinski organski sloj (strelice 1 i 2) i podpovršinski neorganski sloj (strelice 3). SEM mikrografije pokazuju cijanobakterijsku mrežu tamnih BLP (E) koja imobilise (strelica 1), lepi (strelica 2) i povezuje (strelica 3) čestice i homogen biološki pokrivač svetlih BLP (F) čije kolonije (strelica 1) lepe (strelica 3) i prerastaju (strelica 2) čestice. Na slikama sa svetlosnog mikroskopa se vidi filament *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (G) tamnih BLP i kolonija *Chroococidiopsis* sp. (H) svetlih BLP

Pojedini delovi ovih bočnih segmenata eksperimentalne komore prekriveni su debljim, uvijenim, izdignutim strukturama, tamne do crvene (Slika 54, (5a) i (6); 56A, strelice 1) i intenzivno zelene boje (Slika 54, (5b); 56A, strelice 2). Površinski organski sloj ovih BLP je bio stratifikovan (Slika 56B). Gornje delove tamnih BLP su kolonizovale kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (Slika 56B, strelica 1; 56E) koje nisu bile deo konzorcijuma za razvoj biofilma, dok su se u nižim delovima nalazile zelene kolonije (Slika 56B, strelica 2) *Chroococcidiopsis* sp. (Slika 56H) pojedinačno ili zajedno sa novim kolonijama *Chlorogloeopsis* sp. (Slika 56G). Gornje delove površinskog organskog sloja zelenih BLP su kolonizovale neinokulisane kolonije *Scytonema* sp. (Slika 56F), dok su niže delove površinskog sloja zauzimale kolonije koje su bile deo konzorcijuma za razvoj biofilma *Chroococcidiopsis* sp. (Slika 56H).

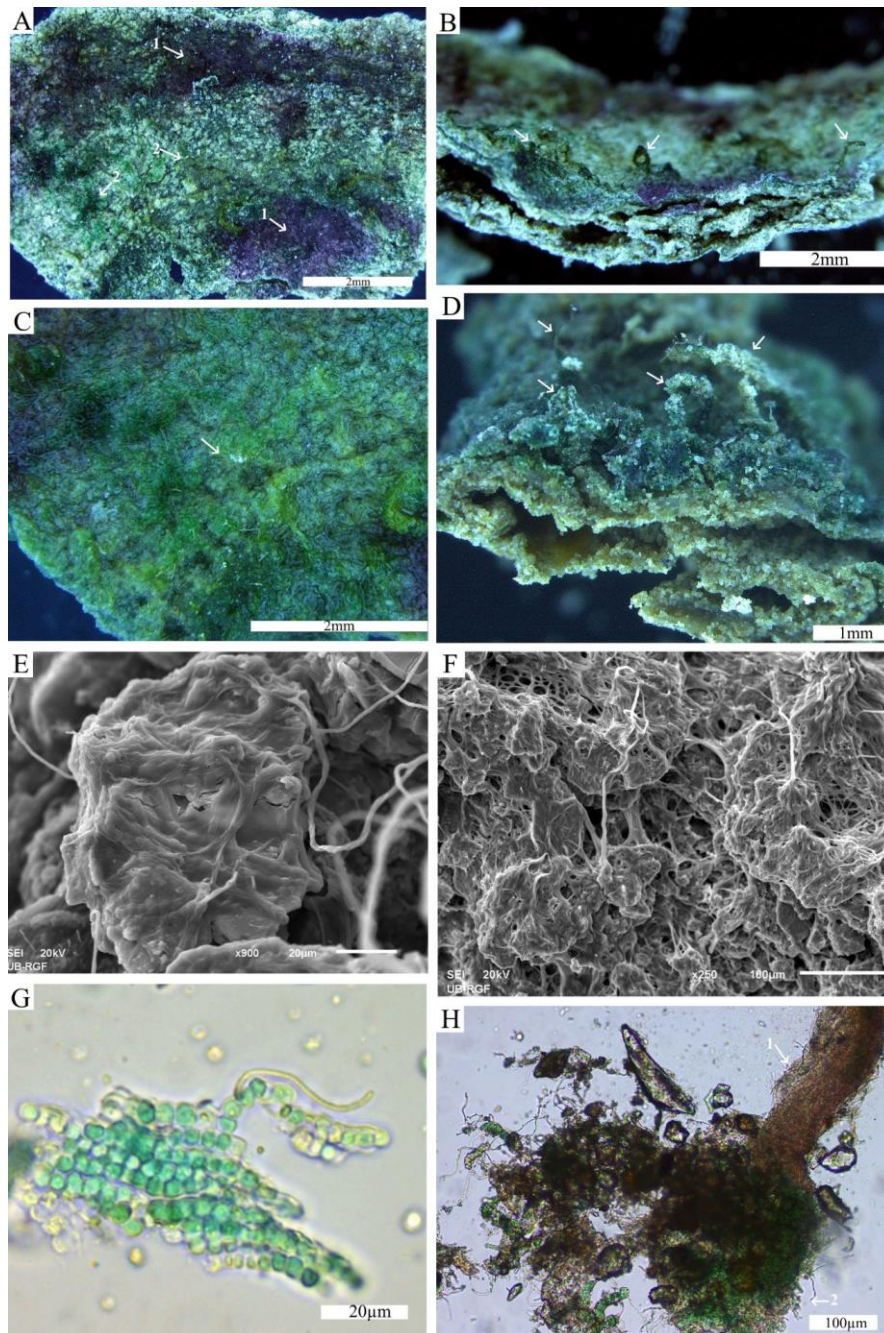
SEM mikrografije površine tamnih do crvenih BLP (Slika 56C) pokazuju združene filamente *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (Slika 56C, strelice 1) koji sa svojim egzopolisaharidima prave gustu mrežu na površini pokrivača, iako *Leptolyngbia* sp. nije bila deo konzorcijuma za razvoj biofilma. Filamenti *Leptolyngbia* sp. tipa 2 povezuju (Slika 56C, strelica 1) i okružuju krupnije čestice (Slika 56C, strelice 2), dok sitnije lepe za svoju površinu (Slika 56C, strelice 3). Filamenti *Scytonema* sp. (Slika 56D, strelice 1), takođe neinokulisani, imaju krupnije filamente koji prave cijanobakterijsku mrežu manje gustine i na isti način interreaguje sa krupnim (Slika 56D, strelice 2) i finim česticama (Slika 56D, strelice 3). Sporadično pojavljivanje tankih filamenata *Leptolyngbia* sp. tipa 2 u zelenim delovima BLP je primećeno (Slika 56D, strelice 4).



Slika 56. BLP bočnih delova eksperimentalne komore. Slike sa stereomikroskopa pokazuju površinu (A) i poprečni presek (B) tamnih do crvenih BLP (A, strelica 1) i intezivno zelenih BLP (A, strelica 2) sa stratifikovanih organskim slojem (B). SEM mikrografija (C, strelica 1) pokazuje kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (E) u višim delovima površinskog sloja tamnih BLP (B, strelica 1) koje su imobilisale krupne (C, strelica 2) i fine čestice (C, strelica 3). Slike sa svetlosnog mikroskopa pokazuju kolonije *Chroococidiopsis* sp. (H) i *Chlorogloeopsis* sp. (G) u nižim delovima površinskog sloja (B, strelica 2). SEM mikrografija (D) zelenih BLP (A, strelica 2) pokazuje kolonije *Scytonema* sp. (F; D, strelica 1) i sporadične kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (E; D, strelica 4) u gornjim delovima površinskog sloja kako imobilisu krupne (D, strelica 2) i fine (D, strelica 3) čestice. Na slici sa svetlosnog mikroskopa se vide kolonije *Chroococidiopsis* sp. (H) koje su kolonizovale niže delove površinskog sloja zelenih BLP (A, strelica 2)

Gornju polovinu centralnog dela eksperimentalne komore su takođe prekrivale deblje, uvijene, izdignute tamne (Slika 57A, strelice 1) i intezivnije zelene BLP (Slika 57A, strelice 2; 57C, označeno strelicom) koje su se međusobno smenjivale. Međutim, prisustvo kolonija *Chroococidiopsis* sp. nije primećeno, kao ni vertikalna stratifikacija organskog sloja intezivno zelenih BLP. Zajednicu ovih BLP su činile neinokulisane cijanobakterije, kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 1 i tipa 2, *Chlorogleopsis* sp. i *Scytonema* sp., uz različitu dominaciju na različitim delovima komore i različitu vertikalnu raspoređenost unutar organskog sloja BLP. Površinski sloj tamnih BLP je bio stratifikovan. Slike sa svetlosnog mikroskopa pokazuju da su kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (Slika 57H, strelica 1) pojedinačno (Slika 54 (8), (9) i (10)) ili zajedno sa kolonijama *Leptolyngbia* sp. tipa 1 (Slika 54, (7a)) kolonizovale gornje delove površinskog organskog sloja ovih BLP. Niže delove su zauzimale zelene kolonije *Chlorogleopsis* sp. (Slika 57G; 57H, strelica 2) pojedinačno (Slika 54, (7a), (9)) ili združene sa kolonijama *Leptolyngbia* sp. tipa 1 (Slika 54, (10)) ili kolonijama *Leptolyngbia* sp. tipa 1 i *Scytonema* sp. zajedno (Slika 54, (8)). Prodiranje kolonija *Leptolyngbia* sp. iz gornjih u donje delove organskog sloja je primećeno. Kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 su formirale i tamne nestratifikovane pokrice (Slika 54, (11a)). Zeleni BLP u ovom delu eksperimentalne komore (Slika 57A, strelica 2; 57C) su bile nestratifikovane i činile su ih kolonije *Chlorogleopsis* sp., (Slika 57G) združene sa kolonijama *Scytonema* sp., *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (Slika 54, (11b)) i *Leptolyngbia* sp. tipa 1 (Slika 54, (7b)).

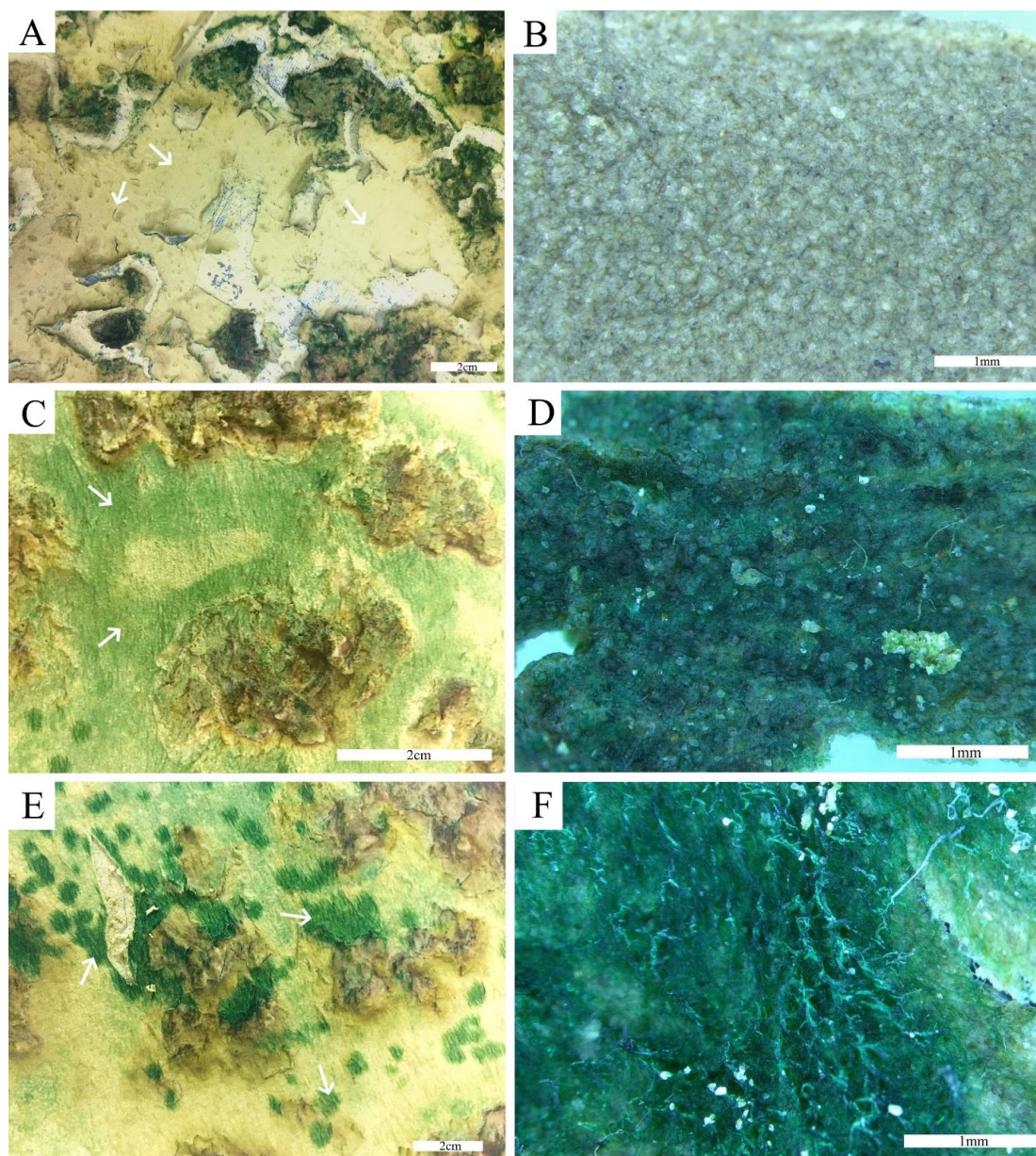
SEM mikrografija pokazuje mrežu tamnih BLP kojom su imobilisane čestice (Slika 57F). Na ovim tamnim BLP je primećen rast cijanobakterijskih kolonija ka gore, praveći tkz. šiljke (Slika 57B; 57D, označeno strelicama). U ovim šiljcima uočena je dominacija kolonija *Leptolyngbia* sp. koje zauzimaju gornji deo površinskog organskog sloja BLP. Rastući u snopovima u vertikalnom pravcu, ove kolonije prave šiljke zajedno sa kolonijama koje rastu ispod njih. Na slici sa stereomikroskopa (Slika 57D) se može videti da je pomenuta vertikalna zajednica cijanobakterijskih kolonija oblepljena česticama, ukazujući na ulogu šiljaka u hvatanju čestica poreklom iz vazduha. SEM mikrografija zelenih BLP (Slika 57E) ukazuje na homogeni amorfni biološki pokrivač kolonija *Chlorogleopsis* sp.. Cijanobakterijske kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 1 i *Chlorogleopsis* sp. su formirale homogen svetlo zeleni biološki pokrivač na gornjoj ivici centralnog dela komore (Slika 54, (4)).



Slika 57. BLP gornje polovine centralnog dela eksperimentalne komore. Slika sa stereomikroskopa (A) pokazuje tamne (A, strelice 1) i intezivno zelene BLP (A, strelice 2; C označeno strelicom) koje su prekrivale gornju polovinu centralnog dela komore. Rezultati sa svetlosnog mikroskopa su pokazali dominaciju kolonija *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (H, strelica 1) u gornjem delu površinskog sloja tamnih BLP, dok su niže slojeve kolonizovale većinom kolonije *Chlorogloeopsis* sp. (G; H, strelica 2). Slike poprečnog preseka sa stereomikroskopa pokazuju vertikalni rast tamnih BLP (B, D označeno strelicama). Zelene BLP su činile većinom kolonije *Chlorogloeopsis* sp. (G). Na SEM mikrografijama površine BLP se može videti amorfnu pokrivač zelenih BLP (E) i mrežasti pokrivač tamnih BLP (F)

U donjoj polovini centralnog dela komore uočeno je ponovno pojavljivanje inokulisanih kolonija *Chroococidiopsis* sp., ali odsustvo kolonija *Scytonema* sp.. Tamne pokrvice su takođe bile stratifikovane, gornje delove površinskog sloja su kolonizovale neinokulisane kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 1 (Slika 54 (12)) ili *Leptolyngbia* sp. tipa 2 (Slika 54, (13)), dok je donji deo kolonizovan neinokulisanim kolonijama *Chlorogloeopsis* sp. i inokulisanim kolonijama *Chroococidiopsis* sp. združeno (Slika 54 (12)) ili *Chroococidiopsis* sp. pojedinačno (Slika 54, (13)).

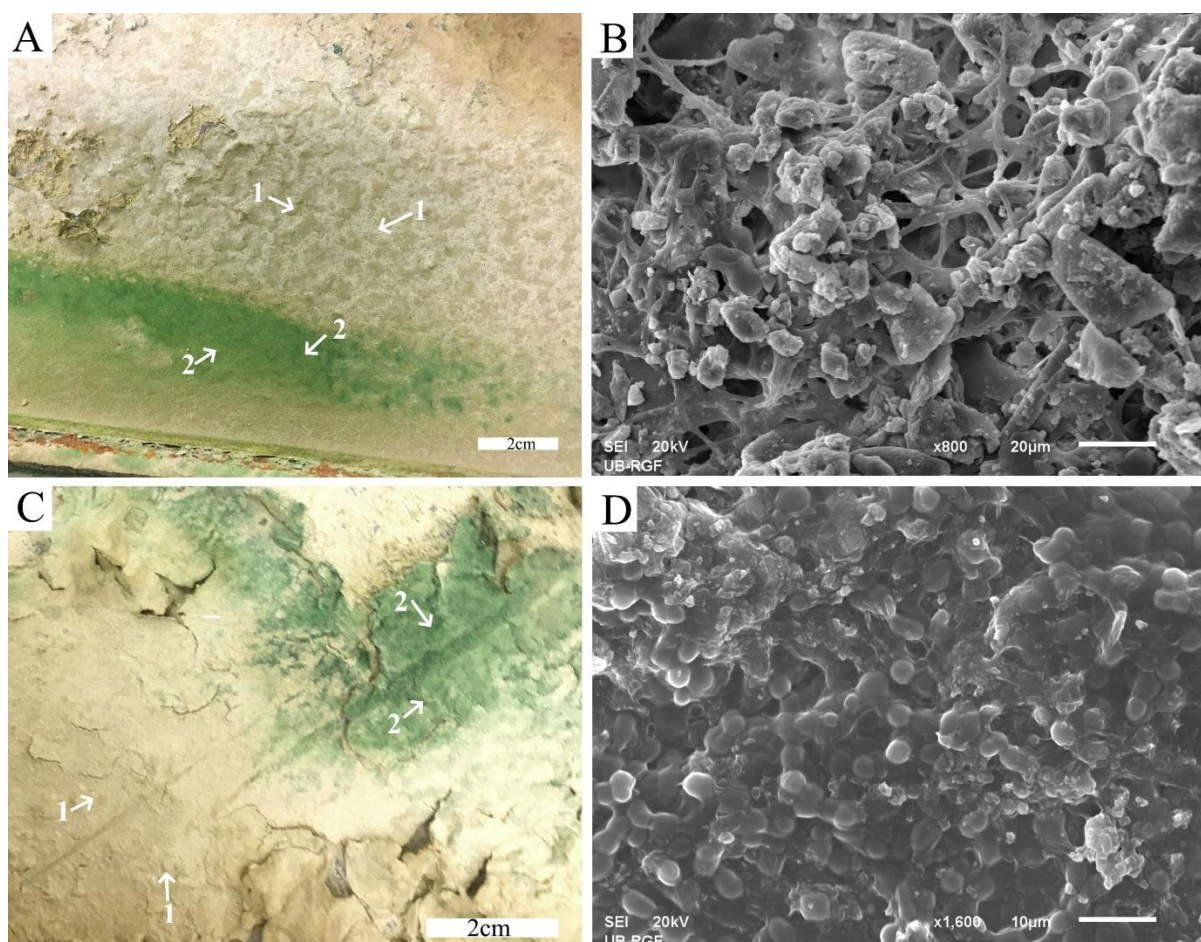
Između pomenutih uvijenih i izdignutih BLP u gornjoj i donjoj polovini centralnog dela eksperimentalne komore kasnije su se razvile nove BLP. Zajednica zelenih BLP gornje polovine centralnog dela komore (kolonije neinokulisanih cijanobakterija *Chlorogloeopsis* sp. združene sa kolonijama *Leptolyngbia* sp. tipa 1 i *Scytonema* sp.) razvile su nove, blede, glatke BLP na prethodno nekolonizovanim delovima komore (Slika 54 (14); Slika 58A, označeno strelicama; 58B). Kolonije koje su kolonizovale donju polovinu centralnog dela komore (neinokulisane kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 1 i *Chlorogloeopsis* sp. i inokulisane kolonije *Chroococidiopsis* sp.) su pravile nove intenzivno zelene kolonije između starijih struktura BLP (Slika 54 (15); Slika 58C, označeno strelicama; 58D). Ove BLP su se protezale ka gornjem centralnom delu eksperimentalne komore, prekrivajući prethodno nekolonizovane delove komore. Takođe, razvile su se i nove zelene BLP (Slika 54 (16)) koje su formirale izdignute strukture u formi „kose“ (Slika 58F), kao pečati na već formiranim pokoricama (Slika 58E, označeno strelicama). Ove BLP su formirale cijanobakterije kasnijih sukcesivnih stadijuma, kolonije *Scytonema* sp..



Slika 58. Novoformirane BLP. Slike sa stereomiskroskopa pokazuju nove BLP koje su se razvile na nekolonizovanim delovima: svetle do blede zelene (A označeno strelicama; B), intezivno zelene (C označeno strelicama; D) i intezivno zelene BLP u vidu „pečata“ (E označeno strelicama; F)

Mlade, nestratifikovane BLP uz samu donju ivicu eksperimentalne komore (Slika 54 (17), (18)) su činile inkulisane kolonije *Chroococidiopsis* sp. i neinkulisane kolonije *Leptolyngbia* sp. tipa 2 sa različitom dominacijom. Kolonije *Chroococidiopsis* sp. su dominirale u jarko zelenim BLP (Slika 54 (17); Slika 59A; 59C, strelice 2), dok je *Leptolyngbia* sp. tipa 2 dominarala u svetlim, tek vidljivim BLP sa manjim učešćem kolonija *Leptolyngbia* sp. tipa 1 (Slika 54 (18); Slika 59A; 59C, strelice 1). Na SEM mikrografijama se može videti da kolonije *Leptolyngbia* sp. prave cijanobakterijsku mrežu pomoću koje

imobilisu čestice (Slika 59B), dok su kolonije *Chroococcidiopsis* sp. zajedno sa svojim izlučenim polisaharidima formirale amorfnu, homogenu biološku pokrivač (Slika 59D).



Slika 59. Sukcesija BLP. Slike sa stereomikroskopa pokazuju izrazito svetle (A, C, strelice 1) i intenzivno zelene BLP (A, C, strelice 2) koje su prekrivale donju ivicu komore. Na SEM mikrografijama se vidi cijanobakterijska mreža (B) kolonija *Leptolyngbia* sp. svetlih BLP i homogeni amorfnu pokrivač (D) zelenih BLP koji su formirale kolonije *Chroococcidiopsis* sp.

4.3.4. Uticaj cijanobakterija na veličinu čestica u komorama

Uticaj cijanobakterija na veličinu čestica procenjen je poređenjem veličine navejavanih čestica, čestica navejanih u prednjem delu eksperimentalne komore za simulaciju oluja prašine, istaloženih čestica lesnog sedimenta ispod BLP zadnjeg dela eksperimentalne komore (Slika 60), kao i čestica navejanih u zadnjem delu kontrolne komore.



Slika 60. Mesta uzorkovanja istaloženih čestica lesnog sedimenta ispod BLP eksperimentalne komore

Srednje veličine navejanih čestica i različitih uzoraka iz eksperimentalne komore (čestica navejanih u prednjem delu eksperimentalne komore i istaloženih čestica ispod formiranih BLP) prikazane su u Tabeli 15. Veličina čestica je određivana pre i posle uklanjanja organske materije i karbonata, gde je u svim uzorcima uočena manja veličina čestica nakon uklanjanja organske materije i karbonata. U prednjem delu komore, gde su simulirane oluje prašine, uočeno je smanjenje veličine navejanih čestica udaljavajući se od izvora vetra (ventilatora). Srednja veličina navejanih čestica iznosila je 35,1 μm (28,7 μm nakon uklanjanja organske materije i karbonata). Na samom ulazu prašine u komoru (ispod izvora prašine) navejane su najkрупnije čestice, te je njihova srednja veličina čestica bila veća od navejanih čestica i iznosila je 38,1 μm (32,4 μm nakon uklanjanja organske materije i karbonata). Na samom kraju prednjeg dela komore, pred ulaz prašine u deo komore sa razvijenim biofilmom, navejane su čestice srednje veličine 36,6 μm , odnosno 29,1 μm nakon uklanjanja organske materije i karbonata.

Srednja veličina istaloženih čestica sedimenta ispod BLP (38,7 μm ispod uzorka *Leptolyngbia* sp. uzorak 3 i 40,8 μm ispod uzorka *Leptolyngbia* sp. uzorak 18) je bila veća od navejanih čestica (35,1 μm) i čestica navejanih pred ulaz prašine u deo komore sa razvijenim biofilmom (36,6 μm). Međutim, nakon uklanjanja organske materije i karbonata iz uzoraka, srednja veličina istaloženih čestica sedimenta ispod BLP je bila ili slična veličini čestica koje su ušle u zadnji deo komore (*Leptolyngbia* sp. uzorak 3) ili čak manja (*Leptolyngbia* sp. uzorak 18) (Slika 60) (Tabela 15).

Srednje veličine čestica navejanih u kontrolnoj komori iznosile su: 1) 37,2 μm (31 μm nakon uklanjanja organske materije i karbonata) za deo kontrolne komore koji odgovara uzorku *Leptolyngbia* sp. uzorak 3 eksperimentalne komore; 2) 37 μm (29,6 μm nakon uklanjanja organske materije i karbonata) za deo kontrolne komore koji odgovara uzorku *Leptolyngbia* sp. uzorak 18 eksperimentalne komore (podaci nisu prikazani). Poredeći veličinu istaloženih čestica sedimenta ispod BLP eksperimentalne komore (Tabela 15) sa veličinom čestica navejanih na odgovarajućim mestima kontrolne komore može se zaključiti da su čestice navejane u kontrolnoj komori pre uklanjanja organske materije i karbonata bile manje od istaloženih čestica sedimenta ispod BLP eksperimentalne komore. Nakon uklanjanja organske materije i karbonata, srednja veličina istaloženih čestica sedimenta ispod BLP je bila manja od čestica odgovarajućih uzoraka kontrolne komore.

Tabela 15. Srednja veličina čestica iz uzoraka eksperimentalne komore

Uzorak čestica		Srednja veličina čestica (μm)	Srednja veličina čestica (μm)*
navejavane čestice		35,1	28,7
navejavane čestice	ispod izvora prašine	38,1	32,4
	10 cm od izvora prašine	38,5	32,8
	20 cm od izvora prašine	36,7	32,1
	30 cm od izvora prašine	39	31,6
	40 cm od izvora prašine	37,8	31
	50 cm od izvora prašine	36,2	28,8
	60 cm od izvora prašine	36,6	29,1
istaložene čestice	<i>Leptolyngbia</i> sp. uzorak 3	38,7	29,4
ispod BLP	<i>Leptolyngbia</i> sp. uzorak 18	40,8	24,9

* nakon uklanjanja organske materije i karbonata

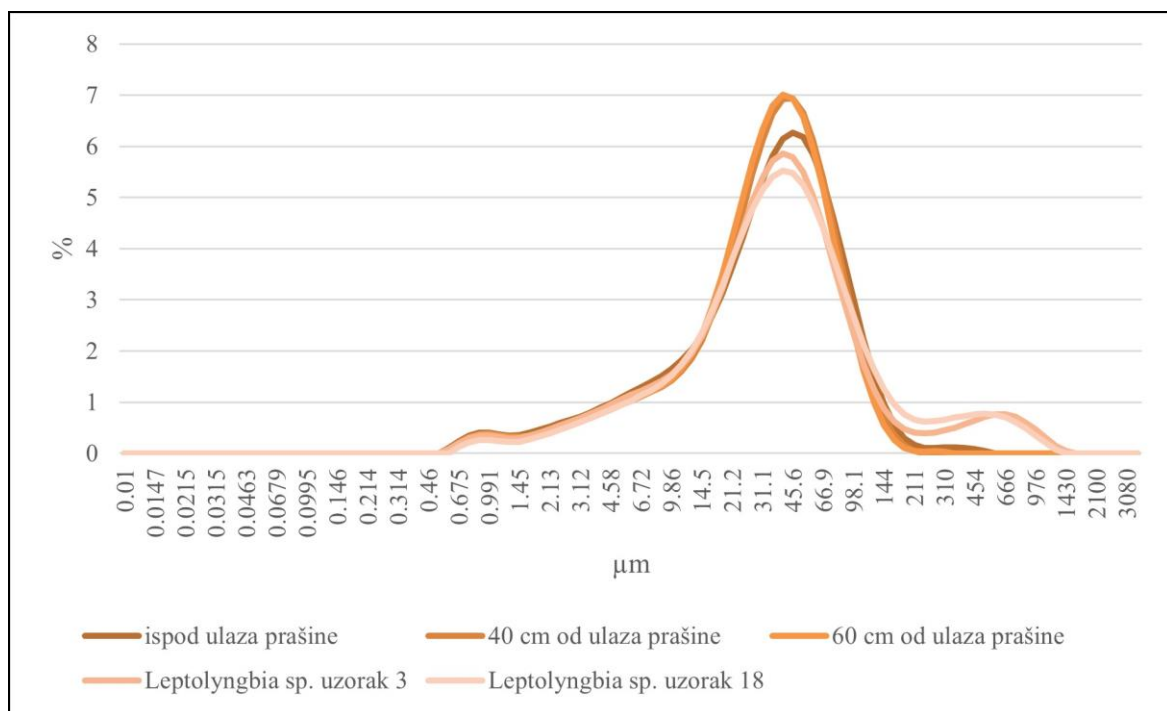
Procentualna zastupljenost određenih veličina čestica prikazana je u Tabeli 16. Najveću zastupljenost u svim ispitivanim uzorcima imale su čestice čija se veličina kreće 16-44 μm . Čestice <44 μm (<5 μm ; 5-16 μm ; 16-44 μm) su u uzorcima u kojima nije uklonjena organska materija i karbonati imale manju zastupljenost u sedimentu ispod BLP, u odnosu na navejavane čestice. Međutim, nakon uklanjanja organske materije i karbonata njihova zastupljenost je ispod BLP bila slična ili veća u odnosu na navejavane čestice. Krupnije čestice (63-125 μm i >125 μm) su bile zastupljenije u sedimentu ispod BLP u

odnosu na navejavane čestice i čestice navejane u delu komore gde je simulirana oluja prašine. Na izlazu iz prednjeg dela komore, gde su simulirane oluje prašine, zastupljenost čestica 63-125 μm je iznosila 21,47%, dok su pomenute čestice u sedimentu ispod BLP zauzimale veći udeo (28,58% u uzorku 3, odnosno 31,93% u uzorku 18). Najkrupnije čestice (>125 μm) su pre uklanjanja organske materije i karbonata bile zastupljenije u istaloženim česticama ispod BLP nego u navejavanim i navejanim česticama. One su imale 3,7 i 4,5 puta veći udeo u istaloženim česticama sedimenta ispod BLP (uzorak 3 i uzorak 18, redom) nego u navejavanim česticama i 5 i 6 puta veći udeo nego u česticama navejanim na izlazu dela komore gde je vršena simulacija oluja prašine. Međutim, nakon uklanjanja organske materije i karbonata ove čestice (>125 μm) su ipak bile zastupljenije u navejavanim i navejanim česticama. Zastupljenost čestica >125 μm u navejavanim česticama je bila 8,6 i 43 puta veća nego u uzorcima istaloženih čestica sedimenta ispod BLP (uzorak 3 i uzorak 18, redom). Zastupljenost čestica >125 μm u česticama navejanim na izlazu dela komore gde je vršena simulacija oluje prašine je bila 2,6 i 13 puta veća od uzoraka istaloženih čestica sedimenta ispod BLP (Tabela 16).

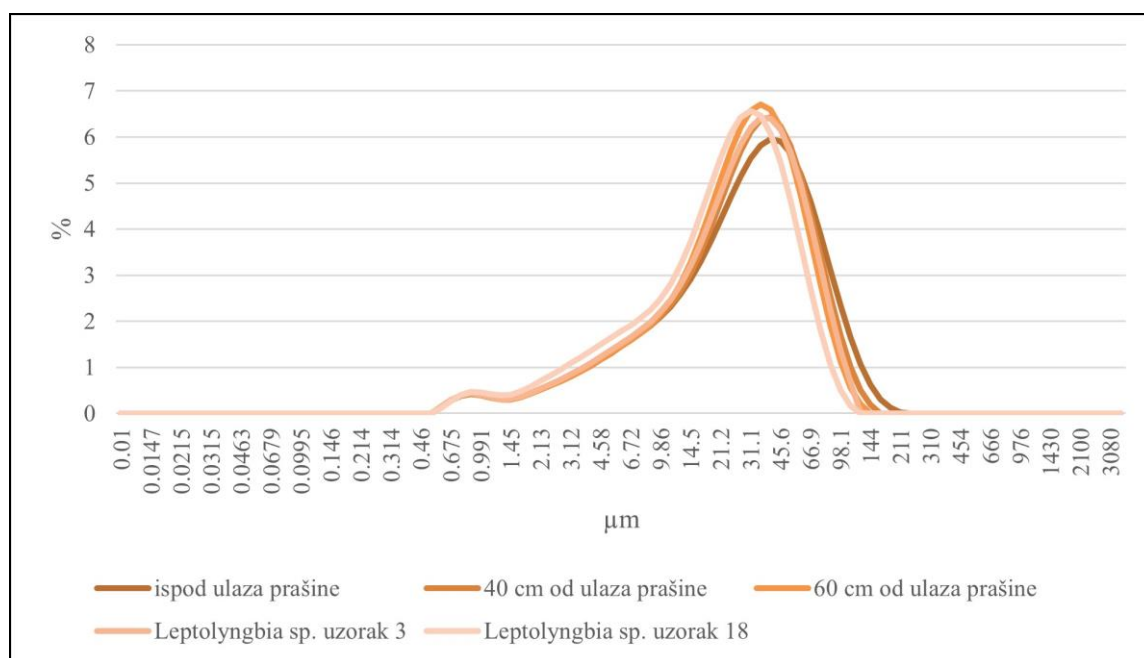
Tabela 16. Procentualni udeo određenih veličina čestica u uzorcima iz eksperimentalne komore. *nakon uklanjanja organske materije i karbonata

Uzorak čestica		<5 μm %	<5 μm* %	5-16 μm %	5-16 μm* %	16-44 μm %	16-44 μm* %	>63 μm %	>63 μm* %	>125 μm %	>125 μm* %
navejavane čestice		8,74	9,54	14,75	19,70	37,51	40,52	21,92	14,98	2,99	0,86
navejavane čestice	ispod izvora prašine	8,28	8,84	14,13	17,72	34,43	37,24	25,88	20,21	4,42	2,33
	10 cm od izvora prašine	8,18	9,2	13,6	17,64	34,69	36,29	25,77	20,79	4,02	2,35
	20 cm od izvora prašine	8,44	8,69	14,02	17,49	36,65	38,79	22,98	18,37	2,97	1,28
	30 cm od izvora prašine	7,02	8,58	12,05	17,58	37,3	39,91	24,46	17,48	2,02	1,24
	40 cm od izvora prašine	7,28	8,74	12,48	17,89	38,29	40,66	23,16	16,14	2,64	0,8
	50 cm od izvora prašine	7,79	9,04	13,26	18,88	39,26	43,54	21,25	12,67	2,06	0,3
	60 cm od izvora prašine	7,27	8,79	12,75	18,52	39,87	43,92	21,47	12,62	2,22	0,26
istaložene čestice ispod BLP	<i>Leptolyngbia</i> sp. uzorak 3	7,57	9,19	13,48	18,78	34,77	41,73	28,58	14,01	11,22	0,1
	<i>Leptolyngbia</i> sp. uzorak 18	6,19	11,18	13,1	21,63	33,92	45,46	31,93	8	13,55	0,02

Sa Grafikona 37. se može videti prisustvo čestica veličine i preko 1200 μm u uzorcima istaloženih čestica sedimenta ispod BLP iz kojih nisu uklonjene organske materije i karbonati, za razliku od uzoraka čestica navejanih u delu komore za simulaciju oluja prašine kod kojih nije uočeno prisustvo čestica većih od 210 μm u sva tri uzorka. U nekim uzorcima navejanih čestica tokom simulacija oluja prašine (uzorci na 60 cm od ulaza prašine i ispod ulaza prašine) je uočeno prisustvo čestica većih 300 i 500 μm . Nakon uklanjanja organske materije i karbonata (Grafikon 38) nije uočeno prisustvo čestica krupnijih od 127 μm u istaloženim česticama sedimenta ispod BLP, dok su u navejanim česticama uočene čestice veličine do 210 μm .



