



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



# TOKSIČNOST ODABRANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA U *IN VIVO* I *IN VITRO* TESTOVIMA

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Mentor:  
Prof. dr Jelica Simeunović

Kandidat:  
Petar Davidović

Novi Sad, 2023. godine

## Zahvalnica

Prvenstveno želim da izrazim zahvalnost svojoj mentorki prof. dr Jelici Simeunović, čije vođstvo, posvećenost i podrška tokom mog istraživačkog rada su bili od neprocenjive vrednosti, a od koje sam mnogo naučio, ne samo o nauci i mikrobiologiji, već i o profesionalnosti, poštenju i upornosti.

Zahvaljujem se članovima komisije prof. dr Mihajli Đan, prof. dr Draganu Radnović, dr Aleksandru Pavić i doc. dr Dajani Blagojević na utrošenom vremenu i izuzetno korisnim savetima i komentarima u vezi ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se prof. dr Zorici Svirčev na vremenu koje je izdvojila za pregled doktorske disertacije, kao i za vredne sugestije i komentare.

Izražavam veliku zahvalnost profesorima i kolegama sa Katedre za mikrobiologiju na izuzetnoj saradnji, kolegijalnosti i pomoći u radu. Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr Dajani Blagojević i dr Oliveri Babić na velikoj pomoći pri eksperimentalnom radu i vrednim savetima. Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama Kuzmanović Ani i Gavrić Damiru koji su uvek bili izvor podrške i učinili moj istraživački rad daleko prijatnijim i inspirativnijim.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za genetiku pod rukovodstvom prof. dr Mihajle Đan, koji su svojim radom i korisnim savetima u velikoj meri doprineli sprovođenju predstavljenih istraživanja.

Takođe, izražavam iskrenu zahvalnost prof. dr Milošu Tanurdžiću i članovima Škole bioloških nauka na Univerzitetu Kvinslend u Brizbejnu (Australija), čija stručnost i pomoć su bili presudni u proširenju mog razumevanja oblasti genomike i bioinformatike i oblikovanju toka ovog istraživanja.

Zahvaljujem se prof. dr Nebojši Andrić i prof. dr Sonji Kaišarević, kao i istraživačima i saradnicima sa Katedre za fiziologiju životinja i Katedre za hidrobiologiju, koji su obezbedili eksperimentalne modele korišćene tokom ovog istraživanja i čiji saveti su bili od neizmernog značaja za sprovođenje eksperimenata.

Zahvaljujem se članovima Naučnog instituta za veterinarstvo Novi Sad koji su omogućili da deo istraživanja u okviru disertacije bude sproveden u laboratorijama instituta.

Duboko sam zahvalan svojoj porodici i prijateljima, bez čije podrške i razumevanja ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem se Ministarstvu nauke, tehnološkog razvoja i inovacija i Fondu za nauku Republike Srbije na finansiranju Programa naučnoistraživačkog rada (Ev. Br. 451-03-47/2023-01/200125) i projekta pod nazivom „Molecular Methods for Supporting Microalgae as Biofactories“ (Ev. Br. 6445349), u okviru kojih su realizovana istraživanja ove doktorske disertacije.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА<sup>1</sup>

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Петар Давидовић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	др Јелица Симеуновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	„Токсичност одабраних сојева цијанобактерија у <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> тестовима“
Језик публикације (писмо):	Српски ( <u>латиница</u> )
Физички опис рада:	Унети број: Страница - 229 Поглавља - 7 Референци - 508 Табела - 26 Слика - 15 Графикона - 40 Прилога - 1
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Микробиологија
Кључне речи / предметна одредница:	Цијанобактерије, <i>Artemia salina</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Danio rerio</i> , Експресија гена, Цитотоксичност, Геномика
Резиме на језику рада:	Цијанобактерије представљају разноврсну групу микроорганизама познатих по продукцији високо потентних природних токсина који представљају озбиљну претњу по здравље људи, животиња и животне средине. Ови цијанотоксини се разликују по својој хемијској структури и механизму деловања, а често се у истом окружењу могу наћи различите класе, што чини процену њихових токсичних ефеката изазовном. Континуиран развој и усавршавање тестова за прецизнију детекцију, карактеризацију и процену ризика од цијанотоксина је главни императив, те се на глобалном нивоу све чешће наглашава потреба за приступом који би омогућио свеобухватно проучавање цијанотоксичности и праћење ефеката на различитим биолошким нивоима. У циљу решавања ових

изазова, развијају се различити алтернативни тестови и примењују модел организми, међу којима су у фокусу у погледу њихове корисности у унапређењу нашег разумевања ове области, водени кичмењаци и бескичмењаци. У складу са тим, формулисани су примарни циљеви ове докторске дисертације који су подразумевали процену акутне токсичности екстраката одабраних сојева цијанобактерија *in vivo*, код акватичних бескичмењака (*Artemia salina* и *Daphnia magna*) и кичмењака (*Danio rerio*) и идентификовање фактора који доводе до модулације њихове токсичности, укључујући доступност хранљивих материја, фотопериод и фазе раста. Додатно, истражени су токсични ефекти који се манифестују на молекуларном нивоу два модел организма, анализом релативних промена у експресији гена који реагују на токсине, како би се дефинисали неки од механизма токсичног деловања одабраних сојева. Поред тога, *in vitro* тест базирани на употреби ћелијске линије хуманог неуробластома је коришћен како би се одредио цитотоксични и неуротоксични потенцијал испитаних сојева. Коначно, један од основних циљева истраживања је подразумевао испитивање метаболичког потенцијала одабраних сојева да продукују одређене типове цијанобактеријских токсина користећи имунотест, геномску и биоинформатичку анализу. У серији тестова акутне токсичности, сојеви цијанобактерија су анализирани коришћењем *D. magna*, *A. salina* и *D. rerio* (зебрица) као модел организма. Резултати су показали да сојеви цијанобактерија испољавају токсичне ефекте зависне од дозе и времена излагања, са варијацијама специфичним за испитани сој. У тестовима са моделом *D. magna*, утврђена је отпорност ових организма према интрацелуларним екстрактима већине сојева, изузев соја *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, који је показао одређени ниво токсичности, узрокујући мање од 25% смртности након 48 сати излагања. У анализи експресије гена користећи јединке *D. magna* као модел организме, утврђено је да су гени повезани са детоксикацијом, растом и репродукцијом реаговали на излагање цијанобактеријама. Гени попут *суп360А8*, *gst* и *p-gp* су се показали као осетљиви индикатори токсичности цијанобактерија, показујући промене зависне од примењене дозе екстраката. Такође су детектоване значајне промене у експресији гена *суп314*, што имплицира потенцијалан ефекат на процесе пресвлачења и раста код ових организма. Тестирањем токсичности сојева на модел организму *D. rerio*, утврђени су различити сублетални ефекти, као што су морфолошке абнормалности и измењене стопе излегања. Специфични ефекти су варирали у зависности од испитиваног соја, трајања излагања и концентрације екстракта. У анализи експресије гена код модел организма *D. rerio*, уочене су значајне промене у експресији гена повезаних са метаболизмом ксенобиотика (*ahr2* и *суп1А1*) и стрес ендоплазматског ретикулума (*bip*). Најзначајније промене су утврђене код гена *abcb4*, који је био значајно индукован након излагања сојевима цијанобактерија, што указује на активацију механизма мултиксенобиотске резистенције. Слични ефекти примећени код *D. magna* указују на заједнички механизам за метаболизам токсичних цијанобактеријских једињења код оба модел организма. У тестовима са врстом *A. salina* утврђена је токсичност свих цијанобактеријских сојева, при чему су водени сојеви (*M. aeruginosa* PCC 7806, *Oscillatoria* DTD-Веќеј, *Oscillatoria* K3 и *Oscillatoria* Z1) показали укупно највећу токсичност. Додатно, откривена је позитивна корелација између концентрације азота и токсичности сојева, и повећана токсичност већине сојева након гајења у азотом богатијем окружењу. Оптимални нивои фосфора су стимулисали токсичност већине сојева до прага од 0.04 g L<sup>-1</sup>, изнад којег нису примећене значајне промене. Такође је испитан утицај

	<p>трајања излагања светлости на токсичност цијанобактерија, уз уочене сличности у одговору сојева који припадају истом роду цијанобактерија на продужено излагање светлости током култивације. Добијени резултати утицаја фазе раста на токсичност наглашавају значајан ефекат фазе раста на продукцију токсичних метаболита тестираних сојева. Утврђено је да је највећа токсичност забележена у екстрактима већине сојева добијених током стационарне фазе раста (након 21 и 35 дана култивације). У случају сојева рода <i>Oscillatoria</i> регистровано је значајно прогресивно повећање токсичности и током фазе експоненцијалног раста и након уласка у стационарну фазу, што указује на континуирану производњу токсичних једињења током свих фаза раста. Након испитивања ефектата цијанобактеријских екстраката на ћелије хуманог неуробластома, утврђена је дозно-зависна цитотоксичност код већине сојева. Варијабилност у одговору ћелија примећена је при продуженом излагању специфичним сојевима, што указује на различите саставе екстраката и њихов ефекат на овај тип ћелија. Након употребе ензимског теста (ELISA) у детекцији еквивалентна микроцистина (MC-LR) у екстрактима цијанобактерија, утврђена је веома ниска концентрација за већину сојева. Овај резултат сугерише да микроцистини и нодуларини нису примарно одговорни за уочену токсичност у примењеним биолошким тестовима. Значајан допринос ове докторске дисертације огледа се у формирању колекције секвенци генома аутохтоних водених и земљишних сојева цијанобактерија изолованих са подручја Републике Србије, представљајући прва таква истраживања на овим просторима. С обзиром на то да на светском нивоу постоји стална потреба за допуњавањем геномских база цијанобактерија новим секвенцама, резултати ових истраживања ће значајно допринети доступности нових 9 секвенцираних генома који припадају родовима <i>Anabaena</i>, <i>Nostoc</i> и <i>Oscillatoria</i>. Геномском анализом цијанобактеријских сојева је откривена изузетна разноликост метаболичких путева, са специфичним кластерима гена одговорним за производњу различитих токсичних једињења. Кластери гена за биосинтезу микроцистина откривени су искључиво у геному терестричног соја Ностоц LC1B, у складу са резултатима ELISA тестова. У геномима водених сојева <i>Oscillatoria</i> K3 и <i>Oscillatoria</i> Z1 идентификовани су кластери гена за производњу цитотоксина цилиндроспермопсина са значајном покривеношћу. Код осталих испитаних сојева су детектовани кластери гена за производњу специфичних токсичних једињења, као што су анабенонептин, микровиридин Ј, микровиридин Н9, јамајкамид А, сцитоцикламид А, ностоклид Н9, хектоклорин и пуваинафицин Ф. У циљу доказивања продукције и идентификације таквих токсичних метаболита и дубљег разумевања њихове активности, неопходна су даља испитивања и примена протеомских и метаболомских анализа.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>12.11.2020.</p>
<p>Датум одбране:  (Попуњава одговарајућа служба)</p>	

<p>Чланови комисије:</p> <p>(титула,                   име, презиме,                звање, институција)</p>	<p>Председник: др Драган Радновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Јелица Симеуновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Михајла Ђан, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Дајана Благојевић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Александар Павић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство</p>
<p>Напомена:</p>	

<sup>1</sup> 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 корице се са тезом.

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>1</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Petar Davidović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Jelica Simeunović, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Thesis title:	“Toxicity of selected strains of cyanobacteria in <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> tests”
Language of text (script):	Serbian (latin)
Physical description:	Number of: Pages - 229 Chapters - 7 References - 508 Tables - 26 Illustrations - 15 Graphs - 40 Appendices - 1
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Microbiology
Subject, Key words:	<i>Cyanobacteria</i> , <i>Artemia salina</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Danio rerio</i> , Gene expression, Cytotoxicity, Genomics

<p>Abstract in English language:</p>	<p>Cyanobacteria are a diverse group of organisms known for producing highly potent cyanotoxins which pose significant threats to human, animal, and environmental health. These toxins have diverse chemical structures and toxicity mechanisms and several toxin classes can be present simultaneously, making it difficult to assess their toxic effects using physico-chemical methods. Continued development and refinement of assays is necessary for their improved detection, characterization, and risk assessment and emphasizes the need for a multi-level approach to studying cyanotoxicity. To address these challenges, alternative tests and model organisms among aquatic vertebrates and invertebrates are continually explored for their utility in advancing our understanding of this field. The primary objectives of this doctoral dissertation were to evaluate the acute toxicity of extracts of selected cyanobacterial strains <i>in vivo</i>, in aquatic invertebrate (<i>Artemia salina</i> and <i>Daphnia magna</i>) and vertebrate (<i>Danio rerio</i>) organisms and identify factors that lead to modulation of their toxicity, including nutrient availability, light period and growth phase. Furthermore, the study aimed to explore the toxic effects manifesting at the molecular level by analyzing the relative changes in the expression of toxin-responsive genes, in order to define some of the mechanisms of toxic action of the selected strains. Additionally, <i>in vitro</i> tests using a human neuroblastoma cell line were utilized to determine their cytotoxic and neurotoxic potential. Lastly, the research aimed to examine the potential of selected strains to produce the best studied groups of cyanobacterial toxins using an immunoassay and various bioinformatics tools.</p> <p>In a series of acute toxicity tests, cyanobacteria strains were evaluated using <i>Daphnia magna</i>, <i>Artemia salina</i>, and <i>Danio rerio</i> (zebrafish) as model organisms. The results showed that cyanobacterial strains exhibited dose- and time-dependent toxic effects, with variations specific to the strain. <i>D. magna</i> proved resistant to most strains, except for <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806, which exhibited mild toxicity, causing less than 25% mortality after 48 hours of exposure. In contrast, <i>D. rerio</i> displayed strain-dependent sublethal effects, such as morphological abnormalities and altered hatching rates. The specific effects varied based on the strain, exposure duration, and concentration. In the gene expression analysis using <i>D. magna</i> as the model organism, the study revealed that genes related to detoxification, growth, and reproduction responded to cyanobacterial exposure. Genes like <i>cyp360A8</i>, <i>gst</i>, and <i>p-gp</i> were sensitive indicators of cyanobacterial toxicity, displaying dose-dependent changes. The study also noted significant shifts in the <i>cyp314</i> gene expression, implying potential impacts on molting and growth processes, warranting further investigation. In the analysis of gene expression in <i>Danio rerio</i> (zebrafish), significant changes were observed in genes related to xenobiotic metabolism (<i>ahr2</i>, <i>cyp1A1</i>) and endoplasmic reticulum stress (<i>bip</i>). Notably, the <i>abcb4</i> gene was prominently induced after exposure to specific cyanobacterial strains, indicating the activation of a multixenobiotic resistance mechanism. Similar effects observed in <i>D. magna</i> suggested a shared mechanism for metabolizing toxic cyanobacterial compounds in both model organisms. The <i>A. salina</i> tests indicated toxicity in all cyanobacterial strains, with aquatic strains, including <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806, <i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej, <i>Oscillatoria</i> K3, and <i>Oscillatoria</i> Z1, exhibiting the highest toxicity. Furthermore, the study investigated the relationship between cyanobacterial</p>
--------------------------------------	--



	<p>growth conditions and toxicity. It revealed a positive correlation between nitrogen concentration and strain toxicity, particularly in nitrogen-rich environments. Optimal phosphorus levels stimulated toxicity in most strains up to a threshold of 0.04 g L<sup>-1</sup>, beyond which no significant changes were observed. The influence of light exposure duration on cyanobacterial toxicity was also examined, with observed similarities in the response of strains belonging to the same cyanobacterial genus to prolonged exposure to light during cultivation. The research also emphasized the impact of growth phases on toxicity. It found that the highest toxicity was recorded in extracts of most strains obtained after 21 and 35 days of cultivation, particularly during the stationary growth phase. Interestingly, for strains of the genus <i>Oscillatoria</i>, a significant progressive increase in toxicity was observed during the exponential growth phase and continued after entering the stationary phase, suggesting continuous production of toxic compounds throughout all growth phases. Moreover, the study investigated the effects of cyanobacterial extracts on human neuroblastoma cells, revealing dose-dependent cytotoxicity of most strains. Variability in the response of cells was noted with prolonged exposure to specific strains, indicating different compositions of extracts and their effects on cell types. The study used an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to assess the content of microcystin (MC-LR) equivalents in cyanobacterial extracts, which was found to be very low in most strains. This result suggested that microcystins and nodularins were not primarily responsible for the observed toxicity in the applied bioassays. Lastly, genomic analysis of the cyanobacterial strains uncovered a remarkable diversity of metabolic pathways, with specific gene clusters responsible for the production of various toxic compounds. Gene clusters for microcystin biosynthesis were detected exclusively in the genome of the terrestrial strain <i>Nostoc</i> LC1B, consistent with ELISA results. In the genomes of aquatic strains <i>Oscillatoria</i> K3 and <i>Oscillatoria</i> Z1, gene clusters for the production of the cytotoxin cylindrospermopsin were identified with significant coverage. Furthermore, other strains displayed gene clusters for the production of specific toxic compounds, such as anabenopeptin, microviridin J, microviridin N9, jamajkamid A, scitocyclamide A, nostoclode N9, hectochlorin, and puvainaphicin F. To confirm the production of these identified toxic metabolites and gain a deeper understanding of their activity, further testing and the application of proteomic and metabolomic analysis were deemed necessary. Sequencing the entire genomes of these strains marked a significant contribution to the understanding of cyanobacteria in the Republic of Serbia, representing the first comprehensive research of its kind in the region. The data contributed to the availability of sequenced genomes for genera <i>Anabaena</i>, <i>Nostoc</i>, and <i>Oscillatoria</i>, enhancing our global knowledge of these organisms and their potential impacts on aquatic ecosystems and human health.</p>
Accepted on Scientific Board on:	12.11.2020.

Defended:  (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board:  (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr Dragan Radnović, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Jelica Simeunović, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Mihajla Đan, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Dajana Blagojević, assistant professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Aleksandar Pavić, senior research associate, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering</p>
Note:	

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.

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cijanobakterije (Modro-zelene alge).....	2
1.2. Cijanobakterijsko cvjetanje vode.....	4
1.3. Toksini cijanobakterija (cijanotoksini) .....	9
1.3.1. Hepatotoksični cijanotoksini .....	11
1.3.2. Citotoksični cijanotoksini .....	14
1.3.3. Neurotoksični cijanotoksini.....	15
1.3.4. Dermatotoksični cijanotoksini .....	17
1.3.5. Lipopolisaharidi .....	18
1.4. Biosinteza cijanotoksina .....	21
1.4.1. Biosinteza mikrocistina .....	21
1.4.2. Biosinteza nodularina.....	23
1.4.3. Biosinteza cilindrospermopsina .....	23
1.4.4. Biosinteza anatoksina .....	24
1.4.5. Biosinteza saksitoksina .....	24
1.5. Metode detekcije cijanotoksina i njihovih toksičnih efekata .....	28
1.5.1. Imunološki eseji.....	28
1.5.2. Biotestovi .....	30
1.5.3. Molekularne metode .....	35
1.6. Problemi u utvrđivanju cijanotoksičnosti, potencijalni pravci i potreba za istraživanjem.. .....	37
2. Ciljevi istraživanja .....	39
3. Materijal i metode.....	42
3.1. Testirani sojevi cijanobakterija, kultivacija i priprema ekstrakata.....	43
3.1.1. Kultivacija odabranih sojeva cijanobakterija.....	43
3.1.2. Priprema intracelularnih ekstrakata.....	45
3.2. Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na nivou čitavog organizma - biotestovi toksičnosti sa akvatičnim model organizmima .....	46
3.2.1. Biotest <i>Daphnia magna</i> - uslovi gajenja kulture i osnovna eksperimentalna procedura .....	46
3.2.2. Biotest <i>Daphnia magna</i> - osnovna eksperimentalna procedura.....	46
3.2.3. Biotest <i>Danio rerio</i> - gajenje i održavanje eksperimentalnih jedinki i dobijanje embriona .....	47
3.2.4. Biotest <i>Danio rerio</i> - osnovna eksperimentalna procedura.....	47

3.3.	Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na molekularnom nivou i nivou ćelije .....	49
3.3.1.	Biotest <i>Daphnia magna</i> - analiza relativnih promena u genskoj ekspresiji .....	49
3.3.2.	Biotest <i>Danio rerio</i> - analiza relativnih promena u ekspresiji gena .....	52
3.3.3.	Utvrđivanje citotoksičnosti i neurotoksičnosti odabranih sojeva - ćelijska linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....	53
3.4.	Uticaj različitih faktora kultivacije i faza rasta na toksičnost cijanobakterija.....	55
3.4.1.	Biotest <i>Artemia salina</i> .....	55
3.5.	Utvrđivanje toksigenog potencijala ispitivanih sojeva .....	57
3.5.1.	Utvrđivanje produkcije mikrocistina kod odabranih sojeva primenom imunološkog eseja - ELISA test .....	57
3.5.2.	Utvrđivanje potencijala za produkciju toksina na osnovu prisustva <i>mcy</i> gena i drugih genskih klastera odgovornih za biosintezu najznačajnijih grupa cijanotoksina u sekvenciranim genomima sojeva.....	58
4.	Rezultati i diskusija .....	61
4.1.	Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na nivou čitavog organizma – biotestovi toksičnosti sa akvatičnim model organizmima .....	62
4.1.1.	Biotest <i>Daphnia magna</i> - toksičnost ispitivanih sojeva u testu imobilizacije .....	62
4.1.2.	Biotest <i>Danio rerio</i> - toksičnost ispitivanih sojeva u testu embriona zebrice .....	65
4.2.	Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na molekularnom nivou.....	84
4.2.1.	Biotest <i>Daphnia magna</i> - analiza relativnih promena u genskoj ekspresiji.....	84
4.2.2.	Biotest <i>Danio rerio</i> - analiza relativnih promena u genskoj ekspresiji.....	103
4.3.	Uticaj različitih faktora kultivacije i faza rasta na toksičnost cijanobakterija.....	121
4.3.1.	Biotest <i>Artemia salina</i> - uticaj koncentracije azota na akutnu toksičnost odabranih sojeva .....	122
4.3.2.	Biotest <i>Artemia salina</i> - uticaj koncentracije fosfora na akutnu toksičnost odabranih sojeva .....	128
4.3.3.	Biotest <i>Artemia salina</i> - uticaj svetlosnog režima na akutnu toksičnost odabranih sojeva .....	134
4.3.4.	Biotest <i>Artemia salina</i> - uticaj faze rasta kulture na akutnu toksičnost odabranih sojeva .....	140
4.3.5.	Analiza primene različitih biotestova u detekciji cijanotoksičnosti .....	146
4.4.	Utvrđivanje citotoksičnosti i neurotoksičnosti odabranih sojeva - ćelijska linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.....	149
4.5.	Utvrđivanje potencijala za produkciju toksina kod odabranih cijanobakterijskih sojeva .....	153
4.5.1.	Utvrđivanje produkcije mikrocistina kod ispitivanih sojeva primenom ELISA testa .....	153

4.5.2. Detekcija biosintetskih genskih klastera za proizvodnju najznačajnijih grupa cijanotoksina .....	155
5. Zaključak .....	169
6. Literatura.....	174
7. Prilog.....	217

## **Lista slika**

<b>Slika 1.</b> Dijagram kretanja azota i fosfora u akvatičnom ekosistemu.....	6
<b>Slika 2.</b> Cvetanje vode izazvano cijanobakterijama roda <i>Microcystis</i> u Copco rezervoaru (Kalifornija).....	9
<b>Slika 3.</b> Prikaz nekih od mogućih toksičnih efekata cijanotoksina i kliničkih simptoma kod ljudi .....	11
<b>Slika 4.</b> Šema usvajanja mikrocistina preko multispecifičnog OATP transportnog sistema aktivnog u različitim tipovima animalnih ćelija, toksičnog dejstva, biotransformacije i izlučivanja ovog toksina .....	14
<b>Slika 5.</b> Prikaz strukture toksikološki najznačajnijih grupa cijanotoksina .....	19
<b>Slika 6.</b> Strukture do sada opisanih analoga mikrocistina .....	22
<b>Slika 7.</b> Šema strukturne organizacije genskih klastera za biosintezu najčešćih i najbolje proučenih cijanotoksina.....	27
<b>Slika 8.</b> Šema istraživanja i sprovedenih analiza u okviru doktorske disertacije .....	41
<b>Slika 9.</b> Fotografije odabranih cijanobakterijskih sojeva A) <i>Anabaena</i> Č2; B) <i>Anabaena</i> Č5; C) <i>Nostoc</i> 2S1; D) <i>Nostoc</i> Z1; E) <i>Nostoc</i> 2S3B; F) <i>Nostoc</i> LC1B; G) <i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej; H) <i>Oscillatoria</i> Z1; I) <i>Oscillatoria</i> K3; J) <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806.....	44
<b>Slika 10.</b> Prikaz eksperimentalne procedure ispitivanja akutne toksičnosti ispitivanih sojeva kod embriona vrste <i>D. rerio</i> .....	48
<b>Slika 11.</b> Prikaz eksperimentalne procedure ispitivanja genske ekspresije <i>D. magna</i> qRT-PCR metodom.....	51
<b>Slika 12.</b> Prikaz rasta SH-SY5Y ćelija adheriranih za dno flaska posmatran uz pomoć invertnog mikroskopa.....	54
<b>Slika 13.</b> Šema eksperimenata sa ciljem ispitivanja uticaja različitih faktora kultivacije i faza rasta na toksičnost cijanobakterija u biotestu <i>A. salina</i> .....	57
<b>Slika 14.</b> Prikaz koraka obrade sirovih očitavanja nakon sekvenciranja, sastavljanja i anotacije cijanobakterijskih genoma .....	60
<b>Slika 15.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Anabaena</i> Č2 u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	66
<b>Slika 16.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Anabaena</i> Č5 u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	68
<b>Slika 17.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	69
<b>Slika 18.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Nostoc</i> 2S1 u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	71
<b>Slika 19.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Nostoc</i> 2S3B u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	72
<b>Slika 20.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Nostoc</i> LC1B u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	74
<b>Slika 21.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Nostoc</i> Z1 u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	75
<b>Slika 22.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	77

<b>Slika 23.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <b>Oscillatoria K3</b> u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	79
<b>Slika 24.</b> Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja <b>Oscillatoria Z1</b> u biotestu sa embrionima vrste <i>D. rerio</i> .....	81
<b>Slika 25.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Anabaena Č2</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	86
<b>Slika 26.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Anabaena Č5</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	88
<b>Slika 27.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Microcystis aeruginosa PCC 7806</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	89
<b>Slika 28.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc 2S1</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	91
<b>Slika 29.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc 2S3B</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	93
<b>Slika 30.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc LC1B</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	94
<b>Slika 31.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc Z1</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	95
<b>Slika 32.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Oscillatoria DTD-Bečej</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	97
<b>Slika 33.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Oscillatoria K3</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	98
<b>Slika 34.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Oscillatoria Z1</b> na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. magna</i> : (A) <i>cyp314</i> , (B) <i>cyp360A8</i> , (C) <i>gst</i> , (D) <i>vtg</i> i (E) <i>p-gp</i> .....	100
<b>Slika 35.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Anabaena Č2</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> .....	104
<b>Slika 36.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Anabaena Č5</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> .....	106
<b>Slika 37.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Microcystis aeruginosa PCC 7806</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> .....	107
<b>Slika 38.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc 2S1</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> .....	109

<b>Slika 39.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc 2S3B</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> . .....	110
<b>Slika 40.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc LC1B</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> . .....	112
<b>Slika 41.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Nostoc Z1</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> . .....	113
<b>Slika 42.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Oscillatoria DTD-Bečej</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> . .....	115
<b>Slika 43.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Oscillatoria K3</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> . .....	116
<b>Slika 44.</b> Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja <b>Oscillatoria Z1</b> na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste <i>D. rerio</i> : (A) <i>cyp1a1</i> , (B) <i>bip</i> , (C) <i>p53</i> , (D) <i>ahr2</i> , (E) <i>vtg1</i> i (F) <i>abcb4</i> . .....	117
<b>Slika 45.</b> Različite grupe biotestova i njihove prednosti u ispitivanju cijanobakterijske toksičnosti .....	148
<b>Slika 46.</b> Uticaj cijanobakterijskih ekstrakata ( <b>1</b> – <i>Anabaena</i> Č2; <b>2</b> – <i>Anabaena</i> Č5; <b>3</b> – <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806; <b>4</b> – <i>Nostoc</i> 2S1; <b>5</b> – <i>Nostoc</i> 2S3B; <b>6</b> – <i>Nostoc</i> LC1B; <b>7</b> – <i>Nostoc</i> Z1; <b>8</b> – <i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej; <b>9</b> – <i>Oscillatoria</i> K3; <b>10</b> – <i>Oscillatoria</i> Z1) na vijabilnost SH-SY5Y ćelija predstavljen kao procenat citotoksičnosti (%Cl) utvrđen nakon 24h (A) i 72h (B) izlaganja.. .....	150
<b>Slika 47.</b> Grafički prikaz koncentracije MC-LR ekvivalenata u uzorcima cijanobakterijskih kultura utvrđene primenom ELISA testa za mikrocistine .....	154
<b>Slika 48.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Anabaena</i> Č2 .....	157
<b>Slika 49.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Anabaena</i> Č5 .....	159
<b>Slika 50.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Nostoc</i> 2S1 .....	160
<b>Slika 51.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Nostoc</i> 2S3B .....	161
<b>Slika 52.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Nostoc</i> LC1B .....	163
<b>Slika 53.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Nostoc</i> Z1 .	164
<b>Slika 54.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Oscillatoria</i> K3 .....	165
<b>Slika 55.</b> Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja <i>Oscillatoria</i> Z1 .....	167



## **Lista tabela**

<b>Tabela 1.</b> Prikaz najbolje istraženih grupa cijanotoksina, do sada identifikovanih producenata i biosintetičkih gena.....	25
<b>Tabela 2.</b> Odabrani sojevi cijanobakterija iz Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija (NSCCC) i Pasterove kolekcije kultura (PCC). ....	43
<b>Tabela 3.</b> Sastav mineralne podloge BG 11 po recepturi opisanoj u Rippka i sar. (1979). ....	45
<b>Tabela 4.</b> Prikaz subletalnih i letalnih promena koje se mogu detektovati u definisanim vremenskim tačkama kod ispitivanih embriona <i>D. rerio</i> nastalih usled izlaganja dejstvu cijanobakterijskih ekstrakata.....	49
<b>Tabela 5.</b> Spisak korišćenih prajmera i njihovih nukleotidnih sekvenci u biotestu <i>D. magna</i> .....	52
<b>Tabela 6.</b> Spisak korišćenih prajmera i njihovih nukleotidnih sekvenci u biotestu <i>D. rerio</i> .....	53
<b>Tabela 7.</b> Sastav veštačke morske vode - ASW podloga ( <i>Artificial sea water</i> ) .....	56
<b>Tabela 8.</b> Akutna toksičnost cijanobakterijskih DMSO ekstrakata u biotestu <i>D. magna</i> , posle 24 i 48h izlaganja.....	63
<b>Tabela 9.</b> Uticaj koncentracije azota na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu <i>Artemia salina</i> .....	123
<b>Tabela 10.</b> Uticaj promene koncentracije azota tokom kultivacije na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize.....	126
<b>Tabela 11.</b> Uticaj koncentracije fosfora na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu <i>Artemia salina</i> . R.....	131
<b>Tabela 12.</b> Uticaj promene koncentracije fosfora tokom kultivacije na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize.....	134
<b>Tabela 13.</b> Uticaj svetlosnog režima na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu <i>Artemia salina</i> . ....	137
<b>Tabela 14.</b> Uticaj svetlosnog režima tokom kultivacije na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize.. ..	140
<b>Tabela 15.</b> Uticaj faze rasta kulture na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu <i>Artemia salina</i> . ....	143
<b>Tabela 16.</b> Uticaj faze rasta kulture na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize. ....	146
<b>Tabela 17.</b> Inhibitorne koncentracije (IC <sub>50</sub> i IC <sub>10</sub> ) i intervali poverenja od 95% za uticaj ekstrakata cijanobakterija na vijabilnost ćelija SH-SY5Y (µg mL <sup>-1</sup> ).....	151
<b>Tabela 18.</b> Koncentracije MC-LR ekvivalenata u uzorcima cijanobakterijskih kultura utvrđene primenom ELISA testa za mikrocistine. Rezultati su prikazani kao ppb (engl. <i>parts per billion</i> ; jedan deo na milijardu), uz vrednosti standardne greške (SEM) za svaki od rezultata.....	153
<b>Tabela 19.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Anabaena</i> Č2.....	156
<b>Tabela 20.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Anabaena</i> Č5.....	158
<b>Tabela 21.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Nostoc</i> 2S1.....	159
<b>Tabela 22.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Nostoc</i> 2S3B .....	160
<b>Tabela 23.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Nostoc</i> LC1B.....	162

<b>Tabela 24.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Nostoc</i> Z1 .....	163
<b>Tabela 25.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Oscillatoria</i> K3.....	164
<b>Tabela 26.</b> Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja <i>Oscillatoria</i> Z1 .....	166

## **Lista skraćenica**

<i>abcb4</i>	Gen koji kodira membranski protein koji je član superfamilije ATP-vezujućih kasetnih (ABC) transportera
AChE	Acetilholinesteraza
ADDA	3-amino-9-metoksi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoična kiselina
<i>ahr2</i>	Aril-ugljovodonični receptor
ALS	Amiotrofična lateralna skleroza
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionska kiselina, glutamatni receptor
ANOVA	Analize varijanse
ASW	Veštačka morska voda (engl. <i>Artificial sea water</i> )
Bax	Pro-apoptotički član porodice gena Bcl-2 (engl. <i>Bcl-2 Associated X-protein</i> )
Bcl-2	Proteini porodice B-ćelijskog limfoma-2 koji regulišu programiranu ćelijsku smrt
BG11	Tečna mineralna podloga za cijanobakterije (engl. <i>Blue Green Algae Medium</i> )
BGK	Biosintetički genski klaster
BLAST	Alat za pretragu lokalnog poravnanja (engl. <i>The Basic Local Alignment Search Tool</i> )
<i>bip</i>	Gen koji kodira vezujući imunoglobulinski protein (engl. <i>Binding Immunoglobulin Protein</i> )
BMAA	$\beta$ -metilamino-L-alanin
Caco-2	Ćelijska linija izvedena iz tkiva kolorektalnog adenokarcinoma čoveka
CaMKII	$Ca^{2+}$ /kalmodulin zavisna protein kinaza II
cDNK	Komplementarna DNK
CI 95%	Interval poverenja od 95% (engl. <i>Confidence interval 95%</i> )
CI%	Procenat citotoksičnosti
Ct	Prag ciklusa PCR reakcije (engl. <i>Cycle Threshold</i> )
CYN	Cilindrospermopsin
CYP450	Citohrom P450 superfamilija enzima
<i>cyp1a1</i>	Citohrom P450 familija 1, podfamilija A
<i>cyp314</i>	Citohrom P450 familija 314
<i>cyp360</i>	Citohrom P450 familija 3
D-Glu	D-glutaminska kiselina
D-MeAsp	D-eritro-metilasparaginska kiselina

DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EC50	efektivna koncentracija; koncentracija pri kojoj se javlja ispitivani efekat kod 50% tretiranih jedinki
ELISA	Enzimski imuno-vezujući test
EPD	Edem perikardijalne duplje
ER stres	Stres endoplazmatskog retikuluma
EŽK	Edem žumančane kese
FET	Test akutne toksičnosti sa ribljim embrionom (engl. <i>Fish embryo toxicity assay</i> )
FTS	Fetalni teleći serum
GSH	Glutation
GST	Glutation-S transferaza
GTX II	Gonijautoksin II
GTX II/III	Mešoviti gonijautoksin II plus III
HepG2	Ćelijska linija izvedena iz humanog hepatoma
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi
iRNK	Informaciona RNK
LArg	L-arginin
LAP	Linearni peptidi koji sadrže azole/azoline
LC50	Letalna koncentracija koja dovodi do letalnog efekta kod 50% izloženih jedinki
LPS	Lipopolisaharid
MALDI-TOF	Matricom potpomognuta laserska jonizacija
MAPK	Mitogen aktivirajuće protein kinaze
MC	Mikrocistin
MC-LA	Mikrocistin-LA, leucin, alanin
MC-LR	Mikrocistin-LR, leucin, arginin
MC-RR	Mikrocistin-RR, arginin, arginin
mcy	Geni mikrocistin sintetaze
MC-YR	Mikrocistin-YR, tirozin, arginin
MeDhb	N-metildehidrobutirin
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

NeK2	Serin/treonin-protein kinaza
NEO	Neosaksitoksin
NGS	Metoda sekvenciranja nove generacije (engl. <i>Next Generation Sequencing</i> )
NMDA	N-metil-D-aspartat, glutamatni receptor
NOD	Nodularin
NRPS	Neribozomalne peptidne sintetaze
NSCCC	Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija
OATP	Organski transportni sistem anjona
OECD	Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (engl. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
OGD	Deformiteti glave i oka
ORF	Otvoreni okvir čitanja (engl. <i>Open reading frame</i> )
p53	Tumor protein p53
PCC	Pasterova kolekcija cijanobakterija (engl. <i>Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria</i> )
PCR	Lančana reakcije polimeraze
P-gp	P-glikoprotein
PKS	Poliketid sintaze
PP1	Protein fosfataza tipa 1
PP2A	Protein fosfataza tipa 2A
PPIA	Test inhibicije protein fosfataze (engl. <i>Protein Phosphate Inhibition Assay</i> )
qPCR	Kvantitativna lančana polimerazna reakcija
RNK	Ribonukleinska kiselina
<i>rpl</i>	Ribozomalni protein
RiPP	Ribozomalno sintetisani i post-translaciono modifikovani peptidi
RT-qPCR	Kvantitativna lančana polimerazna reakcija u realnom vremenu (engl. <i>real-time quantitative PCR</i> )
SD	Skeletni deformiteti
SH-SY5Y	Ćelijska linija humanog neuroblastoma
SNP	Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
STX	Saksitoksin
TP	Ukupan fosfor (engl. <i>Total Phosphorus</i> )
USEPA	Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (engl. <i>United States Environmental Protection Agency</i> )

vfg	Gen koji je odgovoran za produkciju istoimenog prekursora žumančanog proteina vitelina
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )
7-deoxy-CYN	7-deoksi-cilindrospermopsin
7-epi-CYN	7-epi-cilindrospermopsin

# 1. Uvod

## 1.1. Cijanobakterije (Modro-zelene alge)

Cijanobakterije (Cyanophyta, Cyanophyceae, Cyanoprokaryota, Cyanobacteria) su ubikvitarna grupa morfološki raznovrsnih i ekološki izuzetno značajnih prokariotskih mikroorganizama. Poznate su takođe pod nazivom modro-zelene alge zbog morfoloških i metaboličkih sličnosti sa eukariotskim algama, kao i činjenice da poseduju hlorofil umesto bakteriohlorofila i sposobnosti oksigene fotosinteze (Palmer, 1962). Međutim, nakon primene modernijeg integrativnog taksonomskog pristupa koji uključuje biohemijske, ekološke, genetičke i molekularne analize, utvrđeno je da se radi o oksigenim fototrofnim bakterijama (Holt i sar., 1994). Istraživanja ultrastrukture ćelija cijanobakterija jasno pokazuju nedostatak jedra i drugih organela, kao i prisustvo peptidoglikanskog ćelijskog zida i lipopolisaharidne spoljašnje membrane, što su karakteristike Gram-negativnih Eubakterija (Vincent, 2009). Međutim, ćelijski zid cijanobakterija karakteriše deblji sloj peptidoglikana (10 – 40 nm) u poređenju sa tipičnim Gram-negativnim bakterijama (2 – 6 nm) (Hoiczuk i Hansel, 2000). Postoje podaci koji svrstavaju cijanobakterije među najstarije forme života na Zemlji. Najstariji poznati fosilni ostaci filamentoznih organizama, u velikoj meri nalik današnjim cijanobakterijama, pronađeni su u Zapadnoj Australiji (Schopf i Packer, 1987). Procenjeno je da su ovi nalazi stari između 3.3 i 3.5 milijardi godina, što ujedno predstavlja i najstariji dokumentovan nalaz očuvane mikrobiote. Kao jedna od najstarijih grupa oksigenih fotoautotrofa, smatra se da su cijanobakterije imale izuzetno značajnu ulogu u inicijalnoj oksigenaciji atmosfere pre približno 2.32-2.45 milijarde godina (Schirrmeister i sar., 2013). Akumulacija kiseonika u atmosferi je dovela do biološke inovacije u vidu aerobne respiracije, kao metabolički i energetski daleko efikasnijeg procesa u odnosu na anaerobni tip, čime je omogućen nastanak kompleksnih, višćelijskih, energetski-efikasnih eukariotskih organizama (Dismukes i sar., 2000). Jedan od mogućih dokaza se može pronaći u činjenici da pored oksigene fotosinteze određene, danas prisutne vrste, imaju sposobnost da vrše anoksigenu fotosintezu uz upotrebu vodonik-sulfida kao donora elektrona (Holland, 2006). Smatra se da su upravo cijanobakterije koje poseduju obe navedene adaptacije igrale fundamentalnu ulogu u globalnom ciklusu ugljenika, kiseonika i sumpora u proterozojskim okeanima (Hamilton i sar., 2018). Činjenica da cijanobakterije danas opstaju u širokom spektru različitih akvatičnih i terestričnih staništa, pripisuje se upravo ovako dugom periodu evolutivne adaptacije. Iako se prvenstveno javljaju u površinskim vodama, njihova nesvakidašnja sposobnost tolerancije promena temperature, intenziteta svetlosti i saliniteta (Ierson, 2017), kao i niz specifičnih fizioloških, metaboličkih i biohemijskih karakteristika, omogućili su im opstanak u staništima koja odlikuju ekstremni uslovi, među kojima su slatine, termalni izvori, pa i pustinje i zaleđena okruženja (Buratti i sar., 2017). Cijanobakterije su često prvi organizmi koji nastanjuju ogoljene površine stena ili zemljišta, gde predstavljaju značajne komponente funkcionalnih procesa kruženja nutritivnih elemenata (Whitton, 1992). Često se javljaju u asocijacijama sastavljenih od različitih vrsta prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama koji formiraju koherentne, slojevite strukture u vidu pokrivača ili biofilmova i takve asocijacije predstavljaju predominantne i ponekad čak i jedine oblike života u pojedinim ekstremnim staništima. Ipak, cijanobakterije se najefikasnije razvijaju u slatkovodnim, marinskim i braktičnim ekosistemima (Kulasooriya, 2011), gde je njihova dominacija uslovljena varijetetom njima svojstvenih fizioloških prednosti.

U poređenju sa ostalim prokariotskim grupama mikroorganizama, morfologija cijanobakterija je posebno raznovrsna i kompleksna (Castenholz, 2015). Građu njihovog vegetativnog tela



(talusa) može odlikovati jednoćelijska, kolonijska ili višećelijska filamentozna (končasta) forma sa lažnim ili pravim grananjem (Kulasooriya, 2011; Castenholz, 2015). Veličina samih ćelija cijanobakterija može varirati između 0.5  $\mu\text{m}$  (npr. vrste roda *Prochlorococcus*) i 50-100  $\mu\text{m}$  (kod određenih vrsta rodova *Chroococcus* i *Oscillatoria*). U slučaju jednoćelijskih i kolonijskih formi, oblik ćelija može biti sferičan, štapićast ili fuziforman, dok ćelije filamentoznih cijanobakterija mogu biti diskoidnog ili valjkastog oblika, sa trihomima koji mogu dostići milimetarske dužine (Garcia-Pichel, 2009). Talusi cijanobakterija filamentozne forme mogu biti sastavljeni od istovetnih ćelija, kada se označavaju kao homocitni talusi, dok se forme koje pored ćelija tipične strukture sadrže i pojedine specijalizovane ćelije nastale diferenciranjem od vegetativnih nazivaju heterocitnim (Blaženčić, 1998). Razmnožavanje cijanobakterija se najčešće odvija putem proste ćelijske deobe kod jednoćelijskih i kolonijskih oblika, dok kod filamentoznih oblika specijalizovane strukture poput hormogonija ili hormocisti mogu imati ulogu u reprodukciji (Campbell i Meeks, 1989; Meeks i Elhai, 2002). Hormogonije su kratki, pokretni delovi filamenata koji se u povoljnim uslovima mogu transformisati u samostalne jedinke, što omogućava cijanobakterijama da se brzo šire i kolonizuju nova staništa (Damerval i sar., 1991). S druge strane, hormociste se javljaju u grupama i okružene su zajedničkim debelim omotačem, štiteći ćelije od ekstremnih temperatura, suše ili drugih nepovoljnih faktora okoline (Blaženčić, 1998). Kada se uslovi poboljšaju hormociste mogu klijati, a nove jedinke mogu izrasti iz ovih zaštićenih struktura. Cijanobakterije odlikuje povoljan energetska balans, kao i niska konstanta energetske homeostaze, što znači da im je potrebno manje energije za održavanje normalnog funkcionisanja i strukture ćelija u odnosu na ostale fitoplanktonske organizme (Forchhammer i Selim, 2019). Na ovaj način je cijanobakterijama omogućeno da održe svoje populacije čak i u uslovima slabijeg intenziteta svetlosti ili pri veoma niskim koncentracijama nutrijenata dostupnih u okruženju (Jones i sar., 2018). Fotosintetski pigmenti cijanobakterija uključuju pored hlorofila a i karotenoida, pomoćne pigmente - fikocijanin, alofikocijanin i fikoeritrin (Vincent, 2009), što im omogućava korišćenje svetlosti iz spektra između 400 i 700 nm talasne dužine, uključujući i zonu zelenog svetla (550-650 nm) koju apsorbuju daleko efikasnije u odnosu na većinu grupa zelenih algi i biljaka. Pored toga, pojedine vrste, specifično planktonski oblici, obrazuju vodonepropusne proteinske strukture nazvane "gasne vakuole" sa ulogom u promeni vertikalnog položaja u vodi (Mogany, 2014). Sposobnost regulacije vertikalnog položaja u vodi predstavlja veliku kompetitivnu prednost nad mnogim fitoplanktonskim vrstama koje ne mogu dospeti do izvora nutrijenata nižih nivoa vodenog stuba, u kojima se cijanobakterije nesmetano razvijaju upravo zahvaljujući specifičnom sastavu fotosintetičkih pigmenata. Mnoge vrste mikroalgi takođe poseduju aktivne sisteme za transport ugljendioksida i bikarbonata, međutim, istraživanja su pokazala da su ovi sistemi znatno efikasniji kod cijanobakterija (Boqiang i sar., 2013) i obezbeđuju im kompetitivnu prednost u uslovima povećane pH vrednosti, što je jedna od karakteristika eutrofnih jezera. Određene grupe filamentoznih cijanobakterija predstavljaju ključne biokatalizatore u ciklusu azota (Howarth i sar., 1988; Latysheva i sar., 2012) zahvaljujući procesu konverzije atmosferskog azota do amonijaka koji katališe enzim nitrogenaza, koja biva ireverzibilno inhibirana u prisustvu molekularnog kiseonika. Zapravo, cijanobakterije su jedini azotofiksatorski organizmi koji proizvode kiseonik kao sporedni proizvod fotosintetičkog procesa i istovremeno mogu regulisati neizbežno prisustvo molekularnog kiseonika sa suštinski anaerobnim enzimom (Berman-Frank i sar., 2003). Normalno funkcionisanje ovog osetljivog procesa omogućavaju specifične karakteristike strukture i metaboličke aktivnosti specijalizovanih ćelija - heterocisti prisutnih u talusu određenih vrsta (Mella-Herrera i sar., 2010). Cijanobakterije takođe mogu skladištiti esencijalne nutrijente u vidu glikopeptida, lipidnih inkluzija,

cijanoficinskih zrna i polifosfatnih telašaca, što im omogućava kratkoročno preživljavanje nepovoljnih uslova životne sredine (Castenholz, 2015). Međutim, najočigledniji i najproblematičniji pokazatelj ekološke uspešnosti cijanobakterija, predstavlja sve češća pojava njihove dominacije u površinskim vodama i štetnog prenamnožavanja poznatog kao cvetanje vode (Paerl i Otten, 2013).

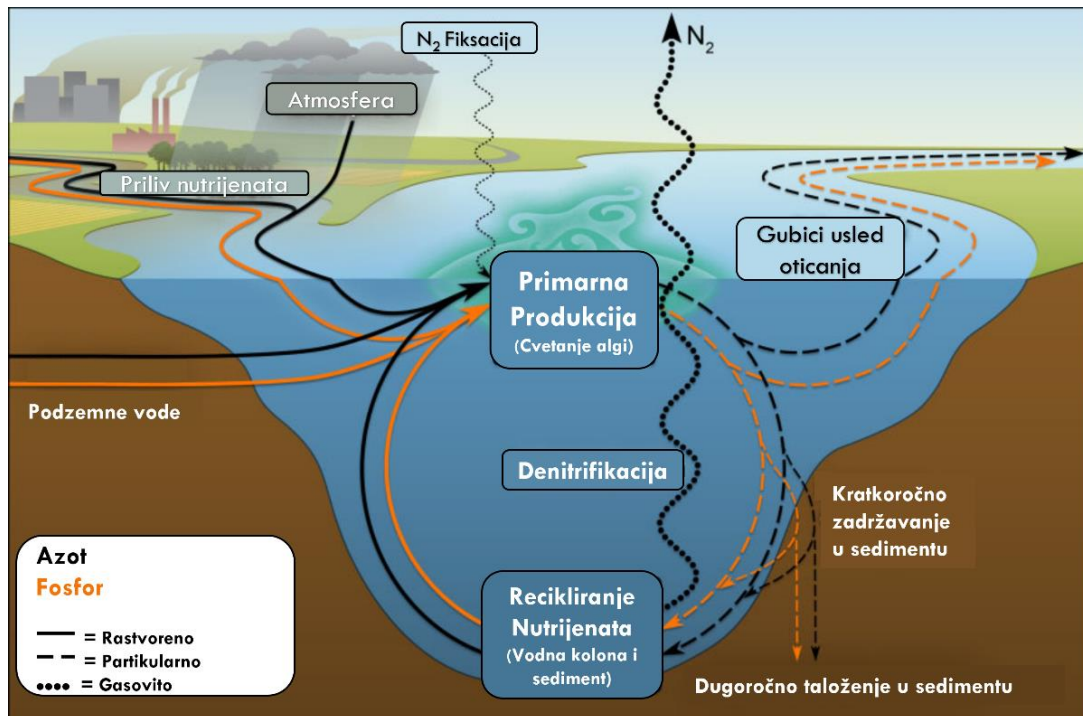
## 1.2. Cijanobakterijsko cvetanje vode

Smatra se da površinske slatke vode čine približno samo 0.01% vode na Zemlji, međutim, ova mala frakcija ukupnih vodnih resursa podržava oko 6% svih opisanih vrsta na planeti (Dodds i sar., 1995). Iako se voda smatra jednim od esencijalnih prirodnih resursa, slatkovodni sistemi su direktno ugroženi ljudskim aktivnostima, jer je unapređenje ekonomske produktivnosti putem povećanja dostupnosti vode često praćeno negativnim efektima po ekosistem i biodiverzitet (Mcintyre i sar., 2010). Kao jedan od najšire rasprostranjenih problema sa kojim se suočavaju slatkovodni ekosistemi izdvaja se veštačka ili kulturalna eutrofizacija. Eutrofizacija se definiše kao stalan i dinamičan ekološki proces, koji uključuje postepeno povećanje količine organskih materija u površinskim vodama, rezultat čega je povećanje primarne produktivnosti, odnosno stope fotosinteze u akvatičkim ekosistemima (Gajin i sar., 2007). Nasuprot **prirodnoj eutrofizaciji**, koja predstavlja proces postepenog geološkog starenja akvatičnog ekosistema, javlja se **veštačka** ili **kulturalna eutrofizacija** koja nastaje kao posledica brze urbanizacije, industrijalizacije i intenzivirane poljoprivredne produkcije (Liu i Qiu, 2007). U prvom slučaju, osnovni uzrok su specifične geomorfološke karakteristike ekosistema, dok je znatno brža promena trofičkog stanja ekosistema u slučaju veštačke eutrofizacije najčešće izazvana ljudskim delovanjem (Serrano i sar., 2017). Ovaj proces je prvi put primećen i opisan početkom dvadesetog veka u industrijski razvijenim zemljama, međutim, u toku proteklih decenija, postao je ozbiljan društveni problem, obuhvativši veliki broj različitih faktora, od primarnih ekoloških, zdravstvenih, pa sve do socioloških, ekonomskih i političkih (Erzinger, 2018). Jezerski ekosistemi su posebno ranjivi kada se radi o eutrofizaciji, prvenstveno zbog svojih hidroloških i morfometrijskih karakteristika. Mala brzina i dugo zadržavanje vode, kao i postojanje termalne stratifikacije, podržavaju primarnu produkciju i taloženje partikularne materije (Feuchtmayr i sar., 2009). Nakon opterećenja sistema dolazi do razgradnje i mineralizacije organskih jedinjenja pod uticajem fizičkih, hemijskih i bioloških procesa. Povećane koncentracije nutrijenata, pre svega azota i fosfora, mogu omogućiti ubrzano razmnožavanje algi i cijanobakterija i naglo povećanje njihove ukupne biomase (Drobac, 2015). Drugi sredinski faktori kao što su svetlost, temperatura i pH vrednost vode takođe mogu uticati na stopu rasta i kompoziciju ovih zajednica, međutim, kako nutrijenti čine osnovu produktivnosti ekosistema, njihova dostupnost se smatra ključnim faktorom u ovom procesu (Bengtsson i sar., 2012).

Cvetanje vode se može smatrati ekstremnim odgovorom akvatičnog ekosistema na eutrofizaciju. Ova pojava se sastoji u brzom umnožavanju i akumulaciji ćelija u populacijama cijanobakterija u akvatičnom sistemu (Shaw i sar., 2012). Cvetanje se definiše kao masovna proliferacija jedne ili nekoliko vrsta sa koncentracijom ćelija većom od 10000 u mililitru vode. Manifestuje se kao vidljiva nakupina cijanobakterijskih ćelija na površini vode zelene ili plavo-zelene do crvene ili mrke boje, ili kao zeleno-plavo zamućenje vode i odsustvo providnosti (Sedmak i Svirčev, 2011). Istraživanjem prisustva toksičnih cijanobakterija u vodenim ekosistemima na teritoriji Republike Srbije u periodu od nekoliko decenija, uz analizu relevantne literature iz ranijeg perioda, utvrđeno je da se cvetanje cijanobakterija javlja u gotovo 80% ispitivanih vodenih ekosistema

(Svirčev i sar., 2017). Ovo istraživanje je obuhvatilo 65 različitih vodenih ekosistema, uključujući reke, jezera, bare, kanale, rezervoare za navodnjavanje i rezervoare za snabdevanje pitkom vodom, što ukazuje na ubikvitarnost ove pojave. U poslednje tri decenije, zabeležen je porast učestalosti cijanobakterijskog cvetanja na globalnom nivou, što je ozbiljno uticalo na kvalitet priobalne i jezerske vode u mnogim delovima sveta (Sukenic i Kaplan, 2021). Cvetanje je direktno povezano sa fizičkim stanjem ekosistema i karakteristikama kakve su temperatura, turbiditet, hidrodinamičke i geohemijske osobine sistema (Osman i sar., 2017). Kako je svetlost esencijalan faktor koji doprinosi fotosintetskoj aktivnosti algi i cijanobakterija, intenzitet svetlosti i karakteristike ciklusa svetlosti imaju značajnu ulogu u stopi rasta i akumulaciji biomase ovih organizama (Singh i sar., 2015). Količina svetlosti u akvatičnim ekosistemima opada sa dubinom, što je znatno izraženije u eutrofnim okruženjima, gde akumulacija biomase fitoplanktona na površini vode dodatno otežava prodor svetlosti do dubljih slojeva sistema (Gotham, 1981). Mehanizmi cijanobakterija za prikupljanje svetlosti se razlikuju u određenoj meri od onih prisutnih kod eukariotskih algi, s obzirom na to da ih odlikuje svojstvo hromatske adaptacije. Jedna od osnovnih razlika je u prisustvu fikobiliproteina koji omogućavaju cijanobakterijama da apsorbuju širi spektar talasnih dužina. Iako se pri visokom intenzitetu svetlosti povećava stopa rasta ćelija, izlaganje višim nivoima fotosintetički aktivnog zračenja može dovesti do fotoinhibicije usled formiranja reaktivnih kiseoničnih formi koje dovode do destabilizacije ćelijske membrane i oštećenja fotosintetičkih pigmenata (Kovač, 2017). Cijanobakterije koje dovode do cvetanja na površini vode su tolerantnije na svetlost većeg intenziteta, što je obezbeđeno povećanom produkcijom karotenoida koji štite ćelije od fotoinhibicije (Chorus i Bartram, 1999).

Dostupnost nutrijenata je, međutim, osnovni preduslov za razvoj organske biomase i stoga se smatra najvažnijim faktorom koji dovodi do cvetanja. Brojne adaptacije cijanobakterija navedene u prethodnom potpoglavlju (Potpoglavlje 1.1) omogućavaju im da iskoriste priliv nutrijenata i brzo, oportunistički, odgovore povećanjem biomase (Vasconcelos, 2006). Mnoge vrste poseduju delimično heterotrofnu metabolizam i mogu koristiti organske (rastvorene ili partikularne) forme nutrijenata kako bi obezbedili deo neophodnih zaliha azota, fosfora i ugljenika (Mur i sar., 1999). Iako je njihovo prisustvo u ovim sredinama uobičajeno, ljudska aktivnost utiče na stepen do kog su cijanobakterije u stanju da se razmnožavaju i ugrožavaju normalno funkcionisanje ekosistema. Pored ugljenika, kiseonika i vodonika koji su akvatičnim organizmima dostupni direktno u vodi, uz dodatak ugljen-dioksida u atmosferi, azot (najčešće u formi nitrata i amonijaka) i fosfor (u formi ortofosfata) predstavljaju esencijalne elemente za razvoj cijanobakterija. Niske koncentracije nitrata i fosfata se prirodno javljaju u svim akvatičnim ekosistemima i održavaju u ravnoteži biološku produkciju, međutim, priliv ovih jedinjenja u većim količinama može dovesti do poremećaja uspostavljene ravnoteže i imati niz negativnih posledica po sam ekosistem (Slika 1) (Shaw i sar., 2012). Nutrijenti u sistem dospevaju i bez ljudskog delovanja putem azotofiksacije, oslobađanjem iz sedimenta i putem mineralizacije organske materije, međutim, antropogene aktivnosti dramatično povećavaju stepen i brzinu obogaćenja akvatičnih sistema ovim jedinjenjima. Povećanje u količini dostupnih nutrijenata može dovesti do promene u sastavu planktonskih zajednica i tako poremetiti lanac ishrane i normalan transfer nutrijenata (Mcintyre i sar., 2010).



Slika 1. Dijagram kretanja azota i fosfora u akvatičnom ekosistemu (Adaptirano iz Paerl, 2006)

Efekti različitih faktora životne sredine na razvoj cijanobakterija i proizvodnju bioaktivnih metabolita su detaljno istraženi i diskutovani u dostupnoj literaturi (Neilan i sar., 2013; Gehringer i Wannicke, 2014; Corbel i sar., 2014; Esteves-ferreira i sar., 2018). Evidentno je da na pojavu masovnog razvoja cijanobakterija u slatkovodnim ekosistemima u velikoj meri utiče dostupnost specifičnih esencijalnih nutrijenata, koji diktiraju brzinu rasta i stopu sinteze njihovih metabolita (Pimentel i Giani, 2014; Kramer i sar., 2018; Schwarz i Forchhammer, 2018). Jedan primer takvih nutrijenata je azot, koji se najčešće nalazi u vodi u obliku nitrata ili amonijum jona (Yin i sar., 1997). U nedostatku izvora azota koji se mogu iskoristiti, određeni sojevi cijanobakterija su u stanju da fiksiraju atmosferski azot, što je veoma efikasan mehanizam za sprečavanje azotnog "gladovanja". Međutim, neki od najčešćih toksigenih rodova cijanobakterija nisu azotofiksatorski i tako u potpunosti zavise od lako dostupnih izvora azota. Azot je takođe od posebnog značaja za cijanobakterije koje poseduju gasne vakuole, jer predstavlja esencijalnu komponentu u njihovoj sintezi. Iz tog razloga, azot ne utiče samo na stopu rasta ovih organizama, već i na njihovu sposobnost promene vertikalnog položaja u ekosistemu. U poređenju sa fosforom, jedinjenja azota se apsorbuju daleko slabije u zemljištu i stoga se veliki deo konvertovanog  $N_2$  rastvara u neorganskoj (amonijumovi joni, nitrati, nitriti) ili organskoj (aminokiseline, proteini, nukleotidi) formi i lako dospeva do površinskih voda. Za razliku od terestričnih ekosistema u kojima je koncentracija azota ograničavajući faktor, slatkovodni sistemi dobijaju dovoljne, često i prekomerne količine azotnih jedinjenja spiranjem površinskih slojeva okolnog zemljišta. Azotna jedinjenja se slabo zadržavaju u zemljištu, zbog čega lako spiranjem dospevaju u akvatične sisteme. Dodatno, transformacije između različitih frakcija partikularnog (organskog), rastvorenog (organskog/neorganskog) i atmosferskog (neorganskog) azota su izuzetno česte i obezbeđuju kontinuirani izvor dostupnog azota u većini okruženja (Bengtsson i sar., 2012). Ograničenje u dostupnosti azota predstavlja veći problem za ne-azotofiksatorske vrste cijanobakterija i može biti ključni faktor u njihovoj zameni drugim vrstama fitoplanktona (Jonge i sar., 2002).

Fosfor je jedan od esencijalnih nutrijenata za rast cijanobakterija i smatra se primarnim limitirajućim elementom koji određuje biološku produktivnost mnogih slatkovodnih ekosistema (Bengtsson i sar., 2012). Ovaj element se prirodno javlja u manjim koncentracijama od ostalih esencijalnih elemenata. Zemljište lako apsorbira fosfor i stoga se najveće količine neorganskog fosfora nalaze vezane u sedimentu u obliku nerastvorljivih jedinjenja ili minerala, dok je samo mala frakcija u obliku rastvorljivih neorganskih fosfata dostupna primarnim producentima (Sharpley i Rekolainen, 1997). Ukoliko se radi o oligotrofnom sistemu, niži slojevi vode ostaju oksigenisani i najveći deo ovih zaliha biva istaložen u sedimentu. U eutrofnim sistemima, međutim, u dubljim slojevima vode često dolazi do uspostavljanja anoksičnih uslova. U ovom slučaju, obično dolazi do razgradnje organske forme fosfora na dnu sistema i transformacije do neorganske forme koja difunduje naviše do fotičke zone, gde ponovo postaje dostupna primarnim producentima (Khan i Ansari, 2005). Upravo zbog tako niskih koncentracija ovog nutrijenta koje su dostupne cijanobakterijama u normalnim uslovima, nakon priliva većih koncentracija u nekoj od različitih formi - ortofosfat, pirofosfat, meta-fosfat, mono- i dihidrogen fosfat, najčešće dolazi do veoma efikasne biološke asimilacije ovih jedinjenja. Cijanobakterije imaju sposobnost da direktno usvajaju i koriste različite izvore fosfora, pri čemu ortofosfatni joni predstavljaju primarni izvor jer su direktno usvojivi u toj formi. Specifična je takođe sposobnost cijanobakterija da se prilagode uslovima promenljive dostupnosti fosfora. Ove adaptacije uključuju izmene u njihovoj sposobnosti usvajanja ortofosfatnih jona bez promena u stopi rasta populacija. U uslovima smanjene dostupnosti fosfora, cijanobakterije mogu koristiti rastvoreni organski fosfor da enzimski hidrolizuju i stvaraju ortofosfat. Ovaj proces dovodi do stvaranja kolonija i lipidnih membrana sa nižim udelom fosfora. Nakon ponovnog uspostavljanja povoljnih uslova, njihove ćelije često akumuliraju i skladište prekomerne količine neorganskog polifosfata u procesu poznatom kao „hiperkompenzacija“ (Solovchenko i sar., 2020; Xiao i sar., 2022). Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, definisane su granične vrednosti koncentracija ukupnog fosfora (engl. Total phosphorus, TP) koje uslovljavaju proliferaciju cijanobakterija. Utvrđeno je značajno povećanje stope rasta cijanobakterijske biomase pri koncentracijama TP u rasponu od 20 do 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Chorus i Schauser, 2011; Vuorio i sar., 2020). Ove koncentracije su i u skladu sa vrednostima definisanim u dokumentu Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2003) koje odgovaraju opsegu od 16 do 54  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Carvalho i sar., 2013). Nakon što je vodno telo kontaminirano i došlo do svetlosnih i temperaturnih promena, brojnost populacija većine eukariotskih algi opada i može doći do dominacije i prenamnožavanja pojedinih cijanobakterijskih vrsta (Slika 2) (Kulasooriya, 2011). Negativne posledice cijanobakterijskog cvetanja su brojne i mogu biti direktne, kakvi su toksični efekti koji se ispoljavaju na ribama, beskičmenjacima i ostaloj akvatičnoj fauni, ili indirektni, što uključuje promene u strukturi ribljih zajednica nakon gubitka hladnih pribežišta u toku leta, usled nastanka anoksičnih uslova u hipolimnionu (Hudnell, 2008). Neki od ovih efekata takođe uključuju promene organoleptičkih svojstava vode, čime se smanjuje kvalitet i potencijal vode za primenu za piće, pripremu hrane, navodnjavanje zemljišta, održavanje higijene i turističke i rekreativne aktivnosti. Poznato je da cvetanje vrsta cijanobakterijskog roda *Microcystis* može biti okidač kaskade ozbiljnih ekoloških posledica, izazivajući blokadu sistema za sprovođenje pijaće vode, povećanje turbiditeta vode i produkciju neprijatnog mirisa kao i smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika u vodi tokom razgradnje biomase (Xiao i sar., 2018). Smatra se da formiranje kolonija ovih vrsta doprinosi nastanku i održavanju cvetanja u slatkovodnim ekosistemima (Bormans i Visser, 2016). Krupne kolonije se mogu odupreti intenzivnoj turbulenciji zahvaljujući sposobnosti plutanja, mogu u određenoj meri smanjiti pritisak zooplanktona i

obezbediti zaštitu od teških metala (Wu i sar., 2007). Pored toga, eutrofizacija dovodi do redukcije biološkog diverziteta u akvatičnim ekosistemima, na svim trofičkim nivoima (Codd, 1995). Promena ovog tipa se najčešće ogleda u smanjenju brojnosti autohtonih, spororastućih vrsta i njihovoj zameni oportunističkim vrstama. Neke od najozbiljnijih posledica eutrofizacije i naknadnog cvetanja vode tiču se promena u koncentraciji dostupnog kiseonika. Nakon odumiranja prenamnoženih cijanobakterijskih i algalnih populacija, dolazi do intenzivne oksidacije novonastalih rezervi organske materije i formiranja sedimenta na dnu vodnog tela, što je proces u kome se troše velike količine kiseonika. Čak i kiseonik u sastavu  $SO_4^{2-}$  biva upotrebljen u ovim uslovima od strane sulfito-redukujućih bakterija, što dovodi do oslobađanja sumpora koji odmah vezuje slobodan kiseonik koji je još uvek dostupan u višim slojevima vode. Nastali hipoksični ili anoksični uslovi mogu onemogućiti opstanak živog sveta koji nastanjuje dati ekosistem i dovesti do karakterističnih pomora ribe i ostalih akvatičnih organizama (WHO, 2002). Nakon ovakvih poremećaja, vodno telo gubi svoje primarne funkcije što naknadno utiče na održivi razvoj ekonomije i društva. Iz tog razloga, danas je rešenje problema cijanobakterijskog cvetanja i oporavka različitih funkcija vodenog sistema od primarnog značaja za naučnike u oblasti zaštite životne sredine (Yang i sar., 2008). Nakon ozbiljnog narušavanja ravnoteže u akvatičnom ekosistemu, potrebno je mnogo vremena i truda kako bi se obezbedio oporavak, posebno u slučaju velikih jezerskih ekosistema, zbog čega su primeri uspešne remedijacije izuzetno retki (Liu i Qiu, 2007). Zbog toga se strategije zaštite najčešće baziraju na merama prevencije koje se sastoje iz redovnog monitoringa vodenih ekosistema, smanjenja unosa nutrijenata iz okolnih obradivih površina i sprečavanja njihovog spiranja u vodene ekosisteme, pravilne regulacije lokalnog komunalnog otpada i uvođenja mera ekoremedijacije (Sedmak i Svirčev, 2011).

Jedan od osnovnih problema sa brзом proliferacijom cijanobakterija se odnosi na njihov veoma aktivan sekundarni metabolizam, pri čemu pojedine vrste mogu da proizvode cijanotoksine, grupu hemijski raznovrsnih i potentnih prirodnih toksina. Cijanobakterijski toksini čine grupu metabolita cijanobakterija čiji su pripadnici neki od najčešće prisutnih toksina u akvatičnim okruženjima širom sveta i predstavljaju sve veći problem u vodama različite namene, uključujući jezera, reke, zalive i okeane, kao i različite veštačke rezervoare vode. Zbog toga važan element redovnog monitoringa vodenih ekosistema predstavlja praćenje zastupljenosti toksičnih i potencijalno toksičnih sojeva cijanobakterija kao i detekcija i karakterizacija pojedinih vrsta cijanotoksina. Informacije dobijene na ovaj način mogu biti od suštinske važnosti za pravovremenu procenu ekoloških i zdravstvenih rizika povezanih sa upotrebom vodenih ekosistema, kao i osmišljavanje adekvatnog plana upravljanja vodama.



**Slika 2.** Cvetanje vode izazvano cijanobakterijama roda *Microcystis* u Copco rezervoaru (Kalifornija) (Preuzeto iz (Solter i Beasley, 2013))

### 1.3. Toksini cijanobakterija (cijanotoksini)

Sposobnost određenih vrsta cijanobakterija da proizvode toksine je poznata kao ozbiljan problem već više od 140 godina, kada su prvi put opisani štetni efekti koje ovi agensi uzrokuju u živim sistemima (Francis, 1878). Najznačajniji toksigeni rodovi cijanobakterija uključuju filamentozne rodove *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria* i kolonijski rod *Microcystis* (Skulberg i Codd, 1984). Više vrsta odnosno sojeva u okviru ovih rodova može biti toksično, međutim, gotovo sve toksične vrste mogu dovesti do pojave cvetanja vode (Shaw i sar., 2012). Drugi rodovi koji proizvode toksine, kao što je rod *Nostoc*, su dobili znatno manje pažnje u dosadašnjim istraživanjima. Iz tog razloga najveći broj istraživanja u svetu toksičnih cijanobakterija odnosi se vodene sojeve. Međutim, pojedine vrste poput vrsta roda *Nostoc* naseljavaju ne samo vodene ekosisteme već i širok spektar kopnenih sredina (Dodds et al., 1995) i poznati su izvor brojnih toksičnih i drugih bioaktivnih jedinjenja identifikovanih samo kod sojeva ovih vrsta (npr. nostociklopitidi, kriptoficini, nostopeptolidi) (Fidor i sar., 2019). Mnogi od ovih proizvoda su izolovani i iz vodenih i iz kopnenih zajednica (Sivonen et al., 1990; Golakoti et al., 1995; Oksanen et al., 2004; Gehringer et al., 2012). U kopnenim sredinama, toksične cijanobakterije mogu uticati na stoku na ispaši, jer su često direktno izložene njihovim toksinima (McGorum et al., 2015; Zhang et al., 2021). Iako je proizvodnja toksina potvrđena kod određenih sojeva, ljudi i danas konzumiraju kao lekove i dijetetske suplemente neke kopnene vrste cijanobakterija (Gantar i Svirčev, 2008).

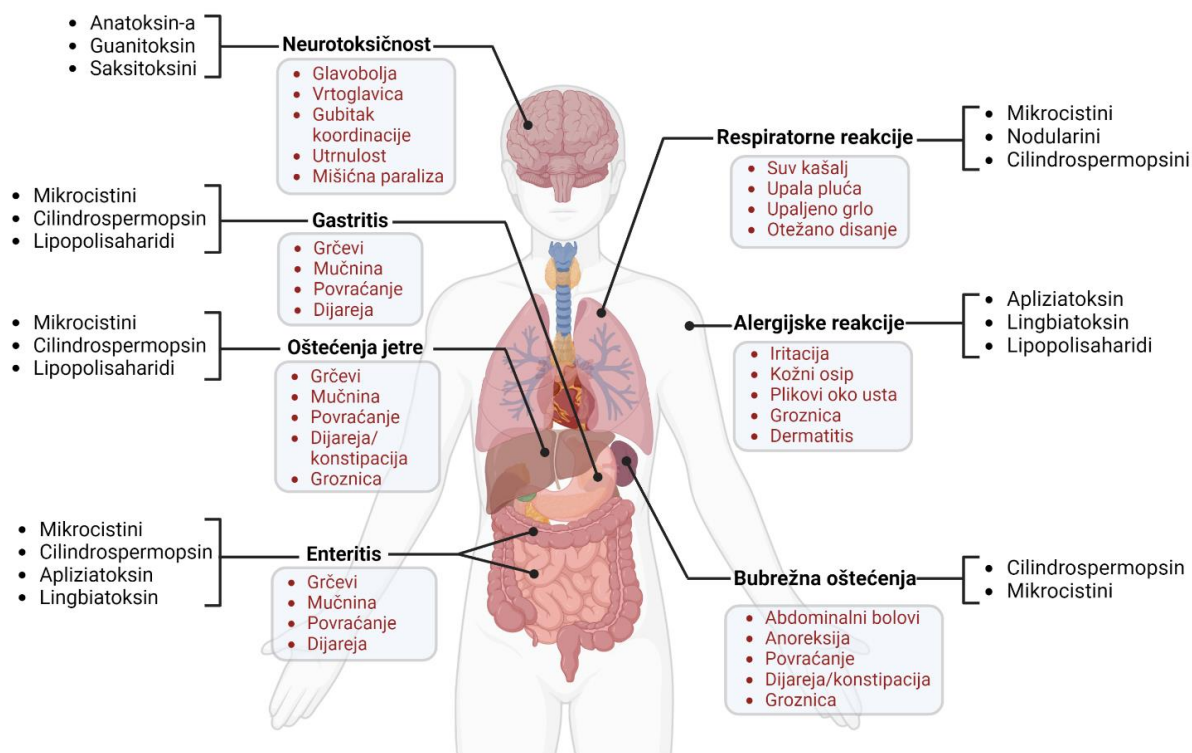
Kao endotoksini, cijanotoksini su veoma stabilni i oslobađaju se u visokim koncentracijama u spoljašnju sredinu prvenstveno nakon odumiranja/lize ćelija. Potencijal za produkciju toksina čini cijanobakterijsku dominaciju u rezervoarima pijaće vode posebno nepoželjnom, jer voda kontaminirana na ovaj način zahteva dodatni korak u procesu purifikacije kako bi se uklonile ćelije i toksini (He i sar., 2012). Akutna i ponekad čak letalna trovanja koja nastaju kao rezultat direktnog ili indirektnog kontakta ljudskih i životinjskih populacija sa toksičnim metabolitima

cijanobakterija se javljaju širom sveta (Carmichael, 1992; Simeunović i sar., 2005; Wood i sar., 2007; Drobac i sar., 2013). Putevi direktnog izlaganja uključuju ingestiju toksina hroničnim unosom kontaminirane pijaće vode, dermalni kontakt tokom rekreacionih aktivnosti, inhalaciju aerosolizovanih čestica ili intravenozni unos tokom medicinskih procedura (EPA, 2014). Indirektno izlaganje se može ostvariti putem konzumacije životinjskih ili biljnih proizvoda koji su prethodno bili izloženi cijanotoksinima, nakon čega se usled bioakumulacije toksični efekti mogu intenzivirati (Drobac i sar., 2013; Svirčev i sar., 2013). Bioakumulacija cijanotoksina se dešava u tkivima vodenih kičmenjaka i beskičmenjaka, uključujući ribe, školjke, zooplankton i organizme zoobentosa. Toksini se mogu akumulirati u ribama u značajnim količinama ako se riba uzgaja ili živi u vodama sa čestim cvetanjem cijanobakterija (Svirčev i sar., 2011). Zabeleženi efekti izloženosti ljudi i životinja toksinima iz ove grupe variraju od iritacije disajnih puteva, upale oka i kontaktnog dermatitisa do oštećenja jetre i bubrega, promena na nivou nervnog sistema, razvoja tumora, pa čak i smrti, pri čemu je ozbiljnost ovih efekata u velikoj meri određena dozom toksina kojoj je individua izložena (Slika 3) (Torokne i sar., 2001; Pilotto i sar., 2004; Abdallah i sar. (2021). Postoji veliki broj dokumentovanih slučajeva intoksikacije ljudi usled izlaganja cijanobakterijama i/ili cijanotoksinima. Toksično cvetanje cijanobakterija u vodama koje se koriste za vodosnabdevanje ili u rekreativne svrhe može predstavljati ozbiljan zdravstveni rizik za ljudsku populaciju (Falconer, 2007). Prvi potvrđen i dokumentovan slučaj trovanja povezan sa cijanobakterijama se desio na ostrvu Palm Island u Kvinslendu, Australija, 1979. godine (Byth, 1980). Cijanotoksinima je tada bilo izloženo 139 dece i 10 odraslih, pri čemu su simptomi uključivali povraćanje, glavobolju, bolove u stomaku s hepatomegalijom, letargiju, dijareju, acidozu i oštećenje jetre, bubrega, pluća i intestinuma. Navedeni simptomi su bili povezani sa konzumacijom vode za piće iz rezervoara kontaminiranog cijanobakterijama vrste *Cylindrospermopsis raciborskii*. Najpoznatiji slučaj trovanja ljudi sa letalnim ishodom, poznat pod nazivom "Karuaru sindrom", desio se na klinici u hemodijalizu u Brazilu 1996. godine. Tada je za hemodijalizu pacijenata upotrebljena voda iz rezervoara u kojem je došlo do cvetanja cijanobakterija. Koncentracija cijanotoksina mikrocistina je bila 19.5 µg/L, a od posledica trovanja je umrlo 76 pacijenata (55%) (Carmichael i sar., 2001). Hronično izlaganje pojedinim grupama cijanotoksina, kao što je slučaj sa mikrocistinima, je povezano sa povećanom incidencom karcinoma jetre ili hroničnim oštećenjem i bolestima jetre (Svirčev i sar., 2017; Zheng i sar., 2017; Liu i sar., 2018; He i sar., 2018), kao i kolorektalnim karcinomom, karcinomom tankog creva (Zhou i sar., 2002; Svirčev i sar., 2013; Svirčev i sar., 2017) ili karcinomom želuca (Xu i sar., 2003), što je uslovalo da Internacionalna agencija za istraživanje kancera (IARC) toksin mikrocistin-LR klasifikuje kao moguću karcinogenu supstancu za čoveka (grupa 2B) (IARC, 2006).

Važno je napomenuti da iako cijanobakterijske vrste sa potencijalom za produkciju toksina mogu biti prisutne u određenom okruženju, to ne mora nužno da čini životnu sredinu toksičnom, pošto se toksini ne proizvode konstantno u dovoljno visokim koncentracijama da predstavljaju rizik po zdravlje ljudi i životinja (Szlag i sar., 2015). Zapravo, toksičnost cijanobakterija je veoma varijabilna i kao takvu ju je izuzetno teško predvideti, čak i nakon identifikacije producenta i utvrđivanja njegove brojnosti u posmatranoj mikrobnoj zajednici. Ispitivanja Merel i sar. (2013) su pokazala da određeni sojevi imaju sposobnost da aktiviraju ili deaktiviraju gene povezane sa biosintezom toksina, u zavisnosti od uslova okoline. Neki od ovih specifičnih uslova, pretežno dostupnost hranljivih materija, temperatura i intenzitet svetlosti, mogu predstavljati važne trigerujuće faktore u produkciji toksina. Iz ovih razloga, razvoj preciznih i pouzdanih metoda za detekciju i kvantifikaciju toksičnosti cijanobakterija u različitim sredinama je od velikog značaja.



Poseban problem predstavlja veliki broj potencijalno toksičnih metabolita koje cijanobakterije mogu proizvoditi. Moguće je grubo klasifikovati ove metabolite prema njihovom toksičnom mehanizmu delovanja i ciljnom organu ili sistemu organa na hepatotoksine, neurotoksine, citotoksine, dermatotoksine i iritante (Tabela 1, Slika 5) (Wiegand i Pflugmacher, 2005; Meriluoto i sar., 2017).



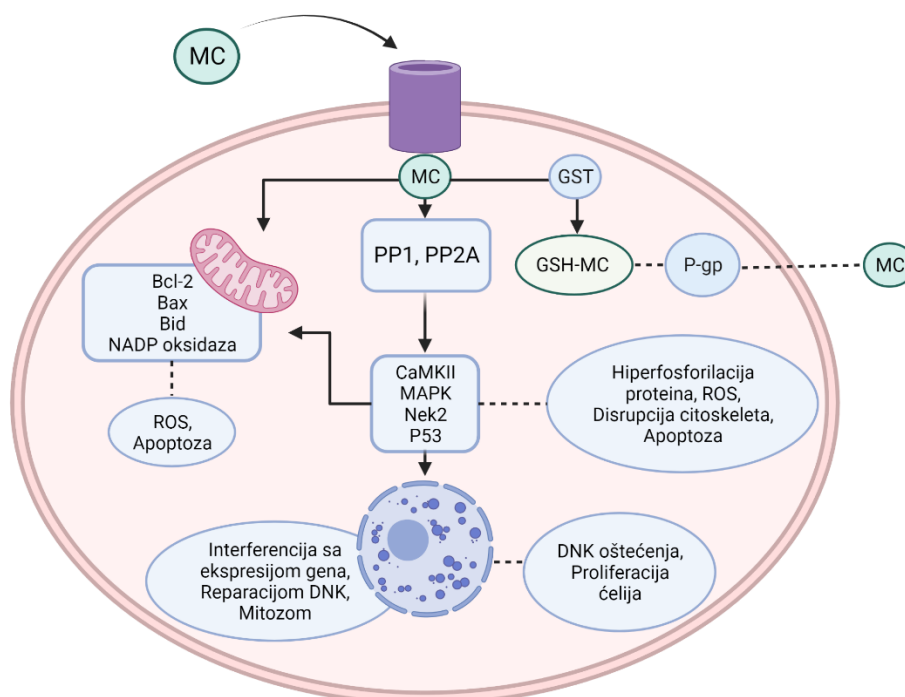
**Slika 3.** Prikaz nekih od mogućih toksičnih efekata cijanotoksina i kliničkih simptoma kod ljudi (Adaptirano iz Abdallah i sar. (2021)).

### 1.3.1. Hepatotoksični cijanotoksini

Hepatotoksični peptidni cijanotoksini su najrasprostranjenija i najbolje proučena klasa cijanobakterijskih toksina. Cijanobakterije proizvode izuzetno širok spektar bioaktivnih peptida, među kojima osnovne klase čine mikrocistini, nodularini, eruginozini, mikroginini, cijanopeptolini, anabenopektini, anabenopetidi, mikroviridini, ciklamidi (cijanobaktini) i nostoficini sa različitim stepenom toksičnosti (Mazur-Marzec i sar., 2013). Ovi jedinstveni ciklični peptidi poseduju različite bioaktivnosti, uključujući inhibiciju različitih grupa enzima (Janssen, 2019). Međutim, da bi se u potpunosti razumeli efekti i potencijalne opasnosti ovih peptida u životnoj sredini, istraživanja njihove biosinteze i toksičnosti na različitim biološkim nivoima organizacije su ključna za adekvatnu procenu rizika. Kao najčešće registrovani i najpotentniji izdvajaju se ciklični heptapeptidni mikrocistini (MC) i pentapeptidni nodularini (NOD) (Slika 5) (Rinehart i sar., 1988). Produkcija mikrocistina je zabeležena kod pripadnika nekoliko rodova slatkovodnih cijanobakterija, prvenstveno *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Anabaenopsis* i *Planktothrix* (Merwe 2014), iako su ovi toksini detektovani i kod pojedinih terestričnih sojeva rodova *Nostoc* i *Hapalosiphon* (Prinsep i sar., 1992; Oksanen i sar., 2004), dok su nodularini detektovani kod vrste *Nodularia spumigena* (Sivonen i Jones, 2009) kao i kod pojedinih vrsta roda *Nostoc* (Gehring i sar., 2012; Jokela i sar., 2017). Mehanizam toksičnog delovanja mikrocistina i

nodularina se temelji na inhibiciji aktivnosti enzima serin-treonin protein fosfataza tipa 1 i tipa 2A (PP1 i PP2A) u eukariotskim ćelijama, putem vezivanja za katalitičke subjedinice ovih enzima odgovorne za regulacije procesa replikacije DNK, ćelijske diferencijacije, metabolizma, apoptoze i drugih ćelijskih funkcija (Slika 4) (Campos i Vasconcelos, 2010). Blokiranjem aktivnih mesta protein fosfataza, ovi toksini sprečavaju formiranje holoenzima i time inhibiraju njihovu aktivnost, što dovodi do hiperfosforilacije proteina, disrupcije citoskeletnih struktura prevashodno u ćelijama jetre, poremećaja u njihovom obliku i na kraju do uništenja ćelije, nakon čega dolazi do hemoragije (Vasconcelos, 2001; Falconer, 2003). Međutim, da bi ispoljili svoje toksično dejstvo, toksini moraju prvo dospeti do ciljnog mesta delovanja. U slučaju mikrocistina, kako se radi o hidrofilnom molekulu, toksin ne može stupiti u ćelije pasivnim transportom već se apsorbuje aktivno zahvaljujući organskom transportnom sistemu anjona (OATP), nakon čega ulazi u hepatocite aktivnošću transportera žučne kiseline i OATP (Runnegar i sar., 1981). Kako isti transporteri mogu biti prisutni i u srcu, plućima, slezini, pankreasu, bubrezima i krvno-moždanoj barijeri, drugi organski sistemi i procesi takođe mogu biti pod uticajem ovih toksina. *In vitro* studije toksičnosti MC rađene sa imortalizovanim ćelijskim linijama koje nisu jetrene (epitelne ćelije, endotelne ćelije, ćelije humanog karcinoma debelog creva, ćelije humanog epidermoidnog karcinoma, ćelijska linija humanog neuroblastoma i druge) su pokazale da i organi kao što su kao što su bubrezi, pluća, creva i mozak mogu biti oštećeni ovim toksinima (Ito i sar., 2002; Botha i sar., 2004; Lankoff i sar., 2004; Žegura i sar., 2008). Kako su, međutim, potrebne veće koncentracije MC i duže vreme izlaganja da bi se izazvali efekti slični onima u hepatocitima, evidentno je da toksičnost direktno zavisi od koncentracije i trajanja izloženosti, što je određeno balansom između apsorpcije, detoksikacije i eliminacije MC iz ćelija. Utvrđene vrednosti LC50 (koncentracija koja dovodi do letalnog efekta kod 50% tretiranih jedinki) za mikrocistin-LR (MC-LR) na miševima (Swiss Webster i BALB/c sojevi) nakon 24 časovnog tretmana, kreću se od 5 do 10.9 mg kg<sup>-1</sup> za oralnu primenu (Lovell i sar., 1989; Robinson i sar., 1989; Fawell i sar., 1999; Chernoff i sar., 2020) i 25 do 158 µg kg<sup>-1</sup> za intraperitonealnu primenu (Lovell i sar., 1989; Robinson i sar., 1989; Fawell i sar., 1999; Kuiper-Goodman i sar., 1999; Boaru i sar., 2006; Chernoff i sar., 2020). Oštećenje jetre i hepatocita izazvano u oba slučaja je manifestovano na sličan način, pri čemu su hemoragija i apoptoza najizraženije promene (Runnegar i sar., 1981; Kuiper-Goodman i sar., 1999; Gupta i sar., 2003; Merel i sar., 2013). Pored toga, izlaganje mikrocistinu uzrokuje zagušenje (kongestiju) jetre krvlju, povećanje odnosa mase jetre i ukupne telesne mase i smanjenje nivoa glukoze i ukupnog proteina u serumu obolelih jedinki miša (Lovell et al., 1989; Robinson et al., 1989; Chorus et al., 2000). Vrednosti LC50 utvrđene za miševe nakon tretmana nodularinom (intraperitonealna injekcija) kreću se od 30 do 50 mg kg<sup>-1</sup> (Terao et al., 1994; Runnegar et al., 2002). Iako je inhibicija protein fosfataza kod sisara smatrana ključnim mehanizmom toksičnog dejstva, pojedini radovi ukazuju na alternativne targete mikrocistina u ćelijama, kao što su aldehid dehidrogenaza II (Chen i sar., 2006) i ATP-sintaza (Mikhailo i sar., 2003), što je takođe jedno od mogućih objašnjenja za raznovrsne opisane efekte u izloženim organizmima. Neke od do sada opisanih specifičnih posledica aktivnosti mikrocistina u ćelijama pod uticajem uključuju povećanje oksidativnog stresa, narušavanje strukture i funkcije mitohondrija i disrupciju citoskeleta, što može potencijalno biti okidač apoptotičkih procesa (Campos i Vasconcelos, 2010; Lezcano i sar., 2012). Dodatno, utvrđeno je da mikrocistini mogu imati genotoksično i mutageno dejstvo (Štraser i sar., 2011; Žegura, 2016; Herrera i sar., 2018), prvenstveno usled formiranja reaktivnih vrsta kiseonika što dovodi do oksidativnog stresa i oštećenja DNK. Primenom mikronukleus testa, utvrđeno je da čak i koncentracije mikrocistina koje nisu direktno

citotoksične mogu značajno uticati na ćelijske linije poput Vero-E6 i HepG2, izazivajući hromozomske aberacije u vidu prekida ili gubitka hromozoma (Menezes i sar., 2013; Dias i sar., 2014). Poznato je takođe da dugotrajno izlaganje dejstvu mikrocistina može potencijalno dovesti do razvoja karcinoma jetre ili kolorektalnog karcinoma (Campos i Vasconcelos, 2010; Žegura i sar., 2011; Faltermann i sar., 2016). Smatra se da u osnovi mehanizma promocije nastanka tumora kod MC-LR leži interakcija sa mehanizmima reparacije DNK i specifičnim genima uključenim u proces apoptoze. Jedan od ovih gena je p53, koji funkcioniše kao transkripcioni transaktivator, igrajući ključnu ulogu u sistemu reparacije DNK, apoptozi i putevima supresije tumora (Takumi i sar., 2010). Protein P53 je supstrat za PP2A enzim (Takumi i sar., 2010) i stoga se smatra da njegova aktivnost može biti direktno regulisana od strane MC-LR. Nakon izlaganja MC-LR, p53 podleže hiperfosforilaciji, što dovodi do značajnog povećanja nivoa ekspresije ovog gena, čime se remeti normalan ćelijski ciklus i mehanizam supresije razvoja tumora (Guzman i sar., 2003). Pored p53, MC-LR takođe utiče na Bcl-2 familiju proteina, koji su većinski vezani za spoljašnju membranu mitohondrija i uključeni u regulaciju mitohondrijalne permeabilnosti i oslobađanje apoptogenih proteina (Fu i sar., 2005). Poznato je da MC-LR može izazvati povećanje u ekspresiji Bax proteina, proapoptotičkog člana porodice Bcl-2 (Fu i sar., 2005), dok je zabeleženo značajno smanjenje ekspresije Bcl-2, anti-apoptotičkog proteina (Svirčev i sar., 2011). Iz sposobnosti MC-LR da inhibira ključne regulatorne proteine proizilazi povećanje aktivnosti protein kinaza kao što su mitogen aktivirajuće protein kinaze (MAPK), Ca<sup>2+</sup>/kalmoldulin zavisna protein kinaza II (CaMKII) i Nek2 kinaza. Ovaj tip interakcije takođe može rezultirati promenom ćelijskih signalnih puteva, regulacijom apoptoze, povećanjem proliferacije i potencijalnom indukcijom razvoja tumora (Campos i Vasconcelos, 2010). Predloženo je nekoliko mehanizama za procese detoksikacije mikrocistina, uključujući aktivnost efluksnih proteinskih transportera poput P-glikoproteina (P-gp) i formiranje konjugata sa glutationom (GSH) pomoću glutation-S transferaza (GST), čime se olakšava njihovo izbacivanje iz ćelija (Campos i Vasconcelos, 2010). Međutim, u tom pravcu su potrebna dalja istraživanja da bi se u potpunosti razumeli i istražili ovi mehanizmi.



**Slika 4.** Šema usvajanja mikrocistina preko multispecifičnog OATP transportnog sistema aktivnog u različitim tipovima animalnih ćelija, toksičnog dejstva, biotransformacije i izlučivanja ovog toksina (Adaptirano iz Campos i Vasconcelos (2010))

### 1.3.2. Citotoksični cijanotoksini

Posebnu grupu cijanotoksina predstavljaju citotoksini koji izazivaju morfološke ili funkcionalne promene na nivou ćelija različitih tkiva i organa kičmenjaka. Cilindrospermopsini se javljaju kao grupa najbolje istraženih i najpotentnijih cijanobakterijskih citotoksina. Cilindrospermopsin (CYN) i njegovi analozi, sulfovani trociklični alkaloidi guanidina, se primarno proizvode od strane cijanobakterijske vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* (*Raphidopsis raciborskii*) (Ohtani i Moore 1992; Kinnear, 2010). Identifikovani su, međutim i drugi producenti, uključujući vrste *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum* i vrste rodova *Raphidopsis*, *Anabaena* i *Lyngbya*. Nekoliko prirodnih kongenera cilindrospermopsina je do sada identifikovano, uključujući 7-deoksi-cilindrospermopsin (7-deoxy-CYN) (Norris i sar., 1999), 7-epi-cilindrospermopsin (7-epi-CYN) (Banker i sar., 2000), kao i 7-deoksi-desulfo-cilindrospermopsin i 7-deoksi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsin (Wimmer i sar., 2014). Iako su zvanično klasifikovani kao hepatotoksini, ovi toksini utiču na više organskih sistema i razlikuju se od prethodno opisane grupe po mehanizmu dejstva. U dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da cilindrospermopsin dovodi do ćelijske smrti kod miševa, pri čemu su zabeležene LC50 vrednosti od približno 2 mg kg<sup>-1</sup> nakon 24 časa od intraperitonealne aplikacije (Ohtani i Moore, 1992; Falconer i sar., 1999; Runnegar i sar., 2002) i 0.2 mg kg<sup>-1</sup> nakon 5-6 dana izlaganja (Sivonen i Jones, 2009). Ingestija CYN kod miševa može dovesti do oštećenja jetre, ali može uticati i na druge organe, uključujući bubrege, pluća, timus, slezinu, nadbubrežne žlezde i srce (Humpage i sar., 2005). Ovakvi slučajevi su posebno česti kada se ekstrakti cijanobakterija koji sadrže CYN ubrizgavaju intraperitonealno, jer je utvrđeno da mogu biti toksičniji i pokazati širi opseg toksičnosti u odnosu na prečišćen toksin (Humpage i sar., 2000; Shaw i sar., 2000; Puddick i sar., 2021). Inhibicija ćelijskog rasta i citotoksičnost su zabeleženi kod niza različitih ćelijskih linija sisara, uključujući ćelije jetre, bubrega, želuca i creva (Fessard i Bernard, 2003; Bain i sar., 2007; Neumann i sar.,

2007; Frosio i sar., 2009). Pored primarnih hepatocita glodara, najčešće korišćene imortalizovane ćelijske linije su Caco-2, izvedene iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma i HepG2 ćelije, izvedene iz humanog hepatocelularnog karcinoma. Utvrđeno je da su imortalizovane ćelije jetre osjetljivije od crevnih, sa EC50 (koncentracija pri kojoj se javlja ispitivani efekat kod 50% tretiranih jedinki) vrednošću od približno 4 mg mL<sup>-1</sup> registrovanom nakon 24 h izlaganja za HepG2 ćelije i redukcijom aktivnosti CYP450 metabolita u jetri (Gutiérrez-Praena i sar., 2019). U slučaju Caco-2 ćelija, najčešće zabeleženi efekti su povećana ćelijska permeabilnost i intracelularna koncentracija reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Remirez i sar., 2002; Pichardo i sar., 2017; Gutiérrez-Praena i sar., 2019). Istraživanja su pokazala da je cilindrospermopsin potentan inhibitor sinteze proteina, što predstavlja rani indikator izlaganja ovom toksinu koji se javlja i pri subtoksičnim koncentracijama. Ovu pravilnost potvrđuju rezultati rada Frosio i sar. (2003), gde je zabeležena potpuna inhibicija sinteze proteina kod primarnih hepatocita Wistar pacova već nakon 4-časovnog izlaganja 0.5 μM CYN, dok je ćelijska smrt utvrđena pri koncentracijama od 1-5 μM i nakon 18 časova izlaganja. Uprkos značajnom negativnom efektu cilindrospermopsina, malo se zna o mehanizmu interferencije cilindrospermopsina sa kompleksnom mašinerijom sinteze proteina u ćelijama čoveka. Poznato je, međutim, da toksin ometa elongacionu fazu ovog procesa i da je uracilni domen u strukturi toksina značajan za održavanje biološke aktivnosti *in vivo* (Banker i sar., 2010). Takođe su opisani genotoksični efekti cilindrospermopsina, prvenstveno mogućnost vezivanja za DNK, čime se može izazvati fragmentacija DNK molekula (Humpage i sar., 2005). Pored toga, utvrđeno je smanjenje količine dostupnog redukovano glutationa čak i pri niskim koncentracijama cilindrospermopsina koje se inače smatraju netoksičnim (0.8-1.6 μM), najverovatnije putem inhibicije GSH sinteze (Runnegar i sar., 1994). Toksin uzrokuje nastanak metaboličkih poremećaja, uključujući oksidativna oštećenja povezana sa smanjenim koncentracijama redukovano glutationa i oslabljenom sintezom glutationa. Primećeni su, takođe znatno slabiji toksični efekti kod životinja koje nemaju evolutivno naprednije sisteme metabolisanja toksina (npr. jetru ili hepatopankreas), što je slučaj i sa kičmenjačkim vrstama u ranim fazama razvoja. Takođe, cilindrospermopsin je jedinstven među cijanobakterijskim toksinima po tome što izaziva toksičnost *in utero*. U istraživanju Rogers i sar. (2007), tretman cilindrospermopsinom (8-128 μg kg<sup>-1</sup>) tokom kasne gestacije kod miševa (gravidne jedinice CD-2, Swiss-Webster) je doveo do povećanja broja mrtvih štenaca, prevremenog izleganja i značajnog smanjenja telesne mase štenaca. Autori su povezali rezultate sa potencijalnom nemogućnošću CYN da prođe kroz placentalnu barijeru i predložili da CYN može uticati na proizvodnju steroidnih hormona *in vivo*, što je moglo dovesti do opisanih štetnih efekata. Uprkos značajnim istraživačkim naporima, mehanizam dejstva CYN je i dalje u određenoj meri nepoznat.