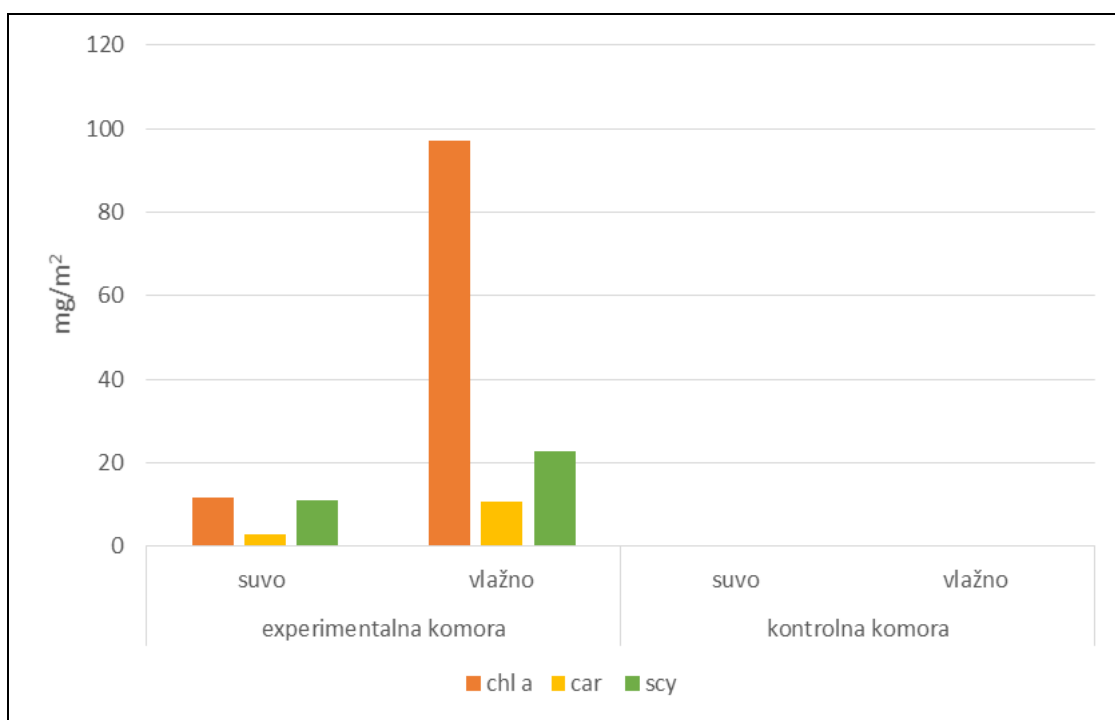
Grafikon 37. Zastupljenost određenih veličina čestica u uzorcima navejanih čestica u delu komore za simulaciju oluja prašine (ispod ulaza prašine, 40 cm od ulaza prašine i 60 cm od ulaza prašine) i istaloženih čestica sedimenta ispod BLP (*Leptolyngbia* sp. uzorak 3 i *Leptolyngbia* sp. uzorak 18)



Grafikon 38. Zastupljenost određenih veličina čestica u uzorcima navejanih čestica u delu komore za simulaciju oluja prašine (ispod ulaza prašine, 40 cm od ulaza prašine i 60 cm od ulaza prašine) i istaloženih čestica sedimenta ispod BLP (*Leptolyngbia* sp. uzorak 3 i *Leptolyngbia* sp. uzorak 18), nakon uklanjanja organske materije i karbonata iz uzoraka

4.3.5. Akumulacija pigmenata nakon navejavanja

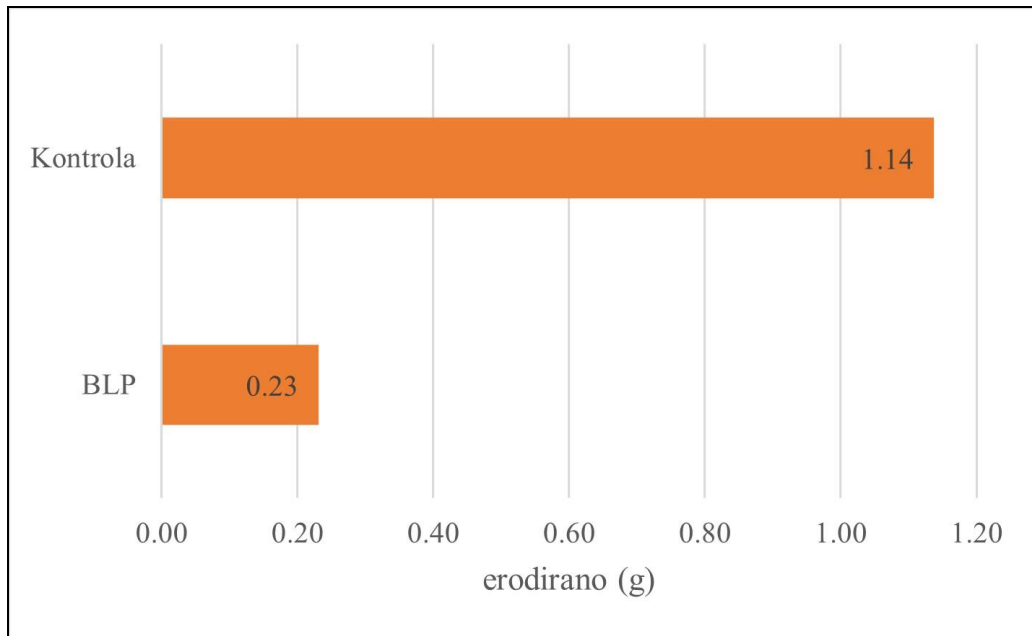
Prisustvo pigmenata u komorama, tokom suvog i vlažnog simuliranog perioda, prikazano je na grafikonu 39. Prisustvo analiziranih pigmenata (hlorofila *a*, karotenoida i scitonemina) nije nađeno u kontrolnoj komori. Akumulacija pigmenata hlorofil *a*, karotenoida i scitonemina je detektovana u eksperimentalnoj komori. Na pomenutom grafikonu se može videti i različita koncentracija pomenutih pigmenata u suvom i vlažnom stanju BLP eksperimentalne komore. Formirane biološke pokorice su na vlaženje reagovala metaboličkom reaktivacijom, što se može videti u povećanju sadržaja hlorofila *a* osam puta u odnosu na suvo stanje istih pokorica. Sadržaj karotenoida se povećao za tri ipo puta, dok se sadržaj scitonemina nakon vlaženja udvostručio.



Grafikon 39. Sadržaj pigmenta hlorofila *a*, karotenoida i scitonemina u suvom i vlažnom stanju BLP eksperimentalne i uzoraka kontrolne komore

4.3.6. Uloga bioloških lesnih pokorica u sprečavanju erozije lesnog sedimenta

Rezultati ispitivanja potencijala BLP u sprečavanju erozije lesnog sedimenta prikazani su na grafikonu 40. Sa pomenutog grafikona se može zaključiti da veštački razvijene BLP, inokulacijom soja *Nostoc* sp. IRN5D, imaju sposobnost sprečavanja erozije čestica lesnog sedimenta u odnosu na kontrolu. U kontrolnim petri pločama, gde lesni sediment nije imao razvijeni biološki pokrivač, erodirano je skoro pet puta više čestica lesnog sedimenta nakon njihovog izlaganja simuliranoj oluji vetra.



Grafikon 40. Sposobnost veštački razvijenih BLP u petri pločama, inokulacijom soja *Nostoc* sp. IRN5D, u smanjenju erozije čestica lesnog sedimenta prilikom izlaganja simuliranoj oluji vetra

5. DISKUSIJA

5.1. Produkcija toksina, biomase, polisaharida i zaštitnih pigmenata izolovanih cijanobakterijskih sojeva

5.1.1. Ekofiziologija izolovanih cijanobakterijskih sojeva

Preko 90% izolovanih cijanobakterijskih sojeva je pripadalo rodu *Nostoc*. Rod *Nostoc* je jedna od najrasprostranjenijih filamentoznih azotofiksirajućih terestričnih cijanobakterija koja ima sposobnost da formira makro i mikrokolonije (Dodds i sar. 1995). *Nostoc* sp. se pojavljuje u svim tipovima bioloških pokorica, obično u površinskim slojevima (Belnap i Lange, 2003; Büdel i sar., 2016). Istražujući cijanobakterijski diverzitet bioloških pokorica zapadne Evrope, Williams i sar. (2016) su ustanovili da je rod *Nostoc* jedan od rodova pronađenih u svim ispitivanim biološkim pokoricama. Široko rasprostranjenje roda *Nostoc* može biti posledica sposobnosti da prežive periode isušivanja (Tomaselli i Giovannetti 1993). Pored roda *Nostoc*, biološke pokorice sušnih regiona Evrope kolonizovali su i rodovi *Tolypothrix* i *Scytonema* (Roncero-Ramos i sar., 2019a). *Tolypothrix* sp. je izolovan kao dominantna cijanobakterija prilikom kultivacije jednog od uzoraka BLP iz Srbije. Heterocistne cijanobakterije, kao što su izolovani sojevi iz rodova *Nostoc* i *Tolypothrix* ove studije, mogu imati ključnu ulogu u sušnim ekosistemima učestvujući u procesima kruženja azota i ugljenika u zemljištu (Roncero-Ramos i sar., 2019a). Cijanobakterijski sojevi rodova *Nostoc* i *Tolypothrix* imaju sposobnost azotofiksacije (Belnap, 2003; Johnson i sar. 2005). U uslovima sa ograničenim izvorima azota, azotofiksirajući sojevi mogu biti favorizovani jer obezbeđuju rast i razmnožavanje cijanobakterija (Mur i sar., 1999). Giraldo-Silva i sar. (2019) su u svojoj studiji ispitujući masovnu produkciju biomase cijanobakterija za potrebe obnove bioloških pokorica favorizovali izolaciju azotofiksirajućih cijanobakterija. Prisustvo jednoćelijskih cijanobakterija roda *Chroococcidiopsis* je zabeleženo u biološkim pokoricama različitih kontinenata (Büdel i sar., 2016). Iako je soj *Chroococcidiopsis* sp. L1 neheterocistni, njegovu sposobnost azotofiksacije ne treba isključiti. Sposobnost sojeva *Chroococcidiopsis* da fiksiraju azot je poznata, ali pod posebnim uslovima kultivacije i zaštite od prisustva kiseonika (Billi i Grilli Caiola 1996; Boison i sar., 2004).

Dominacija roda *Nostoc* među izolovanim sojevima ove studije je pre svega posledica dominacije u kultivacionom medijumu tokom postupka izolacije. Masovni uzgoj terestričnih cijanobakterija može biti otežan zbog njihovog sporog rasta (Guljamov i sar., 2017). Stoga, izolacija nativnih sojeva koji se lako kultivišu može smanjiti troškove masovne produkcije biomase. Optimizacija uslova kultivacije takođe može imati značajnu ulogu u smanjenju troškova masovne produkcije biomase. Roncero-Ramos i sar. (2019b) su pokazali da se kultivacijom terestrične cijanobakterije *Nostoc commune* u medijumu napravljenom od đubriva mogu smanjiti troškovi produkcije biomase i do 295 € po hektaru, u odnosu na standardne medijume za gajenje cijanobakterija napravljene upotrebom hemikalija. Imajući u vidu da je masovna produkcija biomase jedna od aktivnosti u procesu obnove degradiranih površina, odabir sojeva koji se lako kultivišu u odabranom medijumu može doprineti smanjenju troškova potrebnih za sprovođenje procesa obnove degradiranih površina. U procesu skrininga najpodesnijih sojeva u cilju obnove degradiranih površina, nameće se zahtev za selekcijom samo onih sojeva koji nemaju potencijal produkcije cijanotoksina. Pored toga, od posebne važnosti su i sojevi koji imaju značajnu produkciju polisaharida. Sposobnost preživljavanja nepovoljnih uslova se takođe ističe kao bitna osobina izabranih sojeva. Iz tih razloga rađeni su eksperimenti analize toksičnosti izolovanih sojeva, produkcije biomase, ukupnih i izlučenih polisaharida, kao i zaštitnih pigmenata.

5.1.2. Toksičnost cijanobakterijskih sojeva

Cijanotoksini su raznovrsna grupa prirodnih toksina, kako sa hemijske tako i toksikološke tačke gledišta (Sivonen i Jones, 1999). Cijanotoksini unutar ćelije se nazivaju intracelularni, dok oslobađanjem u spoljašnju sredinu postaju ekstracelularni. Oslobađanje cijanotoksina u spoljašnju sredinu može biti tokom života ćelije, dok se najčešće dešava nakon smrti ćelije kada se cijanotoksini izlučuju zajedno sa ćelijskim sadržajem (Chorus, 2001). U okviru ove studije izvršena je procena ukupne toksičnosti izolovanih sojeva (intracelularna i ekstracelularna toksičnost zajedno) i ni jedan od testiranih cijanobakterijskih sojeva nije izazvao mortalitet larvi *Artemia salina* >20%. Najveći mortalitet je izazvan od strane soja *Tolypothrix* sp. L4, starosti 16 nedelja, nakon 48 časova izloženosti larvi račića uzorku ovog soja. Prema kriterijumima za određivanje nivoa toksičnosti cijanobakterijskih sojeva (Simeunović, 2009; 2010), testirani cijanobakterijski sojevi su izazvali nizak mortalitet (<50%).

Negativan uticaj cijanotoksina na zdravlje ljudi (Soares i sar., 2006; Svirčev i sar., 2017a; 2017b) pokazuje da je neophodna analiza cijanotoksina kako u vodenim tako i u terestričnim ekosistemima. Uloga cijanotoksina u karcinogenezi je prepoznata (Svirčev i sar., 2010; 2013a; 2014; Žegura i sar., 2011). Desetogodišnja epidemiološka studija u Srbiji je pokazala značajan porast učestalosti primarnog kancera jetre u regionima u kojima se vodosnadbevanje vrši iz cvetajućih akumulacija (Svirčev i sar., 2013a). Oštećenja ćelija jetre zavise od dužine izloženosti i koncentracije mikrocistinima. Visoke doze mikrocistina-LR (MC-LR) dovode do nekroze ćelija jetre, nešto niže (subletalne) koncentracije do apoptoze, dok niske doze dovode do proliferacije ćelija (Svirčev i sar., 2010). Hronično izlaganje niskim koncentracija MC-LR izaziva promociju tumora (Svirčev i sar., 2011). Analize prisustva cijanotoksina u biološkim pokoricama ukazuju na potencijal terestričnih cijanobakterija da produkuju cijanotoksine. Cox i sar. (2009) su identifikovali prisustvo cijanotoksina u pustinjским biološkim pokoricama, što su kasnije potvrdili drugi i autori (Metcalf i sar., 2012; 2015; Richer i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2020). Njihove studije su pokazale prisustvo mikrocistina, anatoksin-a (S), BMAA, DAB i AEG (Tabela 17). Produkcija cijanotoksina u pustinjским biološkim pokoricama je analizirana i na genskom nivou. U pokoricama pustinje u Kataru pronađeni su geni odgovorni za biosintezu mikrocistina (*mycD*) (Metcalf i sar., 2012). Kada su u pitanju BLP, pronađeni su mogući tragovi mikrocistina u dva uzorka BLP iz Irana (Dulić i sar., 2017). Prisustvo mikrocistina je detektovano u nivou nekoliko ng/g upotrebom testa inhibicije protein fosfataze, dok je test mortaliteta *Artemia salina* ukazao na moguću toksičnost samo jednog uzorka (Dulić i sar., 2017). Studija toksičnosti i prisustva cijanotoksina u BLP poreklom iz Srbije (Tokodi, 2016) nije ukazala na prisustvo cijanotoksina u analiziranim uzorcima. Imajući u vidu rasprostranjenost bioloških pokorica u pustinjama i lesnim regionima, dalja istraživanja prisustva cijanotoksina u biološkim pokoricama su neophodna.

Uništavanje bioloških pokorica aridnih i semi-aridnih sredina može dovesti do stvaranja značajne prašine u vazduhu koja u sebi sadrži ćelije cijanobakterija. Izlaganje ovakvoj prašini predstavlja opasnost od izloženosti cijanotoksinima (Cox i sar., 2009). Prašina nošena vetrom svoj negativan uticaj ispoljava kilometrima daleko od mesta porekla (Goudie, 2014). Stoga, cijanobakterije i cijanotoksini nošeni prašinom mogu uticati na udaljene terestrične i akvatične ekosisteme. Udisanje cijanotoksina kao što su BMAA i DAB može predstavljati značajan rizik u razvoju amiotrofične lateralne skleroze i drugih neurodegenerativnih bolesti (Cox i sar., 2009). Pustinjske biološke pokorice iz Katara su pokazale prisustvo cijanotoksina (Tabela 17) sa različitim delovanjem. Izloženost ovim

cijanotoksinima istovremeno predstavlja rizik od nastanka različitih oboljenja (Metcalf i sar., 2015). Uočena je akumulacija cijanotoksina (BMAA, DAB i AEG) u dubljim slojevima tla pustinje u Kataru, do dubine između 95 i 105 cm (Chatziefthimiou i sar., 2020). Ovakva akumulacija cijanotoksina može dovesti do kontaminacije podzemnih voda i indirektnog uticaja cijanotoksina poreklom iz bioloških pokorica na zdravlje ljudi, životinja i biljaka. Richer i sar. (2015) su pokazali da mehaničko oštećenje ili uklanjanje bioloških pokorica ne mora da utiče na sadržaj cijanotoksina, predstavljajući na taj način zemljište ispod pokorica rezervoarom cijanotoksina akumuliranih tokom niza godina. Kasnija emisija ovih toksina prašinom može imati značajan uticaj na zdravlje ljudi i životinja, kao i biljke.

Tabela 17. Identifikovani cijanotoksini u biološkim pokoricama aridnih i semi-aridnih sredina

Cijanotoksin	Lokalitet	Referenca
BMAA	Pustinja, Katar	Cox i sar., 2009; Metcalf i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2020;
DAB	Pustinja, Katar	Cox i sar., 2009; Metcalf i sar., 2015; Richer i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2020;
AEG	Pustinja, Katar	Metcalf i sar., 2015; Richer i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2020;
Microcistini	Pustinja, Katar	Metcalf i sar., 2012;
Anatoksin-a (S)	Pustinja, Katar	Metcalf i sar., 2012;
<i>mycD</i> gen	Pustinja, Katar	Metcalf i sar., 2012;

Ova studija je pokazala da su biološki testovi toksičnosti detektovali sojeve bez ili sa niskom toksičnosti. Nijedan soj u okviru ove studije nije izazvao mortalitet larvi račića iznad 17%. Studija toksičnosti i prisustva cijanotoksina u BLP sa Titelskog Lesnog platoa (Tokodi, 2016) takođe nije ukazala na prisustvo cijanotoksina primenom dve metode (*Artemia salina* biološki test toksičnosti i test inhibicije protein fosfataze). Potencijalna objašnjenja netoksičnosti terestričnih cijanobakterijskih sojeva su sumirana u studiji Tokodi (2016) i uključuju nedostatak kompeticije sa drugim mikroorganizmima i dostupnost nutrijenata. Iako su zabeleženi mortaliteti u ovoj studiji bili niski, većina sojeva (63,63%) je izazvala veći mortalitet u podlozi bez izvora azota. Predložena uloga najčešće pronađenog toksina u biološkim pokoricama, BMAA, je u prilagođavanju uslovima nedostatka azota (Downing i sar., 2011; 2015). Primećena je veća koncentracija BMAA pri nedostatku azota, dok je izlaganje izvoru azota rezultiralo smanjenjem koncentracije BMAA (Downing i sar., 2011).

Rezultati ove studije i dostupna literatura pokazuju da su neophodna dalja istraživanja toksičnosti terestričnih cijanobakterija, kao i eventualne sudbine i uloge cijanotoksina u terestričnim ekosistemima. U slučaju upotrebe selektovanih sojeva cijanobakterija u aktivnostima restoracije oštećenih pokorica lesnih sedimenata i područja zahvaćenih dezertifikacijom svakako bi bilo neophodno ispitati i prisustvo gena koji kodiraju poznate cijanotoksine.

5.1.3. Produkcija biomase cijanobakterijskih sojeva

Azot je jedan od najvažnijih hranljivih sastojaka potrebnih za rast cijanobakterija, sintezu proteina i drugih ćelijskih komponenti (Kharzi i sar., 2018; Aboim i sar., 2019). Cijanobakterije se ističu po sposobnosti da fiksiraju N_2 iz vazduha i u procesu azotofiksacije ga pretvore u amonijak. Međutim, proces azotofiksacije je energetski zahtevan proces. Studije su pokazale da prisustvo izvora azota u hranljivoj podlozi doprinosi povećanju biomase kultura cijanobakterija (Chaneva i sar., 2007; Yu i sar., 2010; Babić, 2018; Aboim i sar., 2019). Cijanobakterije mogu da koriste različite izvore azota kao što su amonijum, nitrat, nitrit, ureu, aminokiseline (Herrero i sar., 2001). Korišćeni izvor azota ($NaNO_3$) u okviru ove studije je pospešio produkciju biomase kod većine testiranih sojeva nakon sedam nedelja kultivacije (18 od 22 testirana soja) i nakon 16 nedelja kultivacije (21 od 22 testirana soja). Druge studije su isto pokazale da upotreba $NaNO_3$ kao izvora azota može da pospeši produkciju biomase cijanobakterija (Yu i sar., 2010; Babić, 2018; Kharzi i sar., 2018; Aboim i sar., 2019). Posmatrani uticaj izvora azota je potvrđen statističkom analizom rezultata koja je pokazala da sastav kultivacionog medijuma (izvor azota) ima veći uticaj na produkciju biomase izolovanih sojeva, u odnosu na uticaj pojedinačnog soja koji takođe ima statistički značajan uticaj. Rezultati ove studije su u skladu sa zapažanjem Kharzi i sar. (2018) koji su istakli da vrsta izvora azota u medijumu igra značajnu ulogu u određivanju rasta cijanobakterija i produkcije pigmenata. Njihovi rezultati su pokazali da NH_4Cl može imati stimilirajući efekat na produkciju biomase sojeva *Phormidium* sp. i *Pseudoscillatoria* sp., dok kod soja *Arthrospira platensis* deluje inhibirno i izaziva uginuće kulture.

Najveća izmerena biomasa nakon sedam nedelja kultivacije iznosi 941,17 mg/L (*Nostoc* sp. M1, u podlozi sa izvorom azota). Prema Ördog (2001), veoma produktivnim sojevima se smatraju oni kod kojih je finalna biomasa kulture oko 2 mg/mL, dok dobri producenti biomase postižu produkciju između 1 i 2 mg/mL. Prema pomenutoj klasifikaciji,

sojevi izolovani u okviru ove studije se ne mogu smatrati dobrim producentima biomase nakon sedam nedelja kultivacije. Međutim, u toku posmatranog perioda oni nisu dostigli maksimalnu produkciju biomase obzirom da se većina sojeva i u sedmoj nedelji kultivacije nalazila u eksponencijalnoj fazi rasta. Guljamow i sar. (2017) su istakli da biotehnoška primena terestričnih sojeva cijanobakterija može biti ograničena poteškoćama u produkciji dovoljne količine biomase jer ih karakteriše spor rast. Sa druge strane, ovi sojevi mogu biti od velikog biotehnoškog značaja zbog dugog održavanja eksponencijalne faze rasta. Prema Svirčev (2005), ključem uspešne proizvodnje biomase se smatra održavanje kulture u eksponencijalnoj fazi rasta jer se time ćelije održavaju u primarnom metabolizmu i dobija se biomasa bez sekundarnih metabolita.

Odsustvo izvora azota u kultivacionom medijumu je rezultiralo ranijim dostizanjem stacionarne faze rasta kod nekih sojeva (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. IRN6). Jedini soj koji je dostigao stacionarnu fazu rasta, nezavisno od prisustva izvora azota, je soj *Nostoc* sp. IRN6. Najranije dostizanje maksimalne produkcije biomase i kasnije uginuće kulture je uočeno kod soja *Chroococcidiopsis* sp. L1. Iako neki sojevi *Chroococcidiopsis* imaju sposobnost azotifiksacije, za to su potrebni posebni uslovi kao što su nizak intenzitet svetlost i niži sadržaj kiseonika (Billi i Grilli Caiola 1996; Boison i sar., 2004). Obzirom da pomenuti uslovi nisu zadovoljeni u okviru ove studije, u 16. nedelji kultivacije je uočeno uginuće kulture ovog soja.

Nakon 16 nedelja kultivacije došlo je do povećanja biomase kod većine (14 sojeva) testiranih sojeva u oba testirana medijuma, u odnosu na sedmu nedelju kultivacije. Iako je kod sojeva *Nostoc* sp. IRN6 (u podlogama BG11 N+ i BG11 N-), *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. GP14 (u podlozi BG11 N- oba) tokom prvih sedam nedelja kultivacije zabeležen blagi pad u količini produkovane biomase u određenom trenutku, izmerena je veća količina biomase u 16. nedelji kultivacije u odnosu na sedmu nedelju. Ovakav obrazac ponašanja sojeva ukazuje da je u međuvremenu (između sedme i 16. nedelje kultivacije) došlo do oporavka kultura i ponovnog rasta biomase. Soj koji je produkovao najveću biomasu nakon sedam nedelja kultivacije (*Nostoc* sp. M1) je jedini pokazao smanjenje biomase u obe testirane podloge u 16. nedelji kultivacije. Kod ostalih sojeva je vrsta izvora azota imala ulogu u određivanju rasta između sedme i 16. nedelje kultivacije. Odsustvo izvora azota je dovelo do ranijeg dostizanja stacionarne faze rasta i smanjenja biomase u 16. nedelji kultivacije kod šest testiranih sojeva (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. ZJ1). Stoga, upotrebom NaNO_3

kao izvora azota ovi sojevi bi se mogli duže održavati u eksponencijalnoj fazi rasta. Smanjenje biomase sojeva *Chroococcidiopsis* sp. L1 i *Nostoc* sp. L6 u 16. nedelji kultivacije u podlozi BG11 N- je opravdano uzimajući u obzir da su maksimalnu produkciju biomase, a zatim postepen pad, pokazali već u toku prvih sedam nedelja kultivacije (4. i 6. nedelja). Rezultati ukazuju da je kod ostalih sojeva (*Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. ZJ1) prilikom kultivacije u podlozi bez izvora azota stacionarna faza dostignuta u periodu između sedme i 16. nedelje kultivacije. Samo je soj *Nostoc* sp. L2-2 ranije dostigao stacionarnu fazu u podlozi sa izvorom azota i pokazao smanjenje biomase u 16. nedelji kultivacije, u odnosu na sedmu nedelju kulivacije. Stoga, pored vrste izvora azota na produkciju biomase značajno utiče i trajanje kultivacije, kao i specifičnosti samih sojeva.

Nakon 16 nedelja kultivacije šest sojeva (*Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN8) je pokazalo produkciju biomase iznad 2 mg/mL. Prema klasifikaciji Ördog, (2001), ovi sojevi se mogu smatrati visoko produktivnim sojevima. Sojevi *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. IRN5I se ističu po visokoj produkciji u obe testirane podloge. Soj *Nostoc* sp. L5 se dodatno izdvojio po produkciji slične biomase u obe testirane podloge i po najvećoj produkovanoj biomasi u podlozi bez izvora azota. Najveća izmerena biomasa nakon 16. nedelja je iznosila čak 3240,73 mg/L, produkovana od strane soja *Nostoc* sp. IRN8 u podlozi sa izvorom azota. Još osam testiranih sojeva se mogu klasifikovati kao dobri producenti, od kojih su dva soja to svojstvo pokazala u obe testirane podloge (*Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN6), a preostali samo u podlozi sa izvorom azota (*Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. ZJ1). Stoga, od ukupno 22 testirana soja, 14 sojeva je pokazalo visoku produkciju biomase. Iako poreklom terestrični, sojevi izolovani iz BLP mogu biti kultivisani u tečnom medijumu i produkovati značajnu količinu biomase, a samim tim omogućiti dovoljnu količinu biomase za inokulaciju degradiranih površina ili upotrebu u druge biotehnoške svrhe.

Studije su pokazale da povećanje intenziteta svetlosti i trajanja osvetljenja (Chaneva i sar., 2007; Kovač i sar., 2017; Kovač, 2017; Aboim i sar., 2019), kao i dodavanje izvora organskog ugljenika u medijum (Kovač i sar., 2017; Kovač, 2017) mogu povećati produkciju biomase.

5.1.4. Produkcija polisaharida cijanobakterijskih sojeva

Lynch i Bragg (1985) su kao dva glavna mehanizma u stabilizaciji tla istakli sposobnost mikroorganizama, uglavnom filamentoznih, da mehanički vezuju čestice i proizvode materije koje imaju sposobnost povezivanja čestica. Cijanobakterije svojom površinskom mrežom filamenata vrše mehaničko povezivanje čestica, dok istovremeno imaju ulogu lepka zbog egzopolisaharida koje luče (Malam Issa i sar., 2001). Hu i sar. (2003) su utvrdili direktnu povezanost produktivnosti egzopolisaharida i sposobnosti sojeva u stabilizaciji čestica peska. Stoga, ispitivanje potencijala cijanobakterijskih sojeva u produkciji egzopolisaharida zaslužuje posebnu pažnju kada je u pitanju njihova upotreba u obnovi degradiranih površina.

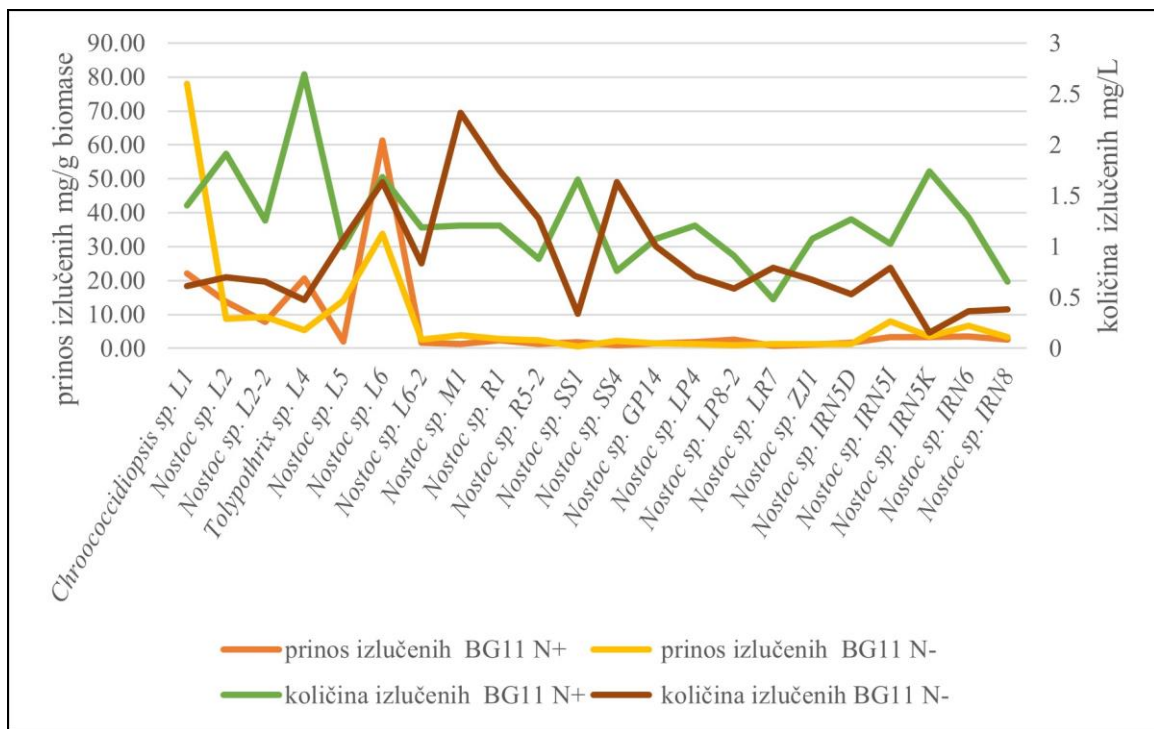
Produkcija izlučenih polisaharida testiranih sojeva nije uvek pratila produkciju ukupnih polisaharida. Sojevi sa najvećom količinom izlučenih polisaharida nisu proizveli i najveće količine ukupnih polisaharida u datoj podlozi tokom ispitivanih perioda kultivacije. Singh i Das (2011) su ispitujući produkciju polisaharida cijanobakterija takođe primetili da su se kao najbolji producenti izlučenih i ukupnih polisaharida izdvojili različiti sojevi. U podlozi sa izvorom azota, soj *Tolypothrix* sp. L4 se istakao kao soj sa najvećom količinom izlučenih i ukupnih polisaharida u kultivacionom medijumu u sedmoj nedelji kultivacije.

Otero i Vincenzini (2003) su pokazali da je uticaj prisustva nitrata kao izvora azota na produkciju ukupnih i izlučenih polisaharida tri soja roda *Nostoc* specifičan za svaki soj. Ova studija je pokazala da prisustvo/odsustvo izvora azota deluje različito na prinos ukupnih i izlučenih polisaharida kod sojeva *Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L2-2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN6, *Nostoc* sp. IRN8. Da je prinos polisaharida specifičan za soj potvrđuje i statistička analiza koja je pokazala da na prinos izlučenih i ukupnih polisaharida najveći uticaj ima specifičnost izolovanog soja. Prinosi izlučenih polisaharida u okviru ove studije su u skladu sa vrednostima dobijenim u studiji Richert i sar. (2005), iako je kultivacija njihovih sojeva vršena pod drugačijim uslovima: konstantno osvetljenje, viša temperatura, aeracija i mehaničko mešanje. Brojne studije su pokazale da konstantno osvetljenje, veći intenzitet svetlosti, visoke temperature i aeracija mogu značajno poboljšati sintezu izlučenih polisaharida (Moreno i sar., 1998; Nicolaus i sar., 1999; Trabelsi i sar., 2009; Mota i sar., 2013). Dalja optimizacija uslova kultivacije bi mogla rezultirati većim prinosom izlučenih polisaharida nego što je izmereno u okviru ove studije. Stoga, neophodna je optimizacija uslova kultivacije u skladu sa karakteristikama soja i potrebama za određenim

tipom polisaharida. Imajući u vidu da je azot jedan od dva najbitnija limitirajuća faktora u sušnih predelima, uticaj azota na produkciju egzopolisaharida predstavlja jedan od bitnih faktora kultivacije prilikom odabira sojeva za obnovu degradiranih površina.

Ova studija je potvrdila ranija zapažanja (sumirano u Pereira i sar., 2009; Rossi i De Philippis, 2015) o različitom uticaju izvora azota na sintezu egzopolisaharida. Uticaj izvora azota na prinos izlučenih polisaharida i količinu izlučenih polisaharida za svaki soj u sedmoj nedelji kultivacije može se videti na grafikonu 41. Prisustvo izvora azota je stimulisalo i količinu i prinos izlučenih polisaharida sojeva *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LP8-2 u oba posmatrana kultivaciona perioda, dok su sojevi *Nostoc* sp. M1 i *Nostoc* sp. R5-2 stimulisani odsustvom izvora azota u podlozi. Kod sojeva *Chroococcidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. SS4, *Nostoc* sp. ZJ1, *Nostoc* sp. IRN8 je izmerena veća količina izlučenih polisaharida u podlozi BG11 N+ u jednom od perioda kultivacije, ali je prinos uvek bio veći u podlozi bez azota. Prethodne studije su uočile da nedostatak izvora azota stimuliše sintezu egzopolisaharida (De Philippis i sar., 1993; Otero i Vincenzini, 2003; Pereira i sar., 2009). U uslovima nedostatka izvora azota dolazi do povećanja odnosa ugljenika i azota zbog čega u cilju skladištenja ugljenika dolazi do sinteze polisaharida koji kasnije predstavljaju rezervoar ugljenika (Otero i Vincenzini, 2003). U okviru ove studije je primećeno da i drugačiji uslovi kultivacije, u pogledu prisustva izvora azota, mogu različito delovati na prinos izlučenih polisaharida jednog istog soja u različitim fazama rasta kultura. Sojevi *Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, *Nostoc* sp. IRN6 su u sedmoj nedelji kultivacije imali bolji prinos izlučenih polisaharida u uslovima bez izvora azota, dok je prinos u starijim kulturama bio bolji sa izvorom azota. Za razliku od njih, kod sojeva *Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. IRN5D je bolji prinos u podlozi BG11 N+ u sedmoj nedelji kultivacije zamenjen boljim prinosom u BG11 N- u starijim kulturama. Statistička analiza podataka je potvrdila da statistički značajan uticaj na količinu izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu i prinos izlučenih polisaharida imaju pojedinačni sojevi i sastav mineralne podloge. Nekoliko studija je pokazalo da se produkcija egzopolisaharida pojačava ulaskom kulture u stacionarnu fazu rasta (De Philippis i Vincenzini, 1998; Moreno i sar., 1998; Su i sar., 2007), što je u okviru ove studije dovelo do većeg prinosa izlučenih polisaharida starijih kultura u drugom kultivacionom medijumu u odnosu na sedmu nedelju. Kod sojeva *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. IRN6 je u prvom posmatranom periodu došlo do dostizanja stacionarne faze u podlozi BG11 N- u kojoj je i prinos bio veći. Kasnija promena boljeg prinosa u drugom kultivacionom medijumu može

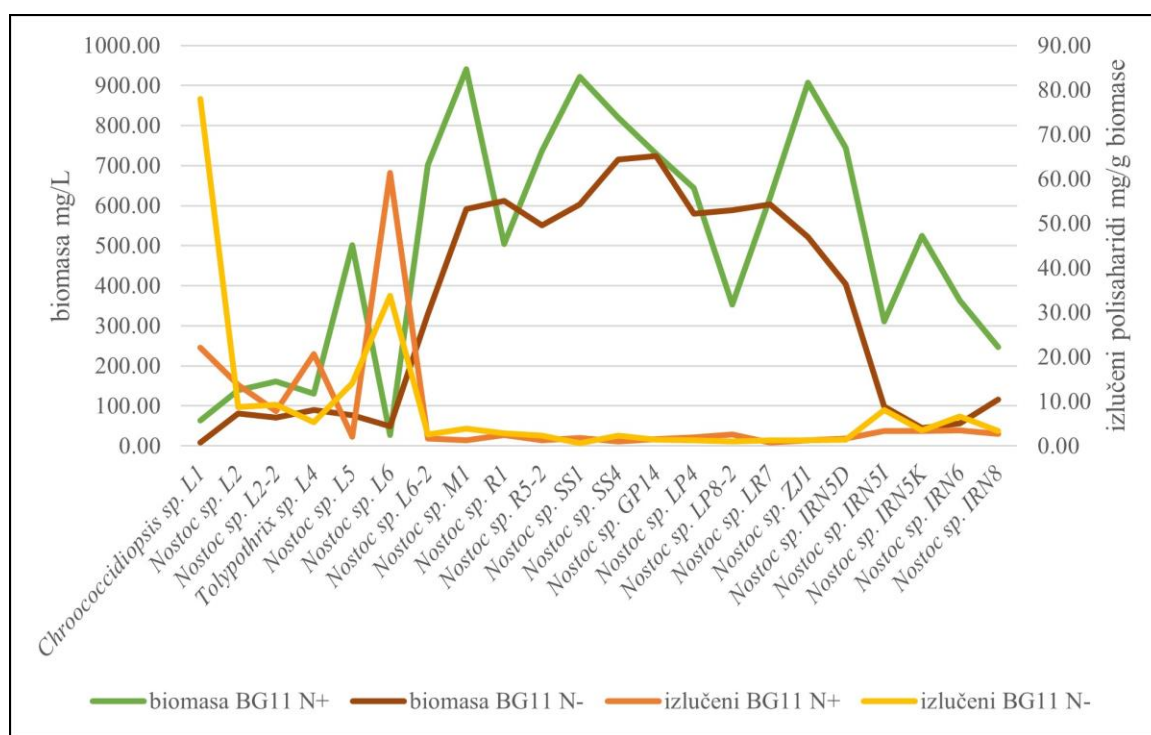
biti posledica oporavka kulture u podlozi BG11 N- i ponovnog usmeravanja energije na rast, zbog čega je prinos izlučenih polisaharida starijih kultura bio bolji u podlozi BG11 N+. Druge studije su pokazale da su cijanobakterije sposobne da za potrebe rasta koriste ugljenik iz egzopolisaharida dobijen njihovom razgradnjom pod uticajem ekstracelularnih enzima (Stuart i sar., 2016a; 2016b). Kultivacija sojeva nakon sedme nedelje je nastavljena u uslovima smanjenog intenziteta svetlosti, što je u skladu sa zapažanjem Stuart i sar. (2016a) o većoj aktivnosti enzima koji razlažu egzopolisaharide tokom tamne faze kultivacije. Kultivacija sojeva u ovim uslovima smanjenog intenziteta svetlosti od sedme do 16. nedelje opravdava uočeno smanjenje količine izlučenih polisaharida sojeva *Tolypothrix* sp. L4 i *Nostoc* sp. SS1 u podlozi sa izvorom azota i sojeva *Nostoc* sp. L2-2, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5I u podlozi bez izvora azota uprkos povećanju biomase. Su i sar. (2007) su takođe primetili smanjenje produkcije egzopolisaharida soja *Cyanothece* sp. 113 u kulturama starijim od 12 dana usled njihove razgradnje enzimima u starijim kulturama. Kod sojeva *Tolypothrix* L4, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5D, *Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5K, je uočena promena prinosa ali ne i dostizanje stacionarne faze kultura. Obzirom da su se njihove kulture još uvek nalazile u ekspanzionalnoj fazi rasta, intenzitet svetlosti je još uvek bio visok zbog manje gustine kultura. Pokazano je da svetlost ima pozitivan uticaj na produkciju egzopolisaharida (Otero i Vincenzini, 2003; Khattar i sar., 2010; Yu i sar., 2010). Sinergistički efekat smanjenog intenziteta svetlosti, prisustva/odsustva izvora azota i starosti kulture mogu biti razlog uočenih promene u prinosu izlučenih polisaharida. Rezultati ove studije su u skladu sa prethodnim zaključcima da je odgovor cijanobakterija na izvor azota u pogledu produkcije egzopolisaharida specifičan za vrstu (De Philippis i Vincenzini, 1998; De Philippis i sar., 1998; Nicolaus i sar., 1999; Pereira i sar., 2009).