### 1.3.3. Neurotoksični cijanotoksini

#### 1.3.3.1. Anatoksini

Anatoksini su alkaloidni toksini rastvorljivi u vodi, koji se povezuju sa velikim brojem slučajeva humanih i animalnih trovanja, među kojima je u prošlosti bilo i onih sa fatalnim ishodom (Wood i sar., 2007; Puschner i sar., 2010; Faassen i sar., 2012; Fastner i sar., 2018). Produkcija cijanotoksina pod nazivom anatoksin-a je prvi put utvrđena kod Kanadskog soja vrste *Anabaena flos-aquae* od strane Devlin i sar. (1977), koji su ovaj toksin nazvali "veoma brzim faktorom smrti" (eng. Very Fast Death Factor, VFDF), jer je izuzetno smrtonosan po domaće i divlje životinje. Od tada je, međutim, produkcija ovog toksina zabeležena i kod drugih

cijanobakterijskih vrsta, među kojima su *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon* sp., *Cylindrospermum* sp. i *Planktothrix* sp. (Sivonen i Jones, 1999). Tri forme anatoksina su do sada opisane: Anatoksin-a i homoanatoksin-a koji su alkaloidi opisani kao sekundarni amini, dok je guanitoksin (prethodno poznat pod nazivom anatoksin-a(s)) opisan kao jedinstveni fosfatni estar cikličnog N-hidroksiguanina (Puschner, 2007). Anatoksin-a i njegov homolog homoanatoksin-a su dvociklični sekundarni amini sa molekulskim masama između 165 i 179 daltona, strukturno slični alkaloidima. Anatoksin-a i homoanatoksin-a imaju opseg LC50 od približno 200-250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  kod miševa (intraperitonealna injekcija, nakon 24 h), dok je kod guanitoksina za isti parametar utvrđena vrednost od 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Carmichael i sar., 1990; Schatz i sar., 2007). Mehanizam dejstva kod ptica i sisara se sastoji u oponašanju dejstva neurotransmitera acetilholina i naknadnom ireverzibilnom vezivanju za nikotinske acetilholinske receptore (Wonnacott i sar., 2000), čime se stimulišu kontrakcije mišićnih ćelija, što može izazvati depolarizaciju blokadu nervno-mišićnih veza (Falconer, 1998). Specifično, natrijumovi voltažno zavisni kanali nakon vezivanja toksina ostaju praktično blokirani u otvorenom stanju, što omogućava "upliv" natrijumovih jona i kontinuiranu produkciju akcionog potencijala, što dovodi do hiperstimulacije mišićnih ćelija. Kada se efekat proširi do respiratornih mišića, dolazi do konvulzija usled nedostatka kiseonika u mozgu i gušenja (Carmichael i sar., 1990). Ovi toksini imaju približno 20 puta veći afinitet za acetilholinske receptore nego acetilholin ili nikotin i efekti su dugoročniji jer ne dolazi do razgradnje usled aktivnosti acetilholinesteraze s obzirom na to da je anatoksin-a otporan na delovanje ovog enzima (Puschner, 2007). Guanitoksin je takođe primarno neurotoksičan cijanotoksin, međutim, za razliku od prethodno navedenog toksina, strukturno je sličniji organofosfatima. Otkriven je primarno kod vrsta *Anabaena flos-aquae* i *A. lemmermannii* i potentan je inhibitor enzima acetilholin-esteraze (Sarma, 2013). Iako su organofosforini holinesterazni inhibitori otkriveni i kod terestričnih bakterija (npr. *Streptomyces antibioticus*) guanitoksin je jedini primer koji se javlja kod cijanobakterija (Fattorusso i Tagliatalata-Scafati, 2007). Reakcija sa ciljnim enzimom se sastoji iz fosforilacije i formiranja specifičnog kompleksa koji čini enzim nefunkcionalnim, što dovodi do preterane stimulacije mišićnih ćelija usled nemogućnosti degradacije acetilholina. Kao što je već navedeno, hemijska struktura se razlikuje u odnosu na anatoksin-a, jer je guanitoksin N-hidroksiguanidin metil fosfatni estar sa molekularnom masom od 252 daltona (Hyde i Carmichael, 1991). Razlog za dodatak "s" u originalnom nazivu toksina (anatoksin-a(s)) leži u karakterističnoj hipersalivaciji primećenoj kod laboratorijskih miševa izloženih ovom toksinu (Solter i Beasley, 2013). Nasuprot relativno stabilnom anatoksinu-a, guanitoksin se smatra veoma nestabilnim molekulom.

#### 1.3.3.2. Saksitoksini

Saksitoksini (STX) su toksini produkovani prvenstveno od strane slatkovodne cijanobakterijske vrste *Aphanizomenon flos-aquae* (Adelman i sar., 1982). Međutim, pored ove vrste, u slatkovodnim i braktičnim okruženjima, u okviru nekoliko cijanobakterijskih rodova takođe se mogu pronaći producenti ovih toksina, među kojima su *Anabaena circinalis*, *Anabaena lemmermannii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei* i *Planktothrix* sp. (Rodgers i sar., 2018). Ovi toksini predstavljaju neke od najpotentnijih neproteinskih toksina poznatih danas, sa LC50 vrednošću od 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  kod miševa, dok se letalnom dozom za čoveka smatra 1 mg prečišćene supstance (Bower i sar., 1981). Radi se o neurotoksičnim alkaloidima triciklične strukture, čiji se molekularni skelet sastoji iz dve guanidinske grupe. Intoksikacija ljudi se najčešće javlja kao posledica ingestije kontaminiranih akvatičnih organizama. Usled blokade natrijumovih kanala izazvane STX-om, ne može doći do

generisanja akcionog potencijala neophodnog za kontrakciju mišića (Chen i sar., 1996). Specifično, toksični efekti saksitoksina se primarno ogledaju u blokiranju voltažno zavisnih natrijumovih kanala u mijelizovanim i nemijelizovanim nervima, što rezultira u relaksaciji vaskularne glatke muskulature, depresiji akcionog potencijala srčanog mišića i inhibiciji aksonalne transmisije do skeletnih mišića (Evans, 1972; Kao, 1993). Blokirajući otvaranje kanala, protok natrijuma u neuron je zaustavljen, što dovodi do mišićne paralize i smrti usled onemogućene respiracije kod sisara (Merwe, 2014). Natrijumovi voltažno zavisni kanali senzornih nerava su mnogo podložniji blokadi saksitoksinima od onih u motornim neuronima, zbog čega senzorni abnormaliteti uglavnom prethode paralizi i parezi. Saksitoksini takođe deluju na kalcijumove kanale L-tipa koji imaju ulogu u stvaranju akcionog potencijala u srčanom mišiću (Stefanopoulos i sar., 2022), ali nivo inhibicije nije tako izražen kao kod natrijumovih kanala (Llewellyn, 2006). Kada je reč o ovom mehanizmu toksičnog delovanja, potrebno je spomenuti jamajkamid i kalkitoksin kao dodatne toksine cijanobakterija koji ispoljavaju neurotoksičnu aktivnost blokiranjem natrijumovih voltažno zavisnih kanala (Edwards i sar., 2004; LePage i sar., 2005).

#### 1.3.3.3. $\beta$ -metilamino-L-alanin (BMAA)

Jedinstvena aminokiselina  $\beta$ -metilamino-L-alanin (BMAA), je prvobitno izolovana iz ploda cikasa kao produkt simbiotskog cijanobakterijskog soja roda *Nostoc*, koji se razvija u kontaktu sa korenom ove biljke (Cox i sar., 2003). Od prvog nalaza ovog metabolita, njegova produkcija je opisana kod predstavnika brojnih cijanobakterijskih redova (*Chroococcales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales*, *Stigonematales*) u različitim životnim sredinama (Cox i sar., 2005). Zabeležena je takođe akumulacija BMAA u brojnim morskim organizmima koji se koriste u ljudskoj ishrani poput ribe, rakova, ostriga i školjki (Jonasson i sar., 2010), međutim, akutno trovanje usled ingestije ovog toksina nije do sada opisano. Jednom kada se unese, BMAA se vezuje za proteine u organizmu, nakon čega može funkcionisati kao endogeni neurotoksični rezervoar koji polako oslobađa toksin direktno u cerebralno tkivo (Murch i sar., 2004). Direktna veza između dejstva ovog toksina i efekata u humanom ili animalnom organizmu još uvek nije u potpunosti opisana, iako trenutni dokazi ukazuju na povezanost između izloženosti BMAA i podložnosti neurogenerativnim bolestima poput amiotrofične lateralne skleroze (ALS) i Parkinsonove bolesti (Spencer i sar., 1987). Poznato je međutim da BMAA ima sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, nakon čega izaziva neurotoksične efekte putem uticaja na centralni nervni sistem. Pri niskim koncentracijama, BMAA može interagovati sa svim osnovnim tipovima glutamatnih receptora (NMDA, AMPA i kainatni receptori) čija aktivacija dovodi do značajnog povećanja intracelularnog nivoa  $Ca^{2+}$  i povećane stimulacije motoneurona (Lobner, 2009). Ova promena dovodi do povećanog stresa endoplazmatskog retikuluma i aktivacije  $Ca^{2+}$ -zavisnih mehanizama ćelijske apoptoze.

#### 1.3.4. Dermatotoksični cijanotoksini

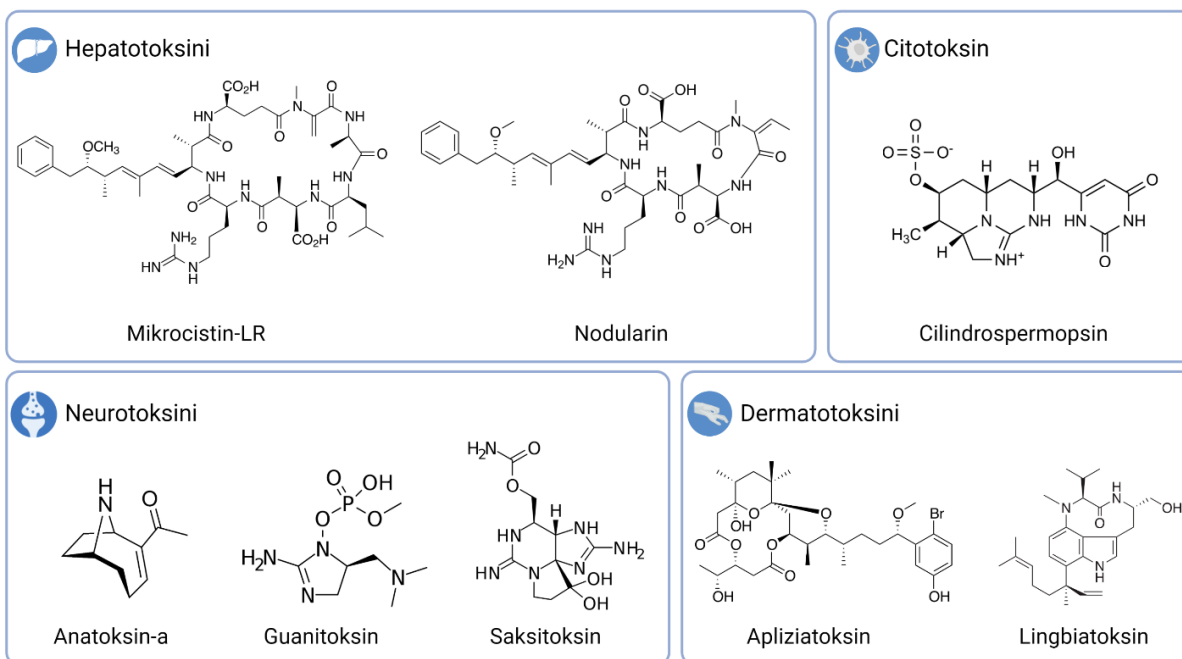
U dermatotoksične cijanotoksine se ubrajaju apliziatoksini, lingbiatoksini i debromoapliziatoksini koji izazivaju kontaktne kožne i gastrointestinalne iritacije kao i različite tipove alergijskih reakcija (Kaebernick i Neilan, 2001; Briand i sar., 2003). Inicijalno, apliziatoksini i debromoapliziatoksini su izolovani iz vrste *Stylocheilus longicauda*, međutim, od tada su identifikovani i kod drugih cijanobakterijskih vrsta (Tang i sar., 2019). Pored toga što uzrokuju teške oblike dermatitisa nakon direktnog izlaganja, ovi toksini mogu delovati kao promotori

tumora putem kompetitivnog vezivanja za protein kinazu C (Chorus i Bartram, 1999). Lingbiatoksine prvenstveno proizvodi *Lyngbya majuscula*, cijanobakterijska vrsta koja se javlja u priobalnim vodama u tropskoj i suptropskoj klimi (Osborne i sar., 2001). Sličan mehanizam delovanja, uključujući akutni kontaktni dermatitis i promociju tumora je prisutan i kod lingbiatoksina (Jeffrey i Liskamp, 1986).

#### 1.3.5. Lipopolisaharidi

Lipopolisaharidi (LPS; endotoksini) su ćelijski konstituenti većine Gram-negativnih bakterija. To su krupni (molekulske mase 200 do 1000 kDa), termostabilni (do 100°C), imunogeni molekuli, rezistentni na delovanje proteolitičkih enzima (Smulders i sar., 2012). Ćelijski zid Gram-negativnih bakterija se ponekad opisuje kao omotač, jer ovaj termin preciznije opisuje labavo prikačen sloj LPS materijala, koji je lociran na spoljašnjem delu tankoslojnog peptidoglikana. Spoljašnji sloj LPS omotača formira specifičnu barijeru, efektivnu protiv difuzije egzo-enzima u spoljašnju sredinu. Ovo predstavlja evolucionu karakteristiku čiji je razvoj omogućio ovim organizmima da prežive i umnože se u okruženjima sa niskim koncentracijama organskih nutrijenata (Sile, 2013). Iako blisko povezan sa ćelijskim omotačem, LPS konstantno biva odbacivan u spoljašnju sredinu. Mogu se izdvojiti tri specifična regiona kada je reč o strukturi LPS - unutrašnji region (jezgro), nazvan lipid A; središnji oligosaharidni sloj; spoljašnji polisaharidni lanac. Lipidna komponenta (Lipid A) predstavlja hidrofobni segment LPS koji je lociran u bazi ove strukture, na spoljašnjoj membrani. Poznato je da je lipidna komponenta odgovorna za toksične efekte ispoljene tokom infekcije Gram-negativnim bakterijama i da je to deo molekula koji je reaktivan *in vivo* (Smulders i sar., 2012). Iako su cijanobakterijski LPS često citirani u literaturi o cijanobakterijama kao toksini odgovorni za razne zdravstvene efekte kod ljudi, od kožnih osipa do gastrointestinalnih, respiratornih i alergijskih reakcija, većina zvaničnih istraživačkih izveštaja opisuje cijanobakterijski LPS kao slabo toksičan u poređenju sa LPS prisutnih kod pripadnika bakterijske familije *Enterobacteriaceae* (Stewart i sar., 2006).





**Slika 5.** Prikaz strukture toksikološki najznačajnijih grupa cijanotoksina (Modifikovano iz Dittmann i Wiegand (2006))

Koncentracije cijanobakterijskih toksina u spoljašnjoj sredini su generalno veoma niske ( $0.1 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) u poređenju sa toksinima prisutnim u samim ćelijama cijanobakterija (Lindholm i Meriluoto, 1991). Cilindrospermopsini su izuzetak, jer se visoke koncentracije ekstracelularnih toksina mogu naći tokom svih faza životnog ciklusa cijanobakterija koje ih produkuju (Chen i sar., 2011). Objavljen je veliki broj istraživanja koja se tiču pojave cijanotoksina u površinskim vodama, posebno mikrocistina, koji su najrasprostranjeniji cijanotoksini, odgovorni za najveći broj registrovanih slučajeva trovanja ljudi i životinja (Chorus i Bartram, 1999) i najveće koncentracije ovih toksina (do  $25 \text{ mg L}^{-1}$  na svetskom nivou) (Sivonen i Jones, 1999) su zabeležene u toku cvetanja vode. Sa druge strane, maksimalne detektovane koncentracije ostalih grupa, poput cilindrospermopsina i anatoksina u površinskim vodama su iznosile do  $3.3 \text{ mg L}^{-1}$  (Sivonen i Jones, 1999). Utvrđeno je da se koncentracije mikrocistina na području Vojvodine mogu kretati od  $0.95$  do  $603.51 \mu\text{g L}^{-1}$  (Simeunović, 2009).

Kako se karakteristika produkcije toksina kod cijanobakterija održala tokom njihove duge evolucije, uprkos visokoj metaboličkoj „ceni“, jasno je da je biološka funkcija ovih metabolita izuzetno važna. Informacije vezane za svrhu produkcije toksina od strane cijanobakterija, kao i funkcionalna ekološka uloga ovih, sa energetskog stanovišta nepovoljnih, bioaktivnih metabolita, su i dalje oskudne i potrebna su dodatna istraživanja u ovom pravcu. Iako je jasno da toksini obezbeđuju određenu prednost cijanobakterijama u njihovom prirodnom okruženju i dalje je nejasno na koji način. Postavljeno je međutim nekoliko hipoteza, koje su podržane rezultatima istraživanja sprovedenih proteklih godina.

**Cijanotoksini kao mehanizam zaštite od predatorstva/ispashe** - Postoje dokazi da cijanotoksini imaju značajan uticaj na strukturu populacija zooplanktona, što je dovelo do razvoja hipoteze da su ovi toksini nastali kao mehanizam zaštite od zooplanktonskih predatora (Lampert, 1981; DeMott i sar., 1991). Rezultati istraživanja Jang i sar. (2003) rađeni sa četiri

soja vrste *M. aeruginosa* su pokazali da kontakt sa zooplanktonom dovodi do povećanja stope produkcije toksina. Dodatno, u radu DeMott i sar. (1991), koji je jedna od glavnih publikacija koje podržavaju ovu hipotezu, autori su приметili da niske koncentracije mikrocistina inhibiraju stopu ishrane kod jedinki vrste *Daphnia pulicaria*, kao i da se ishrana veoma brzo normalizovala nakon postavljanja dafnija u medijum bez toksina.

**Cijanotoksini kao alelopatska jedinjenja** - Još jedna od predloženih funkcija ovih metabolita je da deluju kao alelopatska jedinjenja jer se pokazalo da igraju važnu ulogu u kompetitivnim interakcijama cijanobakterija. Efekat supresije rasta su predložili Ha i Pflugmacher (2013), nakon izlaganja makrofita vrste *Ceratophyllum demersum* dejstvu anatoksin-a, čime je izazvana aktivacija odgovora na stres usled prekomerne proizvodnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i naknadnog oksidativnog oštećenja. Povišena proizvodnja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> takođe je otkrivena kod iste vrste nakon izlaganja hepatotoksičnom mikrocistinu-LR u radu Pflugmacher (2004). Inhibicija rasta je takođe primećena kod različitih vrsta algi, među kojima su vrste rodova *Chlamydomonas*, *Haematococcus*, *Navicula* i *Cryptomonas* kada su bile izložene MC-LR (Babica, 2006). Nekoliko istraživanja je takođe analiziralo efekte cijanotoksina na konkurentne vrste cijanobakterija. Inhibicija fotosinteze, aktivnosti nitrogenaze, rasta i usvajanja CO<sub>2</sub> primećena je kod *Anabaena* spp. i *Nostoc muscorum* nakon izlaganja poluprečišćenom MC-LR, pri čemu su se efekti postepeno povećavali sa porastom koncentracije toksina (Singh i sar., 2001).

**Uloga cijanotoksina u obezbeđivanju hranljivih materija** - Iako su ove grupe metabolita nazvane cijanotoksini, toksična svojstva koja ispoljavaju možda nemaju nikakve veze sa njihovim osnovnim funkcijama. Ovi sekundarni metaboliti bi mogli imati ulogu u obezbeđivanju i zadržavanju specifičnih hranljivih materija u životnoj sredini. Sa te tačke gledišta, proizvodnja toksina bi se trebala povećavati u odnosu na smanjenje dostupnosti specifičnih hranljivih materija. Zaista, povećana produkcija MC pod ograničenjem dostupnosti izvora gvožđa primećena je kod vrste *M. aeruginosa* PCC 7806 (Yeung, 2016). Dodatno, unutarćelijske funkcije mikrocistina su povezane sa balansom jona gvožđa u studiji Utkilen i Gjølme (1995), koji su zabeležili razliku u efikasnosti apsorpcije gvožđa između toksičnih i netoksičnih sojeva *Microcystis aeruginosa* nakon što su oba soja gajena u medijumima deficitarnim u pogledu dostupnog gvožđa.

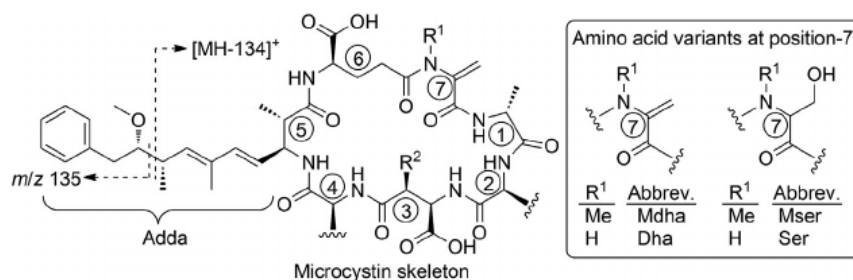
**Cijanotoksini u sinergističkim interakcijama i stvaranju mikrobijalnih asocijacija** – U određenom broju studija je pokazano da nekoliko toksigenih vrsta cijanobakterija dostiže optimalan rast samo u prisustvu određenih vrsta heterotrofnih bakterija (Berg i sar., 2009; Louati i sar., 2015) što je podstaklo nastanak teorije da proizvodnja određenih metabolita, među njima i cijanotoksina, ima ulogu u privlačenju ovih "korisnih" organizama, dok istovremeno funkcionišu kao repelent za antagonističke grupe (Kaebernick i Neilan, 2001), iako još uvek ne postoji dovoljno dokaza u dostupnoj literaturi koji bi potkrepili ovu teoriju. Utvrđeno je recimo, u radu Paerl i Gallucci (1985), da je vrsta *Pseudomonas aeruginosa* hemotaktički privučena od strane azotofiksirajuće vrste *Anabaena oscillarioides*, pri čemu u mutualističkom odnosu ove dve vrste dele fiksirani azot. Dodatno, primećeno je povećanje stope fiksacije CO<sub>2</sub> u ćelijama vrste *M. aeruginosa* gajenih u prisustvu određenih vrsta bakterija. Takođe, Paerl i Milie (1996) opisuju mutualističke i potencijalno sinergističke interakcije između cijanobakterija i heterotrofnih bakterija koje se razvijaju unutar kolonija, na agregacijama trihoma i u visoko specifičnim asocijacijama sa heterocistama azotofiksirajućih cijanobakterija.

## 1.4. Biosinteza cijanotoksina

Tokom proteklih decenija, istraživači su uspeli da identifikuju biosintetičke puteve većine do sada poznatih cijanobakterijskih toksina. Saznanja u ovoj oblasti ne samo da su otkrila jedinstvene biohemijske karakteristike svakog od njih, već su i podstakla stvaranje novih metoda za otkrivanje i razlikovanje toksičnih cijanobakterija u prirodnom okruženju. Pored toga, upoređivanjem biosintetskih puteva različitih rodova koji proizvode toksine, postalo je moguće pratiti evolucionu istoriju i razumeti mehanizme koji stoje iza diverzifikacije nekih od ovih toksina. Prisustvo gena mikrocistin sintetaza (*mcy*) umešanih u biosintezu mikrocistina, recimo, danas se često uzima kao indikacija prisustva potencijalno toksičnih cijanobakterija u uzorku (Dittmann i Börner, 2005). Cijanobakterije, kao i mnoge druge vrste bakterija, mogu da proizvode širok spektar sekundarnih metabolita zahvaljujući specijalizovanom biosintetičkom aparatu. Najveći deo sekundarnih metabolita cijanobakterija su peptidi ili poseduju peptidne podstrukture i otkriveno je da se većina ovih molekula sintetiše putevima neribozomalne peptidne sintetaze (NRPS) i poliketid sintaze (PKS), ili hibridnim putevima kombinacije ova dva kompleksa (Welker i Von Döhren, 2006). Neribozomalni peptidi i poliketidi su dve vrste molekula koje proizvode veliki multienzimski kompleksi. Ovi kompleksi su organizovani u takozvane biosintetičke klastere gena, koji se sastoje od funkcionalnih jedinica koje se označavaju kao moduli, pri čemu je svaki modul odgovoran za katalizaciju jednog ciklusa elongacije ili modifikacije funkcionalnog proizvoda (Kurmayer i sar., 2009). Moduli moraju sadržati minimalno tri najvažnija domena: katalitički domen odgovoran za odabir specifičnog monomera, domen proteina nosača koji vezuje monomer nakon što je tioesterifikovan i drugi katalitički domen koji pomaže pri elongaciji nastajućeg lanca (Naughton i sar., 2017). Ovi molekuli su komercijalno vredni i odgovorni su za većinu značajnih bioaktivnih prirodnih proizvoda cijanobakterija koji su do sada otkriveni.

### 1.4.1. Biosinteza mikrocistina

Obe opisane familije oligopeptidnih toksina (MC i NOD) dele gotovo istu osnovnu strukturu koja uključuje jedinstveni amino-kiselinski bočni lanac poznat pod nazivom ADDA (3-amino-9-metoksi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoična kiselina) za koji se smatra da je odgovoran za toksične karakteristike ovih molekula (Greer i sar., 2018). Iako su strukturne varijacije zabeležene u slučaju svih sedam amino kiselina, generalnu strukturu većine kongenera mikrocistina čini ciklo-(D-alanin 1-**X**2-D-MeAsp3-**Z**4-Adda5-D-glutamat 6-Mdha7) (Rinehart i sar., 1994; Sivonen, 1996), gde su **X** i **Z** varijabilne L-amino kiseline, D-MeAsp je 3-metilasparaginska kiselina i Mdha je N-metil-dehidroalanin (Slika 5). Zahvaljujući karakterističnoj strukturi, mikrocistine odlikuje velika strukturna varijabilnost, rezultat čega je familija od 279 srodnih toksičnih supstanci (Bouaïcha i sar., 2019) koje variraju u sastavu peptidne sekvence, stepenu metilacije, hidrosilacije, epimerizacije i toksičnosti. Najveći broj dostupnih toksikoloških podataka o mikrocistinima se odnosi na varijante MC-LR, MC-RR, MC-YR i MC-LA (oznake aminokiseline na varijabilnim pozicijama 2 i 4 - L, leucin; R, arginin; Y, tirozin; i A, alanin), među kojima je mikrocistin LR najviše proučavan i smatran najtoksičnijom izoformom (Slika 6).



		②	④	⑦	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	[MH] <sup>+</sup> m/z
1	MC-LR	Leu	Arg	Mdha	Me	Me	995.5
2	MC-YR	Tyr	Arg	Mdha	Me	Me	1045.5
3	MC-RR	Arg	Arg	Mdha	Me	Me	1038.5
4	MC-LA	Leu	Ala	Mdha	Me	Me	910.5
5	MC-LF	Leu	Phe	Mdha	Me	Me	986.5
6	MC-LY	Leu	Tyr	Mdha	Me	Me	1002.5
7	MC-LW	Leu	Trp	Mdha	Me	Me	1025.5
8	[Dha <sup>7</sup> ]MC-LR	Leu	Arg	Dha	H	Me	981.5
9	MC-RY	Arg	Tyr	Mdha	Me	Me	1045.5
10	MC-RA	Arg	Ala	Mdha	Me	Me	953.5
11	MC-HilR	Hil	Arg	Mdha	Me	Me	1009.5
12	MC-FR	Phe	Arg	Mdha	Me	Me	1029.5
13	MC-RF	Arg	Phe	Mdha	Me	Me	1029.5
14	[Mser <sup>7</sup> ]MC-YR	Tyr	Arg	Mser	Me	Me	1063.5
15	[Mser <sup>7</sup> ]MC-LR	Leu	Arg	Mser	Me	Me	1013.5
16	[Asp <sup>3</sup> ]MC-RY	Arg	Tyr	Mdha	Me	H	1031.5
17	[Asp <sup>3</sup> ]MC-LR	Leu	Arg	Mdha	Me	H	981.5
18	MC-LY(OMe)	Leu	MeOTyr	Mdha	Me	Me	1032.5
19	MC-LL	Leu	Leu	Mdha	Me	Me	952.5
20	[Asp <sup>3</sup> ]MC-YR	Tyr	Arg	Mdha	Me	H	1031.5
21	[Dha <sup>7</sup> ]MC-YR	Tyr	Arg	Dha	H	Me	1031.5
22	[Mser <sup>7</sup> ]MC-RY	Arg	Tyr	Mser	Me	Me	1063.5
23	[Dha <sup>7</sup> ]MC-RY	Arg	Tyr	Dha	H	Me	1031.5
24	MC-RY(OMe)	Arg	MeOTyr	Mdha	Me	Me	1075.5
25	MC-RAba	Arg	Aba	Mdha	Me	Me	967.5
26	MC-RApa(1)	Arg	Apa	Mdha	Me	H	981.5
27	MC-RApa(2)	Arg	Apa	Dha	H	Me	981.5
28	MC-RL	Arg	Leu	Mdha	Me	Me	995.5
29	MC-YA	Tyr	Ala	Mdha	Me	Me	960.5
30	MC-YAba	Tyr	Aba	Mdha	Me	Me	974.5
31	MC-LAba	Tyr	Aba	Mdha	Me	Me	924.5

**Slika 6.** Strukture do sada opisanih analoga mikrocistina (Preuzeto iz Miles i sar. (2013))

Biosinteza mikrocistina se odvija ne-ribozomalno pomoću hibridnog enzimskog sistema koji uključuje peptidne sintetaze, poliketidne sintaze i dodatne modifikujuće enzime (Calteau i sar., 2014). Kompletan genski klaster je okarakterisan kod vrsta *Microcystis aeruginosa* K-139, PCC 7806 i NIES-843 (Nishizawa i sar., 1999; Tillett i sar., 2000; Kaneko i sar., 2007), zatim *Planktothrix agardhii* NIVA126/8 (Christiansen i sar., 2003) i *Anabaena* 90 (Rouhiainen i sar., 2004), dok su delovi klastera pronađeni kod pojedinih vrsta roda *Nostoc* (Slika 7) (Genuário i sar., 2010). Genski klaster za sintezu mikrocistina (*mcy*), koji zauzima 55.4–55.8 kb (u zavisnosti od producentke vrste) na hromozomu, se sastoji od 6 krupnih otvorenih okvira čitanja (ORF) (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* i *mcyG*) i 4 manja ORF (*mcyF*, *mcyH*, *mcyI* i *mcyJ*), među kojima geni *mcyA*, *mcyB*, *mcyC* kodiraju NRPS, *mcyD* kodira PKS a *mcyG* i *mcyE* predstavljaju mešovite NRPS/PKS gene, dok preostali geni kodiraju modifikacione enzime (Tillett i sar., 2000; Pearson i sar., 2016). Sklapanje mikrocistina počinje sintezom ADDA aminokiseline, aktivacijom fenil propionatne početne jedinice izvedene iz fenilalanina na hibridnom NRPS/PKS enzimu *mcyG*. Skelet karakteristične ADDA aminokiseline se formira aktivnošću četiri PKS modula koji su deo *mcyG*, D i E. Modifikacije bočnog lanca ADDA uvode O-metiltransferaza *mcyJ* i domen amino transferaze *mcyE*. Nakon formiranja ADDA, preostalih šest aminokiselina biva inkorporirano

dejstvom enzima koji kodiraju NRPS moduli *mcyG*, *mcyA*, *mcyB* i *mcyC*. Nakon dodatnih enzimskih modifikacija, izduženi peptid se konačno oslobađa iz enzimskog kompleksa pomoću domena tioesteraze *mcyC*, dok se ABC transporter gen *mcyH* smatra odgovornim za transport mikrocistina (Tillett i sar., 2000; Christiansen i sar., 2003; Hicks i sar., 2006).

#### 1.4.2. Biosinteza nodularina

Kao što je navedeno, nodularini su pentapeptidi, strukturno i toksikološki blisko povezani sa mikrocistinima. Opšta aminokiselinska sekvenca nodularina sadrži D-eritro-metilasparaginsku kiselinu (D-MeAsp), L-arginin (LArg), ADDA aminokiselinu, N-metildehidrobutirin (MeDhb), D-glutaminsku kiselinu (D-Glu) i 2-metilamino-2-butensku kiselinu (N-metildehidrobutirin) i može se pojednostavljeno predstaviti kao ciklo-(D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdhb) (Giordano i sar., 2015). Genski klaster odgovoran za biosintezu nodularina (*nda*) je veličine 48 kb i sastoji se od devet ORF (*ndaA* – *ndaI*) koji kodiraju dva NRPS, jedan PKS i dva NRPS/PKS domena, kao i modifikujuće enzime (Moffitt i Neilan, 2004). Prema analizi sekvence, *nda* klaster sadrži dva velika operona koji se nalaze sa obe strane dvosmernog promotora (Slika 7). Jedan od ovih operona, koji se nalazi nizvodno od promotora, kodira tri NRPS modula sastojanih u okviru ORF-a *ndaA* i *ndaB*. Drugi operon, koji se nalazi uzvodno od promotora, sadrži tri ORF-a označena kao *ndaC*, *ndaD* i *ndaF*, koji kodiraju hibridne NRPS/PKS module, kao i četiri dodatna ORF-a nazvana *ndaE*, *ndaG*, *ndaH* i *ndaI* koji kodiraju modifikujuće enzime (Moffitt i Neilan, 2004). Ovi ORF se transkribuju u suprotnom smeru od nizvodnog operona. Među navedenim ORF, *ndaC*, *D*, *E* i *F* kodiraju enzime koji su odgovorni za biosintezu ADDA aminokiseline, dok *ndaF*, *G*, *H*, *A* i *B* kodiraju enzime odgovorne za sintezu peptida, formiranje ciklične strukture i transport toksina (Gehring i sar., 2012).

#### 1.4.3. Biosinteza cilindrospermopsina

Klaster gena uključenih u proizvodnju CYN prvobitno je delimično opisan kod vrste *Aphanizomenon ovalisporum* (Shalev-Alon i sar., 2002; Kellmann i sar., 2006), gde su identifikovani geni koji kodiraju amidinotransferazu, poliketid sintetazu i peptid sintetazu u genskim regionima nazvanim *aoaA*, *aoaB* i *aoaC*. Nekoliko godina kasnije, kompletan *cyr* klaster koji obuhvata 43 kb i sadrži 15 otvorenih okvira čitanja (ORF) neophodnih za sintezu, regulaciju i transport CYN, je opisan kod vrste *Raphidopsis raciborskii* AWT205 (Slika 7) (Mihali i sar., 2008). Ovi ORF su označeni kao *cyrA-O* i odgovorni su za različite korake u biosintezi CYN. Biosinteza cilindrospermopsina počinje formiranjem ugljeničnog skeleta molekula. Prvi korak uključuje sintezu guanidin-acetata kao osnovne jedinice, tako što se guanidin grupa prenosi na glicin ili arginin dejstvom enzima amidinotransferaze koji kodira *cyrA* (Kellmann i sar., 2006), nakon čega sledi dodavanje pet acetatnih jedinica da bi se formirala ugljenična osnova jedinjenja (*cyrB-F*). Sledeći korak uključuje stvaranje uracilnog prstena (katalizuju *cyrG* i *H*) i dodatne modifikacije sulfatizacije i hidroksilacije uvode enzimi kodirani od strane *cyrJ* i *cyrL*, respektivno. Smatra se da su dalje modifikacione reakcije, kao što su C-metilacija, sulfotransfer i ciklizacija, potrebne da bi se završila biosinteza cilindrospermopsina, međutim, tačan redosled i detalji ovih reakcija nisu u potpunosti shvaćeni, a takođe je nepoznato kako se tačno formira uracilni prsten. Klaster *cyr* gena takođe uključuje transporter protein, *cyrK*, za koji se smatra da je odgovoran za transport CYN iz ćelije (Mihali i sar., 2008). Nedavno je ceo *cyr* klaster iz *R. raciborskii* AWT205 kloniran u ekspresione vektore za proizvodnju CYN u bakterijskoj vrsti *Escherichia coli* (Cullen i sar., 2022), međutim, iako su geni bili transkribovani, nije zabeležena proizvodnja CYN tokom eksperimenata.

#### 1.4.4. Biosinteza anatoksina

Anatoksini koji su do sada identifikovani se biosintetišu u cijanobakterijama preko metaboličkog puta koji uključuje tri PKS enzima koje kodiraju geni *anaE*, *anaF* i *anaG*. Geni koji kodiraju ove enzime identifikovani su prvi put kod vrste *Oscillatoria* sp. PCC 6506 (Méjean i sar., 2014) i utvrđeno je da se nalaze u klasteru gena (*anaA-H*) koji kodiraju različite enzime uključene u biosintezu ove grupe toksina (Slika 7). Put sinteze počinje aktivacijom i vezivanjem ciklične aminokiseline prolina za acil proteinski nosač (kodiran genom *anaD*), pomoću adenilacionog proteina (*anaC*). Nastali prolil-ACP se zatim oksidiše u 1-pirolin-5-karboksil-ACP pomoću oksidaze (*anaB*). Novonastali imin biva procesuiran od strane prvog PKS enzima (*anaE*), koji dodaje redukovanu jedinicu acetata. U narednim koracima, drugi (*anaF*) i treći (*anaG*) PKS enzim su odgovorni za procese ciklizacije i metilacije nakon kojih se formira prekursor homoanatoksin-a. Ako ne dođe do metilacije, proizvod *anaG* je prekursor za anatoksin-a. Pošto *anaG* nema domen tioesteraze, veruje se da tioesteraza tipa II (*anaA*), vrši hidrolizu kako bi se formirao karboksi-anatoksin-a ili karboksi-homoanatoksin-a, koji će zauzvrat dati odgovarajući toksin spontanom dekarboksilacijom (Méjean i sar., 2014; Botana i Alfonso, 2015; Kust i sar., 2020).

#### 1.4.5. Biosinteza saksitoksina

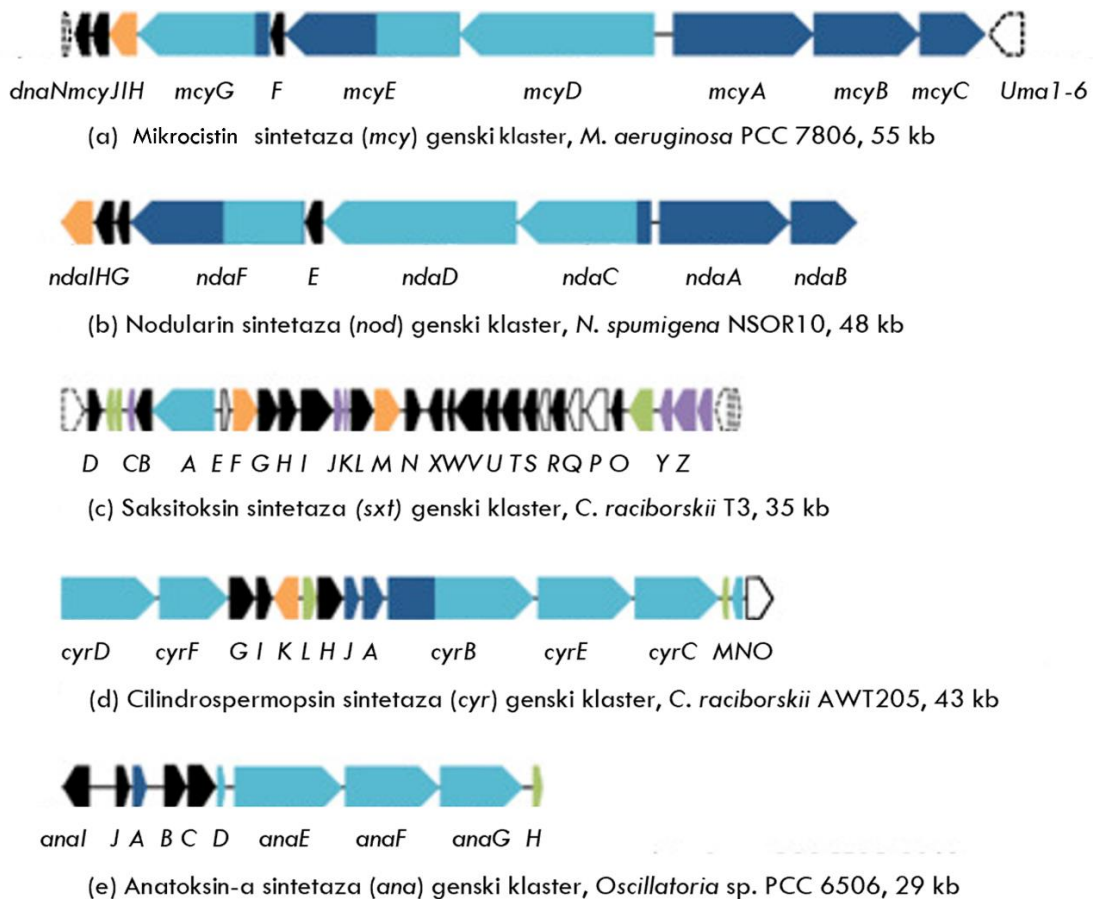
Zabeleženo je više od 50 prirodnih analoga saksitoksina, koji se uglavnom razlikuju u supstituciji bočnih grupa tricikličnog skeleta. Na osnovu mogućih varijacija u ovom regionu, saksitoksini se mogu klasifikovati kao saksitoksin (STX), neosaksitoksin (NEO), gonijautoksin II (GTX II), mešoviti gonijautoksin II plus III (GTX II/III) i dekarbamolsaksitoksin (dcSTX) (Jellet i sar., 1995; Solter i Beasley, 2013). Klaster gena za biosintezu saksitoksina (*sxtA-Z*), je prvi put opisan 1980-ih godina kod vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* T3, nakon čega je pronađen i okarakterisan kod još nekoliko različitih vrsta, uključujući *Raphidiopsis raciborskii*, *Dolichospermum circinale*, *Aphanizomenon* sp., *Raphidiopsis brookii* i *Lyngbya vollei* (Slika 7) (WHO, 2020). Ovaj klaster se sastoji od 26 proteina, koji se nalaze unutar genomskog regiona od 35 kb. Od ovih proteina, 8 (kodirani genima *sxtA*, *sxtB*, *sxtD*, *sxtG*, *sxtS*, *sxtH/T*, *sxtU* i *sxtI*) je direktno uključeno u proizvodnju određenih analoga saksitoksina, kao što su saksitoksin i dekarbamolsaksitoksin (Geffroy i sar., 2021), dok su preostali, kodirani genima kao što su *sxtL*, *sxtN*, *sxtO*, *sxtR*, *sxtKs*, *sxtV*, *sxtX* i *sxtZ*, odgovorni za sintezu drugih analoga, određene modifikacije i transport toksina (Akbar i sar., 2020).

**Tabela 1.** Prikaz najbolje istraženih grupa cijanotoksina, do sada identifikovanih producenata i biosintetičkih gena (modifikovano iz Dittmann i sar. (2013))

Cijanotoksin	Poznate produkujuće vrste/rodovi	Osnovni mehanizam toksičnog dejstva u eukariotskim ćelijama	Najpotentniji kongeneri	Geni uključeni u biosintezi	Pristupni brojevi u genskim bazama	
Mikrocistin	<i>Microcystis</i> sp.	Inhibicija aktivnosti serin-treonin protein fosfataza tipa 1 i tipa 2A (PP1 i PP2A)	Mikrocistin-LR	<i>mcy</i> A-J	<a href="#">AF183408</a> <a href="#">AJ441056</a> <a href="#">AJ536156</a>	
	<i>Anabaena</i> sp.		Hepatotoksičnost;			Mikrocistin-RR
	<i>Anabaenopsis</i> sp.		Mikrocistin-YR			
	<i>Planktothrix</i> sp.		Mikrocistin-LA			
	<i>Nostoc</i> sp.		Mikrocistin-LF			
	<i>Hapalosiphon</i> sp.		Mikrocistin-WR			
Nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>	Inhibicija aktivnosti serin-treonin protein fosfataza tipa 1 i tipa 2A (PP1 i PP2A)	Nodularin-R	<i>nda</i> A-I	<a href="#">AY210783</a>	
			Hepatotoksičnost;			Deoksi-nodularin.
			Nodularin-L			
			Nodularin-RS			
			Nodularin-RR			
Anatoksin	<i>Anabaena circinalis</i>	Oponašanje dejstva acetilholina, i ireverzibilno vezivanje za nikotinske acetilholinske receptore	Neurotoksičnost;	<i>ana</i> A-H	<a href="#">FJ477836</a> <a href="#">JF803645</a>	
	<i>Anabaena lemmermannii</i>		Anatoksin-a			
	<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cylindrospermum</i> sp.		Anatoksin-a (s)			
	<i>Planktothrix</i> sp.		Homoanatoksin-a			

Cijanotoksin	Poznate produkujuće vrste/rodovi	Osnovni mehanizam toksičnog dejstva u eukariotskim ćelijama	Najpotentniji kongeneri	Geni uključeni u biosintezi	Pristupni brojevi u genskim bazama
	<i>Oscillatoria</i> sp.				
Cilindrospermopsin	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Citotoksičnost, hepatotoksičnost, genotoksičnost;	7-deoksicilindrospermopsin	cyr A-O aoa A-C	EU140798 AF395828 FJ418586
	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>		7-epi-cilindrospermopsin,		
	<i>Umezakia natans</i>	Inhibicija sinteze proteina, inhibicija sinteze glutationa, DNK fragmentacija	7-deoksi-desulfo-cilindrospermopsin		
	<i>Raphidopsis</i> sp.		7-deoksi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsin		
	<i>Anabaena</i> sp.				
<i>Lyngbya</i> sp.					
Saksitoksin	<i>Anabaena circinalis</i>	Neurotoksičnost;  Blokiranje voltažno zavisnih natrijumovih kanala	Saksitoksin Neosaksitoksin Dekarbamoilsaksitoksin Gonijatoksin 1	sxt A-Z	DQ787200
	<i>Anabaena lemmermanni</i>				
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>				
	<i>Lyngbya wollei</i>				
	<i>Planktothrix</i> sp.				
<i>Aphanizomenon</i> sp.					





**Slika 7.** Šema strukturne organizacije genskih klastera za biosintezu najčešćih i najbolje proučenih cijanotoksina (modifikovano iz Pearson i sar. (2016))

Rezultati bioinformatičkih analiza genoma cijanobakterijskih sojeva različitog porekla, koji su do sada neistraženi u ovom kontekstu, predstavljaju dragocen resurs kada se radi o unapređenju saznanja o genetičkoj osnovi cijanobakterijske toksičnosti. Ovaj pristup je od izuzetne važnosti za dalja istraživanja, jer omogućava identifikaciju i karakterizaciju ključnih gena i metaboličkih puteva koji su uključeni u produkciju cijanotoksina, čime se omogućava preciznije razumevanje njihovog toksigenog potencijala. Dopuna postojećih baza podataka genomskim podacima novih sojeva cijanobakterija je ključna zbog trenutnog nedostatka sveobuhvatnih informacija, jer bi se na taj način značajno olakšao proces karakterizacije neistraženih sojeva. Ovo je posebno značajno u regionima poput Srbije, gde istraživanja ovog tipa još uvek nisu sprovedena i gde ovakvi pristupi otvaraju put ka obogaćivanju saznanja dostupnih u okviru naučne zajednice i pružaju osnovu za razvoj efikasnijih strategija zaštite životne sredine i javnog zdravlja.

## 1.5. Metode detekcije cijanotoksina i njihovih toksičnih efekata

Pravovremeno utvrđivanje prisustva toksičnih cijanobakterija i njihovih produkata u životnoj sredini je od izuzetnog značaja pre svega za adekvatnu procenu rizika, kako po životnu sredinu, tako i za sve organizme koji dolaze u kontakt sa takvom sredinom. U cilju detekcije i istraživanja cijanobakterijske toksičnosti, razvijene su i prilagođene različite metode. Među njima se javljaju analitičke tehnike sa ulogom u direktnom prepoznavanju toksina u različitim uzorcima kao biohemijski testovi koji se baziraju na specifičnim interakcijama toksina sa antitelima ili enzimima. Sa druge strane, biološki testovi koji koriste žive organizme ili ćelije u kulturi, koriste se u detekciji i kvantifikaciji toksičnih efekata cijanobakterija, dok molekularne metode poput lančane reakcije polimeraze dodatno omogućavaju identifikaciju toksigenog potencijala ciljanjem gena uključenih u proizvodnju toksina. Uprkos brojnim metodama koje su danas dostupne, kako bi se zaštitilo ljudsko zdravlje i izbegla potencijalna opasnost koju predstavljaju cijanobakterijski toksini, javlja se potreba za razvojem novih metoda sa ciljem efikasnije detekcije različitih grupa cijanobakterija i njihovih toksičnih produkata. Važnost odabira metode se ogleda u tome da bi usvojena metoda trebalo da biti pouzdana, precizna i selektivna, kako bi se detektovao toksični organizam ili sam toksin i dobili pouzdani rezultati dovoljno brzo (Zhu i sar., 2014). Metoda bi takođe morala pored same potvrde prisustva toksičnog agensa, obezbediti i informacije o biološkoj aktivnosti toksina. Upravo zbog potrebe za selektivnom i osetljivom detekcijom toksina razvijene su, prvenstveno u proteklih nekoliko decenija, mnoge metode bazirane na direktnoj i indirektnoj detekciji agenasa ovog tipa. Sa jedne strane, moguće je direktno prepoznavanje toksina upotrebom antitela ili merenjima uz pomoć masene spektrometrije (Duracova, 2018). Direktni instrumentalni eseji zavise od dostupnosti sofisticirane opreme, kao što je to u slučaju tačne hromatografije visokih performansi (HPLC) i metoda kombinovanih sa masenom spektrometrijom kakva je MALDI-TOF (matricom potpomognuta laserska jonizacija) (Zhu i sar., 2014). Sa druge strane, pojedine funkcionalne odlike toksina se mogu upotrebiti za njihovu detekciju, jer predstavljaju okidače za veoma specifične reakcije u organizmu životinja ili određenim ćelijama. Pored toga, cijanobakterijske vrste ili geni uključeni u produkciju toksina se mogu detektovati uz pomoć molekularnih metoda. Ovi indirektni eseji mogu obezbediti dragocene informacije, posebno kada je cilj detekcija nepoznatog toksičnog agensa.

### 1.5.1. Imunološki eseji

Imunoeseji su bioanalitičke metode u kojima kvantifikacija analizirane supstance zavisi od interakcije antigena (analita) sa specifičnim antitelom. Suštinski, ove metode se baziraju na reakciji kompetitivnog vezivanja između određene količine označenog analita i varijabilne količine neoznačenog analita u uzorku za ograničen broj veznih mesta na visoko specifičnom antitelu (Oku i sar., 1988). Kada se ovi reagensi pomešaju i inkubiraju, analit se vezuje za antitelo formirajući na taj način imunološki kompleks. Određenim fizičkim ili hemijskim separacionim tehnikama, ovaj kompleks se odvaja od nevezane frakcije reagenasa. Analiza se sprovodi merenjem aktivnosti probe (npr. fluorescencije ili produkta enzimske aktivnosti) (Cox i sar., 2004). Metode koje se baziraju na kompeticiji između slobodnih i označenih antigena za ograničen broj veznih mesta na antitelu se označavaju kao kompetitivne metode. Ovi tipovi eseja se koriste za detekciju toksina malih molekulskih masa, kakav je monociklični heptapeptid mikrocistin (Zhu i sar., 2014). Što se tiče nekompetitivnih eseja, dva osnovna tipa se mogu koristiti za detekciju peptidnih toksina mikroorganizama. Takozvani sendvič enzimski imunoesej se može koristiti samo za detekciju makromolekula, kakvi su proteinski toksini, koji poseduju barem dva

odgovarajuća mesta za vezivanje antigena. U drugom slučaju, čvrsta faza se direktno dovodi u kontakt sa toksinom i količina vezanog toksina se određuje pomoću specifičnih označenih antitela. U oba slučaja, detektovani odgovor u esaju je direktno proporcionalan koncentraciji ciljnog antigena. Većina imunoeseja za konačno očitavanje koristi imunoreagense, međutim, detekcija niskih koncentracija toksina često zahteva amplifikaciju signala i stoga su različite metode kakva je fluorescencija, luminiscencija i masena spektrometrija upotrebljivane za poboljšanje osetljivosti (Zhu i sar., 2014).

Iako su imunoesejske metode primenjivane u detekciji toksina mikroorganizama brojne, enzimski imuno-vezujući test (ELISA test), kao i modifikacije ovog testa, se navode kao neke od najpopularnijih tehnika za ovu primenu. ELISA test koristi osnovni imunološki koncept antigenskog vezivanja za specifično antitelo, što omogućava detekciju veoma malih količina ciljnih proteina, peptida ili antitela u tečnim uzorcima. Testovi ovog tipa koriste enzimima označene antigene i antitela kako bi se izvršila detekcija bioloških molekula. Zahvaljujući hromogenom enzimskom supstratu, obezbeđuje se vidljiva promena boje ili fluorescencija, što ukazuje na prisustvo antigena (Gan i sar., 2012). Količina nastale boje je proporcionalna količini vezanog antitela i samim tim antigena prisutnog u početnoj smeši. Alternativne forme ELISA testa uključuju sendvič i kompetitivni ELISA test koji su prethodno opisani. Zbog svoje osetljivosti ELISA test se predlaže kao efikasna i brza skrining procedura za detekciju različitih cijanotoksina u uzorcima vode (Sivonen i Jones, 1999). Komercijalno dostupni ELISA test kompleti su često korišćeni u cilju detekcije cijanotoksina, budući da ne zahtevaju skupu opremu niti specijalnu obuku za sprovođenje testiranja. Testovi bazirani na ovom principu su adaptirani za detekciju nodularina, cilindropermopsina, saksitoksina i  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA) (Gaget i sar., 2017). Ovakvi testovi mogu biti sprovedeni koristeći sveže sakupljene uzorke, kao i prezervirane uzorke, zbog čega je moguća detekcija i kvantifikacija intracelularnih ali i ekstracelularnih toksina u supernatantu. Kada se radi o mikrocistinima, detekcija se sprovodi na osnovu antitela dizajniranih za prepoznavanje karakteristične  $\beta$  aminokiseline (ADDA), prisutne kod gotovo svih do danas poznatih toksina ove grupe. Osnovna prednost korišćenja ELISA testova je u tome što su se pokazali efikasnim, čak i prilikom detekcije mikrocistina u koncentracijama nižim od onih propisanih od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO) ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Mountfort i sar., 2005; Zhu i sar., 2014). Nedostatak je u tome što se na ovaj način ne obezbeđuju nikakve informacije o tome koji su kongeneri prisutni u mešavini MC toksina.

Pored ELISA testova, dostupni su i biohemijski testovi koji koriste karakteristične efekte povezane sa mehanizmom delovanja specifičnih cijanotoksina, omogućavajući detekciju njihove aktivnosti u uzorcima. Zbog svoje sposobnosti da inhibiraju aktivnost protein fosfataza tipa 1 (PP-1) i 2A (PP-2A), mikrocistini i nodularini se mogu efikasno detektovati korišćenjem biohemijskog testa poznatog kao test inhibicije protein fosfataze (*Protein Phosphate Inhibition Assay - PPIA*). Ova metoda je poznata po svojoj jednostavnosti, brzini, osetljivosti i ponovljivosti, što je čini pouzdanim kolorimetrijskim pristupom u evaluaciji toksičnih efekata mikrocistina i nodularina. Merenje se može postići korišćenjem radio-izotopskih tehnika koje se oslanjaju na radioaktivno obeležene supstrate ili kolorimetrijskim testovima koji koriste supstrate kao što je *p*-nitrofenil fosfat (Sanseverino i sar., 2017). Sa druge strane, za detekciju neurotoksičnih anatoksina se koristi esej inhibicije acetilholinesterazne (AChE) aktivnosti. Kako je inhibicija izazvana ovim toksinima ireverzibilna, reakcija se odvija sve dok sav dostupan toksin ne reaguje sa enzimom (Devic i sar., 2002). Najznačajnija negativna strana ovog testa je vezana za njegovu

selektivnost, jer mnogi toksini kao što su organofosfati i karbamati, koji se koriste kao insekticidi, takođe mogu da inhibiraju aktivnost enzima AChE (Devic i sar., 2002; Miglione i sar., 2021).

### 1.5.2. Biotestovi

Osnovna uloga modela biotesta leži u razumevanju fenomena koji su previše složeni ili apstraktni da bi bili izmereni direktnim pristupom. U istraživanju životne sredine to bi moglo uključivati sagledavanje zakonitosti koje vladaju u određenom ekosistemu ili predviđanje ponašanja ili interakcije određenih elemenata tih sistema. U takvim slučajevima, često je korisno posmatrati specifične žive organizme koji reaguju čak i na suptilne promene u svom okruženju. Iako su izuzetno korisni, modeli predstavljaju samo bliske aproksimacije i nikada nisu tačne replike fenomena koji opisuju, a njihova preciznost u velikoj meri zavisi od trenutnog stanja naučnih saznanja u datoj oblasti (Frigg i Hartmann, 2020). Iz ovih razloga, kao rezultat naučnog napretka i otkrića, konstantno se pojavljuju noviji i unapređeniji modeli. Testovi koji implementiraju takve žive sisteme nazivaju se bioeseji. U toksikologiji, bioeseji su specifični testovi koji se sastoje od kvalitativnih i kvantitativnih merenja toksičnih efekata koji su izazvani u model organizmima nakon određenog perioda izlaganja toksičnom agensu. Oni pružaju brzu i relativno jednostavnu metodu za skrining uzoraka zasnovanu na biološkom odgovoru na toksične efekte. Uočene promene i akumulirani podaci se obično koriste za procenu uticaja supstance na životnu sredinu ili za predikciju fiziološkog odgovora kod ljudi (Gallagher, 2002; Hassan i sar., 2016). Takođe postoje mnoge potencijalne krajnje tačke koje se mogu pratiti, od promena na molekularnom nivou, ćelijskih promena, promena specifičnih fizioloških parametara, pa do promena u pokretljivosti i ponašanju organizma. Potencijalni odgovori na čijoj se detekciji baziraju različiti bioeseji su takođe raznovrsni i uključuju mortalitet, pokretljivost i ponašanje, rast i reprodukciju kao i fiziološke i biohemijske parametre kakvi su fotosinteza, sinteza proteina i promene u genskoj ekspresiji u organizmu (Erzinger, 2018). Postoji međutim, nekoliko ograničenja bioeseja. Prvo, realne koncentracije toksikanta na specifičnom mestu dejstva se mogu značajno razlikovati od onih prvobitno primenjenih u testu, prvenstveno zbog faktora koji utiču na apsorpciju i transport toksina do ciljnog mesta delovanja. Kao drugo, u organizmu dolazi do metaboličke transformacije toksina, što može uticati na njihovu koncentraciju bilo inaktivacijom toksičnih metabolita ili aktivacijom toksina prisutnih u neaktivnoj formi (Srivastava, 2002).

Većina studija koje se bave efektima cijanotoksina se sprovode posmatranjem promena koje nastaju u živom organizmu nakon izlaganja toksinima u nekom obliku, obično prečišćenom pojedinačnom toksinu, iako se sirovi ekstrakti i biomasa nastala tokom cvetanja takođe često analiziraju (Freitas i sar., 2014). U velikom broju zemalja tokom 1980-ih, studije o pojavi, distribuciji i učestalosti toksičnih cijanobakterija sprovedene su koristeći biotest sa miševima koji je bio prvi metod razvijen za detekciju cijanotoksina u vodi, iako je suštinski dizajniran za procenu njihovih efekata u živim sistemima (Mahmood i Carmichael, 1986; Codd i Poon, 1988). U ovom eseju, uzorci su ubrizgavani u eksperimentalne životinje intraperitonealno, nakon čega je praćen nastanak odgovora (nastanak simptoma) u toku narednih 72 h. Ovaj test, koji je do nedavno bio deo rutinske procedure za praćenje cijanotoksina, ima nekoliko značajnih nedostataka. Među najvažnijim su pitanja troškova i održavanja, testu takođe nedostaje osetljivost i specifičnost, posebno u otkrivanju cijanotoksina u niskim koncentracijama (Nicholson i Burch, 2001) i takođe često nailazi na oštre kritike iz etičkih razloga. Stoga su uloženi značajni naponi da se otkriju i primene nove metode koje bi predstavljale alternativu testu sa miševima.

Neke analitičke tehnike pogodne za kvantitativno određivanje toksina postale su dostupne tek kasnih 1980-ih, ali upravo tada dolazi do porasta u broju istraživanja vezanih za specifične cijanotoksine (Sivonen i Jones, 1999). U dostupnoj literaturi, kao neke od postojećih alternativa esejima sa sisarima, za otkrivanje toksičnosti cijanobakterija navode se procedure testiranja koje uključuju određene vrste beskičmenjaka, kao što su test sa artemijama (*Artemia salina* – brine shrimp) i biološki testovi sa račićima kao što su dafnije (najčešće *Daphnia* sp. i *Ceriodaphnia* sp.) ili *Thamnocephalus platyurus* i testovi sa insekatskim vrstama poput pripadnika roda *Chironomus* (Lee i sar., 1999; McElhiney i sar., 2005; Ibelings i sar., 2015). Među kičmenjačkim model organizmima, najbolji rezultati kada se radi o detekciji i karakterizaciji cijanobakterijske toksičnosti su postignuti koristeći testove sa zebričama (*Danio rerio*) i japanskom medaka ribom (*Oryzias latipes*) i njihovim embrionima. Pored toga, *in vitro* testovi koji koriste humane ćelije u kulturi su razvijeni kao alternativa tradicionalnim biološkim testovima sa čitavim organizmima, čime je omogućeno proučavanje efekata cijanotoksina na specifična ciljna tkiva ili organe u kontrolisanom okruženju.

#### 1.5.2.1. *Artemia salina* bioesej

Bioesej sa artemijama je prvi put opisan od strane Michael i sar. (1956), nakon čega su dodatne modifikacije uveli Meyer i sar. (1982) i Solis i sar. (1993). Test sa vrstom *A. salina* je standardizovan i komercijalno dostupan (Arttoxkit, 1995). Radi se o brzom i jeftinom testu, bez potrebe za prethodnim održavanjem kulture, jer su *A. salina* ciste (jaja) komercijalno dostupne u liofiliziranoj formi i mogu se stoga čuvati tokom nekoliko godina na temperaturi od -20°C. Iz jaja čuvanih na ovaj način, larve se mogu izleći i primeniti u eksperimentima u roku od 24h, bez potrebe za specijalnom opremom. Uniformnost eksperimentalnih grupa se može postići upotrebom jedinki koje su u istoj fazi razvika i odgovarajućeg geografskog porekla, što su faktori koji mogu značajno uticati na rast, reprodukciju i preživljavanje ispitivanih jedinki. Integracija NAM (new approaching methods) u eksperimentalnu proceduru (Solis i sar., 1993) je omogućila istovremenu analizu velikog broja uzoraka i različitih koncentracija ispitivanog agensa na jednoj ploči. Ova platforma je omogućila da bioesej sa artemijama postane alternativa testovima citotoksičnosti na ćelijama, posebno pogodnu za laboratorije koje nemaju uslove za održavanje ćelijskih linija. Zbog navedenih karakteristika, ovaj test je do sada prvenstveno korišćen kao brza procedura za ispitivanje toksičnih metabolita u velikom broju uzoraka (Jaki i sar., 1999; Piccardi i sar., 2000). Biotest sa artemijama je uspešno primenjivan u testiranju aktivnosti različitih cijanotoksina (Bláha i sar., 2017). Poređenje uspešnosti *Artemia* eseja i bioeseja sa miševima u ispitivanju toksičnosti cijanobakterijskih metabolita je pokazalo visok stepen sličnosti i dobru korelaciju između dobijenih rezultata, čime se potvrđuje upotrebna vrednost ovog testa u istraživanju cijanobakterijske toksičnosti (Vezie i sar., 1996; Lee i sar., 1999). Kao primer se mogu navesti rezultati rada Vezie i sar. (1996), gde je upoređena efikasnost različitih testova kada se radi o utvrđivanju toksičnosti neokarakterisanih cijanobakterijskih uzoraka. Cijanobakterijski sojevi koji nisu izazvali toksične efekte kod izloženih miševa (NIH Swiss outbred mice) izazvali su nisku stopu mortaliteta kod artemija (uglavnom ispod 13%). Od 15 sojeva hepatotoksičnih za miševе, 13 je bilo veoma toksično za artemije (mortalitet iznad 90%). Stopa mortaliteta kod artemija je takođe bila u korelaciji sa koncentracijom hepatotoksina u ekstraktima ispitanih sojeva. Jedan od prepoznatih nedostataka testa sa artemijama, međutim, jeste smanjena rastvorljivost i biodostupnost nekih supstanci u slanom medijumu neophodnom za normalno funkcionisanje artemija. Iako se može ispitivati niz krajnjih tačaka toksičnog delovanja, uključujući subletalne efekte kao što su stopa izleganja i

stopa rasta neonata i promene u ponašanju larvi (šablonu kretanja) (Libralato i sar., 2016), u testiranju toksičnosti cijanobakterija, najveći broj istraživanja je podrazumevao utvrđivanje stope mortaliteta kao krajnju tačku.

#### 1.5.2.2. *Daphnia* bioeseji

Vrste roda *Daphnia* (Müller) su značajni indikatori promena u različitim tipovima akvatičnih ekosistema, gde se često javljaju kao primarni konzumenti algi, bakterija i protozoa (Tessier i sar., 2000). Pored toga, dafnije često predstavljaju dominantnu formu zooplanktona u različitim akvatičnim staništima, od oligotrofnih do eutrofnih, gde čine kvalitetnu i visoko kaloričnu hranu za veliki broj akvatičnih predatora, zbog čega su esencijalna komponenta lancaca ishrane hidroekosistema. Njihova primena u toksikološkim ispitivanjima datira od početka dvadesetog veka, usvajanjem propisa o akutnim (OECD, 2004) i hroničnim (OECD, 2012) testovima toksičnosti. Od tada su testovi sa dafnijama u širokoj primeni kada se radi o monitoringu sredinskih polutanata u akvatičnim ekosistemima. Iako je imobilizacija (izostanak kretanja kod jedinki) najčešće korišćen parameter toksičnosti u esejima sa ovim vrstama, definisani su i subletalni parametri, što omogućava detekciju i praćenje toksinima izazvanih promena u ranijim fazama intoksikacije (Bownik, 2020). Među osnovnim karakteristikama, koje doprinose vrednosti ovog modela u toksikološkim ispitivanjima, nalazi se sposobnost klonalne reprodukcije (Hebert i Ward, 1972). Zahvaljujući ovoj osobini, moguće je postići i održavati genetičku uniformnost populacija i obezbediti stabilnu i konstantnu genetičku osnovu sa kojom se rezultati mogu porediti. Kako su u potpunosti sekvencirani genomi sojeva vrsta *Daphnia pulex* i *Daphnia magna* (Colbourne i sar., 2005; Lee i sar., 2019), omogućen je uvid u molekularne mehanizme koji leže u osnovi toksičnih odgovora ovih organizama. Fiziološke promene koje nastaju pod uticajem cijanotoksina koje se tiču preživljavanja, rasta i stope ishrane kod dafnija su dobro istražene (DeMott i sar., 1991; Rohrlack i sar., 1999; Ferrão-filho i sar., 2008; Herrera i sar., 2015). Za razliku od ovih efekata, promene na molekularnom i genetičkom nivou do danas nisu dovoljno ispitane. Mali broj podataka je dostupan o uticaju cijanobakterija na ekspresiju gena kod *Daphnia magna* pri čemu je pokazan efekat na gene koji kodiraju enzime uključene u procese glikolize i regulacije stresa (Schwarzenberger i sar., 2009) kao i na aktivnost enzima glutathion-S transferaze (GST), značajnog za proces detoksifikacije kod jedinki nakon izlaganja (Nogueira i sar., 2004).

#### 1.5.2.3. *Thamnocephalus platyurus* bioesej

Bioesej koji koristi larve slatkovodnih rakova vrste *Thamnocephalus platyurus* (Fairy shrimp - vilinski škampi) je uspešno korišćen u skriningu cijanobakterijske toksičnosti, posebno kada se radi o mikrocistinima i cilindrospermopsinima (Kozma Törökné i sar., 2000). Radi se o brzom i standardizovanom biološkom testu koji se primenjuje u analizi različitih hemijskih agenasa, uzoraka površinskih i podzemnih voda, otpadnih voda, kao i cijanobakterijskih ekstrakata i prečišćenih cijanotoksina. Razvijen je komercijalni komplet pod nazivom Thamnotoxkit F, koji obezbeđuje sve neophodne materijale za sprovođenje šest 24-časovnih testova mortaliteta u mikrotitar pločama, koristeći larve ovog organizma. U definisanim ISO protokolima (ISO 14380, 2011) opisana je procedura za određivanje letalnih efekata različitih toksikanata na model organizmu vrste *Thamnocephalus platyurus*, kao i brzi test za ispitivanje subletalnih efekata nakon jednog sata izlaganja. Opisani su takođe 60-minutni test inhibicije ishrane i 24-časovni test mortaliteta, koji se izvode prema standardnim operativnim procedurama Rapidtoxkit i Thamnotoxkit F kompleta, redom. Iako je utvrđena statistički značajna korelacija između nivoa

hepatotoksičnih i neurotoksičnih cijanotoksina u uzorcima i stope mortaliteta u testovima sa ovom vrstom, odgovor jedinki *T. platyurus* se smatra nespecifičnim jer su izuzetno osjetljive na različite metabolite prisutne u ekstraktima cijanobakterija i zabeleženi su letalni efekti čak i u ekstraktima koji nisu sadržali poznate grupe cijanotoksina (Tarczynska i sar., 2000; Torokne, 2000; Maršalek B., 2004). Iz tog razloga su testovi ove grupe od značaja kada se radi o ispitivanju toksičnosti prečišćenih cijanotoksina ali ne i cijanobakterijskih ekstrakata ili uzoraka cvetanja cijanobakterija.

#### 1.5.2.4. *Chironomus* bioeseji

Vrsta *Chironomus riparius* se koristi u testovima toksičnosti dizajniranim sa ciljem procene efekata zagađujućih i toksičnih supstanci koje su potencijalno štetne za organizme bentosa. Poznato je da toksični sekundarni metaboliti koji se oslobađaju tokom cvetanja cijanobakterija u vodenim ekosistemima mogu uticati na beskičmenjake koji nastanjuju bentos (Shahmohammadloo i sar., 2020a) jer se nakon cvetanja ćelije cijanobakterija talože na dnu basena i kontaminiraju ove zajednice. Ova insekatska vrsta je osjetljiva na promene u kvalitetu vode i koristi se kao model organizam za procenu toksičnosti uzoraka vode, praćenje kvaliteta vode i zdravlja ekosistema. Postupci ispitivanja toksičnosti su adaptirani u cilju procene efekata akutnog (OECD No. 235, 2011) i hroničnog (OECD No. 218, 2004b; OECD No. 233, 2010) izlaganja hironomida različitim toksičnim agensima. U osnovi, ove metode predstavljaju modifikacije prethodno opisanih testova akutne imobilizacije na *Daphnia* sp.. U testovima sa hironomidama se koriste larve inicijalne faze razvoja *C. riparius* (najčešće) ili *C. dilutus* i *C. ioshimatsui*, koje su nasumično odabrane iz kultivisane populacije. Larve se izlažu određenom opsegu koncentracija ispitivane supstance tokom 48h ukoliko je cilj merenje akutne toksičnosti i 44 dana kada se radi o hroničnom testu. Među krajnjim tačkama toksičnog delovanja koje se mogu meriti kada se radi o hroničnom izlaganju navodi se ukupan broj jedinki koje dosegnu adultni stadijum, stopa razvoja i fekunditet, dok se kao osnovna krajnja tačka u akutnim testovima beleži imobilizacija (mortalitet) prema OECD standardima. Za razliku od zooplanktonskih organizama koji se hrane filtracijom vode, larve bentosnih beskičmenjaka poseduju snažne mandibule koje se koriste za grizeње i razlaganje hrane. Ovaj mehanizam ishrane može potencijalno povećati njihovu izloženost intracelularnim toksinima iz cijanobakterija, što je jedan od razloga zašto su istraživanja koja se tiču cijanotoksičnosti sa ovim modelom uglavnom usmerena na izloženost putem ishrane (Stanković i sar., 2020; Stanković i sar., 2022). Iako istraživanja sa ciljem ispitivanja cijanobakterijske toksičnosti sa ovim modelom nisu brojna, *Chironomus* bioeseji su se pokazali kao korisni u proceni uticaja cijanotoksina na beskičmenjačke organizme koji nastanjuju bentos.

#### 1.5.2.5. *Danio rerio* bioesej

Zebrice (*Danio rerio*) predstavljaju dobro poznat i ustanovljen model organizam u toksikološkim ispitivanjima, od onih koja se tiču efekata na molekularnom nivou, do testova u okviru kojih se prate promene na čitavom organizmu ili u njegovom ponašanju. Među mnogim prodobnostima ovog modela navodi se jeftino održavanje, male dimenzije jedinki što olakšava manipulaciju, lako gajenje i razmnožavanje ovih organizama i visok fekunditet. Jedna od bitnih karakteristika ovog model sistema, ogleda se u *ex utero* razvoju embriona, što značajno pojednostavljuje manipulaciju i izlaganje toksičnim supstancama (Langheinrich, 2003). Međutim, najveća prednost modela embriona zebrice u odnosu na ostale beskičmenjačke i kičmenjačke medele, ogleda se u skoro potpunoj optičkoj transparentnosti embriona, što, uz činjenicu da se embriogeneza odvija

relativno brzo i *ex utero*, omogućava vizualizaciju promena u morfološkim strukturama unutrašnjih organa uz pomoć svetlosne mikroskopije. Drugi značajan razlog za široku upotrebu i prihvaćenost embriona zebrića kao validne alternative eksperimentima sa sisarskim modelima jeste činjenica da embrioni zebriće starosti do 120 časova nakon fertilizacije ne potpadaju pod Regulativu Evropskog parlamenta (2010/63/EU) o dobrobiti životinja. Međutim, larvalni stadijumi nakon petog dana se hrane nezavisno i stoga su zaštićeni. Pored navedenih karakteristika, genom vrste *Danio rerio* je u potpunosti sekvenciran, pri čemu je utvrđen visok nivo homologije genoma zebriće sa humanim genomom (približno 74%) (Howe i sar., 2013). Zahvaljujući visokom stepenu molekularno-genetičke i fiziološke sličnosti između zebrića i sisara, uključujući čoveka je omogućeno bolje razumevanje mehanizama koji leže u osnovi zabeleženih toksikoloških promena. Prepoznavanje ovih karakteristika je usmerilo veliki broj istraživanja efekata izlaganja zebrića toksičnim metabolitima cijanobakterija na rane faze u razvoju ovih organizama. Razvoj embriona je strogo regulisan i pažljivo koordinisan proces koji zahteva niz specifičnih, vremenski osetljivih interakcija među ćelijama (Bonneau i sar., 2011). Iz tog razloga, deformiteti kod embriona i larvi vrste *Danio rerio*, nastali kao posledica izlaganja toksičnim supstancama, mogu imati značajne i dugoročne efekte na njihov razvoj i preživljavanje. Tip i intenzitet ovih efekata u velikoj meri zavise od vrste i koncentracije toksičnog agensa (Rücker i sar., 2007). U tom smislu, poseban problem mogu predstavljati toksini čiji targeti uključuju strukture DNK ili specifične segmente procesa ćelijske deobe i puteva diferencijacije. Ovo je od posebnog značaja u vodenim sredinama, gde je rizik od hronične izloženosti životinja u ranim fazama ontogeneze potencijalno najveći. Uprkos velikom značaju zebriće kao animalnog model sistema u ispitivanju toksičnosti, primetan je nedostatak podataka o toksičnim efektima cijanobakterija na molekularnom nivou i njihovom uticaju na ekspresiju gena ovih organizama. Ova vrsta istraživanja može omogućiti bolje razumevanje složenih interakcija između cijanobakterija i kičmenjačkih organizama na genetičkom i molekularnom nivou.

#### 1.5.2.6. *Oryzias latipes* bioesej

Medaka (*Oryzias latipes*) su slatkovodne ribe malih dimenzija koje pokazuju veliku sličnost sa zebrićama, uključujući mnoge karakteristike koje se smatraju vrednim u testovima toksičnosti. Kao i zebriće, embrioni medaka ribica su providni tokom ranih faza u razvoju, što ih čini idealnim za proučavanje uticaja toksičnih supstanci na razvoj i funkciju organa (Shima i Shimada, 1994). Medaka takođe imaju kratak životni ciklus, pri čemu se njihova jaja mogu izleći u roku od nedelju dana, a njihov potpuni razvoj traje samo oko dva meseca, što omogućava brže testiranje i procenu toksičnih razvojnih efekata (Kasahara i sar., 2007; Le Manach i sar., 2018). Dodatna podobnost u upotrebi medaka ribica kada se radi o ispitivanju toksičnosti leži u jednostavnosti i niskoj ceni održavanja u poređenju sa drugim modelima kičmenjaka, jer ne zahtevaju veliki prostor, što ih čini atraktivnom opcijom za istraživače koji rade u ograničenim laboratorijskim prostorima (Shima i Shimada, 1994). Pored toga, genom ovog organizma je u potpunosti sekvenciran 2007. godine, čime je omogućeno ispitivanje mehanizama toksičnosti na molekularnom nivou (Kasahara i sar., 2007). Istraživanja vezana za ispitivanje toksičnosti cijanobakterija sa ovim modelom su prvenstveno fokusirana na histopatološke promene koje su rezultat akutnog i hroničnog izlaganja, kao i na molekularne i reproduktivne efekte koji čine osnovu ovih promena (Djediat i sar., 2011; Trinchet i sar., 2011; Le Manach i sar., 2018).



### 1.5.3. Molekularne metode

Došlo je do značajnog napretka u oblasti toksikologije u poslednjih 50 godina, delimično zahvaljujući razvoju i unapređivanju molekularnih tehnika i sve većem razumevanju uticaja toksičnih jedinjenja na osnovne ćelijske i molekularne procese. Molekularne metode u ovoj oblasti se najčešće baziraju na detekciji producenata toksina u ispitivanom uzorku na osnovu prisustva gena koji kodiraju toksine od interesa. Takođe, danas se do značajnih informacija o potencijalnoj toksičnosti ispitivane supstance može doći pre detekcije fiziološkog odgovora, ispitivanjem transkripcionih (iRNK) i translacionih produkata ekspresije gena izloženog organizma (Singh i sar., 2018). U idealnom slučaju, ove promene u ekspresiji gena, koje su potencijalno povezane sa primarnim efektima ispitivane supstance, mogu biti identifikovane pre nego što se pojave bilo kakve fenotipske promene. Identifikovanje ovih promena i njihovo povezivanje sa štetnim efektima je ključno za pronalaženje karakterističnih biomarkera i za generisanje hipoteza o mehanizmima delovanja toksina.

#### 1.5.3.1. PCR metode

Metode bazirane na lančanoj reakciji polimerizacije (PCR), su neke od najčešće korišćenih metoda za detekciju toksina u različitim uzorcima i ispitivanje njihovih efekata. PCR tehnike se mogu opisati kao brze *in vitro* procedure za enzimsku amplifikaciju specifičnih DNK sekvenci (u čistim uzorcima ili kompleksnim smešama) koristeći dva oligonukleotidna prajmera koji hibridizuju sa naspramnim lancima DNK i okružuju sekvencu od interesa. Specifičnost tradicionalne PCR metode obezbeđuju upravo oligonukleotidni prajmeri koji započinju cikluse uzastopnih replikacija *in vitro*. Nakon svakog ciklusa, udvostručuje se količina DNK sekvence od interesa, odnosno dolazi do eksponencijalnog porasta u količini ciljne sekvence. U klasičnoj PCR proceduri, vizuelizacija i analiza proizvoda amplifikacije se postiže upotrebom agarozne gel-elektroforeze, međutim, daljim razvojem metode, potreba za ovim korakom je prevaziđena. Kvantitativna lančana polimerazna reakcija ili qPCR je metoda koja ima značajno niži prag detekcije u odnosu na klasičnu PCR metodu i zahvaljujući upotrebi specifičnih proba za obeležavanje nastalog produkta omogućava praćenje toka reakcije i olakšava proces kvantifikacije dobijenog proizvoda. Zapravo, mogućnost praćenja amplifikacije proizvoda u toku reakcije je osnovna prednost u odnosu na klasičnu PCR detekciju, jer nije neophodna naknadna potvrda nastanka amplifikata pomoću agaroznog gela (Babalola, 2014). Kao što je slučaj sa qPCR, primenom RT-qPCR (*real-time quantitative PCR*) metode, može se istovremeno detektovati i meriti brojnost amplifikovane DNK. Međutim, RT-qPCR kao početni materijal u reakciji koristi RNK, koja se reverzno transkribuje u komplementarnu DNK (cDNK) koristeći reverznu transkriptazu i specifične prajmere (Bustin, 2000). cDNK se potom koristi kao matrica za klasičnu PCR reakciju. RT-qPCR se može izvesti u jednom koraku, u okviru jedne reakcije, ili u 2 uzastopna koraka. Protokoli koji uključuju jedan korak se smatraju adekvatnijim zbog smanjenog rizika od kontaminacije (Wong i Medrano, 2005). Osnovna prednost upotrebe PCR metode za detekciju toksigenih organizama je u tome što se detekcija može uspešno izvršiti na osnovu jedne ćelije u roku od sat vremena i manje, nasuprot konvencionalnim metodama koje zahtevaju dane ili čak nedelje. Međutim, osnovni nedostatak je u tome što DNK sekvenca koja se detektuje mora biti prethodno poznata i takođe, što DNK sekvenca na kojoj se bazira dijagnostički test mora biti jedinstvena za dati mikroorganizam, kako bi se izbegla interferencija i dobijanje lažno pozitivnih rezultata. Iako metoda ukazuje samo na potencijalan rizik od sinteze toksina i ne obezbeđuje informacije o realnim koncentracijama toksina u uzorku, *real-time PCR*

je često primenjivan u cilju monitoringa producenata toksina među cijanobakterijama u akvatičnom okruženju (Kurmayer i sar., 2009; Ostermaier i Kurmayer, 2010).

#### 1.5.3.2. Značaj -omics tehnologija u analizi cijanobakterijske toksičnosti

Jedan od značajnijih koraka u razvoju ove oblasti bila je upotreba “-omics” tehnika koje su omogućile sveobuhvatno sagledavanje cijanobakterijske toksičnosti i otkrivanje kompleksnih molekularnih mehanizama koji stoje iza njihovih toksičnih efekata. Trenutno, -omics pristupi koji se najčešće koriste u toksikološkim istraživanjima uključuju genomiku, transkriptomiku, proteomiku i metabolomiku (Ma i sar., 2021). Metode genomike i komparativne genomike tiču se primene različitih bioinformatičkih alata za analizu čitavih genoma organizama pri čemu se mogu identifikovati geni povezani sa proizvodnjom toksina i odgovorom na stres. Smanjenje troškova sekvenciranja učinilo je dostupnijim čak i manjim istraživačkim grupama da proučavaju genome organizama iz svojih kolekcija, što je doprinelo tome da je danas postao dostupan određeni broj okarakterisanih cijanobakterijskih genoma u različitim bazama (Alvarenga i sar., 2017). Ovaj tip podataka je posebno oskudan kada je reč o cijanobakterijskim sojevima izolovanim u Srbiji, gde do sada nije realizovano sekvenciranje genoma autohtonih sojeva cijanobakterija. Ove genomske informacije su ključne jer, osim što omogućavaju identifikaciju gena odgovornih za proizvodnju toksina, pružaju i uvid u adaptacione mehanizme cijanobakterija, posebno njihov odgovor na promenljive uslove okoline i faktore stresa (Cassier-Chauvat i sar., 2021). Pomak u ovom polju je takođe omogućio detaljno pretraživanje genoma (“genome mining”), odnosno eksploataciju genomske informacije za otkrivanje biosintetskih puteva različitih metabolita, pa i toksina među njima, kao i njihovih mogućih interakcija (Micallef i sar., 2015). Genomski podaci dobijeni sekvenciranjem celog genoma pružaju osnovu i bazu podataka za dalje istraživanje toksičnih cijanobakterija i primenu drugih -omics metoda, kao što su transkriptomika, proteomika i metabolomika.

Metode transkriptomike se zaničaju na istovremenoj detekciji i analizi svih transkripata ili iRNK eksprimiranih u biološkom sistemu u datom trenutku. Primenom tehnika transkriptomike stiže se uvid u aktivnost gena i nivo ekspresije čitavog skupa gena. Na ovaj način je omogućeno istraživanje transkripcionih odgovora izloženih organizama na toksične stimule i interpretacija ovih podataka kako bi se dobile informacije o molekularnim mehanizmima delovanja toksičnih supstanci i nastalim efektima (Williams i sar., 2014). Proteomske analize uključuju karakterizaciju svih proteina u biološkom sistemu, njihove strukture i fiziološke uloge ili funkcije. Kako direktno zavise od podataka dobijenih upotrebom metoda genomike i transkriptomike, predstavljaju logičan sledeći korak u istraživanju. Iako se o ekspresiji proteina može u izvesnoj meri zaključiti proučavanjem ekspresije iRNK, nivoi ekspresije iRNK ne koreliraju uvek sa nivoima ekspresije proteina (D’agostino i sar., 2015). Značaj proteomike je stoga u validaciji i korekciji predviđenih gena, ispitivanju post-translacionih mehanizama kao i otkrivanju novih proteina kodiranih genima koji su propušteni prilikom anotacije genoma (D’agostino i sar., 2015; Battchikova i sar., 2018). Kako ćelije reaguju na unutrašnje i spoljašnje promene regulacijom nivoa i aktivnosti proteina, proteomske analize mogu obezbediti informacije o strategijama prilagođavanja cijanobakterija na stres u životnoj sredini, kao i uticaju različitih procesa na proizvodnju peptidnih cijanotoksina. Na sličan način, metabolomika dopunjuje genomiku, transkriptomiku i proteomiku, identifikujući kompletan set proizvedenih metabolita i pomažući u identifikaciji specifičnih toksina i razumevanju aktiviranih metaboličkih puteva (Hennon i Dyhrman, 2020). U poređenju sa proteomikom i transkriptomikom, metabolomske analize predstavljaju nivo koji je najbliže povezan sa fiziologijom ispitivanog organizma, organa ili ćelije. Integracijom ovih

pristupa (multi-omics strategija) dobija se moćan alat u istraživanju kompleksnih interakcija između cijanobakterija i njihovog okruženja. Ovaj holistički pristup omogućava dublje istraživanje i sagledavanje uticaja cijanotoksina na različite organizme, otkrivajući potencijalne efekte na zdravlje ljudi i životne sredine.

## **1.6. Problemi u utvrđivanju cijanotoksičnosti, potencijalni pravci i potreba za istraživanjem**

Kako se uticaj poznatih i novootkrivenih toksina cijanobakterija sve više povezuje sa zdravljem ljudi i životinja, naglašava se i neophodnost pronalaska odgovora na pitanja povezana sa stopom produkcije ovih toksina, njihovim mehanizmom delovanja u živim sistemima i rešenjem problema toksičnog cvetanja u akvatičnim ekosistemima. Sama toksičnost se može definisati kao suma štetnih efekata koje supstanca izaziva u živim organizmima, uslovljena njegovim hemijskim i strukturnim karakteristikama (He i sar., 2016). Stoga je zadatak utvrđivanja osnovnih mehanizama interakcije toksičnih agenasa sa elementima živih sistema i svih rezultujućih štetnih efekata izuzetno kompleksan. Iako indirektno metode detekcije, kakve su ELISA i RT-PCR, dobijaju sve više pažnje zbog svoje efikasnosti i brzine, relativne jednostavnosti procedura i niskih cena, pojedinačnom upotrebom ovih testova dobijaju se nepotpune informacije o toksičnim karakteristikama ispitivanih cijanobakterijskih sojeva. ELISA test je u nekim slučajevima podložan interferenciji, ne-specifičnom vezivanju i unakrsnoj reaktivnosti, dok se PCR tehnike koriste u cilju utvrđivanja potencijala za produkciju toksina na osnovu prisustva odgovarajućih gena i ne obezbeđuju informacije o realnim koncentracijama toksina prisutnih u uzorku. Pored toga, navedene metode ne pružaju informacije o posledicama izlaganja toksinu, efektivnim koncentracijama neophodnim za ispoljavanje aktivnosti na datom nivou biološke organizacije i ciljnom mestu dejstva toksina. Najdetaljnija slika o dejstvu toksičnih cijanobakterija na živi svet i ekosistem u celosti se stoga može dobiti upotrebom navedenih tehnika detekcije u kombinaciji sa biotestovima sa relevantnim model organizmima. *In vivo* testovi su smatrani najznačajnijim kada je cilj predviđanje uticaja toksina na zdravlje čoveka, jer omogućavaju praćenje promena nastalih tokom apsorpcije, distribucije i metabolizma, do finalne transformacije ili ekskrecije supstance, što je značajno, jer je modulacija toksičnosti uzorka moguća tokom svake od ovih faza (Bingham, 2012). Kako živi organizmi poseduju efikasne sisteme zaštite i detoksifikacije koji im omogućavaju da se u određenoj meri prilagode na promene nastale usled delovanja toksične supstance, fiziološke promene merljive ovim metodama se javljaju tek pri intenzitetu toksičnosti koji prevazilazi kapacitete ovih odbrambenih mehanizama. Zbog toga su često u upotrebi *in vitro* testovi kojima je moguće detektovati promene koje nastaju pri znatno manjim koncentracijama toksina (Escher i Leusch, 2012). Takođe se kao veoma važna nameću istraživanja koja se odnose na utvrđivanje efekata bioaktivnih metabolita cijanobakterija na nivou ekspresije gena model organizma među akvatičnim beskičmenjacima (zooplankton) i kičmenjacima. Ova vrsta istraživanja je i dalje relativno slabo zastupljena u dostupnoj literaturi, iako predstavlja jedan od ključnih aspekata proučavanja i razumevanja cijanotoksičnosti. Širok spektar ćelijskih linija, humanog i animalnog porekla, se danas koristi za procenu uticaja kako čistih cijanotoksina, tako i potencijalno toksičnih ekstrakata cijanobakterija. *In vitro* testovi ovog tipa predstavljaju etički opravdanu alternativu onima koji se baziraju na upotrebi kičmenjačkih modela, zbog čega pronalaze sve češću primenu u proceni citotoksičnih (Froscio i sar. 2009), neurotoksičnih (Feurstein i sar. 2011) i genotoksičnih efekata cijanobakterijskih toksina (Štraser i sar. 2011; Hercog i sar. 2017). Laboratorijski biotestovi omogućavaju preciznu identifikaciju i

karakterizaciju cijanotoksina koji nastaju tokom cvetanja algi. Razumevanje povezanosti hemijske strukture, intenziteta toksičnosti i varijacija u proizvodnji toksina je fundamentalno za procenu potencijalnih rizika po zdravlje ljudi i životne sredine. Takođe, identifikacija sredinskih faktora koji utiču na toksičnost cijanobakterija i dovode do njihove dominacije u akvatičnim ekosistemima, jedan je od najznačajnijih koraka u pravcu formiranja adekvatne strategije pravovremene prevencije i zaštite od toksičnog cijanobakterijskog cvetanja. Kompleksnost interakcija fizičkih, hemijskih i bioloških procesa prisutnih u svim ekosistemima, čini identifikaciju primarnih faktora koji utiču na produkciju, oslobađanje i rezultujuću toksičnost ovih agenasa, izuzetno zahtevnom. Pored toga, toksigene cijanobakterije, pored sposobnosti da prežive u uslovima nepovoljnim za njihov razvoj, često odgovaraju povećanom produkcijom toksina na stresne promene u intenzitetima pojedinih faktora u svom okruženju (Zilliges i sar., 2011; Kurmayer, 2012). Laboratorijska ispitivanja pomažu da se simuliraju i analiziraju različiti faktori životne sredine (npr. nivoi hranljivih materija, temperatura, svetlost) koji utiču na razvoj cvetanja cijanobakterija i doprinose razumevanju načina na koji ovi faktori utiču na dinamiku cvetanja i proizvodnju toksina, što je od suštinskog značaja za predviđanje i sprečavanje ove pojave. Osetljivost navedenih metoda evaluacije cijanobakterijske toksičnosti je različita, zbog čega je neophodan širi pristup koji podrazumeva istovremeno korišćenje više različitih metoda u detekciji toksičnosti sojeva različitog porekla u okviru određenog podneblja. Bolje razumevanje ovih interakcija može doprineti mogućnosti predviđanja i prevencije nastanka uslova koji dovode do ispoljavanja i modulacije toksičnosti cijanobakterija i time i rizika po zdravlje ljudi i životinja i životne sredine u celini.

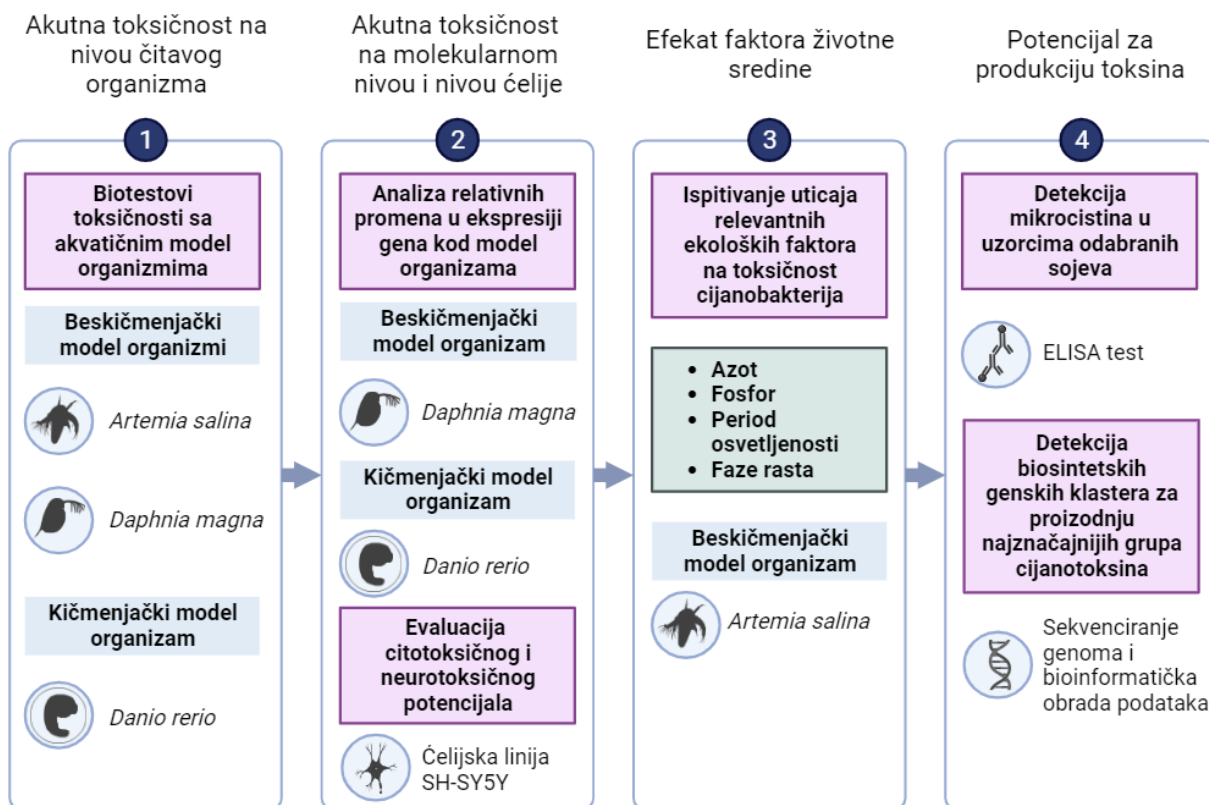
## 2. Ciljevi istraživanja

Osnovni postavljene ciljevi istraživanja obuhvataju:

1. Karakterizacija toksičnih efekata odabranih autohtonih vodenih i zemljišnih cijanobakterijskih sojeva kroz ispitivanje akutne toksičnosti njihovih ekstrakata *in vivo*, na akvatičnim beskičmenjačkim i kičmenjačkim model organizmima i identifikacija egzogenih faktora koji dovode do modulacije toksičnosti;
2. Utvrđivanje toksičnih efekata koji se ispoljavaju na molekularnom i genetičkom nivou beskičmenjačkog i kičmenjačkog model organizma kako bi se stekao uvid u mehanizme toksičnog delovanja testiranih sojeva;
3. Ispitivanje citotoksičnog i neurotoksičnog potencijala cijanobakterijskih sojeva *in vitro*;
4. Utvrđivanje toksigenog potencijala odabranih sojeva u cilju identifikacije jedinjenja koji bi mogli biti odgovorni za ispoljene toksične efekte, sa fokusom na produkciju mikrocistina kao najbolje proučene grupe cijanobakterijskih toksina.

Plan istraživanja sa ciljem realizacije postavljenih ciljeva:

1. Detekcija i karakterizacija akutne toksičnosti ekstrakata cijanobakterijskih sojeva koristeći *in vivo* testove toksičnosti sa beskičmenjačkim (*Artemia salina*, *Daphnia magna*) i kičmenjačkim (*Danio rerio*) akvatičnim model organizmima;
2. Analiza relativnih promena u ekspresiji odabranih gena kod model organizama *Daphnia magna* i *Danio rerio*, kako bi se identifikovali molekularno-genetički i fiziološki putevi na koje ispitivana toksična jedinjenja cijanobakterija deluju na datim model organizmima;
3. Evaluacija citotoksičnog i neurotoksičnog potencijala ispitivanih sojeva u testu sa ćelijskom linijom humanog neuroblastoma SH-SY5Y;
4. Ispitivanje uticaja relevantnih ekoloških faktora (dostupnost nutrijenata, period osvetljenosti) i faze rasta na toksičnost odabranih sojeva u *Artemia salina* biotestu;
5. Detekcija mikrocistina u uzorcima sojeva cijanobakterija primenom ELISA testa;
6. Sekvenciranje genoma sojeva cijanobakterija, formiranje kolekcije sekvenci sojeva i upotreba bioinformatičkih metoda za detekciju *mcy* gena odgovornih za produkciju mikrocistina, kao i detekcija genskih klastera odgovornih za biosintezu najznačajnijih poznatih grupa cijanotoksina.



Slika 8. Šema istraživanja i sprovedenih analiza u okviru doktorske disertacije

### 3. Materijal i metode



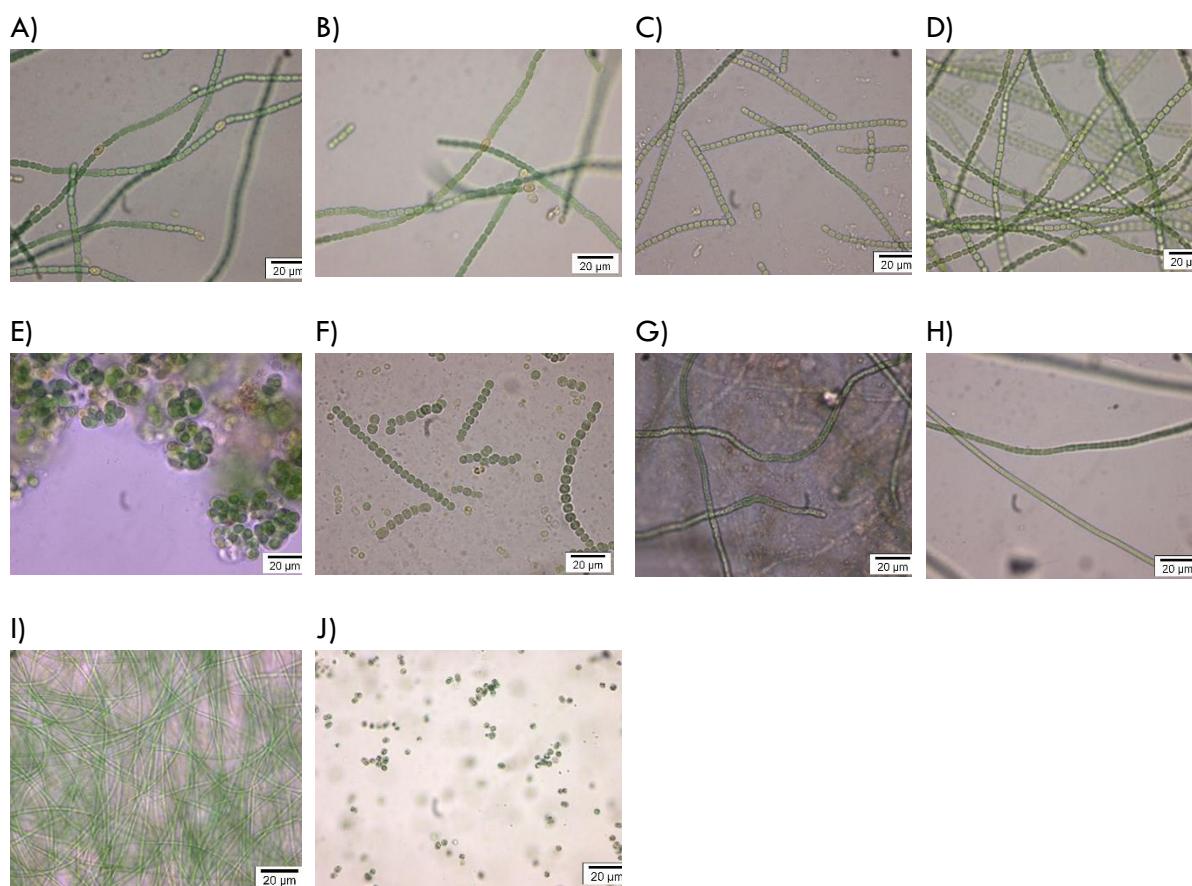
### 3.1. Testirani sojevi cijanobakterija, kultivacija i priprema ekstrakata

#### 3.1.1. Kultivacija odabranih sojeva cijanobakterija

Cijanobakterijski sojevi čija toksična svojstva su eksperimentalno ispitivana predstavljaju sojeve koji pripadaju Novosadskoj kolekciji kultura cijanobakterija (NSCCC) Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Među odabranim sojevima, nalazili su se predstavnici rodova *Nostoc*, *Anabaena*, *Oscillatoria* i *Microcystis*, među kojima je 5 terestričnih sojeva i 5 akvatičnih sojeva (Tabela 2, Slika 9). Toksični referentni soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, dobijen je iz Pasterove kolekcije kultura (PCC- Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria). Kod ovog soja je potvrđena produkcija mikrocistina i stoga je u većini testova korišćen kao pozitivna kontrola. Svi sojevi izuzev referentnog soja su autohtoni, izolovani sa područja Vojvodine (Srbija).

**Tabela 2.** Odabrani sojevi cijanobakterija iz Novosadske kolekcije kultura cijanobakterija (NSCCC) i Pasterove kolekcije kultura (PCC).

	Naziv soja	Red	Izvor (kolekcija)	Originalno poreklo	Oblast
(A)	<i>Anabaena</i> Č2	Nostocales	NSCCC	Terestrična sredina/černozem	Srbija, Vojvodina
(B)	<i>Anabaena</i> Č5	Nostocales	NSCCC	Terestrična sredina/černozem	Srbija, Vojvodina
(C)	<i>Nostoc</i> 2S1	Nostocales	NSCCC	Terestrična sredina/solonjec	Srbija, Vojvodina
(D)	<i>Nostoc</i> Z1	Nostocales	NSCCC	Jezero Zobnatica	Srbija, Vojvodina
(E)	<i>Nostoc</i> 2S3B	Nostocales	NSCCC	Terestrična sredina/černozem	Srbija, Vojvodina
(F)	<i>Nostoc</i> LC1B	Nostocales	NSCCC	Terestrična sredina /livadska crnica	Srbija, Vojvodina
(G)	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	Oscillatoriales	NSCCC	Kanal Dunav-Tisa-Dunav	Srbija, Vojvodina
(H)	<i>Oscillatoria</i> Z1	Oscillatoriales	NSCCC	Jezero Zobnatica	Srbija, Vojvodina
(I)	<i>Oscillatoria</i> K3	Oscillatoriales	NSCCC	Jezero Krivaja	Srbija, Vojvodina
(J)	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	Chroococcales	PCC	Braakman rezervoar	Holandija



**Slika 9.** Fotografije odabranih cijanobakterijskih sojeva A) *Anabaena* Č2; B) *Anabaena* Č5; C) *Nostoc* 2S1; D) *Nostoc* Z1; E) *Nostoc* 2S3B; F) *Nostoc* LC1B; G) *Oscillatoria* DTD-Bečej; H) *Oscillatoria* Z1; I) *Oscillatoria* K3; J) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806

Kao osnovni medijum za kultivaciju sojeva korišćena je sintetička, tečna mineralna podloga BG11 (Tabela 3) (Rippka i sar., 1979), koja podržava rast širokog spektra terestričnih i slatkovodnih cijanobakterijskih vrsta. Pripreme podloge su uključivale modifikacije u sadržaju azota u formi natrijum-nitrata ( $\text{NaNO}_3$ ) u zavisnosti od karakteristika gajenih sojeva, pa je tako podloga bez dodatka azota korišćena prilikom gajenja svih heterocistnih sojeva sa sposobnošću azotofiksacije u uslovima smanjene dostupnosti azota, dok je za neheterocitne sojeve pripremana podloga uz dodatak  $\text{NaNO}_3$ . Soj *M. aeruginosa* PCC 7806 je gajen u modifikovanoj BG11 podlozi (mBG11), koja je podrazumevala dodatak  $0.8 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  tokom pripreme podloge. Početna pH vrednost svih podloga je iznosila 7.5. Dodatne modifikacije osnovne podloge za gajenje cijanobakterija su uvođene u zavisnosti od eksperimentalne procedure i biće opisane u odgovarajućim poglavljima. Aksene kulture su gajene u erlenmajer posudama zapremine 250 ml, pri temperaturi od  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  uz svetlosni režim od 16 časova svetlosti i 8 časova mraka i intenzitet svetlosti od 4760 do 5710 lx. Sve kulture su gajene 21 dan, odnosno, do ulaska u stacionarnu fazu rasta. Nakon toga, pristupljeno je izdvajanju biomase i pripremi ekstrakata za testiranja.

**Tabela 3.** Sastav mineralne podloge BG 11 po recepturi opisanoj u Rippka i sar. (1979).

Komponente	Količina u g L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0.04
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.036
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.020
Limunska kiselina	0.006
Fe – amonijum citrat	0.006
EDTA	0.001
A5 (rastvor oligoelemenata)*	1 mL L <sup>-1</sup>

\*A5 – sastav A5 mešavine oligoelemenata (g L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2.86); MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O (1.81); ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0.222); MoO<sub>3</sub> x 2H<sub>2</sub>O (0.390); CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (0.079); Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0.0494).

### 3.1.2. Priprema intracelularnih ekstrakata

Nakon perioda kultivacije, vlažna cijanobakterijska biomasa je izdvojena iz medijuma pipetiranjem ili filtracijom pomoću vakuum pumpe i sterilnih filtera poroziteta 0.45 µm (Sartorius, Nemačka). Potpuna dehidracija biomase je postignuta 24-časovnom liofilizacijom uz upotrebu *Christ Alpha 2-4 LD plus* aparata (Christ, Nemačka). Nakon isušivanja, biomasa je izmerena i odgovarajuća količina je izdvojena, potopljena u 1 mL rastvarača (dihlormetan-etanol 1:1 – DMSO ekstrakcija (dimetil sulfoksid, Sigma, SAD) ili 75% metanol – metanolna ekstrakcija) i odložena na 4°C preko noći. U zavisnosti od eksperimentalne procedure sprovedene u narednoj fazi testiranja, kao rastvarač je primenjen 75% metanol (metanolna ekstrakcija) ili dihlormetan-etanol (1:1) (DMSO ekstrakcija).

U slučaju **metanolne ekstrakcije**, drugi dan ekstrakcije je podrazumevao oslobađanje aktivnih metabolita iz ćelija indukovano sonikacijom u ultrazvučnom vodenom kupatilu tokom 10 min. (u ciklusima od 30 sekundi). Ekstrakti su zatim centrifugirani (Eppendorf 5424 R) tokom 15 min. na 5000 rpm, a supernatanti izdvojeni i odloženi na 4°C do primene u eksperimentima.

U slučaju **DMSO ekstrakcije**, nakon sonikacije od 5 min., ekstrakti su vorteksirani u dva ciklusa po 2 min. i zatim centrifugirani tokom 5 min. na 12.000 rpm. Izdvojeni supernatanti su uparavani kako bi se uklonio rastvarač i onemogućila potencijalna interferencija sa eksperimentom. Nakon uparavanja, isušeni ekstrakti su resuspendovani u 200 µL čistog (98%-99%) rastvora DMSO, nakon čega su odloženi u zamrzivač na -20° C do upotrebe.

### **3.2. Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na nivou čitavog organizma - biotestovi toksičnosti sa akvatičnim model organizmima**

#### **3.2.1. Biotest *Daphnia magna* - uslovi gajenja kulture i osnovna eksperimentalna procedura**

Organizmi upotrebljeni u toku eksperimenata predstavljaju kulturu *D. magna* Laboratorije za hidrobiologiju Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Jedinke su uzgajane u standardnoj sintetičkoj podlozi pripremljenoj prema USEPA propisima (USEPA, 2002), kontrolisane pH vrednosti od  $8.0 \pm 0.5$ . Podloga korišćena za gajenje dafnija je takođe korišćena u pripremljenoj fazi kao i u toku samog eksperimenta. Populacije su održavane u staklenim posudama zapremine 2 L, pri osvetljenosti po režimu 16 h svetlosti-8 h mraka i temperaturi od  $20 \pm 2$  °C. Za ishranu dafnija korišćena je biomasa mikroalge *Chlorella vulgaris* kao i rastvor pekarskog kvasca, jednom dnevno, pet dana sedmično, dok je medijum obnavljan dva puta svake sedmice. Sve eksperimentalne kulture su formirane pomoću neonata starosti do 24 h, dobijenih isključivo klonalnom reprodukcijom, čime je osigurana genetička uniformnost svih jedinki uz održanje prirodne genetičke varijabilnosti. Tokom testiranja, korišćeno je deset neonata na 25 mL test rastvora u četiri ponavljanja za svaku koncentraciju tretmana. Pre izlaganja ekstraktima cijanobakterija test organizmi nisu hranjeni 24 sata. Test medijumi nisu obnavljeni, a životinje nisu hranjene ni u jednom od eksperimenata. U cilju korišćenja juvenilnih jedinki približno iste starosti, u početnoj fazi eksperimenta gravidne ženke su izdvajane u zasebne posude sa medijumom. Medijum je aerisan 24 h pre upotrebe, nakon čega je merena koncentracija rastvorenog kiseonika, kako bi se osiguralo da prevazilazi 3 mg L<sup>-1</sup>. Jedinke su zatim ostavljane 1-2 dana do izleganja neonata. Nakon izleganja, neonate su izdvajane u staklenu čašu sa medijumom. Serija razblaženja je pripremljena za svaki od cijanobakterijskih ekstrakata (koncentracije 150 mg mL<sup>-1</sup> – priprema opisana u potpoglavlju 3.1.2) u staklenim tikvicama zapremine 200 mL. Po 25 mL pripremljenih tretman rastvora je prebačeno u sterilne čaše zapremine 50 mL. Za svaku korišćenu koncentraciju su pripremljena četiri replikata. Poslednji korak je uključivao aplikaciju eksperimentalnih organizama, gde je 10 neonata dodato u svaku čašu pasterovom pipetom koja je proširena kako ne bi došlo do povrede jedinki tokom rukovanja.

#### **3.2.2. Biotest *Daphnia magna* - osnovna eksperimentalna procedura**

Testovi akutne toksičnosti sa *D. magna* su sprovedeni u skladu sa standardnim protokolom ISO 6341 (CSN ISO 6341, 1996). Sintetički medijum koji se koristi za kultivaciju dafnija je takođe korišćen za pripremu četiri koncentracije (100, 150, 200 i 250 µg mL<sup>-1</sup>) DMSO tipa ekstrakta, kao i za kontrole. Dodatno, dodate su DMSO kontrole sa odgovarajućim opsegom koncentracija da bi se testirala inertnost DMSO u primenjenim koncentracijama, zajedno sa kontrolama medijuma bez dodatog ekstrakta ili rastvarača. Koncentracija DMSO rastvarača u eksperimentu bila je niža od 0.1%. Vijabilnost test organizama je praćena nakon 24 i 48 h izlaganja pomoću kompaktnog stereomikroskopa (Olympus SZX7, Tokyo, Japan), pri čemu je primarni mereni toksični efekat bila imobilizacija testiranih jedinki. Podaci o akutnoj toksičnosti su predstavljeni kao procenat prosečnog mortaliteta u četiri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija (SD). Rezultati su prikazani tabelarno pomoću Microsoft Office Excel 365 programa.

### 3.2.3. Biotest *Danio rerio* - gajenje i održavanje eksperimentalnih jedinki i dobijanje embriona

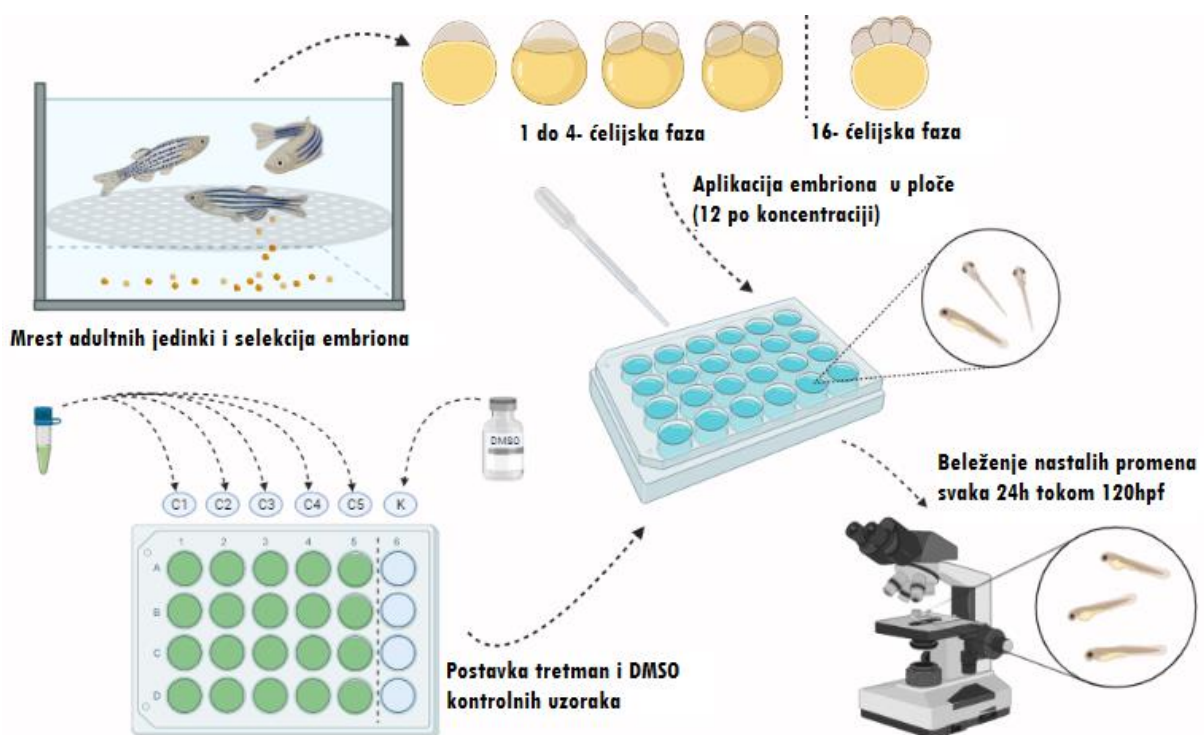
Jedinke vrste *Danio rerio* (zebrica) AB soja (divlji tip) korišćene u eksperimentima su ustupljene Laboratoriji za fiziologiju životinja od strane Dr. Zsolt Csenki sa Szent Istvan Univerziteta (Godollo, Mađarska). Populacije su održavane u akvarijumima zapremine 30 L (~1L po jedinki), pod kontrolisanim uslovima koji su uključivali temperaturu (28°C), svetlosni režim (14:10 h svetlost/mrak), kao i stabilne vrednosti pH (8.4) i rastvorenog kiseonika (~80%). Kao medijum za gajenje ribica u akvarijumima korišćena je filtrirana vodovodska voda (česmuša) obogaćena komercijalno dostupnim aditivima (Easy-Life Fluid Filter Medium, The Netherlands). Ribice su hranjene živim, juvenilnim jedinkama vrste *Artemia salina* (Dajana Artemia Egg Mix) i komercijalno dostupnom hranom za ribice u ljusticama (Sera Vipan Nature Tropical Flakes, Heinsberg, Germany) dva puta dnevno, sedam dana u sedmici. Embrioni zebrića su dobijani parenjem adultnih jedinki postavljenih na mrest u prilagođenim akvarijumima (mrestilicama) preko noći, po šemi 3 ženke i 2 mužjaka. Pored uspostavljanja osnovnih, gore navedenih uslova, priprema mrestilica je uključivala i postavljanje zaštitne pregradne mrežice, čija je uloga sprečavanje kanibalizma embriona od strane adulta, kao i dodatnih elemenata koji su doprineli imitaciji prirodnog okruženja ribica pogodnog za mrest. Sam mrest i fertilizacija su se dešavali ujutru, 30 minuta nakon paljenja svetla. Najkasnije 60 minuta nakon fertilizacije, embrioni su sakupljeni i izvršeno je njihovo pregledanje i selekcija pod lupom (Nikon SMZ800N, Tokyo, Japan). Birani su vitalni embrioni, kod kojih nije bilo uočljivih malformacija u vidu koagulacije ili anomalija vezanih za ćelijsku deobu. Odgovarajući embrioni su korišćeni u daljem testiranju. Kako embrioni korišćeni u ovim eksperimentima nisu bili stariji od 5 dana, nije bila neophodna dozvola etičke komisije za dobrobit životinja Univerziteta u Novom Sadu niti licenca po Direktivi Evropskog Saveta 2010-63-EU.

### 3.2.4. Biotest *Danio rerio* - osnovna eksperimentalna procedura

Test embrionalne akutne toksičnosti je sproveden po opisanoj proceduri testa toksičnosti ribljeg embriona (*Fish embryo toxicity test* (FET)) (OECD, 2013) uz manje modifikacije. Eksperimenti su izvođeni u sterilnim mikrotitar pločama sa 24 bunarića, pri čemu je u svaki bunarić ploče najpre dodato 2 mL rekonstruisanog ribljeg medijuma, koji se sastojao od autoklavirane Milipure vode sa dodatkom 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.75 mM NaHCO<sub>3</sub> i 0.075 mM KCl (ISO 7346-1:1996). Sledeći korak je uključivao dodavanje odgovarajućih količina cijanobakterijskih ekstrakata kako bi se u pločama dobio raspon od 5 različitih koncentracija (100, 120, 160, 200 i 250 µg mL<sup>-1</sup>). Embrioni su izlagani uticaju ekstrakata u grupama po 12, odnosno 3 embriona po otvoru ploče sa 4 replikata za svaku od primenjenih koncentracija. Kontrolne grupe su se sastojale od čistog ribljeg medijuma (negativna kontrola) i medijuma sa dodatkom DMSO (kontrola rastvarača), pri čemu koncentracija DMSO primenjena u eksperimentima nikada nije prelazila 0.1%. Embrioni su nakon dodavanja u ploče inkubirani na 28 °C, uz održavanje svetlosnog režima od 14h svetlosti: 10h mraka. U intervalima od 24h vršena je provera njihove vijabilnosti i beležene su promene uzrokovane tretmanima pomoću mikroskopa (Slika 10). Beležene promene su uključivale koagulaciju embriona, srčani rad, razvoj somita, deformaciju kičme, nedostatak odvajanja pupoljka repa, zakrivljenje repa u larvalnoj fazi, pigmentaciju, razvoj očiju, srčani edem (SE), edem žumančane kese (EŽK), zakasnelo izleganje/izostanak izleganja (

Slika **10**. Prikaz eksperimentalne procedure ispitivanja akutne toksičnosti ispitivanih sojeva kod embriona vrste *D. rerio*

**Tabela 4).** Test je smatran validnim ukoliko kod 90% embriona u kontrolnoj grupi nisu primećeni letalni ili subletalni efekti tokom ukupnog perioda izlaganja. Na kraju perioda izlaganja, na osnovu pozitivnog ishoda u bilo kojoj od navedenih tačaka su izračunate EC50 vrednosti. U slučajevima kada je toksičnost ekstrakata bila nedovoljna za izračunavanje EC50 vrednosti, korišćen je parametar EC10 koji je mogao biti izračunat kod većine testiranih sojeva. Parametar EC10 je izabran sa ciljem aproksimacije koncentracije bez efekta NOEC (engl. No effect concentration), stavljajući EC10 i EC50 na suprotne krajeve spektra toksičnosti. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti tri ponavljanja  $\pm$  SD. Značajnost razlika zabeleženih za tretmane i netretiranu kontrolu je utvrđena na osnovu analize varijanse (ANOVA) i Dunnet post-hoc testova, pri čemu su kao dovoljno jak dokaz protiv nulte hipoteze prihvatane vrednosti  $p < 0.05$ . GraphPad Prism 9 softver je korišćen za statističku analizu podataka i prikaz rezultata.



**Slika 10.** Prikaz eksperimentalne procedure ispitivanja akutne toksičnosti ispitivanih sojeva kod embriona vrste *D. rerio*

**Tabela 4.** Prikaz subletalnih i letalnih promena koje se mogu detektovati u definisanim vremenskim tačkama kod ispitivanih embriona *D. rerio* nastalih usled izlaganja dejstvu cijanobakterijskih ekstrakata

Kategorija	Razvojni proces	Vreme (hpf)				
		24	48	72	96	120
Letalni efekti	Koagulacija embriona	●	●	●	●	●
	Izostanak formiranja somita	●	●	●	●	●
	Izostanak odvajanja repa	●	●	●	●	●
	Odsustvo srčanog rada	●	●	●	●	●
Efekti na rast i razvoj	Edem perikardijalne duplje	●	●	●	●	●
	Edem žumančane kese	●	●	●	●	●
	Zakasnelo izleganje/izostanak izleganja	n.d.	n.d.	n.d.	●	●
	Deformiteti kičme	●	●	●	●	●
	Malformacija repa	n.d.	●	●	●	●
	Izostanak cirkulacije krvi	n.d.	●	●	●	●
	Malformacije glave	●	●	●	●	●
	deformiteti oka (promene u veličini i obliku oka)	●	●	●	●	●
	Izostanak pigmentacije očiju/tela	n.d.	●	●	●	●
	Izostanak kretanja embriona/larve	●	●	●	●	●

\*n.d. – nije detektabilno

### 3.3. Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na molekularnom nivou i nivou ćelije

#### 3.3.1. Biotest *Daphnia magna* - analiza relativnih promena u genskoj ekspresiji

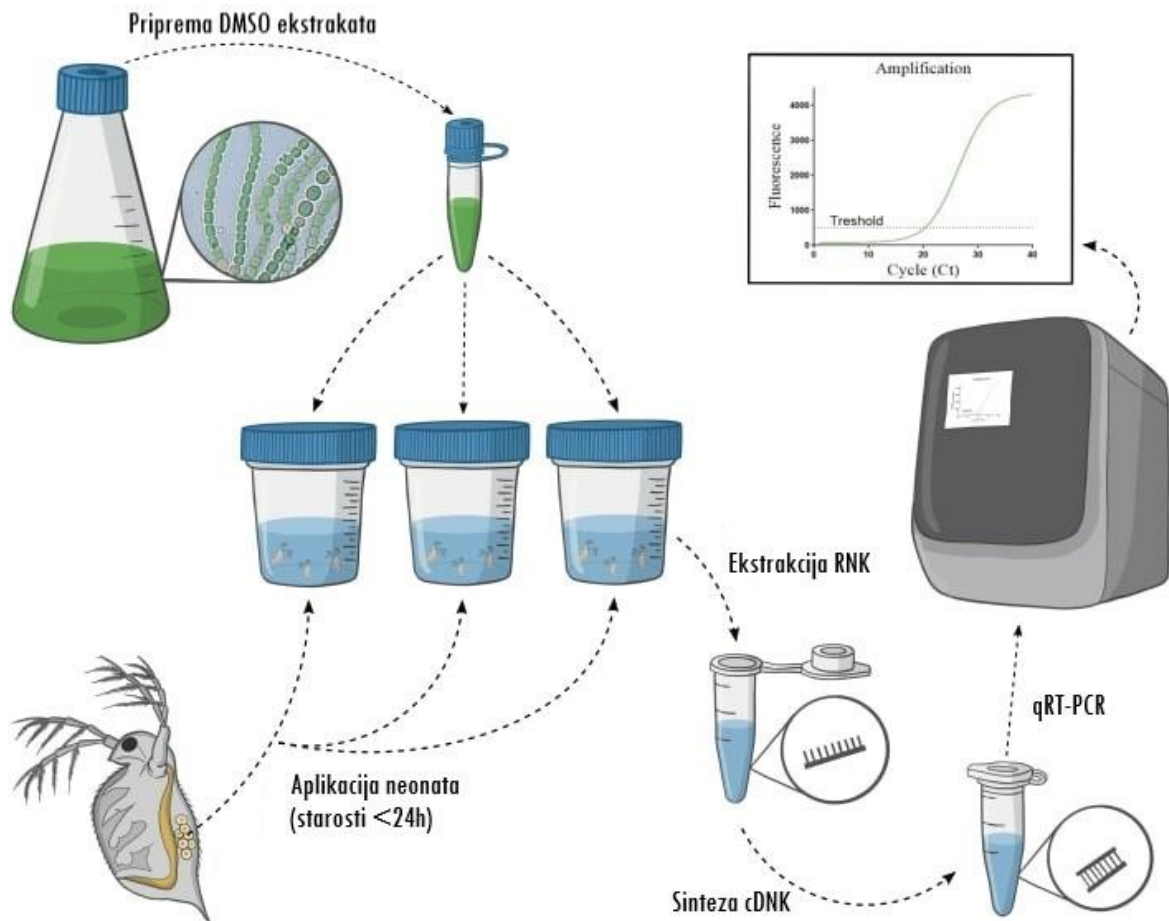
Efekti izlaganja cijanobakterijskim sojevima na ekspresiju odabranih gena kod vrste *D. magna* analizirani su korišćenjem tri različite koncentracije ekstrakata (Slika 11). Početna koncentracija sastojala se od 0.1 mL odgovarajućeg ekstrakta dodatih u 200 mL medijuma (što odgovara najvišoj korišćenoj koncentraciji od 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Preostale dve koncentracije su dobijene dvostrukim razblaženjima (37.5 i 18.75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Kako bi se isključila mogućnost uticaja ekstrakcionog sredstva na ishod eksperimenta, kontrolna serija uzoraka (bez tretmana) je pripremljena sa rastvorom DMSO koji je prethodno korišćen za solubilizaciju ekstrakata cijanobakterija, u istom opsegu koncentracija kao i tretman. Dodatno, pripremana je kontrola koja se sastojala iz podloge bez dodatih ekstrakata ili DMSO rastvarača. Koncentracije DMSO u medijumima za izlaganje nikada nisu prekoračile 0.05%. Na ovaj način pripremljeni eksperimentalni tretmani su ostavljani tokom 48 h, uz provere vijabilnosti neonata na svaka 24 h. Jedinke kod kojih nije uočeno kretanje su smatrane uginulim i uklanjane su iz eksperimenta.



Nakon izlaganja, neonate su sakupljene u kivete zapremine 1.5 mL, potopljene u 350  $\mu$ L reagensa za stabilizaciju tkiva (*RNAlater*) i odložene na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.1.1. Biotest *Daphnia magna* - ekstrakcija RNK i kvantitativna „real time“ PCR (RT-PCR) metoda

U pripremnoj fazi, uzorci su otapani na ledu u cilju izdvajanja RNA-later reagensa. Ekstrakcija ukupne RNK je sprovedena pomoću komercijalnog kompleta Rneasy Mini Kit (Qiagen, Nemačka) prateći uputstva navedena u protokolu proizvođača. Nakon ekstrakcije, čistoća i ukupna koncentracija izolovane RNK je potvrđena spektrofotometrijski pomoću NanoDrop 1000 spektrofotometra (Nanodrop Technologies Inc. Wilmington, SAD) merenjem apsorbanci uzoraka na talasnim dužinama od 260, 280 i 230 nm, nakon čega su uzorci odloženi na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Reverzna transkripcija je sprovedena koristeći QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Nemačka) na osnovu protokola proizvođača. Dobijena komplementarna DNK (cDNK) je razblažena do koncentracije od  $10\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  i odložena na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kvantifikacija ekspresije gena sprovedena je primenom metode kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*Quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR*). Analize su vršene upotrebom Mastercycler ep Gradient S uređaja (Eppendorf, Nemačka) i Power SYBR Green Master Mix (Applied biosystems, SAD). Za postavku reakcija, korišćene su polipropilenske ploče sa 96 bunarčića (ThermoFisher Scientific, SAD). Reakciona smeša zapremine  $13.05\text{ } \mu\text{L}$  se sastojala iz  $5.25\text{ } \mu\text{L}$  Power SYBR Green Master Mix,  $1000\text{ nM}$  rastvora prajmera (Forward+Reverse) i  $25\text{ ng}$  cDNK rastvorene u DNase RNase Protease Free  $\text{H}_2\text{O}$ . Čistoća konstituenata smeše je testirana u svakoj ploči dodatkom triplikata negativne kontrole koja se sastojala samo od reakcione smeše, bez cDNK. Amplifikacioni program podešen na PCR instrumentu je uključivao inicijalnu denaturaciju na  $95^{\circ}\text{C}$  tokom 10 min., nakon čega je sledilo 40 ciklusa koji su se sastojali od dva koraka: 15 s na  $95^{\circ}\text{C}$  i 60 s na  $60^{\circ}\text{C}$ . Temperaturni opseg od  $65^{\circ}\text{C}$  do  $95^{\circ}\text{C}$  za krivu topljenja je podešen u svakoj reakciji. Kod test organizma *D. magna*, testiran je uticaj ekstrakata na ekspresiju 5 gena (*cyp314*, *cyp360A*, *gst*, *pgp*, *vtg*), dok je kao endogena kontrola upotrebljen gen  $\beta$ -actin koji je konstitutivno eksprimovan u svim eksperimentalnim grupama. Sekvence prajmera za referentni i sve ciljne gene su prikazane u Tabela 5.



**Slika 11.** Prikaz eksperimentalne procedure ispitivanja genske ekspresije *D. magna* qRT-PCR metodom (Adaptirano iz Davidović i sar. (2022)).

Analiza relativnih promena u ekspresiji gena je sprovedena uz upotrebu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode (Livak i Schmittgen, 2001). Kontrolni gen  $\beta$ -actin je pokazao stabilnu ekspresiju u svim tretmanima. Približno normalna raspodela podataka je utvrđena nakon primene standardnog testa normalnosti (Shapiro-Wilk,  $\alpha = 0.05$ ). Rezultati su predstavljeni grafički kao stopa promena (fold change) u odnosu na kontrolu  $\pm$  standardne devijacije (SD). Za statističke analize su korišćene  $\Delta Ct$  vrednosti (prag ciklusa PCR reakcije (engl. cycle threshold)), dobijene oduzimanjem Ct vrednosti housekeeping gena od Ct gena od interesa. Analiza varijanse (ANOVA) i Dunnett post-hoc testovi su korišćeni za utvrđivanje značajnosti razlika između vrednosti dobijenih u tretmanima i netretirane (DMSO) kontrole, dok su statističke razlike određene kao  $P < 0.05$ . GraphPad Prism 9 softver je korišćen za statističku analizu podataka, kao i za prezentaciju rezultata.

**Tabela 5.** Spisak korišćenih prajmera i njihovih nukleotidnih sekvenci u biotestu *D. magna*

Naziv gena	Opis	Sekvenca forward i reverse prajmera (5'-3')	Dužina ampikona (bp)	Poreklo
<i>β-actin</i>	Aktin	F - GCCCTCTCCAGCCCTCATTCT R - TGGGGCAAGGGCGGTGATTT	189	(Houde i sar., 2013)
<i>cyp314</i>	Citohrom P450 familija 314	F - ACTATGTATGGACTTCCCTGGTG R - TTATCGCGGGTGTC AACG	194	ID: KC172920.1
<i>cyp360</i>	Citohrom P450 familija 3	F - TCGGCGAGATTTACACAGT R - GCACATTCGGTTATCAAGAC	150	(Wang i sar., 2016)
<i>gst</i>	Glutation S-transferaza	F - GGGAGTCTTTACCACCGTTTC R - TCGCCAGCAGCATACTTGTT	150	(Wang i sar., 2016)
<i>p-gp</i>	P-glikoprotein	F - CCACTTGCGTTCAACTTCTTC R - TTCGCCGATTGATGTTCC	158	ID: AB257771.1
<i>vtg</i>	Vitelogenin	F - CACTGCCTTCCCAAGAACAT R - ATCAAGAGGACGGACGAAGA	66	(Hannas i sar., 2011)

### 3.3.2. Biotest *Danio rerio* - analiza relativnih promena u ekspresiji gena

U cilju ispitivanja uticaja tretmana ekstraktima cijanobakterija na ekspresiju gena kod model organizma *Danio rerio*, kao i radi poređenja osetljivosti primenjenih metoda, testirane su niže subletalne koncentracije ekstrakata (60, 80 i 100 µg mL<sup>-1</sup>) u odnosu na FET test, pri kojima nisu primećene promene u odnosu na kontrolnu grupu kod više od 15% izloženih jedinki. Procedura vezana za mrest odraslih jedinki, produkciju i proveru kvaliteta embriona, pripremu ribljeg medijuma i izlaganje test jedinki ekstraktima je identična onoj opisanoj u potpoglavlju 3.2.3. Koncentracija rastvarača (DMSO) primenjena u eksperimentima nikada nije prelazila 0.05%. Tokom trajanja eksperimenta, na svaka 24 h proveravana je vijabilnost embriona i vršena je eliminacija embriona kod kojih je došlo do koagulacije, prestanka srčanog rada i pojave deformiteta. Nakon 5 dana izlaganja odnosno 120 časova, pristupljeno je koracima ekstrakcije RNK iz uzoraka, odnosno, vijabilnih larvi zebrića izdvojenih iz ploča sa tretmanom. Zatim je izvršena reverzna transkripcija u cilju dobijanja komplementarne DNK i kvantifikacije ekspresije gena primenom qRT-PCR metode, koji su u velikoj meri rađeni po proceduri opisanoj u potpoglavlju 3.3.1.1, dok su izmene u odnosu na ovu proceduru opisane u daljem tekstu.

Praćene su promene u nivoima ekspresije 6 gena (*bip*; *vtg1*; *p53*; *cyp1a1*; *ahr2*; *abcb4*) uključenih u signalni put apoptoze, metabolizam ksenobiotika, endokrine puteve, kao i stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) i oksidativni stres. Kao endogena kontrola je korišćen *housekeeping* gen *rpl* (ribozomalni protein L), koji je izabran zbog izuzetno stabilne ekspresije utvrđene u dosadašnjim istraživanjima (Xu i sar., 2016). Spisak sekvenci korišćenih prajmera je prikazan u Tabela 6. Reakciona smeša je pripremana u zapremini od 10 µL i sastojala se iz 5 µL Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, SAD), 500 nM svakog od prajmera (Forward+Reverse) i 45 ng cDNK. Program amplifikacije je uključivao predinkubacioni period od 10 minuta na 95 °C, nakon čega je sledilo 40 ciklusa sastojanih od dva koraka: denaturacije dvolančane DNK na 95 °C tokom 30 sekundi i gradijent od 57-62 °C primenjen u cilju vezivanja prajmera tokom 1 minuta U slučaju gena *cyp1a1*, *ahr2*, *bip* i *p53* vezivanje prajmera se odvijalo na 60 °C, dok je za gen *vtg1* temperatura vezivanja iznosila 57 °C. Analiza i obrada rezultata

kao i statistička provera značajnosti utvrđenih razlika između kontrolnih i tretman uzoraka je izvršena po proceduri identičnoj onoj opisanoj u potpoglavlju 3.3.1.1.

**Tabela 6.** Spisak korišćenih prajmera i njihovih nukleotidnih sekvenci u biotestu *D. rerio*

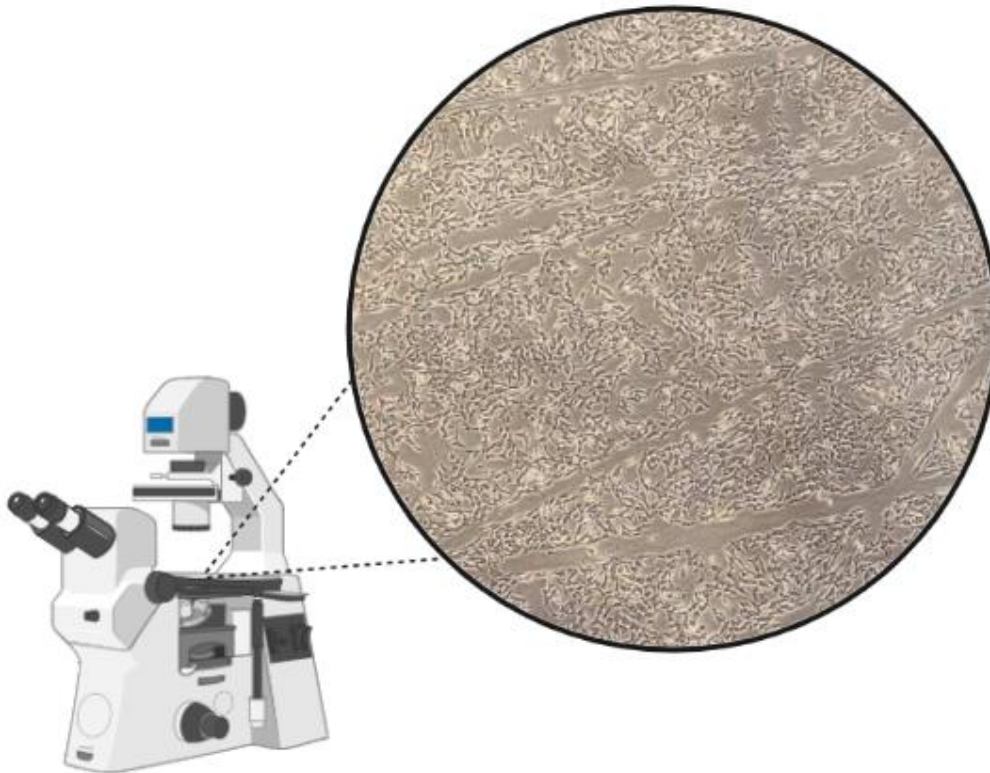
Naziv gena	Opis	Sekvenca forward i reverse prajmera (5'-3')	Dužina ampikona (bp)	Poreklo
<i>rpl</i>	Ribozomalni protein	F - AGCTCAAGATGGCAACACAG R - AAGTCTTCTCGTCCTCC	100	(Oggier i sar., 2010)
<i>bip</i>	Vezujući imunoglobulinski protein	F - CGAAGAAGCCAGATATCGATGA R - ACGGCTCTTTCCGTTGAAC	194	(Christen i sar., 2013)
<i>cyp1a1</i>	Citohrom P450 familija 1, podfamilija A	F - AATCCCAGACGGGCTACA R - CCGGGCCATAGCACTTAC	150	(Wang i sar., 2016)
<i>ahr2</i>	Aril-ugljovodonični receptor	F - ACGGTGAAGCTCTCCCATA R - AGTAGGTTTCTCTGGCCAC	150	((Zodrow i Tanguay, 2003)
<i>p53</i>	Tumor supresor protein p53	F - GCTTGTACAGGGGTCATT R - ACAAAGGTCCCAGTGGAGTG	158	(Christen i sar., 2013)
<i>vtg1</i>	Vitelogenin	F - CATCTTATGCTGGTGATTGTCA R - CTTGAGCTTGAAC TTGAAC TTGA	66	(Hoffmann i sar., 2006)
<i>abcb4</i>	<i>abcb4</i> transporter ksenobiotika	F - TACTGATGATGCTTGGCTTAATC R - TCTCTGGAAGGTGAAGTTAGG	159	NM_001114583.1

### 3.3.3. Utvrđivanje citotoksičnosti i neurotoksičnosti odabranih sojeva - ćelijska linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

U cilju detekcije potencijalne citotoksičnosti i neurotoksičnosti ekstrakata odabranih sojeva, ispitana je vijabilnost humanih SH-SY5Y neuroblastomskih ćelija (eng. European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC - 94030304) nakon 24 i 72-časovnog izlaganja njihovom delovanju. Ova ćelijska linija je dobijena trostrukim subkloniranjem osnovne linije SK-N-SH (ATCC HTB-11) (SH-SY » SH-5Y » SH-SY5Y), primarno dobijene biopsijom metastaze koštanog tumora (Biedler i sar., 1973). Sve ćelije korišćene u eksperimentima su obezbeđene od strane Laboratorije za ekofiziologiju i ekotoksikologiju (LECOTOX), Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

#### 3.3.3.1. Uslovi pripreme i kultivacije ćelija

Kompletan medijum za gajenje ćelija dobijen je kombinovanjem rastvora Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma-Aldrich, SAD) i F12 (Ham's F-12 Sigma-Aldrich, SAD) u odnosu 1:1, uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (FTS) i 1% HEPES rastvora (Sigma-Aldrich, SAD). Ćelije su gajene u T-75 flaskovima (Nunc EasYFlask, Thermo Scientific, SAD) u inkubatoru sa vlažnom atmosferom uz koncentraciju CO<sub>2</sub> od 5% i pri temperaturi od 37°C. Nakon uspostavljanja kulture, konfluentnost rasta je utvrđivana posmatranjem ćelija pod invertnim mikroskopom (Slika 12). Ćelije su subkultivisane dva puta nedeljno, ili izdvajane za upotrebu u eksperimentima pri konfluentnosti od 80-90% koristeći klasičan postupak tripsinizacije. Sam korak tripsinizacije je uključivao upotrebu 1 mL tripsina uz inkubaciju od 3-4 minuta na 37 °C.



**Slika 12.** Prikaz rasta SH-SY5Y ćelija adheriranih za dno flaska posmatran uz pomoć invertnog mikroskopa

### 3.3.3.2. Eksperimentalna procedura - MTT esej

Za postavljanje eksperimenta korišćene su mikrotitar ploče sa 96 bunarića koje su inokulisane suspenzijom ćelija gustine od 20.000 ćelija, u finalnoj zapremini od 100  $\mu\text{l}$  po bunariću. Kompletan MEM medijum je korišćen za pripremu razblaženja cijanobakterijskih DMSO ekstrakata (priprema ekstrakata opisana u poglavlju 3.1.2) do finalnih koncentracija od 4, 100, 400 i 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dok je čist medijum korišćen kao negativna kontrola. Svaka koncentracija ekstrakta korišćena u tretmanima je testirana u triplicatu. Dodatno je testiran i uticaj rastvora DMSO korišćenog u pripremi ekstrakata u rasponu koncentracija od 0.002, 0.05, 0.2, 1, 2, 3, 4 i 5%. Na ovaj način je utvrđeno da DMSO u koncentracijama primenjenim tokom testiranja, koje nisu prelazile 1%, nije ometao vijabilnost ćelija. Kao pozitivna kontrola, primenjen je 0.025-2 mM vodonik-peroksid, koji dokazano dovodi do inhibicije rasta ispitivane ćelijske linije u primenjenoj dozi (Garcimartín i sar., 2017). Pripremljene ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 i 72h. Čitav eksperiment je sproveden u 4 seta (ponavljanja). Nakon tretmana, vijabilnost ćelija je ispitana pomoću MTT esej, prema proceduri Kaišarević i sar. (2009). Prvi korak procedure je uključivao rastvaranje MTT praha [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] u medijumu za kultivaciju ćelija bez dodatog FTS-a i pripremu rastvora koncentracije 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$ . Medijum sa tretmanom je uklonjen iz svih otvora ploče, nakon čega je dodat 0.1 mL pripremljenog MTT rastvora po bunariću. Ploče su zatim inkubirane 3h na 37°C, kako bi se obezbedili uslovi za aktivnost mitohondrijalne dehidrogenaze i akumulaciju ljubičastih kristala formazana u vijabilnim ćelijama. Medijum je zatim ponovo uklonjen iz ploča i u svaki bunarić je dodat 0.1 mL HCl/izopropanol rastvora (0.04 M) u cilju rastvaranja nastalog formazana. Nakon inkubacije od 10 min. na sobnoj temperaturi, sadržaj ploča je promešan kratko pomoću šejkera spektrofotometra (*Multiskan GO*, Thermo Fisher Scientific, SAD) i

apsorbance su merene na talasnoj dužini od 540 nm i 690 nm, na fotometru. Na osnovu dobijenih vrednosti, izračunata je procentualna vrednost citotoksičnosti na osnovu formule:  $CI (\%) = (1 - A_t / A_k) \times 100$ , gde  $A_t$  predstavlja apsorbancu uzorka sa tretmanom, dok se  $A_k$  odnosi na apsorbance kontrolnih uzoraka. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti %CI dobijene u četiri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Kriva nelinearne regresije je kreirana na osnovu % citotoksičnosti i Log<sub>10</sub>-transformisane vrednosti koncentracija ekstrakata i upotrebljena za utvrđivanje 50% inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) svakog ekstrakta koristeći GraphPad Prism 9 softver. Izvršena je jednosmerna ANOVA i Dunnet-ovi post-hoc testovi, kako bi se utvrdila značajnost razlika između grupa tretmana.

### **3.4. Uticaj različitih faktora kultivacije i faza rasta na toksičnost cijanobakterija**

#### **3.4.1. Biotest *Artemia salina***

Biotest *A. salina* je primenjen u cilju utvrđivanja akutne toksičnosti ispitivanih cijanobakterijskih sojeva i uticaja različitih faktora sredine, pri čemu je testiran uticaj koncentracija dostupnih nutrijenata i uticaj perioda osvetljenosti (Slika 13). Pored uticaja sredinskih faktora, toksičnost je testirana i u zavisnosti od faze rasta cijanobakterijskih sojeva, pri čemu su ispitivane eksponencijalna i stacionarna faza rasta kultura. U ovu svrhu, uvedene su modifikacije standardnih parametara kultivacije cijanobakterija opisanih u poglavlju 3:

U cilju ispitivanja efekata izloženosti odabranih sojeva različitim koncentracijama fosfata u formi kalijum dihidrogenfosfata ( $K_2HPO_4$ ) tokom kultivacije na rezultujuću toksičnost, pripremljena su tri tipa osnovne BG11 podloge sa finalnim koncentracijama od 0.02, 0.04 i 0.06 g L<sup>-1</sup>  $K_2HPO_4$ .

Kako bi se ispitaio uticaj dostupnih koncentracija azota u formi natrijum-nitrata ( $NaNO_3$ ), svi sojevi su kultivisani u podlozi bez dodatka azota i sa dodatkom 0.8 i 1.5 g L<sup>-1</sup>  $NaNO_3$ .

Uticaj perioda izlaganja svetlosti na toksičnost sojeva je ispitan koristeći BG11 medijum pripremljen po redovnoj proceduri. Uzorci su kultivisani u uslovima kontrolisane svetlosti emitovane iz hladnih belih fluorescentnih lampi (temperatura boje svetlosti – 6500 K, dnevna svetlost), intenziteta 2500 lm. Tri tipa dnevnog režima osvetljenosti su primenjena tokom kultivacije (svetlost/tama): 8h/16h, 12h/12h i 16h/8h.

Dodatno, toksičnost svih ispitivanih sojeva na larve *A. salina* je određena u 3 različite faze rasta kulture, tako što je biomasa za pripremu ekstrakata izolovana nakon 7 (eksponencijalna faza rasta), 21 (početak stacionarne faze rasta) i 35 dana (kasna stacionarna faza rasta) od početka kultivacije.

Za svaku od analiza iz ove kategorije, jednosmerna analize varijanse (ANOVA) je upotrebljena u cilju upoređivanja efekata različitih tretmana na rezultujuću toksičnost odabranih sojeva.

##### **3.4.1.1. Biotest *Artemia salina* - osnovna eksperimentalna procedura**

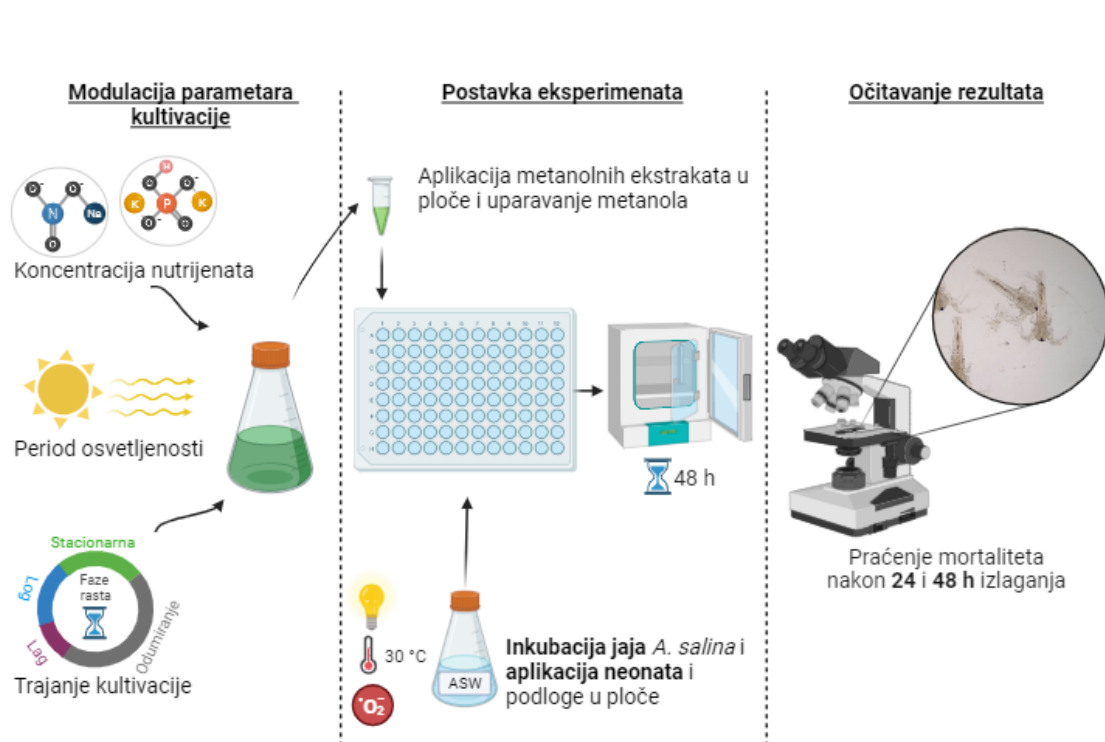
Inicijalna faza eseja je uključivala inkubaciju 0.6 grama jaja vrste *A. salina* (Carolina, SAD) u 100 mL sterilne, veštačke morske vode - ASW podloga (engl. *Artificial sea water*) koja je pripremana rastvaranjem različitih soli u 1 L sterilne destilovane vode (Tabela 7), pri čemu je podešavana pH vrednost podloge na 8.5. Inkubacija je trajala 30-36 časova u kontrolisanim

uslovima, na temperaturi od 30°C uz konstantnu osvetljenost i aeraciju. Cijanobakterijski ekstrakti su istog dana aplicirani u mikrotitar ploče u zapremini od 100 µL po otvoru ploče i ostavljani preko noći u termostatu podešenom na 30°C, kako bi metanol prisutan u ekstraktima ispario u potpunosti. Svaki od ekstrakata je testiran u 4 koncentracije (100, 1000, 5000 i 10.000 µg mL<sup>-1</sup>) pripremljenih serijskim razblaženjem osnovnog rastvora, sa tri replikata po koncentraciji. Pored ekstrakata, ovaj korak je uključivao i aplikaciju čistog metanola koji je takodje uparavan u toku noći, kako bi se isključila mogućnost uticaja ekstrakcionog sredstva na eksperimentalne organizme. Nakon izleganja, juvenilne jedinke starosti do 24h su izdvojene za upotrebu u eksperimentu. U svaki otvor je dodato po 10-20 račića, zajedno sa 100 µL ASW podloge, nakon čega je dodato još 100 µL podloge kako bi se dobila konačna zapremina od 200 µL po otvoru ploče. Pripremljene su i dodatne kontrole u 3 replikata, u formi čiste ASW podloge i test organizama, bez dodatka cijanobakterijskih ekstrakata ili metanola. Nakon pripreme odgovarajućih tretmana i kontrola, ploče su odlagane u termostat na 30°C, uz konstantno osvetljenje.

**Tabela 7.** Sastav veštačke morske vode - ASW podloga (*Artificial sea water*)

Komponente	Količina u g L <sup>-1</sup>
NaCl	24
KCl	0.6
MgSO <sub>4</sub>	6
CaCl <sub>2</sub>	0.7
MgCl <sub>2</sub>	4.5

Toksičnost ispitivanih cijanobakterijskih sojeva je utvrđivana na osnovu mortaliteta zabeleženog kod eksperimentalnih organizama nakon 24 i 48h izlaganja u odnosu na kontrolu. Letalan efekat kod izloženih jedinki je određivana na osnovu izostanka kretanja tokom posmatranja. Očitavanje rezultata je vršeno prebrojavanjem uginulih organizama pomoću lupe Olympus KL 1600 LED (Japan), nakon čega je, u cilju preciznog utvrđivanja ukupnog broja jedinki u svakom otvoru ploče, kretanje organizama onemogućeno dodatkom 100 µL metanola u svaki od otvora. Eksperiment je smatran validnim ukoliko je smrtnost zabeležena u kontrolnim replikatima bila manja od 10%. Dobijene vrednosti su korišćene za procentualno izražavanje stope mortaliteta kao i utvrđivanje graničnih LC50 i LC10 vrednosti. Ceo eksperiment je sproveden u dva nezavisna ponavljanja.



Slika 13. Šema eksperimenata sa ciljem ispitivanja uticaja različitih faktora kultivacije i faza rasta na toksičnost cijanobakterija u biotestu *A. salina*

### 3.5. Utvrđivanje toksiogenog potencijala ispitivanih sojeva

#### 3.5.1. Utvrđivanje produkcije mikrocistina kod odabranih sojeva primenom imunološkog eseja - ELISA test

Uzorci ispitivanih cijanobakterijskih sojeva su podvrgnuti ELISA testu za detekciju ukupne produkcije mikrocistina uz pomoć komercijalnog kompleta QuantiPlate Kit for Microcystins High Sensitivity (Envirologix Inc., SAD). Eksperiment je sproveden u laboratorijama Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu. Test se bazira na kompeticiji mikrocistina u uzorcima sa enzimom (peroksidaza rena) obeleženim mikrocistinom, prisutnim na površini bunarića ploče, za ograničen broj veznih mesta na antitelima. Kao što je slučaj kod svih kompetitivnih imunitestova, koncentracija ispitivanog agensa u uzorcima je obrnuto proporcionalna intenzitetu boje koja se pojavljuje u bunarićima ploče. Prva, pripremna faza je uključivala odlaganje uzoraka na  $-80^{\circ}\text{C}$  tokom 12h. Nakon otapanja uzoraka u vodenom kupatilu na  $35^{\circ}\text{C}$ , izvršena je disrupcija integriteta cijanobakterijskih ćelija u ultrazvučnom kupatilu u 3 ciklusa po 30 sekundi. Nakon sonikacije, 2 mL svakog uzorka je profiltrirano kroz filtere poroznosti  $0.22\ \mu\text{L}$  kako bi se uklonili suspendovani ćelijski konstituenti. Uzorci pripremljeni na ovaj način su podvrgnuti ELISA testu po uputstvima proizvođača. Svi uzorci, uključujući 4 standarda i negativnu kontrolu su testirani u duplikatima. Spektrofotometrijska merenja su izvršena na talasnim dužinama od 450 i 650 nm pomoću čitača mikrotitar ploča (Asys Expert Plus UV, Biochrom, Velika Britanija). Navedeni opseg detekcije kompleta je 0.1-1.2 ppb. Koncentracije MC-LR ekvivalenta prisutne u testiranim cijanobakterijskim uzorcima su izračunate na osnovu standardne krive i izražene u  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Rezultati dobijeni za soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, koji je poznat producent mikrocistina, su upotrebljeni kao pozitivna kontrola.



### 3.5.2. Utvrđivanje potencijala za produkciju toksina na osnovu prisustva *mcy* gena i drugih genskih klastera odgovornih za biosintezu najznačajnijih grupa cijanotoksina u sekvenciranim genomima sojeva

U okviru ovog istraživanja su prvi put sekvencirani genomi odabranih devet cijanobakterijskih sojeva u cilju detekcije genskih klastera odgovornih za biosintezu najznačajnijih grupa cijanotoksina. Referentni soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 nije uključen kao deo ove faze istraživanja, jer je kompletna sekvenca genoma ovog soja već okarakterisana i dostupna u NCBI (National Center for Biotechnology Information) bazi podataka (ID: 267872) (Frangeul i sar., 2008). Sirovi podaci na osnovu kojih su sprovedene analize su pohranjeni i dostupni u sledećem dokumentu ([https://drive.google.com/drive/folders/1kTXEcMm9OLgBB-4UnsYsEuWB\\_GzV5gED](https://drive.google.com/drive/folders/1kTXEcMm9OLgBB-4UnsYsEuWB_GzV5gED)).

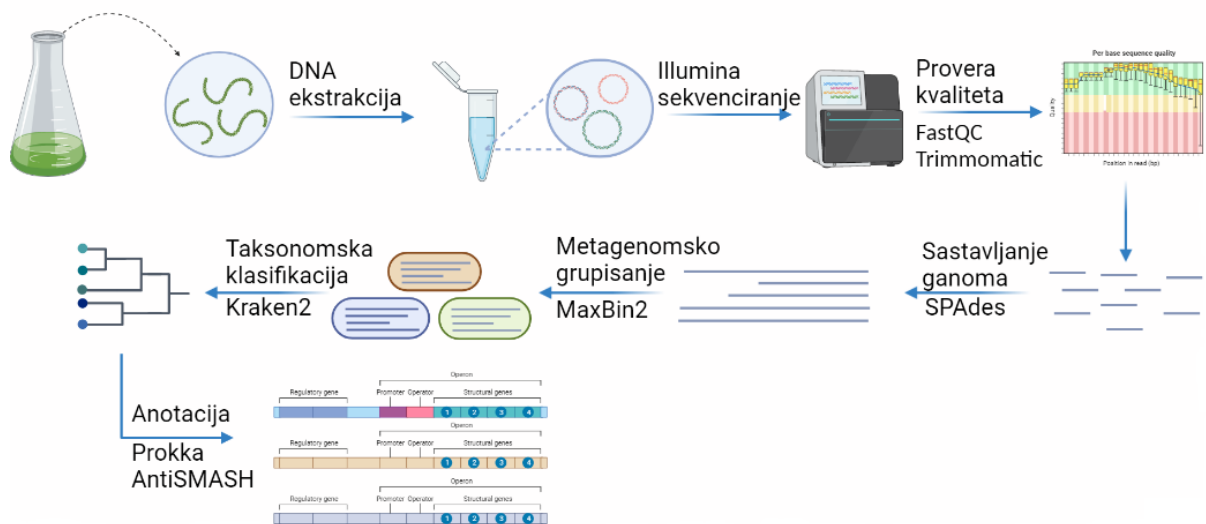
#### 3.5.2.1. Ekstrakcija DNK i priprema za sekvenciranje genoma cijanobakterija

Po 100 mL sveže kulture svakog od sojeva je sakupljeno u sterilne tube od 50 mL i centrifugirano na 6000 g tokom 10 min. Supernatant koji se sastojao iz iskorišćenog BG11 medijuma je odlivan, dok je koncentrovana biomasa u talogu sakupljana i resuspendovana u 5-10 mL svežeg sterilnog medijuma. Iz uzoraka biomase koncentrovane na ovaj način, izdvajano je 1.8 mL za ekstrakciju DNK pomoću komercijalnog kompleta *DNeasy PowerLyzer Microbial Kit* (Qiagen). Protokol ekstrakcije je većinski sproveden po uputstvima proizvođača kompleta, uz prilagođavanje procedure predviđene za liziranje ćelija, kako bi se povećali prinosi DNK, uzela u obzir karakteristike ćelijskih omotača svakog pojedinačnog cijanobakterijskog soja i potencijalna fragmentacija DNK svela na minimum. Biomasa sojeva čije ćelije se teže liziraju usled prisustva rigidnijih omotača (npr. sojevi roda *Oscillatoria*), je zamrznuta u tečnom azotu i homogenizovana pomoću tučka i avana, dok su ćelije preostalih sojeva razbijane pomoću 0.5 g sterilnih silikonskih kuglica dijametra 0.1 mm uz upotrebu homogenizatora (*BeadBug Microtube Homogenizer*, 115V (Benchmark Scientific, SAD)), pri brzini od 2800-3200 rpm tokom 2x20 sekundi. Kvalitet i prinos izolata je određen upotrebom NanoDrop 1000 spektrofotometra (Nanodrop Technologies Inc. Wilmington, SAD) i QFX fluorometra (DeNovix). Uzorci su dodatno analizirani horizontalnom gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Sekvenciranje kompletnih genoma je dalje sprovedeno u dva pristupa:

1. Uzorci svih sojeva su sekvencirani *Illumina* metodom sekvenciranja nove generacije (NGS) uslužno u kompaniji MacroGen Europe (Amsterdam, Holandija). Priprema biblioteka za sekvenciranje pomoću *Illumina* platforme je izvršena koristeći *TruSeq Nano DNA* i *TruSeq DNA PCR Free* komercijalne komplete. Ovom metodom su generisani kratki sirovi fragmenti/očitavanja (raw reads) dužine ~151 bp, uparenih krajeva.
2. Uzorci dva soja koji su se pokazali kao najtoksičniji tokom testiranja (*Oscillatoria* K3 i *Nostoc* LC1B) su dodatno sekvencirani pomoću *PromethION* platforme (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom) prilikom istraživačke posete Školi bioloških nauka na Univerzitetu Kvinslend (Australija). Dodatna provera kvaliteta uzoraka DNK je izvršena pomoću *TapeStation Analysis 4.1.1* (Agilent Technologies) softvera u okviru *Genomic DNK ScreenTape* platforme. Neobrađeni (sirovi) podaci dobijeni nakon nanopore sekvenciranja su konvertovani iz *fast5* u *fastq* format pomoću *Albacore* softvera, koji je deo *MinKNOW* paketa. Ovom metodom su generisani znatno duži sirovi fragmenti dužine ~10.000 bp.

### 3.5.2.2. *De novo* sastavljanje genoma, metagenomsko grupisanje sekvenci i anotacija

Provera kvaliteta sirovih očitavanja dobijenih nakon *Illumina* sekvenciranja je izvršena pomoću *FastQC* softvera (Verzija 0.11.9) (Irews, 2010), nakon čega su sekvence obrađene i profiltrirane pomoću *Trimmomatic* softvera (Verzija 0.36) (Bolger i sar., 2014) i dobijeni prečišćeni fajlovi sa očitavanjima visokog kvaliteta. Za *de novo* sastavljanje genoma upotrebljen je *SPAdes* softver (Verzija 3.15.4) (Bankevich i sar., 2012), čime je postignuto spajanje kratkih očitavanja u duže sekvence, takozvane kontige (*contig*) kao i njihovo povezivanje u skafolde (*scaffolds*) u kojima redosled kontiga odgovara onom prisutnom u originalnom genomu iz kog potiču. Nastavak analiza je zahtevao izdvajanje onih kontiga koji pripadaju genomu ciljnog cijanobakterijskog soja od kontiga poreklom od ostalih bakterijskih grupa iz asocijacije. *Trimmomatic* fajlovi koji su sadržali prečišćena kratka očitavanja i *SPAdes* fajlovi sastojani od sastavljenih kontiga, su upotrebljeni za metagenomsko binovanje (*binning*), odnosno proces grupisanja očitavanja i sastavljenih kontiga u diskretne BIN-ove u odnosu na pripadnost odgovarajućem genomu, odnosno, u grupacije u kojima svaka grupa predstavlja jedan određeni genom. Algoritam *MaxBin2* softvera (Verzija 2.2.7) (Wu i sar., 2016), koji je primenjen u ovu svrhu, koristi nukleotidni sastav (frekvencije tetranukleotidnih sekvenci), pokrivenost kontiga (prosečan broj očitavanja po bazi u okviru kontiga) i prisutstvo gena koji predstavljaju filogenetske markere, kako bi grupisao sekvence u odgovarajuće BIN-ove. Klaster sastavljen isključivo od cijanobakterijskih sekvenci je odabran uz pomoć *Kraken2* softvera (Verzija 2.1.1) (Wood i Salzberg, 2014) koji omogućava pridavanje taksonomskih obeležja sekvencama u okviru BIN-a. Karakteristike odabranog BIN-a, kao što su procenat guanin-citozin parova (GC%), ukupna dužina svih sekvenci (koja bi trebala odgovarati procenjenoj veličini cijanobakterijskog genoma) kao i broj i veličina grupisanih kontiga, su utvrđene pomoću *Quast* softvera (Verzija 5.2.0) (Mikheenko i sar., 2018). Za detaljnu anotaciju i identifikaciju ORF je upotrebljen *Prokka* softver (Verzija 1.14.6) (Seemann, 2014), dok je za detekciju i analizu genskih klastera za biosintezu sekundarnih metabolita korišćen *antiSMASH* softver (Verzija 6.1.1) (Medema i sar., 2011) (Slika 14).



**Slika 14.** Prikaz koraka obrade sirovih očitavanja nakon sekvenciranja, sastavljanja i anotacije cijanobakterijskih genoma

### 3.5.2.3. Procedura hibridnog sastavljanja genoma

Provera kvaliteta sirovih očitavanja dobijenih upotrebom *PromethION* platforme je izvršena pomoću *NanoPlot* softvera (Verzija 1.36.2) (De Coster i sar., 2018). Dobijen je set od 5348994 očitavanja, pri čemu je srednja dužina očitavanja bila 5741.8 za soj *Oscillatoria* K3 i set od 2218310 očitavanja, srednje dužine od 8252.3 za soj *Nostoc* LC1B. Za dobijanje korigovanih kontiga na osnovu sirovih očitavanja, upotrebljen je *Flye* Softver (Verzija 2.9.1) (Kolmogorov i sar., 2020). Genomske sekvence za oba soja su dobijene kombinovanjem podataka dobijenih pomoću dva navedena pristupa, koristeći *Unicycler* softver (Verzija 0.5.0) (Wick i sar., 2017). *Unicycler* pojednostavljuje proces sastavljanja genoma kombinovanjem više alata u jedan sveobuhvatan paket i proizvodi kontige sa manje grešaka u sklapanju od drugih hibridnih asemblera. Softver prvo koristi *SPAdes* alat za sklapanje *Illumina* kratkih očitavanja, uz primenu različitih procedura prečišćavanja kako bi se odredila najjednostavnija struktura prilikom sklapanja sa ispravkama eventualnih grešaka pri čitanju. Nakon toga, *Unicycler* koristi duga očitavanja kako bi se premostile praznine preostale nakon poravnavanja kratkih očitavanja, nakon čega se dobijaju konačne “konsenzus” sekvence. Na ovaj način se istovremeno koriste prednosti oba pristupa, uključujući preciznost koju obezbeđuju kratka očitavanja i pokrivenost koja se dobija primenom dugih očitavanja. Konačno, *Unicycler* koristi *Bowtie2* (Verzija 2.5.0) (Langmead i sar., 2009) i *Pilon* (Verzija 1.20) (Walker i sar., 2014) softvere da poboljša nacrt sklopa, prvenstveno eliminisanjem SNP-ova (*Single Nucleotide Polymorphism*) i indela. Dodatna prednost korišćenja *Unicycler*-a je njegova sposobnost da prepozna komponente genoma kao kružne, što eliminiše potrebu za dodatnim koracima cirkularizacije. Kao i u prethodno opisanoj proceduri, za detekciju i analizu genskih klastera za biosintezu sekundarnih metabolita korišćen je *antiSMASH* softver.

## 4. Rezultati i diskusija

## 4.1. Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na nivou čitavog organizma – biotestovi toksičnosti sa akvatičnim model organizmima

### 4.1.1. Biotest *Daphnia magna* - toksičnost ispitivanih sojeva u testu imobilizacije

Test akutne toksičnosti sa vrstom *D. magna* je upotrebljen kako bi se utvrdio uticaj ispitivanih ekstrakata autohtonih zemljišnih i vodenih sojeva na preživljavanje ove grupe organizama. Rezultati dobijeni u eksperimentima su sumirani u Tabela 8. U kontrolnim grupama nisu zabeleženi letalni efekti nakon 48h izlaganja i pokretljivost test organizama je bila bez vidljivih promena tokom eksperimenta. Kod većine sojeva nisu zabeleženi letalni efekti tokom tretmana i pokretljivost test organizama je ostala nepromenjena do kraja eksperimentalnog perioda. Toksični efekti koji su zabeleženi su u velikoj meri bili zavisni od doze, sa najvišim stepenom imobilizacije primećenim u grupama tretiranim sa 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ekstrakata. Pored toga, efekti su se intenzivirali nakon dužeg izlaganja, jer su samo male promene u preživljavanju dafnija uočene nakon 24 sata, dok je nakon 48 sati stopa mortaliteta dostigla približno 20% kod pojedinih sojeva. Posle 48 sati, letalni efekti su primećeni samo u dve grupe sa najvišim koncentracijama (200 i 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) soja *Nostoc* Z1 i *Oscillatoria* K3, pri čemu stopa mortaliteta u ovim slučajevima nije prelazila 15%. U slučaju soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, efekti su bili nešto izraženiji i uočljivi čak i nakon 24 sata, pri čemu je mortalitet zabeležen samo u slučaju najveće koncentracije ekstrakta soja (2.5%  $\pm$  0.43). Posle 48 sati toksični efekti su se intenzivirali, sa 22.5% (250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i 20% (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) mortaliteta zabeleženog u grupama sa najvišim koncentracijama ekstrakta.

Efekti toksičnih cijanobakterija i prečišćenih cijanotoksina na preživljavanje, reprodukciju i ishranu jedinki roda *Daphnia* nakon akutnog i hroničnog izlaganja su dobro istraženi i opisani u dostupnoj literaturi (Nizan i sar., 1986; Hietala i sar., 1995; Maršalek i sar., 2004; Dao i sar., 2010; Ortiz-Rodríguez i sar., 2012; Pawlik-Skowrońska i sar., 2019). Rezultati većine dosadašnjih istraživanja ukazuju na značajan negativan uticaj cijanobakterijskih metabolita na ove procese kod dafnija i najčešće ih povezuju sa mikrocistinom ili cilindrospermopsinom kao uzročnim agensima. U radu Pawlik-Skowrońska i sar. (2019), utvrđena je akutna toksičnost prečišćenog MC-LR toksina kod jedinki vrste *Daphnia pulex* nakon 24 h izlaganja, sa smanjenjem u stopi preživljavanja do nivoa od približno 80% pri koncentraciji od 1.66  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 60% pri koncentraciji od 3.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . U istom radu, izlaganje anatoksinu-a je izazvalo smanjenje u stopi preživljavanja jedinki na nivo od 33% pri koncentraciji od 1.66  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pokazujući mnogo jači efekat od onog registrovanog u slučaju MC-LR pri istoj koncentraciji. Sa druge strane, Tarczyska i sar. (2001) su definisali vrednosti LC50 (48h) od 511–5705  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za prečišćene ekstrakte cijanobakterija, na osnovu testiranja 17 uzoraka cijanobakterijskog cvetanja sa jedinkama *D. magna*. Međutim, rezultati istraživanja Sotero-Santos i sar. (2006) dobijeni nakon izlaganja jedinki vrste *Daphnia similis* i *Ceriodaphnia silvestrii* ekstraktima dobijenih iz uzoraka cijanobakterijskog cvetanja u kojima je dominirala vrsta *Microcystis aeruginosa* su ukazali na intenzivniju akutnu toksičnost sa LC50 (24h) vrednostima od 186.61 i 155.11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Dodatno, u istraživanju Smutná i sar. (2014), ispitana je akutna i hronična toksičnost ekstrakata dobijenih iz osam uzoraka cijanobakterijskog cvetanja kod jedinki vrste *D. similis* i *C. silvestrii*. Zabeležene su varijacije u intenzitetu akutne toksičnosti u odnosu na tip uzorka gde su se LC50 (48h) vrednosti kretale između 107.9 i >1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Međutim, nakon hroničnog izlaganja (21 dan) utvrđeni su značajno intenzivniji dozno-zavisni letalni efekti i uticaj na reprodukciju test organizama. Rezultati navedenih istraživanja ukazuju na to da nasuprot prečišćenim cijanotoksinima, kada se

radi o cijanobakterijskoj biomasi ili prečišćenim ekstraktima, tip i intenzitet efekata, kao i letalna koncentracija, u velikoj meri zavise od ispitivanog cijanobakterijskog soja, kao i trajanja ekspozicije. Iako su koncentracije ekstrakata primenjene u ovoj doktorskoj disertaciji komparabilne efektivnim koncentracijama opisanim u drugim radovima, nije utvrđen statistički značajan uticaj na preživljavanje jedinki *D. magna*, što može biti posledica relativno kratkog vremenskog perioda izlaganja tokom testova akutne toksičnosti.

**Tabela 8.** Akutna toksičnost cijanobakterijskih DMSO ekstrakata u biotestu *D. magna*, posle 24 i 48h izlaganja.

Naziv soja	Koncentracija ekstrakta ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mortalitet (%)	
		24h izlaganja	48h izlaganja
<b>Anabaena Č2</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	0
<b>Anabaena Č5</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	0
<b>Microcystis PCC 7806</b>	100	0	0
	150	0	$5 \pm 0.5$
	200	0	$20 \pm 1$
	250	$2.5 \pm 0.43$	$22.5 \pm 0.82$
<b>Nostoc 2S1</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	0
<b>Nostoc 2S3B</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	0
<b>Nostoc LC1B</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	0
<b>Nostoc Z1</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	$10 \pm 0.71$
	250	0	$15 \pm 0.50$
<b>Oscillatoria DTD-Bečej</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0

Naziv soja	Koncentracija ekstrakta ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mortalitet (%)	
		24h izlaganja	48h izlaganja
	250	0	0
<b>Oscillatoria K3</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	12.5 $\pm$ 0.43
<b>Oscillatoria Z1</b>	100	0	0
	150	0	0
	200	0	0
	250	0	0

\* Vrednosti su izražene kao srednja vrednost mortaliteta od n = 4 ponavljanja  $\pm$ SD

Relativno niska toksičnost zabeležena u testovima akutne toksičnosti takođe bi mogla biti posledica aktiviranja zaštitnih mehanizama uključenih u detoksikaciju štetnih jedinjenja kod dafnija, što u većini slučajeva može uspešno ublažiti toksične efekte. Drugo moguće objašnjenje za ovakav rezultat se može pronaći u načinu izlaganja test organizama. U ovom radu, jedinke su bile direktno izložene dejstvu bioaktivnih agenasa cijanobakterija rastvorenih u vodenom medijumu. Međutim, usvajanje cijanobakterijskih ćelija koje proizvode cijanotoksine (prvenstveno mikrocistine) putem ishrane je opisano kao primarni mehanizam intoksikacije kod dafnija (Rohrlack i sar., 2005). Varenjem ćelija cijanobakterija oslobađaju se mikrocistini koji se akumuliraju u šupljini srednjeg creva, odakle se mogu transportovati direktno u krvotok. Iako ovo otkriće nije začuđujuće, pošto se dafnije hrane neselektivnom filtracijom i izložene su toksičnim cijanobakterijama u svom prirodnom okruženju, ovaj nalaz direktno povezuje stopu ishrane sa preživljavanjem izloženih dafnija. Stoga se može pretpostaviti da mehanizam intoksikacije drugim cijanobakterijskim toksinima takođe uključuje ishranu. U istraživanju Haney i sar. (1995), smanjena brzina ishrane je utvrđena kod vrste *Daphnia carinata* izložene filtratima soja *Aphanizomenon flos-aquae*, kao i prečišćenom saksitoksinu, što je utvrđeno na osnovu učestalosti pokreta torakalnih izraštaja. Dodatno, primećena je povećana stopa post-abdominalnog odbacivanja akumuliranog materijala, verovatno zbog prisustva toksičnih jedinjenja prisutnih u medijumu. Jedinke su mogle da se oporave do nivoa aktivnosti koji je bio prisutan pre tretmana mnogo brže nakon izlaganja čistom saksitoksinu nego filtratu, što ukazuje na mogućnost interakcije različitih metabolita prisutnih u filtratima kojom se povećava ukupna toksičnost. Pored toga, kontradiktorni rezultati istraživanja interakcije dafnija sa toksičnim cijanobakterijama mogu se objasniti sposobnošću ovih organizama da razviju toleranciju na toksine cijanobakterija, koji su često prisutni u njihovom prirodnom okruženju. Postoje indikacije o promenjenoj osetljivosti ovih životinja na cijanotoksine, posebno nakon što su prethodno bile izložene određenim metabolitima cijanobakterija ili ćelijskim konstituentima (Nandini, 2000; Gustafsson i Hansson, 2004; Lindsay i sar., 2006). Značajan uticaj na preživljavanje, rast i reprodukciju primećen je kod *D. magna* jedinki izloženih soju *M. aeruginosa* (Gustafsson i Hansson, 2004). Takođe je utvrđeno da test organizmi koji su prethodno bili izloženi toksičnom soju pokazuju povećanu toleranciju (preživljavanje i brzinu rasta) na toksične efekte, što implicira da su dafnije sposobne da se prilagode prisustvu toksičnih sojeva roda *Microcystis*, ukoliko su im obezbeđeni odgovarajući uslovi za aklimatizaciju (Ortiz-Rodríguez i sar., 2012). Negativan efekat na preživljavanje i fekunditet je utvrđen i kod jedinki vrste *D. pulex* nakon izlaganja

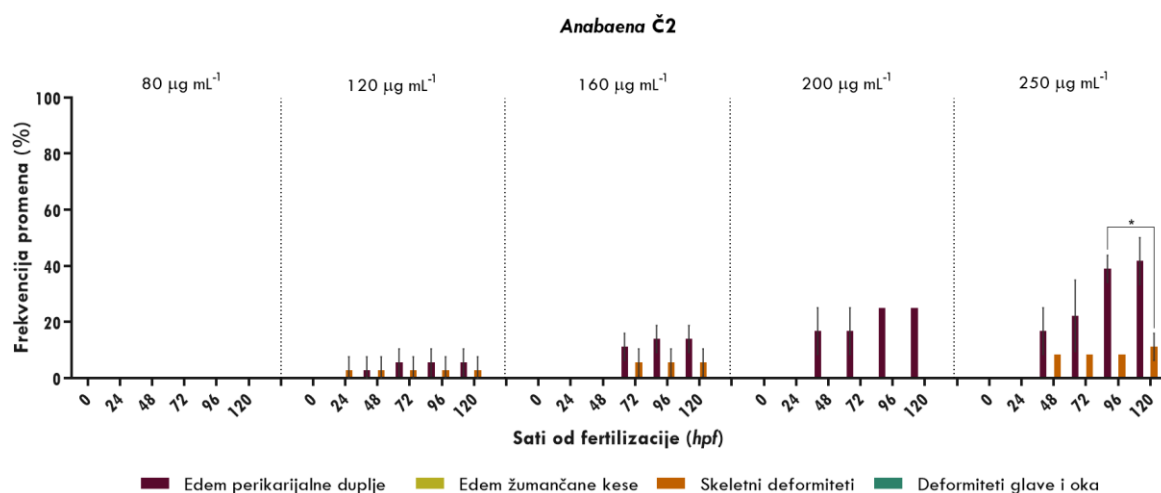
filamentima sojeva *Anabaena flos-aquae* i *A. affinis*, kao i prečišćenom anatoksinu-a (Claska i Gilbert, 1998).

#### 4.1.2. Biotest *Danio rerio* - toksičnost ispitivanih sojeva u testu embriona zebrice

U ovom radu je sprovedeno ispitivanje uticaja ekstrakata 10 cijanobakterijskih sojeva na embryo-larvalni razvoj jedinki vrste *Danio rerio*. Uočeni efekti koji su se najčešće javljali kao posledica tretmana ekstraktima cijanobakterija su grupisani u četiri osnovne kategorije: edemi perikardijalne komore, edemi žumančane kese, skeletni deformiteti (lordoza, kifoza, skolioza i zakrivljenost repa) i deformiteti glave i oka. Dodatno je praćena stopa izleganja, odnosno, tretmanom izazvana pojava preranog ili zakasnelog izlaska jedinki iz horiona. U kontrolnim grupama je zabeležen normalan razvoj embriona na osnovu opisa dostupnog u Kimmel i sar. (1995) i broj zabeleženih malformacija nikada nije prelazio 10%. Rezultati ispitivanja na ovom modelu ukazuju na potencijal odabranih sojeva da izazovu niz subletalnih toksičnih efekata kod izloženih embriona u različitim fazama razvoja. Utvrđene su značajne razlike u izazvanim efektima između ekstrakata različitih sojeva. Dodatno, za ekstrakte gotovo svih ispitanih sojeva je utvrđena vremenski i dozno-zavisna toksičnost.

Abnormalnosti u razvoju su primećene kod jedinki izloženih ekstraktima soja **Anabaena Č2** pri koncentracijama većim od  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pri čemu je pojava perikardijalnog edema bila najosetljiviji pokazatelj toksičnog dejstva (Slika 15A). Ovaj efekat je bio primetan već nakon 48 sati izlaganja, i često je praćen zakrivljenjima kičme (lordoza) i repa. Ukupna stopa malformacija je značajno odstupala od kontrole samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 96 sati od fertilizacije, gde su deformiteti bili najizraženiji i utvrđeni kod preko 40% testiranih jedinki. Dodatno, zakasnelo izleganje ili odsustvo izleganja do kraja eksperimentalnog perioda primećeno je kod jedinki tretiranih najvišim koncentracijama ekstrakta ( $200$  i  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Slika 15C). Nije bilo moguće odrediti EC50 vrednosti za posmatrane kategorije efekata, jer frekvencija njihove pojave nije prelazila 40% u primenjenom opsegu koncentracija ( $\text{EC}_{50} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Međutim, za indikatore toksičnog dejstva kao što su pojava edema perikardijalne duplje i skeletnih deformiteta utvrđena je granična vrednost EC10 (120hpf) od  $145.04 \mu\text{g mL}^{-1}$  odnosno  $248.15 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 15B).

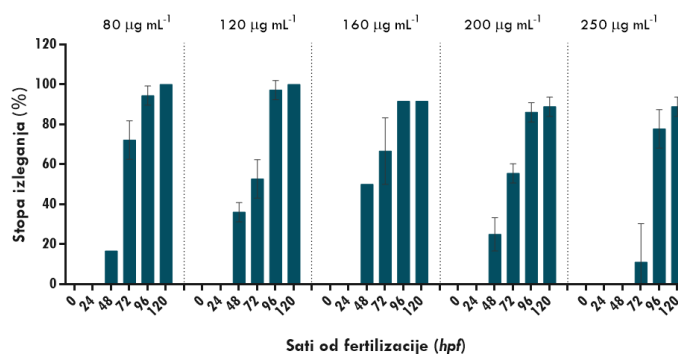
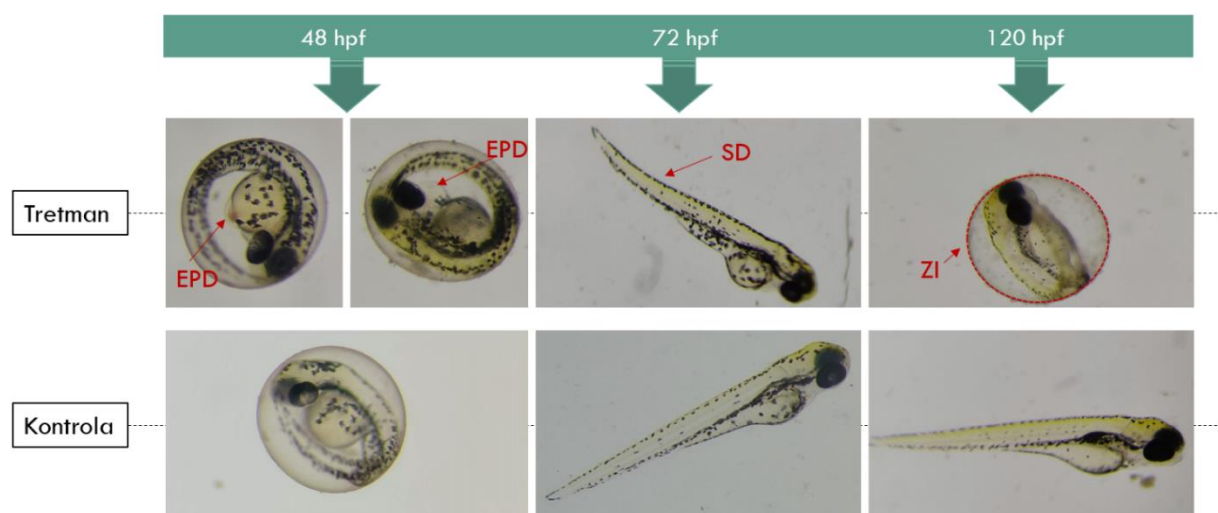
(A)





**(B)**

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	>250	145.04	/	0.93
EŽK	>250	>250	/	1
SD	>250	248.15	/	0.49
OGD	>250	>250	/	1

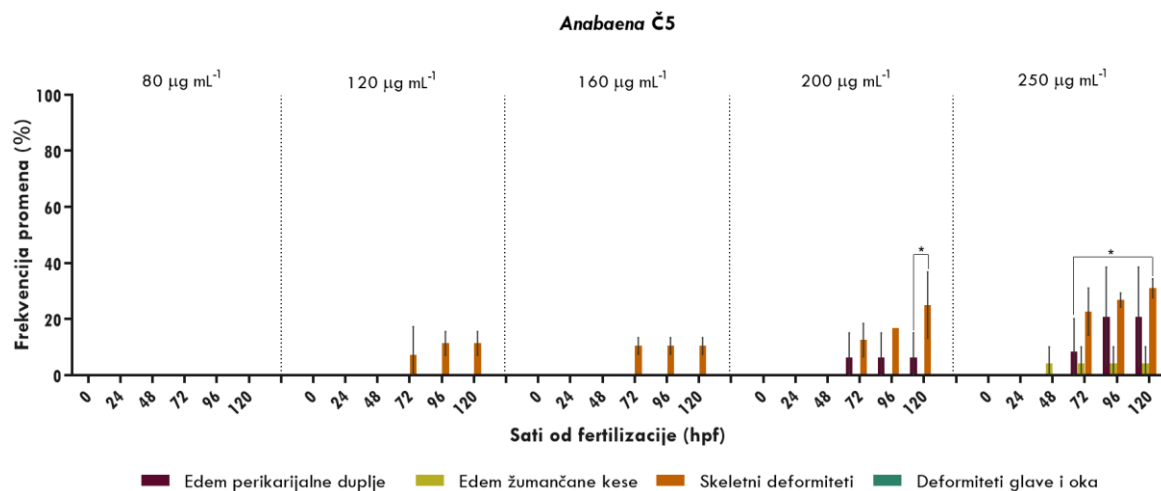
**(C)****(D)**

**Slika 15.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Anabaena Č2* u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. **(A)** Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); **(B)** Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; **(C)** Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; **(D)** Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Deformiteti skeleta su identifikovani kao najosetljiviji parametar prilikom testiranja ekstrakata soja *Anabaena Č5*, dok su preostali zabeleženi efekti uključivali perikardijalne edeme i edeme žumančane kese (Slika 16). Ovi efekti su uglavnom primećeni nakon 72 sata izlaganja i postajali su intenzivniji i brojniji sa produženim tretmanom (Slika 16A). Nakon primene koncentracija ekstrakata nižih od  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , malformacije su primećene kod relativno malog procenta jedinki (7.14-10.41%), pri čemu su zakrivljenost kičme i repa jedini efekti zabeleženi među testiranim grupama u ovom opsegu. Pojava edema perikardijalne duplje kod izloženih jedinki konstatovana je samo nakon primene dve najviše koncentracije ekstrakta, dok su edemi žumančane kese primećeni tek nakon što su embrioni bili izloženi najvišoj koncentraciji ekstrakta ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Utvrđeno je da je stopa pojave subletalnih efekata bila statistički značajna nakon 120 sati izlaganja u grupi od  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  i nakon 72 sata u grupi od  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Utvrđena

je vrednost EC10 (120h) od 185.80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za efekat pojave skeletnih deformitetov, dok ostale granične vrednosti niso mogle biti utvrđene (Slika 16B).