Grafikon 41. Odnos uticaja prisustva/odsustva izvora azota na prinos izlučenih polisaharida i količinu izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu izolovanih cijanobakterijskih sojeva u sedmoj nedelji kultivacije

Ova studija je pokazala da produkcija izlučenih i ukupnih polisaharida u kultivacionoj podlozi ne mora da prati produkciju biomase, nego predstavlja sposobnost pojedinačnog soja u produkciji polisaharida. Soj sa najvećom količinom izlučenih polisaharida (*Nostoc* sp. L2, nakon 16 nedelja kultivacije, u podlozi BG11 N+) se nije izdvojio ni kao visoko produktivan, ni kao dobar producent biomase. Nakon sedam nedelja kultivacije, najveću količinu izlučenih i jednu od najvećih količina ukupnih polisaharida je imao soj *Tolypothrix* sp. L4 (podloga BG11 N+) koji se takođe nije istakao po produkciji biomase. Kada je u pitanju količina ukupnih polisaharida nakon 16 nedelja kultivacije, soj sa najvećom količinom ukupnih polisaharida (*Nostoc* sp. IRN5I) se jeste pokazao kao veoma produktivan soj biomase, ali nije produkovao najviše biomase među testiranim sojevima. Rezultati ovih istraživanja su u skladu sa drugim studijama (Moreno i sar., 1998; 2003; Otero i Vincenzini, 2003) koje su pokazale da uslovi kultivacije koji pospešuju produkciju biomase određenog soja ne moraju delovati isto i na produkciju polisaharida. Prinos izlučenih polisaharida i produkcija biomase su takođe kod većine sojeva bili stimulirani različitim uslovima kultivacije (Grafikon 42), u pogledu prisustva izvora azota u kultivacionom medijumu. Ovi rezultati su u skladu sa statističkom obradom podataka koja je pokazala da različiti faktori imaju značajniji uticaj na

prinos izlučenih polisaharida (pojedinačni soj) i produkciju biomase (sastav kultivacionog medijuma). Prinos izlučenih polisaharida i produkcija biomase u sedmoj nedelji kultivacije su kod sedam sojeva (*Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. R1, *Nostoc* sp. SS1, *Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP4, *Nostoc* sp. IRN5D) bile stimulisane istim uslovima kultivacije u pogledu prisustva izvora azota u medijumu.

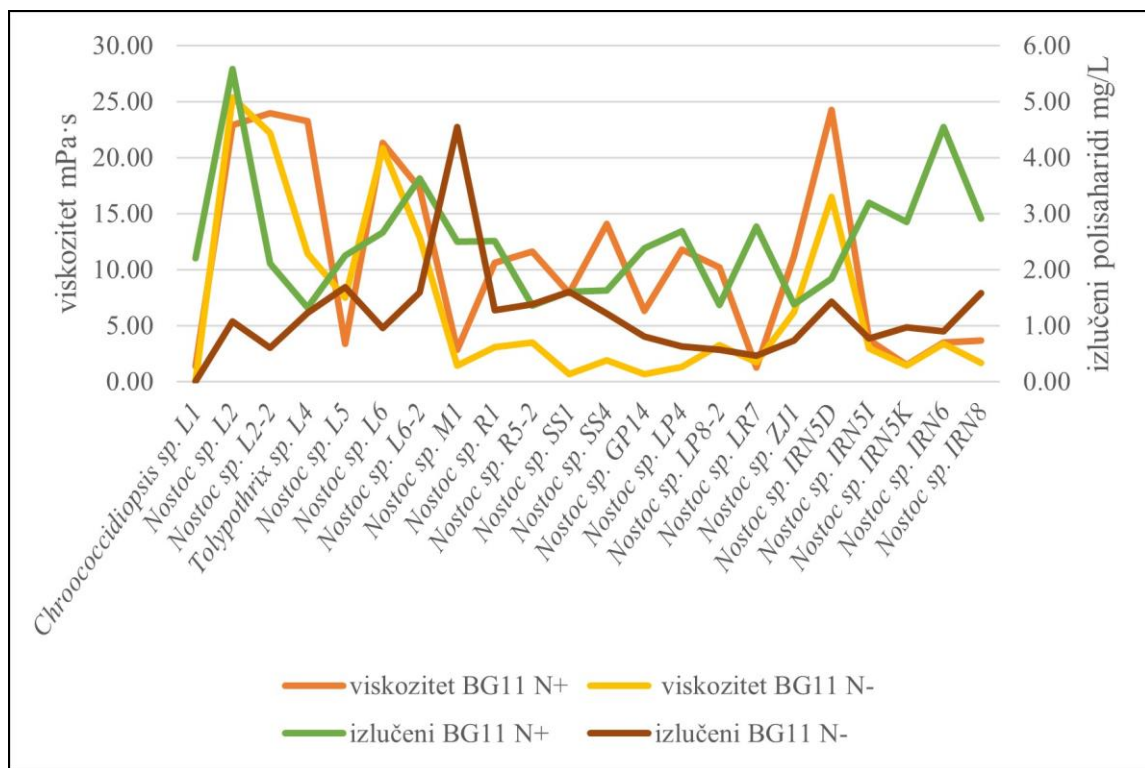


Grafikon 42. Odnos uticaja prisustva/odsustva izvora azota na produkciju biomase i prinos izlučenih polisaharida izolovanih cijanobakterijskih sojeva u sedmoj nedelji kultivacije

Izlučeni polisaharidi soja *Nostoc* sp. IRN6 su u kulturi staroj sedam nedelja činili 76,83% ukupnih polisaharida, dok je udeo izlučenih polisaharida nekih starijih kultura bio još veći, na primer soj *Nostoc* sp. L2-2 (84,9%). De Philippis i sar. (1998) su pokazali da izlučeni polisaharidi biotehnoški perspektivnih sojeva roda *Cyanothece* nisu činili preko 70% ukupnih polisaharida. Ovi rezultati ukazuju na visok potencijal ispitivanih sojeva u produkciji izlučenih polisaharida. Sojevi *Nostoc* sp. L6-2 u obe podloge, soj *Nostoc* sp. M1 u podlozi bez azota i soj *Nostoc* sp. IRN6 u podlozi sa azotom su se istakli po udelu izlučenih polisaharida u oba posmatrana perioda koji su činili više od 50% ukupnih polisaharida. Ovi rezultati su pokazali da je sposobnost izlučivanja polisaharida specifična za pojedinačni soj i da može biti uslovljena prisustvom izvora azota u kultivacionom medijumu. Zapažanja ove studije su u skladu sa prethodnim zaključcima da produkcija egzopolisaharida cijanobakterija

većinom zavisi od vrste cijanobakterije i uslova kultivacije (Nicolaus i sar., 1999; Pereira i sar., 2009; De Philippis i Vincenzini, 1998).

Proizvodnja izlučenih polisaharida uzrokuje progresivno povećanje viskoznosti kultivacionog medijuma (De Philippis i sar., 1991; De Philippis i Vincenzini, 1998). Uticaj izvora azota na količinu izlučenih polisaharida i viskozitet kultivacionog medijuma je bio različit (Grafikon 43). Nakon sedam nedelja kultivacije kod većine (16 sojeva) sojeva je količina bila veća u podlozi BG11 N+, dok je viskozitet kod većine sojeva bio veći u podlozi BG11 N-. Nakon 16 nedelja kultivacije je viskozitet bio veći kod većine sojeva u podlozi BG11 N+, kao i količina (Grafikon 43). Ovi rezultati su u skladu sa statističkim analizama koje pokazuju da najveći uticaj na viskozitet medijuma izolovanih sojeva i količinu izlučenih polisaharida ima sastav kultivacionog medijuma (izvor azota), ali da statistički značajno utiče i izolovani soj.



Grafikon 43. Odnos uticaja prisustva/odsustva izvora azota na viskozitet i količinu izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu izolovanih cijanobakterijskih sojeva u 16. nedelji kultivacije

Viskozitet kultivacionog medijuma u ovoj studiji nije pokazao striktnu pozitivnu korelaciju sa prinostom ili količinom izlučenih polisaharida (Grafikon 43). Nakon sedam nedelja kultivacije najviši viskozitet je dobijen u kulturi soja *Nostoc* sp. LP8-2 (18,99 mPa·s) čiji su i količina i prinos izlučenih polisaharida bili među nižim vrednostima u okviru ove

studije. Soj sa najvećim prinosom *Chroococidiopsis* sp. L1 je imao niži viskozitet (6,76 mPa·s), dok je soj sa najvećom količinom *Tolypothrix* sp. L4 imao veoma nizak viskozitet (0,37 mPa·s). U starijim kulturama je najviši viskozitet izmeren kod soja *Nostoc* sp. L2 u podlozi BG11 N- koji je imao četvrti po redu prinos izlučenih polisaharida. Pomenuti soj je imao najveću količinu izlučenih polisaharida, ali u podlozi sa izvorom azota gde je izračunat viskozitet bio nešto niži (22,88 mPa·s). Ostali sojevi sa visokim viskozitetom (*Nostoc* sp. L2-2 i *Nostoc* sp. L6, u obe podloge) su se istakli po prinosu, ali ne i po količini izlučenih polisaharida. Takođe, soj *Nostoc* sp. L2-2 se po prinosu istakao samo u podlozi BG11 N+. Rezultati ove studije ukazuju na to da ključnu ulogu u određivanju viskoziteta kultivacionog medijuma nema količina ili prinos izlučenih polisaharida. Hu i sar. (2003) su u svojoj studiji takođe zapazili da soj (*Microcoleus vaginatus*) sa najvećim sadržajem šećera ima najnižu vrednost viskoziteta. Whistler i Daniel (1990) su pokazali da polisaharidi većih molekulskih masa i linearnije strukture imaju veći viskozitet. Cijanobakterije su poznate po produkciji egzopolisaharida velikih molekulskih masa (Pereira i sar., 2009), čak većih od sirove ksantanske gume (Rončević i sar., 2019). Na primer, *Cyanospira capsulata*, *Anabaena spiroides* i *Phormidium* 94 proizvode egzopolisaharide čije molekulske mase iznose oko 2 MDa (Pereira i sar., 2009). Na viskozitet utiče i prisustvo naelektrisanih grupa, proteinskih ostataka i neorganskih soli u izlučenim polisaharidima, kao i pH vrednost (De Philippis i Vincenzini, 1998; Hu i sar., 2003). Stoga, iako su prinos i/ili količina izlučenih polisaharida nekih sojeva bili niski, kvalitet izlučenih polisaharida u pogledu molekulskih masa, sadržaju monosaharida, zastupljenost naelektrisanih grupa i proteina u njihovom sastavu mogu uticati na viskozitet. Ovi rezultati su skladu sa zapažanjem Otero i Vincenzini (2003), da je uticaj prisustva kombinovanog azota na sintezu polisaharida specifičan za svaku vrstu.

5.1.5. Produkcija zaštitnih pigmenata cijanobakterijskih sojeva

Smanjenjem ozonskog omotača došlo je do povećanja štetnog UV zračenja koje dospe do Zemljine površine. UV zračenje ima direktan i indirektan štetan uticaj na cijanobakterije zbog apsorpcije biomolekulima (na primer: nukleinske kiseline i proteini) i UV-indukovanog oksidativnog stresa, što može da dovede do letalnog ishoda (Singh i sar., 2010). Singh i sar. (2010) su u okviru svoje studije sumirali uočene uticaje UV zračenja na cijanobakterije: oštećenje proteina i DNK, odložena diferencijacija vegetativnih ćelija u heterociste i akinete, raskidanje filamenata, promene u pokretljivosti i orijentaciji ćelija u

zajednici, otežan rast i preživljavanje, smanjenje sadržaja fikobiliproteina i gubitak nitrogenaze. Međutim, cijanobakterije su razvile nekoliko mehanizama odbrane od štetnog UV zračenja (Singh i sar., 2010; Rastogi i sar., 2014), od kojih je jedan i produkcija UV zaštitnih pigmenata.

Poredeći sposobnost sojeva da produkuju ispitivane UV zaštitne pigmente primećeno je da 16 sojeva ima sposobnost produkcije MOMA, u odnosu na produkciju MOSA koju je pokazalo 11 testiranih sojeva. Ispitujući sposobnost produkcije MOMA i MOSA kod 15 cijanobakterijskih sojeva, Lalić i sar. (2020) su zabeležili produkciju MOMA kod svih sojeva, dok je prisustvo MOSA zabeleženo kod osam cijanobakterijskih kultura (Lalić i sar., 2020). Nasuprot MOSA jedinjenja čija je produkcija najčešće stimulirana UV zračenjem, MOMA metaboliti mogu biti sintetisani kao odgovor na druge stresne faktore kao što su temperatura, pH ili azot zbog čega se mikosporin smatra stresom indukovanim metabolitom (Pantelić, 2017; Lalić i sar., 2020).

Devet testiranih sojeva (*Nostoc* sp. L2, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6, *Nostoc* sp. L6-2, *Nostoc* sp. M1, *Nostoc* sp. R5-2, *Nostoc* sp. LP8-2, *Nostoc* sp. LR7, *Nostoc* sp. IRN5D) je pokazalo da ima sposobnost da produkuje oba testirana zaštitna pigmenta. Produkciju MOSA su pokazali samo sojevi roda *Nostoc*, dok je produkcija MOMA primećena i kod rodova *Chroococcidiopsis* i *Tolypothrix*. Mnoge studije su zabeležile produkciju mikosporina (Böhm i sar., 1995; Sinha i sar., 2003; Matsui i sar., 2011; Roshan i sar., 2015; Rastogi i sar., 2016; Lalić i sar., 2020) i scitonemina (Fleming i Castenholz, 2007; 2008; Chen i sar., 2013; Gao, 2017; Lalić i sar., 2020) od strane cijanobakterijskih vrsta roda *Nostoc*. Produkcija oba testirana UV zaštitna metabolita kod pomenutih sojeva može biti potreba određenog soja za većom zaštitom od štetnog UV zračenja, koju produkcijom samo jednog metabolita nije moguće postići. Produkcija obe vrste zaštitnih metabolita uočena je i u drugim studijama (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993; Pantelić, 2017; Lalić i sar., 2020). Iako u ovoj studiji nije uočena produkcija metabolita u opsegu scitonemin apsorbanca od strane cijanobakterijskog soja *Chroococcidiopsis* sp. L1, druge studije su pokazale sposobnost cijanobakterija roda *Chroococcidiopsis* da produkuje scitonemin (Dillon i Castenholz, 1999; Dillon i sar., 2002; Fleming i Castenholz, 2007). Soj *Tolypothrix* sp. L4 nije produkovao scitonemin. Međutim, Adhikary i Sahu (1998) su pokazali da *Tolypothrix byssoidea* ima značajan stepen apsorpcije na 384 nm što odgovara prisustvu scitonemina. Pantelić (2017) je u svojoj studiji uočila pik scitonemina kulture koju su činili *Tolypothrix* sp. i *Oculatella* sp..

Većina sojeva koja je produkovala metabolite scitonemin opsega je tu produkciju pokazala u podlozi bez izvora azota. Primećen je stimulirajući efekat odsustva azota na

produkciju scitonemina i u drugim studijama (Fleming i Castenholz, 2008; Lalić i sar., 2020). Za razliku od MOSA, produkcija MOMA je većinom bila zabeležena u podlozi sa izvorom azota. Jedino soj *Nostoc* sp. L2 nije sintetisao MOMA u podlozi BG11 N+. Stimulativni efekat prisustva izvora azota u medijumu na produkciju mikosorina je uočen i u drugim studijama (Singh i sar., 2008; Yadav i sar., 2011; Lalić i sar., 2020).

Apsorpcijom UV-A zračenja scitonemin može da spreči čak 90% pomenutog zračenja da dodje do ćelije (Garcia-Pichel i sar., 1992). Efikasnost mikosporinu sličnih aminokiselina u zaštiti od štetnog UV zračenja zavisi od njihovog lokaliteta u ćeliji (Singh i sar., 2010). Značajan, ali ograničen, stepen zaštite pružaju ovi molekuli kada se nalaze u citoplazmi ćelije (Garcia-Pichel i Castenholz, 1993), dok mnogo veći stepen zaštite pružaju kada se nalaze u ekstracelularnom matriksu (Ehling-Schulz i sar., 1997). Pored zaštitne ulogu protiv štetnog UV zračenja, mikosporinu slične aminokiseline su pokazale da deluju kao antioksidanti i osmoliti (Klisch i Häder, 2008; Rastogi i sar., 2016; Chrapusta i sar., 2017). Stabilnost UV zaštitnih molekula je ključna za njihovu upotrebu u zaštiti od štetnog zračenja. Mikosporinu slične aminokiseline i scitonemin su se pokazali kao prilično stabilni molekuli na dejstvo UV zračenja, temperature i različitih rastvora (Gröniger i Häder, 2000; Rastogi i Incharoensakdi, 2014). Stabilnost scitonemina i nakon 2 meseca izloženosti UV-A zračenju ukazuje na njegov potencijal da pruža zaštitu od štetnog UV zračenja tokom dužeg vremenskog perioda, dok su ćelije isušene ili metabolički neaktivne (Fleming i Castenholz, 2007). Produkcija ovih molekula (scitonemina i mikosporinu sličnih aminokiselina) kao odgovor na stresne uslove, kao i njihov pronalazak u lesnom sedimentu i BLP ukazuje na njihov potencijal da se mogu koristiti kao biomarkeri u paleoekološkim istraživanjima lesnog sedimenta (Lalić i sar., 2020).

Iako neki sojevi nisu produkovali ni jedan od testiranih zaštitnih metabolita, njihov potencijal da rastu i razvijaju se u semi-aridnim uslovima ne treba zanemariti. Kod nekih cijanobakterijskih vrsta iz roda *Microcoleus* je migriranje i sakrivanje filamenata mnogo efikasniji vid zaštite od UV zračenja nego produkcija UV zaštitnih pigmenata (Bowker i sar., 2002). Takođe, formiranje zajednice sa cijanobakterijskim vrstama koje imaju sposobnost produkcije UV zaštitnih pigmenata može biti još jedan vid izbegavanja negativnog uticaja uzrokovanog UV zračenjem. Bowker i sar. (2002) su pokazali da nije bilo značajnog mortaliteta *Microcoleus vaginatus* u zajednici bioloških pokorica gde je primećena produkcija UV zaštitnih pigmenata od strane *Nostoc* sp. i *Scytonema myochrous* koje kolonizuju površinski deo pokorica. Pored sposobnosti migracije, postojanje drugih strategija

(antioksidanti, proteini toplotnog šoka) u borbi protiv štetnog UV zračenja bi trebalo ispitati kod izolovanih cijanobakterijskih sojeva.

Značaj i uloga prethodnih istraživanja biće detaljno prodiskutovani pod naslovom 5.4.4. *Skrining izolovanih sojeva - odabir optimalnih sojeva za inokulaciju.*

5.2. Morfologija i diverzitet veštački razvijenih bioloških lesnih pokorica

Posle 10 meseci, tokom kojih je simulirano 37 oluja prašine, došlo je do raspršivanja čestica prašine preko dobro razvijenih cijanobakterijskih pokorica u eksperimentalnoj komori. Kao rezultat interakcije čestica sa cijanobakterijama stvorila se biološko-sedimentna zajednica BLP debljine od nekoliko milimetara (Slika 45B). Istovremeno, u kontrolnoj komori stvorio se sloj slabo povezanih čestica prašine (Slika 53C; 53D). Ova studija je potvrdila ranija zapažanja da inicirajući interakciju čestica sa cijanobakterijama dolazi do stvaranja veštačkih bioloških pokorica (na primer: Chen i sar., 2006; Wang i sar., 2009; Wu i sar., 2013; Mugnai i sar., 2017b; Chamizo i sar., 2018). Ova pojava uspostavljanja bliske veze cijanobakterija kao biotičke/žive komponente i čestica kao abiotičke/nežive komponente ekosistema koje se nalaze u direktnom kontaktu i zajedno čine specijalnu zajednicu poznatu kao BLP, je u nauci prepoznata kao sinergoza (*synergosis*) (Svirčev i sar., 2019).

Prisustvo morfološki različitih BLP ove studije može biti posledica dominacije različitih cijanobakterija. Razvojem BLP došlo je do potisnuća inokulisanih sojeva rodova *Nostoc* i *Tolypothrix*, razvojem novih sojeva iz tri nova roda *Leptolyngbia*, *Scytonema* i *Chlorogloeopsis* koji su zajedno sa inokulisanim sojem roda *Chroococidiopsis* činili formirane BLP eksperimentalne komore. Mugnai i sar. (2018) su na primeru soja *Leptolyngbia ohadii* istakli da sposobnost vertikalne migracije može igrati značajnu ulogu u formiranju bioloških pokorica, čak značajniju od produkcije egzopolisaharida. *Leptolyngbia* sp. dominira u prvim fazama razvoja bioloških pokorica, na suvom i manje stabilnom tlu, dok se heterocistni sojevi javljaju u kasnijim sukcesivnim stadijumima (Roncero-Ramos i sar., 2020). U skladu sa ovim saznanjima može se zaključiti da iako su u inokulumu dominirale heterociste cijanobakterije roda *Nostoc*, one su bile potisnute i dominaciju su preuzele cijanobakterije roda *Leptolyngbia* zbog razvijenih strategija za preživljavanje nepovoljnih uslova (Roncero-Ramos i sar., 2020). Cijanobakterijski inokulum

ima ulogu da ubrza prirodni proces razvoja pokorica i sukcesije (Lan i sar., 2014). Chen i sar. (2006) su pokazali da se cijanobakterijski diverzitet može promeniti i nakon 22 dana od inokulacije. Pokazano je da su veštački razvijene cijanobakterijske pokorice na peščanim dinamama doprinele bržem pojavljivanju mahovina, zeljastih biljaka i žbunja (Wang i sar., 2009; Lan i sar., 2014).

Cijanobakterije, kao raniji stadijum razvoja bioloških pokorica, formiraju biofilm glatke površine, dok su neravne/izdignute biološke pokorice obično sačinjene od moćno razvijenih cijanobakterijskih kolonija, lišajeva i mahovina (Thomas i Dougill, 2007; Lan i sar., 2012; Williams i sar., 2012). U ovoj studiji je primećeno nekoliko različitih morfoloških oblika cijanobakterijskih BLP, uključujući glatke, uvijene i izdignute biološke pokorice. Pojava izdignutih kolonija cijanobakterija u okviru bioloških pokorica primećena i u studiji Malam Issa i sar. (1999). U ovoj studiji je primećen rast roda *Leptolyngbia* u snopovima, izdižući se od površine BLP i praveći tkz. izdignute strukture BLP. Izdignute forme primećene su i kod roda *Scytonema*. Neravnomerni biološki pokrivač eksperimentalne komore može biti posledica tendencije terestričnih cijanobakterija da formiraju makroskopske kolonije. Razvoj cijanobakterijskog biofilma je doveo do “neravnomernog” raspoređivanja cijanobakterijskih kolonija po površini eksperimentalne komore, a samim tim i do formiranja neravnomernog biološkog pokrivača BLP. Cijanobakterije roda *Nostoc*, koje su dominirale u inokulumu ove studije, mogu da formiraju kolonije makroskopske veličine (Gao, 1998; Mollenhauer i sar., 1999). Kasnija kolonizacija delova eksperimentalne komore između ljuspastih, uvijenih i izdignutih BLP bila je postignuta glatkim cijanobakterijskim biofilmom. Izdignute i uvijene BLP su se formirale pomoću već formiranog cijanobakterijskog pokrivača debljine nekoliko mm, dok su se glatke BLP formirale naknadno na nekolonizovanim delovima komore. Sa razvojem bioloških pokorica povećava se hrapavost površine (Thomas i Dougill, 2007; Rodríguez-Caballero i sar., 2012).

Horizontalna distribucija rodova u eksperimentalnoj komori može biti posledica različite veličine čestica. Primećeno je opadanje veličine čestica od izvora prašine ka zadnjem delu eksperimentalne komore gde se nalazio biofilm. Za uspešan razvoj kokalnih cijanobakterija koje prave homogeniji i amorfni egzopolisahardini sloj, neophodno je prisustvo finijih čestica (Dulić i sar., 2017). Kokalne cijanobakterije roda *Chroococidiopsis* su formirale glatki, amorfni, homogen biološki pokrivač (Slika 55F; 59D) u najudaljenijem delu eksperimentalne komore od izvora prašine gde se pretpostavlja da su dospele najfinije čestice prašine. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Rozenstein i sar. (2014) koji su uočili da je razvoj cijanobakterijskog pokrivača homogeniji na finijim česticama. Filamentozne

cijanobakterije roda *Leptolyngbia* su formirale BLP nalik mreži koje su svojim filamentima okruživale i prerastale krupnije čestice, lepile sitnije čestice za svoj cevasti egzopolisaharid i povezivale udaljene čestice (Slika 55E; 56C; 57F). One su kolonizovale površinski deo BLP u centralnim delu komore i delovima komore bliže izvoru prašine. Ispitujući BLP Irana, Dulić i sar. (2017) su takođe uočili dominaciju filamentoznih cijanobakterija u uzorcima koje karakterišu krupnije čestice i širi prostor između čestica.

Cijanobakterije rodova *Chroococciopsis* i *Chlorogloeopsis* su kolonizovale delove BLP ispod kolonija *Leptolyngbia* u uzorcima centralnog dela komore. Takođe, *Scytonema* je kolonizovala površinske delove komore, ispod kojih su se nalazile kolonije *Chroococciopsis*. Pomenuta vertikalna distribucija je verovatno posledica različitih faktora životne sredine i različitih životnih strategije svakog soja. Raspored i veličina čestica, intenzitet svetlosti i dostupnost nutrijenata mogu biti neki od razloga vertikalne distribucije cijanobakterija u BLP (Malam Issa i sar., 1999; Garcia-Pichel i sar., 2003; Williams i sar., 2012). Malam Issa i sar. (1999) su uočili dominaciju krupnijih čestica u površinskom sloju, a dominaciju finih čestica u dubljim slojevima. U slučaju takve raspodele čestica u ovoj studiji, raspored i veličina čestica može biti jedan od razloga kolonizacije kokalnih cijanobakterija roda *Chroococciopsis* dubljih slojeva, a filamentoznih cijanobakterija površinskih slojeva BLP.

Ova studija je potvrdila sposobnost suvih cijanobakterijskih BLP da ponovo aktiviraju svoje metaboličke procese nakon vlaženja (Slika 48). Cijanobakterijske biološke pokorice mogu da prežive izuzetno sušne uslove u pustinji Negev čije godišnje padavine iznose <87 mm. Ove pokorice štite površinu od erozije i učestvuju u akumulaciji čestica koristeći samo rosu kao izvor vlage (Zaady i Offer, 2010). U ovoj studiji je primećen veći obim BLP u vlažnom stanju (Slika 48), što je u skladu sa sposobnošću cijanobakterijskih bioloških pokorica (njihovih egzopolisaharida) da nakon vlaženja nabubre i povećaju svoju zapreminu 10 puta više u odnosu na njihovu zapreminu u suvom stanju (Verrecchia i sar., 1995), ili čak i do 13 puta (Shields i Durrell, 1964; Campbell, 1977), kao i biomasu do 8 puta (Wang i sar, 2017). Debljina BLP se nakon 15 minuta od trenutka vlaženja skoro udvostručila u odnosu na debljinu suvog stanja (Slika 49). Gušći biološki pokrivač preko lesnog sedimenta primećen tokom vlažnog perioda može biti i rezultat cijanobakterijske sposobnosti da se kreću prema vlažnim površinama. Cijanobakterije imaju sposobnost da migriraju u površinske slojeve bioloških pokorica tokom vlažnih perioda i da se vraćaju u dublje slojeve tokom sušnih perioda (Garcia-Pichel i Pringault, 2001). Formiranje neravnomernog biološkog pokrivača sa izdignutim delovima može doprineti i povećanju infiltracije. Prema Belnap i sar. (2001),

infiltracija se povećava u predelima sa neravnomernim i izdignutim biološkim pokoricama, za razliku od glatkih bioloških pokorica gde je smanjen stepen infiltracije.

Ponovna aktivacija metaboličkih procesa cijanobakterija nakon vlaženja pokazana je i povećanjem sadržaja hlorofila *a* biološkog pokrivača eksperimentalne komore (Grafikon 39). Prisustvo hlorofila *a* u kontrolnoj komori nije detektovano ni u suvom stanju niti nakon vlaženja, što ukazuje na odsustvo biološke komponente. Otpornost cijanobakterija na sušne uslove pokazana je i u studiji Simeunović i sar. (2013) očuvanjem fikobiliproteina nakon 10 godina cijanobakterijskog izlaganja suši i tami. Abed i sar. (2014) su pokazali da je promena boje suvih bioloških pokorica nakon vlaženja u zeleno bila rezultat brzog oporavka sinteze pigmenata. Cijanobakterije bioloških pokorica imaju sposobnost da održe svoj fotosintetički aparat netaknutim nakon dužeg perioda suše i da nastave svoje fotosintetičke aktivnosti u roku od nekoliko minuta nakon vlaženja (Abed i sar., 2014). Iako u ovoj studiji nije korišćen standard za detekciju scitonemina, i druge studije su njegov sadržaj u biološkim pokoricama procenjivale spektrofotometrijski bez standarda-MOSA (na primer, Lan i sar., 2010). Prisustvo karotenoida i MOSA u BLP eksperimentalne komore se ne povezuju sa UV osvetljenjem obzirom da veštački razvijene BLP nisu izlagane UV osvetljenju. Produkcija ovih zaštitnih pigmenata može biti posledica drugih stresogenih faktora, na primer isušivanja koje je primenjivano u ovoj studiji. Pokazan je stimulirajući efekat periodičnog isušivanja na sintezu scitonemina (Fleming i Castenholz, 2007). Fleming i Castenholz (2007) su uočili stimulirajući efekat kod dva cijanobakterijska soja (*Nostoc punctiforme* i *Chroococcidiopsis* CCMEE 5056), za razliku od soja *Chroococcidiopsis* CCMEE 246 kod kog je isušivanje inhibiralo sintezu scitonemina.

5.3. Stabilizacija čestica cijanobakterijama

Biološke pokorice imaju značajnu ulogu u taloženju čestica prašine (Zhang i sar., 2006). One hvataju, vezuju, akumuliraju i stabilizuju čestice prašine (Svirčev i sar., 2013; 2019). U okviru ove studije, proces vezivanja, akumulacije i stabilizacije se odvijao u dva uočena sloja BLP. Gornji površinski sloj u kom su čestice vezane i akumulirane živim cijanobakterijskim kolonijama (Slika 47, strelice 1 i 2, redom) i donji podpovršinski sloj stabilizovanih čestica i zaostalog egzopolisaharidnog materijala (Slika 47, strelica 3). Opisana

organizacija čestica i cijanobakterija iz BLP je u skladu sa stratifikacijom bioloških pokorica od strane Felde i sar. (2014).

U okviru ove studije dokazana je sposobnost cijanobakterija da vezuju čestice prašine poreklom iz vazduha. Sposobnost organizama bioloških pokorica da vezuju čestice iz vazduha opisana je i od strane drugih autora (Belnap i Gardner, 1993; Zaady i Offer, 2010; Williams i sar., 2012; Dulić i sar., 2017). Cijanobakterije vezuju čestice mehanički pomoću svojih filamenata i lepljivih egzopolisaharida (Malam Issa i sar., 2001). Ova eksperimentalna studija je pokazala da način vezivanja čestica u velikoj meri zavisi od morfologije cijanobakterijskih kolonija. Primećeno je vezivanje čestica mrežom cijanobakterijskih filamenata i njihovih cevastih egzopolisaharida i lepljenje čestica na površinski sloj amorfnoeg cijanobakterijskog pokrivača sa sluzavim egzopolisaharidima. Isti način vezivanja čestica je primećen u prirodnim BLP sa Lesnog Platoa severnog Irana (Dulić i sar., 2017). Zapažanja ove eksperimentalne studije o mehanizmu imobilizacije krupnih i finih čestica je u skladu sa drugim istraživanjima (Malam Issa i sar., 1999; 2001; Dulić i sar., 2017). Krupnije čestice su bile okružene filamentima cijanobakterija ili prekrivene/zalepljene za amorfni egzopolisaharidni sloj, dok su finije čestice bile zalepljene za površinu cevastog ili amorfnoeg egzopolisaharida ili uronjene u amorfni pokrivač. Prema BLOCDUST modelu, dva glavna mehanizma stabilizacije čestica jesu imobilizacija krupnijih čestica mrežom cijanobakterijskih filamenata i lepljenje finijih čestica na površinu egzopolisaharida (Svirčev i sar., 2019). U našim istraživanjima je primećeno kretanje filamenata između obližnjih čestica, stvarajući organsku vezu među njima (Slika 50D, strelica 1). Iako postojanje većih pora između čestica može da onemogući kretanje filamenata (Rozenstein i sar., 2014), stvaranje ovakvih organskih veza između čestica u okruženju (Malam Issa i sar., 2007; Rozenstein i sar., 2014) smanjuje veličinu pora i omogućava brže i lakše širenje cijanobakterija. Zatvaranje velikih pora finim česticama može olakšati širenje kolonija, a istovremeno imobilisati čestice.

Pored horizontalno orjentisanih biološko-mineralnih struktura koje su činile cijanobakterijske kolonije i imobilisane čestice, uočene su i vertikalno orjentisane zajednice cijanobakterija i čestica prašine. Snopovi cijanobakterijskih filamenata i njihovih egzopolisaharida sa umetnutim česticama formirale su izgledne strukture bioloških pokorica (Slika 50C; 50F). Iako se smatra da cijanobakterijske biološke pokorice, kao raniji stadijum razvoja, formiraju glatke biološke pokorice (Lan i sar., 2012; Williams i sar., 2012), ova studija je pokazala sposobnost cijanobakterija da u okviru bioloških pokorica rastu u vertikalnom pravcu i formiraju i izdignute delove. Zbog glatke površine koju prave, smatra se

da cijanobakterijske biološke pokorice imaju manji potencijal za hvatanje čestica, za razliku od lišajeva i mahovina (Williams i sar., 2012). Međutim, uvijene i izdignute biološke pokorice povećavaju hrapavost biološkog pokrivača, a samim tim i ukupna površina za hvatanje i vezivanje čestica je veća. Prema Williams i sar. (2012) morfologija bioloških pokorica reguliše količinu akumuliranih čestica, gde pokorice veće hrapavosti imaju veću sposobnost akumulacije čestica. Takođe, stepen erozije se smanjuje sa povećanjem hrapavosti biološkog pokrivača (Rodríguez-Caballero i sar., 2012).

Uočeno taloženje metabolisanih čestica ispod cijanobakterijskih kolonija (Slika 47, strelica 3) je posledica cijanobakterijske životne strategije da rastu prema izvoru svetlosti metabolišući dostupne minerale iz zarobljenih čestica (Garcia-Pichel i Pringault, 2001; William i sar., 2012; Svirčev i sar., 2013). Migrirajući prema izvoru svetlosti, cijanobakterije oslobađaju svoj egzopolisaharidni materijal. U stabilizaciji istaloženih čestica značajnu ulogu ima napušteni egzopolisaharidni materijal (Slika 51C; 51D, označeno strelicama). Egzopolisaharidi učestvuju u agregaciji tla, povezujući čestice međusobno (Belnap i Gardner, 1993; Eldridge i Greene, 1994; Belnap, 2003; Malam Issa i sar., 2007; Chamizo i sar., 2019; Mugnai i sar., 2020). Povezivanje čestica dovodi do povećanja veličine agregata (Smalley i sar., 2011), što rezultira stvaranjem težih agregata koji će samim tim teže biti erodirani vetrom ili vodom (Danin i Yaalon, 1980; Danin i sar., 1989). Napušteni egzopolisaharidni materijal lepi i stabilizuje čestice čak i nakon uginuća cijanobakterija ili migracije u površinske slojeve bioloških pokorica (Zhang i sar., 2006). Zahvaljujući napuštenom egzopolisaharidnom materijalu (Slika 51C; 51D, označeno strelicama) i produkciji novih egzopolisaharida, cijanobakterije predstavljaju dugoročan izvor lepljivog materijala koji vezuje čestice.