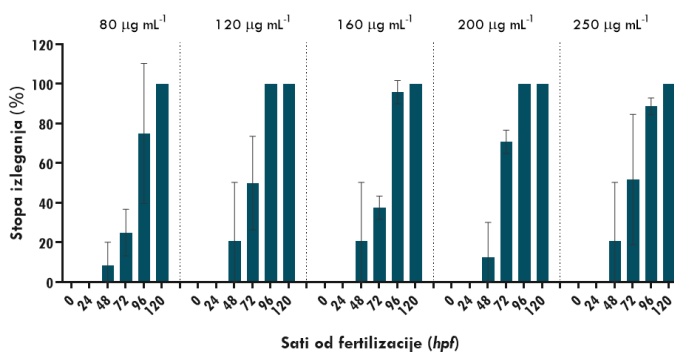
(A)



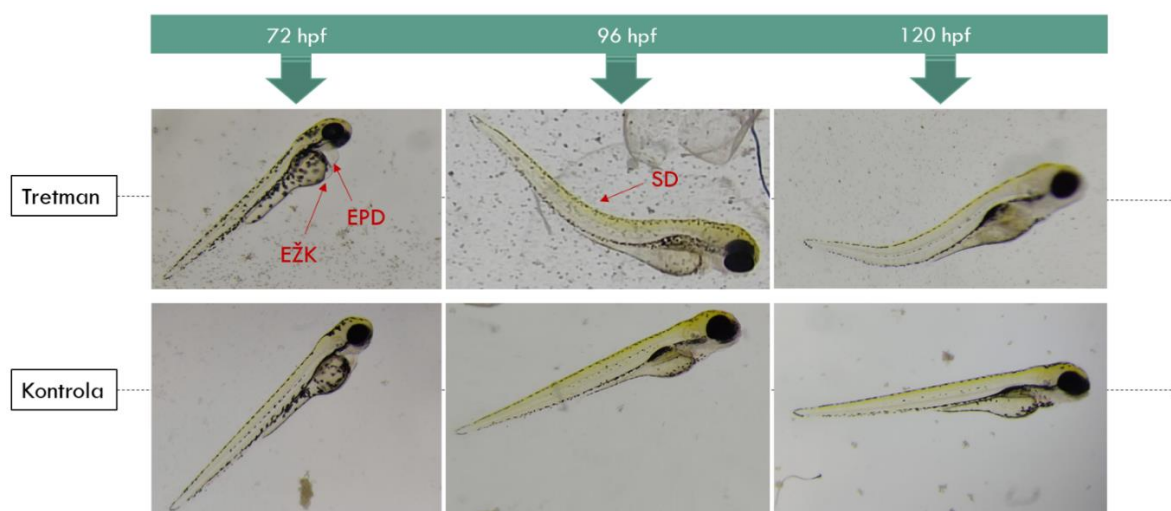
(B)

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	>250	>250	/	0.61
EŽK	>250	>250	/	0.44
SD	>250	185.80	/	0.81
OGD	>250	>250	/	1

(C)



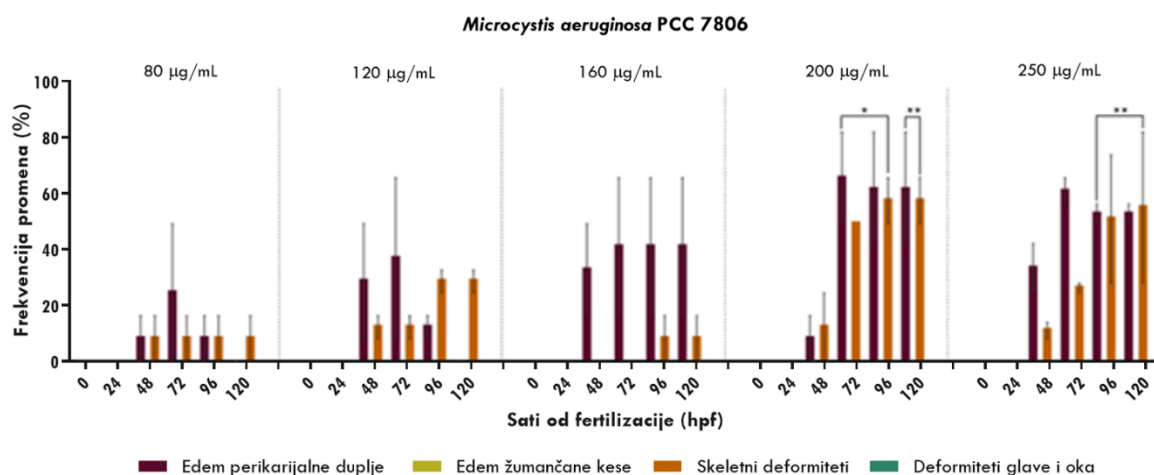
(D)



**Slika 16.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Anabaena Č5* u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. (A) Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); (B) Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; (C) Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; (D) Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: EPD – edem perikardijalne duplje, EŽK – edem žumančane kese, SD – skeletni deformitet, OGD – deformiteti glave i oka, DO – deformitet oka, ZI – zakasnelo izleganje.

Rezultati izlaganja embriona zebriće ekstraktima soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ukazuju na razvojnu toksičnost zavisnu od doze i vremena ekspozicije, pri čemu su edemi perikardijalne duplje i skeletne malformacije bili najučestaliji efekti (Slika 17D). Toksični efekti su zabeleženi pri svim primenjenim koncentracijama ekstrakata. Edemi perikardijalne duplje su primećeni nakon 48 i 72 sata izlaganja kod preko 60% jedinki u grupama izloženim dejstvu dve najveće koncentracije ekstrakta (Slika 17A). Međutim, kod određenog broja ovih jedinki (8.33%) isti efekat je izostao nakon izlaganja do 96 i 120 hpf, što ukazuje da toksični metaboliti nisu dostigli kritičnu koncentraciju da bi izazvali oštećenja ili može biti pokazatelj aktivnosti reparacionih mehanizama, koji su omogućili oporavak od nastalih promena. U većini slučajeva, pojava edema kod izloženih organizama je bila praćena skeletnim malformacijama u vidu lordoze ili zakrivljenosti pupoljka repa, pri čemu je broj ovih promena rastao sa povećanjem koncentracije ekstrakta. Najveći broj skeletnih malformacija je primećen nakon 120 sati izlaganja, pri koncentracijama od 200 i 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . U poređenju sa kontrolnom grupom, efekat tretmana je bio značajno veći samo u grupama izloženim dejstvu dve najveće koncentracije ekstrakta. Na kraju eksperimenta, nakon 120 hpf, na osnovu frekvencije pojave edema perikardijalne duplje utvrđena je granična vrednost EC50 od 166.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dok je za skeletne deformitete EC50 vrednost iznosila 219.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 17B). Vrednost EC10 izračunata na osnovu frekvencije perikardijalnih edema je iznosila 41.43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dok je ista vrednost za skeletne deformitete bila 93.26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

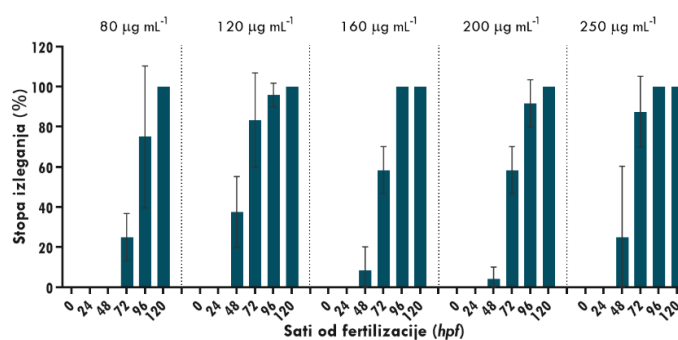
(A)



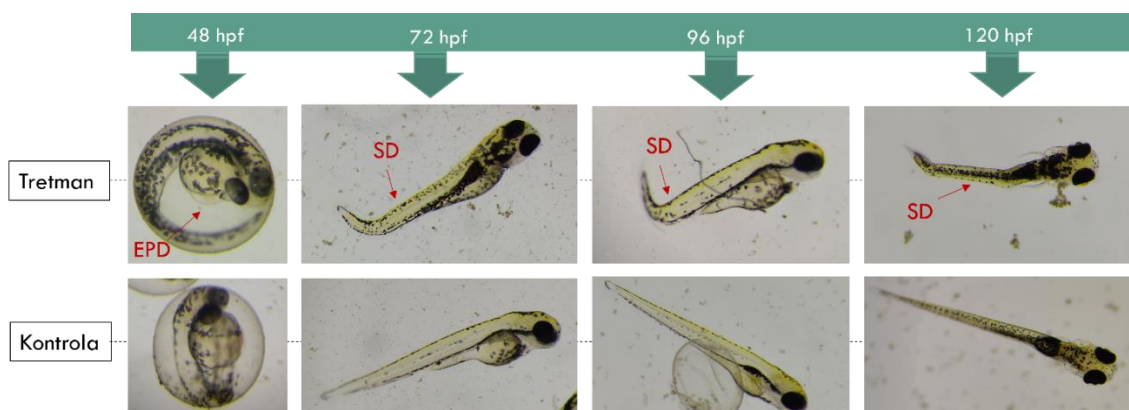
(B)

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	166.3	41.43	98.33 - 224.66	0.31
EŽK	>250	>250	/	1
SD	219.8	93.26	93.39 - 214	0.58
OGD	>250	>250	/	1

(C)



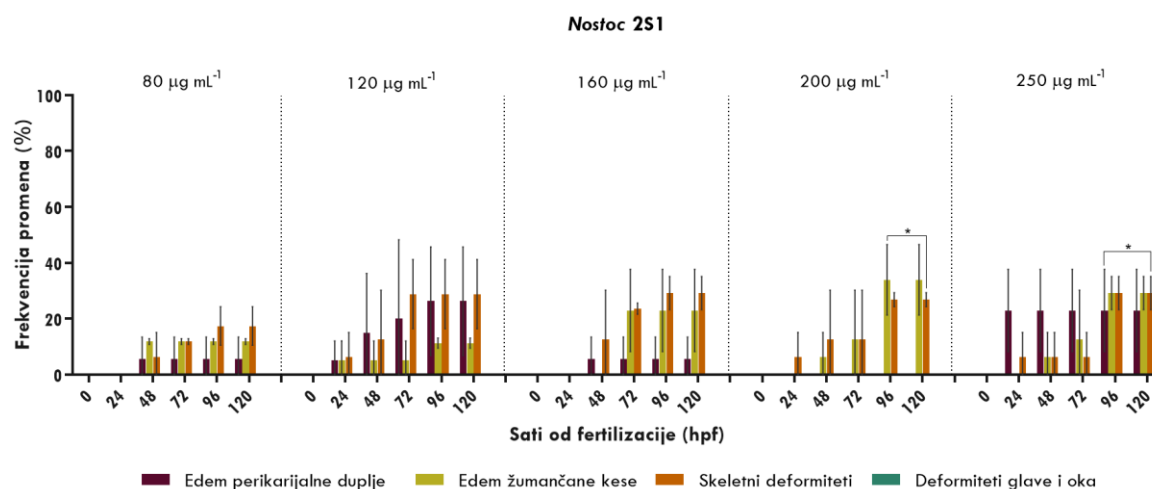
(D)



**Slika 17.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. (A) Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); (B) Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; (C) Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; (D) Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: EPD – edem perikardijalne duplje, EŽK – edem žumančane kese, SD – skeletni deformitet, OGD – deformiteti glave i oka, DO – deformitet oka, ZI – zakasnelo izleganje.

Nakon tretmana ekstraktima soja **Nostoc 2S1**, primećena je pojava skeletnih deformiteta i edema kod izloženih embriona i larvi zebrice (Slika 18D). Broj jedinki kod kojih je primećena zakrivljenost kičme, kao i intenzitet ove promene, su se povećavali sa produženim vremenom izlaganja dejstvu ekstrakata. Pored toga, registrovano je da pojava edema žumančane kese zavisi kako od vremena izlaganja, tako i od visine primenjene doze ekstrakta, pri čemu je značajno povećanje primećeno pri najvišim testiranim koncentracijama (Slika 18A). Sa druge strane, pojava edema perikardijalne duplje je zabeležena u ranijim fazama ekspozicije, između 24 i 72 sata tretmana, nakon čega ova promena više nije bila primetna kod izloženih jedinki. Značajni nivoi toksičnog delovanja u poređenju sa kontrolnom grupom su zabeleženi samo u grupama izloženim dejstvu dve najveće koncentracije ekstrakta i to nakon 96 sati izlaganja. Kako su EC50 vrednosti bile izvan definisanog opsega koncentracija, određena je vrednost EC10 za efekat pojava edema perikardijalne duplje ( $245.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i edema žumančane kese ( $191.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), dok je EC10 vrednost za pojavu skeletnih deformiteta bila niža od najniže primenjene koncentracije (Slika 18B).

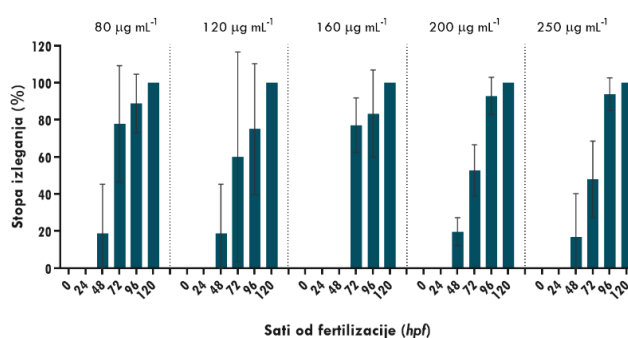
(A)



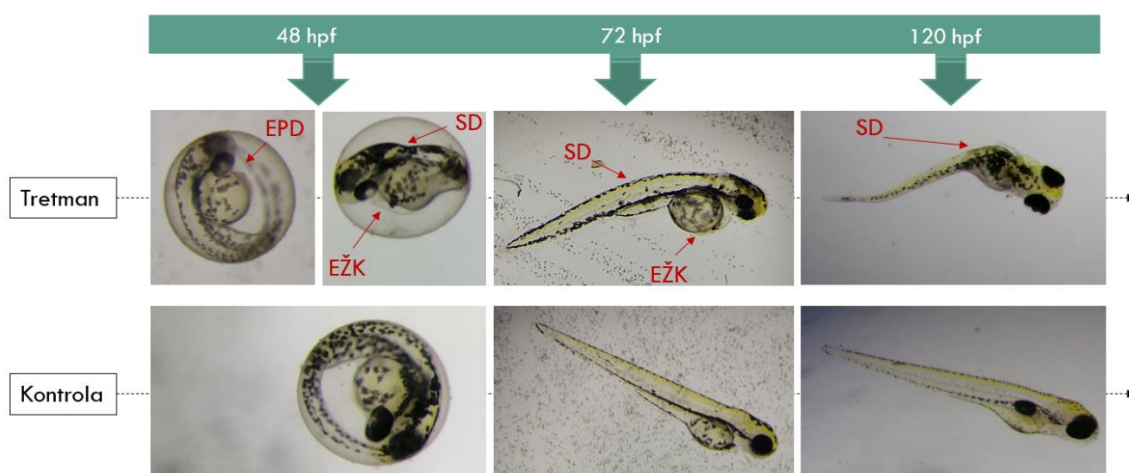
(B)

	LC50	LC10	95% CI	R2
<b>EPD</b>	>250	245.88	/	0.59
<b>EŽK</b>	>250	191.11	/	0.64
<b>SD</b>	>250	<80	/	0.41
<b>OGD</b>	>250	>250	/	1

(C)



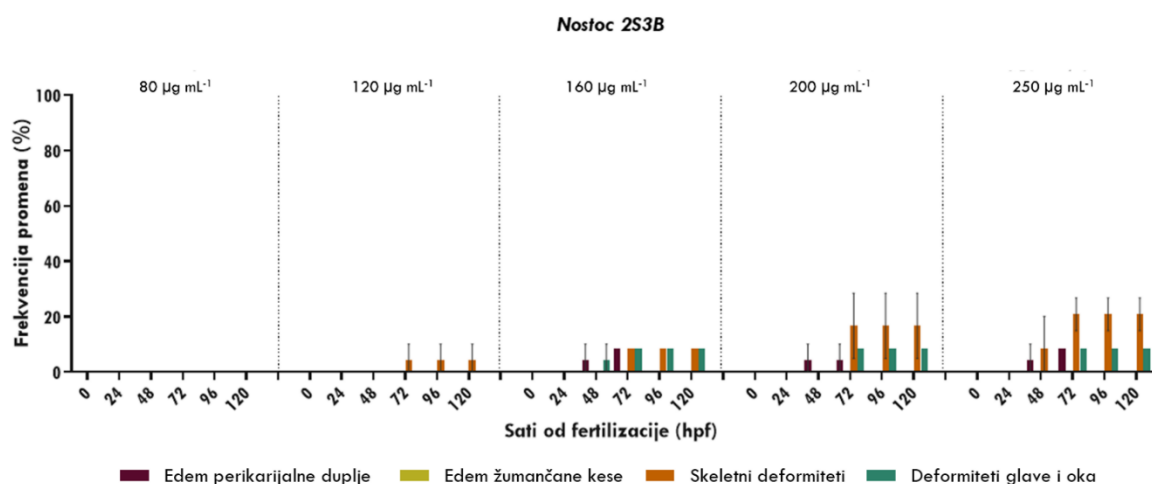
(D)



**Slika 18.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Nostoc 2S1* u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. (A) Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); (B) Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; (C) Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; (D) Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Izlaganje različitim koncentracijama ekstrakta soja *Nostoc 2S3B* rezultiralo je deformitetima skeleta, pri čemu je najveći procenat deformiteta uočen u grupi izloženoj najvišoj koncentraciji ekstrakta nakon 72 sata izlaganja i ostao je nepromenjen do kraja eksperimenta (Slika 19A). Iako su i niže koncentracije (do  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) izazvale toksične efekte, nisu zabeležene značajne razlike u poređenju sa kontrolnom grupom. Edemi perikardijalne duplje su primećeni u grupama većih koncentracija ( $160\text{--}250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), međutim, zabeležene vrednosti nisu prelazile 8.33% i iste promene nisu bile primetne nakon 96 sati izlaganja. U istim koncentracijskim grupama su primećene jedinke slabije razvijenih očiju u odnosu na jedinke u kontrolnoj grupi. Jedinke kod kojih je uočen ovaj tip promene se nisu oporavile do kraja eksperimentalnog perioda. Utvrđena je EC10 vrednost za efekat pojave skeletnih deformacija kod test jedinki, koja je iznosila  $169.55 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 19B). Tokom eksperimenta nisu primećene promene u odnosu na normalnu stopu izleganja (Slika 19C).

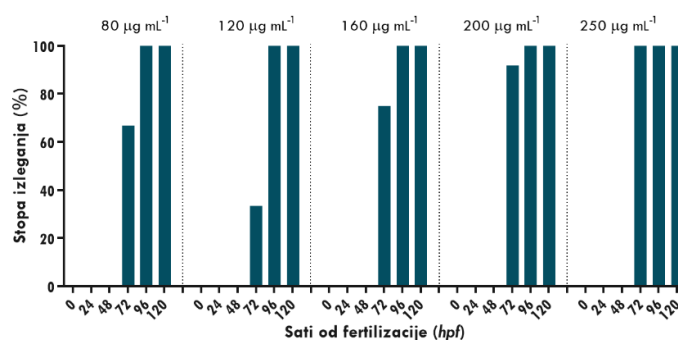
(A)



(B)

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	>250	>250	/	1
EŽK	>250	>250	/	0.66
SD	>250	169.55	/	0.73
OGD	>250	>250	/	1

(C)



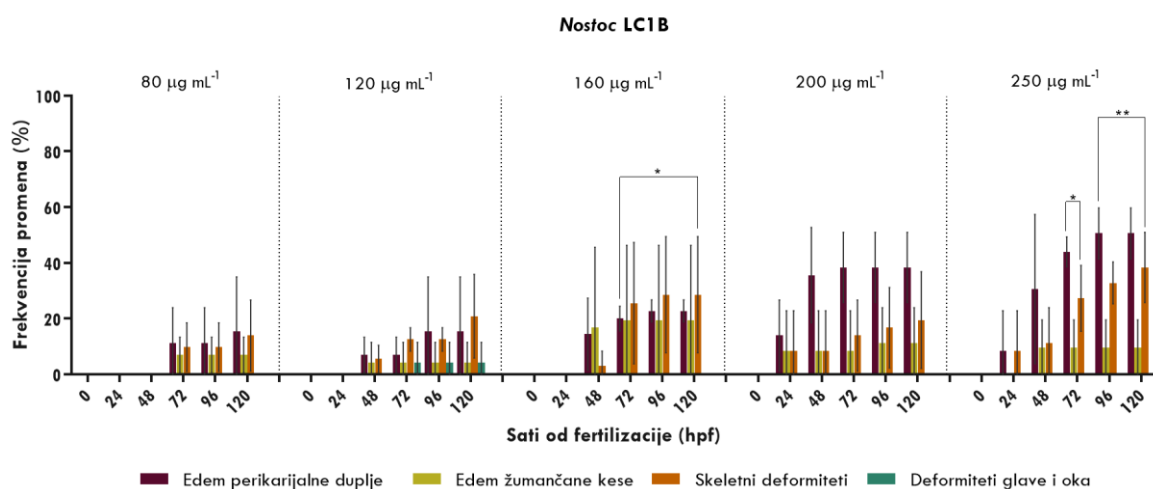
(D)



**Slika 19.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja **Nostoc 253B** u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. **(A)** Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); **(B)** Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; **(C)** Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; **(D)** Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Testiranjem ekstrakata soja **Nostoc LC1B**, utvrđena je dozno-zavisna razvojna toksičnost kod izloženih jedinki, sa izraženim skeletnim i srčanim abnormalnostima (Slika 20D). Rezultati su pokazali da su najizraženije malformacije uočene kod eksponiranih embriona zebriće bile deformacije skeleta, perikardijalni edem i edem žumančane kese, koji su, za razliku od ostalih testiranih sojeva, bili primetni u određenoj meri pri svim ispitivanim koncentracijama ekstrakata. Efekti su bili najizraženiji u opsegu koncentracija od 160-250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pri čemu su statistički značajne promene većinom zabeležene nakon 72 sata izlaganja (Slika 20A). Najčešći štetni efekti primećeni kod jedinki tretiranih ekstraktima ovog soja su bili perikardijalni edemi, koji su zabeleženi kod 50.55% eksperimentalnih organizama u grupama izloženim najvećoj koncentraciji ekstrakta. Pored toga, primećeno je postepeno povećanje u frekvenciji pojave skeletnih deformiteta kod jedinki sa produženim izlaganjem, dostižući maksimalnu vrednost od 38.8% nakon 120 sati izloženosti. Dodatno, utvrđen je uticaj tretmana na stopu izleganja zebrića (Slika 20C). U grupi izloženoj najvećoj koncentraciji, 80% jedinki se izleglo pre kraja eksperimenta, a samo 65% se izleglo pre vremenske tačke od 96 sati. Pri koncentraciji ekstrakta od 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , izleganje je izostalo kod približno 10% izloženih jedinki. Granična EC50 vrednost nije mogla biti izračunata u datom opsegu koncentracija. Međutim, EC10 vrednosti su utvrđene za efekte edema perikardijalne duplje i skeletne deformitete i iznosile su 87.6 i 53.96  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ekstrakta (Slika 20B).

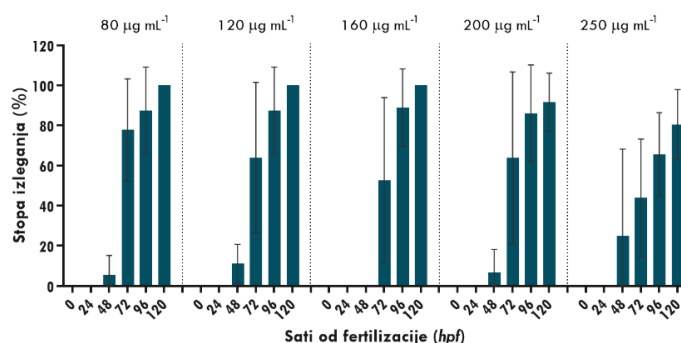
(A)



(B)

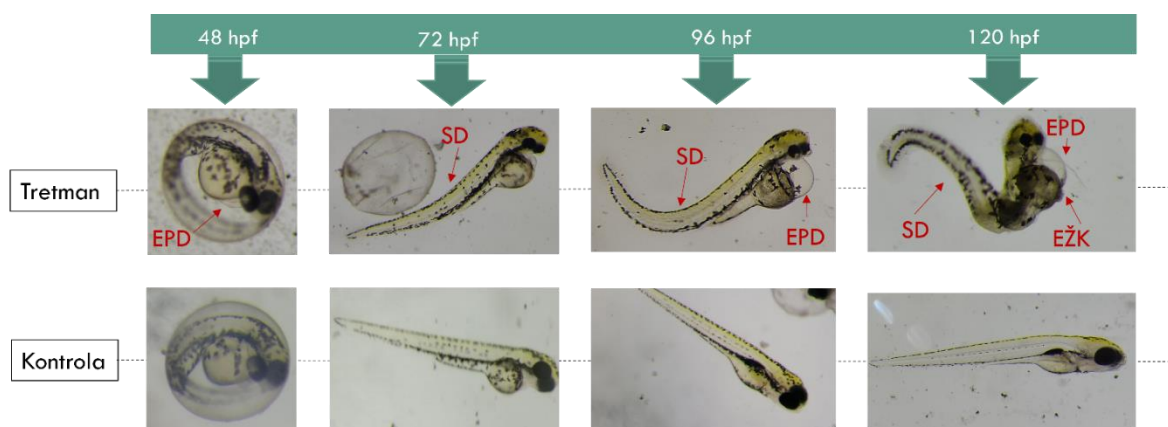
	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	>250	87.60	/	0.58
EŽK	>250	>250	/	0.08
SD	>250	53.96	/	0.64
OGD	>250	>250	/	0.10

(C)





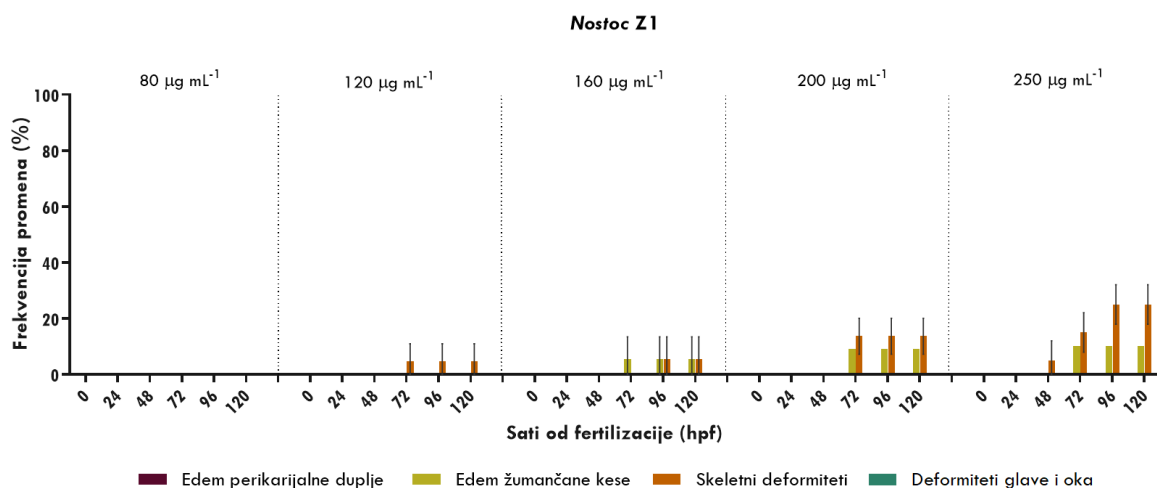
(D)



**Slika 20.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja **Nostoc LC1B** u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. **(A)** Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); **(B)** Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; **(C)** Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; **(D)** Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Izloženost embriona ekstraktima soja **Nostoc Z1** rezultirala je dozno-zavisnom toksičnošću (Slika 21A). Zapaženi razvojni abnormaliteti kod izloženih larvi su uključivali deformacije skeleta i edeme žumančane kese (Slika 21D). Incidencija deformacija skeleta nije prelazila 25%, a pojava edema žumančane kese nije prelazila 10% ni u jednoj od ispitivanih grupa. Međutim, utvrđeno je da se intenzitet uočenih promena povećava sa primenjenom koncentracijom ekstrakta. Promene su bile приметne tek nakon 72 sata izlaganja dejstvu ekstrakata, međutim, nakon ove vremenske tačke nije bilo većih promena u broju i intenzitetu malformacija. Na osnovu rezultata statističkog testa, ni u jednoj od eksperimentalnih grupa nije izračunata značajna razlika u incidenci ukupnih deformiteta. Referentne EC50 vrednosti su bile izvan primenjenog opsega koncentracija ekstrakta, međutim, za efekat skeletnih deformiteta je utvrđena EC10 vrednost od  $204.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 21B).

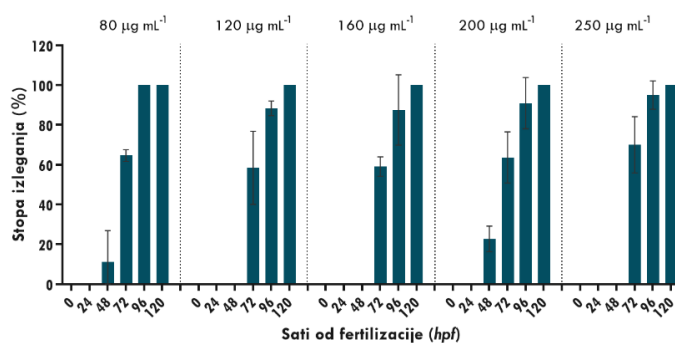
(A)



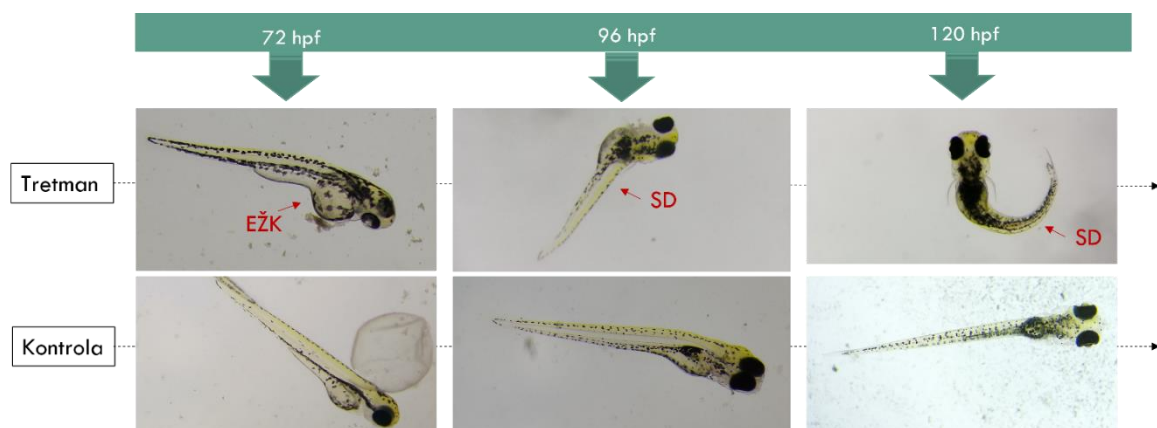
(B)

	LC50	LC10	95% CI	R2
EPD	>250	>250	/	1
EŽK	>250	>250	/	0.74
SD	>250	204.9	/	0.78
OGD	>250	>250	/	1

(C)



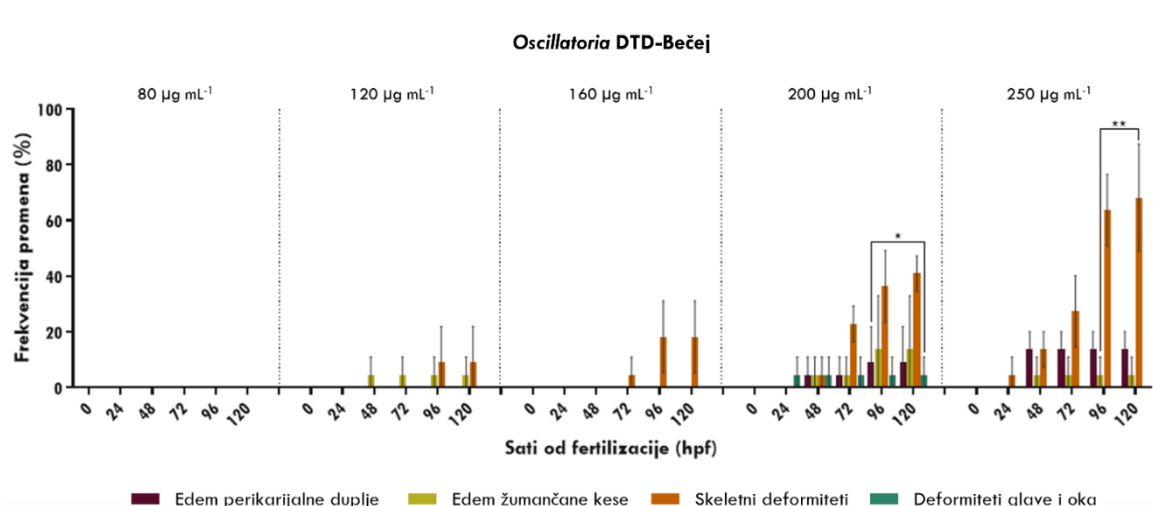
(D)



**Slika 21.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja **Nostoc Z1** u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. (A) Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); (B) Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; (C) Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; (D) Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Subletalni efekti izloženosti različitim koncentracijama ekstrakta soja **Oscillatoria DTD-Bečej** na embrione zebrice su uključivali prvenstveno deformacije skeleta u vidu zakrivljenosti kičme i repa (Slika 22D). Primećeni su takođe edemi perikardijalne duplje, edemi žumančane kese, kao i deformiteta oka kod pojedinih jedinki, ali u znatno manjem broju embriona u odnosu na ostale primećene promene. Pojava skeletnih deformiteta, koji su se manifestovali u vidu lordoze i zakrivljenja pupoljka repa, bila je najčešća u grupama izloženim koncentracijama ekstrakta od 200 i 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 22A). Ovaj tip efekta je prvi put uočen nakon 48 sati izlaganja u malom procentu (4.5%) u obe grupe, pri čemu su do kraja eksperimenta skeletni deformiteti uočeni kod 40.9% jedinki pri koncentraciji od 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 68.18% jedinki pri koncentraciji od 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Uočene kičmene malformacije nisu bile prisutne u grupi sa najnižom koncentracijom ekstrakta, dok su u koncentracijama nižim od 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  bile uočljive kod manje od 20% izloženih zebrica do kraja eksperimenta. Perikardijalni edemi su uočeni u ranijim tačkama merenja (48 i 72 hpf), međutim, nije bilo vidljivih efekata ovog tipa nakon 96 sati izlaganja, što ukazuje na reverzibilnu prirodu ove promene. Dobijena EC50 (120 hpf) vrednost za efekat pojave skeletnih deformiteta kod test jedinki je iznosila 162.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 22B).

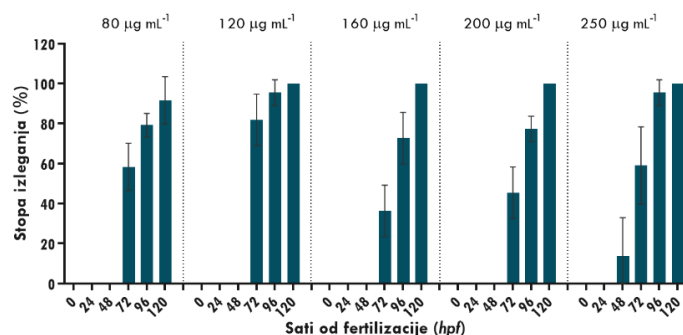
(A)



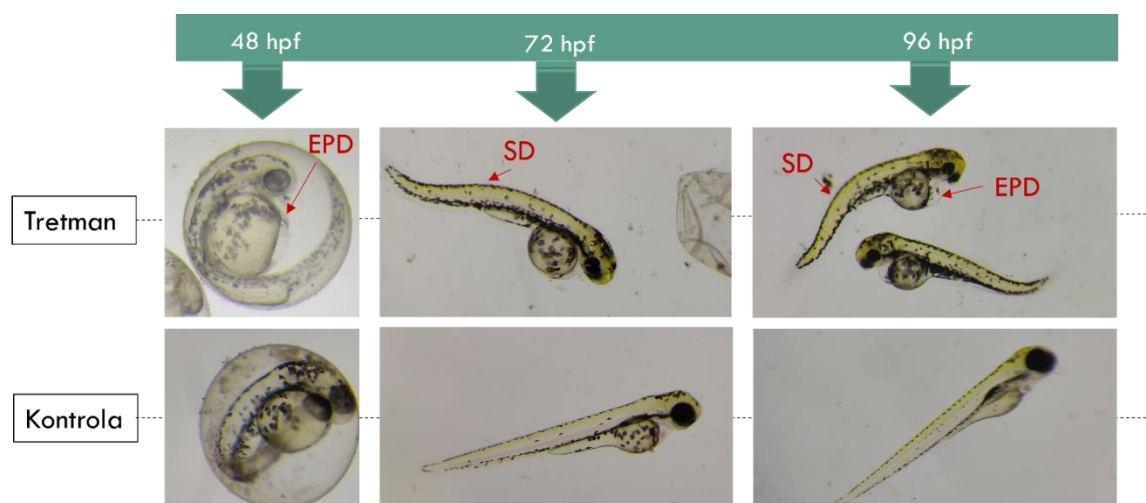
(B)

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	>250	225.97	/	0.55
EŽK	>250	>250	/	0.08
SD	162.5	79.67	/	0.60
OGD	>250	249.50	/	0.16

(C)



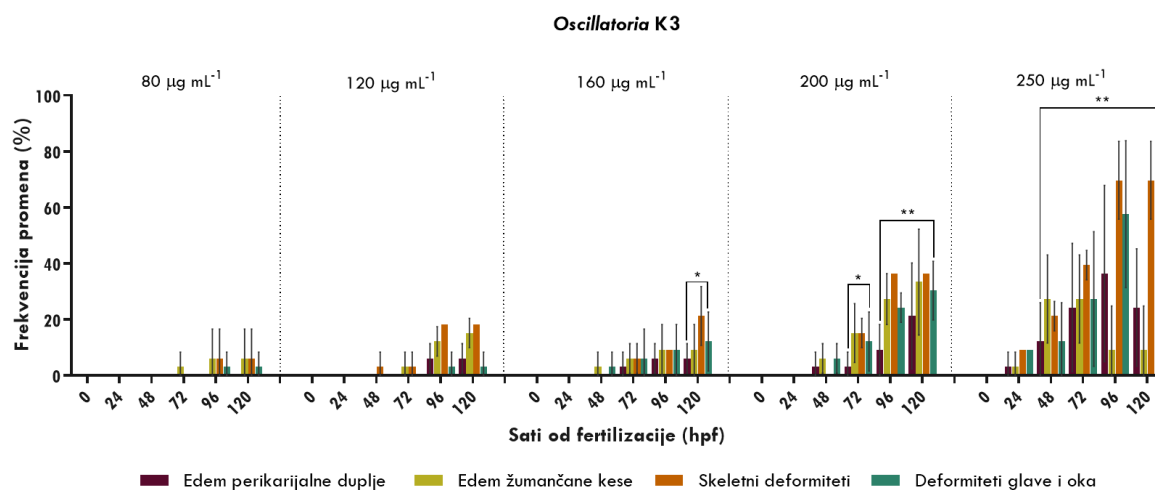
(D)



**Slika 22.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Oscillatoria DTD-Bečej* u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. **(A)** Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); **(B)** Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; **(C)** Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; **(D)** Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Razvojni deformiteti nastali kao rezultat izlaganja ekstraktima soja *Oscillatoria K3* uključivali su deformitete kičme u vidu skolioze, lordoze i zakrivljenosti repnog pupoljka, kao i smanjenu veličinu oka i edeme žumančane kese koji su uočeni u svim koncentracijskim grupama, dok su perikardijalni edemi primećeni nakon primene koncentracija većih od  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 23A, Slika 23D). Trend smanjenja broja i intenziteta edema sa produženim izlaganjem zabeležen kod nekih od prethodno spomenutih sojeva je primećen i kod ovog soja u grupama izloženim dejstvu dve najveće koncentracije ekstrakta. Pri nižim koncentracijama, procenat jedinki sa ovim tipom promene nije prelazio 33.38%. Procenat test organizama sa uočljivom skoliozom i lordozom bio je posebno visok nakon izlaganja ekstraktima ovog soja, dostižući do 69.6% u grupi izloženoj najvećoj primenjenoj koncentraciji ekstrakta. Kod izloženih larvi je takođe uočen usporen ili zaustavljen razvoj očiju, u odnosu na kontrolnu grupu jedinki. Ovaj tip toksičnog efekta je zabeležen kod 60.6% jedinki u tretmanu sa najvećom koncentracijom. Dodatno, iako su stopa i vreme izleganja tekli očekivano, približno 15% embriona nije izašlo iz horiona do kraja eksperimenta (Slika 23C). Granične vrednosti EC50 ( $120 \text{ hpf}$ ) su izračunate za efekte skeletnih ( $215.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i deformiteta glave i oka ( $231.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Slika 23B). Vrednosti EC10 su dobijene za sve tipove malformacija i iznosile su  $163.65 \mu\text{g mL}^{-1}$  (EPD),  $121.51 \mu\text{g mL}^{-1}$  (EŽK),  $120.22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (SD),  $154.78 \mu\text{g mL}^{-1}$  (OGD).

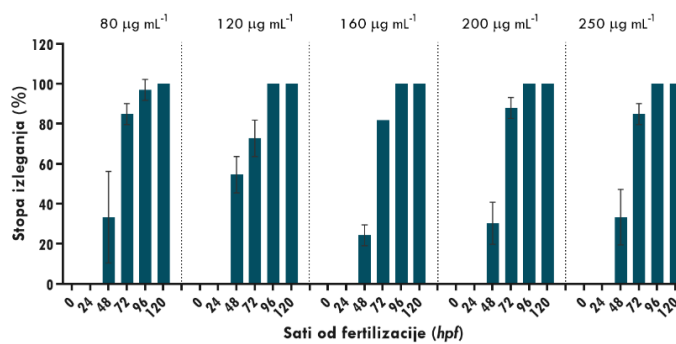
(A)



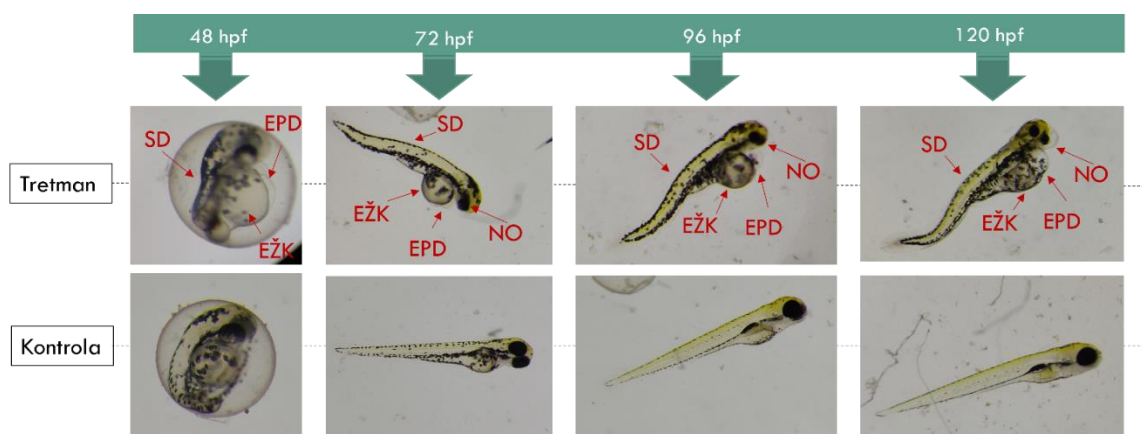
(B)

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	>250	163.65	/	0.47
EŽK	>250	121.51	/	0.39
SD	215.6	120.22	198.3	0.83
			240.8	
OGD	231.7	154.78	212.2	0.75
			266.2	

(C)



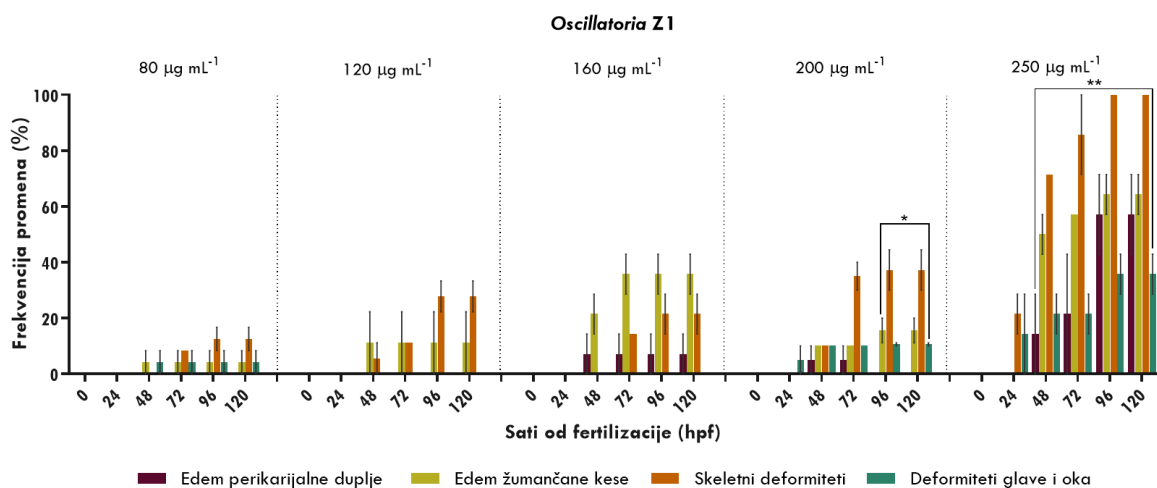
(D)



**Slika 23.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Oscillatoria K3* u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta. **(A)** Frekvencija 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena u zavisnosti od vremena izlaganja i koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); **(B)** Granične efektivne vrednosti EC50 i EC10, 95% interval poverenja (95% CI) za EC50 vrednost i R-kvadrat; **(C)** Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; **(D)** Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Skraćenice: **EPD** – edem perikardijalne duplje, **EŽK** – edem žumančane kese, **SD** – skeletni deformitet, **OGD** – deformiteti glave i oka, **DO** – deformitet oka, **ZI** – zakasnelo izleganje.

Najzastupljenija promena prouzrokovana izlaganjem test organizama ekstraktima soja *Oscillatoria Z1* je bila pojava skeletnih deformiteta (Slika 24D). U grupama koje su bile izložene najvećoj koncentraciji ekstrakta, skeletni deformiteti su primećeni kod 100% jedinki nakon 120 sati izlaganja, dok je 21.4% registrovano nakon 24 sata izlaganja u istoj grupi (Slika 24A). Ovaj tip promene se manifestovao u vidu skolioze, lordoze i zakrivljenosti pupoljka repa, koji su bili primetni nakon 48 sati tretmana, pre izlaska jedinki iz horiona. Pored toga, kod velikog broja jedinki je primećena pojava edema žumančane kese (64.28% pri koncentraciji od 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i edema perikardijuma (57.14% pri koncentraciji od 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pri čemu su ove promene takođe bile primetne od 48. sata izlaganja i postajale su intenzivnije i brojnije sa dužim vremenom ekspozicije. Kod određenog broja jedinki (35.71% pri koncentraciji od 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), primećena je pojava očiju manjih dimenzija u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na nepravilan ili usporen razvoj očiju. Referentne EC50 (120 hpf) vrednosti su izračunate za efekat pojave edema perikardijalne duplje (244.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), edema žumančane kese (237.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i skeletnih deformiteta (199.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). U slučaju efekta pojave deformiteta glave i oka, utvrđena je granična EC10 (120 hpf) vrednost (201.06  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), dok je EC50 vrednost bila izvan testiranog opsega koncentracija (Slika 24B). Ekstrakti ovog soja su imali najizraženiji uticaj na izleganje ispitivanih organizama u odnosu na sve testirane sojeve (Slika 24C). U grupi tretiranoj najvećom koncentracijom ekstrakta, kod 30% jedinki nije došlo do izleganja do kraja eksperimentalnog perioda, dok je pri koncentraciji od 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inhibirano izleganje 15% jedinki.

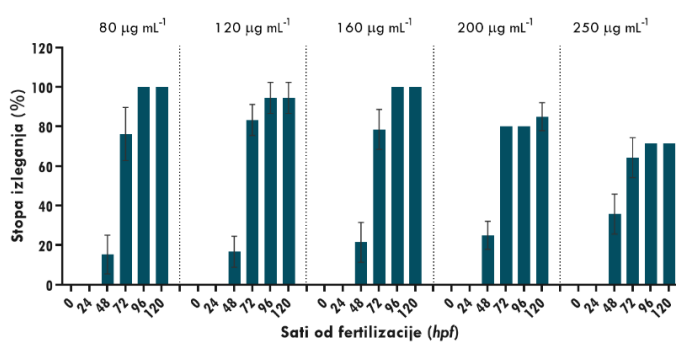
(A)



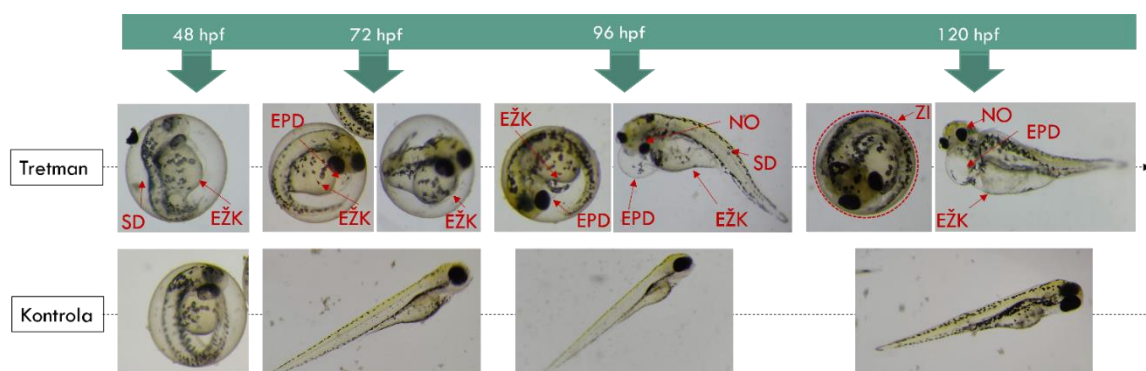
(B)

	EC50	EC10	95% CI	R2
EPD	244.7	207.53	232.8	0.87
			-	
EŽK	237.6	117.85	194.9	0.62
			-	
SD	199.6	149.42	157.5	0.71
			-	
OGD	>250	201.06	/	0.90

(C)



(D)



**Slika 24.** Rezultati testiranja akutne toksičnosti ekstrakata soja *Oscillatoria* Z1 u biotestu sa embrionima vrste *D. rerio*. Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti 3 ponavljanja  $\pm$  SD, dok su vrednosti predstavljene u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta (A) Frekvencija pojave 4 najzastupljenije kategorije subletalnih promena beleženih u funkciji vremena izlaganja i primenjene koncentracije ekstrakta. Zvezdice (\*) označavaju značajne statistički razlike između kontrolne i tretirane grupe utvrđene na osnovu dvosmerne ANOVA analize i Dunnet-ovih post-hoc testova (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ); (B) Granične vrednosti letalnosti LC50 i LC10, 95% interval poverenja (95% CI) dobijen za LC50 vrednost i R-kvadrat.; (C) Stopa izleganja tokom eksperimenta za svaku koncentracijsku grupu; (D) Zabeležene promene kod embriona i larvi u tretman grupama i slike jedinki u kontrolnoj grupi. Korišćene skraćenice: EPD – edem perikardijalne duplje, EŽK – edem žumančane kese, SD – skeletni deformitet, OGD – deformiteti glave i oka, DO – deformitet oka, ZI – zakasnelo izleganje.

U poslednje vreme, zebrice postaju sve popularniji model organizam kada se radi o istraživanju toksičnosti cijanobakterija zbog svoje izuzetne vrednosti u proučavanju subletalnih efekata koji proizlaze iz akutne i hronične izloženosti. Brojne eksperimentalne studije ukazuju na to da cijanobakterijski toksini mogu izazvati značajne promene u embrionalno-larvalnom razvoju vodenih organizama i predlažu upotrebu vrste *Danio rerio* kao adekvatnog model organizma za ispitivanje cijanobakterijske toksičnosti (Lindsay i sar., 2006; Berry i sar., 2009; Ghazali i sar., 2009). Na osnovu EC50 vrednosti određenih u ovom radu, najosetljiviji sub-letalni parametri cijanobakterijske toksičnosti su bili skeletni deformiteti, potom edemi perikardijalne duplje i edemi žumančane kese kao indikatori kardiotoksičnosti i hepatotoksičnosti, zatim deformiteti glave i oka, i na kraju izmenjenu stopu izleganja ili izostanak izleganja, što ukazuje na to da ekstrakti ispitivanih cijanobakterijskih sojeva najveći uticaj imaju na pravilan razvoj tela zebrića. Od deset ispitanih sojeva, najveća toksičnost je zabeležena u slučaju akvatičnih sojeva *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1, gde su najizraženiji efekti uočeni pri koncentracijama ekstrakta od 200 i 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Efekti slični onima opisanim u ovom istraživanju su zabeleženi u radu Wang i sar. (2020), koji su ispitali toksični i teratogeni potencijal različitih koncentracija čistog cilindrospermopsina u testu sa embrionima zebrića. Utvrđeno je da izlaganje višim koncentracijama CYN (20, 200 i 2000 nM) dovodi do značajno usporenog srčanog rada, pojave edema žumančane kese i perikardijuma, kao i telesnih deformiteta kao što su smanjena dužina tela i smanjena veličina očiju. Pored toga, stopa izleganja je značajno smanjena u ovim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom. Kako je ispitivanjem genoma sojeva *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1 takođe utvrđen potencijal za produkciju cilindrospermopsina na osnovu prisustva gena uključenih u biosintezu ovog cijanotoksina (Potpoglavlje 4.5.2), postoji mogućnost da je prisustvo cilindrospermopsina u ispitivanim ekstraktima odgovorno za zabeležene efekte tokom testiranja. Definitivno povezivanje nastalih efekata sa cilindrospermopsinom kao uzročnim



agensom ipak zahteva dodatne hemijske analize kako bi se potvrdila produkcija ovog toksina kod datih sojeva. Slično tome, u istraživanju koje su sprovedi Moraes i sar. (2022), izlaganje dejstvu CYN je rezultiralo smanjenim rastom jedinki i abnormalnostima u razvoju kao što su edem perikardijuma i žumančane kese, kao i odsustvo ribljev mehura. Takođe je utvrđeno da izlaganje koncentracijama CYN od  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  i višim dovodi do povećane smrtnosti ovih organizama u kasnijim fazama razvoja. Dodatno, efekti dva soja vrste *Raphidopsis raciborskii* (T2 i T3), su testirani u hroničnim i akutnim eksperimentima sa larvama zebrice i odraslim jedinkama (Zagatto i sar., 2012). Tokom akutnog testiranja nije utvrđen značajan uticaj nijednog od sojeva na preživljavanje odraslih zebrica, međutim, oba soja su negativno uticala na preživljavanje larvi, uzrokujući do 40% smrtnosti nakon četiri dana izlaganja i 100% smrtnosti do kraja eksperimenta (7 dana). U navedenim istraživanjima, malformacije su se pojavile nakon primene nižih koncentracija cijanobakterijskih metabolita u odnosu na koncentracije primenjene u ovom radu, međutim, spektar uočenih promena je takođe bio manji. Ova razlika može biti posledica primene izdvojenog i prečišćenog cilindrospermopsina, nasuprot neprečišćenim ekstraktima sojeva testiranih u ovom radu koji sadrže mešavinu različitih potencijalno toksičnih metabolita zbog čega može doći do potencijacije, aditivnog ili sinergističkog efekta. Slični razvojni deformiteti su, međutim, takođe zabeleženi kod larvi zebrica direktno izloženih saksitoksinu rastvorenem u tečnom medijumu (Pavagadhi i sar., 2012). U ovom radu, izlaganje embriona koncentraciji od  $481 \pm 40 \mu\text{g L}^{-1}$  rezultiralo je morfološkim abnormalnostima, uključujući edeme očiju, perikardijuma i žumančane kese, zakrivljenost kičme i repa, kao i kraniofacijalne deformitete. Dodatno, primećeni su senzomotorički poremećaji, sa totalnom paralizom koja se manifestovala nakon produženog izlaganja, na šta su razvijeniji embrioni bili posebno osetljivi. Većina subletalnih efekata, uključujući paralizu i fiziološke abnormalitete, se pokazala kao reverzibilna nakon prenošenja larvi u čistu vodu, što je u skladu sa opisanim mehanizmom delovanja saksitoksina. Na osnovu ovih i ranijih zapažanja, autori su zaključili da pojava malformacija kod zebrica može biti povezana sa otežanim kretanjem, što je uzrok neravnoteže tečnosti u organizmu i stoga nastanka edema. Ovaj zaključak je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu, jer su skeletni deformiteti kod jedinki izloženih dejstvu ekstrakata u većini slučajeva bili praćeni pojavom edema. Iako nisu uočene promene koje se mogu pripisati neurotoksičnom delovanju ekstrakata, kao što je paraliza čitavih jedinki (izostanak kretanja), primećeni kičmeni i repni deformiteti su izazvali usporeno ili otežano kretanje kod jedinki pod uticajem. Ekstrakti sojeva *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 i *Nostoc* LC1B su takođe ispoljili visoku toksičnost u testu, pri čemu su edemi perikardijalne duplje i skeletne malformacije bili najčešći i najizraženiji zabeleženi efekti. Pored toga, primećena je kongestija krvi, odnosno, akumulacija krvnih zrnaca u predelu perikardijuma i žumanca. Istraživanja koja se odnose na nastanak malformacija i razvojnu toksičnost mikrocistina nakon direktnog izlaganja embriona zebrice su brojna i dok su neki od prvih eksperimentalnih rezultata pružili vrlo malo dokaza o takvim efektima (Oberemm i sar., 1997), novije studije ukazuju na pojavu značajnih razvojnih defekata kod izloženih jedinki. Wang i sar. (2005) su pokazali da prečišćen MC-LR nakon mikroinjekcije uzrokuje uginuće embriona na dozno i vremenski zavisna način i pojavu malformacija kod preživelih jedinki. Slično rezultatima dobijenim u ovom radu za ekstrakte soja *M. aeruginosa* PCC 7806, među najčešćim razvojnim defektima su se javljali edemi perikardijalne duplje i skeletni deformiteti (prvenstveno zakrivljenje repa) koji su se pogoršavali sa produženim izlaganjem. Vrlo je verovatno da horionska membrana onemogućava prodor mikrocistina u određenoj meri, što bi moglo objasniti odsustvo letalnog efekta i manji intenzitet malformacija u našem istraživanju. U istraživanju Oberemm i sar.

(1999), pokazalo se da ekstrakti cijanobakterija mogu imati mnogo izraženije efekte na zebrice od efekata dobijenih tretmanom čistim cijanotoksinima, što se može objasniti prisustvom do sada neidentifikovanih toksičnih elemenata u ćelijama cijanobakterija, kao i sinergističkim dejstvom smeše toksičnih metabolita u ispitivanim ekstraktima. Ovo nije jedini slučaj da su takva zapažanja objavljena. Na primer, Keil i sar. (2002) su testirali toksičnost ekstrakata pripremljenih iz uzoraka cvetanja vrste roda *Planktothrix* kod embriona i larvi zebrice, nakon čega je utvrđeno da indukovani toksični efekti nisu bili u korelaciji sa sadržajem mikrocistina u ekstraktima. Ekstrakti su značajno uticali na razvoj embriona uzrokujući malformacije, a takođe su uticali na stopu izleganja i izazivali prevremeno izleganje i usporavanje rasta jedinki. Pored toga, u istraživanju Nunes de Freitas i sar. (2023), utvrđeno je da mikrociklamid, cijanopeptid koji proizvodi cijanobakterijski soj vrste *Microcystis aeruginosa*, izaziva letalne efekte i kardiotoksičnost embriona zebrice u koncentraciji od  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pri čemu je izračunata LC50 vrednost od  $42.98 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nisu primećene teratogene promene do 96 sati pri koncentracijama od 1 do  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ali su promene u razvoju srca (perikardijalni edemi) primećene kod svih izloženih larvi pri koncentraciji od  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Slični efekti su utvrđeni i u ovom istraživanju, u najvećoj meri nakon primene ekstrakata sojeva *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 i *Nostoc* LC1B, što bi moglo biti posledica sličnosti u metaboličkim putevima i produkcije srodnih toksičnih metabolita. Pored toga, u istraživanju Jaja-Chimedza i sar. (2017) je utvrđeno da izlaganje karotenoidnim glikozidima i retinolnoj kiselini poreklom iz cijanobakterija može izazvati malformacije u embrionima zebrice, koje karakteriše opšti nedostatak diferencijacije glave, očiju i repa, kao i inhibirana migracija i nepravilna agregacija melanofora, a da intenzitet ovih promena zavisi od primenjene doze ekstrakta.

Na osnovu dobijenih rezultata, izdvojene kategorije efekata koji su se najčešće javljali kod zebrica kao posledica tretmana ekstraktima cijanobakterija (edemi perikardijalne komore, edemi žumančane kese, skeletni deformiteti (zakrivljenost kičme i/ili repa), deformiteti glave i oka, stopa izleganja), predstavljaju osetljive parametre za detekciju i karakterizaciju cijanobakterijske toksičnosti. Utvrđena je dozna i vremenska zavisnost frekvencije promena koje su se javljale kod izloženih organizama i toksični efekti zabeleženi u ovom istraživanju su u velikoj meri u skladu sa rezultatima dostupnih istraživanja u kojima su ispitivani efekti cijanotoksina cilindrospermopsina i mikrocistina kod embriona i larvi zebrica. Najveća toksičnost je utvrđena u slučaju vodenih sojeva *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1 i zemljišnog soja *Nostoc* LC1B, kod kojih su praćene malformacije zabeležene kod preko 50% izloženih jedinki. Iako nije utvrđena razlika u tipu malformacija koje su se javljale nakon izlaganja dejstvu vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija, intenzitet i frekvencija subletalnih promena su bili daleko veći kod jedinki izloženih dejstvu vodenih sojeva. U prethodno opisanom biotestu sa dafnijama u kom je praćen letalan efekat ekstrakata, takođe je utvrđena toksičnost sojeva *M. aeruginosa* PCC 7806 i *Oscillatoria* K3, međutim, nije utvrđena toksičnost velikog intenziteta. Mogućnost praćenja subletalnih promena na nivou kičmenjačkog modela u ovom testu je doprinela dobijanju značajno većeg broja informacija i detekcije toksičnosti pri nižim koncentracijama ekstrakata. Ovi rezultati bi mogli ukazivati na značajnu razvojnu toksičnost ispitanih sojeva i prisustvo toksičnih metabolita u primenjenim ekstraktima koji ometaju normalan razvoj zebrica. Precizna identifikacija toksičnih jedinjenja u ekstraktima cijanobakterija i istraživanje molekularne osnove toksičnosti i mehanizama koji leže u osnovi uočenih subletalnih efekata kod embriona i larvi zebrica su ključni za dublje razumevanje procesa koji pokreću razvoj uočenih subletalnih efekata.

## 4.2. Akutna toksičnost cijanobakterijskih sojeva na molekularnom nivou

### 4.2.1. Biotest *Daphnia magna* - analiza relativnih promena u genskoj ekspresiji

Biološki testovi sa vrstama roda *Daphnia* su se pokazali kao izuzetno korisni u ispitivanju toksičnosti cijanobakterija. Pored velikog broja mogućih krajnjih tačaka korišćenih u testovima toksičnosti sa dafnijama, poslednjih godina istraživanja su fokusirana na promene u ekspresiji gena izazvane cijanotoksinima (Schwartz i sar., 2007; Asselman i sar., 2012; Lyu i sar., 2016b; Shahmohamadloo i sar., 2020b; He i sar., 2023). Uprkos ovim naporima, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi njihovog odgovora na cijanobakterijsku toksičnost ostali su u velikoj meri nerazjašnjeni. Ispitivanjem promena u ekspresiji gena i identifikacijom novih biomarkera kod ekološki ključnih akvatičnih organizama poput predstavnika roda *Daphnia*, može se obezbediti jedinstven uvid u štetne efekte po životnu sredinu i doći do informacija značajnih za adekvatnu procenu ekološkog rizika.

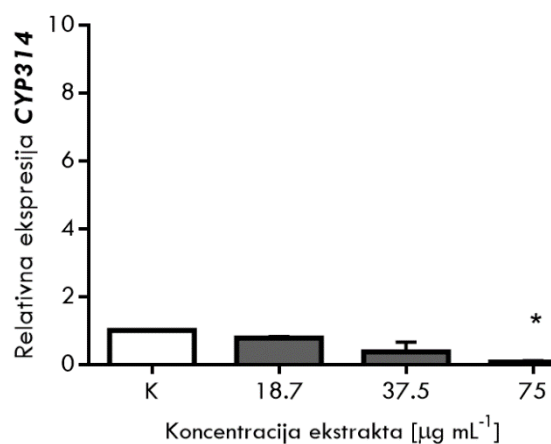
Pored toga, profilisanje genske ekspresije i određivanje karakteristika toksičnosti mogu pomoći u shvatanju negativnih fenotipskih ishoda toksičnosti povezanih sa specifičnim funkcijama gena. Stoga, analize genske ekspresije mogu poboljšati razumevanje mehanizama pomoću kojih cijanotoksini izazivaju ili moduliraju štetne efekte kod dafnija i na taj način pomoći u identifikaciji osetljivih biomarkera koji reaguju na cijanotoksičnost. Povezivanje ovih nalaza sa promenama koje se mogu uočiti na višim nivoima biološke organizacije moglo bi da obezbedi dublje razumevanje toksičnosti cijanobakterija u kontekstu celog organizma i omogući otkrivanje toksičnosti u ranim fazama kaskade toksičnih efekata.

U ovom istraživanju je analiziran potencijal odabranih sojeva cijanobakterija da utiču na ekspresiju gena uključenih u procese detoksikacije, rasta i reprodukcije kod model organizma *D. magna*. Među odabranim genima, dva imaju ulogu u razvoju organizama, od kojih je *cyp314* odgovoran za prevođenje ekdizona, hormona neophodnog za koordinisanje procesa metamorfoze, u aktivnu formu, dok je vitelogenin (*vtg*), koji je odgovoran za produkciju istoimenog prekursora žumančanog proteina vitelina, upotrebljen kao biomarker izlaganja potencijalno estrogenim supstancama. Preostala tri gena predstavljaju neke od integralnih delova detoksifikacionog sistema ovih organizama, gde *gst* (glutation-s-transferaza) i *p-gp* (p-glikoprotein) imaju ulogu u konjugaciji i transportu ksenobiotika i njihovih štetnih metabolita, dok je gen *cyp360A8* homolog *cyp3A* genima koji predstavljaju neke od najvažnijih faktora u procesu metabolizma ksenobiotika kod ljudi, a koji se često koriste kao biomarkeri izlaganja ksenobiotcima.

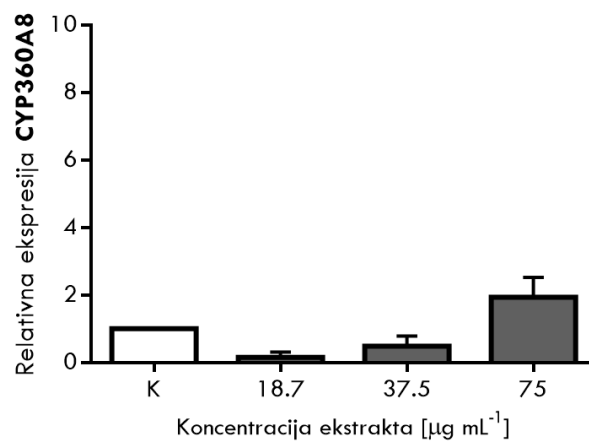
Transkripcione promene odabranih gena kod jedinki vrste *D. magna* nastale kao rezultat izlaganja ekstraktima soja *Anabaena* Č2 su prikazane na Slika 25. Utvrđeno je da u ekspresiji gena *cyp314* nije bilo promena u odnosu na kontrolne vrednosti u grupi izloženoj najnižoj koncentraciji ekstrakta (Slika 25A). Međutim, došlo je do postepenog smanjenja nivoa ekspresije sa povećanjem koncentracije ekstrakta primenjene u testu. Specifično, pri delovanju najveće koncentracije ekstrakta, ekspresija *cyp314* je bila statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolne vrednosti. Ispitivanjem delovanja različitih koncentracija ekstrakta na ekspresiju *cyp360A8* gena, zapažen je jači inhibitorski efekat pri nižim koncentracijama, međutim, bez statistički značajne promene u bilo kojoj od grupa (Slika 25B). Utvrđeno je da je ekspresija *gst* gena povećana 1.8 puta u grupi izloženoj 18.5 µg mL<sup>-1</sup> ekstrakta, ali promena nije bila statistički značajna (Slika 25C). Tretmani takođe nisu značajno uticali na ekspresiju *vtg* i *p-gp*

gena, iako je primećen blagi porast ekspresije sa povećanjem koncentracije ekstrakta do maksimalnog povećanja od 2.4 puta (Slika 25D; Slika 25E).

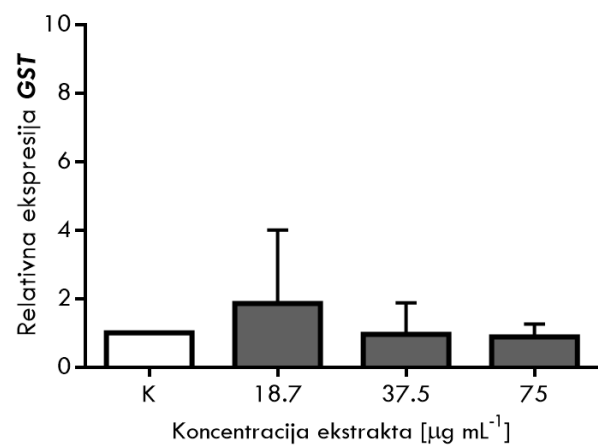
(A)



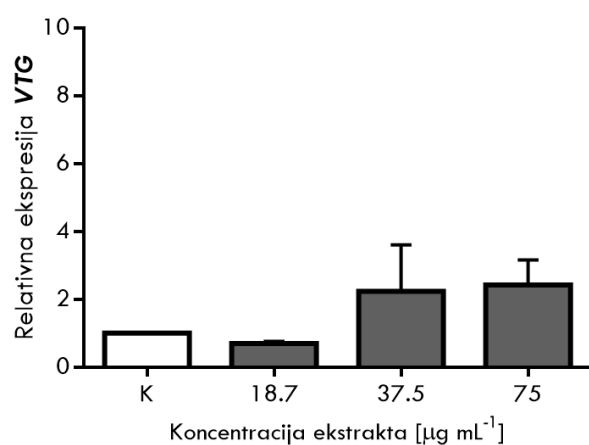
(B)



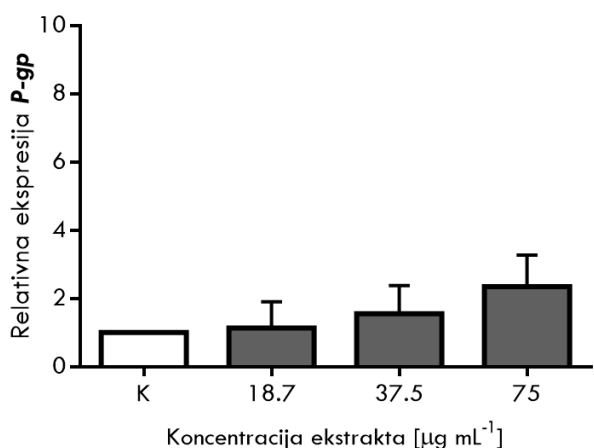
(C)



(D)



(E)

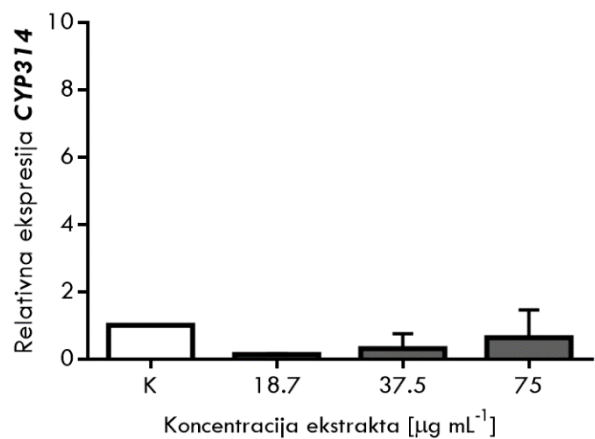


**Slika 25.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Anabaena Č2* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

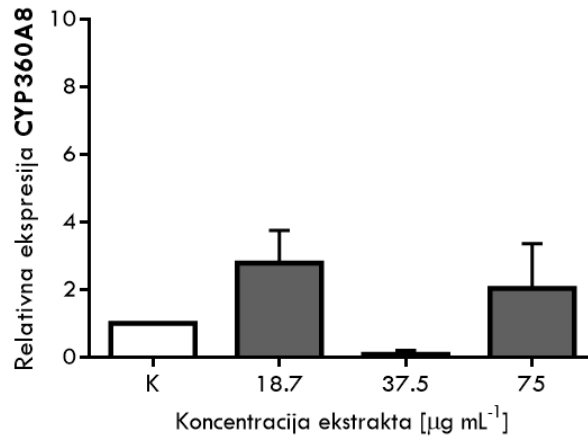
Rezultati pokazuju da su ekstrakti soja *Anabaena Č5* izazvali značajne promene u ekspresiji odabranih gena (Slika 26), pri čemu su najizraženije promene primećene u ekspresiji *gst* i *p-gp* gena povezanih sa detoksikacijom i mehanizmima efluksa ksenobiotika (Slika 26C, Slika 26E). Utvrđeno je da su nivoi ekspresije gena *cyp314* bili sniženi u grupama sa nižim koncentracijama ekstrakta, međutim bez značajnog odstupanja vrednosti od kontrolnih (Slika 26A). U slučaju gena *cyp360A8*, zabeleženo je povećanje nivoa ekspresije pri najnižoj i najvišoj koncentraciji ekstrakta, međutim, koncentracija ekstrakta od  $37.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  je izazvala smanjenje nivoa ekspresije ovog gena u odnosu na kontrolne (Slika 26B). Uočena razlika u regulaciji aktivnosti gena *cyp360A8* pri različitim koncentracijama toksičnih ekstrakata može potencijalno predstavljati karakteristiku adaptivne strategije ovog model organizma. Pri nižim koncentracijama toksina, jedinke *D. magna* mogu aktivirati mehanizme detoksikacije, koji mogu uključivati pojačanu regulaciju gena kao što je *cyp360A8* uključenih u metabolizam i eliminaciju toksina. Pri višim koncentracijama, ovi mehanizmi mogu biti preopterećeni, što dovodi do kontinuirane regulacije aktivnosti ovog gena. Međutim, pri specifičnim umerenim koncentracijama, organizam može da percipira toksin kao umereni stresor, što dovodi do drugačijeg odgovora, kao što je down-regulacija, kao način za očuvanje energije ili davanje prioriteta drugim metaboličkim procesima (Religia i sar., 2020). Drugu mogućnost predstavlja postojanje granične koncentracije toksina pri kojoj izloženi organizam prelazi sa odgovora povišene ekspresije gena u odgovor snižene ekspresije. Ispod ovog praga, organizam može dati prioritet odbrambenim mehanizmima, dok bi iznad njega toksičnost mogla rezultirati smanjenjem ekspresije gena uključenih u ove procese. Značajne promene su zabeležene u ekspresiji *gst* gena, pri čemu je u slučaju nižih koncentracija uočeno smanjenje nivoa ekspresije, dok je u grupi tretiranoj najvišom koncentracijom ekstrakta zabeležen statistički značajno povećan nivo ekspresije (3.87 puta,  $p=0.044$ ), približno četiri puta veći od onog detektovanog u kontroli (Slika 26C). Sličan obrazac je primećen za gen *p-gp*, sa blago sniženim nivoima ekspresije pri delovanju niske koncentracije ekstrakta i statistički značajnim povećanjem (5 puta,  $p=0.0412$ ) u grupi izloženoj najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakta od  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 26E). Kada je reč o relativnoj ekspresiji gena *vtg*, nije utvrđena statistička značajnost u bilo kojoj

od eksperimentalnih grupa (Slika 26D). Zabeležen je međutim povišen nivo ekspresije za oko 2 puta pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakta, dok su pri nižim koncentracijama nivoi ekspresije bili niži od kontrolnih.

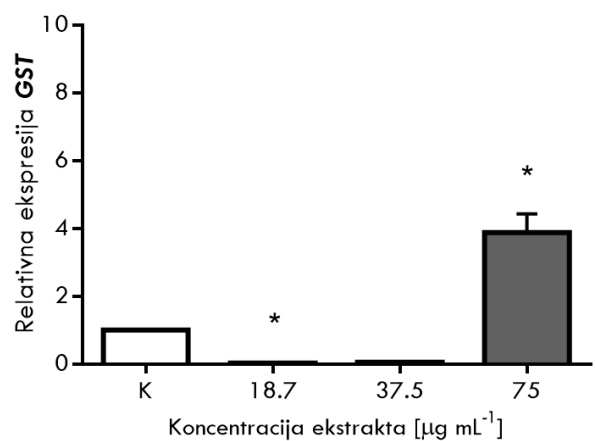
(A)



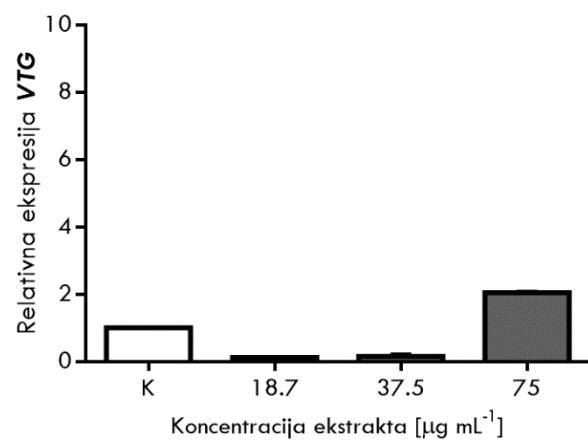
(B)



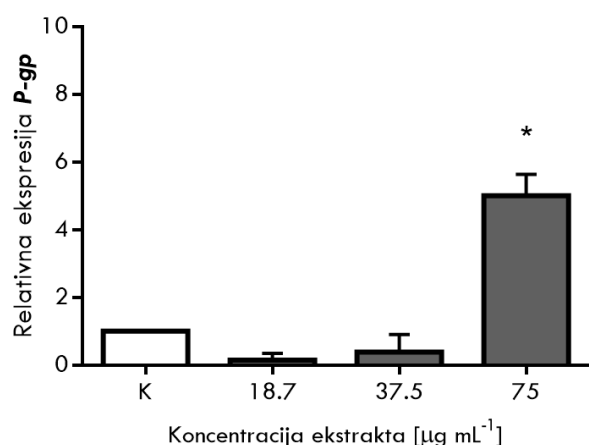
(C)



(D)

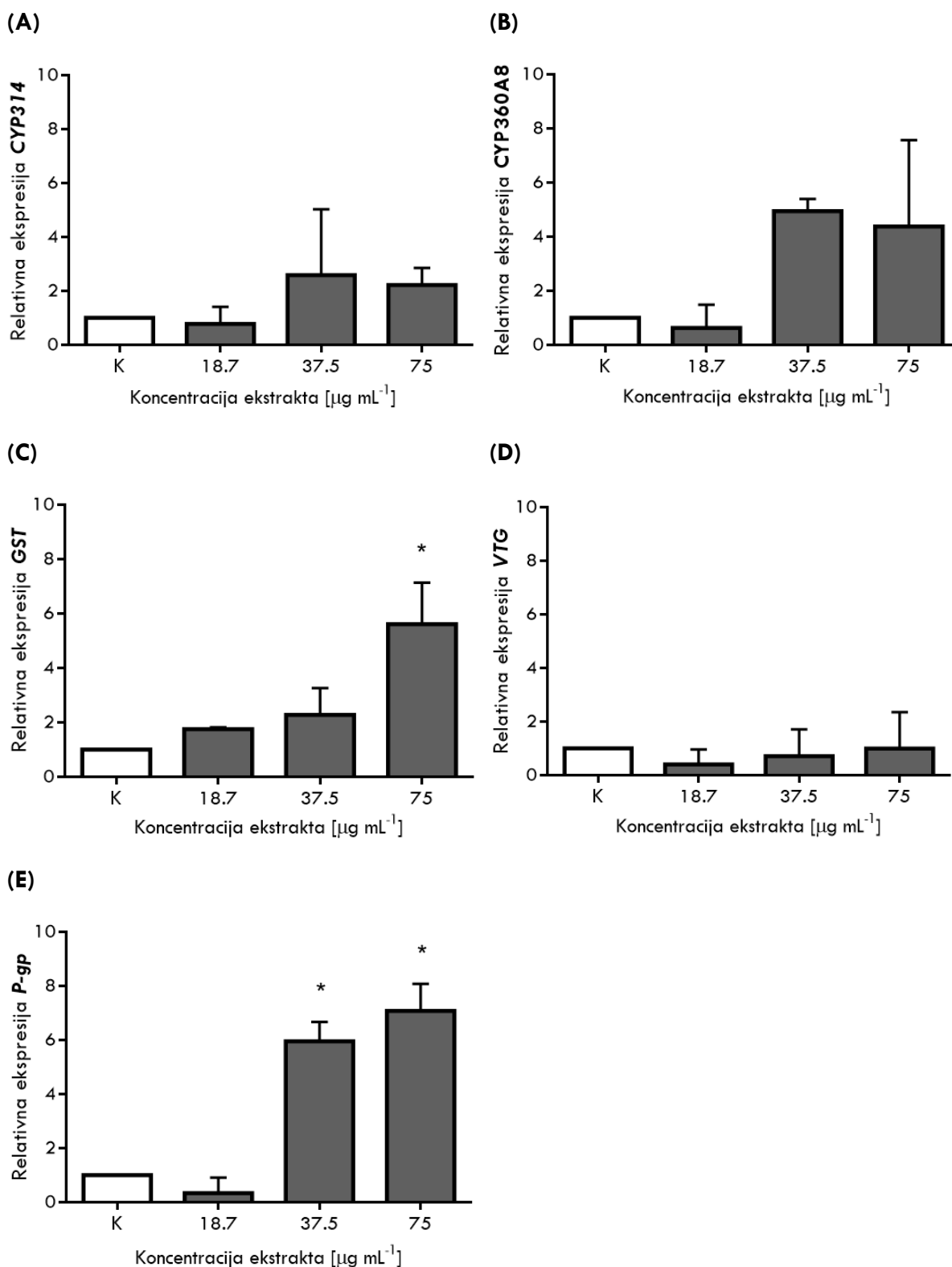


(E)



**Slika 26.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Anabaena Č5* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

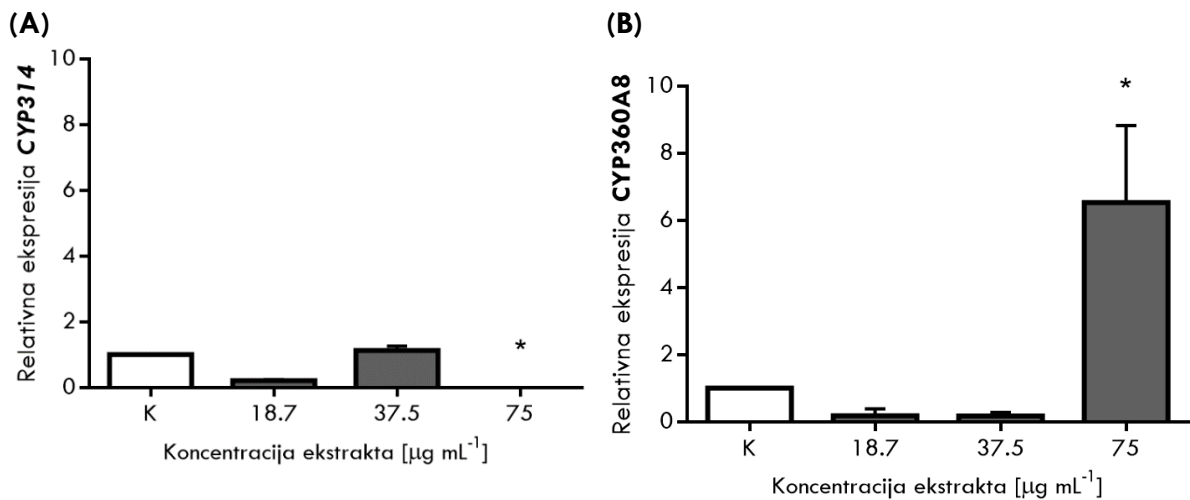
U slučaju soja *Microcystis aeruginosa PCC 7806* primećene su promene u nivoima ekspresije gena *cyp360A8*, *gst* i *p-gp*, kod kojih je zabeleženo povećanje nakon izlaganja višim koncentracijama ekstrakta ovog soja. Nivo ekspresije gena *cyp314* pri najnižoj testiranoj koncentraciji ekstrakta je bio u nivou kontrole, dok su više koncentracije izazvale povećanje nivoa ekspresije približno 3 puta (Slika 27A). Utvrđeno je da je ekspresija *cyp360A8* povećana više od 4 puta u poređenju sa kontrolom (Slika 27B), iako ovo odstupanje nije bilo statistički značajno, verovatno zbog visokog stepena varijacije uočene u rezultatima tri nezavisna eksperimenta. Nasuprot tome, ekspresija *gst* gena se povećala proporcionalno primenjenoj koncentraciji ekstrakta i statistički značajno je bila izmenjena u grupi sa najvišom koncentracijom, povećavši se do 5 puta ( $p=0.0414$ ) u poređenju sa kontrolom (Slika 27C). Slično tome, ekspresija *p-gp* gena je bila u skladu sa kontrolnom vrednošću u grupi sa najnižom koncentracijom, ali je statistički značajno bila povećana u grupama tretmana sa 37.5 i 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ekstrakta, pri čemu su zabeleženi nivoi bili 5.9 ( $p=0.0393$ ) odnosno 7 ( $p=0.0291$ ) puta veći u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 27E). Promene uočene u ekspresiji gena *vtg* nakon tretmana ekstraktima ovog soja nisu bile statistički značajne i može se primetiti samo blago smanjenje u nivoima ekspresije pri nižim koncentracijama ekstrakta (Slika 27D).

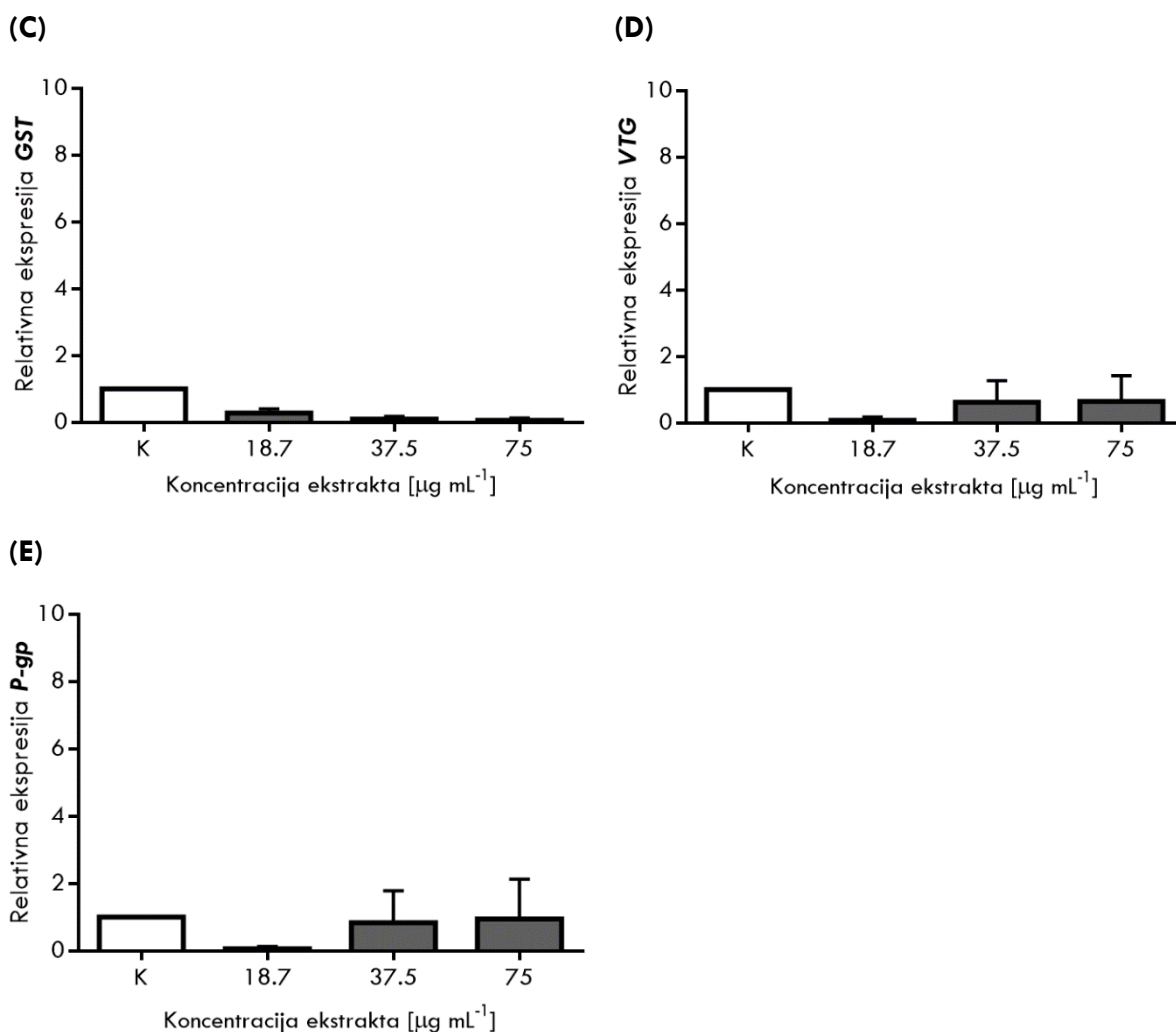


**Slika 27.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 na relative nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).



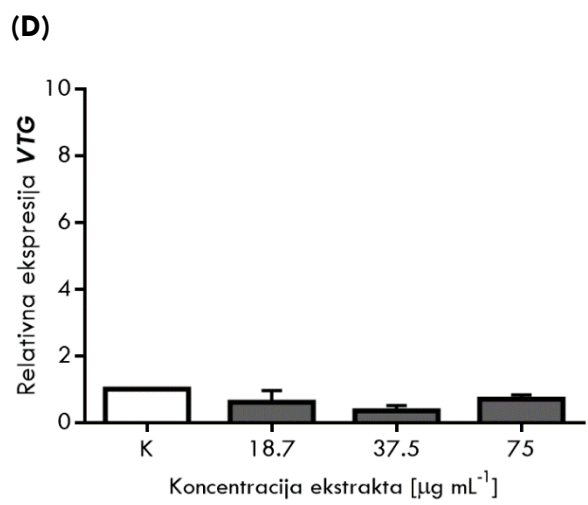
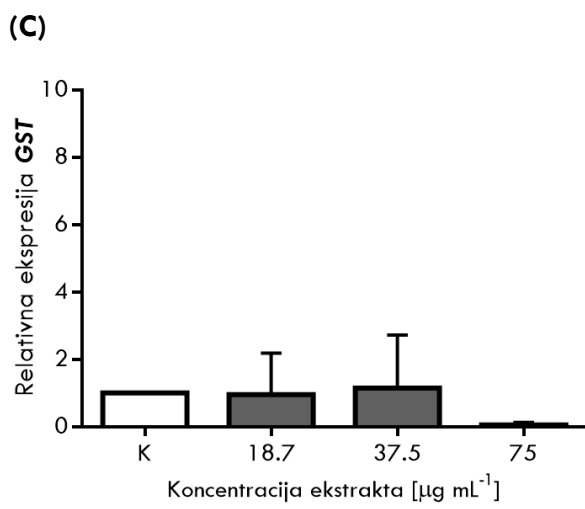
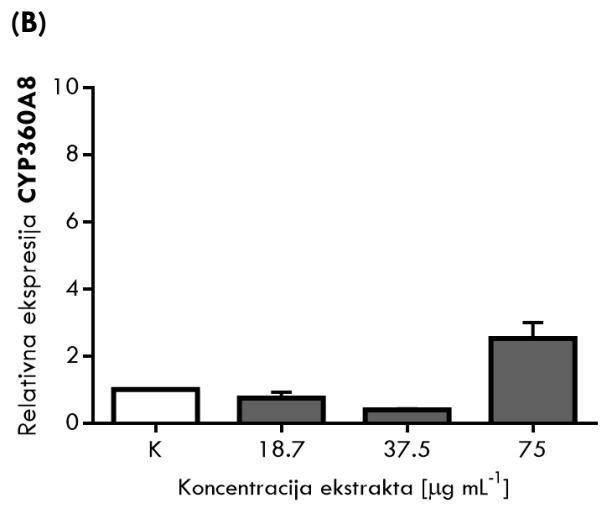
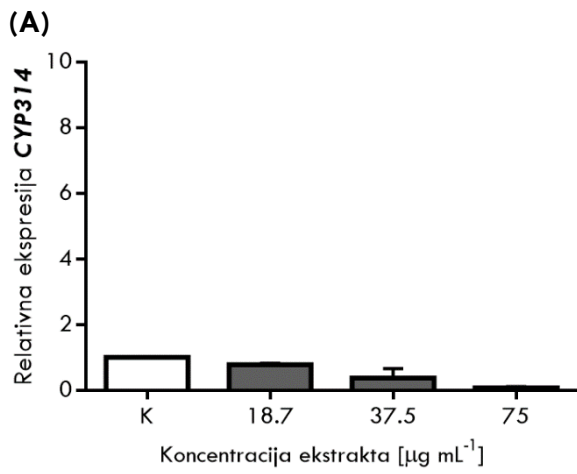
Nivoi ekspresije gena *D. magna* izloženih ekstraktima **Nostoc 2S1** prikazani su na Slika 28. Utvrđeno je da je nivo ekspresije gena *cyp314* bio statistički značajno manji nakon primene najveće koncentracije ekstrakta, dok je nivo u grupi izloženoj dejstvu ekstrakta u koncentraciji od  $37.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  bio poput kontrolne vrednosti (Slika 28A). Pri najnižoj ispitanoj koncentraciji ekstrakta, uočeno je smanjenje nivoa ekspresije gena *cyp314* u odnosu na kontrolu, međutim, ova promena nije bila statistički značajna. Slično tome, ekspresija gena *cyp360A8* je bila smanjena pri nižim koncentracijama ekstrakta, ali je povećana približno 6.5 puta ( $p=0.0305$ ) u grupi izloženoj najvećoj koncentraciji ekstrakta ( $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Slika 28B). Iako geni *cyp314* i *cyp360A8* kodiraju proteine iste superfamilije, različiti obrasci njihove ekspresije u ovom slučaju mogu biti posledica različitih bioloških funkcija koje njihovi genski produkti obavljaju u organizmu *D. magna*. Gen *cyp314* je ključan za proces presvlačenja, što direktno utiče na rast i razvoj ovih organizama, dok *cyp360A8* značajno doprinosi detoksifikaciji, uključujući eliminaciju toksina i drugih supstanci. Utvrđeno je da je ekspresija gena *gst* bila inhibirana u sve tri eksperimentalne grupe, međutim, ove vrednosti nisu statistički značajno odstupale od kontrolnih (Slika 28C). Nivoi ekspresije gena *vtg* i *p-gp* su bili niži od kontrolnih nakon izlaganja najnižoj koncentraciji ekstrakta, međutim, u grupama izloženim višim koncentracijama nije bilo statistički značajnog odstupanja od kontrolnih vrednosti (Slika 28D; Slika 28E).

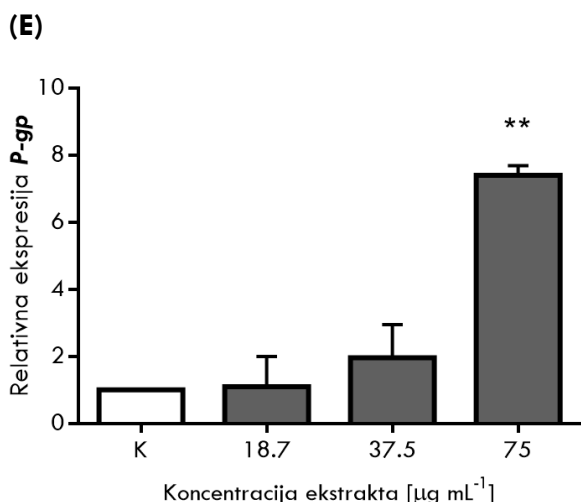




**Slika 28.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja **Nostoc 2S3B** na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

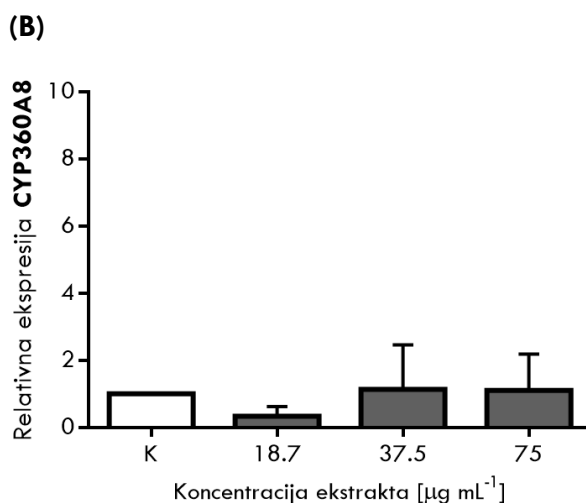
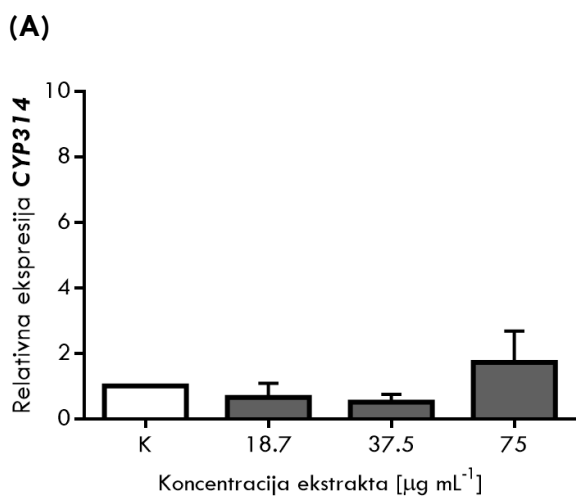
Relativne promene nivoa ekspresije gena nakon tretmana ekstraktima soja **Nostoc 2S3B** prikazane su na Slika 29. Nivoi transkripcije gena *cyp314* su bili smanjeni u svim grupama u odnosu na kontrolu, pri čemu se u odgovor na povećanje koncentracije ekstrakta ekspresija ovog gena postepeno smanjivala (Slika 29A). Ekspresija gena *cyp360A8* je bila povećana približno 2.5 puta u grupi sa koncentracijom od  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  i smanjena u preostale dve grupe, međutim, ove promene nisu izazvale značajnu razliku u odnosu na nivoe zabeležene u kontrolnim grupama (Slika 29B). Ekspresija *gst* gena je bila inhibirana u tretmanu sa najvišom koncentracijom, dok preostale dve grupe nisu značajno odstupale od kontrole (Slika 29C). Sa druge strane, izlaganje test organizama koncentraciji ekstrakta od  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  je rezultiralo statistički značajnom indukcijom *p-gp* gena (7.3 puta povećanje u odnosu na kontrolu,  $p < 0.0001$ ), bez značajnih promena u grupama nižih koncentracija ekstrakta. Nisu primećene značajne promene u ekspresiji gena *vtg* ni u jednoj od tretiranih grupa.





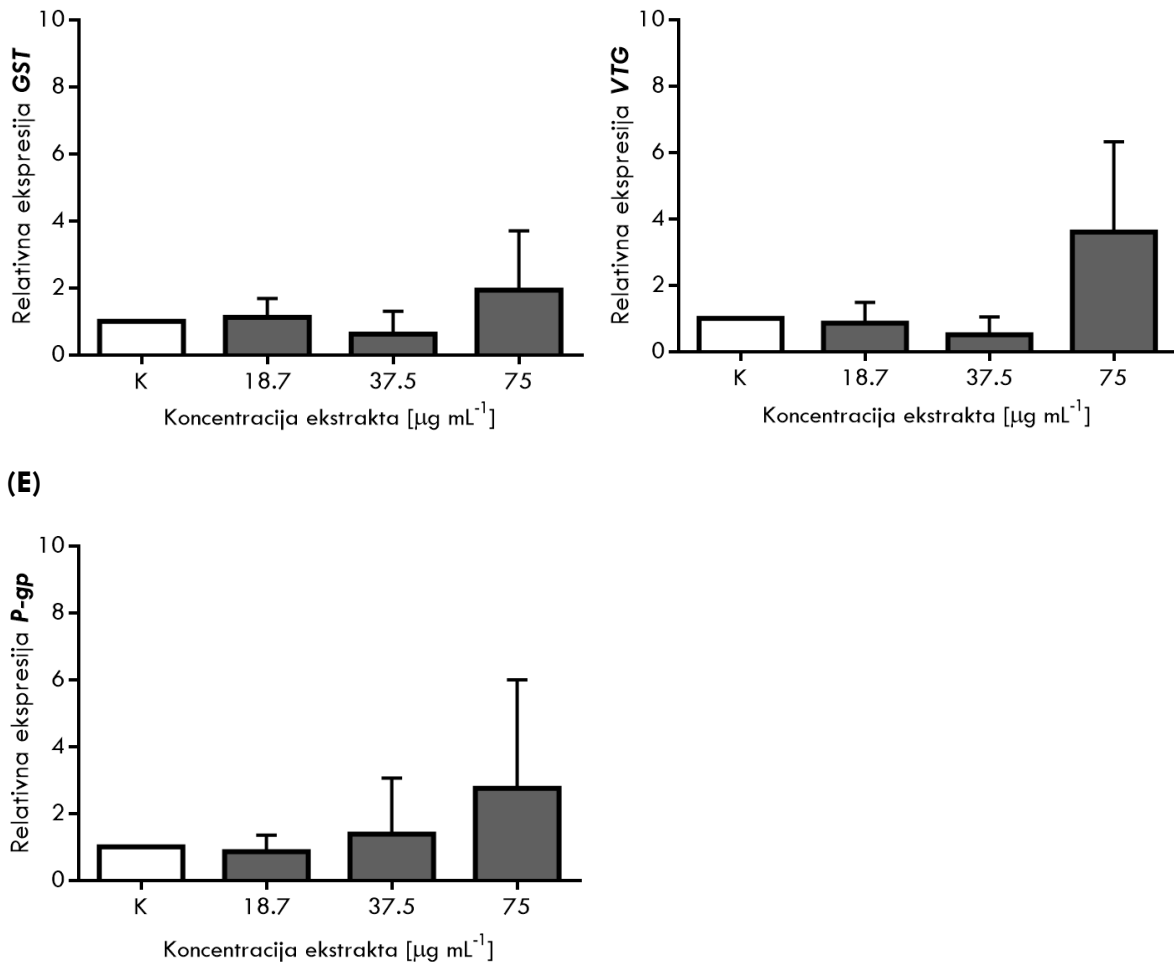
**Slika 29.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Nostoc 2S3B* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Rezultati istraživanja pokazuju da su nivoi ekspresije oba gena koji pripadaju citohrom p450 familiji bili slični onima u kontrolnoj grupi nakon primene ekstrakta soja *Nostoc LC1B* (Slika 30A; Slika 30B). Međutim, u određenoj meri je primetna razlika u ekspresiji ova dva gena pri višim koncentracijama ekstrakta. U slučaju gena *cyp314*, povećanje nivoa ekspresije je zabeleženo samo pri najvišoj koncentraciji ekstrakta, dok je ekspresija gena *cyp360A8* bila neznatno indukovana i u grupi izloženoj dejstvu koncentracije od  $37.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Za gen *gst* uočeno je povećanje ekspresije od 2.9 puta u odnosu na kontrolu nakon primene najveće koncentracije ekstrakta (Slika 30C). Slično tome, ekspresija *vtg* gena bila je povećana 3.6 puta u odnosu na kontrolu u grupi izloženoj najvećoj koncentraciji ekstrakta (Slika 30D), dok je kod gena *p-gp* uočeno dozno-zavisno povećanje u ekspresiji do maksimalne promene u odnosu na kontrolu od 2.7 puta pri najvećoj koncentraciji (Slika 30E). Međutim, ni za jednu od navedenih promena nije utvrđeno da su bile statistički značajne.



**(C)**

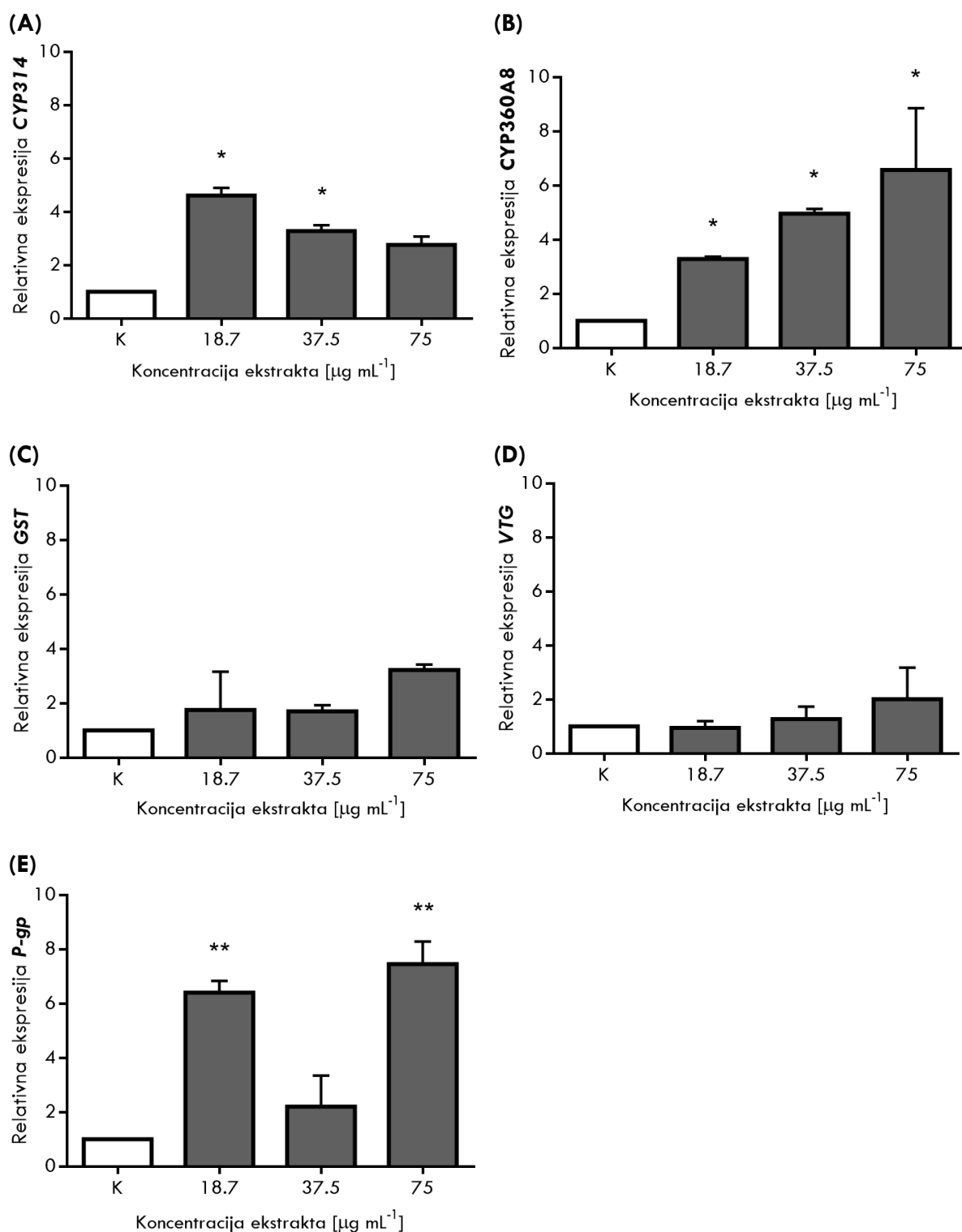
**(D)**



**Slika 30.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Nostoc LC1B* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

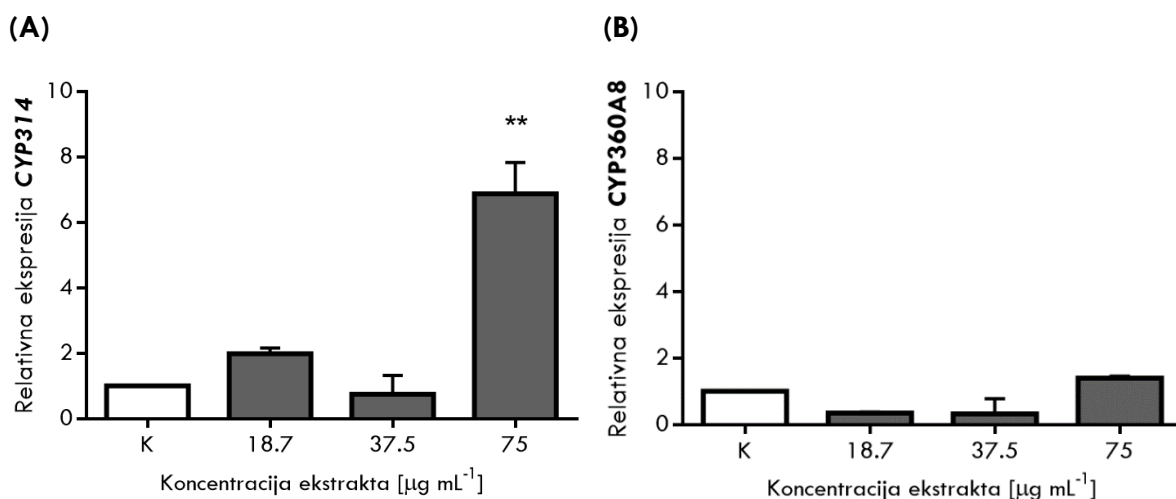
Rezultati promena u nivoima ekspresije gena kod *D. magna* izloženih ekstraktima *Nostoc Z1* pokazuju da je tretman u većini slučajeva rezultirao značajnim promenama u ekspresiji praćenih gena (Slika 31). Statistički značajne razlike uočene su u slučaju oba gena CYP familije, pri čemu je ispoljen drugačiji obrazac u ekspresiji ta dva gena. Indukcija ekspresije *cyp314* gena uočena je pri delovanju nižih koncentracija ekstrakata soja *Nostoc Z1*, sa povećanjem od 3.2 (37.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) odnosno 4.6 puta (18.75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Slika 31A). Za razliku od navedenog gena *cyp* familije, suprotan efekat je zabeležen kod gena *cyp360A8*, čija ekspresija je značajno povećana u svim grupama u poređenju sa kontrolama i može se primetiti rastući trend sa primenjenom koncentracijom ekstrakta (Slika 31B). Najveće povećanje nivoa ekspresije, od približno 6.5 puta u odnosu na kontrolnu vrednost, zabeleženo je u grupi sa najvišom koncentracijom ekstrakta (75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i smanjivalo se po dozno-zavisnom trendu u preostale dve grupe. Uočeno je povećanje nivoa ekspresije gena koji kodira glutation S-transferazu (*gst*) u eksperimentalnoj grupi izloženoj 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ekstrakta, ali nije utvrđeno da je statistički značajno u odnosu na kontrolu (Slika 31C). Kao što se može videti, najizraženiji indukcionni odgovor je dobijen za p-glikoprotein (*p-gp*) u grupi sa koncentracijom ekstrakta od 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , koji se povećao oko 7.5 puta ( $p < 0.0001$ ) u odnosu na kontrolu, dok je pri koncentraciji od 18.75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ekspresija povećana

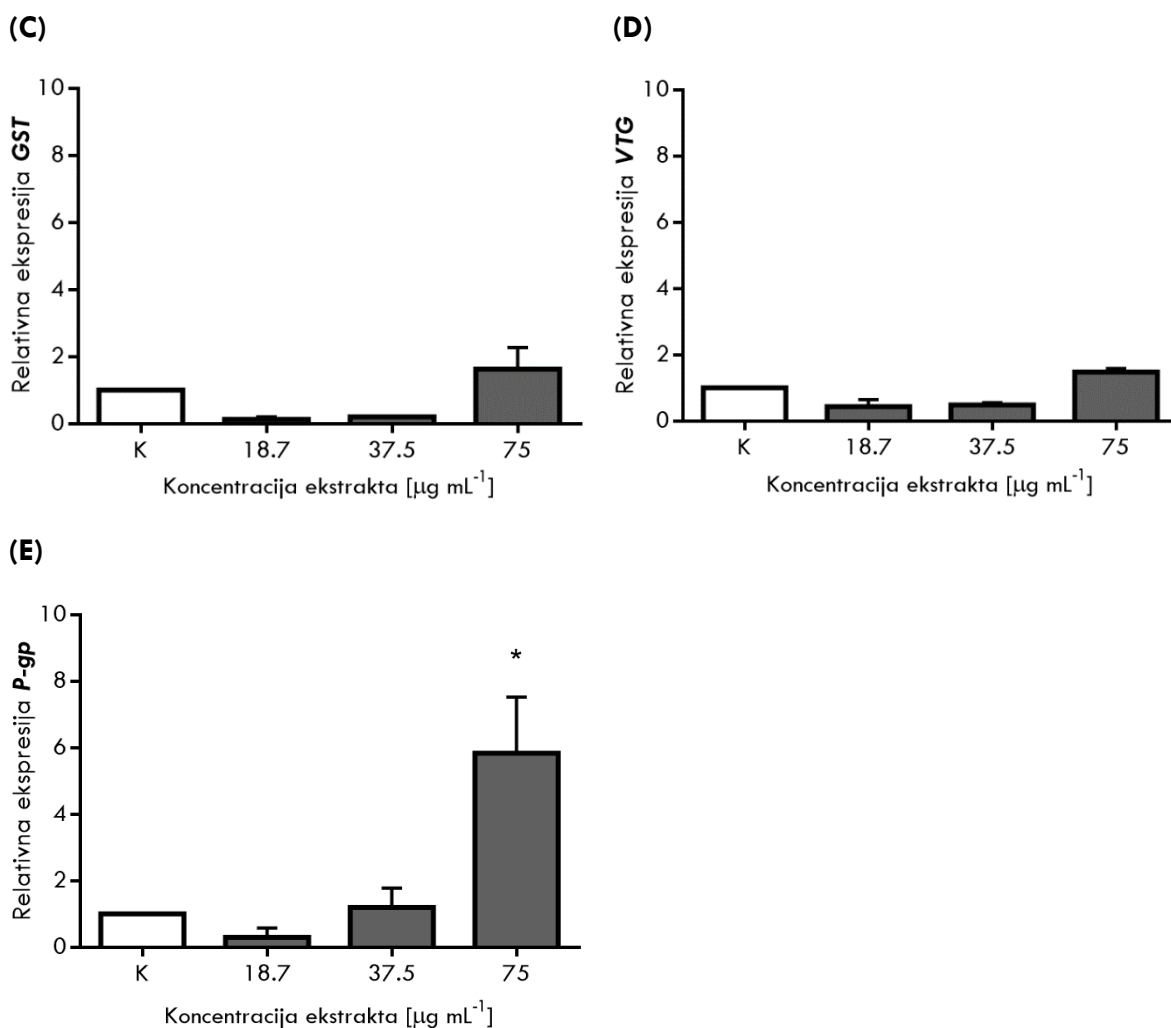
6.4 puta (Slika 31E). Utvrđeno je da tretmani nisu značajno uticali na ekspresiju gena koji kodira vitelogenin (*vtg*), iako je u odnosu na kontrolu zabeleženo blago dozno-zavisno povećanje (Slika 31D).



**Slika 31.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Nostoc Z1* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360a8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\* P < 0.05; \*\* P < 0.001).

Promene u ekspresiji odabranih gena nastale kao odgovor na izlaganje ekstraktima soja **Oscillatoria DTD-Bečej** su prikazane na Slika 32. Rezultati pokazuju da je tretman rezultirao značajnim promenama u ekspresiji gena *cyp314* i *p-gp*. Gen *cyp314* je bio statistički značajno indukovano samo u grupi sa najvećom koncentracijom ekstrakta sa povećanjem nivoa ekspresije od 6.8 puta ( $p=0.0205$ ) (Slika 32A). Nivoi ekspresije *p-gp* gena su porasli po sličnom obrascu, pri čemu je najizraženija promena u odnosu na kontrolu uočena delovanjem najveće koncentracije ekstrakta, koja je bila 5.8 ( $p=0.0393$ ) puta veća od kontrole (Slika 32E). Promene preostalih testiranih gena (*cyp360A8*, *gst* i *vtg*) su pratile sličan obrazac, sa smanjenjem nivoa ekspresije pri nižim koncentracijama u odnosu na kontrolne vrednosti i povećanjem od približno dva puta pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakta.

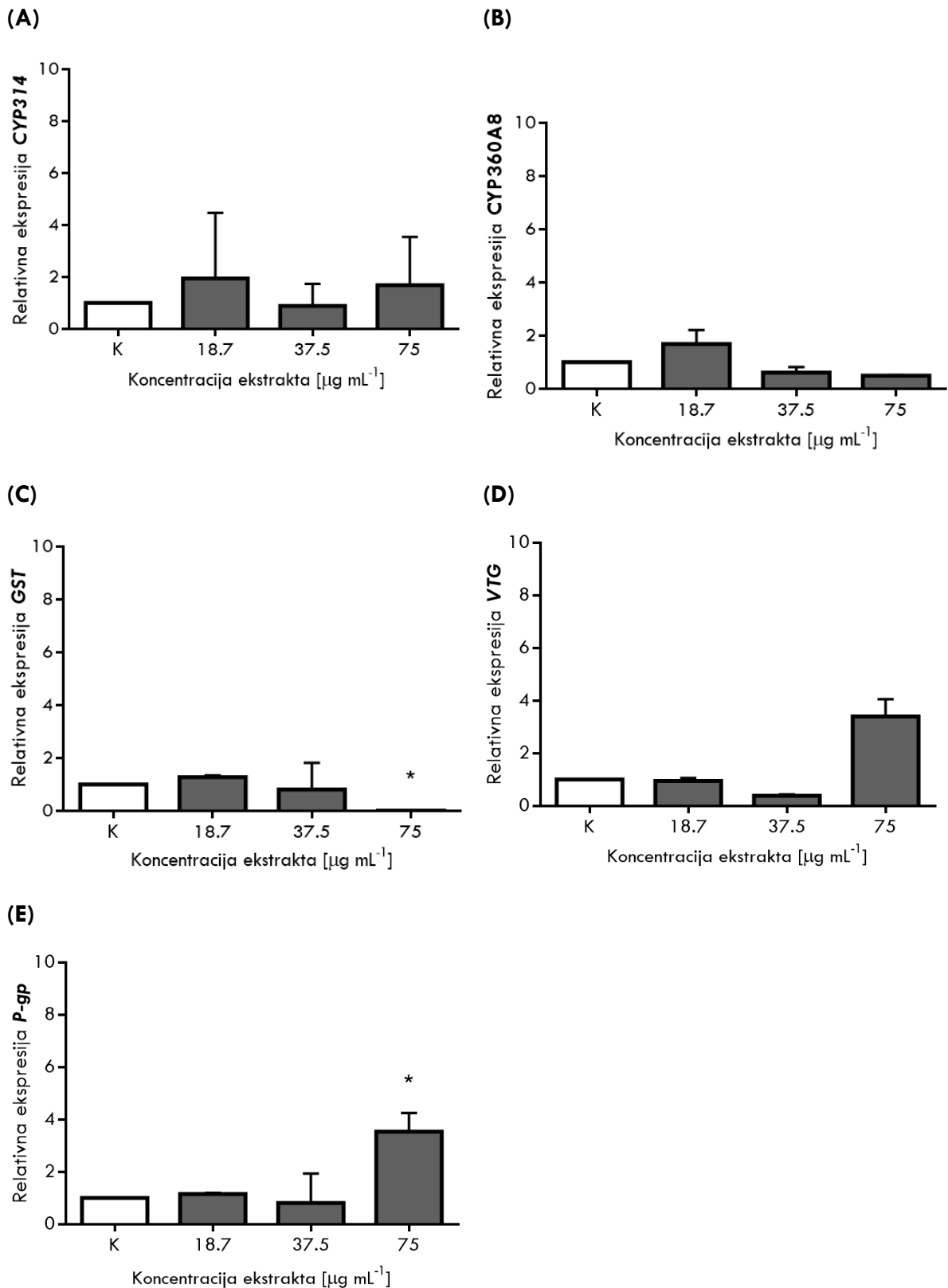




**Slika 32.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Oscillatoria DTD-Bečej* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Utvrđeno je da ekstrakti soja *Oscillatoria K3* nisu izazvali značajne promene u nivoima ekspresije *cyp* gena, pri čemu je indukcija ekspresije (oko 1.9 puta u odnosu na kontrolu) zabeležena u grupama sa najnižom koncentracijom i nije bilo većih odstupanja od kontrolnih vrednosti u preostalim tretmanima (Slika 33A, Slika 33B). Međutim, primećene su značajne promene u ekspresiji gena *gst* i *p-gp*. Utvrđeno je da je ekspresija *gst* inhibirana u grupi sa najvišom koncentracijom, sa smanjenjem nivoa ekspresije četiri puta u odnosu na kontrolu (Slika 33C). Sa druge strane, ekspresija *p-gp* je značajno povećana u grupi od  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pokazujući povećanje od 3.6 puta ( $p=0.0489$ ) u poređenju sa kontrolom (Slika 33E). Sličan trend je primećen i za ekspresiju *vtg*, iako povećanje nije bilo statistički značajno (Slika 33D).

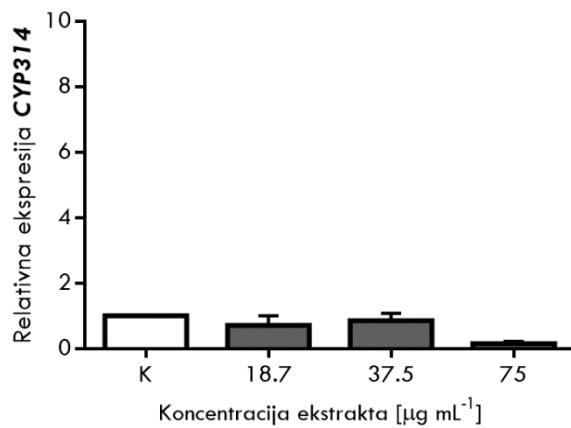




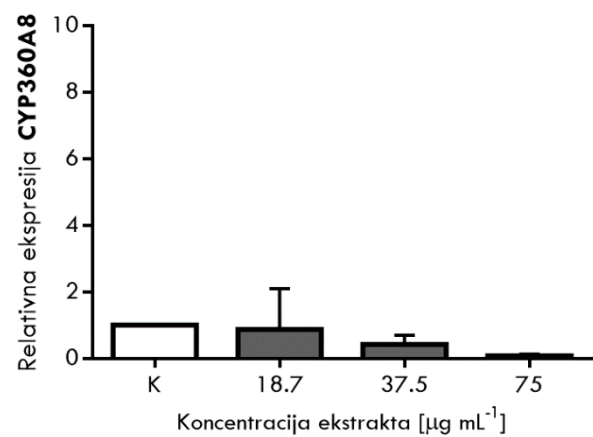
**Slika 33.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Oscillatoria K3* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Nivoi ekspresije odabranih gena kod jedinki *D. magna* izloženih ekstraktima vrste *Oscillatoria Z1* su predstavljeni na Slika 34. Izlaganje ovom soju na sličan način je uticalo na nivoe ekspresije gena *cyp314* i *cyp360A8* (Slika 34A; slika 34B). Ekspresija oba gena je bila u nivou kontrole u grupama sa nižim koncentracijama ekstrakta, dok je u grupi sa najvećom koncentracijom utvrđeno smanjenje približno dva puta. Ekspresija gena koji kodira glutation S-transferazu (*gst*) i vitelogenin (*vtg*) nije se statistički značajno razlikovala od kontrolnih vrednosti ni u jednoj od tretiranih grupa (Slika 34C; Slika 34D). U slučaju nivoa ekspresije gena p-glikoproteina (*p-gp*), utvrđena je inhibicija sa približno 1.5 puta smanjenom ekspresijom u grupama sa nižim koncentracijama u odnosu na kontrolu i 2.8 puta povećanom ekspresijom u grupi sa najvišom koncentracijom ekstrakta (Slika 34E).

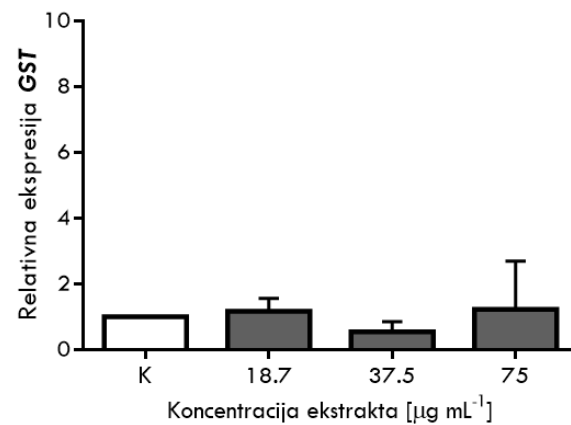
(A)



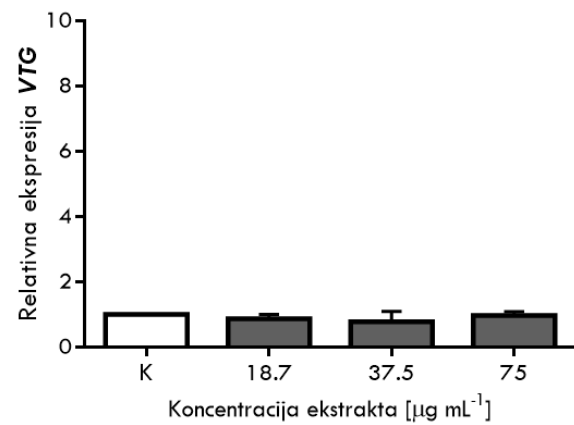
(B)



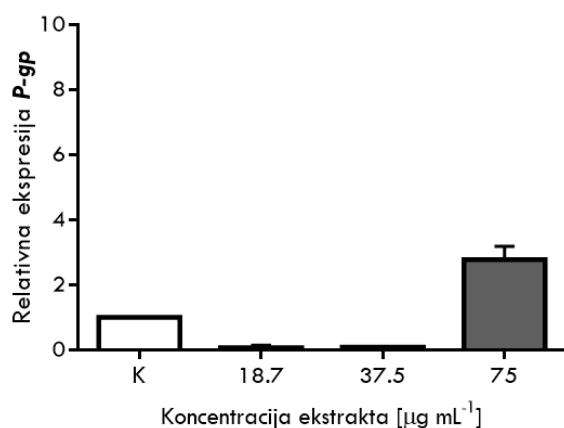
(C)



(D)



(E)



**Slika 34.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Oscillatoria Z1* na relativne nivoe ekspresije pet odabranih gena kod test organizama vrste *D. magna*: (A) *cyp314*, (B) *cyp360A8*, (C) *gst*, (D) *vtg* i (E) *p-gp*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao kolone sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Među ekstraktima ukupno deset ispitanih sojeva, osam je izazvalo značajne promene u ekspresiji odabranih gena u odnosu na kontrolne nivoe, uzrokujući poremećaj homeostaze kod izloženih dafnija. Prvi od dva gena uključena u rast i reprodukciju kod dafnija, bio je *cyp314*, član superfamilije citohrom P450 (CYP) uključen u proces “presvlačenja” kod dafnija, odnosno konačno pretvaranje ekdizona u njegov efektivni oblik 20-hidroksi ekdizon (20E) (Rewitz i Gilbert, 2008). Promene u nivoima ekspresije gena *cyp314* su često korišćen parametar u proceni potencijala različitih agenasa da utiču na reprodukciju i razvoj kod vrste *D. magna* (Le i sar., 2010; Wang i sar., 2016). U ovom istraživanju, došlo je do značajne promene u nivou ekspresije gena *cyp314* kada su test organizmi bili izloženi ekstraktima sojeva *Anabaena Č2*, *Nostoc 2S1*, *Nostoc Z1* i *Oscillatoria* DTD-Bečej, što bi moglo ukazivati na potencijal sojeva da utiču na biosintezu hormona presvlačenja i na taj način utiču na rast i razvoj dafnija. Međutim, važno je istaći da su u slučaju terestričnih sojeva *Anabaena Č2* i *Nostoc 2S1* zabeleženi nivoi ekspresije ovog gena bili značajno smanjeni u odnosu na kontrolne, dok su ekstrakti akvatičnih sojeva *Nostoc Z1* i *Oscillatoria* DTD-Bečej izazvali značajno povećanje u ekspresiji *cyp314*. Uočene razlike u efektima koje izazivaju ovi sojevi mogu biti posledica njihovog različitog porekla, što se reflektuje i na njihov metabolički potencijal. Indukcija gena *cyp314* kod dafnija izazvana ekstraktima vodenih sojeva bi mogla ukazivati na prisustvo jedinjenja koja igraju ulogu u odbrambenom mehanizmu protiv zooplanktonskih predatora, ili alelopatskih jedinjenja uključenih u kompetitivne interakcije cijanobakterija u vodenim sredinama. Među dostupnim istraživanjima takođe postoje dokazi o poremećajima procesa presvlačenja kod dafnija, uzrokovanim cijanobakterijskim metabolitima. Kaebernick i sar. (2001) su otkrili da dafnije hranjene ćelijama soja koji pripada rodu *Microcystis* pokazuju poremećaj u procesu presvlačenja. Potrebno je istaći da su navedeni efekti utvrđeni kod divljeg soja koji ne proizvodi mikrocistin, što ukazuje na to da je za interferenciju ovog procesa odgovoran neki drugi bioaktivni metabolit. Dodatne dokaze za ovaj efekat su obezbedili Rohrlack i sar. (2004), koji su identifikovali mikroviridin J kao agens koji izaziva letalan poremećaj presvlačenja kod jedinki vrste *Daphnia pulex* izloženih dejstvu soja *M. aeruginosa* (UVOCC MRC). Kako je u ovom radu kod sojeva *Anabaena Č2*, *Nostoc 2S1* i *Nostoc Z1* utvrđen potencijal za produkciju mikroviridina

J na osnovu prisustva specifičnih biosintetičkih gena (Potpoglavlje 4.5.2), zabeležene promene u ekspresiji gena *cyp314* potencijalno pružaju dodatan uvid u mehanizam interferencije procesa presvlačenja kod dafnija koji su izloženi ovom agensu. Drugi gen povezan sa reprodukcijom dafnija u ovom istraživanju bio je vitelogenin (*vtg*), koji kodira prekursor osnovnog proteina žumanca vitelina, važnog izvora energije tokom embrionalnog razvoja kod oviparnih organizama (Matozzo i sar., 2008). Promene u nivou vitelogenina su identifikovane kao osetljivi biomarker izloženosti supstancama koje ometaju funkcionisanje endokrinog sistema (EDC) (Matozzo i sar., 2008), koje su široko rasprostranjene u vodenim ekosistemima i imaju potencijal da poremete hormonsku homeostazu i utiču na reproduktivne sposobnosti izloženih organizama (Tran i sar., 2019). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da se estrogenska aktivnost primenjenih ekstrakata testiranih sojeva ne može smatrati značajnom. Međutim, primećena je manja transkripciona indukcija gena *vtg* nakon izlaganja jedinki ekstraktima sojeva *Nostoc* LC1B i *Oscillatoria* K3. Iako uočene promene u ekspresiji gena *cyp314* i *vtg* ukazuju na efekat pojedinih ispitanih sojeva da utiču na rast i reprodukciju dafnija, neophodna su dodatna istraživanja koja bi uključila sagledavanje fizioloških indikatora i reproduktivnih performansi kod izloženih jedinki, kao što su vreme potrebno za dobijanje potomstva i ukupan broj jaja po jedinki. Takav primer se može naći u radu koji su objavili Xu i sar. (2019), u kom je opisana stimulacija biosinteze ekdizona i vitelogenina nakon akutnog i hroničnog izlaganja jedinki *D. magna* eksudatu soja *M. aeruginosa*, što je rezultiralo povećanom proizvodnjom jaja i neonata. Međutim, primećeno je da, iako su se koncentracije ekdizona povećavale, nije došlo do promena u ekspresiji gena *cyp314* tokom 96 sati eksperimenta.

Među ciljnim genima u ovom istraživanju koji su uključeni u procese detoksikacije kod *D. magna* bili su *cyp360A8*, *gst* i *p-gp*. Gen *cyp360A8* je još jedan član superfamilije citohroma P450, koji predstavlja homolog gena *cyp3A* kod kičmenjaka (Yamano i Tatsuno, 1990) i ima glavnu ulogu u sistemu ksenobiotske transformacije kod *D. magna* (Religia i sar., 2020). Ovaj gen se takođe često koristi kao osetljiv biomarker izloženosti ksenobiotcima i koristan je u detekciji širokog spektra ksenobiotika (Aksakal i Arslan, 2020; Bao i sar., 2020; Ding i sar., 2020). U ovom radu ekspresija *cyp360A8* je značajno povećana u svim testiranim koncentracijama i izmenjena je na dozno-zavisani način u odgovor na dejstvo ekstrakta soja *Nostoc* Z1. Pored toga, značajna indukcija je zabeležena u grupi tretiranoj najvećom koncentracijom ekstrakta soja *Nostoc* 2S1. U prethodnom istraživanju, pokazano je da bioaktivna jedinjenja detektovana u ekstraktima soja *Nostoc* Z1 deluju na kritične faze ćelijske detoksikacije, posebno kroz indukciju CYP1A1, enzima prve faze biotransformacije (Marić i sar., 2020). Iako nije utvrđeno da je statistički značajno, povećanje nivoa ekspresije *cyp360A8* takođe je primećeno u grupi izloženoj dejstvu dve najviše koncentracije ekstrakta soja *Microcystis* PCC 7806. Slična promena u ekspresiji *cyp360A8* je zabeležena u radu Xu i sar. (2019). Jedinke vrste *D. magna* izložene toksičnom soju *M. aeruginosa* su odgovorile značajnom indukcijom ovog gena (6.6 puta) u odnosu na kontrolu, na tretman koji je uključivao živu kulturu soja. Preostala dva gena uključena u proces detoksikacije *D. magna* korišćena u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije su bili *gst* i *p-gp*. Enzimi glutation S-transferaze (GST) su uključeni u biotransformaciju reaktivnih jedinjenja katalizujući konjugaciju redukovanog glutationa (GSH) sa endogenim supstratima rezultat čega je obično detoksikacija. Pflugmacher i sar. (1998) su bili prvi koji su ukazali na to da prvi korak detoksikacije mikrocistina kod dafnija uključuje konjugaciju sa GSH, što je reakcija koju katalizuju enzimi GST. Od tada, efekat mikrocistina (intra- i ekstracelularnih) i drugih cijanobakterijskih toksina na GST aktivnost kod dafnija je demonstriran u nekoliko publikacija

(Nogueira i sar., 2004; Sadler i Elert, 2014; Lyu i sar., 2016a). U ovom istraživanju, nivoi ekspresije *gst* gena su bili značajno promenjeni nakon izlaganja ekstraktima sojeva *Anabaena* Č5, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 i *Oscillatoria* K3. Značajne relativne promene ekspresije su zabeležene isključivo u eksperimentalnim grupama izloženim najvećoj koncentraciji ekstrakata ( $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ovi rezultati bi mogli biti pokazatelj uključenosti navedenog metaboličkog puta u biotransformaciju i eliminaciju specifičnih toksičnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima ispitivanih sojeva, ili jednostavno predstavljaju generalni odgovor na oksidativni stres izazvan tretmanima. Ekstrakti soja *Oscillatoria* K3 su izazvali značajno smanjenje *gst* aktivnosti u grupi sa najvišom dozom ekstrakta ( $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), dok se rezultati u preostalim grupama nisu razlikovali u većoj meri od kontrole. Slično tome, Chen i sar. (2005) su registrovali smanjenje enzimske aktivnosti GSH i GST kod jedinki *D. magna* pri koncentracijama prečišćenog toksina MC-LR većim od  $0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$ , kao i pri produženom izlaganju, bez uočenih razlika u odnosu na kontrolne uslove u grupama izloženim nižim dozama. Autori su naveli da su veće doze toksina i dugotrajna izloženost doveli do akumulacije većih koncentracija mikrocistina u organizmima dafnija, što je rezultiralo smanjenom sposobnošću jedinki da iniciraju mehanizme zaštite od reaktivnih vrsta kiseonika, čija eliminacija se povezuje sa aktivnošću GST enzima. Primećeno je značajno povećanje aktivnosti gena *p-gp* nakon izlaganja ekstraktima šest od ukupno deset ispitivanih sojeva, među kojima su predstavnici svih ispitanih cijanobakterijskih rodova. U većini slučajeva, najveća indukcija *p-gp* je primećena u grupama tretiranim sa  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  ekstrakata, što bi moglo da ukaže na prisustvo toksičnih metabolita u ekstraktima u dovoljnim koncentracijama da se aktivira odbrambeni mehanizam izloženih organizama. P-glikoprotein (*p-gp*), kao deo mehanizma multiksenobiotske rezistencije (MXR), uključen je u efluks širokog spektra jedinjenja i predstavlja prvu liniju odbrane od ksenobiotika u mnogim vodenim organizmima (Smital i sar., 2000). Deluje kao ATP-zavisan ćelijski transporter, izvozeći štetne supstance iz ćelija i sprečavajući njihovu intracelularnu akumulaciju. Zbog toga promene uočene u nivoima ekspresije *p-gp* predstavljaju dobar pokazatelj prisustva određenih toksičnih jedinjenja u primenjenim ekstraktima cijanobakterija, koji su aktivirali ovaj mehanizam izbacivanja toksina iz ćelija dafnija. Uočena povećana regulacija p-glikoproteina (*p-gp*) je takođe u skladu sa drugim istraživanjima koji opisuju ovaj efekat kao važan mehanizam eliminacije cijanotoksina u vodenim organizmima (Contardo-Jara i sar., 2008; Amé i sar., 2009), iako to do sada nije bilo povezano sa sigurnošću kao odbrambeni mehanizam kod dafnija koji se aktivira nakon izlaganja toksičnim cijanobakterijama. Međutim, promene ekspresije *p-gp* kod *D. magna* su dobro poznate i opisane su kao odgovor na izlaganje različitim ksenobioticima. Liu i sar. (2017) su zabeležili značajnu indukciju *p-gp* pri visokim koncentracijama ( $0.05\text{-}5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) diklofenaka, što se takođe odrazilo na indukciju gena *cyp360A8* u svim testiranim koncentracijama nakon 48 sati izlaganja. Pored toga, nivoi ekspresije oba gena su se smanjili na početni nivo nakon 96h, što bi mogao biti pokazatelj uspešnog smanjenja intracelularnog nivoa ove supstance i samim tim efikasnosti sistema detoksikacije posredovanih genima *cyp360A8* i *p-gp*.

U istraživanjima sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije, utvrđena je toksičnost slabog intenziteta kod jedinki vrste *D. magna* na nivou celog organizma, međutim, analizom ekspresije gena su otkrivene značajne promene na molekularnom nivou. Kako se promene u ekspresiji gena javljaju na početku ćelijskog odgovora na izlaganje toksičnim agensima, vredan uvid u toksikološke interakcije može se dobiti merenjem ovih prvih odgovora koji se manifestuju na nivou transkripcije, posebno ekspresije gena uključenih u mehanizme detoksikacije. Geni

povezani sa procesima detoksikacije (*cyp360A8*, *gst* i *p-gp*) su se pokazali kao najosetljiviji indikatori toksičnosti cijanobakterija, pošto je većina ekstrakata testiranih sojeva izazvala značajne promene nivoa njihove ekspresije na dozno-zavisnan način. Uočene promene u ekspresiji ovih specifičnih gena ukazuju na aktivaciju metaboličkih puteva uključenih u prvu i drugu fazu biotransformacije ksenobiotika u izloženim organizmima. Ekspresija *p-gp* gena je značajno indukovana nakon izlaganja jedinki dejstvu šest od deset testiranih sojeva, što ga čini potencijalno najperspektivnijim biomarkerom za detekciju cijanobakterijske toksičnosti među testiranim genima. Povezivanje ovakvih nalaza sa specifičnim promenama uočljivim na višim nivoima biološke organizacije, moglo bi da pruži dublje razumevanje toksičnosti cijanobakterija u kontekstu celog organizma, a potencijalno i pouzdan metod detekcije toksičnosti u ranim fazama kaskade toksičnih efekata. Dodatno, zabeležene su značajne promene u ekspresiji gena *cyp374* nakon izlaganja dejstvu četiri različita cijanobakterijska soja, međutim, ove promene zahtevaju dalje istraživanje i potvrdu definitivnog poremećaja u procesu presvlačenja dafnija uspostavljanjem veze između utvrđenih promena u genskoj ekspresiji i nastalih promena na višim nivoima biološke organizacije. Kod izloženih organizama, promene najslabijeg intenziteta su zabeležene u ekspresiji gena *vtg*, što ukazuje na slabu estrogenu aktivnost ekstrakata. Rezultati istraživanja sprovedenog u ovoj doktorskoj disertaciji naglašavaju potrebu za daljim ispitivanjem specifičnih genskih markera koji reaguju na toksičnost cijanobakterija kod vodenih beskičmenjaka, što je oblast koja je nedovoljno istražena kada se radi o kvantitativnoj analizi.

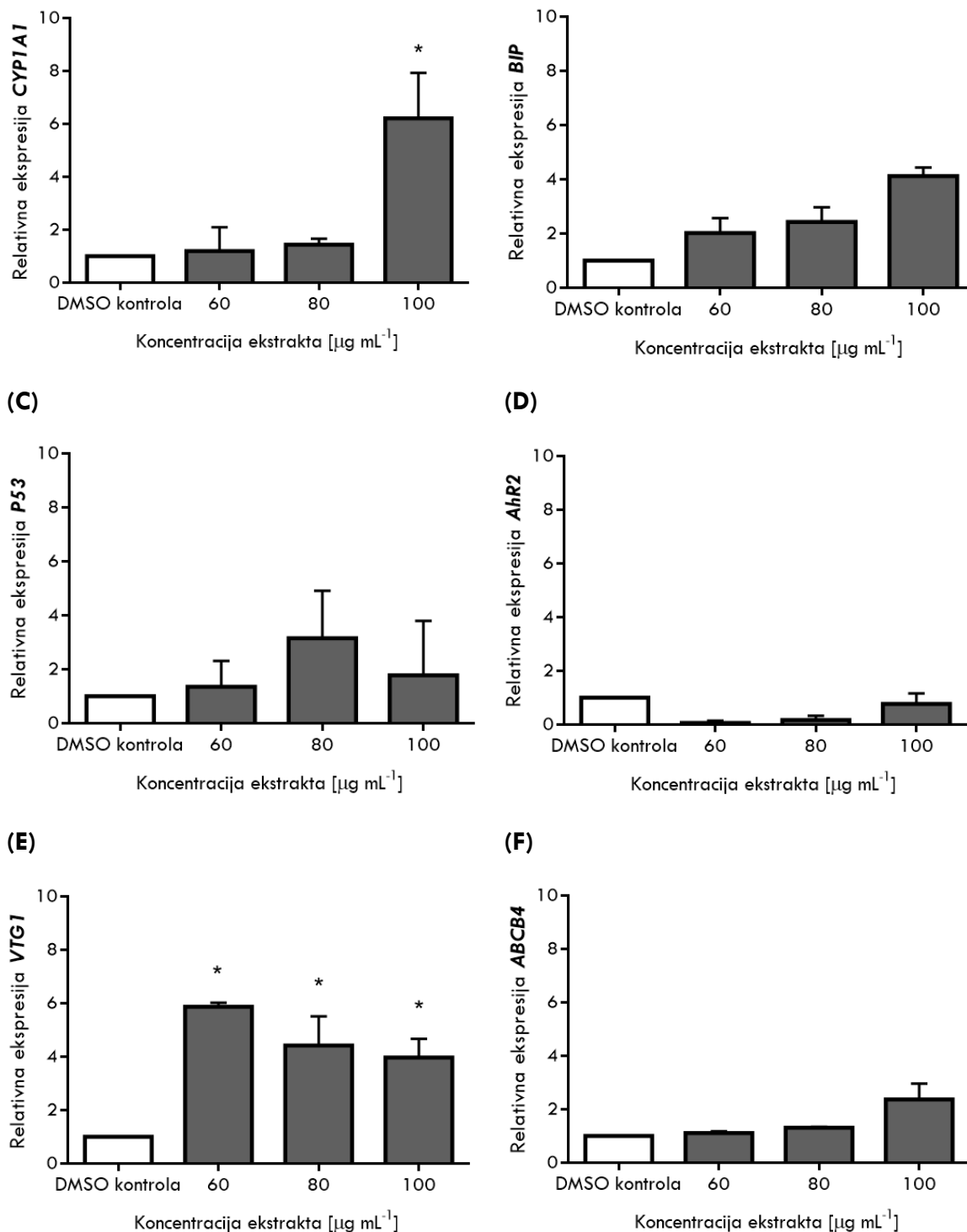
#### 4.2.2. Biotest *Danio rerio* - analiza relativnih promena u genskoj ekspresiji

Ispitane su promene u ekspresiji 6 gena kod jedinki vrste *D. rerio* povezanih sa metabolizmom ksenobiotika (*ahr2*, *cyp1a1*, *abcb4*), procesom apoptoze (*p53*), stresom endoplazmatskog retikuluma (ER stres) (*bip*) i endokrinim procesima (*vtg1*), uslovljene dejstvom ispitanih cijanobakterijskih ekstrakata.

Značajno odstupanje u nivoima ekspresije ispitivanih gena nakon tretmana jedinki *Danio rerio* ekstraktima soja **Anabaena Č2** je utvrđeno u slučaju gena *cyp1a1* i *vtg1* (Slika 35A; Slika 35E). Zabeleženo je značajno povećanje nivoa ekspresije gena *cyp1a1* (6.21 puta,  $p=0.0085$ ) pri koncentraciji ekstrakta od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok su primenom preostale dve koncentracije dobijene vrednosti u nivou kontrolnih. U sve tri koncentracijske grupe je utvrđena statistički značajna dozno-zavisna indukcija gena *vtg1*, pri čemu su najveće promene zabeležene pri koncentraciji od  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  (5.87 puta,  $p<0.0001$ ). Primećena je takođe dozno zavisna indukcija gena *bip* sa najvećim odstupanjem od kontrole pri koncentraciji od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (4.11 puta,  $p=0.0664$ ), međutim, nijedna od primenjenih koncentracija ekstrakta nije izazvala statistički značajan efekat (Slika 35B). Ekspresija gena *p53* i *abcb4* je bila povećana pri svim primenjenim koncentracijama ekstrakta, ali razlika u odnosu na kontrolnu vrednost nije bila statistički značajna (Slika 35C; Slika 35F). U slučaju gena *ahr2*, nivoi ekspresije su bili niži od kontrolnih u svim tretman grupama (Slika 35D).

(A)

(B)

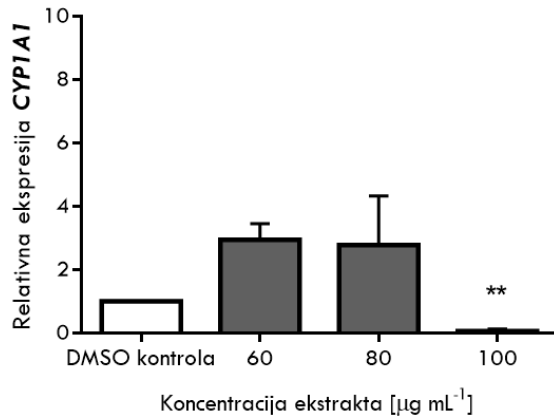


**Slika 35.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Anabaena* Č2 na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

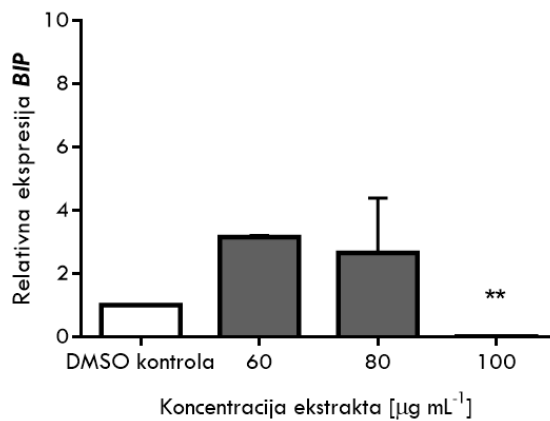
Nakon primene ekstrakata soja *Anabaena* Č5, primećene su značajne promene u nivoima ekspresije gena *cyp1a1*, *bip*, *p53* i *ahr2* (Slika 36). Poređenjem sa kontrolom, može se uočiti statistički značajno smanjenje nivoa ekspresije svih navedenih gena kod jedinki tretiranih najvišom koncentracijom ekstrakta (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), što ukazuje na inhibitorski efekat ekstrakata.

U slučaju gena *cyp1a1* i *bip* je uočen najintenzivniji inhibični efekat pri najvišoj dozi ekstrakata, dok su pri nižim dozama nivoi ekspresije bili oko 3 puta viši od kontrolnih (Slika 36A; Slika 36B). Sličan trend se može primetiti u slučaju gena *p53* i *ahr2*, sa nivoima ekspresije približnim kontroli pri nižim koncentracijama i značajnom inhibicijom pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 36C; Slika 36D). Nivoi ekspresije gena *vtg1* i *abcb4* bili su slični kontrolnim, osim pri najvišoj testiranoj koncentraciji, gde je došlo do inhibicije gena *vtg1* i indukcije gena *abcb4* (Slika 36E; Slika 36F).

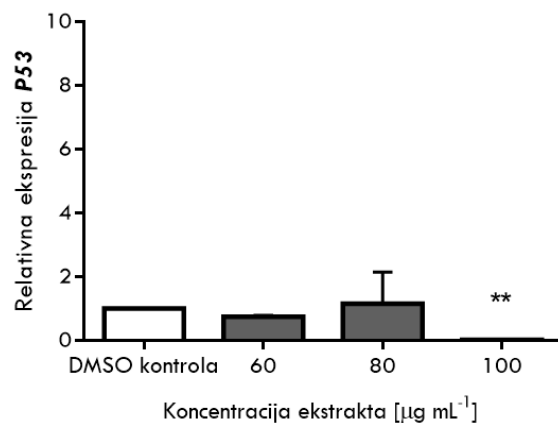
(A)



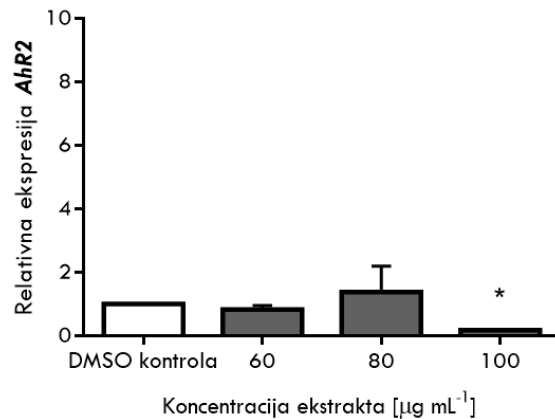
(B)



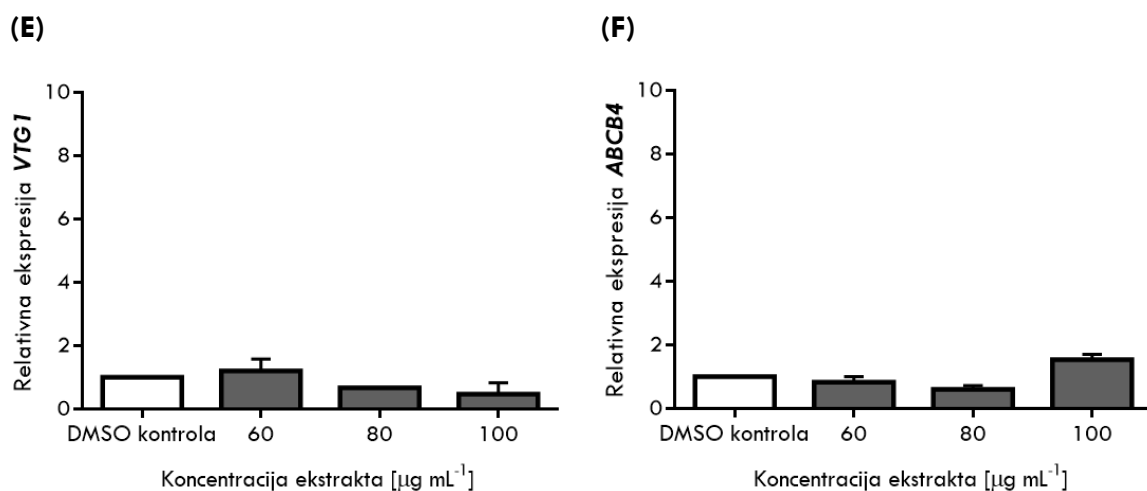
(C)



(D)

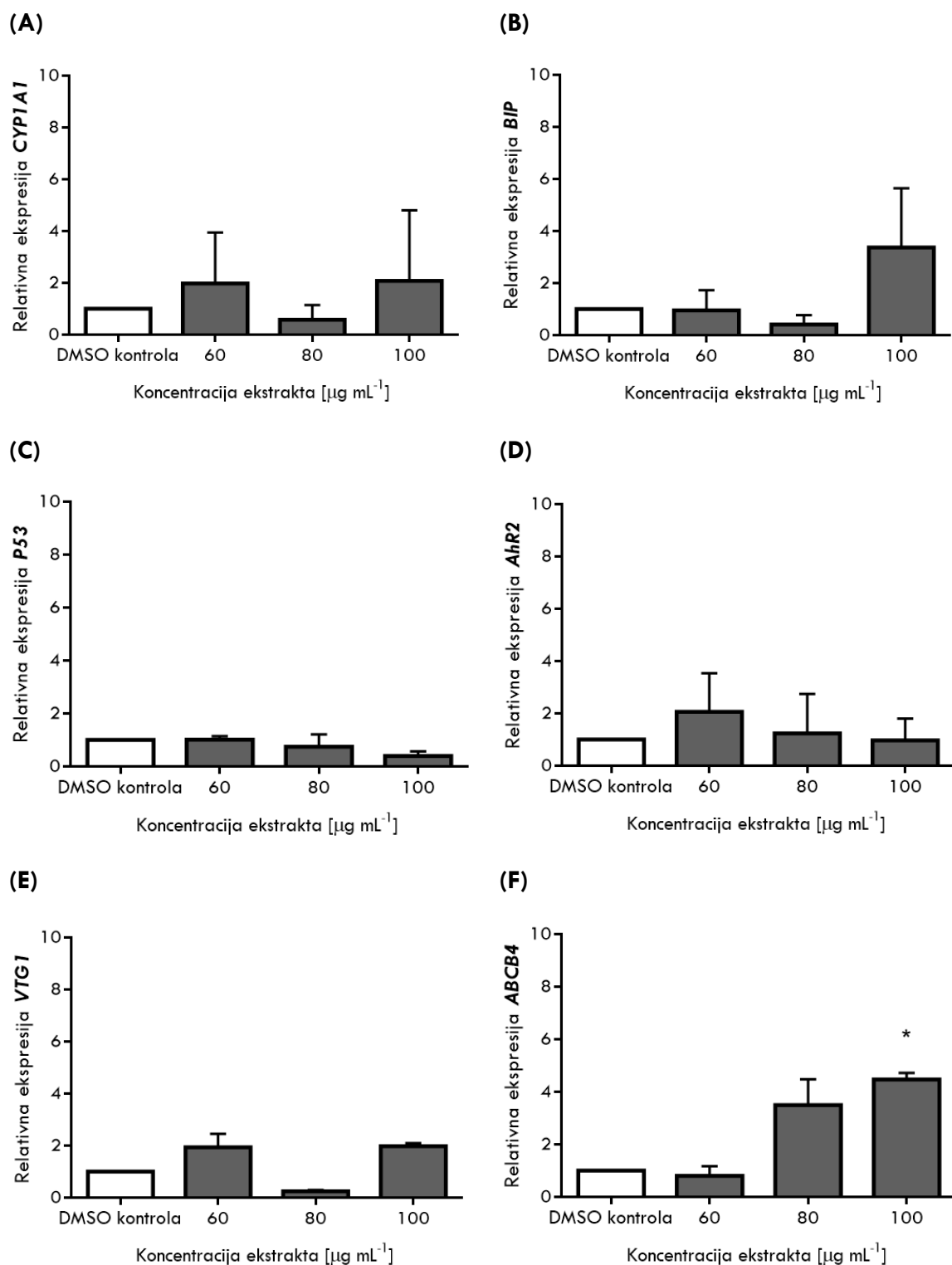






**Slika 36.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Anabaena Č5* na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Rezultati ispitivanja dejstva ekstrakata soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ukazuju na značajno odstupanje u ekspresiji gena *abcb4* u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnoj grupi (Slika 37F). Utvrđeno je da je izlaganje koncentracijama ekstrakta većim od  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  rezultiralo dozno-zavisnim povećanjem ekspresije ovog gena, uz statistički značajnu promenu pri najvišoj primenjenoj koncentraciji (4.46 puta,  $p=0.0417$ ) u odnosu na kontrolu. Utvrđeno je takođe povećanje nivoa ekspresije gena *bip* od 3.37 puta ( $p=0.8355$ ) pri najvećoj koncentraciji, dok su pri nižim koncentracijama nivoi ekspresije bili manji od kontrolnih, što je bilo posebno izraženo pri koncentraciji od  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 37B). Uočeni obrazac ekspresije *bip* gena može ukazivati na moguću zavisnost regulacije aktivnosti ovog gena od doze toksičnih metabolita prisutnih u ekstraktu testiranog soja, kao i na karaktersitike mehanizma odgovora jedinki *D. rerio* na stres endoplazmatskog retikuluma u čiju medijaciju je uključen ovaj gen. U slučaju gena *p53*, utvrđeno je dozno zavisno smanjenje ekspresije, koje je bilo 3 puta manje od kontrolne u najvišoj koncentracijskoj grupi (Slika 37C). Sličan obrazac dozne zavisnosti nivoa ekspresije je primećen kod gena *ahr2*, međutim, nivoi ekspresije su u ovom slučaju pri višim koncentracijama bili slični kontrolnim vrednostima (Slika 37D). Značajnije promene su uočene samo pri najnižoj koncentraciji, gde je zabeleženo povećanje od približno dva puta u odnosu na kontrolnu vrednost. Nivo ekspresije gena *vtg1* povećao se za oko dva puta pri koncentracijama od 60 i  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok je zabeleženo smanjenje u odnosu na kontrolu pri koncentraciji od  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 37E). Ova nelinearnost u zabeleženom odgovoru ukazuje na kompleksnost regulacije gena *vtg1* i na moguće interakcije između različitih ćelijskih faktora.

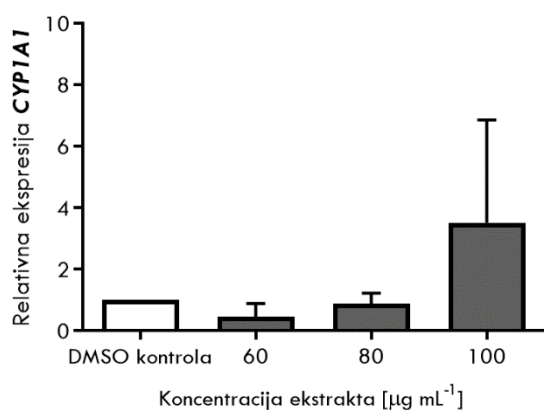


**Slika 37.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 na relative nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

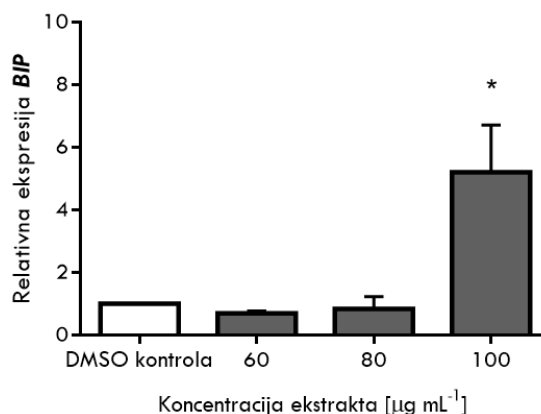
Izlaganje ekstraktima soja *Nostoc 2S1* je izazvalo dozno zavisno povećanje u ekspresiji gena *cyp1a1*, *bip* i *p53*, koje je bilo posebno izraženo u grupama izloženim najvišoj koncentraciji ekstrakta (Slika 38). Najveće promene u odnosu na kontrolne vrednosti su uočene u slučaju gena

*cyp1a1* i *bip*, kod kojih su zabeležena povećanja od 3.50 ( $p=0.2459$ ) i 5.20 ( $p=0.0170$ ) nakon izlaganja dejstvu najviše koncentracije ekstrakta, pri čemu je utvrđeno da je indukcija ekspresije *bip* gena bila statistički značajna (Slika 38A; Slika 38B). Sličan efekat je zabeležen kada se radi o ekspresiji gena *p53*, gde je registrovano dozno-zavisno povećanje nivoa ekspresije do nivoa približno tri puta većeg od kontrolnog u grupi izloženoj ekstraktu u koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 38C). Iako su nivoi ekspresije preostala tri gena (*ahr2*, *vgt1* i *abcb4*) bili u većem broju slučajeva približni kontrolnim, takođe se može uočiti porast u nivou ekspresije u skladu sa primenjenom koncentracijom ekstrakta (Slika 38D; Slika 38E; Slika 38F).

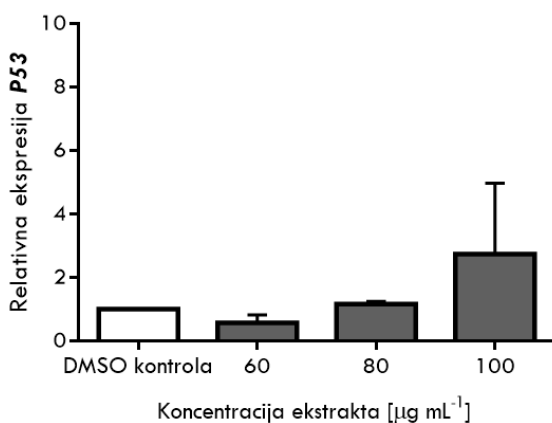
(A)



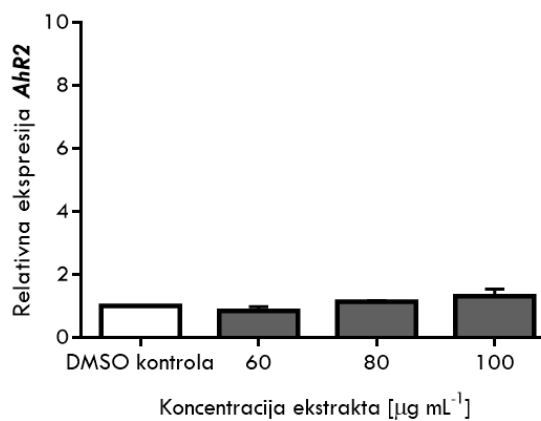
(B)

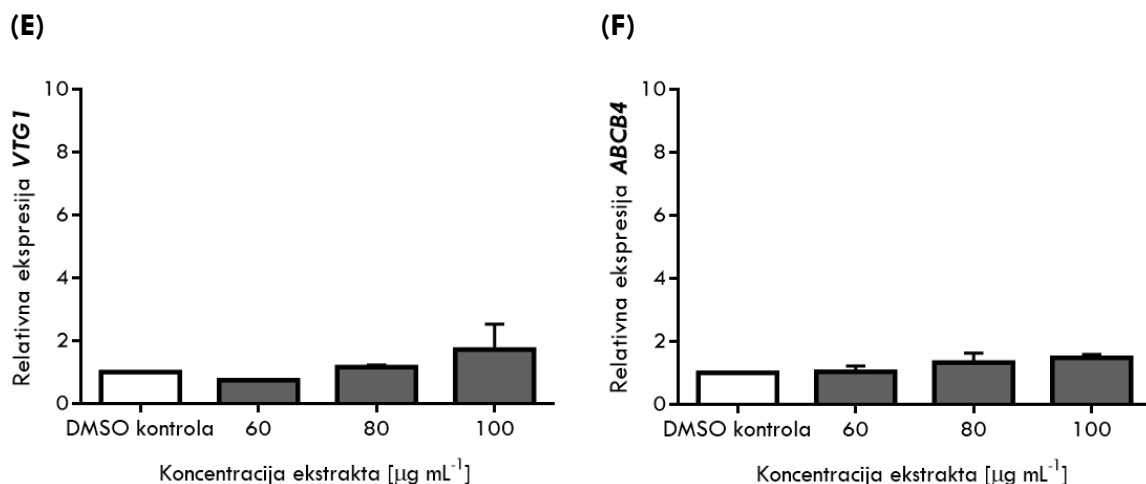


(C)



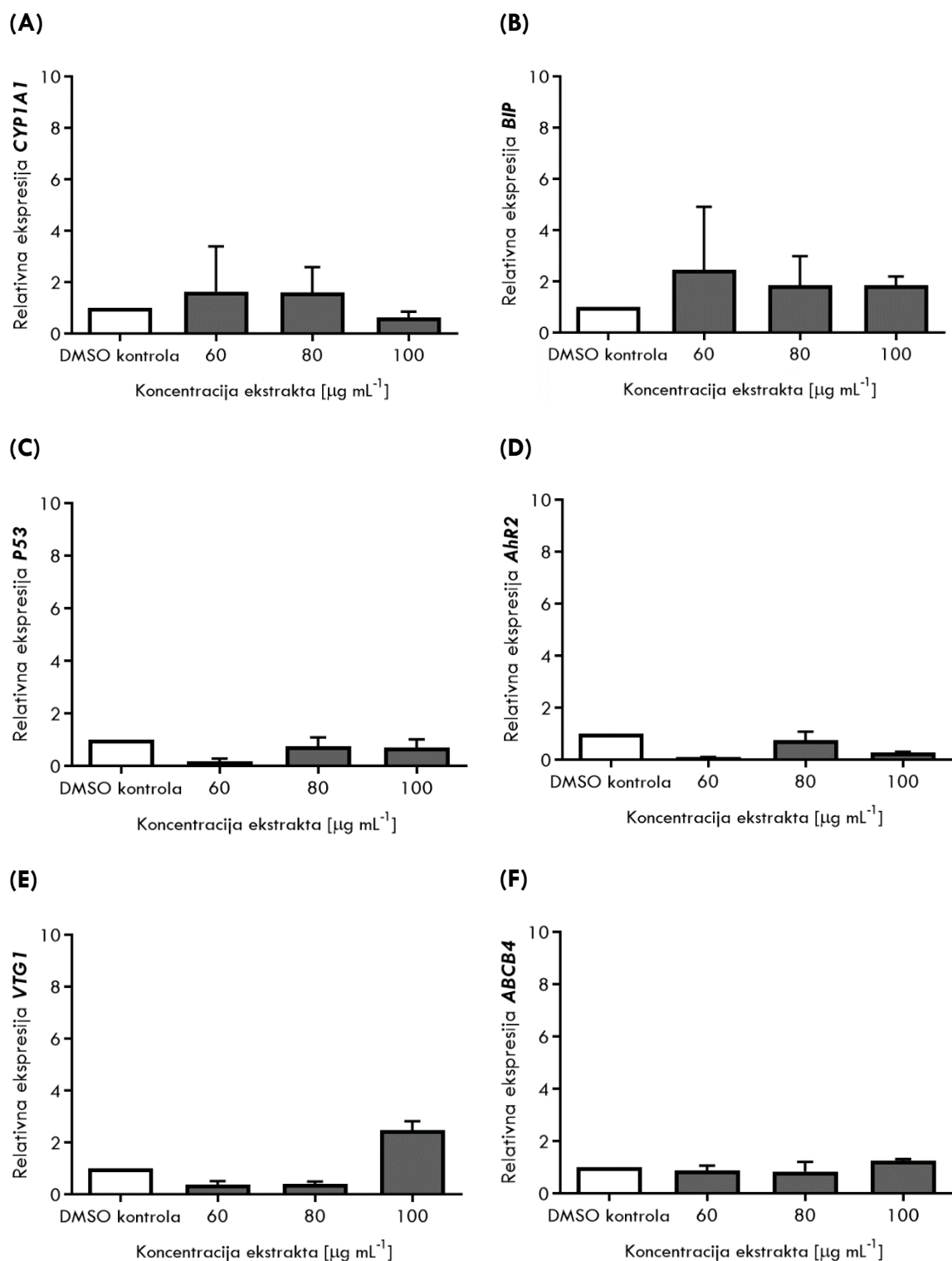
(D)





**Slika 38.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja **Nostoc 2S1** na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Ispitivanjem dejstva ekstrakata soja **Nostoc 2S3B** nisu utvrđene statistički značajne promene u odnosu na kontrolu u bilo kojoj od koncentracijskih grupa (Slika 39). Najveće promene u odnosu na kontrolu su zabeležene kod gena *bip* i *vtg*, pri čemu uočena odstupanja nisu bila veća od 2.4 puta (Slike 39B i 39E). Geni *cyp1a1* i *bip* su imali blago povišene nivoe ekspresije pri nižim koncentracijama (Slike 39A i 39B), dok su pri najvišoj koncentraciji nivoi bili smanjeni, posebno u slučaju gena *cyp1a1*. Sa druge strane, u slučaju gena *p53* se može uočiti znatno niži nivo ekspresije pri koncentraciji od  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  dok veće koncentracije ekstrakta nisu izazvale veće promene u odnosu na kontrolne vrednosti (Slika 39C). Sličan obrazac je uočen u rezultatima dobijenim za gen *ahr2*, sa smanjenjem nivoa ekspresije u sve tri tretman grupe, pri čemu je najniža koncentracija ekstrakta u ovom slučaju takođe ispoljila najizraženiji inhibicioni efekat na ekspresiju ovog gena (Slika 39D). Gen *vtg1* je imao snižene nivoe ekspresije pri nižim koncentracijama dok je pri najvišoj koncentraciji ekstrakta zabeležena ekspresija približno 2 puta veća u odnosu na kontrolu (Slika 39E). Praćenjem ekspresije gena *abcb4* nije uočeno značajno odstupanje u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 39F).

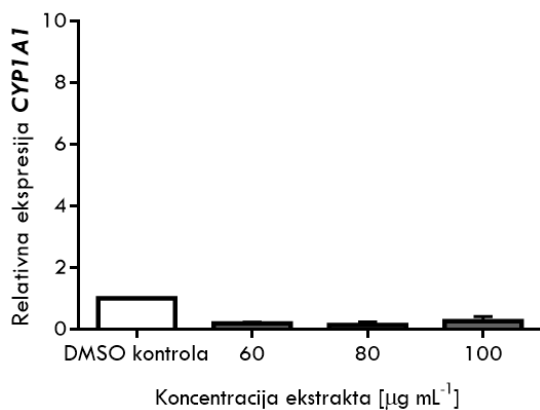


**Slika 39.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Nostoc 2S3B* na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubiči sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

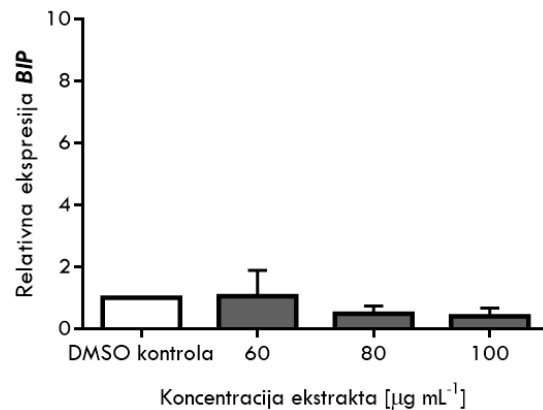
Među testiranim genima nakon izlaganja svih test grupa dejstvu ekstrakata soja *Nostoc LC1B*, utvrđena je značajna promena u ekspresiji *abcb4* gena u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 40F). U grupi sa najvećom koncentracijom (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ekspresija gena *abcb4* je statistički značajno

indukovana, pokazujući povećanje od 5.46 puta u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p = 0.0230$ ). Pored toga, *cyp1a1* i *ahr2* geni su pokazali značajno smanjene nivoe ekspresije u poređenju sa kontrolnom grupom pri delovanju svih testiranih koncentracija ekstrakta (Slika 40A; Slika 40D). Ova promena u regulaciji ekspresije može biti pokazatelj inhibitornih efekata primenjenih ekstrakata cijanobakterija na ekspresiju navedenih gena i procese u koje su oni uključeni. Nisu primećene značajne promene u ekspresiji za preostale testirane gene, *bip*, *p53* i *vtg1*, u bilo kojoj od preostalih eksperimentalnih grupa. Međutim, kod u slučaju gena *bip* i *p53*, može se uočiti dozno-zavisno smanjenje nivoa ekspresije, pri čemu je potencijalno inhibitoran efekat ekstrakata bio posebno izražen nakon primene koncentracija većih od  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 40B; Slika 40C). Slično tome, ekspresija gena *vtg1* je bila smanjena pri najvišoj koncentraciji ekstrakta, dok su u preostale dve grupe registrovane vrednosti u nivou kontrole (Slika 40E).

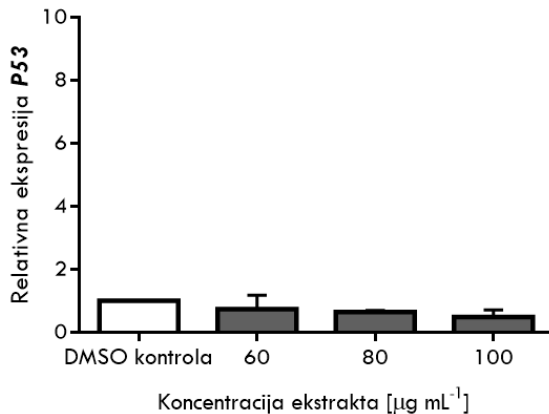
(A)



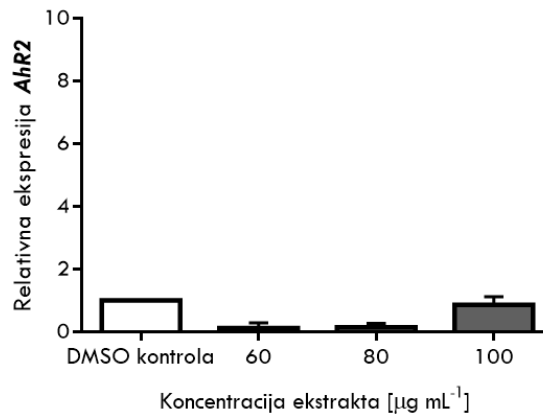
(B)

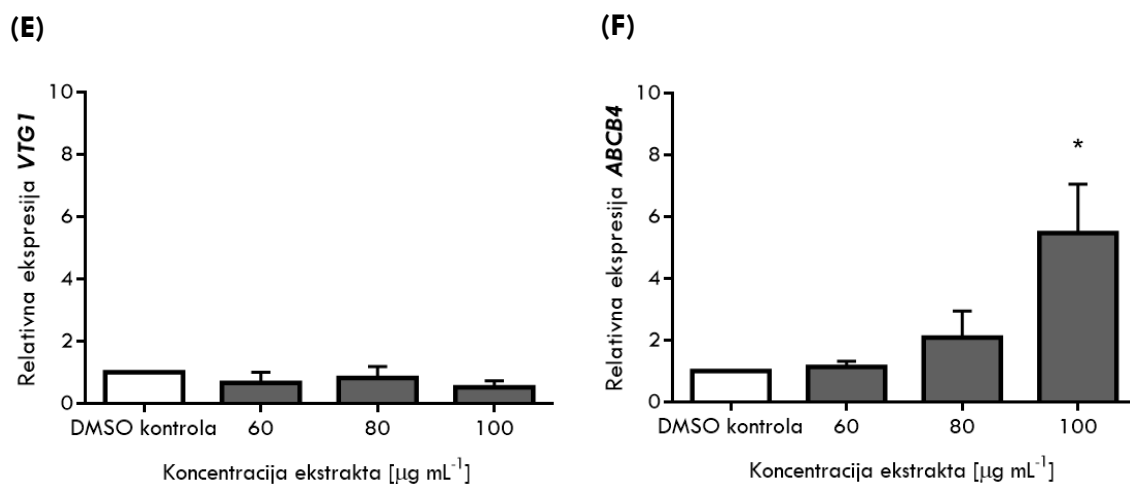


(C)



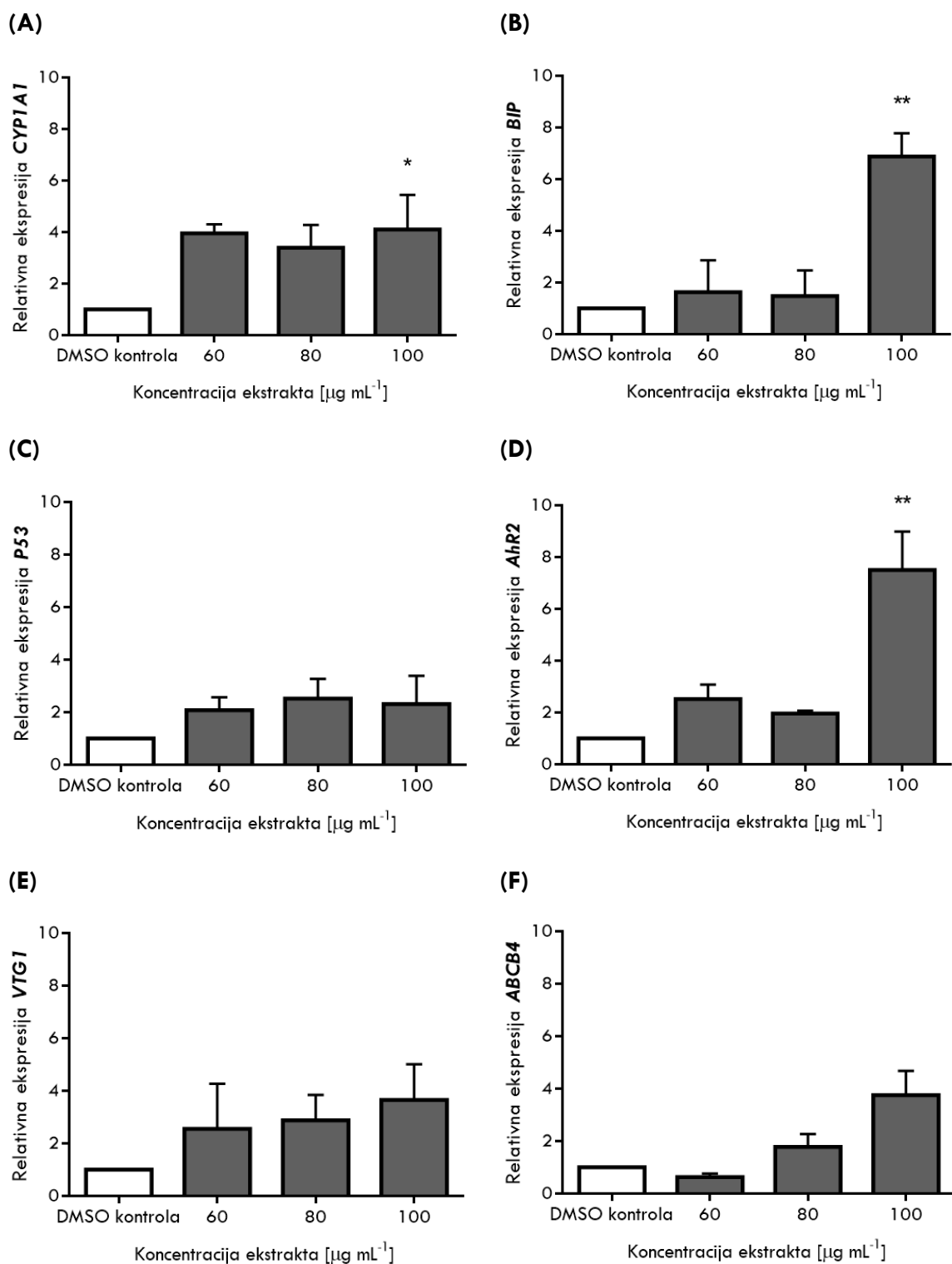
(D)





**Slika 40.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja **Nostoc LC1B** na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: **(A)** *cyp1a1*, **(B)** *bip*, **(C)** *p53*, **(D)** *ahr2*, **(E)** *vtg1* i **(F)** *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Kao odgovor na izlaganje ekstraktima soja **Nostoc Z1** došlo je do povećanja u ekspresiji gotovo svih praćenih gena kod test organizama (Slika 41). Može se takođe primetiti da je kod većine gena indukcija postajala intenzivnija u skladu sa povećanjem koncentracije ekstrakata reflektujući dozno-zavisni trend. Najizraženije promene su uočene u ekspresiji gena *cyp1a1*, *bip* i *ahr2*. U slučaju gena *cyp1a1*, nivoi ekspresije u sve tri koncentracijske grupe su bili približni, međutim, najznačajnije odstupanje (4.10 puta,  $p = 0.0500$ ) je zabeleženo u grupi sa najvećom koncentracijom ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Slika 41A). Slični rezultati su dobijeni u slučaju gena *bip* i *ahr2*, gde je najveća primenjena koncentracija izazvala povećanje od 6.88 ( $p = 0.0018$ ) (Slika 41B) odnosno 7.50 ( $p = 0.0003$ ) puta (Slika 41D). Zabeležena je takođe indukcija ekspresije gena *p53* u sve tri tretman grupe, gde je pri najnižoj koncentraciji ekstrakta ekspresija povećana dva puta u odnosu na kontrolne vrednosti, dok su više koncentracije izazvale povećanje od 2.5 do 3 puta (Slika 41C). Primećena je takođe dozno-zavisna indukcija povećanje nivoa ekspresije gena *vtg1* i *abcb4*, sa maksimalnim povećanjima oko 3.5 puta u odnosu na kontrolu (Slika 41E; Slika 41F).



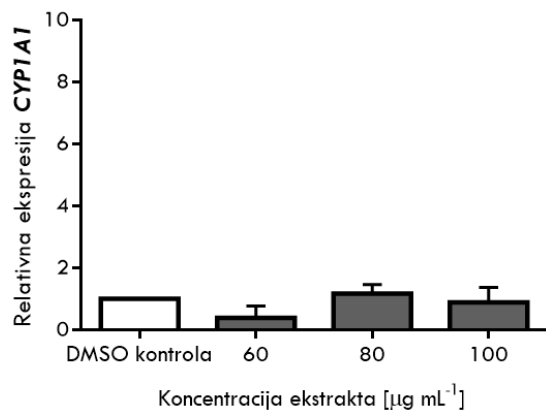
**Slika 41.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Nostoc Z1* na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abc4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Izlaganje test organizama ekstraktima soja *Oscillatoria DTD-Bečej* nije dovelo do statistički značajnijih promena u ekspresiji odabranih gena (Slika 42). Međutim, na osnovu dobijenih podataka se mogu uočiti određene pravilnosti. Utvrđeno je povećanje nivoa ekspresije gena

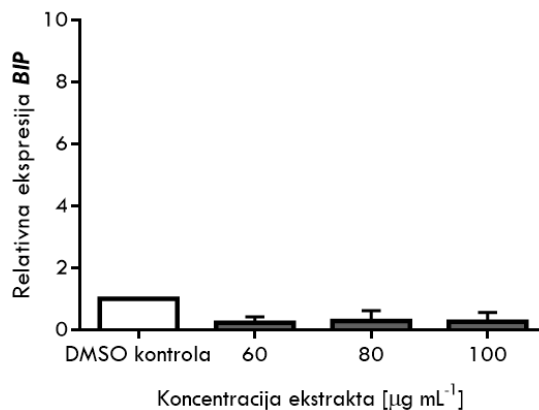


*cyp1a1* i *ahr2* u tretman grupama sa višim koncentracijama ekstrakta, ali ovo povećanje nije dostiglo nivo veći od 1.7 do 2 puta u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 42A; Slika 42D). Nasuprot tome, *bip* i *vtg1* geni su pokazali značajno smanjenje ekspresije u svim koncentracijskim tretmanima (Slika 42B; Slika 42E). Nivoi ekspresije ovih gena bili su 3 do 4 puta niži od kontrolne grupe, što ukazuje na inhibitorne efekte primenjenih cijanobakterijskih ekstrakata. Primećen je sličan trend u nivoima ekspresije gena *p53* i *abcb4*, pri čemu je došlo do inhibicije u grupama izloženim najnižim koncentracijama ekstrakta, dok su vrednosti ostale na nivou kontrole pri višim koncentracijama (Slika 42C, Slika 42F).

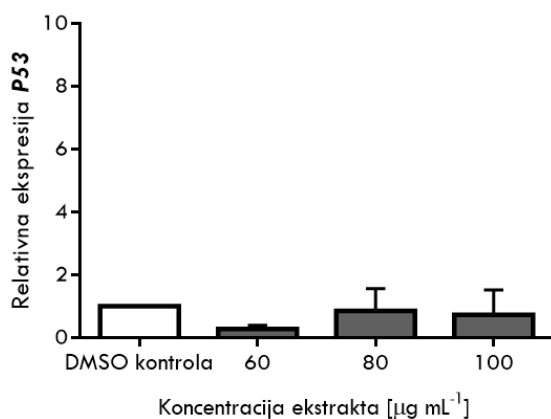
(A)



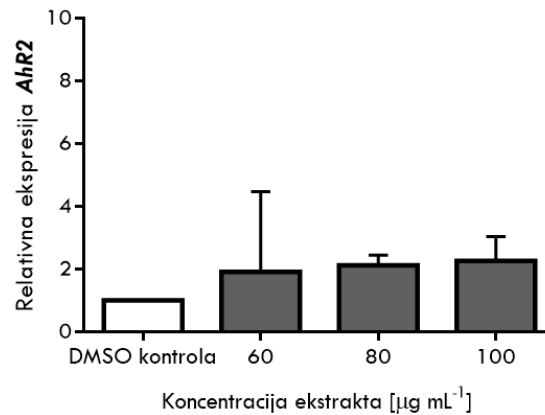
(B)

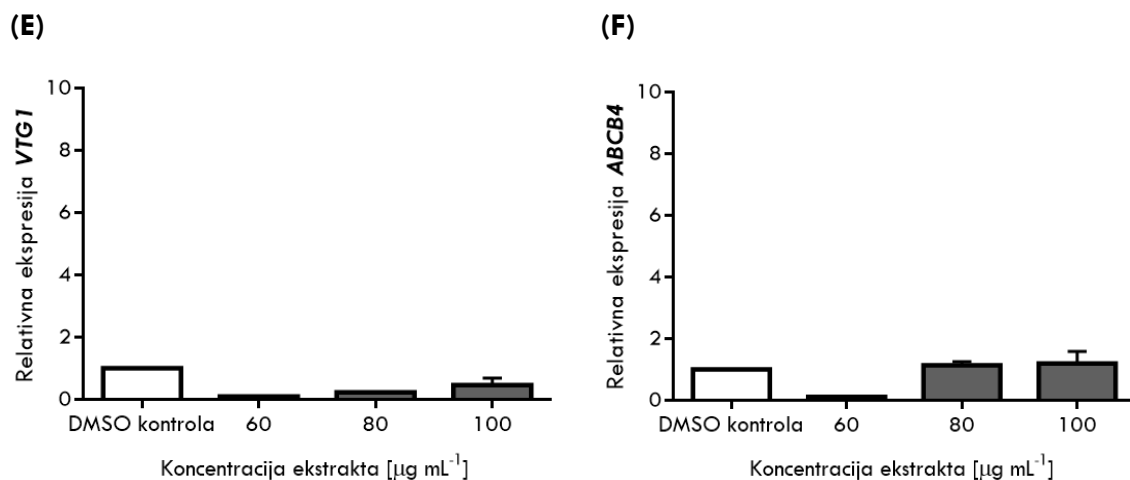


(C)



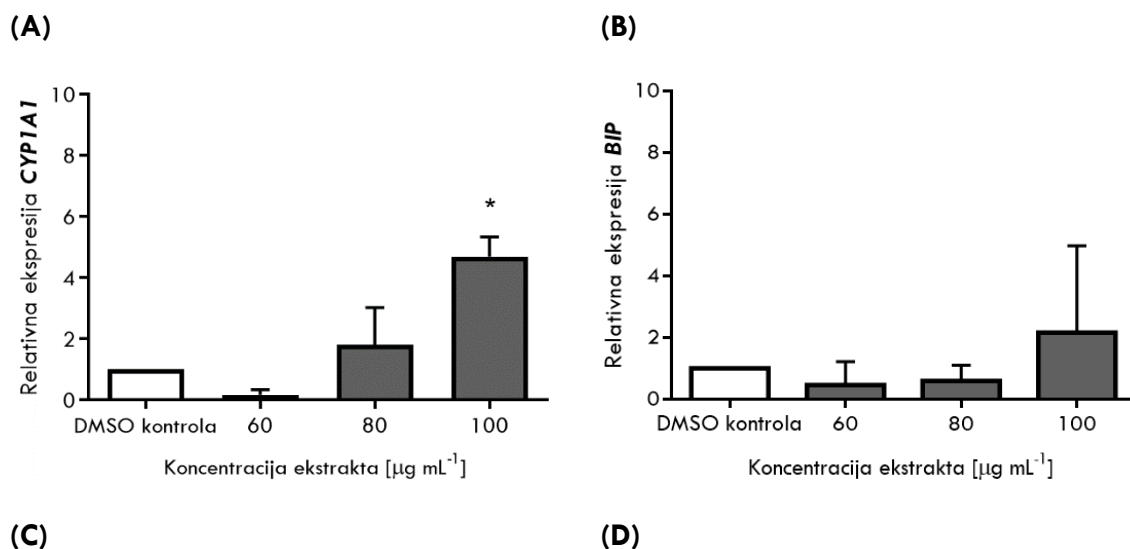
(D)

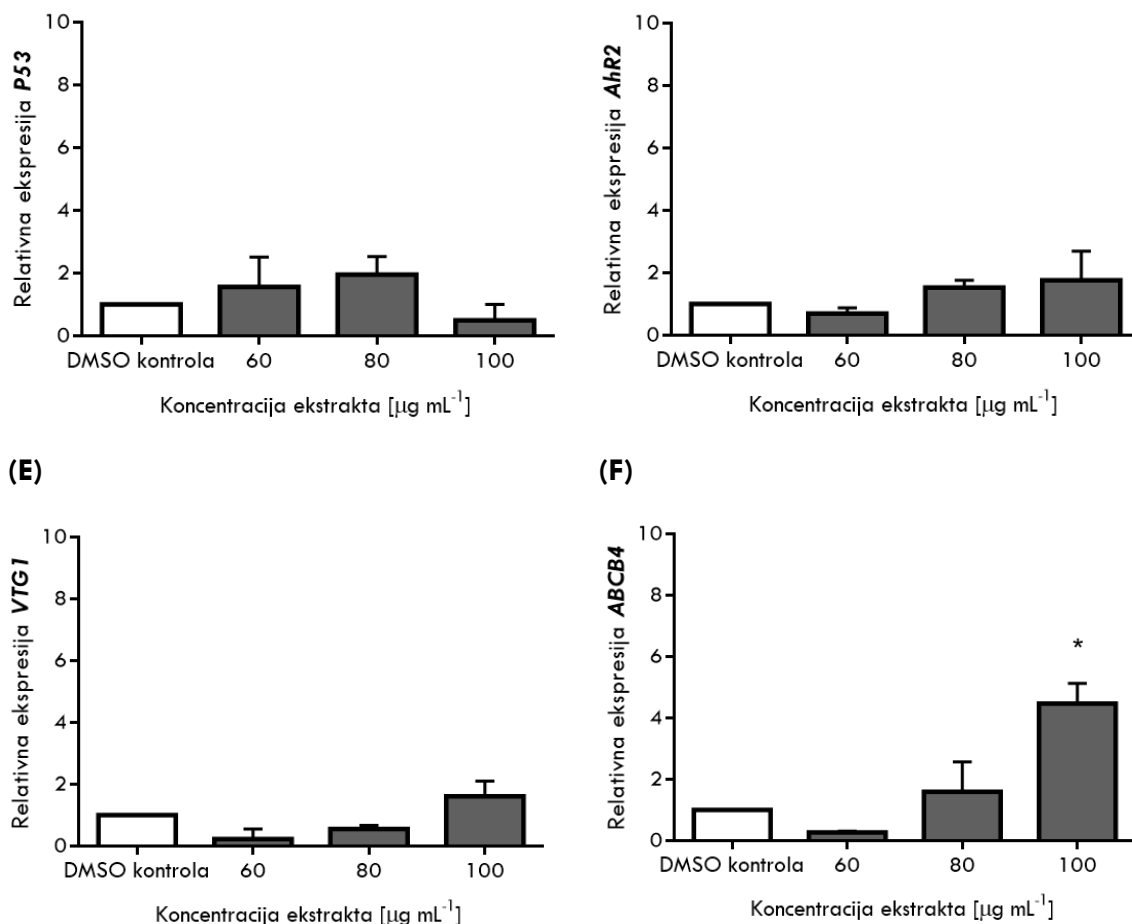




**Slika 42.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Oscillatoria* DTD-Bečej na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

U slučaju soja *Oscillatoria* K3, uočen je trend indukcije gena *cyp1a1*, *bip*, *ahr2* i *abcb4* zavisan od primenjene koncentracije ekstrakta (Slika 43). Među testiranim genima, statistički značajna promena je primećena samo u nivoima ekspresije gena *cyp1a1* i *abcb4* (Slika 43A; Slika 43F). U tretmanu sa najvećom koncentracijom ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ekspresija gena *abcb4* je značajno indukovana, pokazujući povećanje od 4.47 puta u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p=0.0221$ ). Zabeležena je indukcija *cyp1a1* u grupi sa najvišom koncentracijom ekstrakta, sa povećanjem od 4.6 puta u nivou ekspresije u odnosu na kontrolu. Dozno-zavisna indukcija ekspresije je registrovana i u slučaju gena *bip*, *ahr2* i *vtg1*, pri čemu je uočeno povećanje od približno 2 puta u odnosu na kontrolne vrednosti pri koncentraciji ekstrakta od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Slika 43B; Slika 43D; Slika 43E). U slučaju gena *p53*, najviša primenjena koncentracija ekstrakta je ispoljila inhibitorski efekat na ekspresiju ovog gena, dok su niže koncentracije izazvale blago povećanje nivoa ekspresije (Slika 43C).