Rezultati granulometrije pokazuju da je došlo do ukрупnjavanja čestica nakon njihovog metabolisanja od strane cijanobakterijskih BLP. Zastupljenost krupnih čestica je bila 5-6 puta veća u istaloženim česticama sedimenta ispod BLP, nego u česticama navejanim neposredno pred ulazak u deo komore sa biofilmom. Prisustvo čestica većih od 1200 μm je uočeno u istaloženim česticama sedimenta ispod BLP. U česticama navejanim na samom ulazu prašine u eksperimentalnu komoru uočene su čestice do 516 μm , dok su u ostalim uzorcima navejanih čestica u delu komore za simulaciju oluja prašine (40 cm i 60 cm od izvora prašine) zabeležene čestice do 211 i 310 μm . Uočeno ukрупnjavanje čestica je posledica međusobnog lepljenja čestica egzopolisaharidima cijanobakterija. Zastupljenost krupnih čestica u česticama istaloženim ispod BLP nakon uklanjanja organske materije i karbonata smanjila se za duplo (čestice 63-125 μm) ili čak preko šesto puta (zastupljenost

čestica krupnijih od 125 μm se u uzorku *Leptolyngbia* sp. uzorak 18 smanjila sa 13,55% na 0,02%). Ovi rezultati ukazuju da je tretmanom uklanjanja organske materije i karbonata došlo do uklanjanja „lepka“ između čestica koje su formirale veće agregate i dovelo do njihovog raspadanja. Srednja veličina čestica istaloženih ispod BLP eksperimentalne komore, pre uklanjanja organske materije i karbonata, je bila veća od srednje veličine čestica odgovarajućih mesta kontrolne komore ukazujući na ulogu cijanobakterija u formiranju većih agregata čestica. Manja srednja veličina čestica istaloženih ispod BLP u odnosu na čestice iz kontrolne komore, nakon uklanjanja organske materije i karbonata, dodatno potvrđuje ulogu cijanobakterija u ukupnjavanju čestica. Sitnije čestice u sedimentu ispod BLP nakon tretmana uklanjanja organske materije i karbonata ukazuju na veći sadržaj „lepka“ u česticama metabolisanim od strane cijanobakterija koji je odstranjen tretmanom uklanjanja organske materije i karbonata, što je rezultiralo mnogo sitnijim česticama od čestica navejanih u kontrolnoj komori. U ovom slučaju je prikazano realno smanjenja veličine čestica usled metaboličkih aktivnosti cijanobakterija.

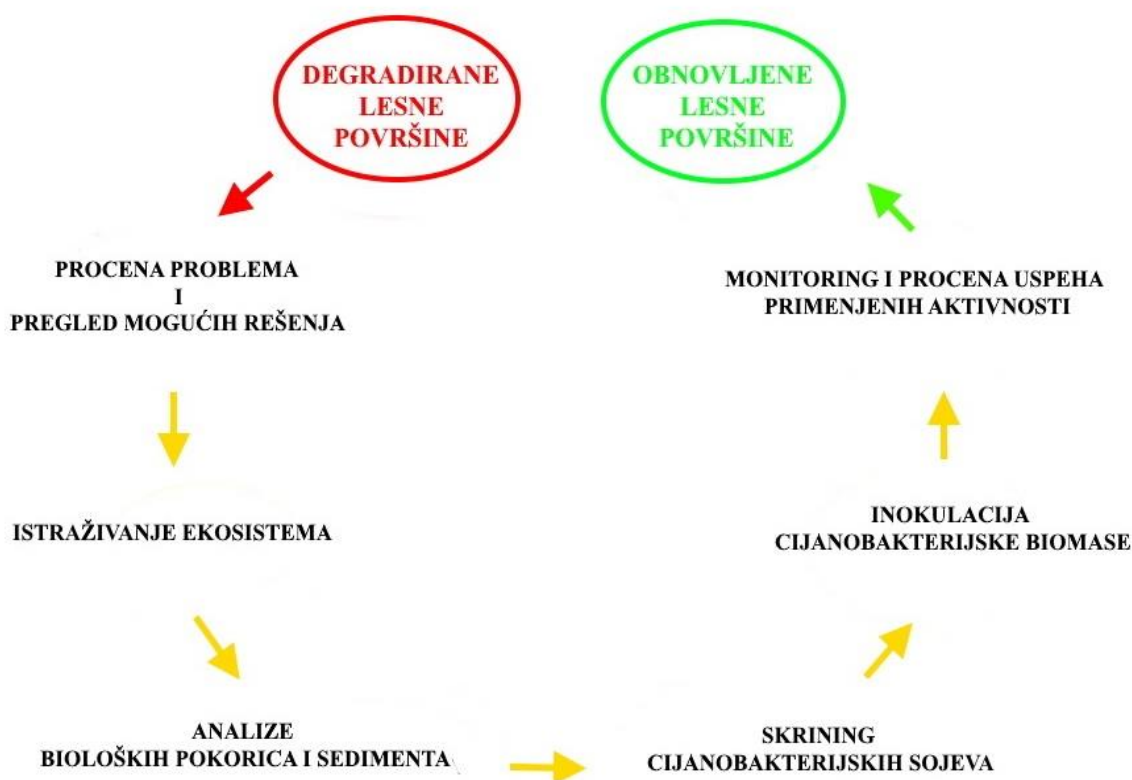
Dulić i sar. (2017) su istakli dvostruku ulogu cijanobakterijskih egzopolisaharida u stabilizaciji lesnog sedimenta: smanjenje erozije hvatanjem, vezivanjem i imobilizacijom čestica i trajno vezivanje čestica stvaranjem karbonatnih precipitata procesima organomineralizacije egzopolisaharida. Čestice iz vazduha predstavljaju izvor osnovnih mineralnih hranljivih materija organizmima bioloških pokorica (Williams i sar., 2012; Svirčev i sar., 2013; 2019). Obzirom da se u ovom eksperimentu dodavanje mineralnih materija vršilo samo jednom mesečno, čestice prašine su verovatno bile glavni izvor hranljivih materija cijanobakterijama BLP. Do neophodnih nutrijenata cijanobakterije dolaze rastvaranjem minerala, one svojim metaboličkim procesima i pomoću egzopolisaharida izazivaju rastvaranje minerala u kontaktnoj zoni egzopolisaharida i minerala (Svirčev i sar., 2019). Egzopolisaharidi koje uglavnom proizvode cijanobakterije (De Philippis i sar., 2001) imaju značajnu ulogu u precipitaciji karbonata (Obst i sar., 2009). Mineralizovani egzopolisaharidi imaju ulogu cementa između čestica, a samim tim doprinose njihovom očuvanju i stabilizaciji tla (Svirčev i sar., 2019). Kremer i sar. (2008) su pokazali da se karbonati vezuju za površinu kvarca i služe kao cement između čestica kvarca u cijanobakterijskim zajednicama sa slatkovodnih pešćanih delova. Ipak, potrebna su dalja ispitivanja o značaju cijanobakterija i njihovih egzopolisaharida u stvaranju karbonata kao stabilizatora čestica u BLP.

Uloga cijanobakterijskih BLP u stabilizaciji lesnog sedimenta je potvrđena u ovoj studiji (Grafikon 40). Pet puta više čestica je erodirano sa nezaštićenog lesnog sedimenta, u

odnosu na lesni sediment prekriven veštački razvijenim cijanobakterijskim pokrivačem inokulacijom soja *Nostoc* sp. IRN5D. Biološke pokorice formirajući zaštitni sloj na površini tla sprečavaju odnošenje već nataloženih čestica prašine (Svirčev i sar., 2013). Čestice imobilisane cijanobakterijskim BLP i ispod njih su zaštićene od erozije, što je rezultiralo stabilizacijom sedimenta u ovoj studiji. Ovaj mehanizam zaštite tla od erozije biološkim pokoricama primećen je i u drugim studijama (Malam Issa i sar., 1999; 2001; 2007; Zhang i sar., 2006; Williams i sar., 2012; Dulic i sar., 2017). Le Bissonnais (1996) je potvrdio ulogu cijanobakterijskog pokrivača u zaštiti tla od erozije klasifikujući tlo sa cijanobakterijskim pokrivačem kao stabilno, za razliku od tla bez biološkog pokrivača koje se smatra nestabilnim.

5.4. Predlog za stabilizaciju i obnovu degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom

Smanjenje stabilnosti i plodnosti tla se posmatraju kao dva najveća problema uključena u degradaciju ekosistema i dezertifikaciju u sušnim predelima (Bowker i sar., 2006; 2008). Prema Lan i sar. (2014), stabilnost površinskog sloja tla i prisustvo vegetacije se smatraju najvažnijim mehanizmima u borbi protiv dezertifikacije. Rossi i sar. (2017) i Rossi (2020) su pregledom osnovnih aktivnosti koje je potrebno sprovesti prilikom upotrebe cijanobakterija i bioloških pokorica kao inokuluma u stabilizaciji tla i obnovi ekosistemskih funkcija napravili veliki napredak u rešavanju problema dezertifikacije. Međutim, kako su i sami naglasili, potrebna je dalja optimizacija ove tehnologije (Rossi i sar., 2017; Rossi, 2020). Osobine lesa, njegova rasprostranjenost, degradiranost površina lesnih sedimenata, kao i proces dezertifikacije zahtevaju poseban pristup prilikom obnove i restoracije. Dosadašnji rezultati primenjenih aktivnosti ukazuju da uspešna obnova degradiranih lesnih površina zahteva ekološki pristup, prepoznavanje i poštovanje prirodnih bioloških procesa i upotrebu autohtone vegetacije. Imajući u vidu kompleksnost problema izazvanih dezertifikacijom i degradacijom površina lesnih sedimenata neophodan je multidisciplinarni tim stručnjaka za planiranje i izvođenje aktivnosti stabilizacije i obnove ovih područja. Dosadašnja saznanja i rezultati ove studije su doveli do zaključka da je potreban niz aktivnosti tačno definisanog redosleda za uspešnu stabilizaciju i obnovu degradiranih lesnih površina i onih zahvaćenih dezertifikacijom (Slika 61).

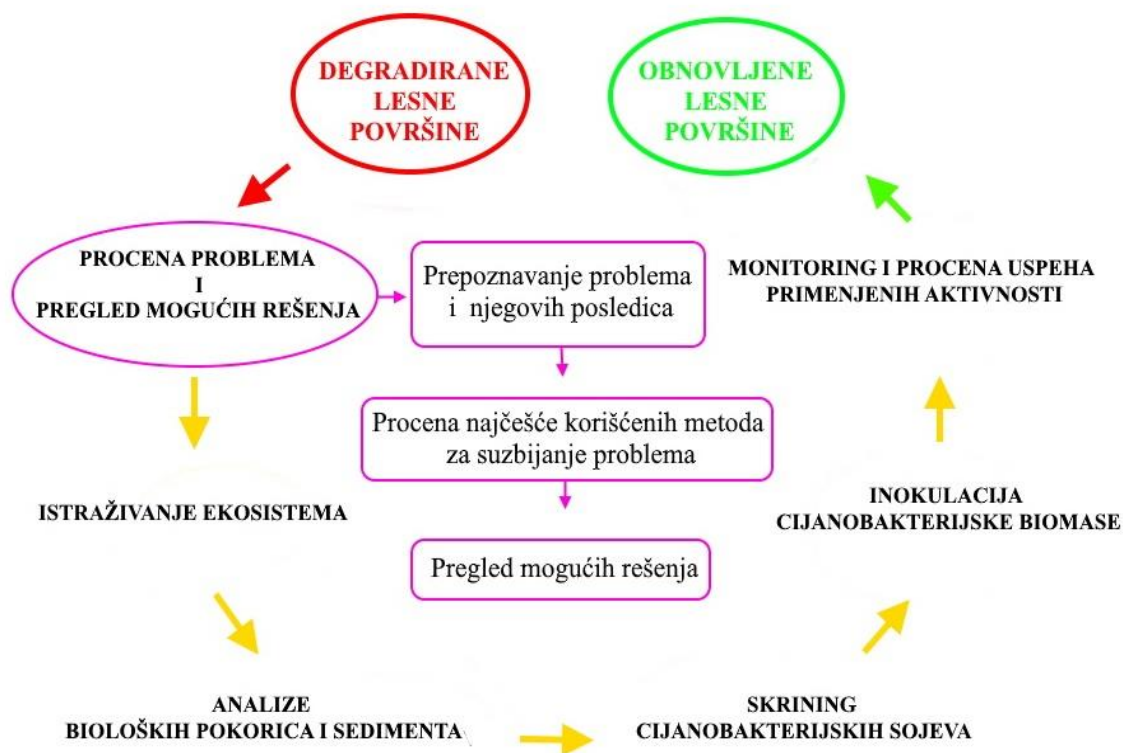


Slika 61. Predloženi plan obnove degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom zasnovan na ubrzavanju prirodne sukcesije iniciranjem razvoja bioloških pokrica inokulacijom cijanobakterija

Pre svega, potrebno je shvatiti prirodu i veličinu problema. Uzorkovanje i analiza prirodnih bioloških pokorica i supstrata, kao i prepoznavanje faktora koji stoje iza problema predstavljaju neophodne aktivnosti za predlaganje odgovarajućih mera obnove. Sledeći korak je izolacija dominantnih cijanobakterijskih vrsta iz uzorkovanih bioloških pokorica, nakon čega je potrebno odabrati najprikladnije sojeve za područje na kom se planira stabilizacija i obnova. Pre masovne produkcije i inokulacije cijanobakterija, neophodno je proceniti pogodnost (netoksičnost, produkcija egzopolisaharida i zaštitnih pigmenata) i brzinu rasta izolovanih sojeva u laboratorijskim i terenskim uslovima. Nakon odabira sojeva, masovne produkcije i inokulacije potrebno je vršiti monitoring razvoja bioloških pokorica i stabilizacije tla kako bi se procenio uspeh primenjenih aktivnosti obnove.

5.4.1. Procena problema degradacije površina lesnih sedimenata i pregled mogućeg rešenja

Prvi korak u obnovi degradiranih površina lesnog sedimenta je procena problema. Sumirani pregled ekonomskih, zdravstvenih, socijalnih i ekoloških problema u lesnim predelima dat je u uvodnom delu ove studije (poglavlje *1.4. Problemi izazvani dezertifikacijom i degradacijom površina pokrivenih biološkim pokoricama*). Nakon zaključka da je neophodna primena mera obnove izvršen je pregled najčešće primenjenih metoda na degradiranim lesnim površinama. Iz pomenutog uvodnog poglavlja se može zaključiti da su primenjene mere revegetacije „Grain for Green“ projekta na Kineskom Lesnom Platou dovele do novih problema. Kao jedan od glavnih razloga za neuspehe projekata pošumljavanja smatra se upotreba neadekvatnih biljnih vrsta (Lamb i sar., 2005). Sadnja drveća ili grmlja u predelima gde nedrvenaste vrste čine prirodnu vegetaciju predstavlja neadekvatan pristup rešavanju problema. Takav pristup je doveo do smanjenja dostupnosti vode i uginuća zasađenih, ali i prirodnih vrsta (Cao i sar., 2009; 2011). Jiang i sar. (2019) su istakli da programi pošumljavanja, primenjeni na Lesnom Platou, mogu biti loš izbor u aridnim i semi-aridnim regionima jer izvođači nisu uzeli u obzir lokalne uslove padavina. Nakon primenjenih mera došlo je do iscrpljivanja resursa vode i isušivanja tla. Stoga, u budućim ekološkim aktivnostima obnove degradiranih površina neophodno je izabrati optimalne biljne vrste koje će izbalansirati stabilizaciju tla i sadržaj vlage. Vegetacijske vrste treba razmotriti u skladu sa klimatskim uslovima, svojstvima tla i topografijom (Jiang i sar., 2019).



Slika 62. Prvi korak u obnovi degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom- procena stanja i stepena degradacije i pregled mogućih rešenja

Biološke pokorice kao moguće rešenje

Iako je „Grain for Green“ projekat imao za cilj poboljšanje stanja životne sredine sadnjom drveća i grmlja, došlo je do neočekivanog razvoja bioloških pokorica koje su preuzele glavnu ulogu u kontroli erozije tla (Zhao i Xu, 2013; Zhao i sar., 2014; Gao i sar., 2017). Biološke pokorice su kolonizovale oko 60-70% površine Kineskog Lesnog Platoa na kom je sproveden pomenuti projekat (Zhao i Xu, 2013). Zhao i sar. (2014) su ispitujući potencijal mahovina i lišajeva za obnovu degradiranih lesnih površina već istakli da bi biološke pokorice mogle biti odlično rešenje u ranim fazama ekološke obnove erozivnih delova Lesnog Platoa. U odeljku 1.2. *Terestrične cijanobakterije u biološkim pokoricama* su sumirane osnovne uloge bioloških pokorica u sušnim ekosistemima. Biološke pokorice učestvuju u primarnim procesima ekosistema (Maestre i sar., 2011) zbog čega imaju značajnu ulogu u održavanju i poboljšanju stanja životne sredine (Belnap, 2003). One poboljšavaju svojstva površinskog dela tla i na taj način obezbeđuju životnu sredinu za druge organizme (Wang i sar., 2009). Biološke pokorice se smatraju neophodnom komponentom zdravog i

funkcionalnog ekosistema, kao i lokalnog i regionalnog biodiverziteta (Eldridge, 2000). Organizmi bioloških pokorica kolonizuju gole ili ogoljene površine ekosistema (Neher i sar., 2003) i utiču na primarne procese ekosistema (Maestre i sar., 2011). Razvoj bioloških pokorica je sukcesivan, od pokorica u kojima dominiraju cijanobakterije do pokorica u kojima dominiraju lišajevi i mahovine (Li i sar., 2010). Međutim, proces prirodne sukcesije može biti dugotrajan (Hu i Liu, 2003; Chiquoine, 2012). Primećeno je da prve vrste u zajednici mogu biti dominantne čak posle 42 godine (Hu i Liu, 2003). Potpuni razvoj bioloških pokorica može trajati i stotinama godina (LeQuire, 2009). Navedene uloge i svojstva bioloških pokorica su u skladu sa predlogom Bowker (2007) o posmatranju obnove bioloških pokorica kao ključnim korakom u obnovi degradiranih zemljišta u sušnim područjima. Stoga, potpomognuti oporavak bioloških pokorica (veštačkom inokulacijom) bi smanjio vreme potrebno za oporavak bioloških pokorica. Prema Zhao i sar. (2014), ubrzavanjem sukcesije bioloških pokorica bi se moglo obezbediti tlo povoljno za razvoj vaskularnih biljaka, kao i smanjena stopa erozije. Aktivnosti kao što su gaženje, ispaša (Maestre i sar., 2006), požari, uništavanje terenskim vozilima, oranje, neodgovarajuća sadnja drveća, primena đubriva, neprimerna i prekomerna upotreba herbicida, ali i druge aktivnosti takođe utiču na opstanak bioloških pokorica (http://euroarboretum.com.au/wp-content/uploads/2015/09/6_Reducing-Soil-Disturbance.pdf). Prema Rodriguez-Caballero i sar. (2018), pokrivač bioloških pokorica koji trenutno iznosi oko 12% Zemljine površine će se smanjiti za oko 25 do 40% u roku od 65 godina zbog antropogeno izazvanih klimatskih promena i intenzivnije upotrebe zemljišta. Uništavanje bioloških pokorica dovodi do smanjenja stabilnosti tla, plodnosti tla i zadržavanja vlage (Belnap i Gardner, 1993), što rezultira erozijom izazvanom aktivnošću vode ili vetra (http://euroarboretum.com.au/wp-content/uploads/2015/09/6_Reducing-Soil-Disturbance.pdf). Stoga, obnavljanje bioloških pokorica u aridnim i semi-aridnim regionima gde one predstavljaju glavni vegetacijski pokrivač bi moglo biti od velikog značaja za poboljšanje stanja ekosistema u pomenutim regionima. Značaj očuvanja ili obnove bioloških pokorica u aridnim i semi-aridnim regionima se ogleda i u paroli "DO NOT BUST THE CRUST" koja je postala poznata u regionima u kojima biološke pokorice predstavljaju uobičajen biološki pokrivač (Faist i sar., 2021).

Kada je u pitanju lesni sediment i upotreba organizama bioloških pokorica za njegovu obnovu, ispitivana je upotreba mahovina (Xiao i sar., 2011; 2015; Zhao i sar., 2014). Upotreba prirodnih pokorica mahovina sa Kineskog Lesnog Platoa kao inokuluma je u potpunosti prekrila lesnu površinu za 10 meseci u laboratorijskim uslovima (Xiao i sar.,

2011). Zhao i sar. (2014) su pokazali da inokulum od prirodnih pokorica lišajeva i mahovina, takođe sa Kineskog Lesnog Platoa, prekrije više od 65% površine lesa nakon 10 nedelja u laboratorijskim uslovima. Međutim, potpuni razvoj bioloških pokorica u kojima dominiraju mahovine na terenu je postignut posle četiri godine (Xiao i sar., 2015). Sa druge strane, studije su pokazale da je za uspešnu kultivaciju bioloških pokorica u kojima dominiraju cijanobakterije u odgovarajućim uslovima dovoljno nekoliko nedelja (Chen i sar., 2006; Wang i sar., 2009). Sporiji razvoj lišajeva i mahovina može biti rezultat njihove naknadne pojave nakon stabilizacije površinskog sloja tla cijanobakterijama i zelenim algama (Belnap, 2003). Dostupnost vode je takođe bitan faktor za rast i obnavljanje mahovina (Graf i Rochetort, 2010; Zhao i sar., 2014). Pored vlage, mahovinama je potreban i određen nivo zamračenja (Lan i sar., 2014; Doherty i sar., 2016; Li i sar., 2016). U suvom stanju mahovine imaju sposobnost da tolerišu visoke temperature, ali kombinacija toplih i vlažnih uslova može biti destruktivna po njih (Proctor, 2000). Lišajevi i mahovine su efikasniji u zadržavanju sadržaja vode tokom vlažnih perioda, dok su tokom sušnih perioda cijanobakterije mnogo efikasnije u zadržavanju vlage (Chamizo i sar., 2013).

Cijanobakterijska komponenta u razvoju bioloških pokorica

Belnap (1993) je istakla da uništavanje bioloških pokorica može dovesti do dugoročnih negativnih posledica, jer se njihovim uništavanjem ostaje bez živih cijanobakterija koje bi obnavljale biološke pokorice i lučile novi egzopolisaharidni omotač (Belnap, 1993). Mnogo studija je potvrdilo ulogu cijanobakterija u stabilizaciji peska veštačkim formiranjem kompleksne cijanobakterijske mreže i njihovim egzopolisaharidima (Chen i sar., 2006; Malam Issa i sar., 2007; Xie i sar., 2007; Wang i sar., 2009; Lan i sar., 2010; Wu i sar., 2013; Rozenstein i sar., 2014; Mugnai i sar., 2017a; 2017b; 2018; 2020; Park i sar., 2017; Chamizo i sar., 2018; 2019) (Tabela 18). Bailey i sar. (1973) su ispitivali uticaj dve cijanobakterijske vrste *Oscillatoria prolifica* i *Nostoc commune* na stabilnost agregata lesnog tla, potencijal cijanobakterija da interreaguju sa lesnim česticama, učestvuju u stabilizaciji lesa i koriste se za njegovu obnovu. Ova studija predstavlja napredak u oblasti razvoja strategije za borbu protiv degradacije lesnih površina. Rezultati su pokazali da se formiranje veštačkih BLP može pokrenuti iniciranjem interakcije čestica kao abiotičke komponente i cijanobakterija kao biotičke komponente. Dakle, obnova degradiranih lesnih površina, ublažavanje procesa dezertifikacije i sličnih problema bi se moglo postići

iniciranjem razvoja veštačkih cijanobakterijskih BLP. Ovaj predlog je zasnovan na upotrebi cijanobakterija kao inokuluma za pokretanje razvoja BLP i ubrzavanje procesa prirodne sukcesije bioloških pokorica od cijanobakterija, preko mahovina, do vaskularnih biljaka.

Tabela 18. Cijanobakterijski sojevi testirani da indukuju razvoj bioloških pokorica na različitim supstratima

Cijanobakterije	Supstrat	Reference
<i>Leptolyngbia ohadii</i>	pesak	Mugnai i sar., 2017a; 2018; 2020;
<i>Microcoleus vaginatus</i>	pesak	Hu i sar., 2002a, 2002b; Chen i sar., 2006; Xie i sar., 2007; Wang i sar., 2009; Lan i sar., 2010; Wu i sar., 2013; Rozenstein i sar., 2014
<i>Nostoc sp.</i>	pesak; peskovita ilovača	Hu i sar., 2002a; Malam Issa i sar. 2007; Park i sar., 2017
<i>Nostoc commune</i>	blatnjava ilovača; krečnjak	Roncero-Ramos i sar., 2019c
<i>Nostoc PCC9025</i>	peščarsko tlo; granitno tlo; škriljac; krečno tlo	Acea i sar., 2001, 2003
<i>Nostoc PCC9104</i>	peščarsko tlo; granitno tlo; škriljac; krečno tlo	Acea i sar., 2001, 2003
<i>Oscillatoria PCC9014</i>	peščarsko tlo; granitno tlo; škriljac; krečno tlo	Acea i sar., 2001, 2003
<i>Phormidium sp.</i>	pesak	Park i sar., 2017
<i>Phormidium ambiguum</i>	muljevita ilovača; peščana ilovača; ilovasti pesak; pesak	Chamizo i sar., 2018; 2019;
<i>Phormidium tenue</i>	pesak	Hu i sar., 2002a; Xie i sar., 2007
<i>Scytonema javanicum</i>	pesak; muljevita ilovača; peščana ilovača; ilovasti pesak	Hu i sar., 2002a; Xie i sar., 2007; Wang i sar. 2009; Wu i sar. 2013; Chamizo i sar., 2018; 2019
<i>Scytonema arcangeli</i>	pesak	Park i sar., 2017
<i>Scytonema CCC9801</i>	peščarsko tlo; granitno tlo; škriljac; krečno tlo	Acea i sar., 2001; 2003
<i>Schizothrix AMPL0116</i>	pesak	Mugnai i sar., 2017b;
<i>Schizothrix AMPL1601</i>	pesak	Mugnai i sar., 2017a

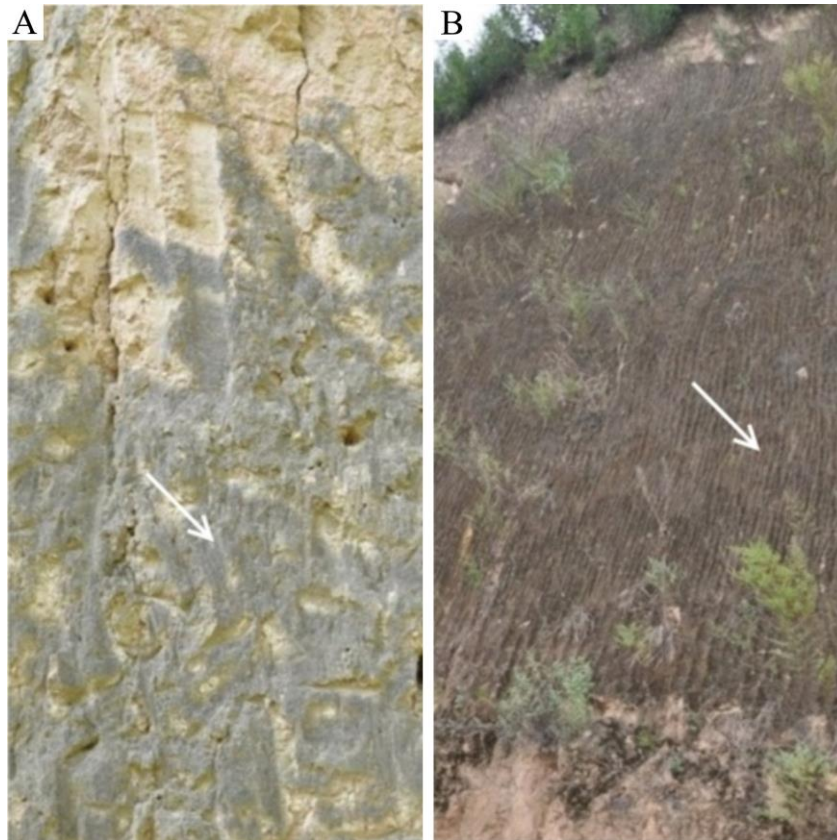
de Caire i sar. (1997) su pokazali da izolovani egzopolisaharidi mogu obezbediti bolju stabilnost tla nego sama cijanobakterijska biomasa, ali da cijanobakterijska masa ima bolje izgleda za dugoročan uspeh. Klizeći kroz površinski deo tla, cijanobakterijski filamenti napuštaju svoje stare egzopolisaharidne omotače i stvaraju nove (de Caire i sar., 1997; Belnap i sar., 2001). Napušteni egzopolisaharidni materijal je uočen u donjim delovima površinskog sloja bioloških pokorica ove studije. Stoga, inokulacija cijanobakterijama predstavlja konstantan izvor egzopolisaharida koji učestvuju u vezivanju čestica. Zaostali egzopolisaharidni materijal se često može naći u dubljim slojevima tla (na dubini oko 10 cm od površine tla) gde takođe mogu da zadržavaju vodu, nutrijente i stabilizuju čestice (Belnap i Gardner, 1993).

Razvoj cijanobakterijskih pokorica na lesnom sedimentu je podržan njegovim sastavom i veličinom čestica koje ga čine, kao i afinitetom cijanobakterija ka finim česticama. Uočen je brži razvoj cijanobakterijskih pokorica na sitnijim česticama peska (Rozenstein i sar., 2014), kao i formiranje debljih bioloških pokorica na tlu od finijih čestica u poređenju sa peskovitim tлом (Chamizo i sar., 2018). Ranije studije su pokazale da je za razvoj merljivih bioloških pokorica potrebno najmanje 4-5% gline i čestica veličine 10-50 μm (West, 1990). Tipični lesni sediment se sastoji uglavnom od čestica veličine 10-50 μm (40-70%) i gline (5-20%) (Pécsi, 1990), čije su čestice sitnije od peska. Biološke pokorice su mnogo efikasnije u zadržavanju vlage finijeg tla nego tla koje čine pretežno krupnije čestice (Chamizo i sar., 2013). Stoga, biološke pokorice mogu imati veći uticaj na poboljšanje stanja životne sredine lesnih predela u odnosu na peščane pustinje.

Belnap i Eldridge (2001) su procenili da je nakon potpunog uklanjanja bioloških pokorica na platou Kolorado bilo potrebno između 14 i 34 godine za samostalni oporavak cijanobakterija. Potpomognutim razvojem bioloških pokorice uz odgovarajuće uslove, njihov oporavak se može postići za mnogo kraće vreme. Chen i sar. (2006) su istakli da su sadržaj vode i intenzitet svetlosti ključni faktori koji utiču na razvoj bioloških pokorica. Nakon inokulacije cijanobakterija na peščane dine bilo je potrebno 20 dana za razvoj bioloških pokorica, 22 dana za promenu diverziteta (Chen i sar., 2006), tri godina za uspostavljanje zajednice vaskularnih biljaka od 10 ili čak 17 vrsta (Wang i sar., 2009) i osam godina za uspostavljanje klimatske vegetacije (Lan i sar., 2014). Rezultati dobijeni od strane Acea i sar. (2001) su pokazali da je nakon inokulacije cijanobakterijskih sojeva (*Oscillatoria*, *Scytonema* i dva soja roda *Nostoc*) na pesku došlo do razvoja bioloških pokorica debljine 0,8-1,0 cm za dva meseca. Chen i sar. (2006) su zaključili da je nakon inokulacije *Microcoleus vaginatus* na peščane dine Mongolije bilo potrebno samo 22 dana za razvoj bioloških pokorica otpornih na

eroziju vetrom i vodom. Šta više, inokulacija kombinacije dva soja (*Microcoleus vaginatus* i *Scytonema javanicum*) na pokretne peščane dine Mongolije je dovela do kolonizacije cele inokulisane površine za samo 18 dana (Wang i sar., 2009) ili čak jedne nedelje (Lan i sar., 2014). Ove studije su pokazale da su ovako veštački razvijene cijanobakterijske biološke pokorice dovele do pojavljivanja mahovina, zeljastih i žbunastih biljaka (Wang i sar., 2009; Lan i sar., 2014). Novije studije su ukazale na sposobnost i drugih cijanobakterijskih sojeva (*Schizothrix* AMPL1601, *Schizothrix* AMPL0116 i *Leptolyngbia ohadii*) da razviju biološke pokorice na pesku i da se koriste za obnavljanje siromašnog peskovitog tla (Mugnai i sar., 2017a; 2017b; 2018). Pored toga, testirana je sposobnost cijanobakterija da indukuju razvoj bioloških pokorica i na drugim podlogama sem peska (Tabela 18). Roncero-Ramos i sar. (2017) su pokazali da je inokulacija krečnjaka poreklom sa kamenoloma nativnim cijanobakterijskim sojem roda *Nostoc* dovela do povećanja pokrivenosti biološkim pokoricama. Inokulacija *Phormidium ambiguum* i *Scytonema javanicum* na različitim vrstama tla (od muljevite ilovače do peska) je dovela do razvoja bioloških pokorica na svim testiranim podlogama, kao i povećanja plodnosti i stabilnosti tla (Chamizo i sar., 2018).

Predložena upotreba cijanobakterija za stabilizaciju i obnovu lesnih predela je naučno zasnovana na BLOCDUST hipotezi (Svirčev i sar., 2013; 2019). Cijanobakterije su dominantna komponenta BLP (Svirčev i sar., 2013) (Slika 63). U okviru ove studije je napravljen značajan korak u potvrđivanju biogenog poreklo lesa i ulozi cijanobakterija u inicijalnom formiranju lesa. Ranija istraživanja sprovedena od strane Hu i sar. (2002a) i Lan i sar. (2014) su podržala upotrebu cijanobakterijskog inokuluma u ubrzavanju prirodne sukcesije bioloških pokorica i dalji razvoj zajednice vaskularnih biljaka. Oni su istakli ulogu cijanobakterija i mikroalgi u ranijim stadijumima razvoja bioloških pokorica, a ulogu lišajeva, gljiva i mahovina u poboljšavanju strukture i fizičko-hemijskih svojstava tla. Takođe, u studiji Zhao i Xu (2013) je pokazano da su rani sukcesivni stadijumi razvijenih bioloških pokorica nakon primene “Grain for Green projekta”, u kojima su dominirale cijanobakterije, smanjili gubitak tla za 92%, dok su kasniji stadijumi sukcesivnog razvoja bioloških pokorica u potpunosti kontrolisali gubitak tla.

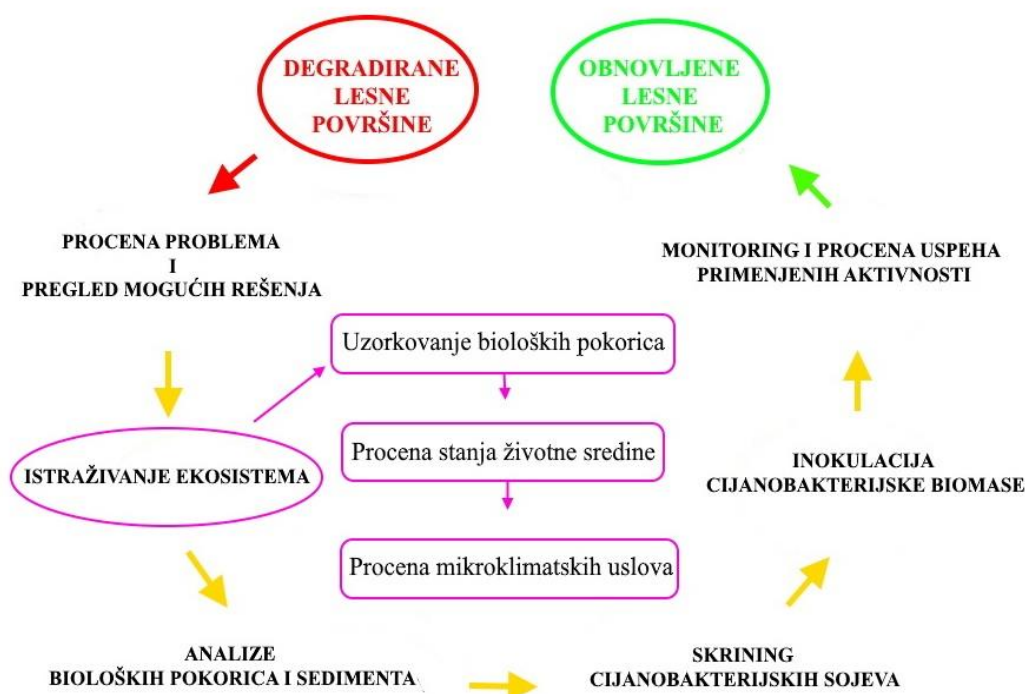


Slika 63. Biološke pokorice u kojima dominiraju cijanobakterije. Prirodno razvijene cijanobakterijske pokorice (A, B strelicama označeno) na površini lesnog profila štite sediment od erozije i smanjuje emisiju prašine u atmosferu
(Lokalitet: Lochuan, China)
(Foto: Prof. Zorica Svirčev)

5.4.2. Istraživanje ekosistema (analize na terenu)

Nakon procene da razvoj bioloških pokorica inokulacijom cijanobakterija može predstavljati rešenje za suzbijanje i borbu protiv negativnih posledica oštećenja lesnog pokrivača i dezertifikacije, neophodno je istražiti ekosistem ugroženog područja (Slika 64). Iako je preporuka da se koristi tačno određena komponenta bioloških pokorica (cijanobakterije), uspešna obnova i stabilizacija lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom zahtevaju znanje o celokupnoj zajednici bioloških pokorica, stanju životne sredine i mikroklimatskim faktorima tačno određenog područja. Svaki ekosistem karakteriše različita zajednica bioloških pokorica u zavisnosti od faktora životne sredine i svojstava površinskog sloja tla. Stoga, neophodno je izvršiti uzorkovanje svih tipova autohtonih

bioloških pokorica u svakom području gde se planira obnavljanje ogoljenih i oštećenih površina. Različiti tipovi bioloških pokorica se karakterišu prisustvom različitih vrsta, visoko specijalizovanih za život u određenim uslovima. Sastav zajednice bioloških pokorica zavisi od nekoliko faktora sredine kao što su padavine, tip supstrata i prisustvo vaskularnih biljaka (Concostrina-Zubiri i sar., 2014). Fizičko-hemijske osobine supstrata takođe mogu da utiču na sastav zajednice bioloških pokorica, na primer: sadržaj magnezijuma u supstratu može uticati na sukcesiju bioloških pokorica (Hu i Liu, 2003).



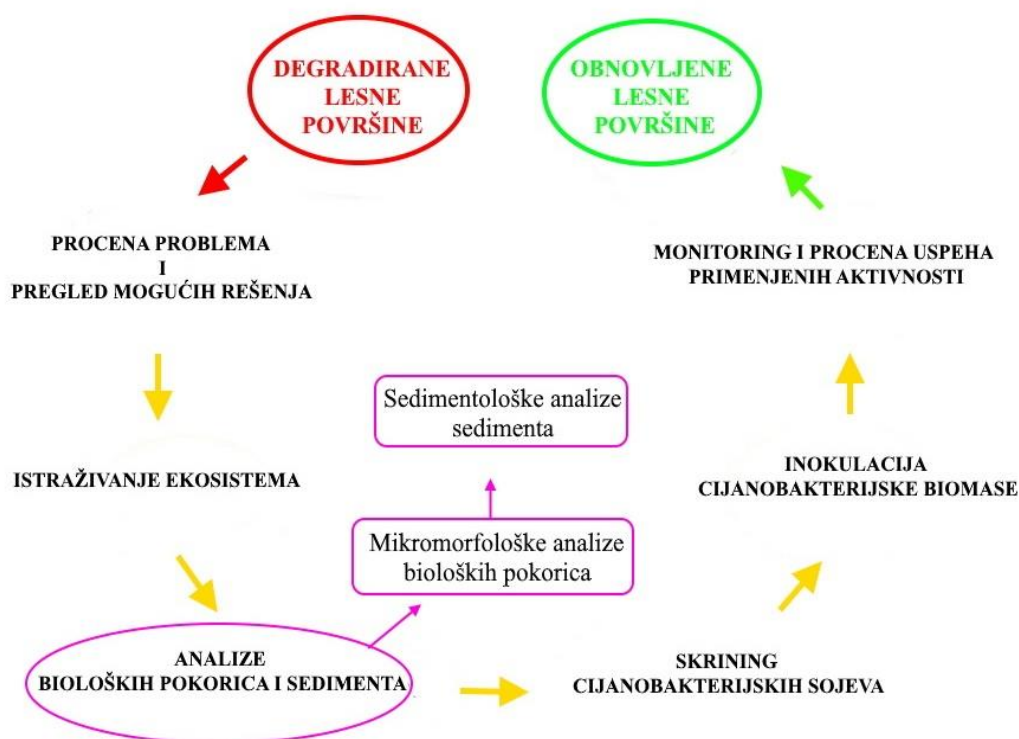
Slika 64. Istraživanje ekosistema odabranog degradiranog područja u procesu obnove lesnih područja i predela zahvaćenih dezertifikacijom

Osobine ekosistema i mikroklimatski uslovi određenog lokaliteta mogu imati značajan uticaj i na realizaciju primenjenih mera obnove. Specifične osobine sredine (kao što su način korišćenja zemljišta, klima, rasprostranjenost, narušavanje pokrivača bioloških pokorica i druge osobine) moraju biti procenjene. Williams i sar. (2018) su istražujući oporavak bioloških pokorica zapadne Evrope zaključili da klimatski faktori imaju značajan uticaj na početne stadijume oporavka bioloških pokorica. Optimalni vremenski uslovi (sezona) za inokulaciju cijanobakterija takođe moraju biti procenjeni u okviru ove aktivnosti. Akumulacija čestica prašine od strane organizama bioloških pokorica, njihov rast i reprodukcija zahtevaju vlažne uslove sredine (Gao i Yu, 2000; Chiquoine, 2012; Svirčev i

sar., 2013). Voda je primarni faktor koji utiče na razvoj bioloških pokorica (Bu i sar., 2014). Da bi se ubrzao razvoj bioloških pokorica obično je potrebno da inokulacija cijanobakterijama bude praćena zalivanjem tokom prvih dana (na primer: Xie i sar., 2007; Wang i sar., 2009; Wu i sar., 2013). Dakle, inokulacija cijanobakterijske biomase u najvlažnijoj godišnjoj sezoni bi značajno smanjila budžet potreban za proces obnove degradiranog ekosistema.

5.4.3. Sastav uzorkovanih bioloških pokorica i analiza sedimenta

Da bi se izvršila uspešna procena kako erodirani lesni sediment pretvoriti u stabilno tlo sa prirodnim biološkim pokrivačem potrebno je izvršiti detaljnu mikromorfološku analizu uzorkovanih bioloških pokorica (Slika 65).



Slika 65. Analize nativnih bioloških pokorica i sedimenta sa degradiranog područja u procesu obnove degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom

Posmatranje bioloških pokorica pod stereomikroskopom, svetlosnim i skening elektronskim mikroskopom može imati važnu ulogu u mikromorfološkom opisu bioloških pokorica. Ova studija je pokazala da se pomenutim posmatranjem dobija uvid u morfologiju,

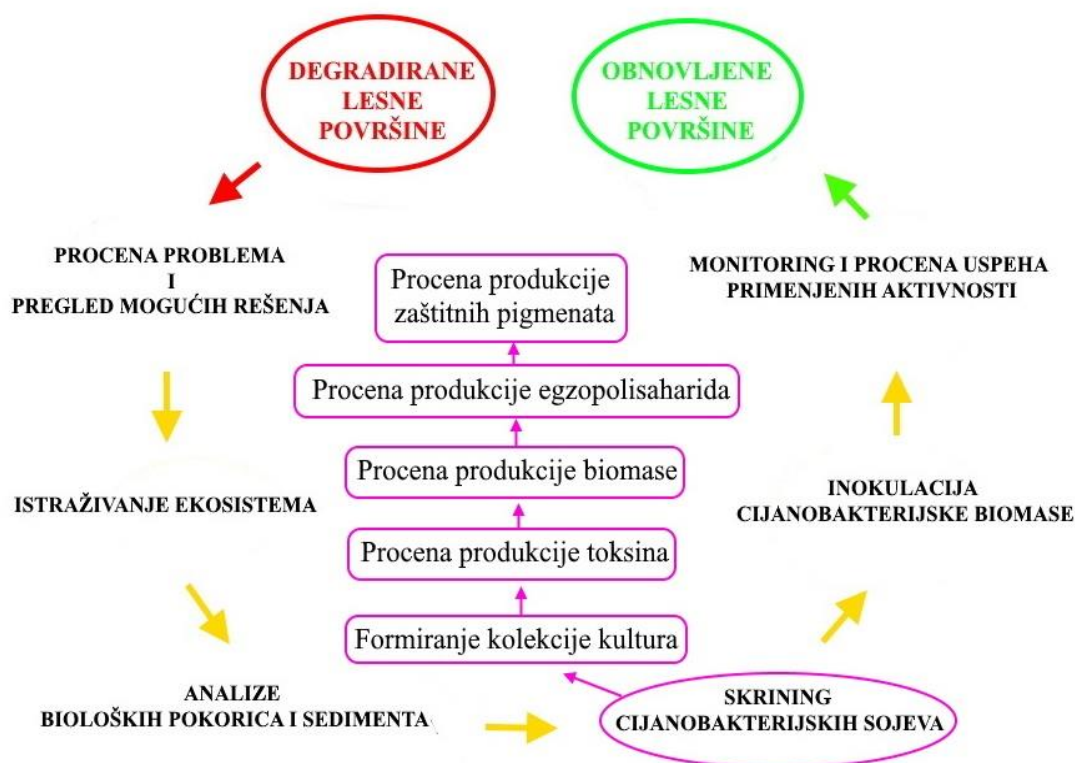
raspodelu i zastupljenost cijanobakterijskih kolonija i rodova/vrsta u posmatranim biološkim pokoricama, ali i uvid u interakciju cijanobakterija sa česticama lesa. Roncero-Ramos i sar. (2019c) su istakli važnost istraživanja autohtone zajednice koju je potrebno obnoviti, jer interakcija native zajednice sa inokulumom može uticati na uspeh obnove. Oni su pokazali pozitivan rezultat interakcije cijanobakterijskog inokuluma i native zajednice na manje degradiranom tlu, dok je ova interakcija na jače degradiranom tlu rezultirala slabijim razvojem cijanobakterija. Prikupljene informacije o nativnim biološkim pokoricama bi bile korisne prilikom odabira sojeva za terensku primenu.

Nakon klimatskih uslova, tekstura tla ima značajnu ulogu u oporavku bioloških pokorica (Williams i sar., 2018; Faist i sar., 2021). Analize degradiranog lesnog sedimenta je takođe potrebno izvršiti (Slika 65). Posebnu pažnju treba obratiti na veličinu čestica i analizu veličina pora. Stopa rasta cijanobakterija (Rozestein i sar., 2014), diverzitet i organizacija unutar bioloških pokorica (Dulić i sar., 2017) može zavisiti od organizacije pora i veličine čestica. Dulić i sar. (2017) su pokazali da filamentozne cijanobakterije dominiraju na supstratu krupnijih čestica, dok supstrat finijih čestica stvara uslove za veći cijanobakterijski diverzitet sa većom zastupljenošću kokalnih cijanobakterija i kraćih filamentoznih predstavnika. Ova studija je takođe pokazala dominaciju filamentoznih oblika cijanobakterija u predelu komore sa krupnijim česticama i dominaciju kokalnih predstavnika u delu komore sa finijim česticama. Pored uticaja na sastav i organizaciju zajednice, veličina pora i veličina čestica mogu uticati i na sadržaj vode. Finiji supstrati sa uskim porama, ali većom ukupnom površinom pora, imaju veći kapacitet zadržavanja vlage (Warren, 2001). Određivanje veličine pora je moguće izvršiti metodom snimanja (na primer: Lawrence i Jiang, 2017), dok je metoda prosejavanja pogodna za analizu veličine čestica (na primer: Dulić i sar., 2017) ili koristeći laserski uređaj za određivanje veličine čestica kao što je rađeno u okviru ove studije.

Poznavanje native zajednice, cijanobakterijskog diverziteta, organizacije kolonija unutar bioloških pokorica, kao i veličine čestica i organizacije pora sedimenta na kojem je potrebno izvršiti obnovu, omogućava utvrđivanje glavnih kriterijuma za odabir najprikladnijih sojeva za stabilizaciju i obnovu odabranog sedimenta. Dodatne analize koje bi poboljšale uspeh primenjenih mera obnove su mineraloške analize, stratifikacija čestica i njihova cementacija.

5.4.4. Skrining izolovanih sojeva - odabir optimalnih sojeva za inokulaciju

Da bi se pronašli najpogodniji i najefikasniji cijanobakterijski sojevi za obnavljanje degradiranog lesnog područja, neophodna je njihova izolacija iz nativnih bioloških pokorica koje su prethodno analizirane (Slika 66).



Slika 66. Skrining nativnih cijanobakterijskih sojeva u procesu obnove degradiranih lesnih područja i predela zahvaćenih dezertifikacijom

Nakon izolacije sledi isčišćavanje, kultivacija i determinacija sojeva kombinujući klasične i molekularne metode. Determinisani sojevi zatim postaju deo cijanobakterijske kolekcije kultura. Izolacija i isčišćavanje cijanobakterijskih sojeva u okviru ove studije je rađena po metodi Rippka (1988), dok su sojevi determinisani na osnovu morfoloških karaktera upotrebom ključeva za determinaciju. Kolekcije kultura omogućavaju čuvanje sojeva za njihova dalja istraživanja i biotehnošku upotrebu. Izolovani cijanobakterijski sojevi iz BLP su postali deo već postojeće Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija (NSCCC-Novi Sad Cyanobacterial Culture Collection) (Svirčev, 2005). Kriterijumi za odabir sojeva koji bi se koristili kao inokulum za obnavljanje degradiranih lesnih terena treba da sadrže što više informacija o sojevima, da bi se omogućilo formiranje održivih bioloških

pokorica koje su efikasne u stabilizaciji sedimenta. U ovoj studiji, ispitivane su različite karakteristike sojeva uključujući toksičnost, produkciju biomase, polisaharida, zaštitnih pigmenata, interakciju cijanobakterijskih kolonija sa česticama prašine, kao i sposobnost stabilizacije površinskog sloja lesnog sedimenta. Ispitivani sojevi su izolovani iz BLP uzorkovanih sa površina lesnog sedimenta Srbije, Kine i Irana. Za ispitivanje interakcije cijanobakterijskih kolonija sa česticama su korišćeni sojevi izolovani iz BLP iz Srbije i lesni sediment sa istog lokaliteta. Ovim je zadovoljena preporuka da se koriste autohtone cijanobakterije, kako bi se izbeglo unošenje invazivnih taksona (Zhao i sar., 2016). Ispitivanje interakcije cijanobakterija poreklom iz Kine i Irana sa česticama nije rađeno zbog nemogućnosti da se donese lesni sediment sa pomenutih lokaliteta.

Procena produkcije cijanotoksina

Procena toksičnosti cijanobakterijskih sojeva je neophodan korak u odabiru sojeva za upotrebu u obnovi degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom zbog poznatih negativnih efekata cijanotoksina. Da bi se izbegla produkcija cijanotoksina nakon primenjenih mera obnove, trebalo bi ispitati sposobnost izolovanih sojeva da produkuju cijanotoksine. Stoga, preporučljiva je primena molekularnih analiza PCR testom (*Polymerase Chain Reaction*) za detekciju gena povezanih sa produkcijom cijanotoksina. Neki od kodirajućih genskih klastera za cijanotoksine su: klaster mikrocistinskih gena (Nishizawa i sar., 1999; 2000; 2001; Tillet i sar., 2000; Christiansen i sar., 2003; Fewer i sar., 2003; Sielaf i sar., 2003; Pearson i sar., 2004; 2007), gen klaster za nodularin (Moffitt i Neilan, 2004), anatoksin-a gen klaster (Rantala-Ylinen i sar., 2011), cilindropermopsin gen klaster (Mihali i sar., 2008; Stüken i Jakobsen, 2010), saksitoksin gen klaster (D'Agostino i sar., 2014), lingbiatoksin gen klister (Edwards i Gerwick, 2004). Do sada je potvrđeno prisustvo gena *mycD*, jednog od gena odgovornih za biosintezu mikrocistina, u pustinjским pokoricama (Metcalf i sar., 2012). Stoga, izolovane sojeve iz terestričnih ekosistema je potrebno analizirati na sposobnost produkcije cijanotoksina. Sojeve kod kojih je potvrđeno prisustvo gena odgovornih za produkciju cijanotoksina treba isključiti iz daljih aktivnosti u svrhu obnove degradiranih površina.

Klasteri cijanotoksinskih gena su identifikovani za određene toksine, dok za mnogo cijanotoksina ne postoje. Prisustvo takvih oblika cijanotoksina je neophodno proceniti fizičko-hemijskim analizama. Ove metode uključuju tečnu hromatografiju-masena

spektrometrija (LC-MS/MS) za detekciju neurotoksičnih aminokiselina (Faassen i sar., 2016; Faassen, 2017), tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC) sa UV detektorom apsorpcije za analizu aplaziatoksina i dermoaplaziatoksina (Capper i sar., 2005; Harr i sar., 2008). Međutim, novi cijanotoksini se stalno otkrivaju i cijanobakterije mogu proizvesti i trenutno nepoznate cijanotoksine (Bláha i sar., 2009). Tada značajnu ulogu u proceni toksičnosti cijanobakterijskih sojeva mogu imati biološki testovi toksičnosti jer pružaju procenu ukupne toksičnosti. Ovi testovi su uglavnom jednostavne i isplative metode (Marsalek i Bláha, 2000). Neki od test organizama koji se mogu koristiti su beskičmenjaci poput rodova *Artemia* i *Daphnia*. Ova dva roda beskičmenjaka su osjetljivi i vrlo česti test organizmi kada je u pitanju detekcija cijanotoksičnosti (Marsalek i Bláha, 2000; Lindsay i sar., 2006; Ferrao-Filho i sar., 2010). *Artemia salina* biološki test toksičnosti se pokazao kao dobar indikator prisustva cijanotoksina zbog čega se često koristi u analizama toksičnosti cijanobakterija (Kiviranta i sar., 1991; Vezie i sar., 1996; Beattie i sar., 2003; Tokodi i sar., 2018). Iako se u većini studija upotreba ovog testa toksičnosti bazirala na njegovu osjetljivost na hepatotoksine (mikrocistine i nodularin) (Agrawal i sar., 2012), uspešno je korišćen i u detekciji toksičnosti cilindrospermopsina (na primer, Metcalf i sar., 2002) i anatoksina (Lahti i sar., 1995).

Imajući u vidu rečeno, procena cijanotoksičnosti sojeva bi trebala biti izvršena primenom seta metoda uključujući genske analize, fizičko-hemijske metode i biološke testove toksičnosti u cilju izbegavanja negativnih efekata cijanotoksina. Ukoliko bi (potencijalna) toksičnost izolovanih sojeva bila potvrđena nekom od predloženih/primenjenih metoda, te sojeve treba isključiti iz dalje upotrebe.

Procena produkcije biomase

Jednostavnost uzgoja i efikasna produkcija biomase mogu biti poželjne osobine prilikom odabira sojeva za inokulaciju na terenu. Sojevi sa visokom stopom rasta će omogućiti lakšu produkciju biomase većih razmera za inokulaciju na terenu. U ovoj studiji je produkcija biomase izolovanih sojeva procenjena merenjem koncentracije hlorofila *a* (Mackinney, 1941; APHA, 1992). Procena produkcije biomase može biti izvršena i primenom drugih metoda, kao što je metoda merenja suve biomase (DW) (na primer, Bruno i sar., 2012).

Terenska studija Hu i sar. (2002a) je pokazala da je soju *Nostoc* sp. bilo potrebno mnogo više biomase od sojeva *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium tenue* i *Scytonema javanicum* da stabilizuje pesak zbog morfologije kolonija. Sojevi roda *Microcoleus* su često odabirani među ostalim sojevima jer su primarni kolonizatori ogoljenog tla. Međutim, kultivacija *Microcoleus* se pokazala veoma sporom u pogledu produkcije biomase (Giraldo-Silva i sar., 2019), što može uticati na njegovu primenu u obnovi degradiranih površina. Stoga, prilikom odabira soja/sojeva za inokulaciju efikasnost soja u produkciji biomase treba da bude podržana drugim karakteristikama sojeva. Na količinu početnog inokuluma značajno utiče i veličina čestica nestabilizovanog tla. Mugnai i sar. (2020) su pokazali da je na pesku srednje veličine zrna, u odnosu na pesak krupnijih čestica, potrebna manja količina početnog inokuluma za razvoj bioloških pokorica sa istom stabilnošću agregata.

Proizvodnja biomase mora biti optimizovana za velike razmere zbog čega je potrebno pronaći jeftinije medijume za kultivaciju i sisteme pogodne za povećanje produkcije (Roncero-Ramos i sar., 2019b). Visoko produktivni sojevi biomase bi znatno smanjili troškove potrebne za obnovu degradiranih površina, međutim produkcija biomase nije jedina karakteristika prilikom izbora soja za inokulaciju. Produkcija egzopolisaharida i zaštitnih pigmenata igra značajnu ulogu u preživljavanju cijanobakterija u surovim uslovima sredine. Stoga, odabrane netoksične sojeve cijanobakterija bi trebalo testirati na sposobnost produkcije egzopolisaharida i zaštitnih pigmenata. Imajući u vidu da se nijedan soj ove studije nije pokazao kao toksičan, svi sojevi su analizirani na pomenute osobine. Međutim, pored značaja ekofizioloških osobina cijanobakterija namenjenih za inokulaciju na nestabilizovano tlo (Rossi i sar., 2017), granulometrija supstrata igra značajnu ulogu u određivanju početnog inokuluma (Mugnai i sar., 2020). Ova studija je pokazala afinitet pojedinačnih cijanobakterijskih sojeva u kolonizaciji određenog tipa čestica, što je u skladu i sa drugim studijama (Rozenstein i sar., 2014; Dulić i sar., 2017).

Procena produkcije egzopolisaharida

Produkcija egzopolisaharida ima centralnu ulogu u ovoj studiji jer su egzopolisaharidi važni za stabilnost agregata tla (Cano i sar., 1997) i proces formiranja lesa (Svirčev i sar., 2013; 2019). Chamizo i sar. (2019) i Mugnai i sar. (2020) su pokazali da kapsularni polisaharidi imaju značajniju ulogu u vezivanju čestica, dok izlučeni polisaharidi potencijalno kontrolišu dostupnost vode (Mugnau i sar., 2020). Izlučeni polisaharidi bi mogli imati važnu

ulogu u sprečavanju gubitka vode, povećavanju dužine vlažnog perioda i povećavanju dostupnosti vode biološkim pokoricama, što se smatra najvažnijim mehanizmom u obnavljanju bioloških pokorica (Bu i sar., 2014). Stoga, sojevi sa visokim potencijalom sinteze egzopolisaharida bi mogli imati važnu ulogu nakon inokulacije biomase, obezbeđujući vodu za razvoj bioloških pokorica.

U okviru ove studije, polisaharidi su analizirani njihovom kvantifikacijom primenom spektrofotometrijske metode pomoću fenol-sumporne kiseline (Dubois i sar., 1956). Kvantifikacija polisaharida je u skladu sa studijom Hu i sar. (2003) koja je pokazala da je stabilizacija čestica srazmerna količini produkovanih polisaharida. Pored kvantifikacije egzopolisaharida, struktura polimera može igrati važnu ulogu prilikom izbora soja za inokulaciju na terenu. Stabilizacija može biti jača ukoliko su polimeri sojeva sačinjeni od više različitih monosaharida i povezani različitim vezama (Hu i sar., 2003). Sastav polimera se može analizirati hromatografskim metodama (na primer: Khattar i sar., 2010).

Procena produkcije zaštitnih pigmenata

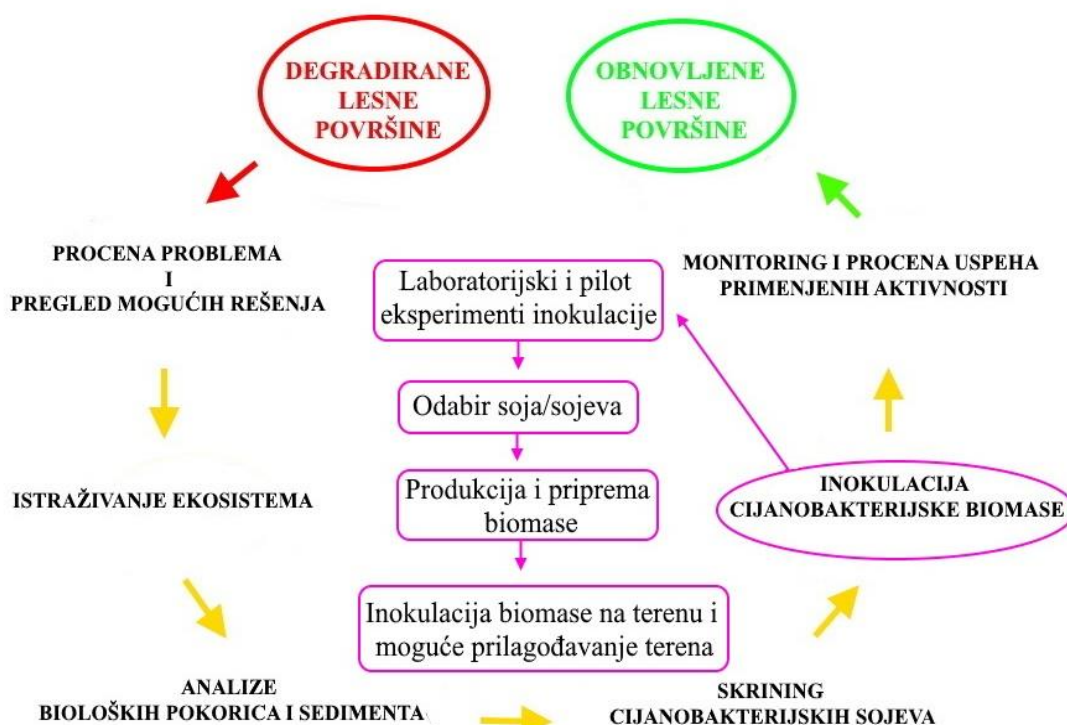
Pored isušivanja i ograničene dostupnosti hranljivih sastojaka, UV zračenje je važan faktor koji utiče na preživljavanje cijanobakterija. Sposobnost inokulisanih cijanobakterijskih sojeva da prežive nakon inokulacije je od ključnog značaja za uspostavljanje početne cijanobakterijske zajednice, zatim i celog procesa obnavljanja degradiranih površina. Cijanobakterije su razvile nekoliko mehanizama za borbu protiv štetnih efekata izloženosti UV zračenju (Pattanaik i sar., 2007), što je opisano u uvodnom poglavlju ove studije (potpoglavlje: *1.1. Opšte karakteristike cijanobakterija*). Jedna od strategija je sinteza UV zaštitnih supstanci, na primer: porodica pigmenata scitonemina i aminokiselina sličnih mikosporinu. Stoga, prilikom izbora soja/sojeva za inokulaciju posebnu pažnju treba posvetiti na njihovu sposobnost da sintetišu UV zaštitne pigmente. Budući da su degradirane lesne površine i područja zahvaćena dezertifikacijom uglavnom izložene jačem UV osvetljenju, inokulacija sojeva sa sposobnošću da produkuju UV zaštitne supstance će povećati stopu preživljavanja inokuluma i omogućiti razvoj vitalnije pionirske zajednice.

Zbog nestašice standarda mikosporina i scitonemina u okviru ove studije analizirani su metaboliti opsega apsorbanace mikosporina i scitonemina. Međutim, druge studije u kojima je korišćena ista metodologija su dokazale prisustvo scitonemina i mikosporina na istim apsorbanicama (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; 1993; Rastogi i Incharoensakdi, 2014;

Pantelić, 2017). U cilju preciznije identifikacije pigmenata grupe scitonemina preporuka je da se koriste metode kao što su HPLC sa detektorom sa nizom dioda (HPLC-DAD) (Rastogi i Incharoensakdi, 2014) ili LC-MS/MS (na primer: Airs i sar., 1991; Squier i sar., 2004a; 2004b). Pregled metoda za izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju mikosporinu sličnih aminokiselina dostupan je u studiji objavljenoj od strane Carreto i Carignan (2011). Autori predlažu upotrebu HPLC-DAD ili HPLC-MS za razdvajanje i identifikaciju MAAs.

5.4.5. Inokulacija cijanobakterijske biomase

Pre bilo kakve inokulacije na terenu, potrebno je testirati sposobnost odabranih sojeva da podstaknu brz razvoj bioloških pokorica u laboratorijskim uslovima i pilot eksperimentu *in-situ* (Slika 67).



Slika 67. Eksperimentalne studije inokulacije cijanobakterija i terenska inokulacija velikih razmera u procesu obnove degradiranih lesnih površina i područja zahvaćenih dezertifikacijom

Na osnovu rezultata ove studije, poznavanja fiziologije terestričnih cijanobakterija i svojstava lesnog sedimenta, najpoželjnija svojstva izabranih sojeva za inokulaciju na terenu uključuju: netoksičnost, brz rast, visoku sposobnost sinteze egzopolisaharida, produkciju zaštitnih pigmenata i morfologiju kolonija.

Različite cijanobakterijske sojeve, u konzorcijumu ili pojedinačno, sa različitom gustinom inokuluma treba analizirati u laboratorijskim uslovima radi procene afiniteta sojeva za rast na sedimentu određenog lokaliteta (veličina čestica i poroznost), potrebe za vodom i određenim mikroklimatskim uslovima kako bi se pored identifikacije najoptimalnijih sojeva odredila i najefikasnija koncentracija biomase inokuluma. Da bi se ispitao uticaj faktora životne sredine u datom području, najprikladnije sojeve iz laboratorijskih uslova bi trebalo testirati na eksperimentalnim parcelama tokom optimalne sezone rasta (vlažne sezone) za brži razvoj početnih stadijuma bioloških pokorica. Tek nakon odabira sojeva na osnovu rezultata laboratorijskih ispitivanja i terenskih eksperimenata treba pristupiti produkciji biomase većih razmera i inokulaciji na terenu.

Izbor sistema za masovnu produkciju cijanobakterijske biomase i odgovarajuće tehnike inokulacije može biti izazovan. Generalno, izbor sistema za masovnu produkciju biomase zavisi od finansijskih sredstava. Cijanobakterijska biomasa za obnovu degradiranih terena se obično proizvodi u tečnim kulturama (na primer: Wang i sar., 2009; Wu i sar., 2013; Park i sar., 2017). Međutim, kulture biofilmova mogu imati veliki potencijal u produkciji biomase za potrebe inokulacije na terenu u svrhu stabilizacije i obnove degradiranih područja. Biofilm predstavlja zajednicu organizama koja živi u sopstvenom ekstracelularnom matkriksu (Vert i sar., 2012). Ovakvi biofilmovi igraju značajnu ulogu u stabilizaciji čestica tla (Cano i sar., 1997), što ukazuje na potencijal biofilma da se koristi u stabilizaciji i obnovi degradiranih zemljišta. Prema Giraldo Silva i sar. (2016) biološke pokorice su verovatno najrazvijeniji biofilm na Zemlji.

Dvoslojni bioreaktor ili porozni supstratni bioreaktor je razvijen za kultivaciju mikroalgi u formi fototrofnog biofilma. Različiti oblici ovog bioreaktora razlikuju se po tome da li je biomasa koja se uzgaja potopljena u podlogu ili se uzgaja na poroznoj podlozi koja snadbeva biomasu hranljivim materijama i vlagom (Berner i sar., 2014). Prednosti biofilm bioreaktora u odnosu na gajenje u tečnim kulturama podrazumevaju: veću koncentraciju biomase po jedinici zapremine, potrebu za manjom količinom tečnog medijuma i izbegavanje skupih tehnika za sakupljanje biomase (Ozkan i sar., 2012; Berner i sar., 2014). Ekelhof i Melkonian (2017) su pokazali da mikroalga *Netrium digitu* produkuje dvadeset puta veću količinu ćelijske biomase i šest puta veću količinu egzopolisaharida kada se uzgaja na dvoslojnom bioreaktoru nego u tečnim kulturama. Pored često korišćenih sistema za produkciju biomase u tečnim kulturama (Chen i sar., 2006; Lan i sar., 2010; Wu i sar., 2013; Park i sar., 2017), biofilm bioreaktor može imati značajnu ulogu u procesu obnove degradiranih zemljišta zbog pogodne proizvodnje većih količina biomase i na taj način

ubrzati proces formiranja bioloških pokorica. Pored zatvorenih bioreaktora za proizvodnju biomase, postoje i otvoreni sistemi za kultivaciju cijanobakterija. Prednost upotrebe otvorenih sistema se ogleda u nižim troškovima zbog mogućnosti upotrebe direktne sunčeve svetlosti (Da Rosa i sar., 2011). Takođe, u cilju smanjenja troškova produkcije biomase, otpadne vode mogu služiti kao medijum za uzgajanje. (Wu i sar., 2018). Pomenuta upotreba otpadnih voda bi istovremeno služila i za njihovo prečišćavanje.

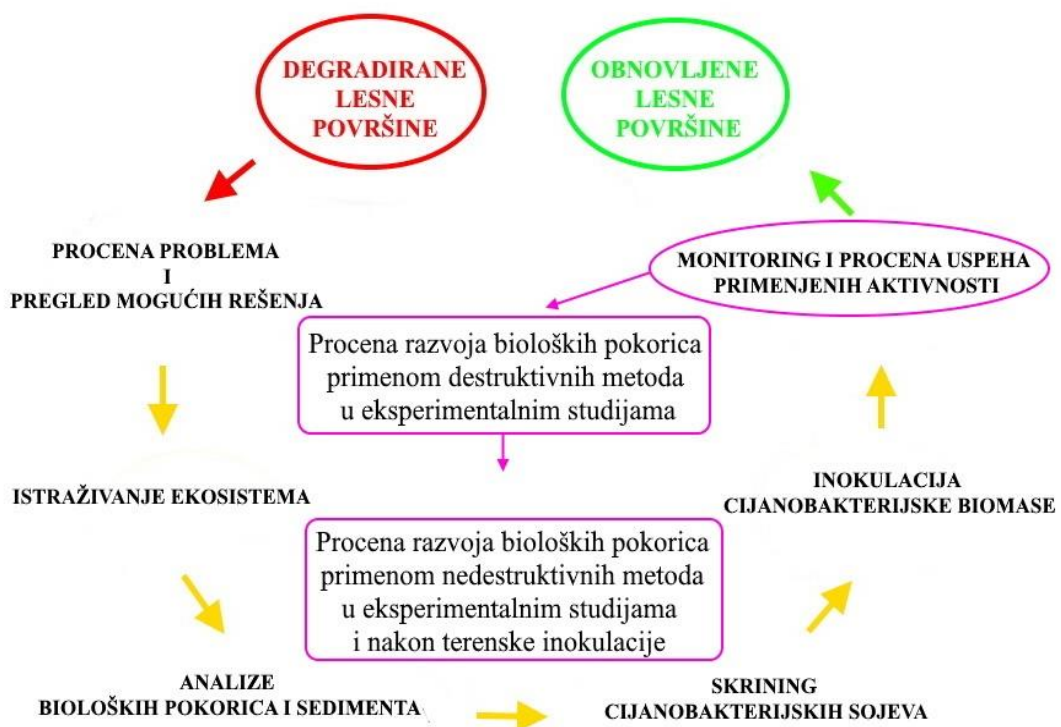
Nakon proizvodnje dovoljne količine biomase, sledi njena inokulacija na terenu. Najčešće korišćena uspešna tehnika inokulacije je prskanje biomase koje je testirano u laboratorijskim uslovima (Hu i sar., 2002a; Lan i sar., 2010; Rozenstein i sar., 2014) i terenskim istraživanjima (Hu i sar., 2002a; Chen i sar., 2006; Wang i sar., 2009; Park i sar., 2017). Na manjim površinama, na primer u laboratoriji, može se koristiti i takozvana tehnika kap po kap kada se pomoću pipete inokuliše biomasa (Mugnai i sar., 2018), nakon čega sledi jednostavno raspoređivanje biomase (Acea i sar., 2003). Bu i sar. (2014) su pokazali da je i inokulacija već razvijenih cijanobakterijskih pokorica po površini supstrata stvorila povoljne uslove za razvoj bioloških pokorica, zbog čega je ova metoda pod nazivom „broadcasting“ okarakterisana kao efikasna i izvodljiva za razvoj cijanobakterijskih bioloških pokorica. Izbor tehnike za inokulaciju biomase na terenu većih razmera bi mogao biti raspršivanje biomase pomoću poljoprivrednih aviona, kojim bi se omogućila inokulacija bez oštećenja postojećeg površinskog sloja tla (Sears i Prithiviraj, 2012). Roncero-Ramos i sar. (2020) su istakli da bi se proces obnove degradiranih terena mogao sastojati iz prve inokulacije sa pionirskim vrstama i drugom inokulacijom sa heterocistim vrstama. U njihovoj studiji cijanobakterije roda *Leptolyngbia* su dominirale u prvim fazama razvoja bioloških pokorica na degradiranim supstratima, dok su heterocistne cijanobakterije preuzele dominaciju u kasnijim sukcesivnim stadijumima bioloških pokorica. Rezultati ove studije su takođe pokazali da je došlo do potiskivanja inokulisanih heterocistih cijanobakterija roda *Nostoc*, dok su dominaciju preuzele cijanobakterije roda *Leptolyngbia*.

Antoninka i sar. (2020) su istakli da preživljavanje inokuluma zavisi od njegove prilagođenosti na uslove sredine. Oni su dali pregled studija u kojima su analizirani uslovi koji bi pomogli uspostavljanje zajednice bioloških pokorica na terenu i istakli da se preživljavanje inokuluma može unaprediti metaboličkim "ojačavanjem" inokuluma i smanjenjem stresa u životnoj sredini. Ojačavanje inokuluma ili metabolička modifikacija se može postići njegovim izlaganjem UV osvetljenju i smenama suvih i vlažnih uslova pre procesa inokulacije. Cijanobakterijski biofilm je u okviru ove studije izlagan smenama suvih i vlažnih uslova pre simulacije oluja prašine. Takođe, obezbeđivanjem izvora vlage i

produženjem vlažnog perioda, kao i smanjenjem UV zračenja se može omogućiti lakši razvoj bioloških pokorica u različitim ekosistemima (Antoninka i sar., 2020). Privremeno zalivanje nakon inokulacije je efikasno poboljšanje stanja životne sredine za uspostavljanje zajednice bioloških pokorica (Bowker i sar., 2019). Giraldo-Silva i sar. (2019) su pokazali da dostupnost vode i umerena temperatura, koja će sprečiti brzo isparavanje, omogućavaju preživljavanje inokuluma u prirodnim uslovima. Postavljanje mreže od jute na površinu tla omogućava stabilizaciju tla, poboljšava raspoloživost resursa, smanjuje UV zračenje i na taj način otklanja prepreke za razvoj bioloških pokorica (Bowker i sar., 2019, Antoninka i sar., 2020). Stoga, procena stresogenih faktora sredine i njihovo moguće ublažavanje na području gde se planira uspostavljanje zajednice bioloških pokorica predstavlja jedan od bitnih koraka ka uspešnom obnavljanju predela.

5.4.6. Monitoring rasta bioloških pokorica i procena uspeha primenjenih aktivnosti stabilizacije i obnove

Da bi se procenila efikasnost izabranih sojeva u obnovi degradiranih površina, neophodno je redovno praćenje rasta i razvoja bioloških pokorica (Slika 68).



Slika 68. Monitoring razvoja bioloških pokorica i procena uspeha primenjenih aktivnosti u procesu obnove degradiranih lesnih površina i područja zahvaćenih dezertifikacijom

Budući da su biološke pokorice vrlo osjetljive na mehanička oštećenja preporučljiva je upotreba nedestruktivnih metoda za monitoring razvoja bioloških pokorica nakon inokulacije cijanobakterijske biomase na terenu. Spektralna merenja prilikom kojih se koriste terenski spektrometar i vrši izračunavanje spektralnih indeksa, a ne zahteva uzorkovanje na terenu, može biti dobar izbor nedestruktivne metode za procenu razvoja bioloških pokorica (Zaady i sar., 2007; Rozenstein i sar., 2014). Studije su pokazale da postoje različiti spektralni indeksi pomoću kojih se može pratiti razvoj bioloških pokorica. BI indeks (Indeks osvetljenosti; na engleskom: Brightness Index) (Escadafal i Bacha, 1996) bi mogao da se koristi za procenu razvoja bioloških pokorica u ranijim stadijumima razvoja, dok je NDVI indeks (Normalizovani indeks razlike u vegetaciji; na engleskom: Normalized Difference Vegetation Index) (Tucker, 1979) predložen za procenu razvoja već formiranih bioloških pokorica.

Procena razvoja bioloških pokorica u laboratorijskim uslovima i pilot eksperimentima bi pored pomenutih nedestruktivnih metoda svakako trebala uključiti i uzorkovanje formiranih bioloških pokorica. Destruktivne metode bazirane na uzorcima pokorica se koriste za procenu razvoja veštački razvijenih bioloških pokorica i uključuju: merenje biomase ili koncentracije hlorofila *a* (Hu i sar., 2002a; Chen i sar., 2006; Wang i sar., 2009; Lan i sar., 2010; Wu i sar., 2013; Bu i sar., 2014; Rozenstein i sar., 2014), sadržaja polisaharida (Lan i sar., 2010, 2013; Rozenstein i sar., 2014; Mugnai i sar., 2018), sadržaja proteina (Rozenstein i sar., 2014), zaštitnih pigmenata scitonemina i karotenoida (Lan i sar., 2010; Wu i sar., 2013), mikroskopsko posmatranje formiranih pokorica i prisutnih vrsta (Hu i sar., 2002a; Chen i sar., 2006; Lan i sar., 2013; Wu i sar., 2013), vlage i debljine pokorica (Hu i sar., 2002a; Lan i sar., 2013; Wu i sar., 2013). Procena uspeha primenjenih aktivnosti obnove u dosadašnjim studijama uključivala je i ispitivanje karakteristika površinskog sloja primenom destruktivnih metoda: sadržaj organskog ugljenika (TOC) (Acea i sar., 2003; Lan i sar., 2013), ukupni azot i fosfor (Lan i sar., 2013; Wu i sar., 2013), dostupni azot i fosfor (Wu i sar., 2013), dostupni kalcijum, magnezijum, natrijum, kalijum (Acea i sar., 2003), kao i pH vrednost (Acea i sar., 2003; Wu i sar., 2013).