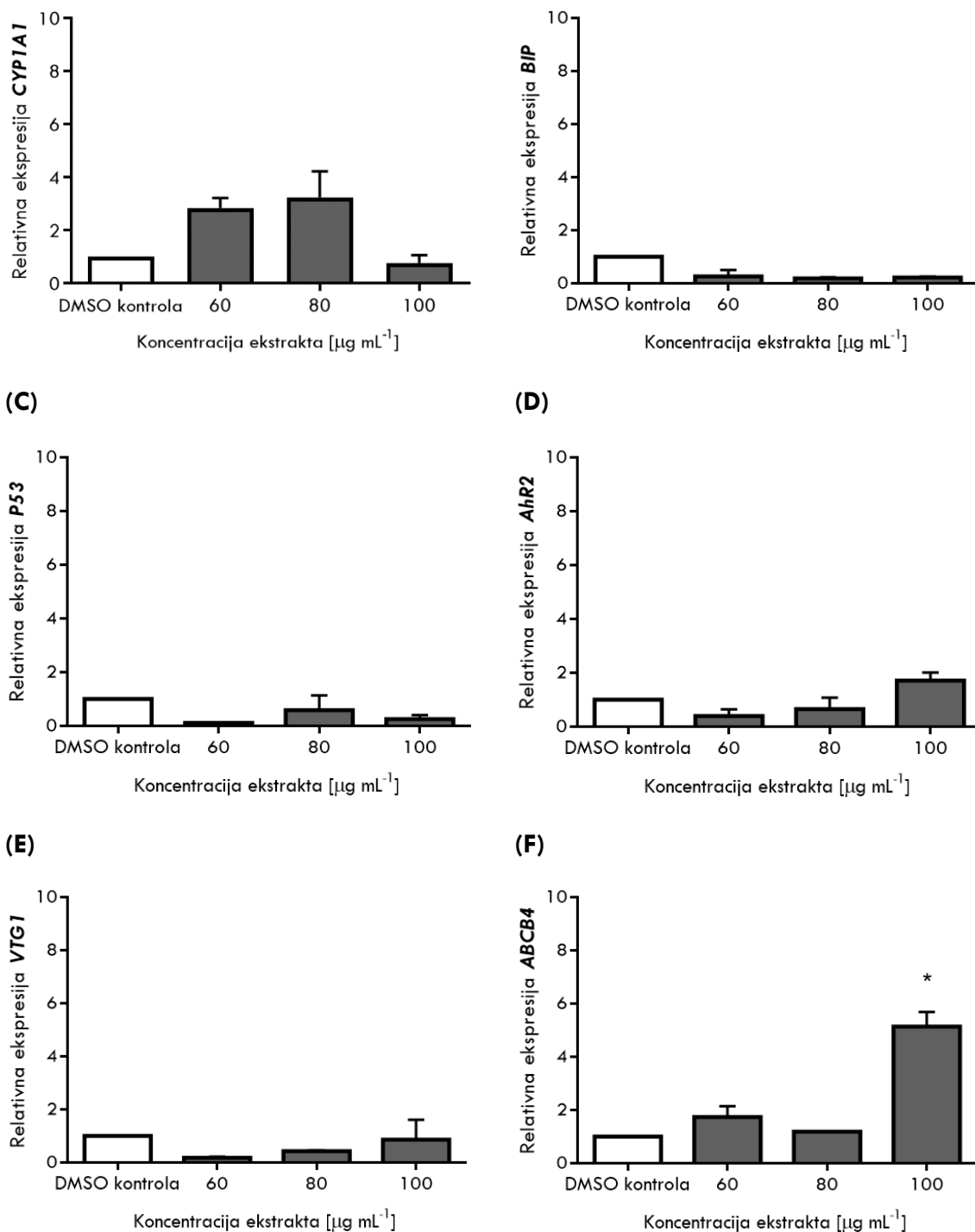


**Slika 43.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Oscillatoria K3* na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Prilikom izlaganja zebrića ekstraktima soja *Oscillatoria Z1*, utvrđena je promena ekspresije gena *cyp1a1* u skladu sa primenjenom koncentracijom ekstrakta ovog soja (Slika 44). Pri nižim koncentracijama, primećena je indukcija ovog gena koja je dostigla povećanje od 3.23 puta pri tretmanu sa  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  ekstrakta u odnosu na kontrolu. Međutim, u grupi sa najvećom koncentracijom ekstrakta, nivo ekspresije *cyp1a1* je bio nešto niži od kontrolnog (Slika 44A). Za gen *abcb4*, značajno povećanje ekspresije primećeno je samo u grupi sa najvećom koncentracijom ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), pri čemu je nivo ekspresije ovog gena značajno promenjen, pokazujući povećanje od 5.13 puta u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p=0.0322$ ) (Slika 44F). Nivoi ekspresije gena *abcb4* u preostalim koncentracijskim grupama bili su približni kontrolnim. Većina ostalih testiranih gena (*bip*, *p53*, *vtg1*) pokazala je neznatno snižene nivoe ekspresije kao odgovor na delovanje ekstrakata soja *Oscillatoria Z1*, iako nijedna od ovih promena nije bila statistički značajna (Slika 44B; Slika 44C; Slika 44E).

(A)

(B)



**Slika 44.** Efekti tri različite koncentracije ekstrakta cijanobakterijskog soja *Oscillatoria Z1* na relativne nivoe ekspresije šest odabranih gena kod test organizama vrste *D. rerio*: (A) *cyp1a1*, (B) *bip*, (C) *p53*, (D) *ahr2*, (E) *vtg1* i (F) *abcb4*. Promene u nivoima ekspresije gena u odnosu na netretirane DMSO kontrolne grupe su predstavljene kao stubići sa srednjim  $\pm$  SD vrednostima tri nezavisna eksperimenta. Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ ).

Na osnovu prikazanih rezultata delovanja testiranih sojeva cijanobakterija na ekspresiju gena zebrica se može primetiti da su najznačajnije promene zabeležene u ekspresiji gena uključenih u signalne puteve metabolizma ksenobiotika (*ahr2*, *cyp1A1* i *abcb4*). Primećeni su značajni biološki efekti cijanobakterijskih sojeva *Anabaena Č2*, *Anabaena Č5*, *Nostoc Z1* i *Oscillatoria K3*, kada se radi o njihovoj interakciji sa enzimima prve faze procesa detoksikacije, pošto je

zabeležena aktivacija aril ugljovodoničnog receptora i indukovana aktivnost CYP1A1, kao osnovnih elemenata AHR/CYP1 signalnog puta. Geni aril-ugljovodoničnog receptora 2 (*ahr2*) i citohroma P450 1A1 (*cyp1A1*) kod vrste *Danio rerio* imaju ključnu ulogu u detoksikaciji štetnih jedinjenja (Hu i sar., 2007; Denison i sar., 2011). Gen *ahr2* kodira ligandom aktiviran transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju različitih gena uključenih u metabolizam ksenobiotika. Ovaj gen se eksprimuje tokom razvoja zebrice i ima ulogu u normalnom razvoju i homeostazi ovih organizama. Aktivacija *ahr2* nakon izlaganja ksenobioticima dovodi do indukcije ekspresije gena *cyp1A1*, koji je rani i nespecifični biomarker aktivacije *ahr2* gena (Abel i Haarmann-Stemann, 2010). Gen *cyp1A1* ima ulogu u metabolizmu širokog spektra ksenobiotika u organizmu zebrica i njegovi enzimski produkti su primarno locirani u tkivu jetre, ali se takođe mogu naći u ekstrahepatičnim tkivima kao što su škrge, bubrezi i srce (Stegeman i sar., 1989; Buchmann i sar., 1993). Do indukcije *cyp1A1* gena dolazi nakon izlaganja različitim jedinjenjima, uključujući poliaromatične ugljovodonike (PAH), polihlorovane bifenile (PCB) i halogenovane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane (Goksøyr, 1995). Indukcija gena *cyp1A1* je takođe opisana kod tri cijanobakterijska soja u radu Marić i sar. (2020). Nakon ispitivanja uticaja različitih frakcija ekstrakata ovih sojeva, autori su potvrdili produkciju potentnih CYP1A1-indukujućih metabolita i izdvojili karotenoide kao moguće uzročne agense za ovaj efekat. Uloga *cyp1A1* i *ahr2* gena u metabolizmu cijanotoksina na nivou zebrica nije precizno utvrđena i rezultati objavljenih istraživanja su često kontradiktorni. Lee i sar. (2013) su ispitali potencijal prečišćenih mikrocistina da izazovu transkripcione promene kod niza ciljnih gena kod jedinki vrste *Danio rerio*, među kojima i *ahr2* i *cyp1A1*. Nakon 24 sata izlaganja, nivoi transkripcije gena *cyp1A1* u jetri zebrica su ostali nepromenjeni, dok su nivoi iRNK *ahr1* i *ahr2* bili značajno povišeni u poređenju sa kontrolnom grupom nakon izlaganja koncentraciji mikrocistina od 200 µg L<sup>-1</sup>. Sa druge strane, nakon izlaganja zebrica ekstraktima sojeva *Aphanizomenon gracile* i *Raphidiopsis raciborskii*, utvrđena je supresija transkripcionih nivoa *cyp1A* gena od približno 1.4-2.7 puta u jetrama test organizama u odnosu na kontrolne vrednosti (Falfushynska i sar., 2021). U istom radu je ispitan i uticaj prečišćenog cilindrospermopsina i MC-LR, pri čemu su transkripcioni nivoi ovog gena bili 2.2-2.7 puta manji od kontrolnih. Uticaj cilindrospermopsina na ekspresiju gena *cyp1A1* je takođe potvrđen i u testovima sa određenim ćelijskim linijama. U istraživanju koje su sproveli Hercog i sar. (2020), utvrđena je indukcija enzima faze I i faze II procesa detoksikacije, specifično CYP1A1 i CYP3A4, nakon izlaganja HepG2 sferoida aktivnosti cilindrospermopsina. Detektovana je pojačana ekspresija gena *cyp1A1* od 13.2 puta i *cyp3A4* od 2.45 puta u odnosu na kontrolne vrednosti, što ukazuje na uključenost ovog mehanizma detoksikacije u medijaciju toksičnog delovanja CYN. U prethodnim radovima je takođe otkriveno da CYN može pojačati ekspresiju *cyp1A1* gena u humanim perifernim limfocitima (Štraser i sar., 2011; Hercog i sar., 2017).

ATP-vezujući kasetni transporter (ABC transporter) predstavljaju klasu transmembranskih proteina koji igraju ključnu ulogu u ćelijskim odbrambenim mehanizmima u različitim organizmima, od prokariota do sisara (Higgins, 1992). ABC transporteri su vezani za ćelijske membrane i funkcionišu kao deo ključnog mehanizma za olakšavanje translokacije različitih supstrata (poput ksenobiotika, egzogenih i endogenih molekula) izvan bioloških membrana. Ovi transporteri imaju vitalnu ulogu u različitim fiziološkim procesima, kao što je održavanje integriteta organa za izlučivanje (npr. bubrega), funkcionisanje selektivnih barijera (npr. krvno-moždana barijera) i zaštita od primarnog ulaska štetnih jedinjenja iz životne sredine na mestima apsorpcije (npr. gastrointestinalni trakt). Iako zebrice nemaju direktan ortolog gena *abcb1*

prisutnog kod sisara, u njihovom genomu su identifikovana dva paralogna gena, *abcb4* i *abcb5*, koji imaju zajedničko poreklo sa humanim genima *abcb4* i *abcb5* (Fischer i sar., 2013). Do sada je poznato da p-glikoprotein kodiran genom *abcb4* pokazuje aktivnost sličnu multiksenobiotskoj rezistenciji u embrionima zebrice pa se tako smatra funkcionalno sličnijim humanom *abcb1* genu, dok funkcija *abcb5* gena nije u potpunosti razjašnjena (Fischer i sar., 2013). Dokazana je umešanost *abcb4* u ekskreciji različitih toksičnih jedinjenja i zaštiti ćelija zebrica od ksenobiotika (Fischer i sar., 2013; Park i sar., 2023), ali interakcija sa cijanotoksinima i dalje nije opsežno ispitana. Iz tog razloga, rezultati predstavljeni u ovom radu mogu potencijalno doprineti boljem razumevanju uloge *abcb4* gena u zaštiti zebrica od toksičnosti cijanobakterija, posebno u kontekstu modulacije biodostupnosti i samim tim toksikološke potentnosti cijanobakterijskih metabolita. U okviru ove doktorske disertacije, utvrđena je značajna indukcija *abcb4* gena u eksperimentalnim grupama gde su jedinke bile izložene ekstraktima sojeva *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Nostoc* LC1B, *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1, pri čemu se stopa promena sastojala od povećanja nivoa ekspresije 4 do 5 puta u odnosu na kontrolne grupe. Indukcija manjeg intenziteta je uočena i kod ostalih sojeva nakon primene viših koncentracija ekstrakata, međutim bez statističke značajnosti. Sličan trend se može pronaći u istraživanju Lu i sar. (2015), gde su istraženi efekti čistog toksina MC-LR na razvoj embriona zebrice. Ekspresija gena *abcb4* je značajno indukovana u periodu 12-96 hpf i stope indukcije su varirale u rasponu od 1.41-2.08 u zavisnosti od primenjene koncentracije toksina. Dodatno je utvrđeno da se kod adultnih jedinki transkripcija *abcb4* gena uglavnom odvijala u crevima i jetri, pa zatim mišićima, škragama, očima i jajnicima, a relativno niski nivoi transkripta su otkriveni u testisima, bubrezima, srcu i mozgu, što je u skladu sa poznatim aspektima mehanizma dejstva mikrocistina (Bieczynski i sar., 2021).

Značajna indukcija ekspresije gena *bip* je zabeležena u slučaju delovanja sojeva *Nostoc* Z1 i *Nostoc* 2S1, dok je povećanje ekspresije u odnosu na kontrolu u manjoj meri zabeleženo i kod sojeva *Anabaena* Č2 i *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. U slučaju soja *Anabaena* Č5, zabeležena je značajna redukcija nivoa ekspresije gena *bip* samo u eksperimentalnoj grupi izloženoj najvećoj koncentraciji ekstrakta ovog soja. Gen *bip* kod zebrica igra vitalnu ulogu u odgovoru na stres endoplazmatskog retikuluma (ER) i odgovoru na prisustvo nepravilno formiranih proteina. Normalno funkcionisanje ER može biti poremećeno fiziološkim ili toksikološkim faktorima, što dovodi do akumulacije neformiranih ili pogrešno formiranih proteina, što izaziva ER stres (Malhotra i Kaufman, 2007). Indukcija transkripcije *bip* gena se zbog toga koristi kao marker za identifikaciju ER stresa i inicijaciju specifičnog seta reakcija reparacije. Važno je napomenuti da se ova indukcija prvenstveno javlja na nivou iRNK i ne mora uvek da korelira sa promenama na nivou proteina (Faltermann i sar., 2016). Pokazano je da u kulturama tkiva jetre, kratkotrajna i dugotrajna izloženost dejstvu toksina MC-LR (0.15-0.3 mM L<sup>-1</sup>) i nodularina (0.5-1 mM L<sup>-1</sup>) izaziva značajnu transkripcionu indukciju nekoliko gena koji predstavljaju markere ER-stresa, uključujući i *bip* gen nakon 2.5 i 5 časova izlaganja (Faltermann i sar., 2016). U istom radu je zaključeno da izlaganje eleutero-embriona zebrice u trajanju od 4 sata nakon 120 i 168 hpf nije rezultiralo značajnim transkripcionim promenama ovog gena. Slično tome, ispitivanjem uticaja cijanobakterijskog metabolita eruginozina 828A, koji predstavlja poznat inhibitor serin proteaza, na ekspresiju različitih gena kod zebrica, nije utvrđena značajna promena u ekspresiji *bip* gena, primenjenog kao marker ER stresa (Faltermann i sar., 2016b). Nasuprot tome, u radu Zhang i sar. (2020) nije utvrđena indukcija ekspresije *bip* gena pri koncentraciji od 5 i 35 mmol L<sup>-1</sup> MC-LR u kulturi ćelija jetre zebrica.

Autori su zaključili da je nedostatak indukcije ER-stresa od strane MC-LR u ovom slučaju verovatno posledica smanjenog unosa i samim tim nedovoljne akumulacije toksina u ćelijama. Shodno tome sojevi testirani u ovoj tezi koji su ispoljili efekat na ekspresiju ovog gena poseduju potencijal za produkciju toksičnih jedinjenja, koji ne moraju pripadati grupi mikrocistina, a koji dovode do narušavanja funkcije ER kod zebrića.

Gen *p53* kod zebrića funkcioniše kao supresor tumora i faktor transkripcije koji igra ključnu ulogu u različitim ćelijskim odgovorima na stres. Ovaj nuklearni fosfoprotein biva indukovan u odgovoru na ćelijski stres i deluje kao transkripcioni transaktivator u putevima povezanim sa regulacijom apoptoze, sintezom i popravkom DNK i regulacijom ćelijskog ciklusa (Sherr i McCormick, 2002; Hofseth i sar., 2004). Specifični ishodi aktivacije *p53*, međutim, zavise od stepena stresa i tipa ćelija u kojima se aktivnost ispoljava. U ovom radu, tretman ekstraktima soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 nije izazvao značajnu promenu u ekspresiji gena *p53*. Međutim, kod pojedinih sojeva roda *Nostoc* (*Nostoc* 2S1 i *Nostoc* Z1), utvrđeno je povećanje u nivoima ekspresije ovog gena (približno 2 puta u odnosu na kontrolu) pri višim koncentracijama ekstrakata. Statistički značajno odstupanje od kontrolnih vrednosti je utvrđeno samo kod soja *Anabaena* Č5, gde je ekspresija ovog gena bila približno 9 puta manja u odnosu na kontrolne vrednosti u grupi tretiranoj sa 100 µg mL<sup>-1</sup>. U dosadašnjim istraživanjima, indukcija procesa apoptoze nastala kao rezultat modulacije ekspresije *p53* gena je opisana nakon izlaganja različitim grupama organizama dejstvu toksina iz grupe mikrocistina i specifično MC-LR (Chen i Xie, 2005; Li i sar., 2011; Wang i sar., 2012; Ji i sar., 2013). Značajna indukcija je utvrđena u radu Zeng i sar. (2014), prilikom ispitivanja uticaja MC-LR u ranim fazama razvoja zebrića. Utvrđena je značajna up-regulacija transkripcionih nivoa gena *p53*, koja je uključivala povećanje od 1.73 i 4 puta pri koncentracijama toksina od 2 i 5 mg L<sup>-1</sup> redom. Sličan efekat je utvrđen i u radu Zhang i sar. (2013), gde je ispitan uticaj prečišćenih toksina (gonijatoksina 1 i 5 i neosaksitoksina) slatkovodnog soja *Aphanizomenon flos-aquae* na jedinke vrste *D. rerio* nakon intraperitonealne injekcije. Promena u ekspresiji gena *p53* je utvrđena već nakon prvog sata izlaganja, dok je maksimalno povećanje od 2.31 puta u odnosu na kontrolu zabeleženo nakon 9h izlaganja. U radu Faltermann i sar. (2014), ispitani su molekularni efekti cijanobakterijskog toksina cijanopeptolina kod embriona zebriće putem analize transkriptoma. Rezultati su ukazali na značajnu aktivaciju gena *p53* pri koncentracijama toksina od 1000 µg L<sup>-1</sup>, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za gore navedene sojeve roda *Nostoc* testirane u ovoj doktorskoj disertaciji. Pored toga, rezultati istraživanja Falfushynska i sar. (2021) pokazuju značajno smanjenje nivoa transkripta gena *p53* od 1.5 do 2.2 puta u jetri zebrića izloženih dejstvu prečišćenih cilindrospermopsina i mikrocistina-LR. U istom radu, izlaganje dejstvu soja *R. raciborskii* SAG 1.97 je izazvalo sličan efekat, sa smanjenjem ekspresije *p53* gena od približno 1.5 puta, što je značajno manje u odnosu na inhibiciju istog gena zabeleženu u slučaju tretmana sa sojem *Anabaena* Č5.

Poslednjih godina, sve veći značaj se pridaje uticaju cijanotoksina, a posebno mikrocistina, na endokrini sistem akvatičnih organizama. Istraživanja sa jedinkama vrste *D. rerio* pokazuju da i čisti toksini i uzorci cvetanja cijanobakterijskih sojeva imaju potencijal za disrupciju endokrino sistema i stoga predstavljaju potencijalni rizik po ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Promene u nivoima vitelogenina (*vtg*) identifikovane su kao osetljivi biomarker za otkrivanje koncentracija supstanci koje ometaju endokrini sistem vodenih kičmenjaka. Vitelogenin je fosfolipoglikoprotein na čiju sintezu u jetri utiče steroidni hormon estradiol i koristi se u rastućim oocitima za stvaranje proteina žumanca tokom vitelogeneze (Sun i Zhang, 2015). Pored toga, funkcija jetre je vezana

za regulaciju reprodukcije kod oviparnih riba putem sinteze hepatičnog vitelogenina (vtg) (Arukwe i sar. 2003). Osam funkcionalnih vtg gena je potvrđeno u genomu zebrice (Yilmaz i sar., 2018), među kojima se smatra da je *vtg1* najizraženiji i stoga se najčešće koristi u testiranju toksičnosti cijanobakterija. U ovom radu, utvrđena je indukcija ekspresije gena *vtg1* kod gotovo svih sojeva roda *Nostoc*, pri čemu je najveća promena (približno 3 puta) utvrđena kod test organizama izloženih ekstraktima vodenog soja *Nostoc* Z1. Statistički značajna indukcija je, međutim, utvrđena samo nakon primene ekstrakata soja *Anabaena* Č2. Tretman ekstraktima ovog soja je izazvao povećanje u nivou ekspresije *vtg1* gena u svim koncentracijskim grupama od 4.11 do 5.87 puta u odnosu na kontrolu, pri čemu je najveća promena utvrđena nakon primene najniže koncentracije ekstrakta ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). U rezultatima dosadašnjih istraživanja, takođe se mogu naći analize promena u normalnim funkcijama endokrinog sistema zebrica izazvanih dejstvom cijanobakterijskih toksina, iako je takvih istraživanja relativno malo i odnose se uglavnom na mikrocistine. Prijavljena je modulacija funkcije endokrinog sistema i poremećaj oogeneze kod ženki zebrice izloženih dejstvu 2, 10 i  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  MC-LR tokom 21 dana (Zhao i sar., 2015). Nivoi transkripcije *vtg1* gena jetre (zajedno sa drugim faktorima koji regulišu oogenezu) kao i nivoi vtg hormona u plazmi, su pokazali dozno zavisian odgovor na prisustvo toksina, povećavajući se kod jedinki izloženih koncentraciji od  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  MC-LR i opadajući kada je primenjena veća koncentracija ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za soj *Anabaena* Č2 testiranom u ovoj doktorskoj disertaciji u slučaju kojeg je zabeležen isti trend promene ekspresije gena. Pored toga, izloženost MC-LR rezultirala je smanjenim uspehom oplodnje i izleganja ženki zebrice iz obe tretirane grupe, što predstavlja indicaciju transgeneracijskih efekata mikrocistina. Povećana ekspresija gena za vitelogenin je utvrđena i u radu Rogers i sar. (2011) nakon izlaganja larvi zebrice dejstvu liofilizirane biomase soja *Microcystis aeruginosa*, kao i prečišćenom MC-LR u koncentracijama  $100\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Zabeleženo je povećanje nivoa ekspresije *vtg* gena od 619.3 puta kod larvi izloženih dejstvu liofiliziranih ćelija ovog soja ( $50 \text{ mg ćelija L}^{-1}$ ), dok u grupi izloženoj čistom MC-LR toksinu nije bilo sličnih promena. Falfushynska i sar. (2021) su detektovali indukciju *vtg2* izoforme ovog gena kod izloženih zebrica nakon tretmana cijanopeptolinom CP1020, koja se sastojala od povećanja od 6 puta u odnosu na kontrolne vrednosti.

### **4.3. Uticaj različitih faktora kultivacije i faza rasta na toksičnost cijanobakterija**

*Artemia salina* biotest je upotrebljen kako bi se ispitala akutna toksičnost odabranih sojeva cijanobakterija i analizirale potencijalne izmene u intenzitetu toksičnosti uzrokovane promenom različitih parametara kultivacije. Specifično, analiziran je uticaj koncentracije dostupnih azotnih i fosfornih jedinjenja tokom kultivacije, efekat modifikacije svetlosnog režima (broja svetlih sati), kao i uticaj dužine trajanja kultivacije, odnosno toksičnost u različitim fazama rasta cijanobakterijskih kultura. Ovaj esej je izabran za primenu jer se pokazao korisnim u testiranju ekstrakata hepatotoksičnih (Campbell i sar., 1994) i neurotoksičnih cijanobakterijskih izolata (Lahti i sar., 1995; Lee i sar., 1999) i utvrđena je dobra korelacija između koncentracije toksina u uzorcima i uočenih stopa mortaliteta. Zbog toga se danas intenzivno koristi u istraživanju biološke aktivnosti cijanobakterija, prvenstveno kao brzi postupak skrininga toksičnih jedinjenja u situacijama kada je potrebno ispitati veliki broj uzoraka (Chaumot i sar., 2014; Tokodi i sar., 2018). Kao primarni producenti, cijanobakterije zavise od azota i fosfora kao esencijalnih makronutrijenata. Kako naseljavaju dinamične ekosisteme koje karakterišu sezonske fluktuacije



i periodični nedostaci hranljivih materija, ovi organizmi moraju da se prilagode stalno promenljivim uslovima što se dešava putem aktivacije različitih fizioloških odgovora koji mogu biti specifični za određeni cijanobakterijski soj (Pimentel i Giani, 2014). Dokazana je i dokumentovana važnost azota kao ekološkog faktora koji može da indukuje proizvodnju određenih metabolita u cijanobakterijama kao što su fikobiliproteini (Simeunović i sar., 2013) i određena fenolna jedinjenja (Blagojević i sar., 2018). Međutim, stepen do kog su promene u koncentracijama azota i fosfora povezane sa toksičnim cvetanjem cijanobakterija i njihovom proizvodnjom toksina i dalje nije u potpunosti razjašnjen. Osnovna svrha ovog dela istraživanja je proširenje saznanja na ovom polju korišćenjem sojeva različitih rodova cijanobakterija, ne ograničavajući se na sojeve roda *Microcystis* koji su opsežno proučeni i zastupljeni u literaturi. Rezultati ovog istraživanja mogu doprineti boljem razumevanju složenih mehanizama modulacije cijanobakterijske toksičnosti i obezbediti osnovu za unapređenje strategija upravljanja životnom sredinom i kontrole cijanobakterijskih populacija.

#### 4.3.1. Biotest *Artemia salina* - uticaj koncentracije azota na akutnu toksičnost odabranih sojeva

U ovom radu, biotest *Artemia salina* je korišćen za ispitivanje uticaja različitih koncentracija azota u formi natrijum-nitrata ( $\text{NaNO}_3$ ) na toksičnost odabranih sojeva cijanobakterija, dok je koncentracija fosfora održavana optimalnom za rast kulture po recepturi za podlogu BG11 ( $0.04 \text{ g L}^{-1}$ ). Dobijeni rezultati eksperimenta i statističke analize su ukazali na povećanu toksičnost većine sojeva nakon gajenja u azotom bogatijem okruženju (Tabela 9, Tabela 10, Prilog 1).

**Tabela 9.** Uticaj koncentracije azota na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*. Rezultati su kategorisani na osnovu primenjene koncentracije azota u tri nivoa: 0, 0.8 i 1.5 g NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, kao i perioda izlaganja test organizama (24 i 48 sati). Osnovne parametre čine granična vrednost letalnosti LC50, 95% interval poverenja (95% CI) dobijen za ovu vrednost, granična vrednost LC10 i R-kvadrat. Svi rezultati su izraženi u mikrogramima po mililitru (µg mL<sup>-1</sup>) primenjenog ekstrakta.

	24h ekspozicije				48h ekspozicije				
	Naziv soja	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
mBG11 (0 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.88	<b>8433.34</b>	2564.92	/	0.82
	<i>Anabaena</i> Č5	<b>2660.72</b>	2124.75	1923.09 - 3614.09	0.94	<b>1879.31</b>	1667.77	2844.46 - 4213.87	0.92
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	<b>567.54</b>	245.58	406.44 - 781.62	0.97	<b>400.86</b>	183.45	250.03 - 616.59	0.95
	<i>Nostoc</i> 2S1	<b>2312.06</b>	1779.02	1599.55 - 3221.06	0.93	<b>1905.46</b>	1529.01	1465.54 - 2454.70	0.96
	<i>Nostoc</i> 2S3B	> 10000	/	/	0.63	> 10000	/	/	0.64
	<i>Nostoc</i> LC1B	> 10000	570.16	/	0.82	> 10000	236.59	/	0.86
	<i>Nostoc</i> Z1	> 10000	231.73	/	0.81	<b>8109.61</b>	383.70	/	0.82
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	> 10000	3523.70	/	0.92	<b>6165.95</b>	3483.37	5382.69 - 7144.96	0.89
	<i>Oscillatoria</i> K3	<b>790.67</b>	738.93	472.06 – 922.01	0.99	<b>790.67</b>	738.93	472.06 – 922.01	0.99
	<i>Oscillatoria</i> Z1	<b>352.37</b>	206.50	200.44 - 602.56	0.94	<b>282.48</b>	163.78	177.01 - 439.54	0.95

		24h ekspozicije				48h ekspozicije			
Naziv soja	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	
mBG11 (0.8 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.86	>10000	/	/	0.87
	<i>Anabaena</i> Č5	2162.71	1800.85	1402.81 - 3388.44	0.89	2162.71	1800.85	1402.81 - 3388.44	0.89
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	48.50	16.96	17.25 - 92.68	0.96	30.19	19.66	17.33 - 102.82	0.99
	<i>Nostoc</i> 2S1	3235.93	2511.81	192.75 - 6279.10	0.74	3235.93	2511.81	192.75 - 6279.10	0.74
	<i>Nostoc</i> 2S3B	>10000	/	/	0.74	>10000	/	/	0.74
	<i>Nostoc</i> LC1B	>10000	/	/	0.73	>10000	/	/	0.72
	<i>Nostoc</i> Z1	>10000	/	/	0.91	5571.85	1129.83	968.27 - 3509.16	0.83
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	2238.72	1089.77	968.27 - 3206.99	0.81	2238.72	1089.77	968.27 - 3206.99	0.81
	<i>Oscillatoria</i> K3	281.83	184.96	157.76 - 514.04	0.92	168.26	127.39	137.08 - 209.41	0.98
	<i>Oscillatoria</i> Z1	339.62	223.19	189.67 - 633.86	0.93	319.15	210.29	188.36 - 555.90	0.94
mBG11 (1.5 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.9336	>10000	/	/	0.9336
	<i>Anabaena</i> Č5	>10000	/	/	0.9180	>10000	/	/	0.9180
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	48.86	25.99	25.00 - 74.98	0.9755	31.18	16.52	11.64 - 54.57	0.9773

Naziv soja	24h ekspozicije				48h ekspozicije			
	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
<i>Nostoc</i> 2S1	>10000	/	/	0.8000	>10000	/	/	0.6995
<i>Nostoc</i> 2S3B	>10000	/	/	0.8000	>10000	/	/	0.6995
<i>Nostoc</i> LC1B	<b>676.08</b>	147.47	126.47 - 2511.88	0.8640	<b>580.76</b>	131.59	74.64 - 2338.83	0.8417
<i>Nostoc</i> Z1	<b>1153.45</b>	561.48	117.48 - 8279.42	0.6293	<b>1078.94</b>	529.27	148.25 - 5260.17	0.6648
<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	<b>613.76</b>	298.77	968.27 - 3206.99	0.8153	<b>613.76</b>	298.77	968.27 - 3206.99	0.8153
<i>Oscillatoria</i> K3	<b>114.02</b>	79.70	98.17 - 131.52	0.9286	<b>101.39</b>	70.87	89.53 - 113.24	0.9846
<i>Oscillatoria</i> Z1	<b>344.34</b>	221.21	162.92 - 785.23	0.9010	<b>344.34</b>	221.21	162.92 - 785.23	0.9010

**Tabela 10.** Uticaj promene koncentracije azota tokom kultivacije na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize. Značajnost je označena p-vrednostima  $\leq 0.05$ .

Naziv soja	SS	df	MS	F (DFn, DFd)	P-vrednost
<i>Anabaena</i> Č2	797.6	5	159.5	5.575	<b>0.0451</b>
<i>Anabaena</i> Č5	1426	5	285.3	1.036	0.3732
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	2478	5	495.7	4.625	0.0648
<i>Nostoc</i> 2S1	1943	5	388.5	2.773	0.1299
<i>Nostoc</i> 2S3B	1436	5	287.3	7.576	<b>0.0104</b>
<i>Nostoc</i> LC1B	4304	5	860.7	11.10	<b>0.0082</b>
<i>Nostoc</i> Z1	2811	5	562.1	3.323	0.1214
<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	4104	5	820.7	8.045	<b>0.0162</b>
<i>Oscillatoria</i> K3	911.4	5	182.3	1.747	0.2452
<i>Oscillatoria</i> Z1	44.71	5	8.943	0.4039	0.5951

Ekstrakti soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 su ispoljili deset puta veću toksičnost nakon kultivacije soja u okruženju sa  $0.8 \text{ g L}^{-1}$  natrijum nitrata u odnosu na okruženje bez azota. Najniža vrednost LC50 od  $30.19 \mu\text{g mL}^{-1}$  je dobijena primenom ekstrakata ovog soja i sa daljim povećanjem koncentracije azota ova vrednost se neznatno promenila ( $31.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ovaj soj je korišćen kao pozitivna kontrola, pri čemu je konstatovano da uočena razlika u toksičnosti nije bila statistički značajna. U većini dosadašnjih istraživanja je opisana direktna pozitivna korelacija između prisustva azota i proizvodnje toksina u toksigenim cijanobakterijama, posebno ne-azotofiksirajućim sojevima kakvi su pripadnici roda *Microcystis* (Vezie i sar., 2002; Downing i sar., 2005; Harke i Gobler, 2013; Horst i sar., 2014). Toksični sojevi cijanobakterija generalno imaju veće zahteve u pogledu nivoa azota i fosfora u svom okruženju u poređenju sa sojevima koji nisu toksični, verovatno zbog većih energetskih i materijalnih zahteva procesa biosinteze toksina (Vezie i sar., 2002). Kako jedna od poznatih uloga azota u cijanobakterijama uključuje pojačanu sintezu proteina i intracelularnih koncentracija proteina, smatra se da dostupne koncentracije azota utiču na proizvodnju peptidnih toksičnih metabolita (Ownby i sar., 1979). Slično rezultatima dobijenim u ovom radu, Sevilla i sar. (2010) nisu otkrili značajne razlike između uslova niske i visoke koncentracije nitrata nakon ispitivanja efekata ograničenja azota na proizvodnju toksina kod soja *M. aeruginosa* PCC 7806. Takođe, Stolte i sar. (2002) su otkrili da iako dodavanje nitrata doprinosi povećanoj proizvodnji biomase i količine nodularina (takođe cikličnog neribozomalnog peptida) u kulturama soja vrste *Nodularia spumigena*, stope proizvodnje nodularina ostaju u istom nivou bez obzira na izvor azota, odnosno formu azotnog jedinjenja. U datom radu, maksimalne stope rasta bile su najveće kada su nitrati ili amonijum joni bili dostupni kao dodatni izvor azota, ali stope proizvodnje nodularina nisu se značajno razlikovale među kulturama sa različitim izvorima azota. Međutim, nekoliko istraživanja je

pokazalo da veće koncentracije azotnih jedinjenja u životnoj sredini dovode do povećanja brzine rasta i sadržaja mikrocistina toksičnih sojeva *M. aeruginosa* (Downing i sar., 2005; Beversdorf i sar., 2015), iako nije ispitana sama toksičnost nakon promene uslova sredine. U istraživanju Chaffin i sar. (2018) takođe je utvrđena povećana proizvodnja biomase i intenzivirana sinteza mikrocistina kao odgovor na kontinuiran i pulsni priliv azotnih jedinjenjima u različitim formama (nitratom, amonijum jonima i ureom). Utvrđeno je takođe da se koncentracija mikrocistina i ekspresija pojedinačnih *mcy* gena povećava u uslovima deficita azotnih jedinjenja, što ukazuje na komplikovaniji odnos ili čak varijabilnost odgovora od soja do soja (Ginn i sar., 2010; Pimentel i Giani, 2014). U vezi sa tim, Harke i Gobler (2013) su otkrili da u uslovima niskih koncentracija neorganskog azota, regulacija mnogih gena uključenih u sintezu peptida u genskom regionu mikrocistin sintetaze (*mcyA-F*) dovodi do smanjenja sadržaja mikrocistina po ćeliji. Ukoliko se takva povezanost između dostupnosti izvora azota i biosinteze mikrocistina javlja u slučaju ostalih cijanotoksina, to bi potencijalno moglo objasniti povećanu toksičnost testiranih sojeva nakon kultivacije u uslovima bogatijim azotom koja je uočena u ovom istraživanju.

Međutim, suprotan efekat je registrovan u slučaju sojeva roda *Anabaena*, za koje je utvrđeno da su toksičniji nakon gajenja u uslovima nižih koncentracija natrijum nitrata. Specifično, sojevi *Anabaena* Č2 i *Anabaena* Č5 su ispoljili najveću toksičnost ( $LC_{50} = 8433.34$  i  $LC_{50} = 1879.31$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon kultivacije u uslovima bez dodatog natrijum-nitrata, nakon 48 h izlaganja test organizama. Činjenica da toksičnost ovih sojeva nije opala nakon kultivacije u azotom siromašnjoj podlozi se može potencijalno objasniti time što testirani sojevi roda *Anabaena* obrazuju heterociste i poseduju sposobnost azotofiksacije. Poznato je da je stopa asimilacije azota od strane cijanobakterija blisko povezana sa dostupnošću izvora azota i da ograničenje hranljivih materija ne utiče samo na metaboličke procese, već ima potencijal da moduliše mehanizme koji su u osnovi proizvodnje cijanotoksina (Pimentel i Giani, 2014). Geni koji su povezani sa procesom azotofiksacije obično nisu eksprimirani u kulturama koje su snabdevene dovoljnim količinama azotnih jedinjenja (Herrero i sar., 2001). Međutim, regulacija ekspresije ovih gena može biti posebno složena, s obzirom na to da je podložna cirkadijalnom ritmu kod nekih cijanobakterija i može biti ograničena na heterociste kod vrsta koje ih poseduju (Chen i sar., 1998). Postoje istraživanja koja ukazuju na to da je biosinteza cijanotoksina povezana upravo sa nedostatkom azotnih jedinjenja, povećavajući se pod stresom izazvanim azotnim "izgladnjivanjem" (Neilan i sar., 2013; Pimentel i Giani, 2014). Povećanje toksičnosti u uslovima niskih koncentracija azota slična onoj dobijenoj u ovom radu je opisana kod soja vrste *Lyngbya wollei* u radu Yin i sar. (1997), gde je nitrogenazna aktivnost predložena kao moguća strategija preživljavanja koja takođe ovom soju omogućava dominaciju u rezervoaru iz kog je izolovan.

Kada je reč o sojevima roda *Nostoc* u ovom radu, ekstrakti soja *Nostoc* 2S1, slično rezultatima dobijenim za sojeve roda *Anabaena*, ispoljili su najveću toksičnost nakon kultivacije u podlozi bez dodatog natrijum-nitrata ( $LC_{50} = 1905.46$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), uz dozno-zavisno smanjenje toksičnosti sa porastom koncentracije nitrata u podlozi. U slučaju ekstrakata soja *Nostoc* 2S3B, zabeležena je toksičnost slabog intenziteta ( $LC_{50} > 10000$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), bez uočljive promene u odnosu na modifikaciju uslova kultivacije u pogledu dostupnog azota. Ovakva promena standardnih uslova kultivacije se najjače odrazila na toksičnost soja *Nostoc* LC1B, za koji je, nakon gajenja u podlozi bez azota i sa  $0.8 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ ,  $LC_{50}$  vrednost bila viša od maksimalne primenjene doze. Međutim, nakon povećanja koncentracije nitrata u podlozi, zabeleženo je značajno smanjenje vrednosti  $LC_{50}$  ( $F(1.7-6.8) = [11.10]$ ,  $p = 0.0082$ ) do nivoa od  $676.08$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  i  $580.76$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

mL<sup>-1</sup> nakon 24 i 48h izlaganja eksperimentalnih organizama. Slično tome, utvrđena je dozna zavisnost toksičnosti ekstrakata soja *Nostoc* Z1 u odnosu na koncentraciju NaNO<sub>3</sub>, pri čemu je maksimalna LC50 (48 h) vrednost od 1078.94 µg mL<sup>-1</sup> zabeležena nakon izlaganja test jedinki ekstraktima dobijenim nakon kultivacije sa 1.5 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>.

Sličan efekat je zabeležen u slučaju sojeva roda *Oscillatoria*, sa povećanom toksičnošću u okruženju sa visokim sadržajem azota, pri čemu je statistički značajna razlika zabeležena u toksičnosti soja *Oscillatoria* DTD-Bečej (F (1.7-7.1) = [11.10], p = 0.0162), gde se LC50 vrednost umanjila deset puta (sa 6165.95 na 613.76 µg mL<sup>-1</sup>) nakon povećanja raspoloživog azota u medijumu za gajenje. Izuzev soja *M. aeruginosa* PCC 7806 kao pozitivne kontrole, sojevi koji pripadaju rodu *Oscillatoria*, gajeni u prisustvu veće koncentracije azota, ispoljili su najveću toksičnost u ovom testu, sa vrednostima LC50 od 101.39 µg mL<sup>-1</sup> (*Oscillatoria* K3), 344.34 (*Oscillatoria* Z1) i 613.76 µg mL<sup>-1</sup> (*Oscillatoria* DTD-Bečej). Metcalf i sar. (2002) su pokazali da su jedinke *A. salina* izuzetno osetljive na prisustvo prečišćenog cilindropermopsina kao i na ekstrakte soja *Raphidopsis raciborsii* (ex. *Cylindropermopsis raciborskii*) koji je producent ovog toksina. U navedenom radu, cijanobakterijski ekstrakti su ispoljili veću toksičnost (LC50 (48h) = 1680 - 2420 µg mL<sup>-1</sup> suve biomase) u odnosu na prečišćen toksin (LC50 (48h) = 2860 µg mL<sup>-1</sup>). Rezultati LC50 vrednosti koje su dobijene za sojeve roda *Oscillatoria* značajno su niže u odnosu na vrednosti navedene u datom radu, što ukazuje na njihovu visoku toksičnost ispoljenu prema artemijama.

Predstavljeni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da su intracelularni ekstrakti većine ispitivanih sojeva, uzgajanih u prisustvu azota ispoljili jače toksične efekte od onih zabeleženih kada je korišćena kultura gajena u medijumu smanjenih koncentracija ili bez dostupnog izvora azota. Rezultati dati u Tabeli 9 jasno pokazuju da dostupnost azota kao bitnog organogenog elementa značajno utiče na toksičnost sojeva *Anabaena* Č2, *Nostoc* 2S3B, *Nostoc* LC1B i *Oscillatoria* DTD-Bečej. Pored toga u većini slučajeva, toksični efekti su se povećali sa dužim vremenom ekspozicije artemija ekstraktima sojeva ukazujući na vremenski zavisnu toksičnost. Ovaj trend može biti pokazatelj pozitivne korelacije između stope mortaliteta test organizama i dužine izloženosti potencijalno toksičnim metabolitima cijanobakterija. Takođe se može uočiti da se toksičnost povećavala sa porastom primenjene koncentracije ekstrakata, što ukazuje na zavisnost letalnog efekta od koncentracije ekstrakta. Na osnovu utvrđenih graničnih LC50 vrednosti u ovom istraživanju, može se zaključiti da su najveću toksičnost ispoljili ekstrakti soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 koji je producent mikrocistina i sojeva *Oscillatoria* K3 i Z1, koji su potencijalni producenti cilindropermopsina, dok je najniža toksičnost utvrđena za ekstrakte soja *Nostoc* 2S3B.

#### 4.3.2. Biotest *Artemia salina* - uticaj koncentracije fosfora na akutnu toksičnost odabranih sojeva

Poznato je da koncentracija fosfora igra ključnu ulogu u primarnoj produkciji slatkovodnih ekosistema i nastanku cijanobakterijskog i algalnog cvetanja (Davis i sar., 2010). Odnos između dostupnih koncentracija fosfora i cijanobakterijske toksičnosti je multifaktorski, a tačni mehanizmi još nisu u potpunosti opisani. Jedna teorija govori u prilog tome da povišeni nivoi fosfora promovišu rast cijanobakterija, na osnovu kog se proporcionalno povećava i stopa proizvodnje toksina (Kurmayer, 2011). Pored toga, obogaćivanje fosforom može dovesti do promene sastava mikrobne zajednice, potencijalno favorizujući cijanobakterije sa sposobnošću proizvodnje toksičnih jedinjenja. Stres izazvan nedostatkom fosfora takođe može izmeniti

aspekte metaboličke regulacije cijanobakterija i na taj način dovesti do povećane proizvodnje cijanotoksina (Pimentel i Giani, 2014).

Kako bi se ispitalo uticaj različitih koncentracija fosfora u kultivacionom medijumu na toksičnost odabranih cijanobakterijskih sojeva u ovom istraživanju je upotrebljen *Artemia salina* biotest. Dobijeni rezultati govore u prilog tome da većina ispitanih sojeva ispoljava više nivoe toksičnosti nakon kultivacije u prisustvu većih koncentracija fosfora. Ipak, za mnoge sojeve je najveća toksičnost dostignuta sa koncentracijom P od 0.04 g L<sup>-1</sup> i nije se menjala sa daljim povećanjem koncentracije fosfora (Tabela 11, Tabela 12, Prilog 1). Izuzetak je soj *Anabaena* Č5, čija toksičnost je nastavila da raste sa povećanjem koncentracije fosfora iznad ove granice i koji se ujedno pokazao najtoksičnijim sojem u ovom testiranju, sa izračunatom LC50 vrednošću od 199.98 µg mL<sup>-1</sup> u grupi gajenoj sa 0.06 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Sa druge strane, drugi predstavnik roda *Anabaena*, soj *Anabaena* Č2, nije pokazao značajnu toksičnost i nisu zabeležene veće promene nakon povećanja koncentracije fosfora u kultivacionom medijumu.

Ukupno najveća toksičnost je registrovana za soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, sa LC50 vrednošću u opsegu od 30-50 µg mL<sup>-1</sup> u grupama od 0.04 i 0.06 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, što su deset puta veće vrednosti od onih dobijenih za grupu gajenu sa 0.02 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Sličnu pravilnost su registrovali Rapala i sar. (1997) prilikom ispitivanja značaja nivoa fosfata korišćenog pri kultivaciji azotofiksirajućeg *Anabaena* spp. kada se radi o uticaju na rast i stopu biosinteze hepatotoksičnog MC-RR. Na osnovu rezultata je, pored pozitivnog uticaja na rast soja, utvrđeno značajno povećanje intracelularnih koncentracija ovog hepatotoksina sa povećanjem koncentracije PO<sub>4</sub><sup>-</sup> sa 0.05 mg L<sup>-1</sup> na 5.5 mg L<sup>-1</sup> (Z8 medijum). Takođe je utvrđena značajna pozitivna korelacija između vremena kultivacije i koncentracije fosfora, što znači da se do završetka 24 dana kultivacije smanjila koncentracija toksina u ćelijama koje su uzgajane pod ograničenjem fosfora, dok se koncentracija toksina povećala u ćelijama koje su uzgajane pri višim koncentracijama fosfata. Dodatno, u radu Vezie i sar. (2002), najveća koncentracija mikrocistina je takođe utvrđena pri najvećim kombinovanim koncentracijama azota i fosfora gde je i rast biomase bio najveći, međutim, komparabilno velika toksičnost je zabeležena i pri najnižim koncentracijama hranljivih materija, pri uslovima slabog rasta kulture.

Većina sojeva roda *Nostoc* testiranih u ovom istraživanju, među kojima su *Nostoc* 2S3B, *Nostoc* LC1B i *Nostoc* Z1, takođe je pokazala povećane nivoe toksičnosti pri višim koncentracijama fosfora, pri čemu je najveća toksičnost primećena u slučaju koncentracije od 0.04 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Soj *Nostoc* 2S1 je ispoljio najnižu toksičnost, bez promene u odnosu na koncentraciju fosfora dostupnu tokom kultivacije.

Sojevi roda *Oscillatoria* su pokazali najveći nivo toksičnosti nakon kultivacije u medijumu sa 0.04 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. U okviru ove grupe, soj *Oscillatoria* K3 je bio najtoksičniji, sa LC50 vrednošću od 250.61 µg mL<sup>-1</sup> nakon 48 sati izlaganja račića. Osim pozitivne kontrole, najtoksičniji sojevi bili su *Anabaena* Č5 i *Oscillatoria* Z1, koji su pokazali najveću toksičnost u grupama sa visokim sadržajem fosfora. Iako postoji vrlo malo dostupnih informacija o toksičnosti cijanobakterija kod testiranih organizama nakon uzgoja u različitim uslovima dostupnosti fosfata, postoje informacije o različitim stopama proizvodnje određenih cijanotoksina. Slično rezultatima dobijenim u ovom radu, Sivonen (1990) su otkrili da proizvodnja hepatotoksina dezmetil-3-mikrocistina-RR od strane sojeva vrste *Oscillatoria agardhii* zavisi od koncentracije ortofosfata, pri čemu niski nivoi fosfora podstiču njegovu proizvodnju, dok veće koncentracije nemaju nikakav dodatni efekat.



Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje praga zasićenja fosforom kada se radi o proizvodnji mikrocistina, iznad kog se stopa produkcije drastično smanjuje ili čak zaustavlja. Toporowska i sar. (2016) su takođe povezali produkciju anatoksin-a od strane soja *Dolichospermum* spp. (ex. *Anabaena*) sa temperaturom vode i smanjenjem koncentracije dostupnih fosfata. Smanjenje koncentracije fosfata u ovom slučaju nije uticalo na brzinu umnožavanja biomase, ali je značajno povećalo produkciju anatoksin-a i transkripciju gena povezanih sa biosintezom ovog toksina. Slični rezultati su dobijeni u radu Kramer i sar. (2018) koji su kod istog soja utvrdili da je stopa transkripcije gena povezanih sa sintezom anatoksin-a najveća u uslovima ograničene dostupnosti i azota (N) i fosfora (P).

**Tabela 11.** Uticaj koncentracije fosfora na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*. Rezultati su kategorisani na osnovu primenjene koncentracije fosfora u tri nivoa: 0.02, 0.04 i 0.06 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, kao i perioda izlaganja test organizama (24 i 48 sati). Osnovne parametre čine granična vrednost letalnosti LC50, 95% interval poverenja (95% CI) dobijen za ovu vrednost, granična vrednost LC10 i R-kvadrat. Svi rezultati su izraženi u mikrogramima po mililitru (µg mL<sup>-1</sup>) primenjenog ekstrakta.

	24h ekspozicije				48h ekspozicije				
	Naziv soja	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
BG11 – 0.02g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup>	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.88	>10000	/	/	0.86
	<i>Anabaena</i> Č5	<b>8260.37</b>	7735.21	7550.92 - 9015.71	0.94	<b>530.88</b>	351.80	281.19 - 984.01	0.89
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	<b>563.63</b>	248.27	277.33 - 1066.59	0.91	<b>563.63</b>	248.27	277.33 - 1066.59	0.91
	<i>Nostoc</i> 2S1	>10000	/	/		>10000	/	/	
	<i>Nostoc</i> 2S3B	>10000	/	/	0.31	>10000	/	/	0.35
	<i>Nostoc</i> LC1B	<b>6426.87</b>	6011.91	5834.45 - 7112.13	0.95	<b>6208.69</b>	5839.38	5767.66 - 6714.28	0.97
	<i>Nostoc</i> Z1	<b>2466.03</b>	1199.29	859.01 - 10543.86	0.76	<b>1757.92</b>	914.46	680.76 - 4731.51	0.80
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	<b>2238.72</b>	986.74	665.27 - 33573.76	0.75	<b>1879.31</b>	840.84	542.00 - 21527.81	0.75
	<i>Oscillatoria</i> K3	<b>2306.74</b>	2052.04	2037.04 - 2624.21	0.99	<b>968.27</b>	818.75	826.03 - 1104.07	0.98
	<i>Oscillatoria</i> Z1	<b>9794.89</b>	8709.59	8689.60 - 11694.99	0.93	<b>6902.39</b>	5980.71	6280.58 - 7603.26	0.97

		24h ekspozicije				48h ekspozicije			
Naziv soja	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	
BG11 – 0.04g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup>	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.55	>10000	/	/	0.69
	<i>Anabaena</i> Č5	7998.34	3481.91	3318.94 - 9638.29	0.83	912.01	575.26	521.19 - 1541.70	0.91
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	53.21	21.68	20.32 - 97.05	0.96	30.19	19.66	20.32 - 97.05	0.99
	<i>Nostoc</i> 2S1	>10000	/	/		>10000	/	/	
	<i>Nostoc</i> 2S3B	8570.37	1697.45	2917.42 - 11561.22	0.91	4197.58	768.35	1428.89 - 6773.51	0.90
	<i>Nostoc</i> LC1B	4786.30	768.17	4203.11 - 5031.78	0.99	4786.30	768.17	4203.11 - 5031.78	0.99
	<i>Nostoc</i> Z1	3198.89	1494.79	1091.44 - 19724.22	0.75	2691.53	1243.33	928.96 - 12764.38	0.77
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	1273.50	1057.80	866.96 - 1682.67	0.94	1076.46	956.15	762.07 - 1374.04	0.94
	<i>Oscillatoria</i> K3	1503.14	1377.86	1056.44 - 1949.84	0.97	250.61	187.28	198.15 - 322.84	0.98
	<i>Oscillatoria</i> Z1	338.84	202.81	187.93 - 598.41	0.93	266.07	170.12	159.95 - 444.63	0.94
BG11 – 0.06g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup>	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.74	>10000	/	/	0.73
	<i>Anabaena</i> Č5	301.3	172.33	93.97 - 812.83	0.83	199.98	117.44	90.36 - 399.94	0.90
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	92.89	53.49	64.12 - 125.89	0.97	50.69	32.08	31.91 - 69.50	0.98

Naziv soja	24h ekspozicije				48h ekspozicije			
	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
<i>Nostoc 2S1</i>	>10000	/	/		>10000	/	/	
<i>Nostoc 2S3B</i>	<b>6208.69</b>	3886.69	3258.36 - 21086.28	0.80	<b>5308.84</b>	3152.54	2523.48 - 20558.90	0.78
<i>Nostoc LC1B</i>	<b>5420</b>	877.67	4878 - 5962	0.99	<b>5199.95</b>	1456.39	4224.85 - 6225.12	0.96
<i>Nostoc Z1</i>	>10000	3535.26	1892.34 - 22774.28	0.69	<b>4027.17</b>	1070.19	1291.11 - 20733.17	0.79
<i>Oscillatoria DTD-Bečej</i>	>10000	5896.85	3126.07 - 14250.93	0.62	<b>7345.13</b>	4202.40	2831.39 - 12790.08	0.68
<i>Oscillatoria K3</i>	<b>2213.09</b>	1968.73	1931.96 - 2552.70	0.99	<b>1786.48</b>	1510.61	1512.34 - 2060.62	0.98
<i>Oscillatoria Z1</i>	<b>305.49</b>	171.53	240.43 - 385.47	0.98	<b>287.73</b>	170.98	196.78 - 415.91	0.96

**Tabela 12.** Uticaj promene koncentracije fosfora tokom kultivacije na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize. Značajnost je označena p-vrednostima  $\leq 0.05$ .

Naziv soja	SS	df	MS	F (DFn, DFd)	P-vrednost
<i>Anabaena</i> Č2	658.8	5	131.8	3.391	0.1383
<i>Anabaena</i> Č5	6543	5	1309	6.428	<b>0.0189</b>
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	4260	5	852.0	10.97	<b>0.0131</b>
<i>Nostoc</i> 2S1	322.8	5	64.55	1.606	0.2704
<i>Nostoc</i> 2S3B	4387	5	877.3	8.746	<b>0.0147</b>
<i>Nostoc</i> LC1B	1241	5	248.1	1.300	0.3201
<i>Nostoc</i> Z1	91.59	5	18.32	0.3806	0.6373
<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	2248	5	449.6	2.864	0.1629
<i>Oscillatoria</i> K3	1741	5	348.2	2.105	0.2171
<i>Oscillatoria</i> Z1	9888	5	1978	11.12	<b>0.0218</b>

Na osnovu dobijenih rezultata ovog istraživanja, može se zaključiti da u uslovima optimalnih koncentracija azotnih jedinjenja, povećanje koncentracije fosfata iznad granica optimalnih za kultivaciju cijanobakterija ne doprinosi povećanju toksičnosti većine ispitanih sojeva u testu sa model organizmom *Artemia salina*. Izuzetak su sojevi *Anabaena* Č5, *M. aeruginosa* PCC 7806, *Nostoc* 2S3B i *Oscillatoria* Z1 kod kojih je konstatovano da prekoračenje optimalnih granica koncentracije fosfora značajno povećava ispoljenu toksičnost (Tabela 11). Poznato je, međutim, da kod cijanobakterija stres povezan sa nedostatkom adekvatnih izvora nutrijenata može dovesti do značajnog povećanja proizvodnje određenih cijanotoksina (Pimentel i Giani, 2014). Iako ovakva pravilnost kod većine sojeva nije utvrđena u ovom istraživanju, moguće je da su obezbeđene koncentracije fosfata i nakupljene rezerve u ćelijama ispitanih sojeva bile dovoljne da ne dođe do stresnog odgovora tokom perioda kultivacije od 21 dana i aktivacije sinteze toksina. Potrebna su svakako dodatna ispitivanja uticaja fosfornog "izgladnjivanja" cijanobakterija tokom dužeg kultivacionog perioda na produkciju toksina i njihovu toksičnost u različitim biotestovima.

#### 4.3.3. Biotest *Artemia salina* - uticaj svetlosnog režima na akutnu toksičnost odabranih sojeva

Poznato je da svetlost igra važnu ulogu u rastu cijanobakterija i može značajno uticati na njihov metabolizam i specifične fiziološke reakcije. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na to da dostupnost i intenzitet svetlosti imaju ulogu u dinamici zajednice cijanobakterija i modulaciji stope proizvodnje određenih toksina (Gotham, 1981; Singh i Singh, 2015; Ma i sar., 2015; Chaffin i sar., 2018; Mesquita i sar., 2019). Većina dosadašnjih istraživanja je bila usmerena ka proučavanju uticaja različitih intenziteta i kvaliteta svetlosti na toksičnost cijanobakterija, dok se malo zna o uticaju fotoperioda na toksičnost ovih organizama. Dodatno, većina istraživanja se

svodi na kvantifikaciju nivoa toksina po ćeliji ili ukupnoj biomasi u kulturama cijanobakterija, što predstavlja uticaj na proizvodnju toksina, ali ne nužno i na samu toksičnost. Direktna uticaj perioda osvetljenosti na toksičnost cijanobakterijskih sojeva putem analize njihovih efekata u testovima toksičnosti sa model organizmima nije do sada istražen.

U ovom istraživanju, biotest *A. salina* je upotrebljen u cilju ispitivanja toksičnosti ekstraktata cijanobakterija gajenih pri različitim režimima svetlosti. Na osnovu prikazanih rezultata (Tabela 13, Tabela 14, Prilog 1) može se primetiti da je većina testiranih sojeva ispoljila veću toksičnost nakon gajenja u uslovima dužeg perioda osvetljenosti. Međutim, kada je reč o razlikama između 12 i 16 sati osvetljenosti, primećuje se dosledna promena toksičnosti u odnosu na pripadnost soja određenom rodu. Utvrđene razlike izazvane ovom modifikacijom uslova kultivacije se, međutim, ne mogu smatrati statistički značajnim osim u slučaju soja *Nostoc* 2S1 ( $F=7.6$ ,  $p=0.0394$ ) (Tabela 13). U slučaju sojeva roda *Anabaena*, zabeleženo je povećanje toksičnosti sa produženjem broja svetlih sati, pri čemu je najveća toksičnost zabeležena pri režimu od 16:8h (svetlost:tama) za oba soja. Zanimljivo je da su pojedini sojevi, među kojima su *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Nostoc* 2S1, *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1 ispoljili najveću toksičnost kada je režim svetlosti bio 12:12 (svetlost:tama) i sa daljim povećanjem perioda osvetljenosti nije došlo do promene aktivnosti. Sličan trend je primećen u radu Polyzois i sar. (2020), koji su poredili uticaj kontinuirane svetlosti (24h:0h) i fotoperioda od 16 sati svetla i 8 sati tame (16:8h) na stopu rasta i proizvodnju cijanotoksina kriptoficina kod soja *Nostoc* sp. ATCC 53789. Ove modifikacije uslova kultivacije nisu izazvale značajnu razliku u stopama rasta kultura. Međutim, proizvodnja toksina po ćeliji je rasla pod kontinuiranom svetlošću do četvrtog dana eksperimenta, nakon čega je počela da se smanjuje kako se koncentracija ćelija povećavala. Autori su zaključili da je jedan od značajnih faktora koji doprinosi smanjenoj produkciji toksina to što visoka koncentracija ćelija smanjuje dostupnu svetlosnu energiju po ćeliji zbog samozasenjivanja, što rezultira manjom količinom energije za proizvodnju sekundarnih metabolita koji nisu esencijalni za preživljavanje. Ovaj efekat može potencijalno objasniti zašto produženje perioda osvetljenosti iznad 12 sati nije dovelo do pojačane toksičnosti kod određenih sojeva u ovom istraživanju. Slična pravilnost je uočena kada se radi o uticaju intenziteta svetlosti. Jedan od primera se može naći u radu Wiedner i sar. (2003), u kom je ispitan uticaj svetlosti na proizvodnju i sadržaj mikrocistina kod soja *Microcystis* PCC 7806. Otkrivena je pozitivna korelacija između svetlosnog intenziteta i proizvodnje ovog toksina sve do postizanja maksimalne stope rasta. Međutim, pri većim nivoima svetlosnog zračenja, proizvodnja mikrocistina je bila inhibirana. Najveća toksičnost registrovana u okviru ove doktorske teze je zabeležena kod soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 gajenog u uslovima 12:12 (svetlost:tama), gde je LC50 vrednost od  $34.75 \mu\text{g mL}^{-1}$  utvrđena nakon 48h izlaganja test organizama. Pored toga, za ekstrakte soja *Oscillatoria* K3 pri istom režimu kultivacije je utvrđena LC50 vrednost od  $91.62 \mu\text{g mL}^{-1}$ , međutim, približno jednaka vrednost je dobijena i sa promenom uslova kultivacije. Jedini soj za koji je utvrđena veća toksičnost pri kraćem periodu osvetljenosti (8:16h svetlost:tama) je *Oscillatoria* DTD-Bečej, međutim, tri tretmana grupe se nisu razlikovale u dovoljnoj meri da bi se ova promena smatrala statistički značajnom ( $F=2.848$ ,  $p=0.0950$ ). Opisane varijacije u odgovorima različitih rodova, pa čak i među sojevima istog roda, mogu biti odraz različitih adaptivnih biohemijskih mehanizama i regulacije stope produkcije toksičnih metabolita u odgovoru na promene u periodu osvetljenosti tokom razvoja kulture. U dostupnoj literaturi se mogu uočiti varijacije u odgovoru na promene svetlosnog režima čak i kada se radi o producentima cijanotoksina iste grupe. Utkilen i Gjølme (1995) su otkrili da povećanje svetlosnog intenziteta sa 20 na  $75 \text{ mmol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  dovodi do veće koncentracije

mikrocistina po jedinici proteina u kontinuiranim kulturama soja *Microcystis aeruginosa* CIA 228/1. Nasuprot tome, Böttcher i sar. (2001) nisu pronašli razlike u sadržaju mikrocistina po jedinici biomase ili po ćeliji drugog soja *M. aeruginosa* HUB 5-2-4 pri nivoima zračenja koji ograničavaju rast u rasponu od 5 do 75 mmol fotona  $m^{-2} s^{-1}$ . Međutim, primetili su povećanje sadržaja mikrocistina po jedinici suve biomase iznad 20 mmol fotona  $m^{-2} s^{-1}$ . Sa druge strane, u radu Sivonen (1990), zabeležene su veće koncentracije mikrocistina po jedinici suve biomase soja *Oscillatoria agardhii* pri nižim intenzitetima svetlosti (12 i 24 mmol fotona  $m^{-2} s^{-1}$ ) u poređenju sa višim (50 i 95 mmol fotona  $m^{-2} s^{-1}$ ). Rapala i sar. (1997) su takođe utvrdili varijacije u optimumu svetlosnog režima za produkciju različitih analoga mikrocistina kod soja *Anabaena* sp. 90. Nivo MC-LR dostigao je svoj maksimum pri relativno niskom nivou osvetljenja, između 2 i 25 mmol fotona  $m^{-2} s^{-1}$ . Nakon tog praga, koncentracija je ostala konstantna čak i pri višim nivoima svetlosti. Sa druge strane, u istom radu je utvrđeno da je koncentracija toksina MC-RR bila najveća pri intenzitetu svetlosti od 25 mmol fotona  $m^{-2} s^{-1}$ , ukazujući na različite regulacione mehanizme za ove toksične metabolite.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, utvrđena je pozitivna korelacija između perioda osvetljenosti i toksičnosti većine ispitanih sojeva, međutim samo kod jednog soja je uticaj svetlosnog režima bio statistički značajan. Primećene su takođe sličnosti u odgovoru sojeva koji pripadaju istom cijanobakterijskom rodu na promene fotoperioda tokom kultivacije. Ovakav efekat može biti posledica slične genetičke osnove pa samim tim i sličnosti u metabolizmu srodnih sojeva i ukazati na pravilnosti po kojima različiti rodovi cijanobakterija moduliraju stopu proizvodnje određenih cijanotoksina u zavisnosti od svetlosnih uslova. Iako je utvrđen efekat na toksičnost ekstrakata u celini, dodatna ispitivanja su potrebna kako bi se identifikovali specifični toksični agensi čija produkcija je povezana sa periodom osvetljenosti kod ispitanih sojeva.

**Tabela 13.** Uticaj svetlosnog režima na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*. Rezultati su kategorisani na osnovu tipa dnevnog režima osvetljenosti u tri nivoa: 8h/16h, 12h/12h i 16h/8h (svetlost/tama) kao i perioda izlaganja test organizama (24 i 48 sati). Osnovne parametre čine granična vrednost letalnosti LC50, 95% interval poverenja (95% CI) dobijen za ovu vrednost, granična vrednost LC10 i R-kvadrat. Svi rezultati su izraženi u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta.

	24h ekspozicije				48h ekspozicije				
	Naziv soja	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
Svetlosni režim: 8h tame/ 16h svetlosti	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.88	>10000	/	/	0.86
	<i>Anabaena</i> Č5	9057.32	8701.15	8933.05 - 9204.49	0.99	8709.63	8353.63	8375,29 - 9162,20	0.99
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	645.65	428.45	396.28 - 1032.76	0.94	633.86	424.14	389.04 - 1013.91	0.94
	<i>Nostoc</i> 2S1	>10000	9798.53	10000 - 17782.79	0.94	9397.23	7260.39	7516.22 - 13061.70	0.93
	<i>Nostoc</i> 2S3B	>10000	/	/	0.57	>10000	/	/	0.64
	<i>Nostoc</i> LC1B	>10000	/	/	0.64	>10000	/	/	0.63
	<i>Nostoc</i> Z1	>10000	/	/	0.95	>10000	/	/	0.94
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	554.62	465.47	435.51 -673.73	0.99	554.62	465.47	435.51 -673.73	0.99
	<i>Oscillatoria</i> K3	790.67	738.93	472.06 -1109.29	0.99	130.31	121.78	103.12 - 161.94	0.99
	<i>Oscillatoria</i> Z1	4808.39	4605.82	/	0.99	1064.14	/	/	0.98



		24h ekspozicije				48h ekspozicije			
Naziv soja		LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
Svetlosni režim: 12h tame/ 12h svetlosti	<i>Anabaena</i> Č2	>10000	/	/	0.77	<b>6456.54</b>	/	/	0.60
	<i>Anabaena</i> Č5	<b>5357.96</b>	4064.84	3155.00 – 9977.00	0.80	<b>4187.93</b>	3349.76	2630.26 – 6426.87	0.87
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	<b>52.36</b>	23.26	11.06 – 115.34	0.92	<b>34.75</b>	16.57	8.04 – 70.63	0.95
	<i>Nostoc</i> 2S1	<b>5861.38</b>	4827.28	3926.44 - 8709.63	0.82	<b>3235.93</b>	2575.47	1794.73 - 5176.07	0.81
	<i>Nostoc</i> 2S3B	>10000	/	/	0.67	>10000	/	/	0.57
	<i>Nostoc</i> LC1B	<b>6839.11</b>	6235.26	6151.76 - 7620.79	0.95	<b>6123.50</b>	5738.42	5321.08 - 7211.07	0.87
	<i>Nostoc</i> Z1	>10000	/	/	0.05	>10000	/	/	0.30
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	>10000	/	/	0.87	<b>6338.69</b>	5871.36	5407.54 - 7447.31	0.88
	<i>Oscillatoria</i> K3	<b>293.76</b>	256.67	/	0.99	<b>91.62</b>	/	/	0.89
	<i>Oscillatoria</i> Z1	<b>2624.21</b>	2406.00	2301.44 - 4623.81	0.99	<b>295.12</b>	164.33	53.82 - 1879.31	0.77
Svetlosni režim: 16h tame/ 8h svetlosti	<i>Anabaena</i> Č2	<b>4943.10</b>	4569.77	4508.16 – 5308.84	0.98	<b>4886.52</b>	4559.19	4395.41 - 5272.29	0.97
	<i>Anabaena</i> Č5	<b>1167.01</b>	/	/	0.99	<b>1167.01</b>	/	/	0.99
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	<b>1253.14</b>	998.15	473.15 – 1986.09	0.88	<b>535.79</b>	389.02	283.79 – 1135.01	0.93

Naziv soja	24h ekspozicije				48h ekspozicije			
	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
<i>Nostoc 2S1</i>	>10000	/	8729.71 - 16405.9	0.91	>10000	/	8590.13 - 14125.38	0.93
<i>Nostoc 2S3B</i>	>10000	/	/	0.34	>10000	/	/	0.40
<i>Nostoc LC1B</i>	1954.33	1833.77	1710.01 – 2233.57	0.99	1191.24	/	/	0.99
<i>Nostoc Z1</i>	>10000	/	/	0.82	8109.61	/	/	0.82
<i>Oscillatoria DTD-Bečej</i>	1452.11	1255.58	1088.71 - 1815.51	0.97	1054.38	944.62	948.41 - 1193.98	0.98
<i>Oscillatoria K3</i>	123.59	/	/	0.99	109.90	/	/	0.98
<i>Oscillatoria Z1</i>	1244.51	/	/	0.99	1106.62	/	/	0.98

**Tabela 14.** Uticaj svetlosnog režima tokom kultivacije na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize. Značajnost je označena p-vrednostima  $\leq 0.05$ .

Naziv soja	SS	df	MS	F (DFn, DFd)	p-vrednost
<i>Anabaena</i> Č2	3921	5	784.1	2.903	0.1488
<i>Anabaena</i> Č5	3697	5	739.4	1.949	0.2331
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	2091	5	418.2	2.855	0.1318
<i>Nostoc</i> 2S1	1456	5	291.2	7.655	<b>0.0394</b>
<i>Nostoc</i> 2S3B	2516	5	403.1	2.241	0.1123
<i>Nostoc</i> LC1B	3330	5	666.0	1.594	0.2702
<i>Nostoc</i> Z1	1927	5	385.3	5.391	0.0604
<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	7898	5	1580	3.897	0.0950
<i>Oscillatoria</i> K3	1558	5	311.5	1.975	0.2259
<i>Oscillatoria</i> Z1	1708	5	341.7	2.848	0.0988

#### 4.3.4. Biotest *Artemia salina* - uticaj faze rasta kulture na akutnu toksičnost odabranih sojeva

S obzirom na značajnu ulogu koju faza rasta cijanobakterijske populacije ima na stopu produkcije bioaktivnih metabolita, ispitan je efekat ovog faktora na toksičnost cijanobakterijskih sojeva. Dobijeni rezultati ukazuju na izražen uticaj faze rasta kulture na toksičnost ispitivanih sojeva (Tabela 15, Tabela 16, Prilog 1), pri čemu se najveća toksičnost može pripisati kulturama koje su uzgajane u trajanju od 35 dana, za koje se pokazalo da imaju jači efekat na test organizme u odnosu na grupe sa kraćim periodima kultivacije (7 i 21 dan). Međutim, uočeno je da je kod mnogih ispitivanih sojeva došlo do neznatnog pojačanja toksičnog efekta tokom produžene kultivacije nakon 21. dana, pri čemu razlike između ovih vrednosti značajno variraju u zavisnosti od soja.

Toksičnost sojeva *Anabaena* Č2 i *Anabaena* Č5 se povećavala srazmerno trajanju kultivacije i dostigla najveću vrednost nakon perioda od 35 dana ( $LC_{50} = 6456.54 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $LC_{50} = 1095.62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). U slučaju pozitivne kontrole, soj *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 je ispoljio najveću toksičnost nakon 35 dana ( $LC_{50} = 51.16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), međutim, ova vrednost se nije značajno promenila u odnosu na onu uočenu nakon 21 dana kultivacije ( $LC_{50} = 57.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sličan trend je primećen kod većine sojeva roda *Nostoc*, s izuzetkom soja *Nostoc* 2S1, koji je ispoljio najveću toksičnost nakon 21. dana kultivacije ( $LC_{50} = 1241.65 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). U okviru ovog roda, najveća toksičnost je registrovana u slučaju ekstrakata soja *Nostoc* LC1B dobijenih nakon 35 dana kultivacije kulture ( $LC_{50} = 1694.33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sojevi roda *Oscillatoria* su takođe bili toksičniji u kasnijim fazama kultivacije, pri čemu je promena u toksičnosti sa dužim vremenom ekspozicije bila izraženija. Od tri testirana soja roda *Oscillatoria* najtoksičniji za račiče *A. salina*

bio je soj *Oscillatoria* K3, sa zabeleženim najnižim vrednostima LC50 nakon 35 dana kultivacije (135.51  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nakon 24h i 102.09  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nakon 48h). Kod sva tri ispitana soja ovog roda, utvrđeno je statistički značajno povećanje toksičnosti sa produženjem kultivacionog perioda i ulaskom kultura u stacionarnu fazu rasta. Jedno od objašnjenja ovakvih rezultata moglo bi ležati u činjenici da brzina proizvodnje sekundarnih metabolita, uključujući cijanotoksine, u velikoj meri zavisi od faze rasta kulture i da se vreme ulaska u određene faze rasta razlikuje od soja do soja. Tokom eksponencijalne faze, cijanobakterije prolaze kroz aktivnu ćelijsku deobu i period intenziviranog metabolizma, što dovodi do povećanja biomase i intenzivnog iskorišćavanja hranljivih materija. Ova faza je često povezivana sa povećanom proizvodnjom cijanotoksina, pri čemu se maksimalne stope proizvodnje obično postižu pri samom ulasku kulture u stacionarnu fazu krive rasta, što se dešava između 21. i 28. dana kultivacije kod većine testiranih sojeva (Simeunović, 2009). Kada kulture dosegnu poodmaklu stacionarnu fazu rasta, stopa rasta se usporava, a rezerve hranljivih materija postaju ograničavajući faktor. U ovoj fazi, cijanobakterije mogu izdvojiti resurse za preživljavanje i održavanje ćelijske stabilnosti, dok proizvodnja toksina postaje sve "skuplja" i nepovoljnija. Ovo zapažanje je u skladu sa rezultatima prethodnog istraživanja, gde su testirani toksični sojevi cijanobakterija pomoću testa *A. salina* i koji su takođe dostigli maksimalnu toksičnost nakon dužih perioda kultivacije (Davidović i sar., 2019).

Uticao faza rasta na proizvodnju cijanotoksina je opširno proučavan i precizno opisan u dosadašnjim istraživanjima, posebno u slučaju mikrocistina. Orr i Jones (1998) su pokazali da se proizvodnja mikrocistina kod soja *Microcystis aeruginosa* javlja samo prilikom eksponencijalnog rasta kulture, odnosno, kada se koncentracija ćelija povećava, bez obzira na ograničavajuće faktore sredine. Ovo ukazuje na direktnu linearnu korelaciju između ćelijske deobe i stope proizvodnje mikrocistina, dok faktori koji ograničavaju rast kao što su hranljive materije, svetlost i temperatura indirektno utiču na proizvodnju mikrocistina kroz njihov uticaj na rast i deobu ćelija, umesto direktnog efekta na puteve biosinteze ovog toksina. Trend povećanja stope produkcije mikrocistina tokom eksponencijalne faze rasta i zatim postepenog opadanja tokom stacionarne faze je zabeležen i u drugim istraživanjima (Watanabe i sar., 1989; Lee i sar., 2000). Sličan trend je zabeležen i u ovom radu prilikom testiranja ekstrakata soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Nakon dostizanja maksimalne toksičnosti na kraju eksponencijalne faze rasta, nije bilo većih promena u intenzitetu uticaja na eksperimentalne jedinice sa produženjem perioda kultivacije. Važno je napomenuti da odnos između faze rasta i proizvodnje cijanotoksina može biti specifičan za vrstu ili soj i pod uticajem drugih, prethodno opisanih faktora. Na primer, određena istraživanja pokazuju da je proizvodnja cilindropermopsina najveća tokom kasne stacionarne faze, suprotno tipičnom obrascu uočenom za druge cijanotoksine. Istraživanja Hawkins i sar. (2001) su pokazala da nakon ulaska kulture *Raphidopsis raciborskii* (ex. *Cylindropermopsis raciborskii*) u stacionarnu fazu rasta, dolazi do značajnog povećanja nivoa intracelularnog cilindropermopsina (CYN), koje je zapravo dvostruko brže od same stope deobe ćelija u ovoj fazi. Udeo ekstracelularnog CYN, koji je u kulturama činio 20% ukupnog sadržaja toksina tokom eksponencijalne faze, dostigao je 50% tokom stacionarne faze. Prilikom analize dva soja vrste *R. raciborskii*, Saker i Griffiths (2000) su takođe zabeležili značajan porast u nivoima CYN po jedinici biomase kako su kulture prelazile u stacionarnu fazu rasta. Dodatno, utvrđeno je slično povećanje u zastupljenosti CYN frakcije u ukupnom sadržaju ekstracelularnih toksina. Rezultati navedenih istraživanja ukazuju na to da se, za razliku od mikrocistina, produkcija cilindropermopsina nastavlja i nakon ulaska

u stacionarnu fazu rasta i nije u direktnoj korelaciji sa stopom rasta kulture. Ukoliko se uzme u obzir potencijal za produkciju CYN kod sojeva roda *Oscillatoria* utvrđen u okviru ovog istraživanja (Potpoglavlje 4.5.2), povećanje toksičnosti svih sojeva ovog roda nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta može se objasniti kontinuiranom produkcijom ove grupe toksina. Kao što se iz Tabele 16 može videti, faza rasta je statistički značajno uticala na ispoljenu toksičnost najvećeg broja sojeva (6), ukazujući na važnost testiranja u svim fazama rasta kultura.

**Tabela 15.** Uticaj faze rasta kulture na akutnu toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*. Rezultati su kategorisani na osnovu faze rasta u tri nivoa: 7 dana, 21 dan i 35 dana, kao i perioda izlaganja test organizama (24 i 48 sati). Osnovne parametre čine granična vrednost letalnosti LC50, 95% interval poverenja (95% CI) dobijen za ovu vrednost, granična vrednost LC10 i R-kvadrat. Svi rezultati su izraženi u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) primenjenog ekstrakta.

	24h ekspozicije				48h ekspozicije				
	Naziv soja	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
7 dana kultivacije	<i>Anabaena</i> Č2	> 10000	6790.47	6981.62 - 13772.09	0.91	> 10000	4691.37	9794.89 - 11561.12	0.96
	<i>Anabaena</i> Č5	8851.15	8426.22	8165.82 - 9520.72	0.95	7852.35	7291.85	7128.53 - 8629.78	0.95
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	4139.99	2244.49	2477.42 - 7943.28	0.90	1056.81	791.95	816.58 - 1315.22	0.99
	<i>Nostoc</i> 2S1	> 10000	/	/	0.93	> 10000	7320.36	/	0.89
	<i>Nostoc</i> 2S3B	> 10000	/	/	/	> 10000	/	/	/
	<i>Nostoc</i> LC1B	7014.55	6342.30	6531.30 - 7550.92	0.97	6776.41	6190.33	6486.34 - 7063.17	0.99
	<i>Nostoc</i> Z1	> 10000	/	/	0.28	> 10000	8924.83	/	0.97
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	> 10000	4218.90	/	0.95	5236	/	/	0.97
	<i>Oscillatoria</i> K3	> 10000	/	/	0.93	7481.69	7045.98	6886.52 - 8147.04	0.96
	<i>Oscillatoria</i> Z1	> 10000	/	/	0.51	5128.61	/	/	0.95

		24h ekspozicije				48h ekspozicije			
Naziv soja		LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
21 dan kultivacije	<i>Anabaena</i> Č2	<b>8729.71</b>	3034.58	7498.94 - 10764.65	0.91	<b>7888.60</b>		5807.64 - 12852.86	0.83
	<i>Anabaena</i> Č5	<b>5321.08</b>	3998.33	3026.91 - 10964.78	0.78	<b>4064.43</b>	3297.66	2376.84 - 6576.57	0.84
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	<b>2004.47</b>	1656.12	1690.44 - 2365.91	0.98	<b>57.01</b>	32.99	35.97 - 78.52	0.98
	<i>Nostoc</i> 2S1	<b>8729.71</b>	6019.56	/	0.78	<b>1241.65</b>	1187.87	/	/
	<i>Nostoc</i> 2S3B	<b>&gt; 10000</b>	7845.14	7533.55 - 16143.58	0.89	<b>&gt; 10000</b>	7145.07	6982.32 - 13365.95	0.91
	<i>Nostoc</i> LC1B	<b>1954.33</b>	1543.32	1761.97 - 2167.70	0.99	<b>1836.53</b>	1497.03	1541.70 - 2187.76	0.98
	<i>Nostoc</i> Z1	<b>4216.96</b>	2837.32	2722.70 - 6807.69	0.90	<b>3047.89</b>	2132.24	1698.24 - 5164.16	0.86
	<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	<b>1610.64</b>	1002.37	816.58 - 2910.71	0.88	<b>1267.65</b>	1061.19	918.33 - 1644.37	0.95
	<i>Oscillatoria</i> K3	<b>566.23</b>	533.02	200.90 - 1374.04	0.83	<b>566.23</b>	533.02	200.90 - 1374.04	0.83
	<i>Oscillatoria</i> Z1	<b>338.84</b>	202.81	187.93 - 598.41	0.93	<b>131.52</b>	84.09	159.95 - 444.63	0.94
35 dana kultivacije	<i>Anabaena</i> Č2	<b>9120.10</b>	6407.41	6934.25 - 13520.72	0.94	<b>6456.54</b>	2346.70	1185.76 - 19054.72	0.60
	<i>Anabaena</i> Č5	<b>1832.31</b>	1708.81	1495.92 - 2167.70	0.99	<b>1210.59</b>	1095.62	874.2 - 1479.10	0.97
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	<b>348.33</b>	244.65	252.92 - 485.28	0.98	<b>51.16</b>	27.65	29.10 - 74.81	0.98

Naziv soja	24h ekspozicije				48h ekspozicije			
	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>	LC50	LC10	LC50 95% CI	R <sup>2</sup>
<i>Nostoc 2S1</i>	> 10000	1545.25	8729.71 -20276.82	0.89	<b>7925.01</b>	1183.85	6823.38 - 9484.18	0.96
<i>Nostoc 2S3B</i>	> 10000	8628.71	9204.49 - 12161.86	0.97	> 10000	8628.71	9204.49 - 12161.86	0.97
<i>Nostoc LC1B</i>	<b>1694.33</b>	1389.05	1300.16 -2202.92	0.96	<b>1694.33</b>	1389.05	1300.16 -2202.92	0.96
<i>Nostoc Z1</i>	<b>2735.26</b>	2306.27	2275.09 - 3296.09	0.98	<b>2426.61</b>	2079.19	2084.49 - 2837.91	0.98
<i>Oscillatoria DTD-Bečej</i>	<b>1091.44</b>	890.01	632.41 - 1425.60	0.95	<b>420.72</b>	298.76	350.75 - 505.82	0.99
<i>Oscillatoria K3</i>	<b>135.51</b>	84.53	106.16 - 170.21	0.98	<b>102.09</b>	61.13	78.52 - 127.93	0.98
<i>Oscillatoria Z1</i>	<b>266.07</b>	165.97	106.16 - 170.21	0.98	<b>103.27</b>	61.84	78.52 - 127.93	0.98



**Tabela 16.** Uticaj faze rasta kulture na toksičnost ispitivanih sojeva - Rezultati jednosmerne ANOVA analize. Značajnost je označena p-vrednostima  $\leq 0.05$ .

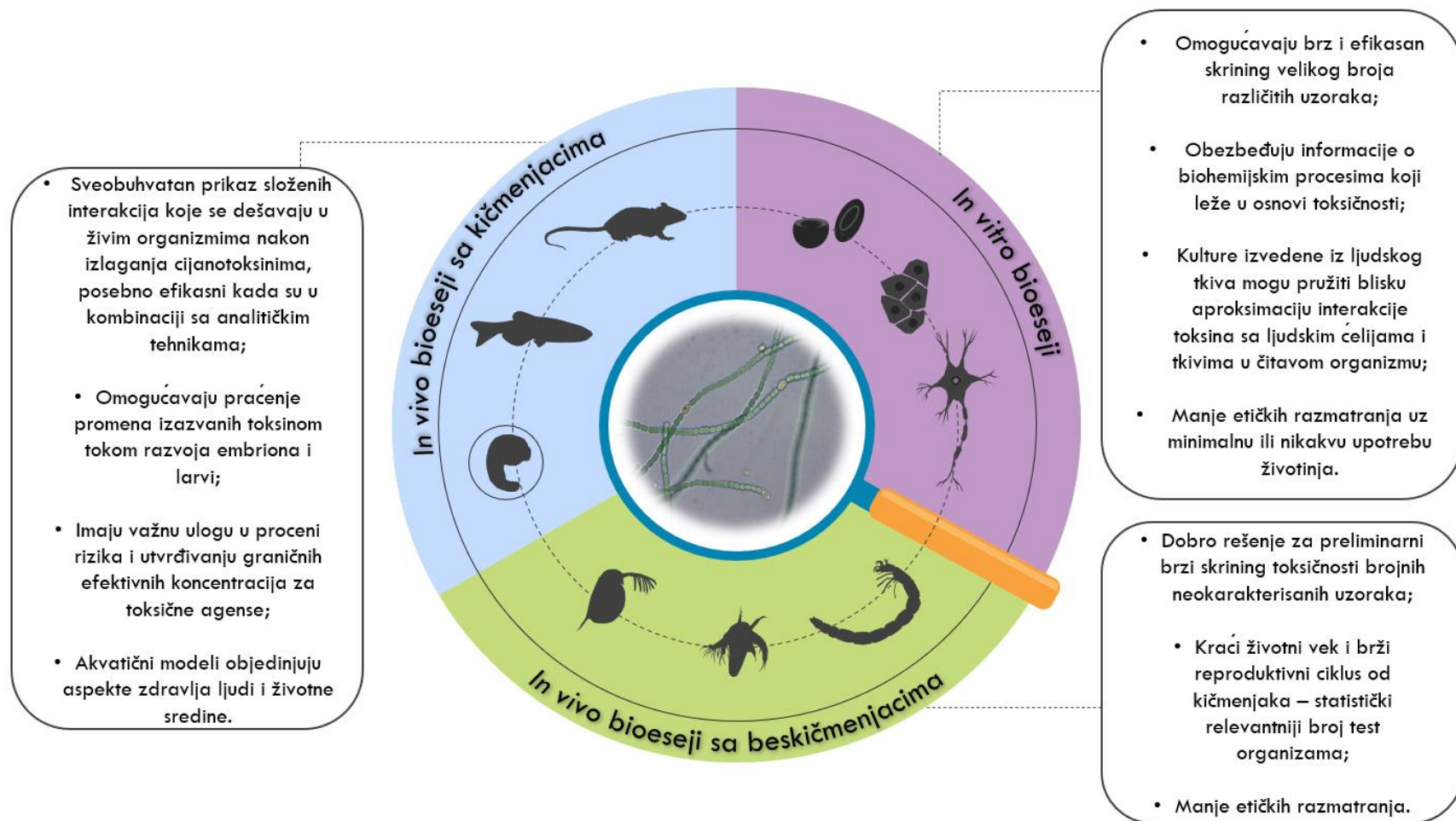
Naziv soja	SS	df	MS	F (DFn, DFd)	p-vrednost
<i>Anabaena</i> Č2	1819	5	363.7	6.230	<b>0.0143</b>
<i>Anabaena</i> Č5	4137	5	827.5	2.810	0.1602
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	6206	5	1241	6.235	<b>0.0261</b>
<i>Nostoc</i> 2S1	860,8	5	172.2	5.599	<b>0.0273</b>
<i>Nostoc</i> 2S3B	3033	5	606.6	6.171	0.0584
<i>Nostoc</i> LC1B	3033	5	606.6	6.171	0.0584
<i>Nostoc</i> Z1	6584	5	1317	3.743	0.1103
<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	7531	5	1506	5.199	<b>0.0392</b>
<i>Oscillatoria</i> K3	15172	5	3034	9.294	<b>0.0137</b>
<i>Oscillatoria</i> Z1	13577	5	2715	7.398	<b>0.0141</b>

*Artemia salina* biotest se u ovom istraživanju pokazao kao izuzetno koristan metod jednostavnog i brzog skrininga velikog broja uzoraka koji sadrže potencijalno toksična jedinjenja, bez gubitka pouzdanosti i osetljivosti testa. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je najizraženiji uticaj od svih testiranih faktora, na toksičnost ispitivanih sojeva imalo trajanje kultivacije, odnosno specifična faza rasta. Iako je potvrđen stimulativan efekat svih ispitivanih faktora na toksičnost odabranih sojeva, takođe je registrovano postojanje praga optimalnog intenziteta ovih faktora nakon kojeg nema značajnijih promena u toksičnosti.