Na osnovu rečenog preporučuje se uvođenje nedestruktivnih metoda u redovan monitoring bioloških pokorica na terenu jer su biološke pokorice već degradirane u mnogim oblastima njihovog rasprostranjenja (Belnap i Eldridge, 2001), što negativno utiče na stabilnost datih ekosistema (Chiquoine, 2012).

Iako ova studija predstavlja naučni napredak u rešavanju problema dezertifikacije i oštećenih lesnih sredina potrebna je dalja optimizacija tehnologije, laboratorijska i terenska provera. Iako su biološke pokorice predmet interesovanja mnogih ekologa (Faist i sar., 2021),

neophodno je uključivanje šire naučne zajednice u sprovođenje aktivnosti obnove kao što su mikrobiolozi, botaničari, biohemičari, pedolozi, geolozi, tehnolozi, inženjeri, ekonomisti. Takođe, poželjno je sagledati rešenje problema sa medicinske i sociološke tačke gledišta imajući u vidu kompleksnost problema izazvanih dezertifikacijom i destrukcijom lesnih površina.

5.4.7. Odabrani sojevi nakon skrininga u cilju restoracije degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom

Na osnovi rezultata ove studije izabrani su sojevi sa potencijalom da se koriste u daljim istraživanjima za potrebe obnove degradiranih lesnih površina Srbije, Kine i Irana, kao i predela zahvaćenih dezertifikacijom. Sojevi su odabrani na osnovu sledećih osobina: netoksičnost, brz rast, visoka sposobnost sinteze izlučenih polisaharida, produkcija zaštitnih pigmenata i morfologija kolonija. Prilikom određivanja potencijala svakog soja prema posmatranim svojstvima u obzir su uzete najveće izmerene vrednosti za svaku od testiranih podloga, nezavisno od perioda kultivacije (Tabela 19). Azot, posle vode, je jedan od najvažnijih faktora koji mogu ograničiti primarnu produkciju u sušnim predelima (Whitford, 2002). Stoga, prednost treba dati sojevima koji postižu veću ili jednaku sposobnost produkcije određenih metabolita u uslovima bez izvora azota, imajući u vidu da uslovi sredine mogu favorizovati sojeve koji imaju sposobnost azotofiksacije.

Tabela 19. Odabir sojeva sa potencijalom da se koriste za obnovu degradiranih lesnih površina i predela zahvaćenih dezertifikacijom. Oznakom + su dodatno označeni sojevi sa visokim potencijalom određenog svojstva u odgovarajućim uslovima

Testirani soj	BG11 medijum	Toksičnost	Biomasa	Količina izlučenih polisaharida	Prinos izlučenih polisaharida	Viskozitet	MOMA	MOSA	Morfologija
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. L1	N+	+	-	+	-	-	+	-	+
	N-	+	-	-	+	-	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. L2	N+	+	-	+	-	+	+	+	+
	N-	+	-	-	-	+	+	+	
<i>Nostoc</i> sp. L2-2	N+	+	-	+	+	+	-	-	+
	N-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Tolypothrix</i> sp. L4	N+	+	-	+	-	+	+	-	+
	N-	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Nostoc</i> sp. L5	N+	+	+	+	-	-	+	-	+
	N-	+	+	-	-	-	-	+	
<i>Nostoc</i> sp. L6	N+	+	-	+	+	+	+	+	+
	N-	+	-	-	+	+	+	+	
<i>Nostoc</i> sp. L6-2	N+	+	+	+	-	+	+	-	+
	N-	+	-	-	-	-	-	+	

<i>Nostoc</i> sp. M1	N+	+	-	+	-	-	+	-	+
	N-	+	-	+	-	-	-	+	
<i>Nostoc</i> sp. R1	N+	+	±	+	-	-	-	-	+
	N-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. R5-2	N+	+	+	-	-	-	+	+	+
	N-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. SS1	N+	+	±	-	-	-	+	-	+
	N-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. SS4	N+	+	±	-	-	-	-	-	+
	N-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. GP14	N+	+	±	+	+	-	+	-	+
	N-	+	-	-	+	+	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. LP4	N+	+	-	+	+	-	-	+	+
	N-	+	-	-	-	-	-	+	
<i>Nostoc</i> sp. LP8-2	N+	+	-	-	+	-	+	-	+
	N-	+	-	-	-	+	-	+	
<i>Nostoc</i> sp. LR7	N+	+	±	+	+	-	+	+	+
	N-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. ZJ1	N+	+	±	-	-	-	+	-	+
	N-	+	-	-	+	+	-	-	

<i>Nostoc sp. IRN5D</i>	N+	+	±	-	-	+	+	-	+
	N-	+	±	-	-	+	+	+	
<i>Nostoc sp. IRN5I</i>	N+	+	+	+	-	-	-	-	+
	N-	+	+	-	+	+	-	-	
<i>Nostoc sp. IRN5K</i>	N+	+	+	+	-	+	-	-	+
	N-	+	-	-	-	+	-	+	
<i>Nostoc sp. IRN6</i>	N+	+	±	+	-	-	+	-	+
	N-	+	±	-	+	+	-	-	
<i>Nostoc sp. IRN8</i>	N+	+	+	+	-	+	+	-	+
	N-	+	±	-	-	+	-	-	

Bezbednost sojeva da se koriste u daljim istraživanjima njihovog potencijala za upotrebu u obnovi degradiranih lesnih površina i površina zahvaćenih dezertifikacijom izvršena je procenom njihove **toksičnosti**. Sojevi koji su izazvali mortalitet larvi *Artemia salina* manji od 50% smatraju se potencijalno bezbednim za dalja istraživanja i označeni su oznakom “+” (Tabela 19). U ovoj studiji ni jedan soj nije izazvao mortalitet larvi račića *Artemia salina* veći od 17%, što opravdava njihov potencijal za dalja ispitivanja i upotrebu u obnavljanju degradiranih površina. Iako je ova studija pokazala da biološki testovi (test mortaliteta *Artemia salina*) mogu biti primenjeni u određivanju toksičnosti sojeva, u slučaju njihove masovne upotrebe za inokulaciju na terenu preporučljiva je primena i drugih metoda detekcije cijanotoksina (na primer: LC-MS/MS, analize gena i primena drugih bioloških testova).

Klasifikacija sojeva u odnosu na produkciju **biomase** vršena je prema Ördog (2001) i prikazana u Tabeli 19. sa odgovarajućim oznakama. Sojevi koji su produkovali biomasu preko 2000 mg/L (veoma produktivni sojevi) su označeni oznakom “+”, sojevi čija se produkcija biomase kretala između 1000 i 2000 mg/L (dobri producenti biomase) oznakom “±”, dok su oznaku “-“ dobili slabo produktivni sojevi (produkcija manja od 1000 mg/L). Sojevi sa najvećom produkcijom, u podlozi bez izvora azota, za svaku državu (Srbiju, Kinu i Iran) su dodatno označeni zelenom bojom. Među sojevima izolovanim iz BLP iz Srbije, soj ***Nostoc sp. L5*** se istakao po skoro istoj produkciji biomase u obe podloge dajući visok prirast biomase (iznad 2 mg/mL). Ovaj soj je imao najveći prirast biomase u podlozi bez izvora azota. Ni jedan od pet testiranih sojeva izolovanih iz BLP iz Kine nije se istakao kao visoko produktivan soj. Dobri producenti biomase su bili sojevi *Nostoc sp. GP14*, *Nostoc sp. LR7*, *Nostoc sp. ZJ1*, ali samo u podlozi sa izvorom azota. Svi sojevi su u uslovima bez izvora azota produkovali biomasu manju od 1 mg/mL. Soj ***Nostoc sp. GP14*** je proizveo najviše biomase u obe testirane podloge, zbog čega može biti izabrani soj za dalja ispitivanja. Sojevi izolovani iz BLP iz Irana takođe nisu pokazali bolju produkciju biomase u uslovima bez izvora azota. Od tri soja (*Nostoc sp. IRN5I*, *Nostoc sp. IRN5K*, *Nostoc sp. IRN8*) koja su se pokazala kao veoma produktivni sojevi, samo je soj ***Nostoc sp. IRN5I*** pomenutu visoku produkciju biomase postigao u uslovima sa i bez izvora azota. Iako su neki sojevi u sedmoj nedelji kultivacije imali veći prinos biomase, nakon 16 nedelja soj *Nostoc sp. IRN5I* je postigao najveći prinos, što ukazuje na njegovu sporiju adaptaciju u tečnim kulturama ali ipak veću stopu produkcije biomase.

Sojevi kod kojih je ostvarena količina **izlučenih polisaharida** u kultivacionom medijumu iznad 2 mg/L su označeni sa “+” (Tabela 19), dok su sojevi sa najvećim

vrednostima ostvarenim u podlozi bez izvora azota dodatno označeni zelenom bojom. Obzirom da se izolovani sojevi ispituju za potrebe inokulacije na degradiranim lesnim površinama i rast u terestričnim ekosistemima, veću ulogu u izboru sojeva ima prinos izlučenih polisaharida (specifična produkcija izlučenih polisaharida po jedinici biomase) u odnosu na količinu u kultivacionom medijumu. Količina izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu je služila kao pomoćni kriterijum prilikom izbora sojeva. Sojevi izolovani iz BLP iz Srbije, sa prinosom izlučenih polisaharida preko 50 mg/g biomase su označeni sa “+” (Tabela 19), dok su ostalim sojevima dodeljene oznake “-“. Obzirom na izuzetno niske i približno slične vrednosti ostvarenih prinosa izlučenih polisaharida sojeva izolovanih iz BLP iz Kine, a u cilju selekcije najboljih sojeva, oznakom “+” su označeni sojevi koji su ostvarili prinose iznad 1,40 mg/g biomase (Tabela 19). Sojevi izolovani iz BLP iz Irana su pokazali prilično slične vrednosti prinosa izlučenih polisaharida sojevima iz Kine. U cilju selekcije najboljih sojeva, oznakom “+” su obeleženi sojevi koji su dostigli prinos izlučenih polisaharida iznad 5 mg/g biomase. Dva soja sa najvećim prinosima iz svake države (Srbije, Kine i Irana) u podlozi bez izvora azota su dodatno označena zelenom bojom. Soj *Nostoc sp. L6* je postigao najveći prinos izlučenih polisaharida u okviru ove studije, koji je ostvario u uslovima bez izvora azota. Njegov značaj je uvećan činjenicom da se istakao i po prinosu izlučenih polisaharida u podlozi sa izvorom azota, ali i da predstavlja jedan od dva soja sa najvećim prinosom ukupnih polisaharida. Ove činjenice ukazuju na visok potencijal pomenutog soja u produkciji egzopolisaharida nezavisno od prisustva azota u predelu gde se planira inokulacija. Soj *Chroococcidiopsis sp. L1* se takođe istakao po prinosu obe vrste polisaharida u uslovima bez izvora azota. U odnosu na ostale sojeve, kod oba soja su izmerene značajne vrednosti viskoziteta. Ranije studije (Billi i Grilli Caiola, 1996; Boison i sar., 2004) ukazuju da rast *Chroococcidiopsis* u semi-aridnim uslovima može biti otežan zbog visokog intenziteta svetlosti i koncentracije kiseonika koji ometaju proces azotifikacije. Međutim, ova studija je pokazala da *Chroococcidiopsis* kolonizuje niže slojeve bioloških pokorica, krijući se ispod drugih cijanobakterijskih vrsta, čime obezbeđuje sebi optimalne uslove za rast. Među kineskim sojevima, dva soja sa najvećim prinosom izlučenih polisaharida u uslovima bez izvora azota (*Nostoc sp. GP14* i *Nostoc sp. ZJ1*) su sojevi kod kojih je u istim uslovima izmerena značajnija vrednost viskoziteta. Sojevi *Nostoc sp. IRN51* i *Nostoc sp. IRN6* su imali najveći prinos izlučenih polisaharida u uslovima bez izvora azota u odnosu na ostale iranske sojeve. U datom trenutku postizanja najvećih prinosa, ova dva soja su pokazala i najveće vrednosti viskoziteta. Sojevi *Nostoc sp. IRN51* i *Nostoc sp. IRN6* su u uslovima sa izvorom azota produkovali i najveće količine izlučenih polisaharida u

kultivacionom medijumu. Poredeći sojeve izolovane iz BLP iz Kine i Irana sa sojevima iz BLP Srbije može se zaključiti da su sojevi iz Kine i Irana dostigli znatno niže prinose izlučenih polisaharida.

Sposobnost produkcije UV **zaštitnih pigmenata** svakog soja označena je sa oznakom“+“, dok su sojevi koji nisu pokazali sposobnost produkcije dva testirana pigmenta označeni oznakom “- “. Najveće zabeležene produkcije su dodatno označene zelenom bojom. Sojevi izolovani iz BLP iz Srbije koji su se izdvojili po najvećoj produkciji biomase i najvećem prinosu izlučenih polisaharida (*Nostoc sp. L5* i *Nostoc sp. L6*, redom) su pokazali sposobnost produkcije oba testirana zaštitna pigmenta. Sposobnost produkcije MOSA od strane soja *Nostoc sp. L6* je bila nezavisna od prisustva azota, kao i prinos izlučenih polisaharida. Takođe, kod pomenutog soja je izmeren najveći sadržaj MOMA u obe testirane podloge. Soj *Nostoc sp. L5* produkovao je MOSA u podlozi bez izvora azota, što čini ovaj soj pogodnim za rast u degradiranim sredinama gde je izražen nedostatak ovog nutrijenta. Takođe, izdvojeni soj po prinosu polisaharida *Chroococcidiopsis sp. L1* ima sposobnost produkcije jednog od testiranih pigmenata (MOMA). Sposobnost sinteze oba ili jednog od testiranih zaštitnih pigmenata pojačava potencijal ovih sojeva da rastu i razvijaju se u semi-aridnim sredinama. Sojevi izolovani iz BLP iz Kine koji su se izdvojili po produkciji biomase i prinosu izlučenih polisaharida (*Nostoc sp. GP14*, *Nostoc sp. ZJ1*) iako nisu pokazali sposobnost produkcije MOSA, prisustvo MOMA je detektovano u podlozi sa izvorom azota. *Nostoc sp. ZJ1* je produkovao najviše MOMA od kineskih sojeva. Među kineskim lesnim sojevima sposobnost produkcije oba pigmenta su pokazali sojevi *Nostoc sp. LP8-2*, *Nostoc sp. LR7*. Kod soja poreklom iz Irana koji je imao najveći prinos izlučenih polisaharida i produkciju biomase (*Nostoc sp. IRN 5I*) nije detektovano prisustvo ni jednog od zaštitnih pigmenata. U kulturi soja *Nostoc sp. IRN6*, drugog po prinosu izlučenih polisaharida, prisustvo MOMA je detektovano u podlozi sa izvorom azota. Sposobnost produkcije obe vrste zaštitnih pigmenata, u podlozi bez izvora azota, od iranskih sojeva pokazao je soj *Nostoc sp. IRN5D*.

Prilikom odabira sojeva **morfologija** sojeva igra značajan uticaj. Posebnu pažnju treba obratiti na sojeve koji imaju afinitet prema određenoj veličini čestica, kao što su *Chroococcidiopsis sp. L1* i *Tolypothrix sp. L4*. Značaj sojeva roda *Nostoc* ne treba zanemariti imajući u vidu njegovu dominaciju prilikom izolacije i činjenicu da predstavlja jedan od najrasprostranjenijih terestričnih cijanobakterija bioloških pokorica (Williams i sar., 2016). Kada su u pitanju sojevi izolovani iz BLP sa lesnog sedimenta iz Srbije, sojeve *Chroococcidiopsis sp. L1* i *Tolypothrix sp. L4* ne treba zanemariti zbog njihove morfologije i

afiniteta prema određenoj veličini čestica. Konzorcijum sojeva (*Chroococidiopsis* sp. L1, *Nostoc* sp. L2, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5, *Nostoc* sp. L6) izolovanih iz BLP sa lesnog sedimenta iz napuštene ciglane u Rumi je testiran da inicira formiranje veštačkih BLP koristeći lesni sediment sa istog lokaliteta kao izvor prašine. Rezultati su pokazali dominaciju roda *Chroococidiopsis* u delovima komore u koji dospevaju nasitnije čestice, dok se pomenuti soj izdvojio i po visokom prinosu izlučenih polisaharida bez obzira na slabiju produkciju biomase. *Tolypothrix* sp. L4 je pokazao sposobnost da dominira na sedimentu koji karakterišu krupnije čestice peska i širi prostor između njih (Dulić i sar., 2017). Nakon sedam nedelja kultivacije kod ovog soja je izmerena najveća količina izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu (Grafikon 27).

Obzirom na potisnuće roda *Nostoc* iz formiranih bioloških pokorica i potrebe za smanjenjem troškova pri produkciji biomase (produkcija biomase manjeg broja sojeva) za primenu na terenu, došlo se do zaključka da za dalja istraživanja treba izabrati konzorcijum sojeva sa najistaknutijim svojstvima potrebnim za razvoj pokorica. Stoga, za obnavljanje degradiranih lesnih površina **Srbije**, pre svega lokaliteta napuštene ciglane u Rumi, sojevi koji bi mogli da predstavljaju dobar izbor za dalja ispitivanja njihove inokulacije na terenu su sojevi sa zelenim oznakama “+” u tabeli 19.: soj sa najvišim prinosom izlučenih polisaharida (*Nostoc* sp. L6), soj sa visokim prinosom izlučenih polisaharida i afinitetom za vezivanje sitnijih čestica (*Chroococidiopsis* sp. L1), soj sa visokom produkcijom biomase (*Nostoc* sp. L5), soj sa sposobnošću kolonizacije krupnijih čestica i visokom količinom izlučenih polisaharida u kultivacionom medijumu (*Tolypothrix* sp. L4). Potencijal ovih sojeva je dodatno naglašen njihovom sposobnošću da produkuju oba zaštitna pigmenta (*Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. L6) ili samo jedan (*Chroococidiopsis* sp. L1 i *Tolypothrix* sp. L4). Kada je u pitanju odabir sojeva za obnovu degradiranih lesnih površina **Kine**, konzorcijum sojeva sa najvišim potencijalom u sintezi biomase i izlučenih polisaharida i sposobnošću sinteze metabolita mikosporin opsega (*Nostoc* sp. ZJ1 i *Nostoc* sp. GP14) bi mogao biti pojačan sojem koji je pokazao sposobnost produkcije metabolita opsega scitonemina (na primer: *Nostoc* sp. LP8-2) u cilju bolje zaštite potencijalnih BLP od štetnog UVA i UVB zračenja. Pojačavanje konzorcijuma sojeva iz **Irana** (*Nostoc* sp. IRN5I i *Nostoc* sp. IRN6) bi takođe trebalo sagledati, imajući u vidu da soj sa najvišim potencijalom u produkciji biomase i prinosa izlučenih polisaharida (*Nostoc* sp. IRN5I) nije pokazao sposobnost produkcije ni jednog od testiranih zaštitnih pigmenta. Soj *Nostoc* sp. IRN5D sa sposobnošću da produkuje oba zaštitna pigmenta bi mogao doprineti boljem preživljavanju ovog konzorcijuma nakon inokulacije.

Na osnovu prethodne diskusije, sojevi *Chroococcidiopsis* sp. L1, *Tolypothrix* sp. L4 *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. L6 mogu predstavljati izabrani konzorcijum sojeva za dalja laboratorijska ispitivanja i terenske eksperimente procene optimalne biomase inokuluma i procene razvoja BLP u cilju obnove degradiranih lesnih površina Srbije, kao autohtoni sojevi ovih istraživanja. Izabrani konzorcijumi autohtonih kineskih (*Nostoc* sp. GP14, *Nostoc* sp. LP8-2 i *Nostoc* sp. ZJ1) i iranskih sojeva (*Nostoc* sp. IRN5I, *Nostoc* sp. IRN5D i *Nostoc* sp. IRN6) bi mogli biti sojevi od izbora za dalja ispitivanja njihovog potencijala da uspostave interakciju sa česticama prašine i formiraju BLP. Međutim, imajući u vidu rezultate ove studije, kao i da je ispitano samo po pet sojeva iz Kine i Irana potrebna su dodatna ispitivanja BLP sa istraživanih lokaliteta Kine i Irana, izolacija i ispitivanje novih sojeva pre konačnog odabira sojeva za inokulaciju na terenima Kine i Irana.

Pored izbora sojeva baziranom na zahtevu da se inokulišu autohtoni sojevi, moglo bi se razmišljati i o kombinovanom konzorcijumu sojeva sa najboljim karakteristikama dobijenim u uslovima bez izvora azota tokom ovih istraživanja, a to bi bili sledeći sojevi: soj sa najvećim prinosom izlučenih polisaharida *Nostoc* sp. L6, soj sa najvećom produkcijom biomase *Nostoc* sp. L5 i soj sa sposobnošću produkcije oba zaštitna pigmenta *Nostoc* sp. IRN5D.

5.5. Uvođenje nove BLOCDUST teorije bazirane na ulozi i značaju cijanobakterija u formiraju lesnog sedimenta

Postavljanje naučne hipoteze predstavlja početak procesa u nastanku naučne teorije. Termin “teorija” se u nauci koristi za opisivanje najnaprednijih sistema znanja (Harte, 2011). Prema Tong (2003), dobro testirano, dokumentovano, objašnjenje prirodne pojave koje je potkrepljeno dokazima naziva se teorija. Naučne metode teže da objasne prirodne pojave univerzuma upotrebom logičnih, doslednih, sistematskih metoda istraživanja, prikupljanjem podataka, analizom podataka (hipoteza) i eksperimentalnim testiranjem. U ovoj studiji su korišćene naučne metode za dokazivanje postavljene BLOCDUST hipoteze u laboratorijskim uslovima. U tom smislu ova studija predstavlja napredak u istraživanju procesa formiranja lesnog sedimenta, prikazivanjem eksperimentalnih dokaza BLOCDUST hipoteze o biogenom poretku lesa. Za uspostavljanje naučne teorije postoji niz koraka koje je potrebno preduzeti (Tong, 2003). Nakon odabira prirodne pojave koju je potrebno otkriti i objasniti, potrebno je

prikupiti informacije o toj pojavi. Nakon sakupljanja dovoljno podataka i pronalaska obrazaca u tim podacima daje se privremeno objašnjenje pomenutih obrazaca, koje se naziva *hipoteza* (Tong, 2003). Sakupljanjem dosadašnjih informacija o poreklu lesa (sumirano u odeljku 1.3.2. *Formiranje lesnog sedimenta*) uočila su se neslaganja dosadašnjih definicija i objašnjenja porekla lesa i strukture formiranog lesnog sedimenta (Svirčev i sar., 2013). Do sada prihvaćena uloga vegetacije u hvatanju i sedimentaciji čestica prašine (Tsoar i Pye, 1987; Danin i Ganor, 1991), dovela se u pitanje obzirom da se najveći deo lesnog sedimenta formirao u semi-aridnim regionima tokom hladnih i suvih glacijalnih perioda kada je vegetacijski pokrivač bio slabo razvijen (Svirčev i sar., 2013). Najnovija istraživanja o formiranju lesa ukazuju da bi mikrobiološka zajednica ekstremofila na površini lesa (biološke pokorice) mogla imati ključnu ulogu u stabilizaciji deponovane prašine i njenom prevođenju u les (Svirčev i sar., 2013; 2019). Stoga, Svirčev i sar. (2013) su dali objašnjenja novih obrazaca u formiranju lesa i na taj način postavili BLOCDUST hipotezu. Sledeći korak je testiranje hipoteze u cilju sakupljanja dodatnih podataka kako bi se proverilo da li hipoteza i dalje pokazuje pretpostavljene obrasce. Prilikom sakupljanja podataka ne smeju se zanemariti oni koji su u suprotnosti sa hipotezom, već se usmeriti na razvijanje hipoteze (Tong, 2003). U tom smislu, istraživanja u ovoj studiji su bazirana na testiranju BLOCDUST hipoteze i postavci BLOCDUST teorije na osnovu rezultata testiranja i provere.

U eksperimentalnoj komori ove studije došlo je do pojave kompaktnog sloja lesnih čestica ispod BLP (Slika 47), kao rezultat sinergističke interakcije između žive i nežive komponente. Za razliku od eksperimentalne komore, u kontrolnoj komori u kojoj nije bilo BLP izdvojio se sloj rasutih čestica bez zaštitnog sloja BLP (Slika 53C; 53D). Prema Svirčev i sar. (2019) stabilizovani les je posledica (produkt) uspostavljanja sinergoze između žive i nežive komponente prirode (BLP i prašine). Williams i sar. (2012) su opisali biološke pokorice kao bio-sedimentni kompleks gde je interakcija između biološke i sedimentne komponente slabo istražena. Sinergoza opisuje ulogu BLP u vezivanju, akumulaciji i stabilizaciji čestica prašine (Svirčev i sar., 2019), što je eksperimentalno potvrđeno u ovoj studiji. Čestice prašine iz vazduha u okviru ove studije su služile kao izvor mineralnih hranljivih materija, dok je već prvi izdvojeni sloj lesa ispod BLP dalje služio kao podloga za rast BLP. Ovakva uloga nežive komponente ekosistema je opisana u sinergozi i njenom značaju u procesu formiranju lesnog sedimenta (Svirčev i sar., 2019). Uočena stabilizacija čestica prašine cijanobakterijskim kolonijama i egzopolisaharidima, kao i zaštitni sloj BLP preko istaloženog sloja lesa je u skladu sa BLOCDUST hipotezom gde se stabilizacija i zaštita čestica ističu kao glavne aktivnosti u procesu nastanka lesa (Svirčev i sar., 2013). Ova

studija potvrđuje teoretski opisanu ulogu biološke komponente (cijanobakterija) u stvaranju lesnog sedimenta (Svirčev i sar., 2013; 2019). Formiranjem lesa u eksperimentalnim uslovima pod aktivnim uticajem cijanobakterijskih BLP nameće se potreba dopune definicije lesa: les nije sediment samo eolskog porekla, nego i biogenog. Pantelić i sar. (2020) su u svojoj studiji pokazali prisustvo metabolita scitonemin opsega u BLP i lesnom sedimentu starom nekoliko desetina hiljada godina, čime se ukazuje na prisustvo cijanobakterija kada se određeni sloj lesa formirao. Opisana uloga cijanobakterijskih BLP u formiranju primarne strukture lesnog sedimenta je u skladu sa opisanom ulogom organizama bioloških pokorica u početnim stadijumima formiranja zemljišta (Schulz i sar., 2013). Mikroorganizmi organizovani u biofilmove učestvuju u rastvaranju minerala, obogaćuju ogoljeno tlo hranljivim materijama i vrše njegovu stabilizaciju, a samim tim predstavljaju osnovu za razvoj vaskularnih biljaka (Schulz i sar., 2013).

Stvaranjem veštačkog kompaktnog lesnog sedimenta samo u komori sa prisustvom BLP (Slike 47; 49), za razliku od rasutih čestica u kontrolnoj komori (Slika 53C; 53D), ova studija predstavlja bitan korak u dokazivanju biogenog porekla lesa. Značaj cijanobakterija kao žive komponente u procesu formiranja lesa je u skladu sa njihovom dominacijom u BLP sa lesnih profila iz Srbije (Svirčev i sar., 2013), kao i značajem BLP u vegetacijskom pokrivaču u lesnim predelima (Smalley i sar., 2011; Svirčev i sar., 2013). Ovim dualnim poreklom lesa (biološko i eolsko) potvrđuje se postojanje i značaj sinergoze u formiranju lesnog sedimenta (Svirčev i sar., 2019). Izdvajanje više podslojeva površinskog i podpovršinskog sloja BLP (Slika 52C; 52D) je posledica periodične simulacije oluja prašine. Zatrpavanje cijanobakterijskih kolonija olujama prašine iniciralo je migraciju cijanobakterija ka izvoru svetlosti. Vraćanje u površinske slojeve cijanobakterije vezuju nove čestice i formiraju novi sloj BLP, dok čestice prašine vezane tokom prethodne oluje ostaju akumulirane ispod novog sloja BLP. Vremenom su se u podpovršinskom sloju izdvojili podslojevi starih BLP zajedno sa zaostalim egzopolisaharidima i istaloženim česticama. Nekoliko studija je pokazalo da se vraćanjem cijanobakterija u površinske slojeve nakon zatrpavanja česticama pokreće novi proces vezivanja, akumulacije i stabilizacije čestica (Garcia-Pichel i Pringault, 2001; Thomas i Dougill, 2007; Williams i sar., 2012). Ovim cikličnim vezivanjem čestica cijanobakterijama, njihova akumulacija i stabilizacija su doveli do nakupljanja slojeva kompaktnog lesnog sedimenta. Malam Issa i sar. (1999) su istakli ulogu bioloških pokorica u taloženju čestica prašine i nakupljanju slojeva tla.

Ukoliko razvijena hipoteza predstavlja najbolje objašnjenje određene pojave i opstane u naučnoj zajednici, ona dobija status teorije. Svaka teorija je podložna modifikaciji ili

odbijanju ukoliko postoje dokazi koji je opovrgavaju ili podržavaju drugu teoriju (Tong, 2003). Prihvatanje naučnih radova koji opisuju ovu hipotezu (Svirčev i sar., 2013; 2019) za objavljivanje i njihovo citiranje (Tabela 20) ukazuju na prepoznavanje značaja BLOCDUST hipoteze od strane naučne zajednice i njeno dalje razvijanje.

Tabela 20. Broj citata BLOCDUST hipoteze u različitim naučnim bazama podataka.

Baza podataka	Broj citata	
	BLOCDUST 2013.	BLOCDUST 2019.
Scopus	31	4
Google scholar	45	7
Web of science	30	3

Ažurirana 30.03.2021.

BLOCDUST 2013.: Svirčev, Z., Marković, S.B., Stevens, T., Codd, G.A., Smalley, I.J., Simeunović, J., Obreht, I., Dulić, T., Pantelić, D., Hambach, U., 2013b. Importance of biological loess crusts for loess formation in semi-arid environments. *Quat. Int.* 296: 206-215.

BLOCDUST 2019: Svirčev, Z., Dulić, T., Obreht, I., Codd, G.A., Lehmkuhl, F., Marković, S.B., Hambach, U., Meriluoto, J., 2019. Cyanobacteria and loess-an underestimated interaction. *Plant Soil* 439:293-308.

6. ZAKLJUČCI

Dezertifikacija i degradacija površina lesnih sedimenata predstavljaju značajne ekološke probleme u mnogim delovima sveta. Zdravlje ljudi i životinja je ugroženo u regionima pogođenim ovim problemima, dok gubitak obradivog zemljišta usled uznapredovanog procesa dezertifikacije uzrokuje dodatne socio-ekonomske probleme. Metode koje se često koriste u obnovi degradiranog tla umerenih regiona, pošumljavanje, ima svoje nedostatke za primenu u aridnim i semi-aridnim sredinama, kao što su lesni predeli. Ova studija predstavlja napredak u obnovi degradiranih lesnih površina i ublažavanju posledica dezertifikacije, sprečavanju i prevenciji zdrastvenih, ekonomskih, ekoloških i socijalnih posledica ovih procesa.

Rezultati disertacije ukazuju na potencijal izolovanih cijanobakterijskih sojeva iz BLP za upotrebu u obnovi degradiranih površina zbog visokog potencijala u produkciji egzopolisaharida i biomase u uslovima bez izvora azota, kao i sposobnosti da proizvode zaštitne pigmente.

➤ Više od 90% izolovanih sojeva u okviru ove disertacije pripada rodu *Nostoc*. Svi izolovani sojevi iz BLP iz Kine i Irana su pripadali rodu *Nostoc*. Izolovani sojevi iz BLP iz Srbije su pored sojeva iz roda *Nostoc* imali po jednog predstavnika iz rodova *Tolypothrix* i *Chroococciopsis*. Izolovani sojevi su doprineli obogaćenju brojnosti sojeva u Novosadskoj kolekciji kultura cijanobakterija-NSCCC.

➤ Svi izolovani sojevi su izazvali mortalitet larvi *Artemia salina* manji od 20%. Najveći mortalitet je iznosio 16% i bio je izazvan od strane soja *Tolypothrix* sp. L4.

➤ Prisustvo izvora azota je stimulisalo produkciju biomase kod većine testiranih sojeva u oba posmatrana kultivaciona perioda. Najveća produkcija biomase od 3241 mg/L je zabeležena kod soja *Nostoc* sp. IRN8 u podlozi sa izvorom azota. Najproduktivniji soj u uslovima bez izvora azota izolovan iz BLP iz Srbije je *Nostoc* sp. L5 (2648 mg/L), koji je sličnu produkciju biomase pokazao i u podlozi sa izvorom azota. U istim uslovima, najproduktivniji soj iz BLP iz Kine je *Nostoc* sp. GP14 (906 mg/L), dok je iz Irana bio *Nostoc* sp. IRN5I (2529 mg/L) koji je sličnu količinu produkovane biomase ostvario i u uslovima sa izvorom azota.

➤ Prisustvo izvora azota je uticalo na veću količinu izlučenih i ukupnih polisaharida u kultivacionom medijumu kod većine testiranih sojeva. Najveće izmerene količine izlučenih i ukupnih polisaharida ove studije su zabeležene u podlozi sa izvorom azota. Soj *Nostoc* sp. L2

je dostigao najveću količinu izlučenih polisaharida (5,58 mg/L), dok je najviše ukupnih polisaharida ostvario soj *Nostoc* sp. IRN5I (19,08 mg/L). U uslovima bez izvora azota, soj sa najvećom količinom izlučenih i ukupnih polisaharida iz Srbije je *Nostoc* sp. M1 (4,54 mg/L izlučenih i 8,33 mg/L ukupnih polisaharida). U istim uslovima, najveću količinu polisaharida iz Kine su pokazali sojevi *Nostoc* sp. GP14 (1,00 mg/L izlučenih polisaharida) i *Nostoc* sp. LR7 (8,79 mg/L ukupnih polisaharida), dok su se iz Irana kao najbolji po količini polisaharida istakli sojevi *Nostoc* sp. IRN8 (1,58 mg/L izlučenih polisaharida) i *Nostoc* sp. IRN5I (11,18 mg/L ukupnih polisaharida). Primećen je pozitivan uticaj dužine kultivacije na količinu polisaharida. Kod većine testiranih sojeva (83%) je primećeno povećanje količine izlučenih i ukupnih polisaharida povećanjem dužine kultivacije nezavisno od prisustva izvora azota.

➤ Prinos izlučenih i ukupnih polisaharida je bio soj-specifičan sa statistički značajnim uticajem prisustva izvora azota. Prinos izlučenih i ukupnih polisaharida je kod većine testiranih sojeva bio stimulisan odsustvom izvora azota. Dva najproduktivnija soja izlučenih polisaharida ove studije su sojevi iz Srbije, *Nostoc* sp. L6 (122 mg/g biomase) i *Chroococcidiopsis* sp. L1 (78 mg/g biomase) sa ostvarenim prinosima u uslovima bez izvora azota. Sojevi sa najvećim prinosom izlučenih polisaharida u odsustvu izvora azota poreklom iz Kine su *Nostoc* sp. GP14 (1,40 mg/g biomase) i *Nostoc* sp. ZJ1 (1,53 mg/g biomase), dok su iz Irana *Nostoc* sp. IRN5I (8,06) i *Nostoc* sp. IRN6 (6,63 mg/g biomase).

➤ Kod 55% testiranih sojeva je prisustvo izvora azota u medijumu stimulisalo veći udeo izlučenih polisaharida u ukupnim polisaharidima, nezavisno od dužine kultivacije. Udeo izlučenih polisaharida u ukupnim polisaharidima iznad 50% je pokazalo 27%, odnosno 36% testiranih sojeva nakon sedam i 16 nedelja kultivacije.

➤ Na viskozitet medijuma testiranih sojeva uticaj su imali prisustvo izvora azota i dužina kultivacije. Veći viskozitet kultura starih sedam nedelja je bio stimulisan odsustvom izvora azota kod većine testiranih sojeva (90,91%), dok je veći viskozitet kultura starih 16 nedelja bio stimulisan prisustvom izvora azota kod većine testiranih sojeva (81,82%).

➤ Prisustvo MOMA je zabeleženo kod mnogo više testiranih sojeva (73% testiranih sojeva) od MOSA (50% testiranih sojeva). Sposobnost produkcije oba pigmenta pokazalo je 41% testiranih sojeva. Uočen je stimulirajući efekat odsustva izvora azota na produkciju MOSA, dok je prisustvo izvora azota stimulisalo produkciju MOMA.

Utvrđeno je da interakcija cijanobakterijskog biofilma i čestica prašine poreklom iz vazduha dovodi do formiranja bioloških pokorica. Odgovor formiranih BLP na dostupnost vode se ogledao u promeni mikromorfologije BLP i metaboličkoj reaktivaciji nakon vlaženja

u vidu povećanja sadržaja pigmenata. Mehanizam hvatanja, akumulacije i stabilizacije čestica cijanobakterijama se razlikovao u zavisnosti od morfologije cijanobakterijskih kolonija. Zarobljavanje čestica cijanobakterijskim filamentima i egzopolisaharidima je rezultiralo deponovanjem čestica i zaostalog egzopolisaharidnog materijala ispod cijanobakterijskih BLP, kao i vertikalnom stratifikacijom BLP. Aktivnošću cijanobakterijskih BLP došlo je do izdvajanja podpovršinskog sloja agregiranih čestica lesnog sedimenta zaštićenih površinskim slojem BLP, za razliku od čestica navejanih bez uticaja biološke komponente. Kao posledica interakcije čestica sa egzopolisaharidima došlo je do ukрупnjavanja čestica, stvaranja većih organo-mineralnih agregata od navejanih čestica i čestica navejanih simulacijom oluja prašine. Površinski zaštitni sloj BLP pokazao je ulogu u sprečavanju odnošenja čestica lesnog sedimenta erozivnim silama simuliranog vetra. Kao posledica sukcesivnih procesa došlo je do promene sastava zajednice u formiranim BLP, pojavljivanja novih sojeva i potiskivanja nekih sojeva koji su inicirali razvoj biofilma.

Identifikovan je konzorcijum sojeva poreklom iz Srbije (*Chroococcidiopsis* sp. L1, *Tolypothrix* sp. L4, *Nostoc* sp. L5 i *Nostoc* sp. L6) za dalja istraživanja njihove potencijalne upotrebe za obnovu degradiranih lesnih površina Srbije. Dalja istraživanja razvoja bioloških pokorica i aktivnosti obnove na terenu su neophodna, ali ova studija predstavlja eksperimentalni dokaz koncepta i napredak u razvoju strategije za borbu protiv dezertifikacije i oštećenja površina u lesnim predelima bazirajući se na fundamentalnom i aplikativnom značaju cijanobakterija u semi-aridnim sredinama i davanjem niza aktivnosti tačno definisanog redosleda za uspešnu stabilizaciju i obnovu degradiranih lesnih površina.

Stvaranje veštačkog kompaktnog lesnog sedimenta samo u komori sa prisustvom BLP, za razliku od rasutih čestica u kontrolnoj komori, predstavlja bitan korak u dokazivanju biogenog porekla lesa. Ovim se definicija lesa kao eolskog sedimenta prevodi u definiciju sa elementima i eolskog i biogenog porekla. Dualnim poreklom lesa (biološko i eolsko) potvrđuje se postojanje i značaj sinergoze u formiranju lesnog sedimenta. Pored toga, dualni koncept je kompletno objašnjen i fundamentalno i eksperimentalno dokazan tako da se kao glavni zaključak i doprinos ove doktorske disertacije može predstaviti prevođenje BLOCDUST hipoteze u BLOCDUST teoriju.

7. LITERATURA

- Abed, R.M.M., Polerecky, L., Al-Habsi, A., Oetjen, J., Strous, M., et al., 2014. Rapid recovery of cyanobacterial pigments in desiccated biological soil crusts following addition of water. PLoS ONE 9: e112372.
- Aboim, J.B., de Oliveira, D.T., de Mescouto, V.A., Reis, A.S., Rocha Filho, G.N., Santos, A.V., Xavier, L.P., Santos, A.S., Gonçalves, E.C., Nascimento, L.A.S., 2019. Optimization of light intensity and NaNO₃ concentration in amazon cyanobacteria cultivation to produce biodiesel. Molecules 24: 2326.
- Acea, M.J., Diz, N., Prieto-Fernández, A., 2001. Microbial populations in heated soils inoculated with cyanobacteria. Biol. Fert. Soils 33: 118-125.
- Acea, M.J., Prieto-Fernández, A., Diz-Cid, N., 2003. Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. Soil Biol. Biochem. 35: 513-524.
- Adhikary, S. P., Sahu, J. K., 1998. UV protecting pigments of the terrestrial cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea*. J. Plant Physiol. 153: 770-773.
- Agrawal, M., Yadav, S., Patel, C., Raipuria, N., Agrawal, M.K., 2012. Bioassay methods to identify the presence of cyanotoxins in drinking water supplies and their removal strategies. Eur. J. Exp. Biol. 2: 321-336.
- Ahrends, A., Hollingsworth, P.M., Beckschäfer, P., Chen, H., Zomer, R.J., Zhang, L., Wang, M., Xu, J., 2017. China's fight to halt tree cover loss. Proc. R. Soc. B. 284: 20162559.
- Airs, R.L., Atkinson, J.E., Keely, B.J., 1991. Development and application of a high-resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. J. Chromatogr. A 917: 167-177.
- Al-Quraishi, A.M.F., Hu, G.D., Chen, J.G., 2004. Land degradation detection, mapping, and monitoring in the Northwestern part of Hebei Province, China, using RS and GIS technologies. Map Asia Conference, August 26-29, Beijing, China.
- Antoninka, A., Faist, A., Rodriguez-Caballero, E., Young, K.E., Chaudhary, V.B., Condon, L.A., Pyke, D.A., 2020. Biological soil crusts in ecological restoration: emerging research and perspectives. Restor. Ecol. 28: S3-S8.
- APHA, 1992. Standard methods for the examination of waste and wastewater. American Public Health Association: Washington, DC, USA.

- Babić, O., 2018. Karakterizacija zemljišnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema planinskih područja Republike Srbije. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Bailey, D., Mazurak, A.P., Rosowski, J.R., 1973. Aggregation of soil particles by algae. *J. Phycol.* 9: 99-101.
- Beattie, KA, Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E., Pflugmacher, S., 2003. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aqua. Toxicol.* 62: 219-226.
- Bebout, B.M., Garcia-Pichel, F., 1995. UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4215-4222.
- Belnap, J., 1993. Recovery rates of cryptobiotic crusts: Inoculant use and assessment methods. *Great Basin Nat.* 53: 89-95.
- Belnap, J., 1994. Potential role of cryptobiotic soil crust in semiarid rangelands. In: *Proceedings - ecology and management of annual rangelands*; Eds: Monsen, S.B., Kitchen, S.G. General Technical Report INT-GTR-313. USDA Forest Service, Intermountain Research Station, Ogden, UT., pp: 179-185.
- Belnap, J., 2003. The world at your feet: Desert biological soil crusts. *Fron. Ecol. Environ.* 1: 181-189.
- Belnap, J., Eldridge, D.J., 2001. Disturbance and recovery of biological soil crusts. In: *Biological soil crusts: structure, function, and management*; Eds: Belnap, J., Lange, O.L. Springer Verlag, Berlin, pp: 363-384.
- Belnap, J., Gardner, J.S., 1993. Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Great Basin Nat.* 53: 40-47.
- Belnap, J., Kaltenecker, J., Rosentreter, R., Williams, J., Leonard, S., Eldridge, D., 2001. *Biological soil crusts: ecology and management*. Technical Report 1730-2, United States Department of the Interior.
- Belnap, J., Lange, L.O., 2003. *Biological soil crusts: structure, function, and management*; Springer Verlag: Berlin, Germany.
- Belnap, J., Lange, O.L., 2001. *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Ecological Studies 150. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Belnap, J., Phillips, S.L., Witwicki, D.L., Miller, M.E., 2008. Visually assessing the level of development and soil surface stability of cyanobacterially dominated biological soil crusts. *J. Arid Environ.* 72: 1257-1264.

- Berg, L.S., 1916. The origin of loess. *Izvestiya Russkogo Geograficheskogo Obshchestva* 52: 579-646.
- Berner, F., Heimann, K., Sheehan, M., 2014. Microalgal biofilms for biomass production. *J. Appl. Phycol.* 27: 1793-1804.
- Billi, D., Grilli Caiola, M., 1996. Effects of nitrogen limitations and starvation *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *New Phytol.* 133: 563-571.
- Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B., 2009. Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisc. Toxicol.* 2: 36-41.
- Blaženčić, J., 1998. *Sistematika algi. U: Sistematika algi*; Editor: Donceev, N. Naučna Knjiga, Beograd, Jugoslavija.
- Blaženčić, J., 2000. *Sistematika algi. IV izdanje.* NNK Internacional, Beograd.
- Blaženčić, J., 2007. *Sistematika algi.* NNK Internacional, Beograd.
- Böhm, G.A., Pfeleiderer, W., Böger, P., Scherer, S., 1995. Structure of a novel pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Biol. Chem.* 270: 8536-8539.
- Boison, G., Mergel, A., Jolkver, H., Bothe, H., 2004. Bacterial life and dinitrogen fixation at gypsum rock. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7070-7077.
- Bowker, M., Antoninka, A., Chuckran, P., 2019. Improving field success of biocrust rehabilitation materials: hardening the organisms or softening the environment? *Restor. Ecol.* 28: S177-S186.
- Bowker, M.A., 2007. Biological soil crust rehabilitation in theory and practice: An underexploited opportunity. *Restor. Ecol.* 15: 13-23.
- Bowker, M.A., Belnap, J., Bala Chaudhary, V., Johnson, N.C., 2008. Revisiting classic water erosion models in drylands: The strong impact of biological soil crusts. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2309-2316.
- Bowker, M.A., Belnap, J., Miller, M.E., 2006. Spatial modeling of biological soil crusts: support for rangeland assessment and monitoring. *Rangel. Ecol. Manag.* 59: 519-529.
- Bowker, M.A., Reed, S.C., Belnap, J., Phillips, S.L., 2002. Temporal variation in community composition, pigmentation and F_v/F_m of desert cyanobacterial soil crusts. *Microb. Ecol.* 43:13-25.
- Brüll, L.P., Huang, Z., Thomas-Oates, J.E., Paulsen, B.S., Cohen, E.H., Michaelsen, T.E., 2000. Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *J. Phycol.* 36: 871-881.

- Bruno, L., Di Pippo, F., Antonaroli, S., Gismondi, A., Valentini, C., Albertano, P., 2012. Characterization of biofilm-forming cyanobacteria for biomass and lipid production. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1052-1064.
- Bu, C., Wu, S., Yang, Y., Zheng, M., 2014. Identification of factors influencing the restoration of cyanobacteria-dominated biological soil crusts. *PLoS ONE.* 9: e90049.
- Büdel B, Veste, M., 2008. Biological crusts. In: Sand dune ecosystems in the Negev-desert; Eds: Breckle S et al. *Ecological Studies* 200, Berlin: Springer, pp: 149-55.
- Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N., Friedl, T., 2016. Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. In: *Biological soil crusts: an organizing principle in drylands*; Eds: Weber, B., Büdel, B., Belnap, J. Springer International Publishing; Cham, pp: 55-80.
- Bukurov, B., 1953. Geomorfološke crte južne Bačke. *Zbornik radova Geografskog institute SANU Jovan Cvijić* 4: 1-63.
- Burrell, A.L., Evans, J.P., De Kauwe, M.G., 2020. Anthropogenic climate change has driven over 5 million km² of drylands towards desertification. *Nat. Commun.* 11: 3853.
- Butel-Ponce, V., Felix-Theodose, F., Ponge, J.F., Bodo, B., 2004. New pigments from the terrestrial cyanobacterium *Scytonema* sp. collected on the Mitaraka Inselberg, French Guyana. *J. Nat. Prod.* 67: 678-681.
- Cai, Q., 2002. The Relationships between soil erosion and human activities on the Loess Plateau. 12th ISCO Conference, Beijing.
- Campbell, S.E., 1977. Desert Crust of Utah: an aridity adapted algal mat community. 16th Algal Symposium. Woods Hole, Massachusetts, pp: 11.
- Cano, M.S., De Mule, M.C.Z., de Caire, G.Z., de Palma, R.M., Colombo, K., 1997. Aggregation of soil particles by *Nostoc muscorum* Ag. (Cyanobacteria). *Phyton.* 60: 35-40.
- Cao, S., Chen, L., Shankman, D., Wang, C., Wang, X., Zhang, H., 2011. Excessive reliance on afforestation in China's arid and semi-arid regions: Lessons in ecological restoration. *Earth-Sci. Rev.* 104: 240-245.
- Cao, S., Chen, L., Yu, X., 2009. Impact of China's Grain for Green project on the landscape of vulnerable arid and semiarid agricultural regions: a case study in northern Shaanxi Province. *J. Appl. Ecol.* 46: 536-543.
- Capper, A., Tibbetts, I.R., O'Neil, J.M., Shaw, G.R., 2005. The fate of *Lyngbya majuscula* toxins in three potential consumers. *J. Chem. Ecol.* 31: 1595-606.

- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 445-459.
- Carpenter, E.J., Capone, D.G., Reuter, J.G., 1992. Marine pelagic cyanobacteria: *Trichodesmium* and other diazotrophs. NATO ASI Series C, Mathematical and Physical Sciences 362. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Carreto, J.I., Carignan, M.O., 2011. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar. Drugs* 21. 9: 387-446.
- Castenholz, R.W., 1997. Multiple strategies for UV tolerance in cyanobacteria. *Spectrum* 10: 10-16.
- Chamizo, S., Adessi, A., Mugnai, G., Simiani, A., De Philippis, R., 2019. Soil type and cyanobacteria species influence the macromolecular and chemical characteristics of the polysaccharidic matrix in induced biocrusts. *Microb. Ecol.* 78: 482-493.
- Chamizo, S., Cantón, Y., Lázaro, R., Domingo, F., 2013. The role of biological soil crusts in soil moisture dynamics in two semiarid ecosystems with contrasting soil textures. *J. Hydrol.* 489: 74-84.
- Chamizo, S., Cantón, Y., Miralles, I., Domingo, F. 2012. Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 49: 96-105.
- Chamizo, S., Mugnai, G., Rossi, F., Certini, G., De Philippis, R., 2018. Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: Gaining insights for applicability in soil restoration. *Front. Environ. Sci.* 6.
- Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K., Lukavsky, J., 2007. Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthonema africanum* a prospective phycobiliprotein producing strain. *J. Appl. Phycol.* 19: 537-544.
- Chatziefthimiou, A.D., Banack, S.A., Cox, P.A., 2020. Biocrust-produced cyanotoxins are found vertically in the desert soil profile. *Neurotox. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00224-x>.
- Chen, J., Zhao, L., Xu, J., Yang, R., He, S., Yan, X., 2013. Determination of oxidized scytonemin in *Nostoc commune* Vauch cultured on different conditions by high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Appl. Phycol.* 25: 1001-1007.
- Chen, L., Xie, Z., Hu, C., Li, D., Wang, G., Liu, Y., 2006. Man-made desert algal crusts as affected by environmental factors in Inner Mongolia, China. *J. Arid Environ.* 67: 521-527.

- Chiquoine, L.P., 2012. Restoration of biological soil crust on disturbed gypsiferous soils in lake Mead national recreation area, Eastern Mojave Desert. Dissertations, Las Vegas, University of Nevada.
- Chorus, I., 2001. Introduction: cyanotoxins-research for environmental safety and human health. In: Cyanotoxins-occurrence, causes, consequences; Eds: Chorus, I. Springer-Verlag, Berlin.
- Chrapusta, E., Kaminski, A., Duchnik, K., Bober, B., Adamski, M., Bialczyk, J., 2017. Mycosporine-like amino acids: potential health and beauty Ingredients. *Mar. Drugs* 15: 326.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E., 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* 185: 564-572.
- Cockell, C.S., Knowland, J., 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74: 311-345.
- Codd, G.A., Azevedo, S.M.F.O., Bagchi, S.N., Burch, M.D., Carmichael, W.W., Harding, W.R., et al., 2005b. Initial situation assessment and recommendations. International hydrobiological programme, technical documents in hydrology. Paris, UNESCO 76: 138.
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, L.F., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005c. Harmful cyanobacteria, Chapter 1. In: Harmful cyanobacteria; Eds: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. Springer Netherlands, pp: 1-23.
- Codd, G.A., Meriluoto, J., Metcalf, J.S., 2017. Introduction: cyanobacteria, cyanotoxins, their human impact, and risk management. In: Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis; Eds: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. John Wiley & Sons.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005a. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203: 264-72.
- Colesie, C., Szyja, M., Büdel, B., 2016. Secrets of success: eco-physiological traits of early successional soil crusts. BioCrust3, 3rd international workshop on biological soil crusts, September 26-30, Star Hall - Moab, Utah, USA.
- Concostrina-Zubiri, L., Martinez, I., Rabasa, S.G., Escudero, A., 2014. The influence of environmental factors on biological soil crust: from a community perspective to a species level approach. *J. Veg. Sci.* 25: 503-513.

- Cox, P.A., Richer, R., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Codd, G.A., Bradley, W.G., 2009. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: A possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10: 109-113.
- Cvijan, M., Blaženčić, J., 1996. Cyanophyta. Tom 1. U: *Flora algi Srbije*; Editor: Blaženčić, J. Naučna knjiga, Beograd. 290.
- D'Agostino, P.M., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2014. Current knowledge on paralytic shellfish toxin biosynthesis, molecular detection and evolution. In: *Toxins and biologically active compounds from microalgae*; Eds: Rossini, G.P. CRC Press, pp: 251-280.
- Da Rosa, A.P.C., Fernandes Carvalho, L., Goldbeck, L., Vieira Costa, J.A., 2011. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Convers. Manag.* 52: 3071-3073.
- Danin, A., Bor-Or, Y., Dor, I., Yisraeli, T., 1989. The role of cyanobacteria in stabilization of sand dunes in southern Israel. *Ecol. Mediterr.* 15: 55e64.
- Danin, A., Yaalon, D.H., 1980. Trapping of silt and clay by lichens and bryophytes in the desert environment of the Dead Sea Region, Bat Sheva Seminar on approaches and methods in paleoclimatic research with emphasis on aridic areas. Jerusalem, Israel, pp: 32.
- Danin, A., Ganor, E., 1991. Trapping of airborne dust by mosses in the Negev Desert, Israel. *Earth Surf. Process. Landf.* 16: 153-162.
- de Caire, G.Z., de Cano, M.S., Palma, R.M., de Mule, C.Z., 2000. Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1985-1987.
- de Caire, Z.G., Storni de Cano, M., Zaccaro de Mulé, M.C., Palma, R.M., Colombo, K., 1997. Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. *J. Appl. Phycol.* 9: 249-253.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R., Vincenzini, M., 1998. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1130-1132.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Pelosi, E., Ventura, S., 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.* 5: 387-394.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M., 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *J. Appl. Phycol.* 13: 293-299.

- De Philippis, R., Sili, C., Tassinato, G., Vincenzini, M., Materassi, R., 1991. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulate*. *Bioresour. Technol.* 38: 101-104.
- De Philippis, R., Vincenzini, M., 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 151-175.
- De Philippis, R., Vincenzini, M., 2003. Outermost polysaccharidic investments of cyanobacteria: Nature, significance, and possible applications. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 7: 13-22.
- Derbyshire, E., 2001. Geological hazards in loess terrain, with particular reference to the loess regions of China. *Earth Sci. Rev.* 54: 231-260.
- Derbyshire, E., 2007. Natural mineralogenic dust and human health. *Ambio.* 36: 73-7.
- Dillon, J., Castenholz, R., 1999. Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UV-C irradiation: implications for early photosynthetic life. *J. Phycol.* 35: 673-681.
- Dillon, J.G., Tatsumi, C.M., Tandingan, P.G., Castenholz, R.W., 2002. Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis* sp.). *Arch. Microbiol.* 177: 322-331.
- Dodds, W. K., Gudder, D. A., Mollenhauer, D., 1995. The ecology of *Nostoc*. *J. Phycol.* 31: 2-18.
- Dodić J., Grahovac J., 2013. Industrijska mikrobiologija: praktikum. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Doherty, K., Bowker, M.A., Antoninka, A., Durham, R., Grove, H., 2016. Shades of success: propagating the dominant drylands moss genus *Syntrichia*. BioCrust3, 3rd international workshop on biological soil crusts. September 26-30, Star Hall - Moab, Utah, USA.
- Doudle, S., Williams, W., 2010. Can we kick-start mining rehabilitation with cyanobacterial crusts? In: Proceedings of the 16th Biennial conference of the Australian rangeland society; Eds: Eldridge, D.J., Waters, C. Bourke, Australian Rangeland Society, Perth.
- Downing, S., Banack, S.A., Metcalf, J.S., Cox, P.A., Downing, T.G., 2011. Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of b-N-methylamino-L alanine. *Toxicon* 58: 187-194.
- Downing, T.G., Phelan, R.R., Downing, S., 2015. A potential physiological role for cyanotoxins in cyanobacteria of arid environments. *J. Arid Environ.* 112: 147-151.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 38: 350-356.
- Dulić, T., Meriluoto, J., Palanački Malešević, T., Gajić, V., Važić, T., Tokodi, N., Obreht, I., Kostić, B., Kosijer, P., Khormali, F., Svirčev, Z., 2017. Cyanobacterial diversity and toxicity of biocrusts from the Caspian Lowland loess deposits, North Iran. *Quat. Int.* 429: 74-85.
- Edwards, D.J., Gerwick, W.H., 2004. *Lyngbya* toxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 11432-11433.
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W., Scherer, S., 1997. UV-B-Induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* 179: 1940-1945.
- Ekelhof, A., Melkonian, M., 2017. Microalgal cultivation in porous substrate bioreactor for extracellular polysaccharide production. *J. Appl. Phycol.* 29: 1115-1122.
- Eldridge, D., 2000. Ecology and management of biological soil crusts: Recent developments and future challenges. *The Bryologist* 103: 742-747.
- Eldridge, D.J., Greene, R.S., 1994. Microbiotic soil crusts: A review of their roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia. *Aust. J. Soil Res.* 32: 389-415.
- Escadafal, R., Bacha, S., 1996. Strategy for the dynamic study of desertification. *Proc ISSS Int Symp*, February 6-10, Ouagadougou, Burkino Faso, pp. 19-34.
- Faassen, E.J., 2017. Extraction and LC-MS/MS analysis of underivatized BMAA. In: *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*; Eds: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Faassen, E.J., Antoniou, M.G., Beekman-Lukassen, W., Blahova, L., Chernova, E., Christophoridis C., Combes, A., Edwards, C., Fastner, J., Harmsen, J., Hiskia, A., Ilag, L.L., Kaloudis, T., Lopicic, S., Lürding, M., Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Porojan, C., Viner-Mozzini, Y., Zguna, N., 2016. A collaborative evaluation of LC-MS/MS based methods for BMAA analysis: Soluble bound BMAA found to be an important fraction. *Mar. Drugs.* 14: 45.
- Faist, A.M., Antoninka, A.J., Barger, N.N., Bowker, M.A., Chaudhary, V.B., Havrilla, C.A., Huber-Sannwald, E., Reed, S.C., Weber, B., 2021. Broader impacts for ecologists: biological soil crust as a model system for education. *Front. Microbiol.* 11: 577922.

- Felde, V.J.M.N.L., Peth, S., Uteau-Puschmann, D., Drahorad, S., Felix-Henningsen, P., 2014. Soil microstructure as an under-explored feature of biological soil crust hydrological properties: case study from the NW Negev Desert. *Biodivers Conserv.* 23:1687-1708.
- Ferrao-Filho, A.S., Soare, M.C.S., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M.F.O., 2010. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environ. Pollut.* 158: 2084-2093.
- Fewer, D., Wahlsten, M., Österholm, J., Jokela, J., Rouhiainen, L., Kaasalainen, U., Rikkinen, J., Sivonen, K., 2003. The genetic basis for O-acetylation of the microcystin toxin in cyanobacteria. *Chem. Biol.* 20: 861-869.
- Fleming, E.D., Castenholz, R.W., 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 9: 1448-1455.
- Fleming, E.D., Castenholz, R.W., 2008. Effects of nitrogen source on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 301-308.
- Gao, 1998. Chinese studies on the edible bluegreen alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *J. Appl. Phycol.* 10: 37-49.
- Gao, K., Yu, A., 2000. Influence of CO₂, light, and watering on growth of *Nostoc flagelliforme* mats. *J. Appl. Phycol.* 12: 185-189.
- Gao, L., Bowker, M.A., Xu, M., Sun, H., Tuo, D., Zhao, Y., 2017. Biological soil crusts decrease erodibility by modifying inherent soil properties on the Loess Plateau, China. *Soil Biol. Biochem.* 105: 49-58.
- Gao, X., 2017. Scytonemin plays a potential role in stabilizing the exopolysaccharidic matrix in terrestrial cyanobacteria. *Microb. Ecol.* 73: 255-258.
- Garcia-Pichel, F., Castenholz, R.W., 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 163-169.
- Garcia-Pichel, F., Johnson, S.L., Youngkin, D., Belnap, J., 2003. Small-scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado Plateau. *Microb. Ecol.* 46: 312-321.
- Garcia-Pichel, F., Pringault, O., 2001. Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature* 413: 380-381.
- Garcia-Pichel, F., Castenholz, R.W., 1991. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* 27: 395-409.

- Garcia-Pichel, F., Sherry, N.D., Castenholz, R.W., 1992. Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis*. *Photochem. Photobiol.* 56: 17-23.
- Giraldo Silva, A., Couradeau, E., De Martini, F., Garcia-Pichel, F., 2016. *Microcoleus vaginatus* carries a nitrogen-fixing microbiome that can help it colonize nutrient-deficient arid substrates. *BioCrust3*, 3rd international workshop on biological soil crusts, September 26-30, Star Hall-Moab, Utah, USA.
- Giraldo-Silva, A., Nelson, C., Barger, N.N., Garcia-Pichel, F., 2019. Nursing bio-crusts: Isolation, cultivation, and fitness test of indigenous cyanobacteria. *Restor. Ecol.* 27: 793-803.
- Goudie, A.S., 2014. Desert dust and human health disorders. *Environ. Int.* 63: 101-113.
- Graf, M.D., Rochetort, L., 2010. Moss regeneration for fen restoration: field and greenhouse experiments. *Restor. Ecol.* 18: 121-130.
- Grant, C.S., Louda, J.W., 2013. Scytonemin-imine, a mahogany-colored UV/Vis sunscreen of cyanobacteria exposed to intense solar radiation. *Org. Geochem.* 65: 29-36.
- Gröniger, A., Häder, D.P., 2000. Stability of mycosporine-like amino acids. *Recent Resear. Develop. Photochem. Photobiol.* 4: 247-252.
- Guljamow, A., Kreische, M., Ishida, K., Liaimer, A., Altermark, B., Bähr, L., Hertweck, C., Ehwald, R., Dittmanna, E. 2017. High-density cultivation of terrestrial *Nostoc* strains leads to reprogramming of secondary metabolome. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e01510-17.
- Hao, Q., Wang, L., Oldfield, F., Peng, S., Qin, L., Song, Y., Xu, B., Qiao, Y., Bloemendal, J., Guo, Z., 2012. Delayed build-up of Arctic ice sheets during 400,000-year minima in insolation variability. *Nature* 490: 393-396.
- Harper, K.T., Belnap, J., 2001. The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *J. Arid Environ.* 47: 347-357.
- Harper, K.T., Marble, J.R., 1988. A role for nonvascular plants in management of arid and semiarid rangeland. In: *Vegetation science applications for rangeland analysis and management*. Dordrecht, Netherlands; Eds: Tueller, P.T., Kluwer Academic Publishers, pp: 135-169.
- Harr, K.E., Szabo, N.J., Cichra, M., Philips, E.J., 2008. Debromoaplysiatoxin in *Lyngbya*-dominated mats on manatees (*Trichechus manatus latirostris*) in the Florida King's Bay ecosystem. *Toxicon* 52: 385-388.

- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183: 411-425.
- Harte, J., 2011. Maximum entropy and ecology: A theory of abundance, distribution, and energetics. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press.
- Hirschberg, J., Chamovitz, D., 1994. Carotenoids in cyanobacteria. In: The molecular biology of cyanobacteria; Eds: Bryant, D.A. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 559-579.
- Hossain, M.M., Nakamoto, H., 2003. Role for the cyanobacterial htpg in protection from oxidative stress, *Curr. Microbiol.* 46: 70-76.
- Hu, C., Liu, Y., Smestad Paulsen, B., Petersen, D., Klaveness, D., 2003. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydr. Polym.* 54: 33-42.
- Hu, C., Liu, Y., Song, L., Zhang, D., 2002a. Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. *J. Appl. Phycol.* 14: 281-292.
- Hu, C., Liu, Y., Zhang, D., Huang, Z., Paulsen, B.S., 2002b. Cementing mechanism of algal crusts from desert area. *Chin. Sci. Bull.* 47: 1361-1368.
- Hu, C.X.; Liu, Y.D., 2003. Primary succession of algal community structure in desert soil. *Acta Bot. Sin.* 45: 917-924.
- Huang, J., Zhang, G., Zhang, Y., Guan, X., Wei, Y., Guo, R., 2020. Global desertification vulnerability to climate change and human activities. *Land Degrad. Dev.* 31: 1380-1391.
- Huang, Z., Liu, Y., Paulsen, B.S., Klaveness, D., 1998. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *J. Phycol.* 34: 962-968.
- Jabbari, A., Besharat, S., Semnani, S., 2008. Role of silis in esophageal cancer. *World J. Gastroenterol.* 14: 3106-3107.
- Jiang, C., Zhang, H., Wang, X., Feng, Y., Labzovskii, L., 2019. Challenging the land degradation in China's Loess Plateau: Benefits, limitations, sustainability, and adaptive strategies of soil and water conservation. *Ecol. Eng.* 127: 135-150.
- Johnson, S.L., Budinoff, C.R., Belnap, J., Garcia-Pichel, F., 2005. Relevance of ammonium oxidation within biological soil crust communities. *Environ. Microbiol.* 7:1-12.
- Jovanović, M., Zvizdić, O., 2009. Geonasleđe lesnih profila u Vojvodini. DMIIZG "Branislav Bukurov", Novi Sad, pp: 103.

- Kehl, M., Sarvati, R., Ahmadi, H., Frechen, M., Skowronek, A., 2005. Loess paleosol sequences along a climatic gradient in Northern Iran. *Eiszeitalt. Ggw.* 55: 151-175.
- Keshavarzi, B., 2014. A possible link between mineralogy of loess deposits and high incidence rate of esophageal cancer in Golestan province of Iran. *Iran J. Sci. Technol.* 38A3: 281-287.
- Khattar, J. I. S. Singh, D. P. Jindal, N., Kaur, N., Singh, Y., Rahi, P., Gulati, A., 2010. Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Limnothrix redekei* PUPCCC 116. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162:1327-1338.
- Kharzi, M.I., Demirel, Z., Dalay, M.C., 2018. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. *J. Appl. Phycol.* 30:1513-1523.
- Khormali, F., Kehl, M., 2011. Micromorphology and development of loess-derived surface and buried soils along a precipitation gradient in Northern Iran. *Quat. Int.* 234: 109-123.
- Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., Huovinen, K., 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 423-436.
- Klisch, M., Häder, D.P., 2008. Mycosporine-like amino acids and marine toxins-The common and the different. *Mar. Drugs* 6: 147-163.
- Komárek, J., 2013. Cyanoprokaryota. 3. Heterocytous genera. In: *Süswasserflora von Mitteleuropa/Freshwater flora of Central Europe*; Eds: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M. Springer/Spektrum: Berlin/Heidelberg, Germany, pp: 1130.
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 1998. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales. In: *Süswasserflora von Mitteleuropa 19/1*; Eds: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. Gustav Fischer: Jena, Germany, pp: 548.
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 2005. Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. In: *Süswasserflora von Mitteleuropa 19/2*; Eds: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. Elsevier/Spektrum: Heidelberg, Germany, pp: 759.
- Konert, M., Vandenberghe, J., 1997. Comparison of laser grain size analysis with pipette and sieve analysis: a solution for the underestimation of the clay fraction. *Sedimentology* 44: 523-535.
- Kovač, D., 2017. Biotehnološki potencijal filamentoznih sojeva cijanobakterija sa područja vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno - matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

- Kovač, D., Babić, O., Milovanović, I., Mišan, A., Simeunović, J., 2017. The production of biomass and phycobiliprotein pigments in filamentous cyanobacteria: the impact of light and carbon sources. *Appl. Biochem. Microbiol.* 53: 539-545.
- Kremer, B., Kazmierczak, J., Stal, L., 2008. Calcium carbonate precipitation in cyanobacterial mats from sandy tidal flats of the North Sea. *Geobiology* 6: 46-56.
- Kukla, G.J., 1987. Loess stratigraphy in Central China. *Quat. Sci. Rev.* 6: 191-219.
- Kultschar, B., Liewellyn, C., 2018. Secondary metabolites in cyanobacteria. In: *Secondary metabolites - sources and applications*; Eds: Vijayakumar, R., Raja, S.S.S. IntechOpen, United Kingdom.
- Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapala, J., Sivonen, K., Niemelä, S.J., 1995. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 109-114.
- Lalić, D., Meriluoto, J., Zorić, M., Dulić, T., Mirosavljević, M., Župunski, M., Svirčev, Z., 2020. Potential of cyanobacterial secondary metabolites as biomarkers for paleoclimate reconstruction. *Catena* 185: 104283.
- Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Manca, M. C., Romano, I., & Gambacorta, A., 1996. Effect of growth conditions on endo- and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10C. *Phytochemistry* 42: 655-659.
- Lamb, D., Erskine, P.D., Parrotta, J.A., 2005. Restoration of degraded tropical forest landscapes. *Science* 310: 1628-1632.
- Lan, S., Zhang, Q., Wu, L., Liu, Y., Zhang, D., Hu, C., 2014. Artificially accelerating the reversal of desertification: Cyanobacterial inoculation facilitates the succession of vegetation communities. *Environ. Sci. Technol.* 48: 307-315.
- Lan, S.; Wu, L.; Zhang, D.; Hu, C., 2012. Successional stages of biological soil crusts and their microstructure variability in Shapotou region (China). *Environ. Earth Sci.* 65: 77-88.
- Lan, S.B., Wu, L., Zhang, D.L., Hu, C.X., 2013. Assessing level of development and successional stages in biological soil crusts with biological indicators. *Microb. Ecol.* 66: 394-403.
- Lan, S.B., Wu, L., Zhang, D.L., Hu, C.X., Liu, Y.D., 2010. Effects of drought and salt stresses on man-made cyanobacterial crusts. *Eur. J. Soil Biol.* 46: 381-386.
- Lawrence, M., Jiang, Y., 2017. Porosity, pore size distribution, micro-structure. In: *Bio-aggregates based building materials*; Eds: Amziane, S., Collet, F. RILEM State-of-the-Art Reports 23.

- Le Bissonnais, Y., 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodibility: I Theory and methodology. *Eur. J. Soil Sci.* 47: 425-437.
- Leonhard, K.C.V., 1824. Charakteristik der Felsarten e Dritte Abteilung. Trümmer- Gesteine. Lose Gesteine. Kohlen. Joseph Engelmann, Heidelberg.
- LeQuire, E., 2009. Biological soil crusts: A crucial component of arid ecosystems. *J. Fire Sci. Brief* 85: 1-6.
- Li, R., Wang, C., Zhao, Y., Yuan, S., Li, B., Li, X., Bu, C., 2016. Rapid restoration of moss biocrusts on field slope under spray-seeding and broadcasting. *BioCrust3*, 3rd international workshop on biological soil crusts. September 26-30, Star Hall - Moab, Utah, USA.
- Li, X.R., Tian, F., Jia, R.L., Zhang, Z.S., Liu, L.C., 2010. Do biological soil crusts determine vegetation changes in sandy deserts? Implications for managing artificial vegetation. *Hydrol. Process.* 24: 3621-3630.
- Li, Y., Shi, W., Aydin, A., Beroya-Eitner, M.A., Gao, G., 2020. Loess genesis and worldwide distribution. *Earth-Sci. Rev.* 201: 102947.
- Lindsay, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., 2006. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 48: 995-1001.
- Ložek, V., 1965. Das Problem der Lößbildung und die Lößmollusken. *Eiszeitalter und Gegenwart* 16: 61-75.
- Lyell, C., 1834. Observations on the loamy deposit called "loess" of the Basin of the Rhine. *Edinburgh New Philos. J.* 17: 110-113.
- Lynch, J.M., Bragg, E., 1985. Microorganisms and soil aggregate stability. *Aust. J. Soil Res.*, 27: 411-423.
- Mackinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- Maestre, F.T., Bowker, M.A., Cantón, Y., Castillo-Monroy, A.P., Cortina, J., Escolar, C., Escudero, A., Lázaro, R., Martínez, I., 2011. Ecology and functional roles of biological soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain. *J. Arid Environ.* 75: 1282-1291.
- Maestre, F.T., Martin, N., Diez, B., Lopez-Poma, R., Santos, F., Luque, I., Cortina, J., 2006. Watering, fertilization, and slurry inoculation promote recovery of biological crust function in degraded soils. *Microb. Ecol.* 52: 365-77.

- Maestre, F.T., Quero, J.L., Gotelli, N.J., Escudero, A., Ochoa, V., Delgado-Baquerizo, M., García-Gómez, M., Bowker, M.A., Soliveres, S., Escolar, C., et al., 2012. Plant species richness and ecosystem multifunctionality in global drylands. *Science* 335: 214-218.
- Mager, D.M. 2010. Carbohydrates in cyanobacterial soil crusts as a source of carbon in the southwest Kalahari, Botswana. *Soil Biol. Biochem.* 42: 313-318.
- Mager, D.M., Thomas, A.D., 2010. Carbohydrates in cyanobacterial soil crusts as a source of carbon in the southwest Kalahari, Botswana. *Soil Biol. Biochem.* 42: 313-318.
- Mager, D.M., Thomas, A.D., 2011. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil processes. *J. Arid Environ.* 75: 91-97.
- Malam Issa, O., Défarge, C., Le Bissonais, Y., Marin, B., Duval, O., Bruand, A., D'Acqui, L.P., Nordenberg, S., Annerman, M., 2007. Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. *Plant Soil* 290: 209-219.
- Malam Issa, O., Le Bissonais, Y., De'farge, C., Trichet, J., 2001. Role of a cyanobacterial cover on structural stability of sandy soils in the Sahelian part of western Niger. *Geoderma*, 101: 15-30.
- Malam Issa, O., Trichet, J., De'farge, C., Coute, A., Valentin, C., 1999. Morphology and microstructure of microbiotic soil crusts on a tiger bush sequence (Niger, Sahel). *Catena* 37: 175-196.
- Marković, S.B., Bokhorst, M, Vandenberghe, J., Oches, E.A., Zöller, L., McCoy, W.D., Gaudenyi, T., Jovanović, M., Hambach, U., Machalett, B. 2008: Late Pleistocene loess-paleosol sequences in the Vojvodina region, North Serbia. *J. Quat. Sci.* 23/1.
- Marković, S.B., Fitzsimmons, K.E., Sprafke, T., Gavrilović, D., Smalley, I.J., Jović, V., Svirčev, Z., Gavrilov, M.B., Beslin, M., 2016. The history of Danube loess research. *Quat. Int.* 399: 86-99.
- Marković, S.B., Hambach, U., Stevens, T., Kukla, G.J., Heller, F., McCoy, W.D., Oches, E.A., Buggle, B., Zöller, L., 2011. The last million years recorded at the Stari Slankamen loess-palaeosol sequence: revised chronostratigraphy and long-term environmental trends. *Quat. Sci. Rev.* 30: 1142-1154.
- Marković, S.B., Jovanović, M., Mijović, D., Bokhorst, M., Vandenberghe, J. Oches, E.A., Hambach U., Zoeller, L., Gaudenyi, T., Kovačev, N., Boganović, Ž., Savić, S., Bojanić, D., Milojković, N., 2005. Titel loess plateau-geopark. *Proceedings of 2nd*

- Conference on the geoheritage of Serbia. 22-23 Jun. 2004. godine. Beograd. Srbija, pp: 177-184.
- Marković, S.B., Smalley, I.J., Hambach, U., Antoine, P., 2009. Loess in the Danube region and surrounding loess provinces: the Marsigli memorial volume. *Quat. Int.* 198: 5-6.
- Marsalek, B., Bláha, L., 2000. Methods for detection and quantification of cyanobacterial toxins—a review. *Algol. Stud.* 99: 1-22.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in a microplate format. *Anal. Biochem.* 339: 69-72.
- Matsui, K., Nazifi, E., Kunita, S., Wada, N., Matsugo, S., Sakamoto, T., 2011. Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 105: 81-89.
- Mazor, G., Kidron, G.J., Vonshak, A., Abeliovich, A., 1996. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 121-130.
- Metcalf, J.S., Banack, S.A., Richer, R., Cox, P.A., 2015. Neurotoxic amino acids and their isomers in desert environments. *J. Arid Environ.* 112: 140-144.
- Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Ressler, J., Gerbersdorf, S., Pflugmacher, S., Codd, G.A., 2002. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *J. Water Supply Res. Technol.-aqua* 51: 145-151.
- Metcalf, J.S., Codd, G.A., 2012. Cyanotoxins. In: *Ecology of Cyanobacteria II Their Diversity in Space and Time*; Eds: Whitton, B.A. Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp: 651-675.
- Metcalf, J.S., Richer, R., Cox, P.A., Codd, G.A., 2012. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci. Total Environ.* 421-422: 118-123.
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Muenchoff, J., Barrow, K.D., Neilan, B.A., 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 716-722.
- Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6353-6362.