#### 4.3.5. Analiza primene različitih biotestova u detekciji cijanotoksičnosti

Na osnovu rezultata dobijenih primenom raznovrsnih biotestova, evidentno je da analiza cijanobakterijske toksičnosti zahteva kombinaciju metoda koje omogućavaju multidimenzionalni uvid u ovaj problem. Iako je proučavanje promena na nivou celog organizma od suštinskog značaja pošto je složenost živih organizama još uvek van domašaja *in vitro* tehnika, razumevanje cijanotoksičnosti na molekularnom i biohemijskom nivou je neophodno za sveobuhvatnu analizu cijanobakterijske toksičnosti. *In vivo* tehnike, uprkos tehničkim i etičkim problemima, nastavljaju da igraju važnu ulogu u proceni rizika i utvrđivanju kritičnih doza toksičnih agenasa. Međutim, postoji potreba za daljim istraživanjima kako bi se poboljšali i optimizovali biološki testovi kičmenjaka za testiranje toksičnosti cijanobakterija. Ovo uključuje razvoj standardizovanih protokola za biotestove koji se mogu koristiti u različitim laboratorijama i regionima, kao i identifikaciju novih model organizama (uključujući mikroorganizme i biljke) koji mogu pružiti novi uvid u mehanizme toksičnosti cijanobakterija i koji su etički opravdani. Trenutno je dostupan širok spektar bioloških testova. Neki od njih, kao što je *Artemia salina* test, nude jednostavno i jeftino rešenje za brzi skrining velikog broja uzoraka koji sadrže potencijalno toksična jedinjenja, bez žrtvovanja pouzdanosti i osetljivosti testa, dok drugi, kao što je test embriona

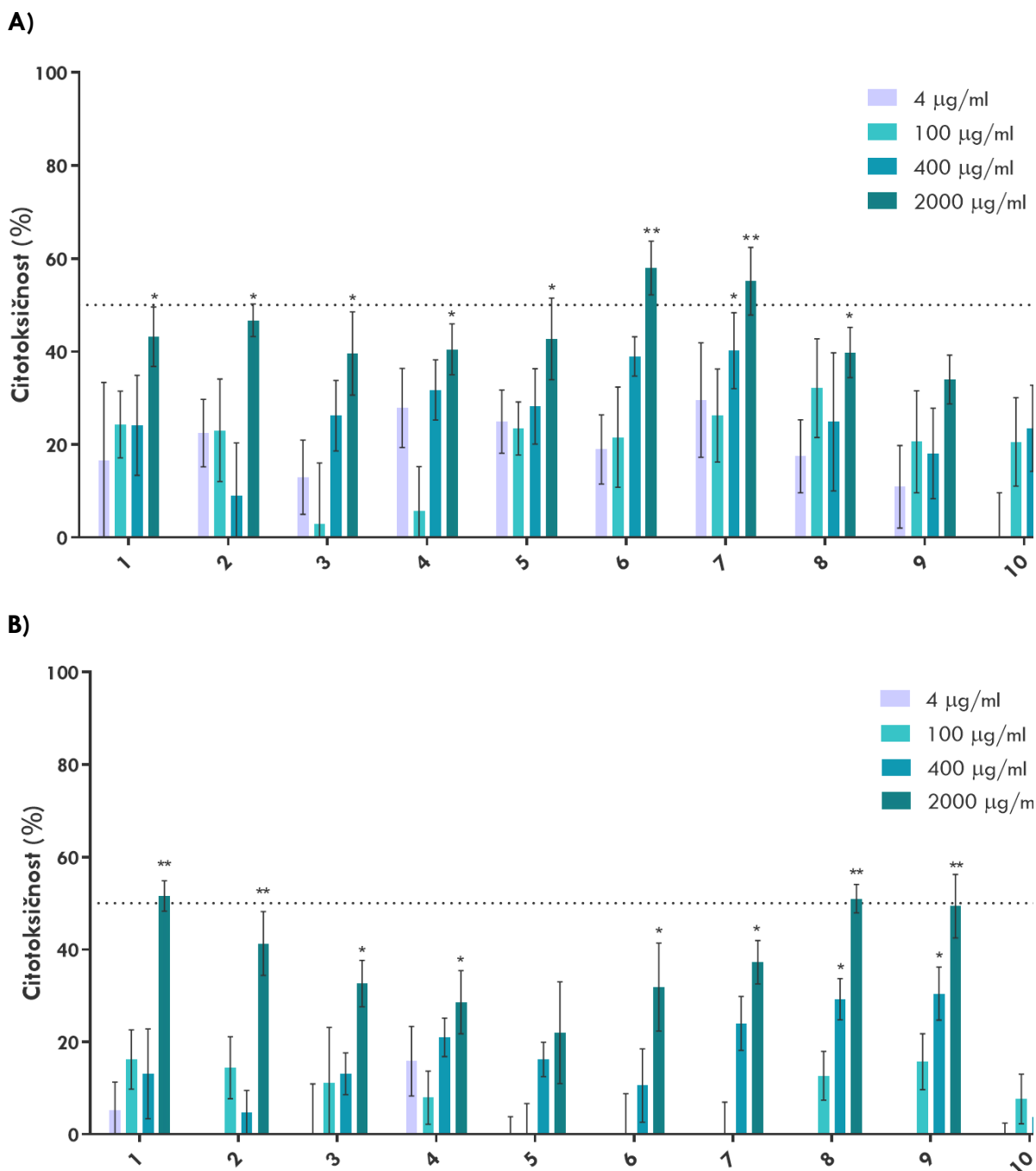
zebrice, mogu obezbediti dublju analizu toksičnosti na različitim biološkim nivoima (Slika 45). Međutim, bilo koji pojedinačni test je obično nedovoljan da se u potpunosti okarakteriše toksičnost cijanobakterija. Pored toga, nove tehnologije kao što su *in vitro* modeli i računarsko modeliranje mogu dopuniti biotestove sa kičmenjacima i pomoći u smanjenju broja životinja koje se koriste u istraživanjima.



**Slika 45.** Različite grupe biotestova i njihove prednosti u ispitivanju cijanobakterijske toksičnosti (Modifikovano iz Davidović i sar. (2023))

#### 4.4. Utvrđivanje citotoksičnosti i neurotoksičnosti odabranih sojeva - ćelijska linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

U cilju ispitivanja citotoksičnog i neurotoksičnog potencijala, testiran je uticaj ekstrakata 10 sojeva cijanobakterija na vijabilnost ćelija ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) pomoću tetrazolijum kolorimetrijskog testa (MTT). Utvrđeni efekti su predstavljeni u vidu procenata citotoksičnosti (CI%) dobijenih nakon 24 i 72h izlaganja dejstvu ekstrakata (Slika 46A; Slika 46B). Takođe su utvrđene granične Inhibitorne koncentracije (IC50 i IC10) i prikazane u tabeli 17. Registrovana toksičnost većine ispitanih sojeva je bila dozno zavisna, pri čemu je samo u slučaju najviše primenjene koncentracije zabeležena citotoksičnost veća od 50% kod pojedinih sojeva. Nakon 24h tretmana, najveća toksičnost je registrovana u slučaju soja *Nostoc* LC1B i iznosila je 57.95% ( $p \leq 0.01$ ) u slučaju najveće koncentracije, dok preostale testirane koncentracije nisu izazvale statistički značajan efekat. Za ovaj soj je utvrđena i IC50 (24h) koncentracija od 1250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Toksičnost većeg intenziteta je zabeležena u slučaju soja *Nostoc* Z1, specifično CI%= 55.13% ( $p \leq 0.01$ ) za najveću ispitivanu koncentraciju i CI%=40.18% ( $p \leq 0.05$ ) za sledeću koncentraciju u nizu (400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), kao i za soj *Oscillatoria* Z1 kod kog su značajni efekti) zabeleženi samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji (CI%=48.80%;  $p \leq 0.05$ ), dok je izračunata IC10 (24h) koncentracija iznosila 49.58  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nakon 72h izlaganja, zabeležena toksičnost za sojeve roda *Nostoc*, koji su prethodno pokazali najveću toksičnost, je bila znatno niža. Značajna razlika u odnosu na kontrolu je registrovana samo u grupama tretiranim najvišom koncentracijom ekstrakata i iznosila je 31.88% ( $p \leq 0.05$ ) za *Nostoc* LC1B i 37.26% ( $p \leq 0.05$ ) za *Nostoc* Z1, dok u preostalim grupama nije zabeležena citotoksičnost veća od 25%. Među sojevima ovog roda, granična inhibitorna koncentracija nakon 72h izlaganja je utvrđena samo u slučaju soja *Nostoc* LC1B (IC10=460.92  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Međutim, toksičnost sojeva koji pripadaju rodovima *Oscillatoria* i *Anabaena* se značajno povećala sa dužinom izlaganja ćelija dejstvu ekstrakata. Najintenzivniji efekti nakon 72h izlaganja su zabeleženi kod soja *Anabaena* Č2, pri čemu je u slučaju najveće primenjene koncentracije izazvana citotoksičnost iznosila 51.56% ( $p \leq 0.01$ ) a granična IC10 (72h) vrednost bila 141.45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Dodatno, pri najvećoj testiranoj koncentraciji, soj *Anabaena* Č5 je takođe ispoljio značajno jači efekat u odnosu na kontrolnu grupu (CI%=41.28%;  $p \leq 0.01$ ; IC10=399.02) dok u preostalim grupama toksičnost nijednog od navedena dva soja nije bila veća od 16%. Toksičnost soja *Oscillatoria* K3 koja nije bila značajna nakon 24 h, čak ni u grupi tretiranoj najvišom koncentracijom ekstrakta (CI%=34%), je nakon dužeg izlaganja dostigla vrednost od 49.36% ( $p \leq 0.01$ ) i 30.46% ( $p \leq 0.05$ ) za nižu koncentraciju (400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Takođe su utvrđene granične vrednosti IC50 (72h)=1846  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i IC10 (72h)=52.68  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Slično tome, toksičnost soja *Oscillatoria* DTD-Bečej je porasla sa 39.79% na 50.98% ( $p \leq 0.01$ ) u grupi tretiranoj najvećom koncentracijom, nakon 72h tretmana i definisana je IC50 (72h) koncentracija od 1723  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Slika 46.** Uticaj cijanobakterijskih ekstrakata (1 – *Anabaena* Č2; 2 – *Anabaena* Č5; 3 – *Microcystis aeruginosa* PCC 7806; 4 – *Nostoc* 2S1; 5 – *Nostoc* 2S3B; 6 – *Nostoc* LC1B; 7 – *Nostoc* Z1; 8 – *Oscillatoria* DTD-Bečej; 9 – *Oscillatoria* K3; 10 – *Oscillatoria* Z1) na vijabilnost SH-SY5Y ćelija predstavljen kao procenat citotoksičnosti (%CI) utvrđen nakon 24h (A) i 72h (B) izlaganja. Značajnost rezultata je prikazana kao \* ( $p \leq 0.05$ ) ili \*\* ( $p \leq 0.01$ ).

**Tabela 17.** Inhibitorne koncentracije (IC50 i IC10) i intervali poverenja od 95% za uticaj ekstraktata cijanobakterija na vijabilnost ćelija SH-SY5Y ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Naziv soja	24h ekspozicije				72h ekspozicije			
	IC50	IC10	IC50 95% CI	R <sup>2</sup>	IC50	IC10	IC50 95% CI	R <sup>2</sup>
<i>Anabaena</i> Č2	> 2000	/	/	/	> 2000	141.45	1204 - 9335	0.407
<i>Anabaena</i> Č5	> 2000	/	/	0.048	> 2000	399.02	1810 – 12047	0.374
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	> 2000	72.55	/	0.113	> 2000	158.19	/	0.175
<i>Nostoc</i> 2S1	> 2000	/	/	/	> 2000	/	/	/
<i>Nostoc</i> 2S3B	> 2000	/	/	/	> 2000	/	/	/
<i>Nostoc</i> LC1B	1250	2.74	460.8 – 1460	0.648	> 2000	460.92	/	0.216
<i>Nostoc</i> Z1	> 2000	0.02	/	0.098	> 2000	/	/	0.349
<i>Oscillatoria</i> DTD- Bečej	> 2000	/	/	/	1723	72.06	1091 – 3370	0.607
<i>Oscillatoria</i> K3	> 2000	/	/	/	1846	52.68	953.1 – 6074	0.434
<i>Oscillatoria</i> Z1	> 2000	49.58	/	0.269	> 2000	611.98	/	0.509

*In vitro* modeli sa ćelijskim linijama su našli primenu u testiranju toksičnosti cijanobakterija kao fleksibilan pristup koji je u skladu sa nastojanjem da se minimalizuje upotreba životinja u testovima toksičnosti, posebno od uspostavljanja kontinualnih ćelijskih kultura, koje se mogu obnavljati zahvaljujući neograničenom kapacitetu proliferacije (Schirmer, 2006). Kako su cijanobakterije poznati producenti metabolita sa potencijalno neurotoksičnom aktivnošću, određene ćelijske linije kao što su primarne kulture neurona (najčešće izolovane iz glodara), kao i kontinualne kulture SH-SY5Y, BV-2 i Neuro-2a, su specifično korišćene u više studija u cilju procene njihovog neurotoksičnog potencijala (O'Neill i sar., 2017; Andeden i sar., 2019). U ovom radu, analizom uticaja odabranih cijanobakterijskih sojeva na vijabilnost ćelija ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y), identifikovana je dozno zavisna citotoksičnost većine ispitivanih sojeva nakon 24 i 72h izlaganja, pri čemu su najintenzivniji toksični efekti detektovani pri najvećoj primenjenoj koncentraciji ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Osim toga, primećena je varijabilnost u odgovoru ćelija na produženo izlaganje specifičnim sojevima ili rodovima cijanobakterija. Specifično, sojevi rodova *Anabaena* i *Oscillatoria* su pokazali povećanu toksičnost sa produženim trajanjem tretmana. Ovaj efekat je bio posebno izražen u slučaju sojeva *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* DTD-Bečej čija toksičnost se značajno povećala nakon 72 sata tretmana u grupi izloženoj dejstvu najviše ispitane koncentracije ekstrakata. Nasuprot tome, kod sojeva *Nostoc* LC1B i *Nostoc* Z1 primećeno je smanjeno toksično dejstvo sa dužim izlaganjem. Iako su ekstrakti

soja *Nostoc* LC1B imali ukupno najveći uticaj na vijabilnost ćelija sa izračunatom citotoksičnošću od 57.95% nakon 24 h, u grupi izloženoj ekstraktima istog soja u trajanju od 72h je detektovana toksičnost znatno slabijeg intenziteta (31.88% CI%). Istraživanja su pokazala da iako *in vitro* ispitivanje toksičnih efekata nastalih nakon kratkoročnog izlaganja može obezbediti važne informacije o akutnim efektima ispitivanog agensa, ovakav pristup ne obuhvata adaptivne procese koji omogućavaju ćelijama da razviju otpornost i prevaziđu ove efekte pri dugoročnijoj izloženosti (Savolainen, 1982; Cherubin i sar., 2018; Harris i sar., 2018). Dobijeni rezultati stoga mogu ukazivati na ulogu reparacionih sistema ćelija u ublažavanju i medijaciji izazvanih toksičnih efekata. Pored toga, postoje dokazi da dugotrajno izlaganje niskim nivoima cijanobakterijskih metabolita poput mikrocistina može podstaći proliferaciju ćelija tumora putem disregulacije aktivnosti tumor-supresor gena, što dovodi do gubitka pozitivne regulacije apoptoze (Svirčev i sar., 2010). Upravo rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju na važnost izlaganja ćelijskih linija toksičnim metabolitima cijanobakterija tokom dužeg vremenskog perioda u cilju preciznije identifikacije promena na ćelijskom nivou. Zabeležena razlika u intenzitetu toksičnosti ekstrakta različitih sojeva dobijena produženim izlaganjem se može potencijalno pripisati dejstvu citotoksina cilindrospermopsina, jer je potencijal za produkciju ovog toksina utvrđen, na osnovu prisustva gena *cyn* biosintetskog klastera, isključivo u genomu sojeva roda *Oscillatoria* (Potpoglavlje 4.5.2). Slično tome, Young i sar. (2008) su utvrdili da primarne humane ćelije granuloze izložene CYN u koncentraciji od  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  tokom 6 sati nisu pokazale nikakve citotoksične efekte. Međutim, produženo vreme izlaganja (72 sata) je dovelo do značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija. Pored toga, Frosio i sar. (2009) su zabeležili citotoksične efekte nakon kratkotrajnog izlaganja ćelija jetre (C3A) dejstvu prečišćenog CYN već tokom 1-6 sati, koji su se održali čak i nakon ispiranja ćelija i perioda oporavka od 24h, što ukazuje na ireverzibilnu prirodu CYN toksičnosti. Efekti ovog tipa, međutim, nisu do sada povezani sa ćelijama nervnog sistema. S obzirom na to da mikrocistini i cilindrospermopsini, dve grupe toksikološki najrelevantnijih cijanotoksina, primarno izazivaju oštećenja jetre, većina istraživanja koja se tiču citotoksičnosti cijanobakterija su sprovedena koristeći ćelijske linije jetre, kao što su ćelije humanog hepatocelularnog karcinoma HepG2 (Dietrich i Hoeger, 2005; Van Apeldoorn i sar., 2007). Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja su pokazali da i ove grupe toksina mogu izazvati neurotoksičnost i promene u ponašanju kod različitih organizama (Pašková i sar., 2008; Zhao i sar., 2015; Hu i sar., 2016; Blagojević i sar., 2021). U radu Hinojosa i sar. (2019), je ispitan citotoksični potencijal toksina MC-LR i CYN u testovima sa ćelijskom linijom SH-SY5Y koristeći MTS esej. Oba toksina su izazvala dozno zavisno smanjenje vijabilnosti ispitanih ćelija nakon 24 i 48h izlaganja. Definisane EC50 vrednosti za MC-LR su iznosile  $36.21 \pm 1.89$  (24h) i  $20.80 \pm 2.08$  (48h), dok su za CYN dobijene vrednosti iznosile  $0.87 \pm 0.13$  (24h) i  $0.32 \pm 0.08$  (48h). Značajno niže granične efektivne koncentracije utvrđene za cilindrospermopsin u odnosu na mikrocistin ukazuju na veću osetljivost ovog tipa ćelija na dejstvo CYN. U kasnijem istraživanju, ista istraživačka grupa je analizirala citotoksičnost dva cijanobakterijska ekstrakta, od kojih je jedan sadržao cilindrospermopsin (*C. ovalisporum*, CYN+) a drugi soj nije proizvodio ovaj toksin (*R. raciborskii*, CYN-), u ćelijskoj liniji SH-SY5Y (Hinojosa i sar., 2023). Rezultati su pokazali da je izlaganje CYN+ ekstraktu izazvalo značajno smanjenje vijabilnosti ćelija u zavisnosti od koncentracije, nakon 24 i 48h izlaganja. Takođe, slično rezultatima ovog rada, došlo je do povećanja citotoksičnog efekta sa produženim izlaganjem ćelija dejstvu ekstrakata, koji je bio izraženiji kod CYN- ekstrakata. Niske granične efektivne vrednosti utvrđene za CYN- ekstrakte ukazuju na prisustvo neokarakterisanih metabolita u ekstraktima cijanobakterija koji mogu uticati na vijabilnost ovog tipa ćelija, pored poznatog toksina. Ćelije

humanog neuroblastoma SH-SY5Y korišćene su takođe u nekoliko studija za ispitivanje citotoksičnosti BMAA (b-N-metilamino-L-alanina), neproteinogene, toksične amino kiseline koja može da ošteti nervni sistem i izazove neurodegenerativne bolesti kao što su Alchajmerova bolest i amiotrofična lateralna skleroza. Koristeći ovu ćelijsku liniju, utvrđeni su različiti efekti, kao što su povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih formi i oksidacija proteina, pojačana regulacija lizozomalnih enzima i apoptoza, dok kod HepG2 i Caco-2 ćelija BMAA nije uticala na uobičajene metaboličke puteve proteinogenih aminokiselina (Sazdova i sar., 2022).

#### 4.5. Utvrđivanje potencijala za produkciju toksina kod odabranih cijanobakterijskih sojeva

##### 4.5.1. Utvrđivanje produkcije mikrocistina kod ispitivanih sojeva primenom ELISA testa

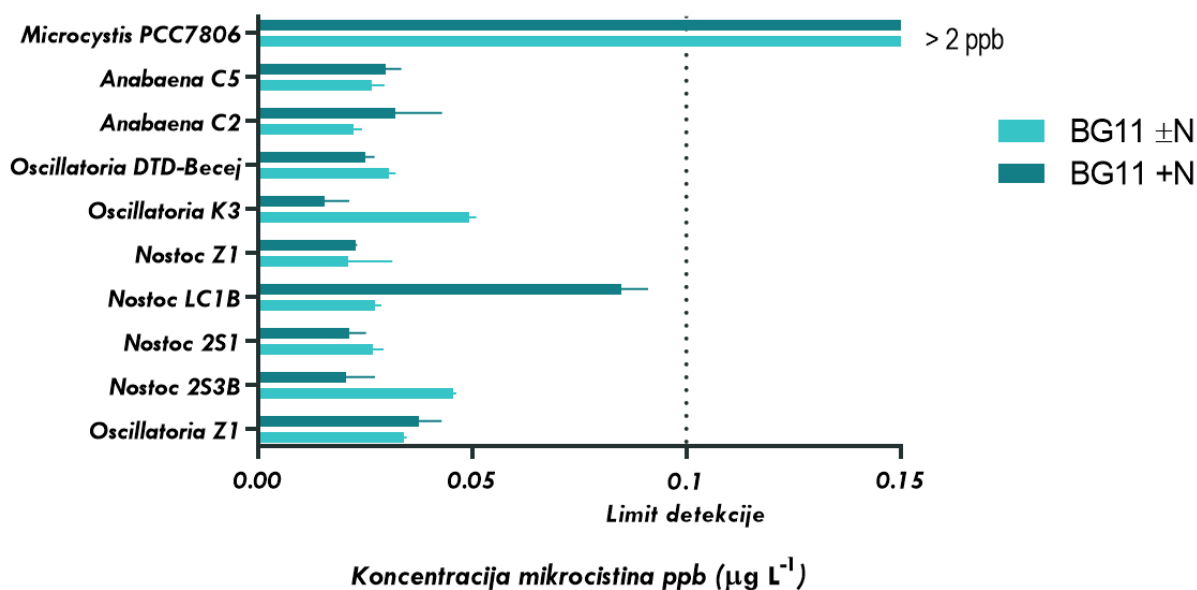
Kako su mikrocistini najrasprostranjeniji cijanobakterijski toksini sa preko 250 poznatih strukturnih varijeteta, u cijanobakterijskim kulturama je izvršena detekcija prisustva upravo ovih toksina kao mogućih uzročnika toksičnih efekata registrovanih u drugim primenjenim testovima. Rezultati dobijeni primenom ELISA testa za mikrocistine ukazali su na veoma nizak sadržaj MC-LR ekvivalenata u gotovo svim ispitanim kulturama, sa zabeleženim koncentracijama ispod donje granice detekcije komercijalnog kompleta (0.1 ppb) (Tabela 18; Slika 47). Najveća koncentracija toksina ove grupe je detektovana u uzorcima soja *Nostoc* LC1B i iznosila je 0.084 ppb nakon kultivacije kulture u uslovima većih koncentracija azota u podlozi (1.5 g NaNO<sub>3</sub>), dok je isti soj pokazao značajno manju produkciju mikrocistina (0.0274 ppb) nakon gajenja u prisustvu manje koncentracije azota. Zabeležene koncentracije mikrocistina u uzorcima preostalih testiranih sojeva su bile izuzetno niske i kretale su se od 0.0156 do 0.0494 ppb. Istovremeno, u uzorku kulture soja *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, poznatog producenta mikrocistina (pozitivna kontrola), registrovane su koncentracije MC-LR ekvivalenata iznad gornje granice detekcije *EnviroLogix* kompleta (2 ppb). Navedeni podaci ukazuju na činjenicu da toksini koje je moguće detektovati upotrebljenim testom (mikrocistini, nodularin) nisu prisutni u cijanobakterijskim kulturama u dovoljnim koncentracijama da bi se mogli smatrati uzročnim agensima toksičnosti zabeležene u primenjenim biotestovima.

**Tabela 18.** Koncentracije MC-LR ekvivalenata u uzorcima cijanobakterijskih kultura utvrđene primenom ELISA testa za mikrocistine. Rezultati su prikazani kao ppb (engl. *parts per billion*; jedan deo na milijardu), uz vrednosti standardne greške (SEM) za svaki od rezultata.

	BG11 +N (1.5 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )		BG11 ±N (0.8 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	
	Koncentracija mikrocistina (ppb)	SEM	Koncentracija mikrocistina (ppb)	SEM
<i>Oscillatoria</i> Z1	<b>0.0377</b>	0.00494	<b>0.0340</b>	0.00049
<i>Nostoc</i> 2S3B	<b>0.0207</b>	0.00638	<b>0.0456</b>	0.00049
<i>Nostoc</i> 2S1	<b>0.0213</b>	0.00368	<b>0.0267</b>	0.00237
<i>Nostoc</i> LC1B	<b>0.084</b>	0.00587	<b>0.0274</b>	0.00118
<i>Nostoc</i> Z1	<b>0.0228</b>	0.00013	<b>0.0211</b>	0.00999
<i>Oscillatoria</i> K3	<b>0.0156</b>	0.00552	<b>0.0494</b>	0.00135
<i>Oscillatoria</i> DTD-Bečej	<b>0.0252</b>	0.00181	<b>0.0305</b>	0.00140



	BG11 +N (1.5 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )		BG11 ±N (0.8 g NaNO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	
	Koncentracija mikrocinina (ppb)	SEM	Koncentracija mikrocinina (ppb)	SEM
<i>Anabaena</i> Č2	0.032	0.01060	0.0223	0.00173
<i>Anabaena</i> Č5	0.0298	0.00343	0.0266	0.00272
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	>2	0	>2	0



**Slika 47.** Grafički prikaz koncentracije MC-LR ekvivalenata u uzorcima cijanobakterijskih kultura utvrđene primenom ELISA testa za mikrocinine

U prethodnim istraživanjima, produkcija mikrocinina je potvrđena kod mnogih cijanobakterijskih vrsta, među kojima su predstavnici rodova *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* (terestrični i akvatični sojevi), *Planktothrix* i *Anabaenopsis*, dok je proizvodnja nodularina identifikovana kod specifičnih vrsta rodova *Nostoc* i *Nodularia* (Lindholm i Meriluoto, 1991; Sivonen i sar., 1992; Rapala i sar., 1997; Oksanen i sar., 2004; Genuário i sar., 2010; Faassen i Lüring, 2013; Rastogi i sar., 2015; Janssen, 2019; Svirčev i sar., 2019). U ovom radu, rezultati dobijeni detekcijom mikrocinina upotrebom ELISA testova u ekstraktima cijanobakterijskih sojeva su pokazali da je većina ispitanih kultura imala veoma nizak sadržaj MC-LR ekvivalenata. Za gotovo sve sojeve su dobijene koncentracije ispod donje granice detekcije komercijalnog ELISA kompleta, što ukazuje na to da toksini iz grupe mikrocinina i nodularina, nisu primarni uzročnici zabeležene toksičnosti. Među ispitivanim sojevima, soj *Nostoc LC1B* je pokazao najveću koncentraciju toksina ove grupe od 0.084 µg mL<sup>-1</sup> kada je bio izložen većim koncentracijama azota u medijumu za rast čime se i u ovom slučaju potvrđuje uticaj azota na produkciju ove grupe toksina. Međutim, čak i u ovom slučaju, proizvodnja mikrocinina je i dalje bila relativno niska u poređenju sa sojem *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, producentom mikrocinina. Ključna prednost ELISA metoda kada se radi o detekciji cijanotoksina leži u isplativosti i jednostavnosti, pošto se kvantifikacija bazira na kolorimetrijskim testovima i ne zahteva upotrebu složenih instrumenata. Pored toga, ELISA metodologija se može prilagoditi za detekciju različitih cijanotoksina uključujući mikrocinine, anatoksin-α, cilindrospermopsin i saksitoksin i posebno

dizajnirani komercijalni kompleti su obezbedili standardizovan pristup njihovoj analizi (Bláhová i sar., 2009; Campbell i sar., 2009). Ova metoda ne zahteva posebnu pripremu uzorka ili korake prethodnog koncentrovanja i obezbeđuje vrednost koja predstavlja ukupnu koncentraciju specifične grupe cijanotoksina u vodi. Međutim, eksperimentalno su utvrđena brojna ograničenja metoda detekcije zasnovanih na ELISA testovima, koja mogu varirati u zavisnosti od vrste ciljnog jedinjenja. Većina ELISA kompleta može da varira u svojoj selektivnosti i osetljivosti na različite varijante ili kongenere cijanotoksina, što je problematično s obzirom na to da određene grupe toksina, kao što su mikrocistini, odlikuje velika strukturna raznolikost. U tom smislu, ovaj tip merenja obezbeđuje jedan signal koji predstavlja opštu koncentraciju mikrocistina, čak i u uzorcima koji mogu da sadrže više kongenera MC sa različitim nivoima potencijalne toksičnosti. Shodno tome i odsustvo signala u ELISA testu prilikom detekcije specifične grupe toksina ne isključuje u potpunosti prisustvo preostalih varijanti ili srodnih cijanotoksina. Opisana je takođe unakrsna reaktivnost sa strukturno sličnim jedinjenjima, što može dovesti do pogrešnog tumačenja i potencijalno lažno pozitivnih rezultata, ne samo u slučaju MC već i drugih cijanotoksina (Aranda-Rodriguez i sar., 2015). Pored jedinjenja strukturno sličnih ciljnom toksinu, poznato je da prisustvo rastvarača kao što su metanol i acetonitril, kao i salinitet ili pH vrednost samih uzoraka mogu ometati reakciju testa i uticati na osetljivost metode detekcije (Metcalf i sar., 2000). Merenja zasnovana na ELISA testu, iako od izuzetnog značaja u detekciji cijanotoksina, su često smatrana semi-kvantitativnim zbog uticaja različitih faktora na izmerene koncentracije, zbog čega je neophodna primena dodatnih testova za sveobuhvatnu procenu kompletnog profila cijanotoksina.

#### 4.5.2. Detekcija biosintetskih genskih klastera za proizvodnju najznačajnijih grupa cijanotoksina

U cilju ispitivanja potencijala odabranih sojeva za produkciju toksičnih sekundarnih metabolita primenjen je bioinformatički pristup uz upotrebu alata za pretragu čitavih sekvenciranih genoma i *in silico* predikciju prisustva sekvenci biosintetičkih genskih klastera (BGK). BIN-ovi svakog soja, prečišćeni na način opisan u sekciji „Materijal i metode“ (3.5.2.2), su ispitani koristeći antiSMASH i Prokka softver, kao i MIBiG baze podataka. Primenom ovih alata je omogućena karakterizacija organizacije genskih klastera i predikcija potencijala za proizvodnju određenih molekula na osnovu poređenja homologije između zadate sekvence (Query) i BGK sekvenci dostupnih u bazama podataka. Ovo poređenje uključuje pretragu „sličnosti“ sekvenci, gde se identifikuju geni sa sličnim sekvencama, kao i analizu sastava domena, gde se ispituju konzervirani proteinski domeni uključeni u biosintezu sekundarnih metabolita. Na osnovu rezultata, dodeljuje se procentualno izražena ocena sličnosti svakom referentnom klasteru. Svi relevantni rezultati su potvrđeni pomoću alata za pretragu lokalnog poravnanja (BLAST, BLASTp), kako bi se izbegli lažno pozitivni rezultati. Analiza sastava NRPS i PKS domena omogućila je razvrstavanje detektovanih genskih klastera na one koji kodiraju specifične metabolite i one koji imaju nisku podudarnost sa klasterima dostupnim u bazama podataka ili su nekompletno prisutni u finalno prečišćenom BIN-u. Primenom navedenih alata je predviđeno postojanje ukupno 196 BGK sekundarnih metabolita, od kojih je 21 uključeno u sintezu potencijalno toksičnih jedinjenja. Poseban akcenat je stavljen na utvrđivanje prisustva *mcy* klastera gena odgovornih za produkciju mikrocistina, *cyn* klastera za produkciju cilindropermopsina, *ana* klastera za produkciju anatoksinina i *sxt* klastera za produkciju saksitoksina.

Pored toga, sekvenciranje kompletnih genoma testiranih sojeva je od izuzetnog značaja sa aspekta formiranja kolekcije sekvenci genoma autohtonih vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija izolovanih sa područja Republike Srbije. Na ovim prostorima takvih istraživanja nije bilo do sada i dobijeni sekvencirani genomi će biti deponovani u odgovarajuću svetsku genomsku bazu za cijanobakterije. S obzirom na to da na svetskom nivou postoje stalni apeli za dopunjavanjem takvih baza novim sekvencama, rezultati ovih istraživanja će značajno doprineti dostupnosti novih 9 sekvenciranih genoma cijanobakterija koji pripadaju rodovima *Anabaena*, *Nostoc* i *Oscillatoria*.

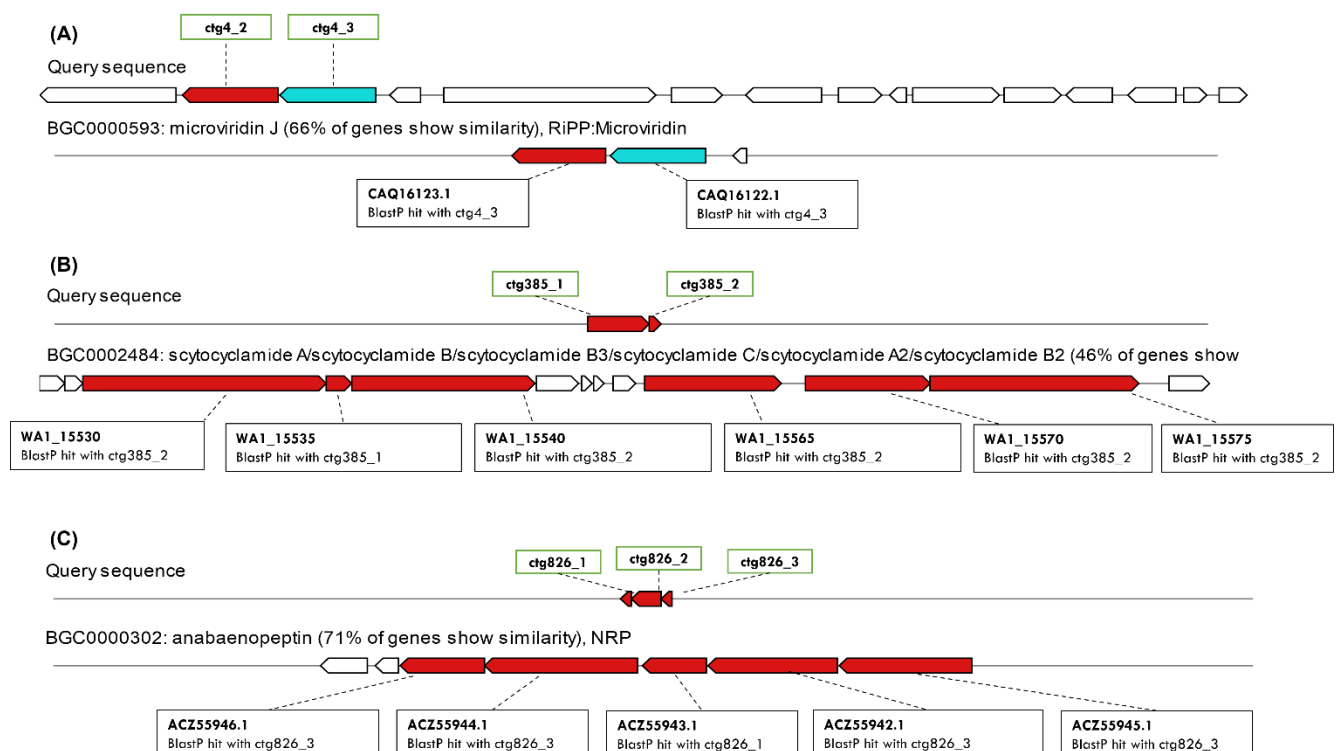
Rezultati bioinformatičke analize sekvenciranih genoma sojeva ukazali su na prisustvo BGK toksičnih metabolita kod gotovo svih ispitivanih sojeva. U slučaju soja ***Oscillatoria* DTD-Bečej** među 70 testiranih kontiga, otkrivena su samo tri klastera sekundarnih metabolita među kojima nije bilo potencijalno toksičnih.

Od ukupno 30 identifikovanih BGK u genomu soja ***Anabaena* Č2**, u pet je utvrđen određen nivo poklapanja sa klasterima za biosintezu potencijalno toksičnih metabolita (Tabela 19, Slika 48). Na osnovu prikazanih rezultata se može utvrditi visok stepen sličnosti (66%) sa BGK soja *Microcystis aeruginosa* MRC uključenog u biosintezu mikroviridina J. U okviru ovog klastera, koji pripada RiPP klasi klastera (Ribozomalno sintetisani I Post-translaciono modifikovani Peptidi), detektovane su ciklaze mdnB i mdnC, dok osnovni prekursor mikroviridina mdnA nije identifikovan. Najveće poklapanje (71%) je dobijeno sa genskim klasterom za produkciju anabenopeptina iz genoma soja *Anabaena* sp. 90. Identifikovan je gotovo čitav genski klaster, uključujući sve poznate osnovne biosintetske gene, s izuzetkom *aptF* gena koji kodira ABC transporter (ATP vezujući kasetni transporter). Anabenopeptini su strukturno raznovrsni ciklopentapeptidi koje proizvode različite vrste cijanobakterija, uključujući *Microcystis aeruginosa* i *Oscillatoria agardhii*, obično bivaju detektovani tokom cijanobakterijskog cvetanja i često se javljaju zajedno sa mikrocistinima (Monteiro i sar., 2021). Dodatno su utvrđene sličnosti sa određenim regionima klastera za biosintezu jamajkamida A, scitociklamida A i nostoklida N1, međutim, poklapanje regiona je bilo manje od 50%.

**Tabela 19.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Anabaena* Č2

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0000593: <b>Mikroviridin J</b> ( <i>Microcystis aeruginosa</i> MRC)	RiPP	66%	Mikroviridin J	6678 nt	CAQ16122.1 <i>mdnB</i> CAQ16123.1 <i>mdnC</i>	ATP "grasp" ligaza ATP "grasp" ligaza
BGC0000302: <b>Anabenopeptin</b> ( <i>Anabaena</i> sp. 90)	NRP	71%	Anabenopeptin	36200 nt	ACZ55946.1 ACZ55944.1 ACZ55943.1 ACZ55942.1 ACZ55945.1	NRP sintetaza NRP sintetaza NRP sintetaza NRP sintetaza NRP sintetaza
BGC0001001: <b>Jamajkamid A</b>	NRP/PK	15%		69900 nt	AAS98783.1 AAS98784.1	PK/NRPS hibrid PK sintetaza

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
( <i>Lyngbya majuscula</i> )			Jamajkamid A, B, C		AAS98786.1 AAS98787.1	NRP sintetaza PK sintaza/tioesteraza
BGC0002484: <b>Scitociklamid A</b> ( <i>Scytonema hofmannii</i> PCC 7110)	NRP/PK	46%	Scitociklamid A, B, B3, C, A2, B2	96737 nt	WA1_15575 WA1_15570 WA1_15565 WA1_15540 WA1_15530	Hipotetički protein Hipotetički protein NRP sintetaza NRP sintetaza Hipotetički protein
BGC0002677: <b>Nostoklid N1</b> <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Ostali	27%	Nostoklid N1, N2	40054 nt	Npun_R2083 Npun_R2082 Npun_R2081 Npun_R2080 Npun_R2079	AMP-zavisna sintetaza i ligaza beta-ketoacil sintetaza beta-ketoacil sintetaza beta-ketoacil sintetaza beta-ketoacil sintetaza



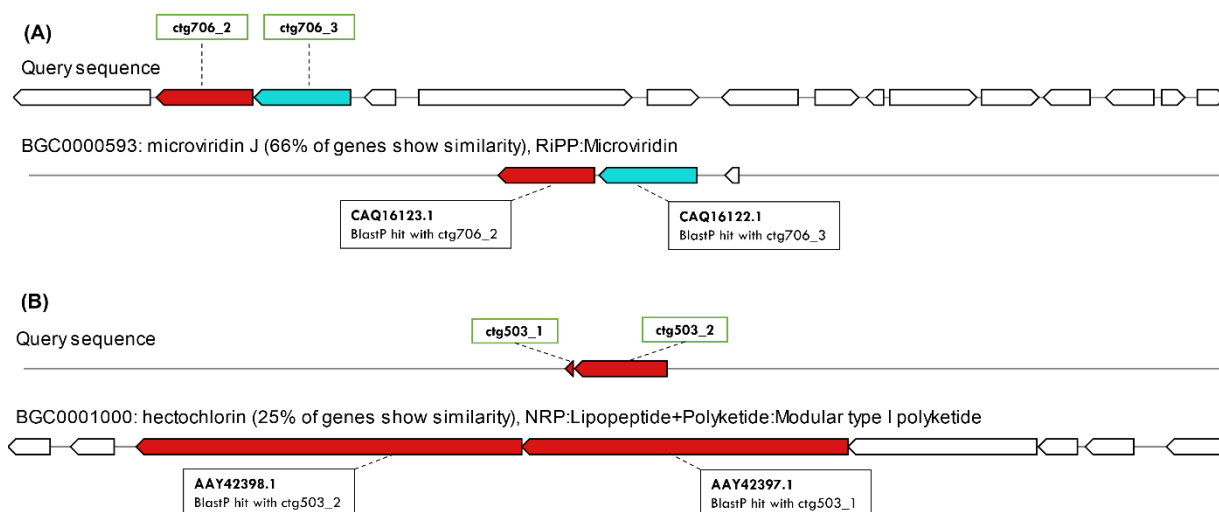
Slika 48. Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Anabaena* Č2

Prilikom ispitivanja genoma soja *Anabaena* Č5 identifikovano je ukupno 19 poklapanja sa klasterima gena sekundarnih metabolita, od kojih se 3 izdvajaju kao potencijalno toksični

(Tabela 20, Slika 49). Identifikovano je ukupno šest gena sa značajnom ulogom u biosintezi i regulaciji toksičnih produkata. Utvrđena je sličnost sa genima sojeva *Microcystis aeruginosa* MRC i *Nostoc punctiforme* PCC 73102, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za prethodno opisan soj *Anabaena* Č2. Ova činjenica ukazuje na moguću sličnost u metaboličkim putevima između ova dva soja. Pored toga, utvrđen je potencijal za produkciju metabolita heptohlorina, pri čemu je poklapanje utvrđeno sa genima soja vrste *Lyngbya majuscula*. Međutim, iako je poklapanje dobijeno sa dva od tri regiona esencijalna za formiranje “skeleta” heptohlorina, nije identifikovano prisustvo preostalih šest regiona uključenih u biosintezu prekursornih jedinjenja i uvođenje finalnih modifikacija u procesu biosinteze ovog bioaktivnog metabolita. Heptohlorin je hlorovani lipopeptid izolovan prvobitno iz marinske cijanobakterijske vrste *Lyngbya majuscula* poznat po antifungalnoj aktivnosti protiv *Candida albicans* i biljnih patogena, kao i inhibiciji rasta određenih humanih ćelijskih linija preko hiperpolimerizacije aktina (Zotchev, 2013). Slično tome, u slučaju poklapanja sa genima soja *Nostoc punctiforme* PCC 73102, detektovana su dva od pet regiona koji katališu ključne procese u biosintezi nostoklida N1, dok preostali esencijalni i prateći regioni nisu detektovani. Iako nije dostupno mnogo informacija o nostoklidu N1, poznato je da se radi o hlorovanom metabolitu inicijalno izolovanom iz kulture simbiotske vrste roda *Nostoc* prisutne u lišaju *Peltigera canina*, koji pokazuje umerenu citotoksičnost kada se radi o životinjskim ćelijskim linijama, posebno Neuro-2a i KB ćelija (Tomura i sar., 2017). Iako ovi rezultati ukazuju na potencijal za produkciju navedenih metabolita, važno je takođe napomenuti da je stopa svih poklapanja sa navedenim biosintetičkim klasterima bila manja od 50%.

**Tabela 20.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Anabaena* Č5

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0000593: <b>Mikroviridin J</b> ( <i>Microcystis aeruginosa</i> MRC)	RiPP	33%	Mikroviridin J	6678 nt	CAQ16122.1 <i>mdnB</i> CAQ16123.1 <i>mdnC</i>	ATP “grasp” ligaza ATP “grasp” ligaza
BGC0001000: <b>Hektoklorin</b> ( <i>Lyngbya majuscula</i> )	NRP/PK	25%	Hektoklorin	41964 nt	AAY42397.1 AAY42398.1	NRP sintetaza NRP sintetaza
BGC0002677: <b>Nostoklid N1</b> <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Ostali	11%	Nostoklid N1, N2	40054 nt	Npun_R2082 Npun_R2083	AMP-zavisna sintetaza i ligaza beta-ketoacil sintaza

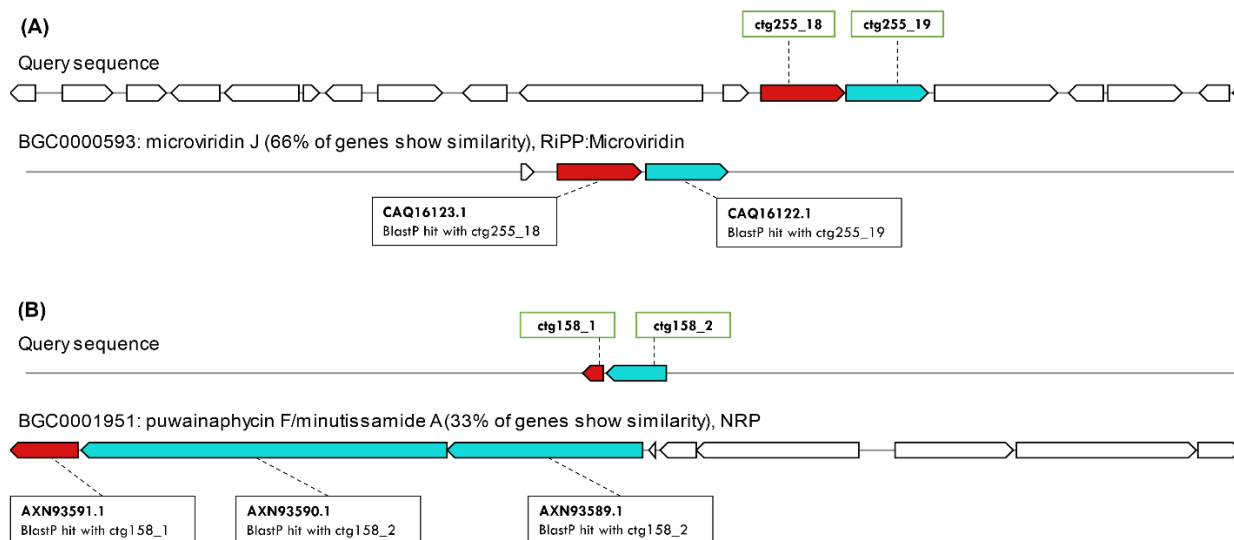


**Slika 49.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Anabaena* Č5

U slučaju soja ***Nostoc* 2S1** utvrđeno je prisustvo 19 BGK sekundarnih metabolita, od kojih su samo dva odgovorna za produkciju potencijalno toksičnih jedinjenja (Tabela 21, Slika 50). Jedno od toksičnih jedinjenja je mikroviridin J, pri čemu su geni koji su identifikovani kod prethodnih sojeva takođe pronađeni i kod soja *Nostoc* 2S1. Mikroviridin J je moćan inhibitor serin-proteaza, koji pripada najvećoj klasi ribozomalnih peptida koje proizvode cijanobakterije, a prvenstveno se javlja kod rodova kao što su *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* i *Nodularia* (Cavalcante do Amaral i sar., 2021). Ima primenu u razvoju određenih lekova i igra ključnu ulogu u zaštiti cijanobakterija protiv zooplanktonskih predatora u njihovom prirodnom okruženju. Pored mikroviridina, detektovano je prisustvo gena za cijanobakterijske lipopeptide puvainaficin F i minutisamid A, pri čemu je najbolje poklapanje dobijeno sa genima soja *Cylindrospermum alatosporum* CCALA 994, sa sličnošću od 33%. Produkti tri detektovana gena predstavljaju 3 od 5 esencijalnih enzima u sintezi ovih jedinjenja, međutim preostali regioni sa dodatnim biosintetičkim i transportnim funkcijama nisu identifikovani.

**Tabela 21.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Nostoc* 2S1

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0000593: <b>Mikroviridin J</b> ( <i>Microcystis aeruginosa</i> MRC)	RiPP	66%	Mikroviridin J	6678 nt	CAQ16123.1 CAQ16122.1	ATP "grasp" ligaza ATP "grasp" ligaza
BGC0001951: <b>Puvainaficin F</b> ( <i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 994)	NRP	33%	Puvainaficin F, Minutisamid A	58884 nt	AXN93589.1 AXN93590.1 AXN93591.1	PuwE PuwF-G PuwH



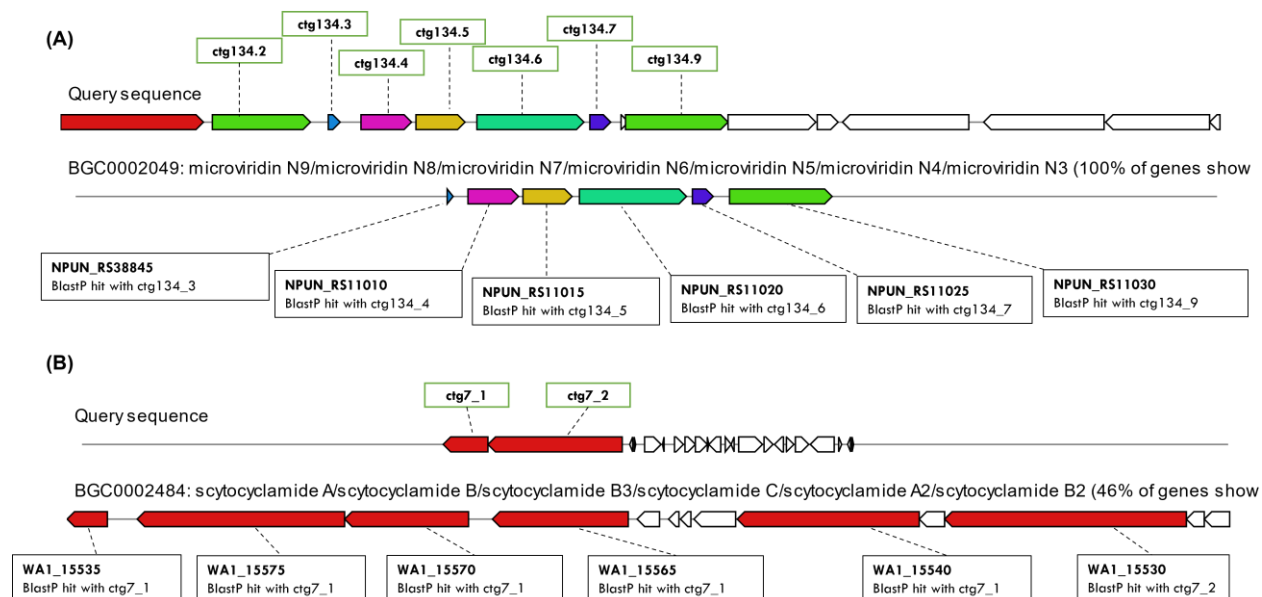
**Slika 50.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Nostoc* 2S1

U genomu soja ***Nostoc* 2S3B** je identifikovano ukupno 29 BGK, među kojima dva kodiraju potencijalno toksične metabolite (Tabela 22, Slika 51). Uočena je značajna sličnost sa klasterom soja *Nostoc punctiforme* PCC 73102 koji je odgovoran za biosintezu mikroviridina N9. Mikroviridin N9 je neobičan ribozomalno sintentisan peptid kog karakteriše 15 do 20 aminokiselinskih ostataka i odsustvo acetilacije, a njegovo ime odražava varijabilnost u broju N-terminalnih amino kiselina, u rasponu od tri do devet (Cavalcante do Amaral i sar., 2021). Ovaj klaster je potpuno identifikovan, što znači da su svi poznati geni uključeni u sintezu ovog metabolita identifikovani u genomu soja *Nostoc* 2S3B. Sličnost između sekvenci ovih klastera iznosi 100%, što ukazuje na blisku genetičku vezu između ova dva soja. Takođe je utvrđeno poklapanje sa BGK za scitociklamid A u genomu soja *Scytonema hofmannii* PCC 7110, pri čemu je stopa poklapanja iznosila 46%.

**Tabela 22.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Nostoc* 2S3B

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0002049: <b>Mikroviridin N9</b> ( <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102)	RiPP	100%	Mikroviridin	7559 nt	NPUN_RS38845  NPUN_RS11010	Proteinazni inhibitor iz familije mikroviridina/m arinostatina  MvdC familija - Maturaza ribozomalnih peptida sa ATP "grasp" domenom
	NRP/PK	46%		96737 nt	WA1_15575	Hipotetički protein

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0002484: <b>Scitociklamid A</b> ( <i>Scytonema hofmannii</i> PCC 7110)			Scitociklamid A, B, B3, C, A2, B2		WA1_15570 WA1_15565 WA1_15540 WA1_15530	Hipotetički protein NRP sintetaza NRP sintetaza Hipotetički protein



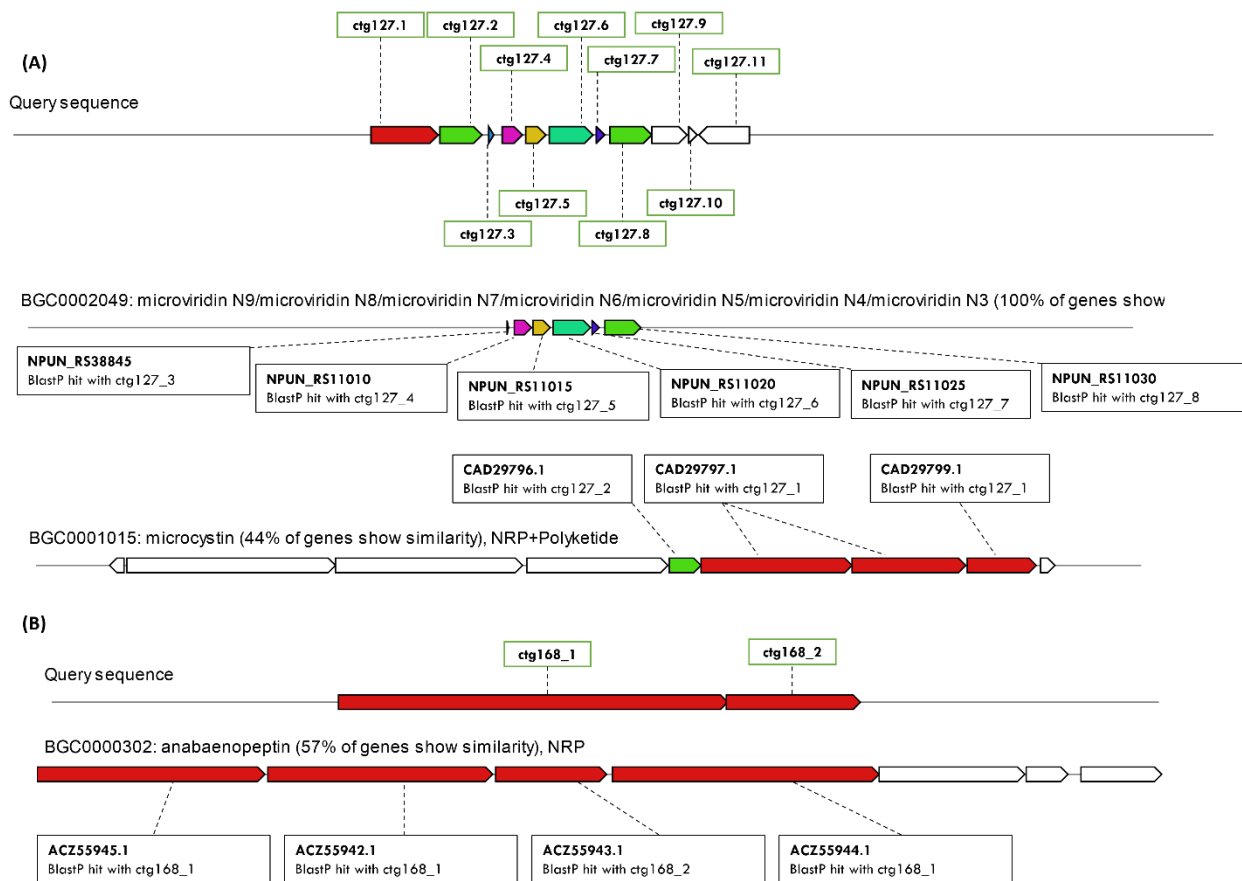
**Slika 51.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Nostoc* 2S3B

Na osnovu dobijenih rezultata za soj ***Nostoc* LC1B**, utvrđeno je prisustvo 30 BGK, od kojih su 3 odgovorna za produkciju potencijalno toksičnih metabolita (Tabela 23, Slika 52). Primena hibridnog pristupa u sklapanju genoma ovog soja omogućila je poboljšanu pokrivenost sekvence (coverage), što se odnosi na udeo ili procenat dužine jedne sekvence koji se poklapa ili mapira na drugu sekvencu, kao i veći procenat identiteta (percent identity), odnosno procenat identičnih nukleotida ili aminokiselina između sekvenci. Ovakav pristup rezultirao je povećanom ukupnom sličnošću sa BGK iz referentnih genoma i pouzdanijim poklapanjima. Najveća sličnost je dobijena sa BGK soja *Nostoc punctiforme* PCC 73102 odgovornog za biosintezu mikroviridina N9, kao što je to bio slučaj kod soja *Nostoc* 2S3B. Ovaj klaster je identifikovan u celosti, odnosno, identifikovani su svi do sada poznati geni uključeni u sintezu ovog metabolita, pri čemu je sličnost sa sekvencama u genomu soja *Nostoc* LC1B bila 100%. Navedena poklapanja sa genima *mcyA*, *mcyB*, *mcyC* i *mcyH* soja *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 uključenim u produkciju mikrocistina mogu biti potencijalno značajna, međutim, važno je naglasiti da je za tri osnovna biosintetska regiona (*mcyA*, *mcyB* i *mcyC*) poklapanje utvrđeno u okviru jedne sekvence (ctg127\_1) u genomu soja *Nostoc* LC1B. Dodatno, samo mali delovi ovih genskih regiona čije veličine iznose 8450, 6434 i 3896 baznih parova (bp) su potencijalno mogli biti identifikovani u okviru sekvence ctg127\_1 veličine 3225 bp. Utvrđeno je takođe prisustvo svih genskih regiona prisutnih u genomu soja *Anabaena* sp. 90 ključnih za biosintezu anabenopeptina osim *aptE* i *aptF*, pri čemu je ukupna sličnost iznosila 57%.



**Tabela 23.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Nostoc* LC1B

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0002049: <b>Mikroviridin N9</b> ( <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102)	RiPP	100%	Mikroviridin	7559 nt	NPUN_RS38845  NPUN_RS11010  NPUN_RS11015  NPUN_RS11020 NPUN_RS11025  NPUN_RS11030	Proteinazni inhibitor iz familije mikroviridina/marinostatina  MvdC familija - Maturaza ribozomalnih peptida sa ATP "grasp" domenom  MvdD familija - Maturaza ribozomalnih peptida sa ATP "grasp" domenom  Patatin  Hipotetički protein  ABC transporter ATP-vezujući protein/permeaza
BGC0001015: <b>Mikrocistin</b> ( <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 126/8)	NRP/PK	44%	Mikrocistin	55575 nt	CAD29796.1 <i>mcyH</i> CAD29797.1 <i>mcyA</i> CAD29798.1 <i>mcyB</i> CAD29799.1 <i>mcyC</i>	ABC transporter  Peptidna sintetaza  Peptidna sintetaza  Mikrocistin sintetaza
BGC0000302: <b>Anabenopeptin</b> ( <i>Anabaena</i> sp. 90)	NRP	57%	Anabenopeptin	36200 nt	ACZ55945.1 <i>aptA1</i> ACZ55942.1 <i>aptA2</i> ACZ55943.1 <i>aptB</i> ACZ55944.1 <i>aptC</i>	NRP sintetaza  NRP sintetaza  NRP sintetaza  NRP sintetaza

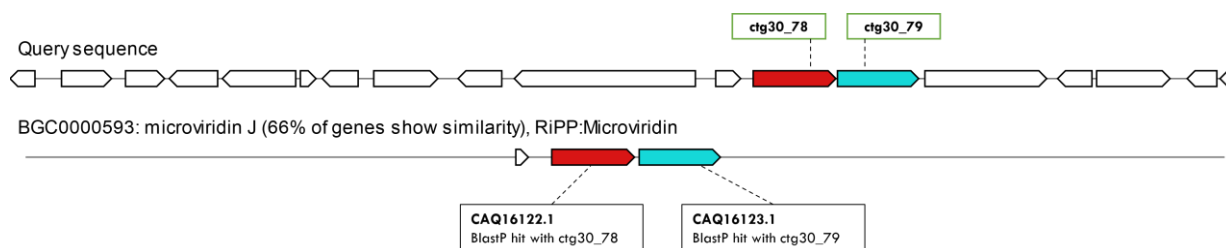


**Slika 52.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Nostoc* LC1B

Ispitivanjem genoma soja ***Nostoc* Z1** utvrđeno je prisustvo 15 BGK sekundarnih metabolita, od kojih je jedan uključen u produkciju potencijalno toksičnog jedinjenja (Tabela 24, Slika 53). Specifično, identifikovano je prisustvo klastera za mikroviridin J, a detektovani geni uključeni u sintezu ovog jedinjenja su identični onima koji su prethodno identifikovani kod drugih sojeva.

**Tabela 24.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Nostoc* Z1

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0000593: <b>Mikroviridin J</b> ( <i>Microcystis aeruginosa</i> MRC)	RiPP	66%	Mikroviridin J	6678 nt	CAQ16122.1 CAQ16123.1	ATP "grasp" ligaza ATP "grasp" ligaza



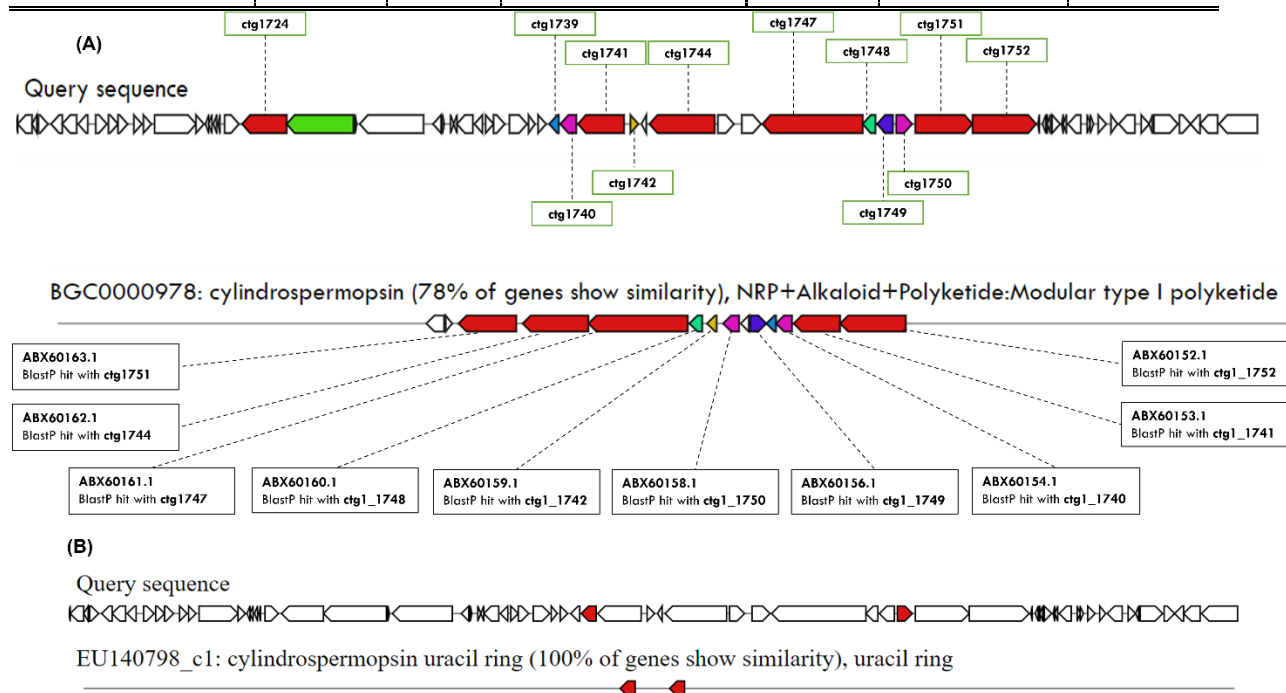
**Slika 53.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Nostoc* Z1

Genom soja ***Oscillatoria* K3** je takođe sklopljen koristeći prethodno opisan hibridni pristup. Ispitivanjem rezultata analize genoma, otkriveno je prisustvo 28 BGK sekundarnih metabolita, od kojih su 3 uključena u biosintezu toksičnih metabolita (Tabela 25, Slika 54). Najznačajnije poklapanje (78% ukupne sličnosti) je dobijeno sa genskim klasterom soja *Cylindrospermopsis raciborskii* AWT205 odgovornim za produkciju cilindrospermopsina. Identifikovano je 10 od ukupno 14 genskih regiona u klasteru, među kojima su svi geni odgovorni za biosintezu citotoksina cilindrospermopsina i transport, odnosno, efluks toksina iz ćelije. Svi neidentifikovani regioni klastera po podacima MiBIG baze referentnih BGK imaju kategoriju drugo („other“), što tipično znači da ovi geni ne pripadaju nijednoj specifičnoj poznatoj porodici gena ili da im nije dodeljena specifična funkcija ili klasifikacija. U nekim slučajevima, ovi geni mogu predstavljati nove ili neokarakterisane gene koji još nisu temeljno proučeni ili anotirani. Dodatno, otkriveni su u potpunosti genski regioni odgovorni za sintezu uracilnog prstena cilindrospermopsina (Slika 54B), koji se smatra neophodnim za ispoljavanje toksičnog delovanja cilindrospermopsina. Pronađena su takođe dva gena iz cilindrospermopsin klastera soja *Aphanizomenon* sp. 10E6, međutim, funkcija otkrivenih gena u procesu sinteze cilindrospermopsina do sada nije poznata i ukupna sličnost sa sekvencama u genomu analiziranog soja je bila manja od 10%. Slično soju *Anabaena* Č2, utvrđeno je poklapanje sa genima soja vrste *Lyngbya majuscula* uključenim u proces biosinteze jamajkamida A. Referentni klaster je izgrađen iz ukupno 26 genskih regiona, od kojih 9 čine ključni biosintetički geni. Među sekvencama soja *Oscillatoria* K3, utvrđeno je poklapanje sa ukupno 6 gena prisutnih u ovom referentnom klasteru, od kojih svi pripadaju kategoriji ključnih biosintetičkih gena.

**Tabela 25.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Oscillatoria* K3

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0000978: <b>Cilindrospermopsin</b> ( <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> AWT205)	NRP/PK alkaloid	78%	Cilindrospermopsin	57112 nt	ABX60152.1 <i>cyrD</i>	PK sintaza
					ABX60153.1 <i>cyrF</i>	PK sintaza
					ABX60154.1 <i>cyrG</i>	Uloga u formiranju uracilnog prstena
					ABX60156.1 <i>cyrK</i>	“Multidrug” eksporter MatE
					ABX60158.1 <i>cyrH</i>	Aminohidrolaza
					ABX60159.1 <i>cyrJ</i>	Sulfotransferaza
					ABX60160.1 <i>cyrA</i>	Amidinotransferaza
					ABX60161.1 <i>cyrB</i>	NRPS/PKS hibrid

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
					ABX60162.1 <i>cyrE</i>	PK sintaza
					ABX60163.1 <i>cyrC</i>	PK sintaza
BGC0001001: <b>Jamajkamid A</b> ( <i>Lyngbya majuscula</i> )	NRP/PK	23%	Jamajkamid A, B, C	69900 nt	AAS98777.1 AAS98781.1 AAS98783.1 AAS98784.1 AAS98787.1 AAS98789.1	PK sintaza PK sintaza NRPS/PKS hibrid PK sintaza PKS/tioest eraza Hipotetički protein
BGC0000981: <b>Cilindrospermopsin</b> ( <i>Aphanizomenon sp. 10E6</i> )	NRP/PK Alkaloid	8%	Cilindrospermopsin	57112 nt	ADF88287.1 ADF88288.1	Nukleotidil transferaza a Domen nepoznate funkcije



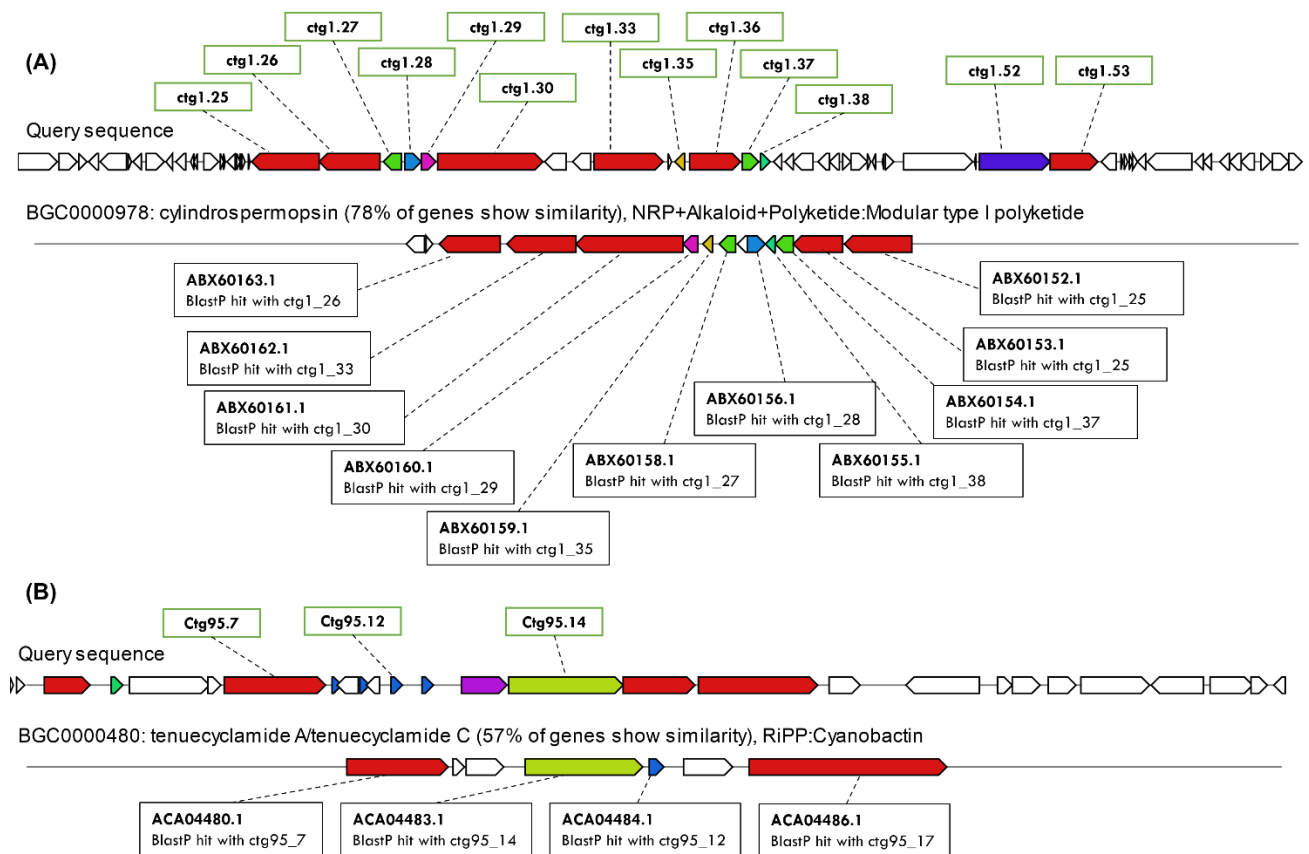
**Slika 54.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Oscillatoria* K3

Analizom genoma soja *Oscillatoria* Z1 postignuti su slični rezultati kao kod prethodno opisanog soja kada je reč o klasteru za produkciju cilindrospermopsina, pri čemu je dobijena ista ukupna sličnost (78%) i poklapanje sa regionima odgovornim za sintezu uracilnog prstena (Tabela 26, Slika 55). Međutim, identifikovan je dodatni genski region (*cynI*), čija tačna funkcija još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Utvrđena je takođe sličnost sa genskim klasterom za toksični metabolit tenueciklamid A, koji je inicijalno pronađen u okviru genoma soja vrste *Nostoc spongiaeforme*,

pri čemu su identifikovani svi ključni biosintetički genski regioni sa sličnošću od 57%. Tenueciklamid A je ciklični heksapeptid, međutim, njegova biološka aktivnost, izuzev potvrđene inhibicije deobe embriona morskog ježa, nije dovoljno istražena (Banker i sar., 1998).

**Tabela 26.** Predviđeni biosintetički klasteri i podudaranja genskih sekvenci u genomu soja *Oscillatoria* Z1

BGK poklapanje	Klasa klastera	Sličnost	Opis	Veličina klastera	Geni/Enzimi u klasteru	Produkti
BGC0000978: <b>Cilindrospermopsin</b> ( <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> AWT205)	NRP/PK alkaloid	78%	Cilindrospermopsin	57112 nt	ABX60152.1 <i>cyrD</i> ABX60153.1 <i>cyrF</i> ABX60154.1 <i>cyrI</i> ABX60155.1 <i>cyrG</i> ABX60156.1 <i>cyrK</i> ABX60158.1 <i>cyrH</i> ABX60159.1 <i>cyrJ</i> ABX60160.1 <i>cyrA</i> ABX60161.1 <i>cyrB</i> ABX60162.1 <i>cyrE</i> ABX60163.1 <i>cyrC</i>	PK sintaza PK sintaza Protein sličan prolin dioksigenazi Uloga u formiranju uracilnog prstena "Multidrug" eksporter MatE Aminohidrolaza Sulfotransferaza Amidino transferaza NRPS/PKS hibrid PK sintaza PK sintaza
BGC0000480: <b>Tenueciklamid A</b> ( <i>Nostoc spongiaeforme</i> var. <i>tenue</i> str. <i>Carmeli</i> )	RiPP	57%	Tenueciklamid A, C	11821 nt	ACA04480.1 ACA04483.1 ACA04484.1 ACA04486.1	tenA tenD tenE tenG



**Slika 55.** Biosintetički klasteri i podudaranja specifičnih regiona u genomu soja *Oscillatoria* Z1

Na osnovu rezultata genomske analize sprovedene u ovom radu, potvrđena je izuzetna raznolikost metaboličkih puteva analiziranih sojeva cijanobakterija. Identifikovano je ukupno 196 klastera sekundarnih metabolita, od kojih većina (92 klastera) pripada kategorijama NRPS, PKS ili hibridnih NRPS/PKS. Pored toga, detektovano je 20 klastera klasifikovanih kao RiPP porodica, a preostala 84 klastera spadala su u različite druge kategorije kao što su lantipeptidi, terpeni, jedinjenja slična mikosporinima, fosfonati, LAP (linearni peptidi koji sadrže azole/azoline), siderofore i rezorcinol. Ukupno 21 klaster je pokazao značajnu homologiju sa BGK koji kodiraju različite potencijalno toksične metabolite, uključujući mikrocistine, cilindrospermopsine, mikroviridine, anabaenopeptine, jamajkamide, scitociklamide, nostoklide, heptohlorine, puvainaficine i tenueciklamide. Međutim, potrebno je napomenuti da je u proseku svaki soj sadržao samo dva klastera uključena u proizvodnju toksičnih metabolita. Kod sojeva rodova *Anabaena* i *Nostoc* je detektovan najveći broj sekundarnih biosintetičkih klastera, pri čemu se najveća raznovrsnost pripisuje sojevima *Anabaena* Č2 i *Nostoc* LC1B sa po 30 različitih klastera. Dodatno, u genomima navedenih sojeva je identifikovan najveći broj BGK koji kodiraju toksične metabolite, pri čemu *Anabaena* Č2 sadrži pet takvih klastera, a *Nostoc* LC1B tri. Biosintetski klasteri gena uključeni u proizvodnju mikrocistina su identifikovani samo u genomu soja *Nostoc* LC1B, što je u skladu sa rezultatima dobijenim nakon upotrebe ELISA testa, gde je zabeležena najveća koncentracija mikrocistin ekvivalenata kod ovog soja pored pozitivne kontrole. Međutim, potrebno je istaći da je u genomu ovog soja identifikovano samo nekoliko određenih delova *mycA*, B, C i H klastera koji kodiraju peptidne sintetaze, mikrocistin sintetazu i ABC transporter, kao i da je pokrivenost ovih delova klastera bila vrlo ograničena. Međutim, kako je u referentnim bazama, koje algoritam korišćenih alata upotrebljava, dostupna samo frakcija ukupno opisanih kongenera mikrocistina, neidentifikovani delovi klastera potencijalno

moгу biti rezultat nedovoljne opisanosti specifične varijante mikrocistina ili jedinstvene genetičke strukture klastera koja je karakteristična za ovaj soj. U slučaju sojeva *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1, otkriveno je prisustvo BGK koji kodiraju cilindrospermopsin sa značajnom sličnošću (78%) sa klasterom soja *Cylindrospermopsis raciborskii* AWT205 koji je odgovoran za proizvodnju ovog toksina i dostupan u MiBIG genomskoj bazi podataka. Interesantno je primetiti da su oba soja pokazala isti procenat sličnosti sa ovim klasterom, što ukazuje da je preostali deo klastera promenljiv i specifičan za svaki pojedinačni soj. Ovu teoriju dodatno potvrđuje činjenica da su svi delovi klastera koji su smatrani esencijalnim za biosintezu funkcionalnog cilindrospermopsina identifikovani u potpunosti, dok je funkcija preostalih delova klastera nepoznata (NCBI GenBank EU140798.1). Navedena dva soja takođe imaju sličnu morfologiju i pokazuju slične efekte u testovima toksičnosti koji su sprovedeni u okviru istraživanja ove doktorske disertacije. U genomu soja *Oscillatoria* DTD-Bečej nisu pronađena značajna poklapanja sa poznatim BGK potencijalno toksičnih metabolita. Ovakav rezultat je najverovatnije posledica nepotpunog sastavljanja genoma što je rezultiralo nedostatkom ili fragmentacijom delova klastera, čime je otežana njihova identifikacija. Pored toga, verovatno je da je značajan deo klastera prisutnih u genomima testiranih sojeva jedinstven i nije prisutan u dostupnim bazama podataka. Shodno tome, njihovo prepoznavanje i precizna klasifikacija od strane softvera može biti otežana i ograničena, što dovodi do niže stope poklapanja. U cilju unapređenja ovog pristupa u analizi toksigenog potencijala cijanobakterija, uspostavljanje novih baza podataka i obogaćivanje postojećih kvalitetnim i pouzdanim genomskim podacima je od ključne važnosti. Postojeće referentne genomske baze podataka kao što su CyanoOmicsDB, CyanoBase i CYORF pružaju neprocenjive izvore informacija za identifikaciju i karakterizaciju genoma sojeva cijanobakterija. Međutim, njihova upotrebna vrednost kada se radi o nepoznatim sojevima je i dalje ograničena zbog prisustva regiona koji su specifični za ispitivani soj i koji su u potpunosti neidentifikovani ili su dovoljno različiti od identifikovanih regiona da ne mogu biti prepoznati od strane algoritama bioinformatičkih alata. Metagenomski pristup se pokazao izuzetno korisnim u identifikaciji karakteristika sekundarnog metabolizma cijanobakterija u ovom istraživanju. Dodatna istraživanja u ovom pravcu bi mogla obezbediti ključne informacije o sastavu zajednice mikroorganizama unutar cijanobakterijskih asocijacija, koje su važne za razumevanje njihove toksičnosti i načina na koji drugi organizmi utiču na stopu proizvodnje cijanotoksina. Pored toga, budućim istraživanjima bi trebalo obuhvatiti dodatne analize, poput proteomskih i metabolomskih, kako bi se potvrdila proizvodnja toksičnih metabolita identifikovanih primenom bioinformatičkih analiza. Ovaj integrisani pristup bi mogao da pruži sveobuhvatnije razumevanje biohemijskih puteva uključenih u proizvodnju toksina, njihovu regulaciju i pojedine aspekte njihove interakcije sa drugim organizmima.

## 5. Zaključak



Na osnovu prikazanih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Primenom akutnih testova toksičnosti (*D. magna*, *A. salina*, *D. rerio*) utvrđeno je da su svi testirani sojevi cijanobakterija ispoljili toksično delovanje u bar jednom primenjenom biotestu. Registrovana toksičnost je u većini slučajeva imala dozno i vremenski zavisan karakter i predstavljala je specifično svojstvo soja ili roda.
- U biotestu *D. magna* na nivou čitavog organizma nisu zabeleženi letalni efekti kod više od 25% jedinki izloženih delovanju ispitivanih autohtonih sojeva u primenjenom opsegu koncentracija. Najveća toksičnost u ovom testu je utvrđena za referentni soj, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, pri najvećoj primenjenoj koncentraciji ekstrakta, pri čemu mortalitet jedinki čak ni nakon 48h ekspozicije nije prelazio 25%. Rezultati testa potencijalno ukazuju na specifičnu otpornost ovog model organizma ka toksičnim efektima metabolita prisutnih u ekstraktima testiranih sojeva.
- Rezultati ispitivanja u testu *D. rerio* su ukazali na potencijal ekstrakata sojeva da izazovu niz subletalnih toksičnih efekata u različitim fazama razvoja zebrića. Vrsta i intenzitet zabeleženih efekata su u velikoj meri zavisili od specifičnog soja, koncentracije ekstrakta i dužine izlaganja jedinki. Najčešće registrovani subletalni efekti su podrazumevali morfološke abnormalnosti kao što su edem perikardijalne duplje i žumančane kese, zakrivljenost kičme, deformitet repa, ometanje normalnog razvoja očiju (smanjenje dimenzija i oblika oka) i promenjenu stopu izleganja ili izostanak izleganja. Najveća toksičnost je zabeležena u slučaju vodenih sojeva *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1, pri čemu su registrovani efekti bili slični do sada opisanim efektima delovanja citotoksina cilindropermopsina na nivou embriona i larvi zebriće. Ekstrakti sojeva *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 i *Nostoc* LC1B su takođe ispoljili visoku toksičnost u testu, pri čemu su edemi perikardijalne duplje i skeletne malformacije bili najčešći i najizraženiji zabeleženi efekti.
- Rezultati istraživanja genske ekspresije na nivou model organizma *D. magna* su pružili novi uvid u ulogu gena vezanih za detoksikaciju, rast i reprodukciju u odgovoru jedinki date vrste na izlaganje potencijalno toksičnim metabolitima testiranih cijanobakterija. Geni uključeni u procese detoksikacije (*cyp360A8*, *gst* i *p-gp*) su se pokazali kao osetljivi molekularno-genetički indikatori toksičnosti cijanobakterija, s obzirom na to da su statistički značajne promene u njihovoj ekspresiji uočene nakon izlaganja ekstraktima sedam od ukupno deset testiranih cijanobakterijskih sojeva, dok istovremeno na nivou čitavog organizma vrste *D. magna* nisu zabeleženi toksični efekti. Registrovane dozno-zavisne promene u ekspresiji ovih specifičnih gena ukazali su na to da su metabolički putevi uključeni u detoksikaciju ksenobiotika i biosintezu ekdizona bili izmenjeni u izloženim organizmima. Zabeležene su takođe i značajne promene u ekspresiji gena *cyp314*, koje zahtevaju dalja istraživanja i potvrdu poremećaja u procesu presvlačenja i rasta, uspostavljanjem veze između promena u ekspresiji gena i posledica na višim nivoima biološke organizacije.
- Dobijeni rezultati relativnih promena u ekspresiji ciljnih gena kod model organizma *D. rerio*, ukazali su na to da odabrani genski markeri mogu biti relevantni u predikciji uticaja cijanobakterijske toksičnosti i ranom prepoznavanju njenih efekata kod akvatičnih

kičmenjaka. Značajne promene su primećene u ekspresiji gena uključenih u signalne puteve metabolizma ksenobiotika (*ahr2*, *cyp1A1* i *abcb4*) i indikatora ER stresa (*bip*). Konstatovani su statistički značajni efekti cijanobakterijskih sojeva *Anabaena* Č2, *Anabaena* Č5, *Nostoc* Z1 i *Oscillatoria* K3, koji su se ogledali u uticaju njihovih ekstrakata na enzime prve faze procesa detoksikacije. Zabeležena je statistički značajna indukcija *abcb4* gena nakon izlaganja ekstraktima sojeva *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Nostoc* LC1B, *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1, što ukazuje na aktivaciju *p-gp* posredovanog multiksenobiotičkog mehanizma rezistencije. Kako su slični efekti primećeni kod jedinki *D. magna*, ovi rezultati ukazuju na moguću umešanost istog mehanizma eliminacije toksičnih cijanobakterijskih jedinjenja kod oba model organizma. Takođe, promene u ekspresiji gena *vtg1* nakon izlaganja ekstraktima sojeva roda *Anabaena* ukazuju na moguću produkciju jedinjenja sa estrogenim efektom kod ovog roda.

- Rezultati analize uticaja cijanobakterijskih sojeva na relativnu ekspresiju odabranih gena kod beskičmenjačkog (*D. magna*) i kičmenjačkog (*D. rerio*) model organizma govore u prilog tome da je većina testiranih sojeva u oba slučaja narušila homeostazu datih organizama ispoljavajući efekat pre svega na procese uključene u detoksikaciju i metabolizam ksenobiotika.
- U akutnom testu *A. salina* registrovan je toksičan efekat svih testiranih sojeva. Najveću toksičnost su ispoljili akvatični sojevi *M. aeruginosa* PCC 7806, *Oscillatoria* DTD-Bečej, *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1, dok su najmanju toksičnost pokazali sojevi *Nostoc* 2S1 i *Nostoc* 2S3B.
- Ispitivanjem uticaja koncentracije nutrijenata esencijalnih za rast cijanobakterija na toksičnost testiranih sojeva, utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije azota i toksičnosti sojeva. Rezultati su jasno pokazali da je većina sojeva ispoljila veću toksičnost kada su gajeni u azotom bogatijem okruženju, što ukazuje na značaj ovog organogenog elementa za procese sinteze toksičnih metabolite kod testiranih sojeva.
- U uslovima optimalnih koncentracija azota, utvrđeno je da dostupna količina fosfora ima stimulativan efekat na toksičnost većine ispitanih sojeva sve do praga od 0.04 g L<sup>-1</sup>, nakon čega nisu primećene značajne promene. Ovi rezultati ukazuju na to da ispitivani sojevi ispoljavaju najveću toksičnost pri koncentracijama fosfora koje se smatraju optimalnim za rast cijanobakterija.
- Rezultati istraživanja efekta svetlosnog režima na toksičnost testiranih cijanobakterija pružaju prvi dokaz o postojanju veze između perioda osvetljenosti i ispoljene toksičnosti ka akvatičnim organizmima. Primećene su sličnosti u odgovoru sojeva koji pripadaju istom cijanobakterijskom rodu na produženo izlaganje svetlosti tokom kultivacije (duže od 12h). Ovi rezultati naglašavaju važnost svetlosti kao abiotičkog faktora koji može značajno uticati na sintezu toksičnih jedinjenja kod cijanobakterijskih sojeva prisutnih u životnoj sredini, kao i na potrebu za daljim istraživanjem mehanizama koji leže u osnovi ovih efekata.

- Ispitivanjem uticaja faze rasta na toksičnost cijanobakterija konstatovano je da je najveća toksičnost zabeležena u slučaju ekstrakata većine sojeva dobijenih nakon 21 i 35 dana kultivacije, odnosno nakon ulaska u stacionarnu fazu i tokom trajanja stacionarne faze rasta. Rezultati su potvrdili da se kod takvih testiranih sojeva najintenzivnija produkcija toksičnih metabolita dešava tokom stacionarne faze rasta. Utvrđeno je takođe značajno progresivno povećanje toksičnosti svih sojeva roda *Oscillatoria* tokom eksponencijalne i nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta, što implicira kontinuiranu produkciju toksičnih jedinjenja tokom sve tri faze rasta u slučaju sojeva ovog roda.
- Analizom uticaja cijanobakterijskih ekstrakata na humane ćelije neuroblastoma, utvrđena je dozno zavisna citotoksičnost većine ispitivanih sojeva, pri čemu je toksičnost veća od 50% konstatovana samo u slučaju najviše primenjene koncentracije ekstrakata četiri soja. Zabeležena je takođe varijabilnost u odgovoru ćelija na produženo vreme ekspozicije, gde je toksičnost sojeva roda *Nostoc* opadala sa dužim izlaganjem ćelija, dok su se efekti sojeva rodova *Oscillatoria* i *Anabaena* intenzivirali nakon 72h izlaganja. Ova pravilnost ukazuje na drugačiji sastav ekstrakata sojeva u odnosu na pripadnost rodu i na drugačiji mehanizam njihovog toksičnog delovanja na nivou ispitivanih ćelija. Takođe, dobijeni rezultati ističu važnost izlaganja testirane ćelijske linije toksinima cijanobakterija tokom dužeg vremenskog perioda u cilju identifikacije hroničnih neurotoksičnih efekata na ćelijskom nivou.
- Primenom ELISA testa, utvrđen je veoma nizak sadržaj MC-LR ekvivalenata u ekstraktima većine ispitivanih sojeva. Takvi rezultati sugerišu da se mikrocistinima i nodularinima ne može pripisati odgovornost za ispoljenu toksičnost sojeva u primenjenim biotestovima, već da su za to zaslužna toksična jedinjenja drugog tipa. Određena koncentracija ekvivalenata mikrocistina je pored soja *M. aeruginosa* PCC 7806 ( $>2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) detektovana samo još u ekstraktima soja *Nostoc* LC1B ( $0.084 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).
- Na osnovu rezultata bioinformatičke analize sekvenciranih genoma utvrđena je izuzetna raznolikost metaboličkih puteva analiziranih sojeva cijanobakterija. Klasteri gena za biosintezu mikrocistina (*mcyA*, *B*, *C* i *H*) su detektovani isključivo u genomu terestričnog soja *Nostoc* LC1B, što je u skladu sa rezultatima dobijenim ELISA testom. Takođe, u genomima vodenih sojeva *Oscillatoria* K3 i *Oscillatoria* Z1 otkriveno je sa značajnom pokrivenošću prisustvo biosintetskog genskog klastera za produkciju citotoksina cilindropermopsina. Analizom genoma ostalih testiranih sojeva cijanobakterija sa područja Srbije utvrđeno je da ih karakteriše postojanje genskih klastera za produkciju specifičnih toksičnih jedinjenja (anabenopeptin, mikroviridin J, mikroviridin N9, jamajkamid A, scitociklamid A, nostoklid N9, heptohlorin i puvainaficin F) koji ne pripadaju najznačajnijim grupama cijanotoksina. U cilju potvrde produkcije identifikovanih toksičnih metabolita, kao i boljeg razumevanja njihove aktivnosti neophodna su dalja ispitivanja i primena proteomske i metabolomske analize.
- Rezultati genomske analize formirane kolekcije sekvenci genoma testiranih sojeva pružaju dragocen uvid u njihov metabolički potencijal i ukazuju na to da bi primena odgovarajućih bioinformatičkih alatki i pristupa trebalo da ide u pravcu primene

hibridnog modela u sklapanju genoma u cilju preciznije i pouzdanije identifikacije klastera odgovornih za biosintezu toksičnih metabolita kod cijanobakterija. Sekvenciranje čitavih genoma testiranih sojeva predstavlja značajan doprinos ove doktorske disertacije sa aspekta formiranja kolekcije sekvenci genoma autohtonih vodenih i zemljišnih sojeva cijanobakterija izolovanih sa područja Republike Srbije, predstavljajući prva takva istraživanja na ovim prostorima. S obzirom na to da na svetskom nivou postoji stalna potreba za dopunjavanjem genomskih baza cijanobakterija novim sekvencama, rezultati ovih istraživanja će značajno doprineti dostupnosti novih 9 sekvenciranih genoma koji pripadaju rodovima *Anabaena*, *Nostoc* i *Oscillatoria*.