- Mollenhauer, D., Bengtsson, R., Lindstrém, E.A., 1999. Macroscopic cyanobacteria of the genus *Nostoc*: a neglected and endangered constituent of european inland aquatic Biodiversity. *Eur. J. Phycol.* 34: 349-360.
- Moreno, J., Angeles Vargas, M., Rodrí'guez, H., Rivas, J., Guerrero, M.G., 2003. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biomol. Eng.* 20: 191-197.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J., Guerrero, M.G., 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* 60: 175-182.
- Mostern, R., 2019. Loess is more: The spatial and ecological history of erosion on China's Northwest frontier. *J. Econ. Soc. Hist. Orient* 62: 560-598.
- Mota, R., Guimaraes, R., Buttel, Z., Rossi, F., Colica, G., Silva, C.J., Santos, C., Gales, L., Zille, A., De Philippis, R., Pereira, S.B., Tamagnini, P., 2013. Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. *Carbohydr. Polym.* 92: 1408-1415.
- Mugnai, G., Rossi, F., Chamizo, S., Adessi, A., De Philippis, R., 2020. The role of grain size and inoculum amount on biocrust formation by *Leptolyngbya ohadii*. *Catena* 184: 104248.
- Mugnai, G., Rossi, F., De Philippis, R., 2017a. Cyanobacterial crust induction using two non-previously tested cyanobacterial inoculants: crusting capability and role of EPSs. *Geophysical Research Abstracts* Vol. 19, EGU2017-730.
- Mugnai, G., Rossi, F., Felde, V.J.M.N.L., Colesie, C., Büdel, B., Peth, S., Kaplan, A., De Philippis, R., 2018. The potential of the cyanobacterium *Leptolyngbya ohadii* as inoculum for stabilizing bare sandy substrates. *Soil Biol. Biochem.* 127: 318-328.
- Mugnai, G., Rossi, R., Felde, V.J.M.N.L., Colesie, C., Büdel, B., Peth, S., Kaplan, A., De Philippis, R., 2017b. Development of the polysaccharidic matrix in biocrusts induced by a cyanobacterium inoculated in sand microcosms. *Biol. Fertil. Soils.* 54: 27-40.
- Muhs, D.R., Cattle, S.R., Crouvi, O., Rousseau, D.D., Sun, J.M., Zarate, M.A., 2014. Loess records. In: *Mineral dust*; Eds: Knippertz, P., Stuut, J.B.W. Springer Netherlands, Dordrecht, pp: 411-441.
- Munson, S., Belnap, J., Okin, G.S., 2011. Responses of wind erosion to climate-induced vegetation changes on the Colorado Plateau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 3854-3859.

- Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. In: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management; Eds: Chorus, I., Bartram, J. WHO.
- Nägeli, C., 1849. Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet. Neue Denkschrift Allg. Schweiz. Natur Ges. 10: 1-138.
- National Development and Reform Commission (NDRC); Ministry of Water Resources (MWR); Ministry of Agriculture (MA); State Forestry Administration (SFA), 2010. People's republic of China. In programming for comprehensive management of the Loess Plateau (2010-2030), pp: 4-14.
- Neher, D.A., Walters, T., Tramer, E., Weicht, T.R., Veluci, R.M., Saiya-Cork, K., Will-Wolf, S., Toppin, J., Traub, J., Johansen, J.R., 2003. Biological soil crust and plant communities in a sand savanna of northwestern Ohio. *J. Torrey Bot. Soc.* 130: 244-252.
- Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Giulio, A., Gambacorta, A., 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52: 639-647.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Shirai, M., 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* sp. *J. Biochem.* 126: 520-529.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Shirai, M., 2001. Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiology* 147: 1235-1241.
- Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K., Shirai, M., 2000. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic, heptapeptide microcystin. *J. Biochem.* 127: 779-789.
- Norboo, T., Anghcuk, P.T., Yahya, M., Kamat, S.R., Pooley, F.D., Corrin, B. et al., 1991. Silicosis in a Himalayan village population: role of environmental dust. *Thorax* 46: 341-3.
- Obreht, I., Hambach, U., Veres, D., Zeeden, C., Böskén, J., Stevens, T., Marković, S.B., Klasen, N., Brill, D., Burow, C., Lehmkuhl, F., 2017. Shift of large-scale atmospheric systems over Europe during late MIS 3 and implications for Modern Human dispersal. *Sci. Rep.* 7: 5848.
- Obreht, I., Zeeden, C., Hambach, U., Veres, D., Marković, S.B., Böskén, J., Svirčev, Z., Bačević, N., Gavrilov, M.B., Lehmkuhl, F., 2016. Tracing the influence of

- Mediterranean climate on Southeastern Europe during the past 350,000 years. *Sci. Rep.* 6: 36334.
- Obst, M., Dynes, J., Lawrence, J., Swerhone, G., Benzerara, K., Karunakaran, C., et al., 2009. Precipitation of amorphous CaCO₃ (aragonite-like) by cyanobacteria: a STXM study of the influence of EPS on the nucleation process. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73: 4180-4198.
- Ördög, V., 2001. Valuable microalgae in the Mosonmagyaróvár algal culture collection (MACC). International Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil Systems. June 20-22, Mosonmagyaróvár, Hungary, pp: 10.
- Ostwald, M., Moberg, J., Persson, M., Xu, J., 2011. The Chinese Grain for Green program—assessing the sequestered carbon from the land reform. World Renewable Energy Congress, May 8-13, Linköping, Sweden,
- Otero, A., Vincenzini, M., 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *J. Biotechnol.* 102: 143-152.
- Otero, A., Vincenzini, M., 2004. *Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *J. Phycol.* 40: 74-81.
- Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., Berberoglu, H., 2012. Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 114: 542-548.
- Palanački Malešević, T., Dulić, T., Obreht, I., Trivunović, Z., Marković, R., Kostić, B., Važić, T., Meriluoto, J., Svirčev, Z., 2021. Cyanobacterial potential for restoration of loess surfaces through artificially induced biocrusts. *Appl. Sci.* 11. <https://dx.doi.org/10.3390/app11010066>.
- Pantelić, D., 2017. Potencijal sekundarnih metabolita cijanobakterija kao biomarkera u paleoklimatskoj rekonstrukciji. Prirodno - matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Park, C.H., Li, X.R., Zhao, Y., Jia, R.L., Hur, J.S., 2017. Rapid development of cyanobacterial crust in the field for combating desertification. *PLoS ONE* 12: e0179903.
- Pattanaik, B., Schumann, R., Karsten, U., 2007. Effect of ultraviolet radiation on cyanobacteria and their protective mechanisms. In: *Algae and cyanobacteria in extreme environments*; Eds: Seckbah, J. Part of the cellular origin of life in extreme habitats and astrobiology, Springer-Verlag, Berlin, Germany 11: 29-45.

- Pearson, L.A., Barrow, K.D., Neilan, B.A., 2007. Characterization of the 2--hydroxy-acid dehydrogenaseMcyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *J. Biol. Chem.* 282: 4681-4692.
- Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A., 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6370-6378.
- Pécsi, M., 1990. Loess is not just the accumulation of dust. *Quat. Int.* 7: 1-21.
- Pecsi, M., 1995. The role of principles and methods in loess-paleosol investigations. *GeoJournal* 36: 117-131.
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P., 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 917-941.
- Potts, M., 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 34: 319-328.
- Potts, M., 2001. Desiccation tolerance: A simple process? *Trends Microbiol.* 9: 553-559.
- Powell, J.T., Chatziefthimiou, A.D., Banack, S.A., Cox, P.A., Metcalf, J.S., 2015. Desert crust microorganisms, their environment, and human health. *J. Arid Environ.* 112: 127-133.
- Proctor, M.C.F., 2000. Physiological ecology. In: *Bryophyte Biology*; Eds: Shaw, A.J., Goffinet, B. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 225-247.
- Prosperi, C.H., 1994. A cyanophyte capable of fixing nitrogen under high levels of oxygen. *J. Phycol.* 30: 222-224.
- Proteau, P.J., Gerwick, W.H., Garcia-Pichel, F., Castenholz, R., 1993. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia* 49: 825-829.
- Pye, K., 1987. *Aeolian Dust and Dust Deposits*. Academic Press, London.
- Pye, K., 1995. The nature, origin, and accumulation of loess. *Quat. Sci. Rev.* 14: 653-667.
- Raghimi, M., Ramezani Mojaveri, M., 2006. Investigation of esophageal cancer with medical geology aspect in Golestan Province, Iran. *Chin. J. Geochem.* 25: 58-59.
- Rantala-Ylinen, A., Kana, 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.
- Rao, B.Q., Liu, Y.D., Wang, W.B., Hu, C.X., Li, D.H., Lan, S.B., 2009. Influence of dew on biomass and photosystem II activity of cyanobacterial crusts in the Hopq Desert, northwest China. *Soil Biol. Biochem.* 41: 2387-2393.
- Rao, B.Q., Wu, P.P., Dauta, A., Li, D.H., Liu, Y.D., 2011. Effects of UV-B radiation on growth and ultrastructures of cyanobacterial crusts under greenhouse conditions. *Acta Sci. Circum.*, 31: 649-657.
- Rashki, A., Eriksson, P.G., de W. Rautenbach, J.C., Kaskaoutis, D.G., Grote, W., Dykstra, J., 2013. Assessment of chemical and mineralogical characteristics of airborne dust in the Sistan region, Iran. *Chemosphere* 90: 227-236.
- Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A., 2014. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87: 244-256.
- Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Moh, S.H., Lee, T.K., Kottuparambil, S., Kim, Y.J., Rhee, J.S., Choi, E.M., Brown, M.T., Häder, D.P., Han, T., 2014. Ultraviolet radiation and cyanobacteria. *J. Photochem. Photobiol. B* 141: 154-169.
- Rastogi, R.P., Sonani, R.R., Madamwar, D., Incharoensakdia, A., 2016. Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. *Algal Res.* 16: 110-118.
- Reynolds, J.F., Stafford Smith, D.M., Lambin, E.F., Turner II, B.L., Mortimore, M., Batterbury, S.P.J., Downing, T.E., Dowlatabadi, H., Fernández, R.J., Herrick, J.E., Huber-Sannwald, E., Jiang, H., Leemans, R., Lynam, T., Maestre, F.T., Ayarza, M., Walker, B., 2007. Global desertification: building a science for dryland development. *Science* 316: 847-851.
- Richer, R., Banack, S.A., Metcalf, J.S., Cox, P.A., 2015. The persistence of cyanobacterial toxins in desert soils. *J. Arid Environ.* 112: 134-139.
- Richert, L., Golubic, S., Le Guedes, R., Ratiskol, J., Payri, C., Guezennec, J., 2005. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Curr. Microbiol.* 51: 379-384.
- Richthofen, E.V., 1882. On the mode of origin of the loess. *Geological Magazine* 9: 293-305.
- Rippka, R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167: 3-27.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Rodríguez-Caballero, E., Belnap, J., Büdel, B., Crutzen, P.J., Andreae, M.O., Pöschl, U., Weber, B., 2018. Dryland photoautotrophic soil surface communities endangered by global change. *Nat. Geosci.* 11: 185-189.
- Rodríguez-Caballero, E., Cantón, Y., Chamizo, S., Afana, A., Solé-Benet, A., 2012. Effects of biological soil crusts on surface roughness and implications for runoff and erosion. *Geomorphology* 145-146: 81-89.
- Roncero-Ramos, B., Muñoz-Martín, M.A., Canton, Y., Chamizo, S., Rodríguez-Caballero, E., Mateo, P., 2020. Land degradation effects on composition of pioneering soil communities: An alternative successional sequence for dryland cyanobacterial biocrusts. *Soil Biol. Biochem.* 146: 107824.
- Roncero-Ramos, B., Muñoz-Martín, M.Á., Chamizo, S., Fernández-Valbuena, L., Mendoza, D., Perona, E., Cantón, Y., Mateo, P., 2019a. Polyphasic evaluation of key cyanobacteria in biocrusts from the most arid region in Europe. *PeerJ* 7: e6169.
- Roncero-Ramos, B., Román, J.R., Gómez-Serrano, C., Cantón, Y., Acién, F.G., 2019b. Production of a biocrust-cyanobacteria strain (*Nostoc commune*) for large-scale restoration of dryland soils. *J Appl Phycol* 31: 2217-2230.
- Roncero-Ramos, B., Román, J.R., Rodríguez-Caballero, E., Chamizo, S., Águila-Carricondo, P., Mateo, P., Cantón, Y., 2019c. Assessing the influence of soil abiotic and biotic factors on *Nostoc commune* inoculation success. *Plant Soil* 444: 57-70.
- Roncero-Ramos, B., Román, R., Gómez, C., Chamizo, S., Rodríguez-Caballero, E., Cantón, Y., 2017. Optimizing N-Fixing cyanobacteria culture to restore arid degraded soils. *Geophys. Res. Abstr.* 19: EGU2017-965.
- Rončević, Z., Grahovac, J., Dodić, S., Vučurović, D., Dodić, J., 2019. Utilisation of winery wastewater for xanthan production in stirred tank bioreactor: Bioprocess modelling and optimization. *Food Bioprod. Process.* 117: 113-125.
- Roshan, S.K., Farhangi, M., Emtiazjoo, M., Rabbani, M., 2015. Effects of solar radiation on pigmentation and induction of a mycosporine-like amino acid in two cyanobacteria, *Anabaena* sp. and *Nostoc* sp. *ISC26. Eur. J. Phycol.* 50: 173-181.
- Rossi, F., 2020. Beneficial biofilms for land rehabilitation and Fertilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 367: fnaa184.

- Rossi, F., De Philippis, R., 2015. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life* 5: 1218-1238.
- Rossi, F., Hua, L., Liu, Y., De Philippis, R., 2017. Cyanobacterial inoculation (cyanobacterisation): perspectives for the development of a standardized multifunctional technology for soil fertilization and desertification reversal. *Earth-Sci. Rev.* 171: 28-43.
- Rozenstein, O., Zaady, E., Katra, I., Karnieli, A., Adamowski, J., Yizhaq, H., 2014. The effect of sand grain size on the development of cyanobacterial biocrusts. *Aeolian Res.* 15: 217-226.
- Saiyed, H.N., Sharma, Y.K., Sadhu, H.G., Norboo, T., Patel, P.D., Venkaiah, K. et al., 1991. Non-occupational pneumoconiosis at high altitude villages in central Ladakh. *Br. J. Ind. Med.* 48: 825-9.
- Schulz, S., Brankatschk, R., Dümig, A., Kögel-Knabner, I., Schloter, M., Zeyer, J., 2013. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. *Biogeosciences*, 10: 3983-3996.
- Sears, J.T., Prithiviraj, B., 2012. Seeding of large areas with biological soil crust starter culture formulations: Using an aircraft dispersible granulate to increase stability, fertility, and CO₂ sequestration on a landscape scale. *IEEE Green Technologies Conference*, April 19-20, Tulsa, OK, USA.
- Shahsavani, A., Yarahmadi, M., Jafarzadeh Haghhighifard, N., Naim Abadi, A., Mahmoudian, M.H., Saki, H., Solat, M.H., Soleimani, Z., Ndaifi, K., 2011. Dust storms: environmental and health impacts. *J. North Khorasan Univ. Med. Sci.* 2: 45-56.
- Sharma, S., Chahar, O.P., 2013. Factors affecting exocellular polysaccharide production and growth by cyanobacterial strains. *Variorum Multi-Disciplinary e-Research Journal* 4: 1-9.
- Shi, H., Shao, M., 2000. Soil and water loss from the Loess Plateau in China. *J. Arid Environ.* 45: 9-20.
- Shields, L.M., Durrell, L.W., 1964. Algae in relation to soil fertility. *Bot. Rev.* 30: 92-128.
- Sielač, H., Dittmann, E., Tandeau De Marsac, N., Bouchier, C., Von Döhren, H., Börner, T., Schwecke, T., 2003. The *mcyF* gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Mycrocystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. *Biochem. J.* 373: 909-916.
- Simeunović, J., 2009. Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

- Simeunović, J., 2010. Cijanobakterije i cijanotoksini u površinskim vodama Vojvodine. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Simeunović, J., Bešlin, K., Svirčev, Z., Kovač, D., Babić, O., 2013. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. *Appl. Phycol.* 25: 597-607.
- Singh, S., Das, S., 2011. Screening, production, optimization, and characterization of cyanobacterial polysaccharide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1971-1980.
- Singh, S.P., Häder, D.P., Sinha, R.P., 2010. Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Res. Rev.* 9: 79-90.
- Singh, S.P., Klisch, M., Hader, D.P., Sinha, R.P., 2008. Role of various growth media on shinorine (mycosporine-like amino acid) concentration and photosynthetic yield in *Anabaena variabilis* PCC 7937. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3111-3115.
- Sinha, R.P., Ambasht, N.K., Sinha, J.P., Häder, D.P., 2003. Wavelength dependent induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitors and salt stress, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 171-176.
- Sinha, R.P., Häder, D.P., 2002. Life under solar UV irradiation in aquatic organisms. *Adv. Space Res.* 30: 1547-1556.
- Sinha, R.P., Häder, D.P., 2008. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Sci.* 174: 278-289.
- Sinha, R.P., Klisch, M., Gröniger, A., Häder, D.P., 1998. Ultraviolet absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B* 47: 83-94.
- Sinha, R.P., Singh, S.P., Häder, D.P., 2007. Database on mycosporines and mycosporinelike amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J. Photochem. Photobiol. B* 89: 29-35.
- Sivakumar, M.V.K., 2007. Interactions between climate and desertification. *Agric. For Meteorol.* 142: 143-155.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic cyanobacteria in water*; Eds: Chorus I., Bartram, J. E & FN SPON & WHO, Geneva, pp: 41-111.
- Smalley, I., Obrecht, I., 2018. The formation of loess ground by the process of loessification: a history of the concept. *Geologos* 24: 163-170.
- Smalley, I.J., Marković, S.B., 2014. Loessification and hydroconsolidation: there is a connection. *Catena* 117: 94-99.
- Smalley, I.J., Marković, S.B., Svirčev, Z., 2011. Loess is [almost totally formed by] the accumulation of dust. *Quat. Int.* 240: 4-11.

- Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J.C., Delgado, A., Magalhães, V.F., Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Azevedo, S.M., 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Toxicol.* 21: 95-103.
- Sprafke, T., Obreht, I., 2016. Loess: rock, sediment or soil: What is missing for its definition? *Quat. Int.* 399: 198-207.
- Squier, A.H., Airs, R.L., Hodgson, D.A., Keely, B.J., 2004a. Atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography/mass spectrometry of the ultraviolet screening pigment scytonemin: characteristic fragmentations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2934-2938.
- Squier, A.H., Hodgson, D.A., Keely, B.J., 2004b. A critical assessment of the analysis and distributions of scytonemin and related UV screening pigments in sediments. *Org. Geochem.* 35: 1221-1228.
- Stevens, T., Armitage, S.J., Lu, H., Thomas, D.S.G., 2006. Sedimentation and diagenesis of Chinese loess: implications for the preservation of continuous, high resolution climate records. *Geology* 34: 849-852.
- Stevens, T., Lu, H., Thomas, D.S.G., Armitage, S.J., 2008. Optical dating of abrupt shifts in the late pleistocene East Asian monsoon. *Geology* 36: 415-418.
- Stewart, W.D.P., 1973 Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 283-316.
- Stuart, R.K., Mayali, X., Lee, J.Z., Craig, Everroad, R., Hwang, M., Bebout, B.M., Weber, P.K., Pett-Ridge, J., Thelen, M.P., 2016b. Cyanobacterial reuse of extracellular organic carbon in microbial mats. *ISME J* 10:1240-1251.
- Stuart, R.K., Mayali, X., Boaro, A.A., Zemla, A., Everroad, R.C., Nilson, D., Weber, P.K., Lipton, M., Bebout, B.M., Pett-Ridge, J., Thelen, M.P., 2016a. Light regimes shape utilization of extracellular organic C and N in a cyanobacterial biofilm. *mBio* 7: e00650-16.
- Stüken, A., Jakobsen, K.S., 2010. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. *Microbiology* 156: 2438-2451.
- Su, C., Chi, Z., Lu, W., 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 25: 411-417.
- Sun, Y., Lu, H., An, Z., 2006. Grain size of loess, palaeosol and red clay deposits on the Chinese Loess Plateau: Significance for understanding pedogenic alteration and palaeomonsoon evolution. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 241: 129-138.

- Svirčev Z., 2005. Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Svirčev, Z., Baltić, V., Gantar, M., Juković, M., Stojanović, D., Baltić, M., 2010. Molecular Aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *J Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 28: 39-59.
- Svirčev, Z., Baltić, V., Simeunović, J., 2011. Cvetanje cijanobakterija u Srbiji-putevi ekspozicije, zdravstveni i zakonodavni aspekti. 16. Studenička akademija, Novi Sad.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Đenić, D., Simeunović, J., Hiskia, A., Kaloudis, T., Mijović, B., Šušak, S., Protić, M., Vidović, M., Onjia, A., Nybom, S., Važić, T., Palanački Malešević, T., Dulić, T., Pantelić, D., Vukašinović, M., Meriluoto, J., 2017a. Lessons from the Užice case: how to complement analytical data. In: *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*; Eds: Meriluto, J., Spoof, L., Codd, G.A. Wiley, Chichester, pp: 298-308.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Lužanin, Z., Munjas, A.M., Nikolin, B.; Vuleta, D., Meriluoto, J., 2014. Epidemiology of cancers and in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J. Environ. Sci. Health C* 32: 319-337.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Mijović, B., Codd, G.A., Meriluoto, J., 2017b. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 91: 621-650.
- Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V., 2013a. Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J. Environ. Sci. Health C* 31: 181-200.
- Svirčev, Z., Dulić, T., Obreht, I., Codd, G.A., Lehmkuhl, F., Marković, S.B., Hambach, U., Meriluoto, J., 2019. Cyanobacteria and loess-an underestimated interaction. *Plant Soil* 439: 293-308.
- Svirčev, Z., Krstić, S., Miladinov-Mikov, M., Vidović, M., 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health C* 27: 36-55.
- Svirčev, Z., Lujčić, J., Marinović, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Stojiljković, B., Meriluoto, J., 2015. Toxicopathology induced by microcystins and nodularin: A histopathological review. *J. Environ. Sci. Health C* 33: 125-167.

- Svirčev, Z., Marković, S.B., Stevens, T., Codd, G.A., Smalley, I.J., Simeunović, J., Obreht, I., Dulić, T., Pantelić, D., Hambach, U., 2013b. Importance of biological loess crusts for loess formation in semi-arid environments. *Quat. Int.* 296: 206-215.
- Svirčev, Z., Nikolić, B., Vukić, V., Marković, S., Gavrilov, M., Ian, S., Obreht, I., Vukotić, B., Meriluoto, J., 2016b. Loess and life out of Earth? *Quat. Int.* 399: 208-217
- Svirčev, Z., Obradović, V., Codd, G.A., Marjanović, P., Spoo, L., Drobac, D., Tokodi, N., Petković, A., Nenin, T., Simeunović, J., et al., 2016a. Massive fish mortality and *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in Aleksandrovac Lake. *Ecotoxicology* 25: 1353-1363.
- Sweeney, M.R., Mason, J.A., 2013. Mechanisms of dust emission from Pleistocene loess deposits, Nebraska, USA. *J. Geophys. Res. Earth Surf.* 118: 1-12.
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., Sakamoto, T., 2005. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7327-7333.
- Thomas, A.D., A.J. Dougill. 2007. Spatial and temporal distribution of cyanobacterial soil crusts in the Kalahari: Implications for soil surface properties. *Geomorphology* 85: 17-29.
- Thomas, A.D., Hoon, S.R., Linton, P.E., 2008. Carbon dioxide fluxes from cyanobacteria crusted soils in the Kalahari. *Appl. Soil Ecol.* 39: 254-263.
- Tillet, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7: 753-764.
- Tokodi, N., Drobac, D., Lazić, G., Petrović, T., Lujić, J., Marinović, Z., Palanački Malešević, T., Meriluoto, J., Svirčev, Z., 2018. Screening of cyanobacterial cultures originating from different environments for cyanotoxicity and cyanotoxins. *Toxicon* 154: 1-6.
- Tokodi, N., 2016. Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije. Doktorska disertacija. Prirodno - matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Tomaselli, L., Giovannetti, L., 1993. Survival of diazotrophic cyanobacteria in soil. *World J. Microb. Biot.* 9: 113-6.
- Tong, W.K., 2003. The scientific method. *Earth Sci.*
- Trabelsi, L., Ouada, H.B., Bacha, H., Ghoul, M., 2009. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Appl. Phycol.* 21: 405-412.

- Tsoar, H., Pye, K., 1987. Dust transport and the question of desert loess formation. *Sedimentology* 34: 139-153.
- Tucker, C.J., 1979. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sens. Environ.* 8: 127-150.
- United Nations Convention to Combat Desertification (UNCCD), 1994. United Nations Convention to Combat Desertification in Those Countries Experiencing Serious Drought and/or Desertification Particularly in Africa. United Nations, Paris.
- United Nations Convention to Combat Desertification (UNCCD), 2000. Assessment of the status of land degradation in arid, semi-arid and dry sub-humid areas. United Nations. Bonn.
- United Nations Convention to Combat Desertification (UNCCD), 2015. Desertification, Land Degradation and Drought (DLDD): Some Global Facts and Figures. United Nations, Bonn.
- Vasiljević, Đ., 2015. Geodiverzitet i geonasleđe Vojvodine u funkciji zaštite i turizma. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Verrecchia, E., Yair, A., Kidron, G.J., Verrecchia, K., 1995. Physical properties of the psammophile cryptogamic crust and their consequences to the water regime of sandy soils, north-western Negev Desert, Israel. *J. Arid Environ.* 29: 427-437.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schue, F., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 84: 377-410.
- Veste, M., 2005. The importance of biological soil crusts for rehabilitation of degraded arid and semi-arid ecosystems. *Sci. Soil Water Conserv.* 3: 42-47.
- Vezie, C., Benoufella, F., Sivonen, K., Bertru, G., Laplanche, A., 1996. Detection of toxicity of cyanobacterial strains using *Artemia salina* and MicrotoxR assays compared with mouse bioassay results. *Phycologia.* 35: 198-202.
- Višnić, T., Spasojević, B., Vujičić, M., 2016. The Potential for geotourism development on the Srem Loess Plateau based on a preliminary geosite assessment model (GAM). *Geoheritage* 8:173-180.
- Wang, G., Ye, W., Lv, Y., 2019. Loess geoheritage and geohazard protective measures at Luochuan Loess National Geopark in NW China. *Geoheritage* 11: 1089-1100.
- Wang, L., Yang, H.Y., Zheng, Y.Q., 2012. Personalized medicine of esophageal cancer. *J. Cancer Res. Ther.* 8: 343-347.

- Wang, L., Zhang, G., Zhu, L., Wang, H., 2017. Biocrust wetting induced change in soil surface roughness as influenced by biocrust type, coverage and wetting patterns. *Geoderma* 306: 1-9.
- Wang, W.B.; Liu, Y.D.; Li, D.H.; Hu, C.X.; Rao, B.Q., 2009. Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area. *Soil Biol. Biochem.* 41: 926-929.
- Wang, X.; Zhang, C.; Hasi, E.; Dong, Z., 2010. Has the three Norths forest shelterbelt program solved the desertification and dust storm problems in arid and semiarid China? *J. Arid Environ.* 74: 13-22.
- Warren, S.D., 2001. Synopsis: Influence of biological soil crusts on arid land hydrology and soil stability. In: *Biological soil crusts: structure, function, and management*; Eds: Belnap, J., Lange, O.L. Volume 150. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- West, N.E., 1990. Structure and function of microphytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semi-arid regions. *Adv. Ecol. Res.* 20: 179-223.
- Whistler, R., Daniel, R., 1990. Function of polysaccharides in foods. In: *Food additives*; Eds: Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. Marcel Dekker: New York, NY, USA.
- Whitford, W.G., 2002. *Ecology of desert ecosystems*. Academy, New York.
- Whitton, B.A., 1992. Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria. In: *Photosynthetic Prokaryotes*; Eds: Mann, N.H., Carr, N.G. Plenum Press, New York, pp: 1-51.
- Whitton, B.A., Potts, M., 2000. *The ecology of cyanobacteria - Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers.
- Whitton, B.A., Potts, M., 2012. Introduction to the cyanobacteria. In: *Ecology of cyanobacteria II*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp: 1-13.
- Williams, A.J., Buck, B.J., Beyene, M.A., 2012. Biological soil crusts in the Mojave Desert, USA: Micromorphology and pedogenesis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76: 1685-1695.
- Williams, L., Jung, P., Zheng, L.J., Maier, S., Peer, T., Grube, M., Weber, B., Büdel, B., 2018. Assessing recovery of biological soil crusts across a latitudinal gradient in Western Europe. *Restor. Ecol.* 26: 543-554.
- Williams, L., Loewen-Schneider, K., Maier, S., Büdel, B., 2016. Cyanobacterial diversity of western European biological soil crusts along a latitudinal gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: fiw157.

- Wu, D., Zou, C., Cao, W., Xiao, T., Gong, G., 2019. Ecosystem services changes between 2000 and 2015 in the Loess Plateau, China: A response to ecological restoration. PLoS ONE 14: e0209483.
- Wu, L., Zhu, Q., Yang, L., Li, B., Hu, C., Lan, S., 2018. Nutrient transferring from wastewater to desert through artificial cultivation of desert cyanobacteria. Bioresour. Technol. 247: 947-953.
- Wu, Y., Rao, B., Wu, P., Liu, Y., Li, G., Li, D., 2013. Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on topsoil. Plant Soil 370: 115-124.
- Xiao, B., Wang, Q.H., Zhao, Y.G., Shao, M.A., 2011. Artificial culture of biological soil crusts and its effects on overland flow and infiltration under simulated rainfall. Appl. Soil Ecol. 48: 11-17.
- Xiao, B.; Zhao, Y.; Wang, B.; Li, C., 2015. Development of artificial moss-dominated biological soil crusts and their effects on runoff and soil water content in a semi-arid environment. J. Arid Environ. 11: 75-83.
- Xie, Z., Liu, Y., Hu, C., Chen, L., Li, D., 2007. Relationships between the biomass of algal crusts in fields and their compressive strength. Soil Biol. Biochem. 39: 567-572.
- Yadav, S., Sinha, R.P., Tyagi, M.B., Kumar, A., 2011. Cyanobacterial secondary metabolites. Int. J. Pharma Bio Sci. 2: 144-167.
- Yu, H., Jia, S., Dai, Y., 2010. Accumulation of exopolysaccharides in liquid suspension culture of *Nostoc flagelliforme* cells. Appl. Biochem. Biotechnol. 160: 552-560.
- Zaady, E., Karnielib, A., Shachakc, M., 2007. Applying a field spectroscopy technique for assessing successional trends of biological soil crusts in a semi-arid environment. J. Arid Environ. 70: 463-477.
- Zaady, E., Offer, Z.Y., 2010. Biogenic soil crusts and soil depth: a long-term case study from the Central Negev desert highland. Sedimentology 57: 351-358.
- Žegura, B., Štraser, A., Filipič, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. Mutat. Res. 727: 16-41.
- Zhang, Y.M., Wang, H.L., Wang, X.Q., Yang, W.K., Zhang, D.Y., 2006. The microstructure of microbiotic crust and its influence on wind erosion for a sandy soil surface in the Gurbantunggut Desert of Northwestern China. Geoderma 132: 441-449.
- Zhao, Y., Bowker, M.A., Zhang, Y., Zaady, E., 2016. Enhanced recovery of biological soil crusts after disturbance. In: Biological soil crusts: An organising principle in drylands; Eds: Weber, B., Büdel, B., Belnap, J. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp: 498-523.

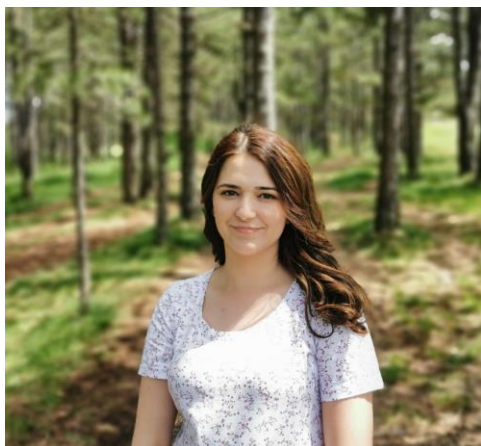
Zhao, Y., Xu, M., 2013. Runoff and soil loss from revegetated grasslands in the Hilly Loess Plateau Region, China: influence of biocrust patches and plant canopies. *J. Hydrol. Eng.* 18: 387-393.

Zhao, Y., Zhu, Q., Li, P., Zhao, L., Wang, L., Zheng, X., Ma, H., 2014. Effects of artificially cultivated biological soil crusts on soil nutrients and biological activities in the Loess Plateau. *J. Arid Land.* 6: 742-752.

http://euroarboretum.com.au/wp-content/uploads/2015/09/6_Reducing-Soil-Disturbance.pdf

<https://biologyreader.com>

<https://blogs.egu.eu>



BIOGRAFIJA

Tamara Palanački Malešević rođena je 08.10.1990. godine u Novom Sadu. Osnovnu škola „Jovan Popović“ završila je u Suseku, a potom Medicinsku školu „7. April“ u Novom Sadu. Studije Ekologije na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, upisuje školske 2009/2010 godine. Osnovne studije ekologije završava u roku sa prosečnom ocenom 9,21 i stiče zvanje Diplomirani ekolog. Nakon završenih osnovnih studija 2013. godine upisuje master studije na istom fakultetu, modul Hidrobiologija. Master studije završava 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i odbranom završnog rada sa istom ocenom pod nazivom „Značaj bioeseja u detekciji cijanotoksina“. Tokom osnovnih i master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i opštine Beočin. Doktorske akademske studije, studijski program Doktor ekoloških nauka, upisuje školske 2014/2015 godine na Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Sve ispite predviđene planom i programom položila je ocenom 10. Tokom doktorskih studija bila je dobitnik stipendije za doktorande Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

U rad Laboratorije za paleoekološku rekonstrukciju (LAPER) uključila se 2014. godine tokom izrade master rada. Godine 2018. zapošljava se na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, kao istraživač saradnik. Angažovana je za izvođenje vežbi iz predmeta Algologija i Biotehnologija. Učestvuje u održavanju kolekcije kultura cijanobakterija na Departmanu za biologiju i ekologiju.

Autor je i koautor tri naučna rada u vodećim naučnim časopisima M20 kategorije, jednog poglavlja u knjizi M13 kategorije, četiri strana (M34) i jednog domaćeg saopštenja (M64). Bavi se izučavanjem cijanobakterija, njihovog značaja u terestričnim i akvatičnim ekosistemima.

Član je Laboratorije za paleoekološku rekonstrukciju (LAPER), Laboratorije CYANO-LAB i Udruženja mikrobiologa Srbije.

Novi Sad, 28.05.2021.

Tamara Palanački Malešević

Plan tretmana podataka

Назив пројекта/истраживања
Значај и улога терестричних цијанобактерија у семи-аридним срединама
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Депарتمان за биологију и екологију б) в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
“Трансформације геопростора Србије - прошлост, савремени проблеми и предлози решења” (Евиденциони број пројекта: ОИ176020), Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.
1. Опис података
<p><i>1.1 Врста студије</i></p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Студија представља истраживање у оквиру докторске дисертације која је за циљ имала испитивање фундаменталне и практичне улоге цијанобактерија у семи-аридним срединама. Анализиран је потенцијал лесних цијанобактеријских сојева за обнову деградираних лесних површина, њихова способност да остваре интеракцију са честица прашине и формирају биолошке покорице. Процењен је механизам имобилизације и стабилизације честица, као и улога цијанобактерија у формирању лесног седимента. Пажња је посвећена и активностима које је потребно спровести у циљу успешне обнове деградираних лесних површина.</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту _____ ђ) снимци, фотографије: <u>фотографије са стереомикроскопа, светлосног микроскопа, скенинг електронског микроскопа, фотографије истраживаних локалитета и фотографије узорака током експеримената</u> е) текст: <u>текстуални подаци за преглед литературе; опис истраживаних подручја;</u> ж) <u>мапа:</u> з) остало: <u>лабораторијски експерименти и мерења</u></p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p>

- a) **Excel фајл**, датотека **.xlsx**
- b) SPSS фајл, датотека
- c) **PDF фајл**, датотека **.pdf**
- d) **Текст фајл**, датотека **.doc**
- e) **JPG фајл**, датотека **.jpg**
- f) **Остало**, датотека **.tiff; sta**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: 2 варијабле (испитано 22 соја у две подлоге, све рађено у три понављања);
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) **не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- a) **експеримент**, навести тип: анализе биохемијских параметара и морфологије
- б) **корелационо истраживање**, навести тип: двофакторијална анализа варијансе
- ц) **анализа текста**, навести тип: прикупљање литературних података из доступних извора
- д) **остало**, навести шта: теренско узорковање вршено ради прикупљања узорака биолошких лесних поковица и лесног седимента

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Спектрофотометар, стереомикроскоп, светлосни микроскоп, скенинг електронски микроскоп, ласерски уређај за одређивање величине честица, вискозиметар

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

—

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичком анализом добијених података

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је извршена поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.1.2. URL адреса <https://www.cris.uns.ac.rs/index.jsf> и <https://nardus.mpn.gov.rs/>

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) **Да**
б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Докторска дисертација ће бити депонована у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

—

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

—

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

—

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-

—

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области (односи се на оригиналне податке)

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Уз претходну комуникацију и писмено одобрење власника података

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

По захтеву ће заинтересованим истраживачима материјал бити послат електронским путем.

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално-без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Тамара Паланачки Малешевић, мејл адреса: tamara.palanacki@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Тамара Паланачки Малешевић, мејл адреса: tamara.palanacki@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Тамара Паланачки Малешевић, мејл адреса: tamara.palanacki@gmail.com