## 6. Literatura

1. Abdallah, M.F., Van Hassel, W.H.R., Andjelkovic, M., Wilmotte, A., Rajkovic, A., 2021. Cyanotoxins and Food Contamination in Developing Countries: Toxins (Basel) 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins13110786>
2. Abel, J., Haarmann-Stemann, T., 2010. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 391, 1235–1248. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.128>
3. Adelman, W.J.Jr., Fohlmeister, J.F., Sasner, J.J., Ikawa, M., 1982. Sodium channels blocked by aphantoxin obtained from the blue-green alga, *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 20, 513–516.
4. Akbar, M.A., Yusof, N.Y.M., Tahir, N.I., Ahmad, A., Usup, G., Sahrani, F.K., Bunawan, H., 2020. Biosynthesis of saxitoxin in marine dinoflagellates: An omics perspective. *Mar Drugs* 18, 1–24. <https://doi.org/10.3390/md18020103>
5. Akin-Oriola, G.A., Lawton, L.A., 2006. The Detection and Quantification of Cyanobacterial Toxins in Water Using the Brine Shrimp (*Artemia salina*) Assay. *West Africa Journal of Applied Ecology* 9, 1–6.
6. Aksakal, F.I., Arslan, H., 2020. Detoxification and reproductive system-related gene expression following exposure to Cu(OH)<sub>2</sub> nanopesticide in water flea (*Daphnia magna* Straus 1820). *Environmental Science and Pollution Research* 27, 6103–6111. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07414-x>
7. Alvarenga, D.O., Fiore, M.F., Varani, A.M., 2017. A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. *Front Microbiol* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00809>
8. Amaral, S. C. Do, Monteiro, P. R., Neto, J. da S. P., Serra, G. M., Gonçalves, E. C., Xavier, L. P., & Santos, A. V., 2021. Current Knowledge on Microviridin from Cyanobacteria. In *Marine Drugs*, Vol. 19, Issue 1. MDPI. <https://doi.org/10.3390/MD19010017>
9. Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A., 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.068>
10. Andeden, E.E., Ozturk, S., Aslim, B., 2019. Antiproliferative, neurotoxic, genotoxic and mutagenic effects of toxic cyanobacterial extracts. *Interdiscip Toxicol* 11, 267–274. <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0026>
11. Anderson, D.M., 2017. and management 143–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081121>. *Progress*
12. Andrews, S., 2010. A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Bioinformatics*.
13. Aranda-Rodriguez, R., Jin, Z., Harvie, J., Cabecinha, A., 2015. Evaluation of three field test kits to detect microcystins from a public health perspective. *Harmful Algae* 42, 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2015.01.001>
14. Arukwe, A.; Goksøyr, A. Eggshell and Egg Yolk Proteins in Fish: Hepatic Proteins for the next Generation: Oogenetic, Pop-ulation, and Evolutionary

- Implications of Endocrine Disruption. *Comp. Hepatol.* 2003, 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-4>.
15. ARTTOXKIT 1995. Crustacean Toxicity Screening Test for saline water. SOP, Standard Operation Procedure. Creasel, Belgium.
  16. Asselman, J., De Coninck, D.I.M., Glaholt, S., Colbourne, J.K., Janssen, C.R., Shaw, J.R., De Schamphelaere, K.A.C., 2012. Identification of pathways, gene networks, and paralogous gene families in daphnia pulex responding to exposure to the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Environ Sci Technol* 46, 8448–8457. <https://doi.org/10.1021/es301100j>
  17. Babalola, O.O., 2014. Molecular techniques : An overview of methods for the detection of bacteria. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1127>
  18. Bain, P., Shaw, G., Patel, B., 2007. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 70, 1687–1693. <https://doi.org/10.1080/15287390701434877>
  19. Banker, R., Carmeli, S., 1998. Tenucyclamides A–D, cyclic hexapeptides from the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* var. *Tenue*. *J. Nat. Prod.*, 61, 1248–1251.
  20. Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., 2010. Uracil Moiety is Required for Toxicity of the Cyanobacterial Hepatotoxin Cylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 281–288.
  21. Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., Carmeli, S., 2000. 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J Nat Prod* 63, 387–389. <https://doi.org/10.1021/np990498m>
  22. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
  23. Bao, S., Pan, B., Wang, L., Cheng, Z., Liu, X., Zhou, Z., Nie, X., 2020. Adverse effects in *Daphnia magna* exposed to e-waste leachate: Assessment based on life trait changes and responses of detoxification-related genes. *Environ Res* 188, 109821. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109821>
  24. Battchikova, N., Muth-Pawlak, D., Aro, E., 2018. Proteomics of cyanobacteria: current horizons. *Current Opinion in Biotechnology*, 54, 65-71.
  25. Bengtsson, L., Herschy, R.W., Fairbridge, R.W., 2012. Encyclopedia of Lakes and Reservoirs. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6>
  26. Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J., 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms 314–325. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110>
  27. Berry, J.P., Gibbs, P.D.L., Schmale, M.C., Saker, M.L., 2009. Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis*

- raciborskii and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicol* 53, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.11.016>
28. Beversdorf, L.J., Chaston, S.D., Miller, T.R., McMahon, K.D., 2015. Microcystin mcyA and mcyE gene abundances are not appropriate indicators of microcystin concentrations in lakes. *PLoS One* 10, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125353>
  29. Bieczynski, F., Paineofilú, J.C., Venturino, A., Luquet, C.M., 2021. Expression and Function of ABC Proteins in Fish Intestine. *Front Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.791834>
  30. Biedler, J.L., Helson, L., Spengler, B.A., 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33, 2643–2652.
  31. Bingham, E.C., B. Cohrssen, and F.A. Patty. 2012. "Patty's Toxicology", 5th edn, Wiley Press, New York.
  32. Blagojević, D., Babić, O., Rašeta, M., Šibul, F., Janjušević, L., Simeunović, J., 2018. Antioxidant activity and phenolic profile in filamentous cyanobacteria: the impact of nitrogen. *J Appl Phycol* 30, 2337–2346. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1476-4>
  33. Blagojević, D.; Babić, O.; Kaišarević, S.; Stanić, B.; Mihajlović, V.; Davidović, P.; Marić, P.; Smital, T.; Simeunović, J. Evaluation of Cyanobacterial Toxicity Using Different Biotests and Protein Phosphatase Inhibition Assay. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021, 28, 49220–49231.
  34. Bláha, L., Cameán, A.M., Fessard, V., Gutiérrez-Praena, D., Jos, Á., Marie, B., Metcalf, J.S., Pichardo, S., Puerto, M., Törökné, A., Vasas, G., Žegura, B., 2017. Bioassay Use in the Field of Toxic Cyanobacteria. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 272–279. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch27>
  35. Bláhová, L., Oravec, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., Šimek, Z., Bláha, L., 2009. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicol* 53, 519–524. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.01.014>
  36. Blaženčić, J., 1998. *Sistematika algi*, in: Donceev, N. (Ed.), *Sistematika Algi*. Naučna Knjiga, Beograd, Jugoslavija.
  37. Boaru, D.A., Dragoş, N., Schirmer, K., 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology* 218, 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.005>
  38. Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
  39. Bonneau, B., Popgeorgiev, N., Prudent, J., Gillet, G., 2011. Cytoskeleton dynamics in early zebrafish development. *Bioarchitecture* 1, 216–220. <https://doi.org/10.4161/bioa.18116>
  40. Boqiang, Q.I.N., Guang, G.A.O., Guangwei, Z.H.U., Yunlin, Z., Yuzhi, S., Xiangming, T., Hai, X.U., Jianming, D., 2013. Lake eutrophication and its



- ecosystem response 58, 961–970. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5560-x>
41. Bormans, M., Visser, P.M., 2016. Cyanobacterial blooms . Ecology , prevention , mitigation and control : Editorial to a CYANOCOST Special Issue. *Aquat Ecol* 50, 327–331. <https://doi.org/10.1007/s10452-016-9595-y>
  42. Botana, L.M., Alfonso, A., 2015. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons.
  43. Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., Van De Venter, M., Shephard, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.10.025>
  44. Böttcher, G., Chorus, I., Ewald, S., Hintze, T., Walz, N., 2001. Light-limited growth and microcystin content of *Planktotrix agardhii* and *Microcystis aeruginosa* in turbidostats, in: *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Germany, pp. 115–133.
  45. Bouaïcha, N., Miles, C.O., Beach, D.G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N.Y., Nguyen-quang, T., 2019. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins Nouredine. *Toxins (Basel)* 11, 714.
  46. Bower, D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A., Howden, M.E.H., 1981. Nonprotein neurotoxins. *Clin Toxicol* 18, 813–863. <https://doi.org/10.3109/15563658108990310>
  47. Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2003. Review article West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 34, 467–483. <https://doi.org/10.1051/vetres>
  48. Buchmann, A., Wannemacher, R., Kulzer, E., Buhler, D.R., Bock, K.W., 1993. Immunohistochemical Localization of the Cytochrome P450 Isozymes LMC2 and LM4B (P4501A1) in 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Treated Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol* 123, 160–169.
  49. Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol* 91, 1049–1130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
  50. Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays 169–193.
  51. Byth S., 1980. Palm Island mystery disease. *Med. J. Aust.* 2: 40–42.
  52. Calteau, A., Fewer, D.P., Latifi, A., Coursin, T., Laurent, T., Jokela, J., Kerfeld, C.A., Sivonen, K., Piel, J., Gugger, M., 2014. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. *BMC Genomics* 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-977>
  53. Campbell, D.L., Lawton, L.A., Beattie, K.A., Codd, G.A., 1994. Comparative Assessment of the Specificity of the Brine Shrimp and Microtox Assays to Hepatotoxic ( Microcystin-LR-Containing ) Cyanobacteria 9, 71–77.
  54. Campbell, E.L., Meeks, J.C., 1989. Characteristics of hormogonia formation by symbiotic nostoc spp. in response to the presence of *Anthoceros punctatus* or its extracellular products. *Appl Environ Microbiol* 55, 125–131. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.125-131.1989>

55. Campbell, K., Huet, A.C., Charlier, C., Higgins, C., Delahaut, P., Elliott, C.T., 2009. Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography B* 877, 4079–4089. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2009.10.023>
56. Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int J Mol Sci* 11, 268–287. <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>
57. Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x>
58. Carmichael, W.W., Azevedo, S.M., An, J.S., Molica, R.J., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Per*; 109:663–668.
59. Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G., 1990. Natural Toxins from Cyanobacteria (Blue-Green Algae), in: *Marine toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*. pp. 87–106.
60. Carvalho, L., McDonald, C., de Hoyos, C., Mischke, U., Phillips, G., Borics, G., Poikane, S., Skjelbred, B., Solheim, A.L., Van Wichelen, J., Cardoso, A.C., 2013. Sustaining recreational quality of European lakes: Minimizing the health risks from algal blooms through phosphorus control. *Journal of Applied Ecology* 50, 315–323. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12059>
61. Cassier-Chauvat, C., Blanc-Garin, V., & Chauvat, F., 2021. Genetic, genomics, and responses to stresses in cyanobacteria: Biotechnological implications. *Genes*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040500>
62. Castenholz, R.W., 2015. General Characteristics of the Cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1–23. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019>
63. Colbourne, J.K., Singan, V.R., Gilbert, D.G., 2005. WFleaBase: The Daphnia Genome Database. *BMC Bioinformatics*, 6, 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-45>.
64. Chaffin, J.D., Davis, T.W., Smith, D.J., Baer, M.M., Dick, G.J., 2018. Interactions between nitrogen form, loading rate, and light intensity on *Microcystis* and *Planktothrix* growth and microcystin production. *Harmful Algae* 73, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.02.001>
65. Chaumot, A., Ferrari, B., Geffard, O., Garric, J., 2014. *Ecotoxicology, Aquatic Invertebrates*, Third Edit. ed, *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00498-X>
66. Chen, H., Burke, J., Prepas, E., 2011. Cyanobacterial Toxins in Fresh Waters. *Journal of Hazardous Materials* 860–871.
67. Chen, H., Lin, C., Wang, T.M., 1996. Effects of 4-Aminopyridine on Saxitoxin Intoxication 48, 44–48.
68. Chen, Y.B., Dominic, B., Mellon, M.T., Zehr, J.P., 1998. Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain IMS 101. *J. Bacteriol.* 180(14):3598–605. doi: 10.1128/JB.180.14.3598-3605.1998.

69. Chen, J., Xie, P., 2005. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon* 45, 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.003>
70. Chen, T., Cui, J., Liang, Y., Xin, X., Owen Young, D., Chen, C., Shen, P., 2006. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology* 220, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.12.001>
71. Chen, W., Song, L., Ou, D., Gan, N., 2005. Chronic Toxicity and Responses of Several Important Enzymes in *Daphnia magna* on Exposure to Sublethal Microcystin-LR. *Canadian Metallurgical Quarterly* 44, 323–330. <https://doi.org/10.1002/tox.20108>
72. Cherubin, P., Quinones, B., Teter, K., 2018. Cellular recovery from exposure to sub-optimal concentrations of AB toxins that inhibit protein synthesis. *Scientific Reports*, 8: 2494. doi: 10.1038/s41598-018-20861-9
73. Chernoff, N., Hill, D., Lang, J., Schmid, J., Le, T., Farthing, A., Huang, H., 2020. The comparative toxicity of 10 microcystin congeners administered orally to mice: Clinical effects and organ toxicity. *Toxins (Basel)* 12, 1–18. <https://doi.org/10.3390/toxins12060403>
74. Chorus, I., Bartram, J., 1999a. *Toxic Cyanobacteria in Water - A guide to their public health, consequences, monitoring and management*. CRC Press.
75. Chorus, I., Bartram, J., 1999b. *Toxic Cyanobacteria in Water - A guide to their public health, consequences, monitoring and management*. CRC Press.
76. Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 3, 323–347. <https://doi.org/10.1080/109374000436364>
77. Chorus, I., Schauser, I., 2011. *Oligotrophication of Lake Tegel and Schlachtensee*, Berlin. Umweltbundesamt 1–179.
78. Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E., 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol* 185, 564–572. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.564-572.2003>
79. Claska, M.E., Gilbert, J.J., 1998. The effect of temperature on the response of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. *Freshw Biol* 39, 221–232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1998.00276.x>
80. Codd, G.A., 1995. Cyanobacterial Toxins: Occurrence, Properties and Biological Significance. *Water Science and Technology* 32, 149–156. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00692-3](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00692-3)
81. Codd, G.A., Poon, G.K., 1988. Cyanobacterial toxins. *Proc. Phytochem. Soc. Europe* 28, 283–296.
82. Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2008. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. *Toxicon* 52, 936–943. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.09.005>
83. Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation

- in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056>
84. Cox, K.L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Manetta, J., Montrose, C., Sittampalam, S. *Immunoassay Methods*. 2012 May 1. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanarayan V, Foley TL, Glicksman M, Gorshkov K, Haas JV, Hall MD, Hoare S, Inglese J, Iversen PW, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Sittampalam GS, Tarselli M, Trask OJ Jr, Wang Y, Weidner JR, Wildey MJ, Wilson K, Xia M, Xu X, editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. PMID: 22553884. Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13380–13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235808100>.
  85. Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5074–5078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501526102>.
  86. Cullen, A., Jordan, M., Neilan, B.A., 2022. Expression of Cyanobacterial Biosynthetic Gene Clusters in *Escherichia coli*, in: Skellam, E. (Ed.), *Engineering Natural Product Biosynthesis*. Humana Press, Denton, USA, pp. 75–92. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2273-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2273-5_5).
  87. Dao, T.S.; Do-Hong, L.C.; Wiegand, C., 2010. Chronic Effects of Cyanobacterial Toxins on *Daphnia magna* and Their Offspring. *Toxicon*, 55, 1244–1254. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.014>
  88. D'Agostino, P.M., Woodhouse, J.N., Makower, A.K., Yeung, A.C.Y., Ongley, S.E., Micallef, M.L., Moffitt, M.C. and Neilan, B.A., 2016. Advances in -omics of toxin-producing cyanobacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 8: 3-13. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12366>
  89. Damerval, T., Guglielmi, G., Houmard, J., Tandeau De Marsac, N., 1991. Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium *Calothrix*: A Photoregulated Developmental Process, *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists.
  90. Davidović, P., Blagojević, D., Babić, O., Simeunović, J., 2019. The influence of nitrogen and growth phase on the toxicity of the cyanobacterial strain *Microcystis* PCC 7806. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences* 89–100.
  91. Davidović, P. G., Blagojević, D. J., Lazić, G. G., & Simeunović, J. B., 2022. Gene expression changes in *Daphnia magna* following waterborne exposure to cyanobacterial strains from the genus *Nostoc*. *Harmful Algae*, 115(December 2021), 102232. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102232>
  92. Davidović, P., Blagojević, D., Meriluoto, J., Simeunović, J., Svirčev, Z., 2023. Biotests in Cyanobacterial Toxicity Assessment - Efficient Enough or Not? *Biology*, 12, no. 5: 711. <https://doi.org/10.3390/biology12050711>

93. Davis, T.W., Harke, M.J., Marcoval, M.A., Goleski, J., Orano-Dawson, C., Berry, D.L., Gobler, C.J., 2010. Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology* 61, 149–162. <https://doi.org/10.3354/ame01445>.
94. De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D.T., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2018. NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* 34, 2666–2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>
95. Delaney, J.M., Wilkins, R.M., 1995. Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon* 33, 771–778
96. DeMott, W.R., Zhang, Q.-X., Carmichael, W.W., 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr* 36, 1346–357. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.7.1346>
97. Denison, M.S., Soshilov, A.A., He, G., Degroot, D.E., Zhao, B., 2011. Exactly the same but different: Promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological Sciences* 124, 1–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr218>
98. Devic, E., Li, D., Dauta, A., Henriksen, P., Codd, G.A., Marty, J.L., Fournier, D., 2002. Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterases. *Appl Environ Microbiol* 68, 4102–4106. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4102-4106.2002>
99. Devlin, J.P., Edwards, E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K., Stavric, B., 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *AnabaenaEos-aquae* NRC-44h1. *Can J Chem* 55, 1–5.
100. Dias, E., Louro, H., Pinto, M., Santos, T., Antunes, S., Pereira, P., Silva, M.J., 2014. Genotoxicity of microcystin-LR in in vitro and in vivo experimental models. *Biomed Res Int* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/949521>
101. Dietrich, D., Hoeger, S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): A reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 273–289. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.005>
102. Ding, R., Liu, S., He, C., Nie, X., 2020. Paracetamol affects the expression of detoxification- and reproduction-related genes and alters the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 29, 398–406. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02199-z>
103. Dittmann, E., Börner, T., 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.008>
104. Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., 2013. Cyanobacterial toxins: Biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Rev* 37, 23–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x>

105. Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins - Occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res* 50, 7–17. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500162>
106. Djediat, C., Moyenga, D., Malécot, M., Comte, K., Yéprémian, C., Bernard, C., Puiseux-Dao, S., Edery, M., 2011. Oral toxicity of extracts of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix agardhii* to the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Toxicon* 58, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.011>
107. Dodds, W.K., Gudder, D.A., Mollenhauer, D., 1995. the Ecology of *Nostoc*. *J Phycol* 31, 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00002.x>
108. Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., Wiedner, C., 2012. Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>
109. Downing, T.G., Meyer, C., Gehringer, M.M., Van De Venter, M., 2005. Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environ Toxicol* 20, 257–262. <https://doi.org/10.1002/tox.20106>
110. Drobac, D., 2015. Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima i njihov utiaj na zdravlje. Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad. , Novi Sad.
111. Drobac, D., Tokodi, N., Simeunović, J., Baltić, V., Stanić, D., Svirčev, Z., 2013. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. *Arh Hig Rada Toksikol* 64, 305–316. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2320>
112. Duracova, M., 2018. Proteomic Methods of Detection and Quantification 1–30. <https://doi.org/10.3390/toxins10030099>
113. Erzinger, G.S., 2018. 1.1 Freshwater ecosystems 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00001-2>
114. Escher Beate and Frederic Leusch. 2012. Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment. IWA.
115. Esteves-ferreira, A.A., Inaba, M., Fort, A., Araújo, W.L., 2018. Critical Reviews in Microbiology Nitrogen metabolism in cyanobacteria : metabolic and molecular control , growth consequences and biotechnological applications. *Crit Rev Microbiol* 0, 1–20. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1446902>
116. Evans, M.H., 1972. Tetrodotoxin, Saxitoxin, and Related Substances: Their Applications in Neurobiology. *Int Rev Neurobiol* 15, 83–166. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60329-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60329-3)
117. Faassen, E.J., Lürling, M., 2013. Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. *Mar Drugs* 11, 2643–2654. <https://doi.org/10.3390/md11072643>
118. Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L., Lurling, M., 2012. First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic

- cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon*. 1;60(3):378-84. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.04.335. Epub 2012 Apr 17. PMID: 22534073.
119. Fastner, J., Beulker, C., Geiser, B., Hoffmann, A., Kröger, R., Teske, K., Hoppe, J., Mundhenk, L., Neurath, H., Sagebiel, D., 2018. Fatal Neurotoxicosis in Dogs Associated with Tycho planktic, Anatoxin-a Producing *Tychonema* sp. in Mesotrophic Lake Tegel, Berlin. *Toxins*. 10(2):60. <https://doi.org/10.3390/toxins10020060>
  120. Falconer, I.R., 1998. Algal Toxins and Human Health 5, 53–82. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-68089-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68089-5_4)
  121. Falconer, I.R., 2003. Cyanobacteria-Toxins in Drinking Water. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env025>
  122. Falconer, I.R., 2007. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB): State of the Science and Research Needs*.
  123. Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer, G.J., Hawkins, P.R., 1999. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss Albino mice. *Environ Toxicol* 14, 143–150. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<143:AID-TOX18>3.0.CO;2-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<143:AID-TOX18>3.0.CO;2-H)
  124. Falfushynska, H., Horyn, O., Osypenko, I., Rzymyski, P., Wejnerowski, Ł., Dziuba, M.K., Sokolova, I.M., 2021. Multibiomarker-based assessment of toxicity of central European strains of filamentous cyanobacteria *Aphanizomenon gracile* and *Raphidiopsis raciborskii* to zebrafish *Danio rerio*. *Water Res* 194, 116923. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116923>
  125. Faltermann, S., Hutter, S., Christen, V., Hettich, T., Fent, K., 2016a. Anti-inflammatory activity of cyanobacterial serine protease inhibitors aeruginosin 828A and cyanopeptolin 1020 in human hepatoma cell line Huh7 and effects in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxins (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8070219>
  126. Faltermann, S., Hutter, S., Christen, V., Hettich, T., Fent, K., 2016b. Anti-inflammatory activity of cyanobacterial serine protease inhibitors aeruginosin 828A and cyanopeptolin 1020 in human hepatoma cell line Huh7 and effects in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxins (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8070219>
  127. Faltermann, S., Zucchi, S., Kohler, E., Blom, J.F., Pernthaler, J., Fent, K., 2014. Molecular effects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms: Global transcriptome analysis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 149, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.018>
  128. Fattorusso, E., Tagliatalata-Scafati, O., 2007. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.

129. Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Hill, R.E., Everett, D.J., 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse; II anatoxin-a. *Hum Exp Toxicol* 18, 168–173. <https://doi.org/10.1177/096032719901800306>
130. Ferrão-filho, A.S., da Costa, S.M., Leitao Ribeiro, M.G., 2008. Effects of a Saxitoxin-Producer Strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the Swimming Movements of Cladocerans. *Environ Toxicol* 165, 16. <https://doi.org/10.1002/tox>
131. Fessard, V., Bernard, C., 2003. Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environ Toxicol* 18, 353–359. <https://doi.org/10.1002/tox.10136>
132. Feuchtmayr, H., Moran, R., Hatton, K., Connor, L., Heyes, T., Moss, B., Harvey, I., Atkinson, D., 2009. Global warming and eutrophication: effects on water chemistry and autotrophic communities in experimental hypertrophic shallow lake mesocosms 713–723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01644.x>
133. Feurstein, Daniel, Kerstin Stemmer, Julia Kleinteich, Tobias Speicher, and Daniel R. Dietrich. 2011. “Microcystin Congener- and Concentration-Dependent Induction of Murine Neuron Apoptosis and Neurite Degeneration.” *Toxicological Sciences* 124 (2): 424–31. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr243>.
134. Fidor, A., Konkol, R., Mazur-Marzec, H., 2019. Bioactive peptides produced by cyanobacteria of the genus nostoc: A review. *Mar. Drugs* 17, 1–16. <https://doi.org/10.3390/md17100561>
135. Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A.-M., Wellner, P., Schirmer, K., Luckenbach, T., 2013. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.
136. Forchhammer, K., Selim, K.A., 2019. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 44, 33–53. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz025>
137. Francis, G., 1878. Poisonous Australian Lake. *Nature* 11–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/018011d0>
138. Frangeul, L., Quillardet, P., Castets, A.M., Humbert, J.F., Matthijs, H.C.P., Cortez, D., Tolonen, A., Zhang, C.C., Gribaldo, S., Kehr, J.C., Zilliges, Y., Ziemert, N., Becker, S., Talla, E., Latifi, A., Billault, A., Lepelletier, A., Dittmann, E., Bouchier, C., de Marsac, N.T., 2008. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *BMC Genomics* 9, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-274>
139. Frigg, R., Hartmann, S., 2020. Models in Science, in: Zalta, E.N. (Ed.), *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*. Metaphysics Research Lab, Stanford University.
140. Frosco, S. M., Cannon, E., Lau, H.M., Humpage, A.R., 2009. Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. *Toxicon* 54, 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.019>
141. Frosco, Suzanne M., Fanok, S., Humpage, A.R., 2009. Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Journal of*



- Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues 72, 345–349.  
<https://doi.org/10.1080/15287390802529906>
142. Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cylindrospermopsin-Induced Protein Synthesis Inhibition and Its Dissociation from Acute Toxicity in Mouse Hepatocytes 243–251.  
<https://doi.org/10.1002/tox.10121>
  143. Fu, W.Y., Chen, J.P., Wang, X.M., Xu, L.H., 2005. Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. *Toxicon* 46, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.021>
  144. Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froschio, S., Humpage, A.R., 2017. Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Res* 118, 227–238.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.04.025>
  145. Gajin, S., Čomić, Lj., Karaman, M., Simeunović, J., 2007. Ekologija mikroorganizama. Prirodno matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
  146. Gallagher, M.E., 2002. Toxicity Testing Requirements, Methods and Proposed Alternatives. *Environ* 26, 253–274.
  147. Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., Song, L., 2012. The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp . 14, 730–742. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02624.x>
  148. Garcia-Pichel, F., 2009. Cyanobacteria, in: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). San Diego State University, San Diego, CA, USA, pp. 107–124.
  149. Garcimartín, A., López-Oliva, M.E., González, M.P., Sánchez-Muniz, F.J., Benedí, J., 2017. Hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Redox Biol* 12, 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.004>
  150. Geffroy, S., Lechat, M.M., Le Gac, M., Rovillon, G.A., Marie, D., Bigeard, E., Malo, F., Amzil, Z., Guillou, L., Caruana, A.M.N., 2021. From the sxtA4 Gene to Saxitoxin Production: What Controls the Variability Among *Alexandrium minutum* and *Alexandrium pacificum* Strains? *Front Microbiol* 12, 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.613199>
  151. Gehringer, M.M., Adler, L., Roberts, A.A., Moffitt, M.C., Mihali, T.K., Mills, T.J.T., Fieker, C., Neilan, B.A., 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. *ISME Journal* 6, 1834–1847.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2012.25>
  152. Gehringer, M.M., Wannicke, N., 2014. Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 88, 1–25.  
<https://doi.org/10.1111/1574-6941.12291>
  153. Genuário, D.B., Silva-Stenico, M.E., Welker, M., Beraldo Moraes, L.A., Fiore, M.F., 2010a. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. *Toxicon* 55, 846–854. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.001>
  154. Genuário, D.B., Silva-Stenico, M.E., Welker, M., Beraldo Moraes, L.A., Fiore, M.F., 2010b. Characterization of a microcystin and detection of

- microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. *Toxicon* 55, 846–854. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.001>
155. Ghazali, I. El, Saqrane, S., Carvalho, A.P., Ouahid, Y., 2009. Compensatory Growth Induced in Zebrafish Larvae after Pre-Exposure to a *Microcystis aeruginosa* Natural Bloom Extract Containing Microcystins 133–146. <https://doi.org/10.3390/ijms10010133>
  156. Ginn, H.P., Pearson, L.A., Neilan, B.A., 2010. NtcA from *microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Appl Environ Microbiol* 76, 4362–4368. <https://doi.org/10.1128/AEM.01862-09>
  157. Giordano, D., Coppola, D., Russo, R., Denaro, R., Giuliano, L., Lauro, F.M., di Prisco, G., Verde, C., 2015. Marine Microbial Secondary Metabolites: Pathways, Evolution and Physiological Roles, 1st ed, *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2015.04.001>
  158. Goksøyr, 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution, in: Degen, G., Seiler, J., Bentley, P. (Eds.), *Toxicology in Transition*. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 80–95.
  159. Golakoti, T., Ogino, J., Heltzel, C., Le Husebo, T., Jensen, C., Larsen, L., Patterson, G., Moore, R., Mooberry, S., Corbett, T., Valeriot, F., 1995. Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 49.
  160. Gotham, I.J., 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton Light and the interactions of light with nitrate limitation1 growth: 26, 649–659.
  161. Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V.L., 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188, 285–296. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00112-4)
  162. Gustafsson, S., Hansson, L.A., 2004. Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquat Ecol* 38, 37–44. <https://doi.org/10.1023/B:AECO.0000020985.47348.5e>
  163. Gutiérrez-Praena, D., Guzmán-Guillén, R., Pichardo, S., Moreno, F.J., Vasconcelos, V., Jos, Á., Cameán, A.M., 2019. Cytotoxic and morphological effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin, and their combinations on the human hepatic cell line HepG2. *Environ Toxicol* 34, 240–251. <https://doi.org/10.1002/tox.22679>
  164. Guzman, R.E., Solter, P.F., Runnegar, M.T., 2003. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicon* 41, 773–781. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00030-8)
  165. Ha, M., Pflugmacher, S., 2013. Time-dependent alterations in growth, photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Aquatic Toxicology* 138–139, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.007>

166. Hamilton, T.L., Klatt, J.M., De Beer, D., Macalady, J.L., 2018. Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: Insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain *hensonii*. *ISME Journal* 12, 568–584. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.193>
167. Haney, J.F., Sasner, J.J., Ikawa, M., 1995. Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages 40, 263–272.
168. Hannas, B.R., Wang, Y.H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H., LeBlanc, G.A., 2011. Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquatic Toxicology* 101, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.006>
169. Harke, M.J., Gobler, C.J., 2013. Global Transcriptional Responses of the Toxic Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to Nitrogen Stress, Phosphorus Stress, and Growth on Organic Matter. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069834>
170. Harris, G., Eschment, M., Perez Orozco, S., McCaffery, J.M., MacLennan, R., Severin, D., Leist, M., Kleinsang, A., Pamies, D., Maertens, A., Hogberg, H.T., Freeman, D., Krikwood, A., Hartung, T., Smirnova, L., 2018. Toxicity, recovery, and resilience in a 3D dopaminergic neuronal in vitro model exposed to rotenone. *Archives of Toxicology*, 92, pp. 2587–2606. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2250-8>
171. Hawkins, P.R., Putt, E., Falconer, I., Humpage, A., 2001. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankton, *Cylindrospermopsis raciborskii* (nostocales, cyanophyceae) during batch culture. *Environ Toxicol* 16, 460–467. <https://doi.org/10.1002/tox.10005>
172. He, J., Chen, J., Xie, P., Zhang, D., Li, G., Wu, L., Zhang, W., Guo, X., Li, S., 2012. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystins through the glutathione and cysteine pathway in the cyanobacteria-eating bighead carp. *Aquatic Toxicology* 116–117, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.004>
173. He, X., Liu, Y., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L.K., Dionysiou, D.D., Lenhart, J.L., Mouser, P.J., Szlag, D., Walker, H.W., 2016. “Toxic Cyanobacteria and Drinking Water: Impacts, Detection, and Treatment.” *Harmful Algae* 54: 174–93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001>.
174. He, Z., Chen, Y., Huo, D., Gao, J., Xu, Y., Yang, R., Yang, Y., Yu, G., 2023. Combined methods elucidate the multi-organ toxicity of *Cylindrospermopsis* (CYN) on *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 324, 121250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121250>
175. He, L., Huang, Y., Guo, Q., Zeng, H., Zheng, C., Wang, J., Chen, J., Wang, L., Shu, W., 2018. Chronic microcystin-LR exposure induces hepatocarcinogenesis via increased gankyrin in vitro and in vivo. *Cell Physiol Biochem* 49:1420–1430. <https://doi.org/10.1159/000493446>
176. Hebert, P.D.N., Ward, R.D., 1972. Inheritance during parthenogenesis in *Daphnia magna*. *Genetics* 71, 639–642.

177. Hennon, G.M.M., Dyhrman, S.T., 2020. Progress and promise of omics for predicting the impacts of climate change on harmful algal blooms. *Harmful algae*, 91:101587. doi: 10.1016/j.hal.2019.03.005
178. Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Jos, Á., Cameán, A.M., Žegura, B., 2017. Genotoxic potential of the binary mixture of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin. *Chemosphere* 189, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.075>
179. Hercog, K., Štampar, M., Štern, A., Filipič, M., Žegura, B., 2020. Application of advanced HepG2 3D cell model for studying genotoxic activity of cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environmental Pollution* 265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114965>
180. Herrera, N., Herrera, C., Ortíz, I., Orozco, L., Robledo, S., Agudelo, D., Echeverri, F., 2018. Genotoxicity and cytotoxicity of three microcystin-LR containing cyanobacterial samples from Antioquia, Colombia. *Toxicon* 154, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.011>
181. Herrera, N.A., Echeverri, L.F., Ferrão-Filho, A.S., 2015. Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon* 95, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.12.016>
182. Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., 2001. Nitrogen Control in Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(2):411-425. doi: 10.1128/JB.183.2.411-425.2001
183. Hietala, J.; Reinikainen, M.; Walls, M., 1995. Variation in Life History Responses of *Daphnia* to Toxic *Microcystis aeruginosa*. *J. Plank-ton Res.*, 17, 2307–2318. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.12.2307>
184. Hicks, L.M., Moffitt, M.C., Beer, L.L., Moore, B.S., Kelleher, N.L., 2006. Structural characterization of in vitro and in vivo intermediates on the loading module of microcystin synthetase. *ACS Chem Biol* 1, 93–102. <https://doi.org/10.1021/cb500007v>
185. Higgins, C.F., 1992. ABC TRANSPORTERS: From Microorganisms to Man, *Annu. Rev. Cell Biol.*
186. Hinojosa, M.G., Cascajosa-Lira, A., Prieto, A.I., Gutiérrez-Praena, D., Vasconcelos, V., Jos, A., Cameán, A.M., 2023. Cytotoxic Effects and Oxidative Stress Produced by a Cyanobacterial Cylindrospermopsin Producer Extract versus a Cylindrospermopsin Non-Producing Extract on the Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line. *Toxins (Basel)* 15. <https://doi.org/10.3390/toxins15050320>
187. Hinojosa, M.G., Prieto, A.I., Gutiérrez-Praena, D., Moreno, F.J., Cameán, A.M., Jos, A., 2019. Neurotoxic assessment of Microcystin-LR, cylindrospermopsin and their combination on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere* 224, 751–764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.173>
188. Hofseth, L.J., Hussain, P.S., Harris, C.C., 2004. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25, 0–181. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.010>

189. Holland, A., Kinnear, S., 2013. Compounds for Competitive Advantage and / or 2239–2258. <https://doi.org/10.3390/md11072239>
190. Holland, H.D., 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 903–915. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1838>
191. Holt, J.G., Riet, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, A Wawerly Comp.
192. Horst, G.P., Sarnelle, O., White, J.D., Hamilton, S.K., Kaul, R.R.B., Bressie, J.D., 2014. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Res* 54, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.063>
193. Houde, M., Carter, B., Douville, M., 2013. Sublethal effects of the flame retardant intermediate hexachlorocyclopentadiene (HCCPD) on the gene transcription and protein activity of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 140–141, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.008>
194. Hoiczyc E., Hansel A., 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol. Mar*;182(5):1191-9. doi: 10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000. PMID: 10671437; PMCID: PMC94402.
195. Howarth, R.W., Marino, R., Cole, J.J., 1988. Nitrogen fixation in freshwater , estuarine , and marine 33, 688–701.
196. Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., White, S., Chow, W., Kilian, B., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-king, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., Mclay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., Mcguire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 2–8. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

197. Hu, W., Sorrentino, C., Denison, M.S., Kolaja, K., Fielden, M.R., 2007. Induction of Cyp1a1 is a nonspecific biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: Results of large-scale screening of pharmaceuticals and toxicants in vivo and in vitro. *Mol Pharmacol* 71, 1475–1486. <https://doi.org/10.1124/mol.106.032748>
198. Hu, Y., Chen, J., Fan, H., Xie, P., He, J., 2016. A review of neurotoxicity of microcystins. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 7211–7219. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6073-y>
199. Hudnell, H.K., 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs, *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7>
200. Humpage, A., Water, A., Centre, Q., 2005. Chapter 16: Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics 4.
201. Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 472, 155–161. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00144-3)
202. Hyde, E.G., Carmichael, W.W., 1991. Anatoxin-A (S), a Naturally Occurring 6, 195–201.
203. IARC. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. International Agency for Research on Cancer IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 94. Lyon: IARC; 2006.
204. Ibelings, B.W., Backer, L.C., Kardinaal, W.E.A., Chorus, I., 2015. Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment and Risk Management around the Globe. *Harmful Algae*, 49 (3): 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
205. ISO 7346-1:1996, n.d. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 1: Static method.
206. ISO (the International Organization for Standardization), 2011. Water quality — Determination of the acute toxicity to *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca) Qualité, ISO 14380:2011(E).
207. Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., Harada, K. ichi, 2002. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40, 1017–1025. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00099-5)
208. Jaja-Chimedza, A., Sanchez, K., Gantar, M., Gibbs, P., Schmale, M., Berry, J.P., 2017. Carotenoid glycosides from cyanobacteria are teratogenic in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. *Chemosphere* 174, 478–489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.145>
209. Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.R., Sticher, O., 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm Biol* 37, 138–143. <https://doi.org/10.1076/phbi.37.2.138.6092>

210. Jang, M., Ha, K., Joo, G.-J., Takamura, N., 2003. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshw Biol* 48, 1540–1550.
211. Janssen, E.M.L., 2019. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Res* 151, 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>
212. Jeffrey, A.M., Liskamp, R.M.J., 1986. Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: Rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B, and aplysiatoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 241–245. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.2.241>
213. Jellet, J.F., Stewart, J.E., Laycock, M.V., 1995. Toxicological Evaluation of Saxitoxin, Neosaxitoxin, Gonyautoxin II, Gonyautoxin II plus III and Decarbamoylsaxitoxin with the Mouse Neuroblastoma Cell Bioassay. *Science* (1979) 9.
214. Ji, W., Liang, H., Zhou, W., Zhang, X., 2013. Apoptotic responses of zebrafish (*Danio rerio*) after exposure with microcystin-LR under different ambient temperatures. *Journal of Applied Toxicology* 33, 799–806. <https://doi.org/10.1002/jat.2735>
215. Jokela, J., Heinilä, L.M.P., Shishido, T.K., Wahlsten, M., Fewer, D.P., Fiore, M.F., Wang, H., Haapaniemi, E., Permi, P., Sivonen, K., 2017. Production of high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitors pseudospumigins by the brazilian benthic nostoc sp. CENA543. *Front Microbiol* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01963>
216. Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9252–9257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914417107>
217. Jones, M., Frideres, A., Kramer, B., 2018. Forecasting Algal Bloom Lags and Stability in a Watershed 352–368.
218. Jonge, V.N. De, Elliott, M., Orive, E., 2002. Causes, historical development , effects and future challenges of a common environmental problem : eutrophication 1–19.
219. Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production 35, 1–9.
220. Kaebernick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., Neilan, B.A., 2001. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: Genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environ Microbiol* 3, 669–679. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00241.x>
221. Kaisarevic S., Lübcke-von Varel U., Orcic D., Streck G., Schulze T., Pogrmic K., Kovacevic R., 2009. Effect-directed analysis of contaminated sediment from the wastewater canal in Pancevo industrial area, Serbia. *Chemosphere* 77: 907-913.
222. Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., Nakamura, Y., Kasai, F., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Ono, A., Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fujishiro, T., Kohara, M., Katoh, M.,

- Nakazaki, N., Nakayama, S., Yamada, M., Tabata, S., Watanabe, M.M., 2007. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Research* 14, 247–256. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsm026>
223. Kao, C.Y., 1993. Paralytic Shellfish Poisoning, in: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. ACADEMIC PRESS, INC., San Diego, CA 92101, pp. 75–86.
224. Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S.I., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., Kohara, Y., 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447, 714–719. <https://doi.org/10.1038/nature05846>
225. Keil, C., Forchert, A., Fastner, J., Szewzyk, U., Rotard, W., Chorus, I., Krätke, R., 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Res* 36, 2133–2139. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00417-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00417-1)
226. Kellmann, R., Mills, T., Neilan, B.A., 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J Mol Evol* 62, 267–280. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0030-6>
227. Khan, F.A., Ansari, A.A., 2005. Eutrophication: An Ecological Vision. *The Botanical Review* 71, 449–482.
228. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
229. Kolmogorov, M., Bickhart, D.M., Behsaz, B., Gurevich, A., Rayko, M., Shin, S.B., Kuhn, K., Yuan, J., Polevikov, E., Smith, T.P.L., Pevzner, P.A., 2020. metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. *Nat Methods* 17, 1103–1110. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00971-x>
230. Kovač, D., 2017. Biotehnoški potencijal filamentoznih sojeva cijanobakterija sa područja Vojvodine. Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
231. Kozma Törökné, A., László, E., Chorus, I., Fastner, J., Heinze, R., Padisák, J., Barbosa, F.A., 2000. Water quality monitoring by Thamnotoxkit F(TM) including cyanobacterial blooms. *Water Science and Technology* 42, 381–385. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0342>
232. Kramer, B.J., Davis, T.W., Meyer, K.A., Rosen, B.H., Goleski, J.A., Dick, G.J., Oh, G., Gobler, C.J., 2018. Nitrogen limitation, toxin synthesis potential, and toxicity of cyanobacterial populations in Lake Okeechobee and the St. Lucie River Estuary, Florida, during the 2016 state of emergency event. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196278>



233. Kramer, B.J., Hem, R., Gobler, C.J., 2022. Elevated CO<sub>2</sub> significantly increases N<sub>2</sub> fixation, growth rates, and alters microcystin, anatoxin, and saxitoxin cell quotas in strains of the bloom-forming cyanobacteria, *Dolichospermum*. *Harmful Algae* 120, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102354>
234. Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Human Health Aspects, in: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water*. pp. 133–174. <https://doi.org/10.1201/9781482295061-10>
235. Kulasoorya, S. a., 2011. Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth. *Ceylon Journal of Science* 40, 71–88.
236. Kurmayer, R., 2011. The toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *J Phycol* 47, 200–207. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00931.x>
237. Kurmayer, R., Christiansen, G., Kurmayer, R., Christiansen, G., 2009. The Genetic Basis of Toxin Production in Cyanobacteria The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria 2, 31–50. <https://doi.org/10.1608/FRJ-2.1.2>
238. Kurmayer, Rainer. 2012. “The Toxic Cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions, Rainer.” *J Phycol.* 47 (1): 200–207. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00931.x>.
239. Kust, A., Méjean, A., Ploux, O., 2020. Biosynthesis of Anatoxins in Cyanobacteria: Identification of the Carboxy-anatoxins as the Penultimate Biosynthetic Intermediates. *J Nat Prod* 83, 142–151. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01121>
240. Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapala, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., 1995a. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Lett Appl Microbiol* 21, 109–114. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01019.x>
241. Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapala, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., 1995b. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Lett Appl Microbiol* 21, 109–114. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01019.x>
242. Lampert, W., 1981. Inhibitory and Toxic Effects of Blue-green Algae on *Daphnia*. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 66, 285–298.
243. Langheinrich, U., 2003. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* 25, 904–912. <https://doi.org/10.1002/bies.10326>
244. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
245. Lankoff, A., Krzowski, Ł., Głąb, J., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Góźdz, S., Wójcik, A., 2004. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 559, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.01.004>

246. Le Manach, S., Sotton, B., Huet, H., Duval, C., Paris, A., Marie, A., Yépreman, C., Catherine, A., Mathéron, L., Vinh, J., Edery, M., Marie, B., 2018. Physiological effects caused by microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis aeruginosa* on medaka fish: A proteomic and metabolomic study on liver. *Environmental Pollution* 234, 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.011>
247. Le, T.H., Lim, E.S., Lee, S.K., Choi, Y.W., Kim, Y.H., Min, J., 2010. Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 79, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.067>
248. Lee, B.Y., Choi, B.S., Kim, M.S., Park, J.C., Jeong, C.B., Han, J., Lee, J.S., 2019. The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 210, 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.009>
249. Lee, S.J., Jang, M.H., Kim, H.S., Yoon, B.D., Oh, H.M., 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *J Appl Microbiol* 89, 323–329. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01112.x>
250. Lee, T.-H., Chen, Y.-M., Chou, H.-N., 1999. Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica* 10, 1–8.
251. Lezcano, N., Sedán, D., Lucotti, I., Giannuzzi, L., Vittone, L., Andrinolo, D., Mundiña-Weilenmann, C., 2012. Subchronic microcystin-Lr exposure increased hepatic apoptosis and induced compensatory mechanisms in mice. *J Biochem Mol Toxicol* 26, 131–138. <https://doi.org/10.1002/jbt.20419>
252. Li, G., Chen, J., Xie, P., Jiang, Y., Wu, L., Zhang, X., 2011. Protein expression profiling in the zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the microcystin-LR. *Proteomics* 11, 2003–2018. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000442>
253. Lindholrn, T., Meriluoto, J.A. O., 1991. Recurrent Depth Maxima of the Hepatotoxic Cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1629–1634.
254. 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. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.036>
255. Liu, W., Qiu, R., 2007. Water eutrophication in China and the 786, 781–786. <https://doi.org/10.1002/jctb>
256. Liu, Y., Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., Nie, X., 2017. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 183, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.020>
257. Liu W., Wang L., Zheng C., Liu, L., Wang, J., Li, D., Tan, Y., Zhao, X., He, L., Shu, W., 2018. Microcystin-LR increases genotoxicity induced by aflatoxin B1 through oxidative stress and DNA base excision repair genes in human

- hepatic cell lines. *Environ Pollut* 233:455–463. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.067>
258. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
259. Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat Prod Rep.* <https://doi.org/10.1039/b501296c>
260. Lobner, D., 2009. Mechanisms of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10, 56–60. <https://doi.org/10.3109/17482960903269062>
261. Louati, I., Pascual, N., Debros, D., Bernard, C., 2015. Structural Diversity of Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Cyanobacteria Differs According to the Cyanobacterial Genus. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140614>
262. Lovell, R.A., Schaeffer, D.J., Hooser, S.B., Haschek, W.M., Dahlem, A.M., Carmichael, W.W., Beasley, V.R., 1989. Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 9, 221–237.
263. Lu, X., Long, Y., Sun, R., Zhou, B., Lin, L., Zhong, S., Cui, Z., 2015. Zebrafish *Abcb4* is a potential efflux transporter of microcystin-LR. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 167, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.08.005>
264. Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A.M., Manfra, L., 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>.
265. Lyu, K., Gu, L., Li, B., Lu, Y., Wu, C., Guan, H., Yang, Z., 2016a. Stress-responsive expression of a glutathione S-transferase ( $\delta$ ) gene in waterflea *Daphnia magna* challenged by microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae* 56, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.009>
266. Lyu, K., Meng, Q., Zhu, X., Dai, D., Zhang, L., Huang, Y., Yang, Z., 2016b. Changes in iTRAQ-Based Proteomic Profiling of the Cladoceran *Daphnia magna* Exposed to Microcystin-Producing and Microcystin-Free *Microcystis aeruginosa*. *Environ Sci Technol* 50, 4798–4807. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00101>
267. Ma, R., Lu, F., Bi, Y., Hu, Z., 2015. Effects of light intensity and quality on phycobiliprotein accumulation in the cyanobacterium *Nostoc sphaeroides* Kützing. *Biotechnol Lett* 37, 1663–1669. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1831-3>
268. Ma, Y., Liu, H., Du, X., Shi, Z., Liu, X., Wang, R., Zhang, S., Tian, Z., Shi, L., Guo, H., Zhang, H., 2021. Advances in the toxicology research of microcystins based on Omics approaches. *Environmental International*, 154, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106661>

269. Mahmood, N., Carmichael, W.W., 1986. The pharmacology of anatoxin-a (s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* nrc 525-17. *Toxicon* 24, 425–434.
270. Malhotra, J.D., Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>
271. Marić, P., Ahel, M., Babić, O., Simeunović, J., Smital, T., 2020. Ecotoxicological profiling of selected cyanobacterial strains using multi-endpoint effect-directed analysis. *Ecotoxicology* 29, 535–550. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02201-8>
272. Maršalek B., B.L., 2004. Comparison of 17 Biotests for Detection of Cyanobacterial Toxicity. *Environ Toxicol* 310–317. <https://doi.org/10.1002/tox.20020>
273. Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ Int* 34, 531–545. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.008>
274. Mazur-Marzec, H., Kaczkowska, M.J., Blaszczyk, A., Akcaalan, R., Spooft, L., Meriluoto, J., 2013. Diversity of peptides produced by *nodularia spumigena* from various geographical regions. *Mar Drugs* 11, 1–19. <https://doi.org/10.3390/md11010001>
275. Mcelhiney, J., Lawton, L.A., 2005. Detection of the Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 219–30. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.002>.
276. Mcintyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Vo, C.J., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
277. Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M.A., Weber, T., Takano, E., Breitling, R., 2011. AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39, 339–346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
278. Meeks, J.C., Elhai, J., 2002. Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 94–121. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.1.94-121.2002>
279. Méjean, A., Paci, G., Gautier, V., Ploux, O., 2014. Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria. *Toxicon* 91, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.016>
280. Menezes, C., Valerio, E., Dias, E., 2013. The Kidney Vero-E6 Cell Line: A Suitable Model to Study the Toxicity of Microcystins. *New Insights into Toxicity and Drug Testing*. <https://doi.org/10.5772/54463>
281. Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and

- cyanotoxins. *Environ Int* 59, 303–327.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>
282. Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A., 2017. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, UK.
283. Merwe, D. Van Der, 2014. Freshwater cyanotoxins 539–548.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00031-2>
284. Mesquita, M.C.B., Lüring, M., Dorr, F., Pinto, E., 2019. Combined Effect of Light and Temperature on the Production of Saxitoxins in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains. *Toxins* 11(1): 38.  
<https://doi.org/10.3390/toxins11010038>
285. Metcalf, J.S., Hyenstrand, P., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *J Appl Microbiol* 89, 532–538.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01141.x>
286. Metcalf, J.S., Lindsay, J., Beattie, K.A., Birmingham, S., Saker, M.L., Törökné, A.K., Codd, G.A., 2002. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: Comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40, 1115–1120. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00105-8)
287. Micallef, M.L., D'Agostino, P.M., Al-Sinawi, B., Neilan, B.A., Moffitt, M.C., 2015. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. *Mar Genomics* 21, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.11.009>
288. Michael, A.S., Thomps, C.G., Abraliov, M., 1956. *Artemia salina* as a test Organism for Bioassay. *Science* (1979) 123, 464.
289. Miglione, A., Napoletano, M., Cinti, S., 2021. Electrochemical biosensors for tracing cyanotoxins in food and environmental matrices. *Biosensors (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/bios11090315>
290. Miles, C. O., Sandvik, M., Nonga, H. E., Rundberget, T., Wilkins, A. L., Rise, F., & Ballot, A., 2013. Identification of microcystins in a Lake Victoria cyanobacterial bloom using LC-MS with thiol derivatization. *Toxicon*, 70, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.016>
291. Mihali, T.K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K.D., Neilan, B.A., 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 74, 716–722.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01988-07>
292. Mikhailo, A., Ha, A., Hellman, J., Meriluoto, J., Eriksson, J.E., 2003. Identification of ATP-synthase as a novel 142, 223–237.
293. Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., Gurevich, A., 2018. Versatile genome assembly evaluation with QUASt-LG. *Bioinformatics* 34, i142–i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>
294. Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol* 70, 6353–6362.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6353-6362.2004>

295. Mogany, T., 2014. Optimization of Culture Conditions and Extraction Method for Phycocyanin Production from a Hypersaline Cyanobacterium. Master's Dissertation.
296. Monteiro, P. R., Do Amaral, S. C., Siqueira, A. S., Xavier, L. P., & Santos, A. V., 2021. Anabaenopeptins: What we know so far. *Toxins*, Vol. 13, Issue 8. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins13080522>
297. Moraes, A.C.N., Shah, S., Magalhães, V.F., Habibi, H.R., 2022. Cylindrospermopsin impairs zebrafish (*Danio rerio*) embryo development. *Mar Environ Res* 175. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105567>
298. Mountfort, D.O., Holland, P., Sprosen, J., 2005. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: Comparison with LC-MS. *Toxicon* 45, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.10.008>
299. Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the Environment. In Chorus, I. and Bartram, J. (eds), *Toxic Cyanobacteria*, in: Spon, E. and F. (Ed.), *Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London, pp. 15–40.
300. Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12228–12231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404926101>
301. Nandini, S., 2000. Responses of rotifers and cladocerans to *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): A demographic study 227–242.
302. Nathane Nunes de Freitas, P., Kinoshita Teramoto, K., Ossanes de Souza, A., Pinto, E., 2023. Evaluation of the Toxicity of Microcyclamide Produced by *Microcystis aeruginosa* in *Danio rerio* Embryos. *Toxics* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxics11020128>
303. Naughton, L.M., Romano, S., O'Gara, F., Dobson, A.D.W., 2017. Identification of secondary metabolite gene clusters in the *Pseudovibrio* Genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. *Front Microbiol* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01494>
304. Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C., Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 15, 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x>
305. Neumann, C., Bain, P., Shaw, G., 2007. Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin, in: *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*. pp. 1679–1686. <https://doi.org/10.1080/15287390701434869>
306. Nicholson, B., Burch, M., 2001. Evaluation of analytical methods for the detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. Canberra: National Health and Medical Research Council.
307. Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K.I., Shirai, M., 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide

- microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem* 126, 520–529.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022481>
308. Nizan, S.; Dimentman, C.; Shilo, M., 1986. Acute Toxic Effects of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Lim-nol. Oceanogr.*, 31, 497–502.
309. Nogueira, I.C.G., Saker, M.L., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Vasconcelos, V.M., 2004. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol* 19, 453–459.  
<https://doi.org/10.1002/tox.20050>
310. Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 14, 163–165. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<163::AID-TOX21>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<163::AID-TOX21>3.0.CO;2-V)
311. Oberemm, A., Becker, J., Codd, G.A., Steinberg, C., 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ Toxicol* 14, 77–88.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<77::AID-TOX11>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<77::AID-TOX11>3.0.CO;2-F)
312. Oberemm, A., Fastner, J., Steinberg, C.E.W., 1997. Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Res* 31, 2918–2921.  
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00120-6)
313. OECD, 2013. Test no. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD publishing, Paris.
314. OECD, 2012. *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 211. Paris.
315. OECD, 2011. Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
316. OECD, 2010. Test no. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
317. OECD, 2004a. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD.  
<https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
318. OECD, 2004b. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.  
<https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>
319. Ohtani, I., Moore, R.E., 1992. Cylindrospermopsin: A Potent Hepatotoxin from the Blue-Green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *American Chemical Society* 114, 7941–7942.
320. Oksanen, I., Jokela, J., Fewer, D.P., Wahlsten, M., Rikkinen, J., Sivonen, K., 2004. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-

- associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. *Appl Environ Microbiol* 70, 5756–5763. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5756-5763.2004>
321. Oku Y., Uesaka Y., Hirayama T., T.Y., 1988. Development to Detect of a Highly Bacterial Sensitive Protein Toxins. *Microbiol. Immunol.* 32, 807–816.
  322. O'Neill, K., Musgrave, I.F., Humpage, A., 2017. Extended Low-Dose Exposure to Saxitoxin Inhibits Neurite Outgrowth in Model Neuronal Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 120, 390–397.
  323. Orr, P.T., Jones, G.J., 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 43, 1604–1614. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.7.1604>
  324. Ortiz-Rodríguez, R., Son Dao, T., Wiegand, C., 2012. Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology* 215, 2795–2805. <https://doi.org/10.1242/jeb.069211>
  325. Osborne, N.J.T., Webb, P.M., Shaw, G.R., 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 27, 381–392. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00098-8)
  326. Osman, O.A., Beier, S., Grabherr, M., 2017. cross Interactions of Freshwater Cyanobacteria with Bacterial Antagonists 83, 1–18.
  327. Ostermaier, V., Kurmayer, R., 2010. Application of Real-Time PCR To Estimate Toxin Production by the Cyanobacterium *Planktothrix* sp. † 76, 3495–3502. <https://doi.org/10.1128/AEM.02771-09>
  328. Ownby, J.D., Shannahan, M., Hood, E., 1979. Protein Synthesis and Degradation in *Anabaena* During Nitrogen Starvation. *J Gen Microbiol* 110, 255–261. <https://doi.org/10.1099/00221287-110-2-255>
  329. Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol* 65, 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>
  330. Paerl, H.W., Gallucci, K.K., 1985. Role of chemotaxis in establishing a specific nitrogen-fixing cyanobacterial-bacterial association. *Science*. 8;227(4687):647-9. doi: 10.1126/science.227.4687.647. PMID: 17781825.
  331. Paerl, H.W., Millie, D.F., 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35:sup6, 160-167, doi: 10.2216/i0031-8884-35-6S-160.1
  332. Palmer, M., 1962. *Algae in water supplies: An illustrated manual on the identification, significance, and control of algae in water supplies*. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Division of water supply and pollution control. Washington, D.C., U.S.; #Pub.- 216489.
  333. Pašková, V., Adamovský, O., Pikula, J., Skočovská, B., Band'ouchová, H., Horáková, J., Babica, P., Maršálek, B., Hilscherová, K., 2008. Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Science of the Total Environment* 398, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.001>
  334. Pavagadhi, S., Gong, Z., Hande, M.P., Dionysiou, D.D., De, A.A., Balasubramanian, R., 2012. Biochemical response of diverse organs in adult



- Danio rerio (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: A balneation study. *Aquatic Toxicology* 109, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.009>
335. Pawlik-Skowrońska, B.; Toporowska, M.; Mazur-Marzec, H. Effects of Secondary Metabolites Produced by Different Cyanobacterial Populations on the Freshwater Zooplankters *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia Pulex*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019, 26, 11793–11804. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04543>
336. Babica, P., Blaha, L., Marsalek, B., 2006. Review Exploring the Natural Role of Microcystins. 20, 9–20. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00176.x>
337. Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S.E., D'Agostino, P.M., Neilan, B.A., 2016a. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* 54, 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>
338. Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S.E., D'Agostino, P.M., Neilan, B.A., 2016b. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* 54, 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>
339. Pflugmacher, S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR 70, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.010>
340. Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1425, 527–533. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00107-X)
341. Piccardi, R., Frosini, A., Tredici, M.R., Margheri, M.C., 2000. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *J Appl Phycol* 12, 543–547. <https://doi.org/10.1023/A:1008106715148>
342. Pichardo, S., Devesa, V., Puerto, M., Vélez, D., Cameán, A.M., 2017. Intestinal transport of *Cylindrospermopsis* using the Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro* 38, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.021>
343. Pilotto, L., Hobson, P., Burch, M.D., Attewell, R., Weightman, W., 2004. Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers 220–224.
344. Pimentel, J.S.M., Giani, A., 2014. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. *Appl Environ Microbiol* 80, 5836–5843. <https://doi.org/10.1128/AEM.01009-14>
345. Polyzois, A., Kirilovsky, D., Dufat, T.H., Michel, S., 2020. Effects of Modification of Light Parameters on the Production of Cryptophycin, Cyanotoxin with Potent Anticancer Activity, in *Nostoc* sp. *Toxins (Basel)* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins12120809>

346. Prinsep, M.R., Caplan, F.R., Moore, R.E., Patterson, G.M.L., E. Honkanen, R., Boynton, A.L., 1992. Microcystin-la from a blue-green alga belonging to the stigonematales. *Phytochemistry* 31, 1247–1248. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80269-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80269-K)
347. Puddick, J., van Ginkel, R., Page, C.D., Murray, J.S., Greenhough, H.E., Bowater, J., Selwood, A.I., Wood, S.A., Prinsep, M.R., Truman, P., Munday, R., Finch, S.C., 2021. Acute toxicity of dihydroanatoxin-a from *Microcoleus autumnalis* in comparison to anatoxin-a. *Chemosphere* 263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127937>
348. Puschner, B., 2007. ( blue-green algae ) toxins 714–724.
349. Puschner, B., Hoff, B., Tor, E.R., 2008. Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 89–92. <https://doi.org/10.1177/104063870802000119>
350. Puschner, B., Pratt, C., Tor, E.R., 2010. Treatment and diagnosis of a dog with fulminant neurological deterioration due to anatoxin-a intoxication 20, 518–522. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2010.00578.x>
351. Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* 63, 2206–2212. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2206-2212.1997>
352. Rastogi, R.P., Madamwar, D., Incharoensakdi, A., 2015. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Front Microbiol* 6, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01254>
353. Religia, P., Nguyen, N.D., Nong, Q.D., Matsuura, T., Kato, Y., Watanabe, H., 2020. Mutation of the cytochrome P450 CYP360A8 gene increases sensitivity to paraquat in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 00, 1–10. <https://doi.org/10.1002/etc.4970>
354. Ramirez, D., Fernández, V., Tapia, G., González, R., Videla, L.A., 2002. Influence of C-phycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflammation Research* 51, 351–356. <https://doi.org/10.1007/PL00000314>
355. Rewitz, K.F., Gilbert, L.I., 2008. *Daphnia* Halloween genes that encode cytochrome P450s mediating the synthesis of the arthropod molting hormone: Evolutionary implications. *BMC Evol Biol* 8, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-60>
356. Rinehart, K.L., Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Mulligan, P.E., Beasley, V.R., Dahlem, A.M., 1988. Nodularin, Microcystin, and the Configuration 8557–8558.
357. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology (N Y)* 111, 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
358. Robinson, N.A., Miura, G.A., Matson, C.F., Dinterman, R.E., Pace, J.G., 1989. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon* 27, 1035–1042.

359. Rodgers, K.J., Main, B.J., Samardzic, K., 2018. Cyanobacterial Neurotoxins: Their Occurrence and Mechanisms of Toxicity. *Neurotox Res* 33, 168–177. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9757-2>
360. Rogers, E.D., Henry, T.B., Twiner, M.J., Gouffon, J.S., McPherson, J.T., Boyer, G.L., Saylor, G.S., Wilhelm, S.W., 2011. Global gene expression profiling in larval zebrafish exposed to microcystin-LR and microcystis reveals endocrine disrupting effects of cyanobacteria. *Environ Sci Technol* 45, 1962–1969. <https://doi.org/10.1021/es103538b>
361. Rogers, E.H., Zehr, R.D., Gage, M.I., Humpage, A.R., Falconer, I.R., Marr, M., Chernoff, N., 2007. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicol* 49, 855–864. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2006.12.009>
362. Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., Börner, T., 2005. Ingestion of microcystins by *Daphnia*: Intestinal uptake and toxic effects. *Limnol Oceanogr* 50, 440–448. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.2.0440>
363. Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2004. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulex*. *Appl Environ Microbiol* 70, 5047–5050. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.5047-5050.2004>
364. Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner, T., Kohl, J.G., 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 65, 737–739. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.737-739.1999>
365. Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K., 2004. Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. *Appl Environ Microbiol* 70, 686–692. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.686-692.2004>
366. Rucker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicol* 50, 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2007.06.019>
367. Runnegar, M.T., Falconer, I.R., Silver, J., 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 317, 268–272. <https://doi.org/10.1007/BF00503829>
368. Runnegar, M.T., Kong, S.-M., Zhong, Y.-Z., Ge, J.-L., Lu, S.C., 1994. The Role of Glutathione in the Toxicity of a Novel Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 235–241.
369. Runnegar, M.T., Xie, C., Snider, B.B., Wallace, G.A., Weinreb, S.M., Kuhlenkamp, J., 2002. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicological Sciences* 67, 81–87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.1.81>

370. Sadler, T., Elert, E. Von, 2014. Dietary exposure of *Daphnia* to microcystins: No in vivo relevance of biotransformation. *Aquatic Toxicology* 150, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.017>
371. Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39, 349–354.
372. Saker, M.L., Neilan, B.A., 2001. Varied Diazotrophies, Morphologies, and Toxicities of Genetically Similar Isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Appl Environ Microbiol* 67, 1839–1845. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1839-1845.2001>
373. Sandle, T., 2013. Pyrogenicity and bacterial endotoxin. *Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals* 21–33. <https://doi.org/10.1533/9781908818638.21>
374. Sanseverino, I., António, D.C., Loos, R., Lettieri, T., 2017. Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection.
375. Sarma, T.A., 2013. Handbook of Handbook of of Handbook Cyanobacteria Cyanobacteria Cyanobacteria.
- Savolainen, H., 1982. Neurotoxicity of industrial chemicals and contaminants: aspects of biochemical mechanisms and effects. *Arch Toxicol Suppl.*; 5:71-83. doi: 10.1007/978-3-642-68511-8\_12.
376. Sazdova, I., Keremidarska-Markova, M., Chichova, M., Uzunov, B., Nikolaev, G., Mladenov, M., Schubert, R., Stoyneva-Gärtner, M., Gagov, H.S., 2022. Review of Cyanotoxicity Studies Based on Cell Cultures. *J Toxicol* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5647178>
377. Sotero-Santos, R.B.; Silva, C.R.D.S.E.; Verani, N.F.; Nonaka, K.O.; Rocha, O., 2006. Toxicity of a Cyanobacteria Bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.011>
378. Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E., Kaplan, A., 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins , a family of cyanobacterial toxins 9, 965–970. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01218.x>
379. Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163–183. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.042>
380. Schirmer, B.E., De Vos, J.M., Antonelli, A., Bagheri, H.C., 2013. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1791–1796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209927110>
381. Schopf, J.W., Packer, B.M., 1987. Early Archean (3.3-Billion to 3.5-Billion-Year-Old) Microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* (1979) 237, 70–73.

382. Schwartz, M.K., Luikart, G., Waples, R.S., 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol Evol* 22, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>
383. Schwarz, R., Forchhammer, K., 2018. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses 2503–2514. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27883-0>
384. Schwarzenberger, A., Courts, C., von Elert, E., 2009. Target gene approaches: Gene expression in *Daphnia magna* exposed to predator-borne kairomones or to microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-527>
385. Sedmak, B., Svirčev, Z., 2011. Cijanobakterije i njihovi toksini-ekološki i toksikološki rizici i cvetanje cijanobakterija u Srbiji. *Visoka šola za varstvo okolja, Velenje, Slovenia*.
386. Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
387. Serrano, L., Reina, M., Quintana, X.D., Romo, S., Olmo, C., Soria, J.M., Blanco, S., Fernández-aláez, C., Fernández-aláez, M., Caria, M.C., Bagella, S., Kalettka, T., 2017. A new tool for the assessment of severe anthropogenic eutrophication in small shallow water bodies. *Ecol Indic* 76, 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.034>
388. Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Teresa Bes, M., Luisa Peleato, M., Fillat, M.F., 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: Transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* 19, 1167–1173. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0500-5>
389. Shahmohamadloo, R.S., Poirier, D.G., Ortiz Almirall, X., Bhavsar, S.P., Sibley, P.K., 2020a. Assessing the toxicity of cell-bound microcystins on freshwater pelagic and benthic invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf* 188, 109945. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109945>
390. Shahmohamadloo, R.S., Simmons, D.B.D., Sibley, P.K., 2020b. Shotgun proteomics analysis reveals sub-lethal effects in *Daphnia magna* exposed to cell-bound microcystins produced by *Microcystis aeruginosa*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 33, 100656. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100656>
391. Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R., Kaplan, A., 2002. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiol Lett* 209, 87–91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11114.x>
392. Sharpley, A.N., Rekolainen, S., 1997. Phosphorus in Agriculture and Its Environmental Implications, in: Tunney, H., Carton, O.T., Brookes, P.C. and Johnston, A.E. (Ed.), *Phosphorus Loss from Soil to Water*. Wexford, pp. 1–53.
393. Shaw, G.R., Moore, D.P., Garnett, C., 2012. Eutrophication and Algal Blooms. *Environmental and Ecological Chemistry II*.

394. Shaw, G.R., Seawright, A.A., Lam, P.S., 2000. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Ther Drug Monit* 22, 89–92.
395. Sherr, C.J., McCormick, F., 2002. The RB and p53 pathways in cancer The life history of cancer cells encompasses a series of genetic missteps in which normal cells are progressively transformed into tumor cells that invade surrounding tissues and become malignant.
396. Shima, A., Shimada, A., 1994. The Japanese medaka, *Oryzias latipes*, as a new model organism for studying environmental germ-cell mutagenesis. *Environ Health Perspect* 102, 33–35. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1233>
397. Simeunović, J., 2009. Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
398. Simeunović, J., Bešlin, K., Svirčev, Z., Kovač, D., Babić, O., 2013. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. *J Appl Phycol* 25, 597–607. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9894-1>
399. Simeunović, J., Svirčev, Z., Krstić, S., Lazić, L., 2005. Occurrence of cyanobacterial blooms in Vojvodina water ecosystems. *Geographica Pannonica* 9, 13–19.
400. Singh, D. P., Tyagi, M., Kumar, A., & Kumar, A., 2001. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 15-22, <https://doi.org/10.1023/A>
401. Singh, K.P., Miaskowski, C., Dhruva, A.A., Flowers, E., Kober, K.M., 2018. Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biol Res Nurs* 20, 369–382. <https://doi.org/10.1177/1099800418772161>
402. Singh, P., Singh, S.S., Aboal, M., Mishra, A.K., 2015. Decoding cyanobacterial phylogeny and molecular evolution using an evonumeric approach. *Protoplasma* 252, 519–535. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0699-8>
403. Singh, S.P., Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
404. Sivonen, K., 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol* 56, 2658–2666. <https://doi.org/10.1128/aem.56.9.2658-2666.1990>
405. Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial Toxins, In I. Chorus and J. Bartram (ed.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health, Significance, Monitoring and Management*, The World Health Organization/E and F.N. Spon, London, United Kingdom.

406. Sivonen, K., Jones, G.J., 2009. Cyanobacterial toxins. *Toxic Cyanobacteria in Water* 41–111. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00005-5>
407. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Färdig, M., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., 1992. Three New Microcystins, Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins, from *Nostoc* sp. Strain 152. *Chem Res Toxicol* 5, 464–469. <https://doi.org/10.1021/tx00028a003>
408. Skulberg, O.M., Codd, G.A., 1984. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *AMBIO A Journal of the Human Environment* 13, 244–247.
409. Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., Kurelec, B., 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 126, 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(00\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(00)00110-9)
410. Smulders, S., Kaiser, J.P., Zuin, S., Van Landuyt, K.L., Golanski, L., Vanoirbeek, J., Wick, P., Hoet, P.H.M., 2012. Contamination of nanoparticles by endotoxin: Evaluation of different test methods. *Part Fibre Toxicol* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-41>
411. Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med* 59, 250–252. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959661>
412. Solovchenko, A., Gorelova, O., Karpova, O., Selyakh, I., Semenova, L., Chivkunova, O., Baulina, O., Vinogradova, E., Pugacheva, T., Scherbakov, P., Vasilieva, S., Lukyanov, A., Lobakova, E., 2020. Phosphorus Feast and Famine in Cyanobacteria: Is Luxury Uptake of the Nutrient Just a Consequence of Acclimation to Its Shortage? *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9091933>
413. Solter, Philip F, Beasley, V.R., 2013. Philip F. Solter, Val R. Beasley. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00038-8>
414. Solter, Philip F., Beasley, V.R., 2013. Phycotoxins, Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00038-8>
415. Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* (1979) 237, 517–522. <https://doi.org/10.1126/science.3603037>
416. Srivastava, L.S., 2002. *Plant Growth and Development. Hormones and Environment* 141–153.
417. Stanković, N., Jovanović, B., Kokić, I.K., Piperac, M.S., Simeunović, J., Jakimov, D., Dimkić, I., Milošević, D., 2022. Toxic effects of a cyanobacterial strain on *Chironomus riparius* larvae in a multistress environment. *Aquatic Toxicology* 253. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106321>
418. Stanković, N., Kostić, I., Jovanović, B., Savić-Zdravković, D., Matić, S., Bašić, J., Cvetković, T., Simeunović, J., Milošević, D., 2020. Can phytoplankton blooming be harmful to benthic organisms? The toxic influence of *Anabaena*

- sp. and *Chlorella* sp. on *Chironomus riparius* larvae. *Science of the Total Environment* 729. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138666>
419. States, U., Agency, E.P., 2014. Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems 1–11.
420. Stefanopoulos, P., Aloizos, S., Tsironi, M., 2022. Clinical symptoms of chemical warfare agents toxicity including mustards, halogenated oximes, arsenicals, and toxins poisoning, in: *Sensing of Deadly Toxic Chemical Warfare Agents, Nerve Agent Simulants, and Their Toxicological Aspects*. pp. 431–487. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90553-4.00029-9>
421. Stegeman, J.J., Miller, M.R., Hinton, D.E., 1989. Cytochrome P450IA1 induction and localization in endothelium of vertebrate (teleost) heart. *Mol Pharmacol* 36, 723–729.
422. Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R., 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - A review. *Environ Health* 5, 1–23. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-5-7>
423. Stolte, W., Karlsson, C., Carlsson, P., Granéli, E., 2002. Modeling the increase of nodularin content in Baltic Sea *Nodularia spumigena* during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures. *FEMS Microbiol Ecol* 41, 211–220. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00295-7)
424. Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments — A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* 33, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>
425. Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B., 2011. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch Toxicol* 85, 1617–1626. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0716-z>
426. Sun, C., Zhang, S., 2015. Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients* 7, 8818–8829. <https://doi.org/10.3390/nu7105432>
427. Sukenik, A., Kaplan, A., 2021. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms in Aquatic Ecosystems: A Comprehensive Outlook on Current and Emerging Mitigation and Control Approaches. *Microorganisms*, 9, 1472. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071472>
428. 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* 37–41. <https://doi.org/10.1080/10590500903585382>
429. Svirčev, Z., Baltić, V., Simeunović, J., 2011. Cvetanje cijanobakterija u Srbiji. Putevi ekspozicije, zdravstveni i zakonodavni aspekt. Novi Sad.
430. Svirčev Z., Drobac D., Tokodi N., Lužanin, Z., Munjas, A.M., Nikolin, B., Vuleta, D., Meriluoto, J., 2014. Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Heal Part C* 32:319–337.
431. Svirčev Z., Drobac D., Tokodi N., Mijović, B., Codd, G.A., Meriluoto, J., 2017. Toxicology of microcystins with reference to cases of human



- intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch Toxicol* 91:621–650. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>
432. Svirčev, Z., Drobac, D., Tokodi, N., Vidović, M., Simeunović, J., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V., 2013. Epidemiology of primary liver cancer in serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 31, 181–200. <https://doi.org/10.1080/10590501.2013.824187>
433. Svirčev, Z., Tokodi, N., Drobac, D., 2017. Review of 130 years of research on cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia presented in a Serbian Cyanobacterial Database. *Advances in Oceanography and Limnology*, 8(1): 153-160, doi: 10.4081/aiol.2017.6360
434. Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J., Codd, G.A., 2019. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings, *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
435. Szlag, D.C., Sinclair, J.L., Southwell, B., Westrick, J.A., 2015. Cyanobacteria and cyanotoxins occurrence and removal from five high-risk conventional treatment drinking water plants. *Toxins (Basel)* 7, 2198–2220. <https://doi.org/10.3390/toxins7062198>
436. Takumi, S., Komatsu, M., Furukawa, T., Ikeda, R., Sumizawa, T., Akenaga, H., Maeda, Y., Aoyama, K., Arizono, K., Ando, S., Takeuchi, T., 2010. P53 plays an important role in cell fate determination after exposure to Microcystin-LR. *Environ Health Perspect* 118, 1292–1298. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001899>
437. Tang, Y.-H., Wu, J., Fan, T.-T., Zhang, H.-H., Gong, X.-X., Cao, Z.-Y., Zhang, J., Lin, H.-W., Han, B.-N., 2019. Chemical and biological study of aplysiatoxin derivatives showing inhibition of potassium channel Kv1.5. *RSC Adv* 9, 7594–7600. <https://doi.org/10.1039/c9ra00965e>
438. Tarczyska, M., Nalecz-Jawecki, G., Brzychcy, M., Zalewski, M., Sawicki, J., 2000. The toxicity of cyanobacterial blooms as determined by microbiotests and mouse assays., in: Persoone, G., Janssen, C.R., De Coen, W.M. (Eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Springer Science, New York, pp. 527–532.
439. Tarczyska, M.; Nalecz-Jawecki, G.; Romanowska-Duda, Z.; Sawicki, J.; Beattie, K.; Codd, G.; Zalewski, M. Tests for the Toxicity Assessment of Cyanobacterial Bloom Samples. *Environ. Toxicol.* 2001, 16, 383–390. <https://doi.org/10.1002/tox.1047>.
440. Teikari, J., Baunach, M., Dittman, E., 2022. Cyanobacterial Genome Sequencing, Annotation and Bioinformatics, in: Skellam, E. (Ed.), *Engineering Natural Product Biosynthesis*. pp. 269–287.
441. Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E., Watanabe, M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green

- alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32, 833–843.  
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90008-6)
442. Tessier, A.J., Leibold, M.A., Tsao, J., 2000. A fundamental trade-off in resource exploitation by *Daphnia* and consequences to plankton communities. *Ecology* 81, 826–841. <https://doi.org/10.2307/177380>
443. Tillett, 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. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00021-1)
444. Tomura, T., Nagashima, S., Yamazaki, S., Iizuka, T., Fudou, R., & Ojika, M., 2017. An unusual diterpene-enhygromic acid and deoxyenhygrolides from a marine myxobacterium, *Enhygromyxa* sp. *Marine Drugs*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/md15040109>
445. Toporowska, M., Pawlik-Skowrońska, B., Kalinowska, R., 2016. Mass Development of Diazotrophic Cyanobacteria (Nostocales) and Production of Neurotoxic Anatoxin-a in a Planktothrix (Oscillatoriales) Dominated Temperate Lake. *Water Air Soil Pollut* 227. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3004-y>
446. Torokne, A., 2000. The potential of the Thamnotoxkit microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins, in: Persoone, G., Janssen, C.R., De Coen, W.M. (Eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Springer Science, New York, pp. 533–540.
447. Torokne, A., Palovics, A., Bankine, M., 2001. Allergenic (Sensitization, Skin and Eye Irritation) Effects of Freshwater Cyanobacteria — Experimental Evidence 512–516. <https://doi.org/10.1002/tox.10011>
448. Tran, T.K.A., Yu, R.M.K., Islam, R., Nguyen, T.H.T., Bui, T.L.H., Kong, R.Y.C., O'Connor, W.A., Leusch, F.D.L., Andrew-Priestley, M., MacFarlane, G.R., 2019. The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environmental Pollution* 248, 1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.056>
449. Trinchet, I., Djediat, C., Huet, H., Dao, S.P., Edery, M., 2011. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reproductive Toxicology* 32, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.07.006>
450. United States Environmental Protection Agency, 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition* October 2002. Environmental Protection 266.
451. Utkilen, H., Gjølme, N., 1995. Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa* 61, 797–800.
452. Vaitomaa, J., 2006. The effects of environmental factors on biomass and microcystin production by the freshwater cyanobacterial genera *Microcystis* and *Anabaena* (PhD Thesis). Helsingin yliopisto, Helsinki.
453. Van Apeldoorn, M.E., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 51, 7–60. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>

454. Vasconcelos, V., 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: 25, 425–432.
455. Vasconcelos, V., 2001. CYANOBACTERIA TOXINS: DIVERSITY AND ECOLOGICAL EFFECTS 20, 45–58.
456. Vezie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K., 2002. Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Nontoxic Microcystis Strains and on Intracellular Microcystin Concentrations. *Microb Ecol* 43, 443–454.
457. Vincent, W.F., 2009. Cyanobacteria. *Protists, Bacteria and Fungi: Planktonic and Attached* 226–232.
458. Vuorio, K., Järvinen, M., Kotamäki, N., 2020. Phosphorus thresholds for bloom-forming cyanobacterial taxa in boreal lakes. *Hydrobiologia* 847, 4389–4400. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04161-5>
459. Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., Earl, A.M., 2014. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
460. Wang, L., Peng, Y., Nie, X., Pan, B., Ku, P., Bao, S., 2016a. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 179, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.010>
461. Wang, L., Peng, Y., Nie, X., Pan, B., Ku, P., Bao, S., 2016b. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 179, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.010>
462. Wang, L., Wang, Q., Xiao, G., Chen, G., Han, L., Hu, T., 2020. Adverse effect of cylindrospermopsin on embryonic development in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 241, 125060. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125060>
463. Wang, P.J., Chien, M.S., Wu, F.J., Chou, H.N., Lee, S.J., 2005. Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio Rerio*. *Toxicol* 45, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.10.016>
464. Wang, S.C., Geng, Z.Z., Wang, Y., Tong, Z.H., Yu, H.Q., 2012. Essential roles of p53 and MAPK cascades in microcystin-LR-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol* 46, 3442–3448. <https://doi.org/10.1021/es203675y>
465. Watanabe, M.F., Harada, K.I., Matsuura, K., Watanabe, M., Suzuki, M., 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). *J Appl Phycol* 1, 161–165. <https://doi.org/10.1007/BF00003879>
466. Welker, M., Von Döhren, H., 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 30, 530–563. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x>

467. Whitton, B.A., 1992. Diversity, Ecology, and Taxonomy of The Cyanobacteria., in: Mann, N.H., Carr, N.G. (Eds.), Photosynthetic Prokaryotes. Plenum Press, New York, pp. 1–51.
468. WHO, 2020. Cyanobacterial toxins: saxitoxins. Guidelines for Drinking-water Quality and Guidelines for Safe Recreational Water Environments 1–29.
469. WHO, W.H.O., 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters. Geneva.
470. WHO, W.H.O.R.O. for, 2002. Eutrophication and health. Luxembourg.
471. Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
472. Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Mur, L.R., 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* 69, 1475–1481. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1475-1481.2003>
473. Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 201–218. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.002>
474. Williams, T.D., Mirbahai, L., Chipman, J.K., 2014. The toxicological application of transcriptomics and epigenomics in zebrafish and other teleosts, *Briefings in Functional Genomics*, 13, 2, 157–171, <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt053>
475. Wimmer, K.M., Strangman, W.K., Wright, J.L.C., 2014. 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 37, 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.006>
476. Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation 39, 1–11.
477. Wonnacott, S., Kaiser, S., Mogg, A., Soliakov, L., Jones, I.W., 2000. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum, *European Journal of Pharmacology*.
478. Wood, D.E., Salzberg, S.L., 2014. Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol* 15. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
479. Wood, S.A., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F., Cary, C.S., 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand 50, 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.025>
480. Wu, Q.L., Zwart, G., Wu, J., Kamst-Van Agterveld, M.P., Liu, S., Hahn, M.W., 2007. Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake, China. *Environ Microbiol* 9, 2765–2774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01388.x>

481. Wu, Y.W., Simmons, B.A., Singer, S.W., 2016. MaxBin 2.0: An automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 32, 605–607. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>
482. Xiao, M., Burford, M.A., Wood, S.A., Aubriot, L., Ibelings, B.W., Prentice, M.J., Galvanese, E.F., Harris, T.D., Hamilton, D.P., 2022. Schindler's legacy: from eutrophic lakes to the phosphorus utilization strategies of cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 46, 1–24. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac029>
483. Xiao, M., Li, M., Reynolds, C.S., 2018. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis* 93, 1399–1420. <https://doi.org/10.1111/brv.12401>
484. Xu, H., Li, C., Zeng, Q., Agrawal, I., Zhu, X., Gong, Z., 2016. Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR. *J Fish Biol* 88, 2095–2110. <https://doi.org/10.1111/jfb.12915>
485. Xu, R., Jiang, Y., Maclsaac, H.J., Chen, L., Li, J., Xu, J., Wang, T., Zi, Y., Chang, X., 2019. Blooming cyanobacteria alter water flea reproduction via exudates of estrogen analogues. *Science of the Total Environment* 696, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133909>
486. Xu, M., Yang, J., Lin, Y., Hu, L., Chen, Y., Shen, Z., Yu, S., 2003. Microcystins in drinking water and mortality of major cancer in a city along Taihu Lake. *Chin J Prev Control Chronic Non Commun Dis* 11:112–113
487. Yamano, S., Tatsuno, J., 1990. Gene Product Catalyzes Coumarin 7-Hydroxylation in Human Liver Microsomes 1322–1329.
488. Yang, X., Wu, X., Hao, H., He, Z., 2008. Mechanisms and assessment of water eutrophication \* 9, 197–209. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710626>
489. Yeung, 2016. Downloaded from <http://aem.asm.org/> on August 23 , 2016 by CORNELL UNIVERSITY Downloaded from <http://aem.asm.org/> on August 23 , 2016 by CORNELL UNIVERSITY. <https://doi.org/10.1128/AEM.01207-16>
490. Yilmaz, O., Patinote, A., Nguyen, T., Bobe, J., 2018. Multiple vitellogenins in zebrafish (*Danio rerio*): quantitative inventory of genes, transcripts and proteins, and relation to egg quality. *Fish Physiol Biochem* 44, 1509–1525. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0524-y>
491. Yin, Q., Carmichael, W.W., Evans, W.R., 1997. Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *J Appl Phycol* 9, 55–63. <https://doi.org/10.1023/A>
492. Young, F.M., Micklem, J., Humpage, A.R., 2008. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. *Reproductive Toxicology* 25, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.02.006>
493. Zagatto P.A., Buratini S.V., Marcia A.A., Ferrao-Filho A.S. Neurotoxicity of Two *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Strains to Mice,

- Daphnia* and Fish. Environ. Toxicol. Chem. 2012; 31:857–862. doi: 10.1002/etc.1759.
494. Zegura, B., 2016. An Overview of the Mechanisms of Microcystin-LR Genotoxicity and Potential An Overview of the Mechanisms of Microcystin-LR Genotoxicity and Potential Carcinogenicity. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160308141549>
495. Žegura, B., Štraser, A., Filipič, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat Res Rev Mutat Res* 727, 16–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.01.002>
496. Žegura, B., Volčič, M., Lah, T.T., Filipič, M., 2008. Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicol* 52, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.06.026>
497. Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G., 2014. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 149, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.021>
498. Zilliges, Yvonne, Jan Christoph Kehr, Sven Meissner, Keishi Ishida, Stefan Mikkat, Martin Hagemann, Aaron Kaplan, Thomas Börner, and Elke Dittmann. 2011. “The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of Microcystis under Oxidative Stress Conditions.” *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017615>.
499. Zhang, D., Hu, C., Wang, G., Li, D., Li, G., Liu, Y., 2013. Zebrafish neurotoxicity from aphanotoxins-cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) from *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1. *Environ Toxicol* 28, 239–254. <https://doi.org/10.1002/tox.20714>
500. Zhang, D., Lin, W., Liu, Y., Guo, H., Wang, L., Yang, L., Li, L., Li, D., Tang, R., 2020. Chronic microcystin-LR exposure induces abnormal lipid metabolism via endoplasmic reticulum stress in Male zebrafish. *Toxins (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12020107>
501. Zhao, S., Li, G., Chen, J., 2015. A proteomic analysis of prenatal transfer of microcystin-LR induced neurotoxicity in rat offspring. *J Proteomics* 114, 197–213. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.015>
502. Zhao, Y., Xie, L., Yan, Y., 2015. Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system. *Chemosphere* 120, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.028>
503. Zheng C., Zeng H., Lin H., Wang, J., Feng, X., Qiu, Z., Chen, J., Luo, J., Luo, Y., Huang, Y., Wang, L., Liu, W., Tan, Y., Xu, A., Yao, Y., Shu, W., 2017. Serum microcystin levels positively linked with risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in southwest China. *Hepatology* 66:1519–1528. <https://doi.org/10.1002/hep.29310>
504. Zhu, K., Dietrich, R., Didier, A., Doyscher, D., Märtilbauer, E., 2014. Recent Developments in Antibody-Based Assays for the Detection of Bacterial Toxins 1325–1348. <https://doi.org/10.3390/toxins6041325>

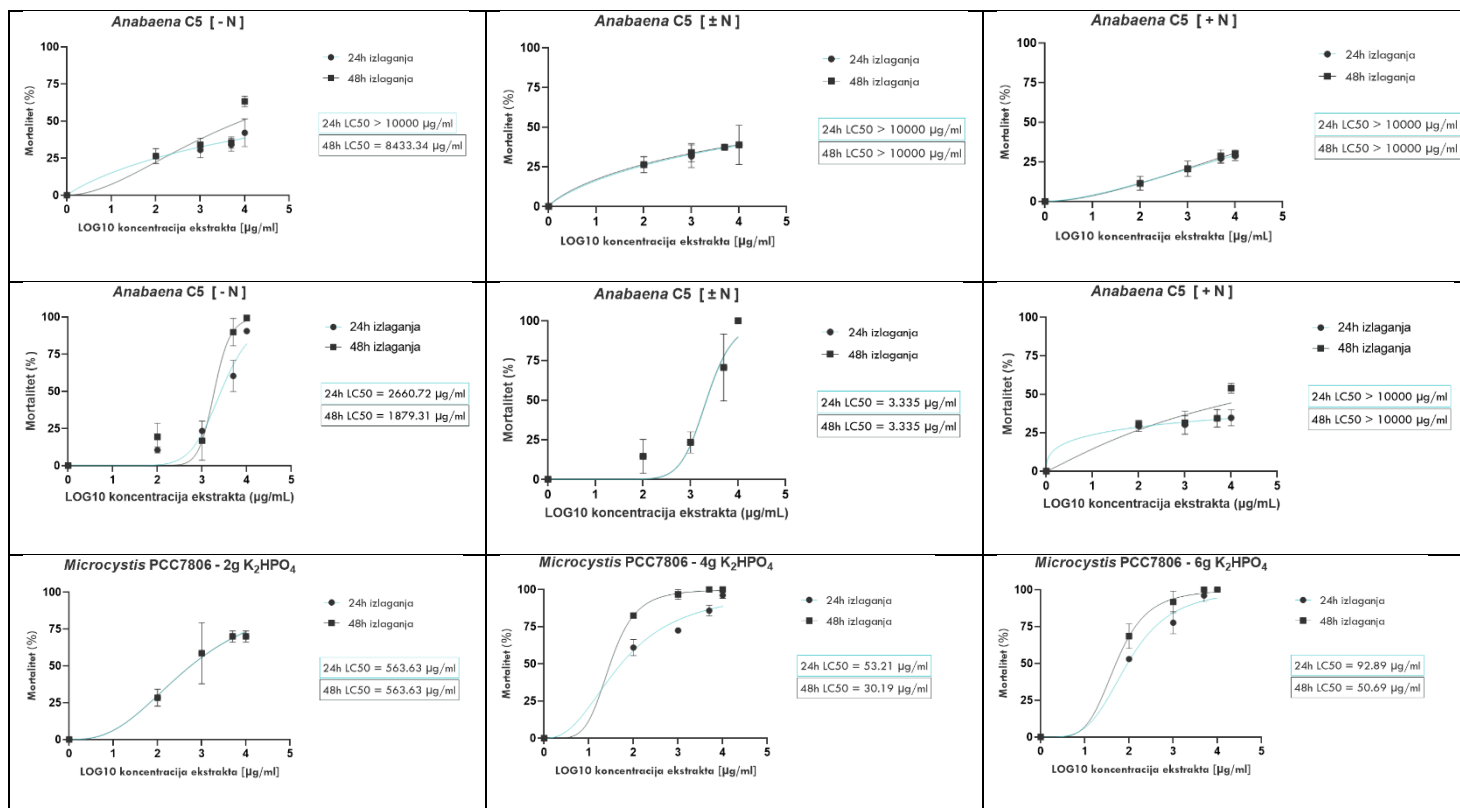
505. Zhu, P., Zhang, B., Wu, J., Dang, C., Lv, Y., 2014. Sensitive and rapid detection of microcystin synthetase E Gene (mcy E) by loop-mediated isothermal amplification: A new assay for detecting the potential microcystin-producing *Microcystis* in the aquatic ecosystem. *Harmful Algae* 37, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.04.018>
506. Zhou, L., Yu, H., Chen, K., 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed Environ Sci* 15:166–171
507. Zodrow, J.M., Tanguay, R.L., 2003. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin Inhibits Zebrafish Caudal Fin Regeneration. *Toxicological Sciences* 76, 151–161. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg205>
508. Zotchev, S. B. (2013). Alkaloids from marine bacteria. In *Advances in Botanical Research*, Vol. 68, pp. 301–333. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408061-4.00011-0>

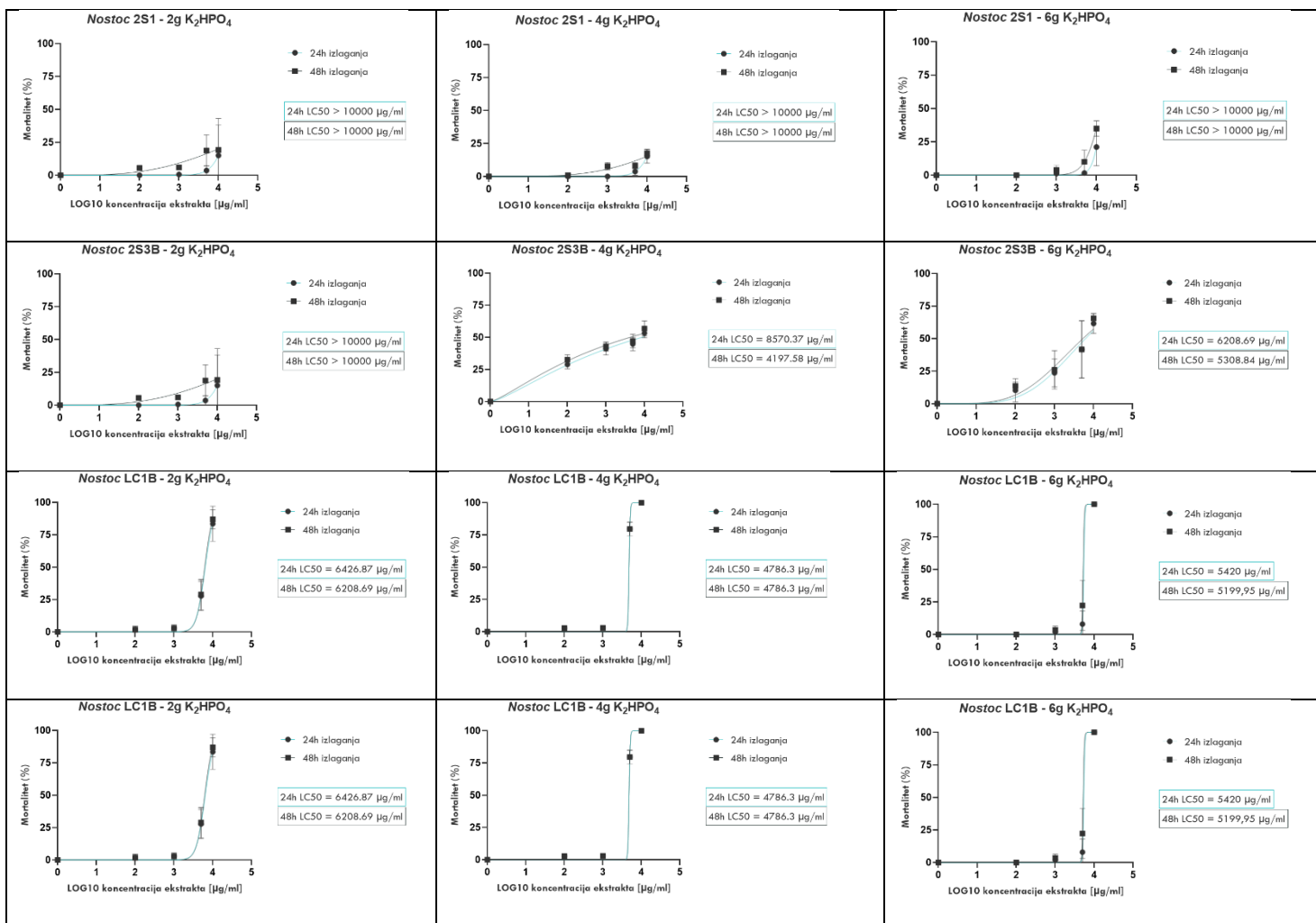
## 7. Prilog

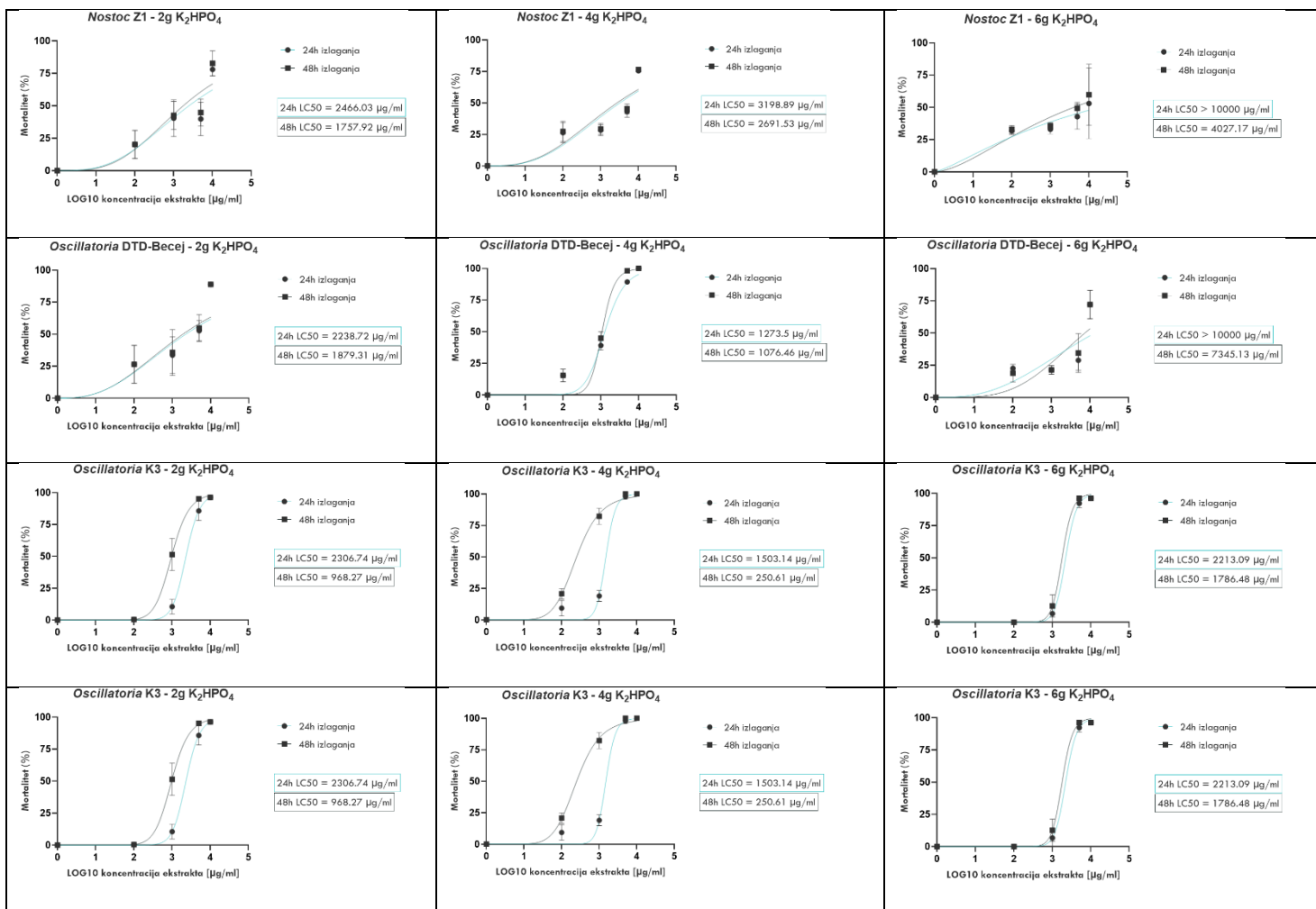


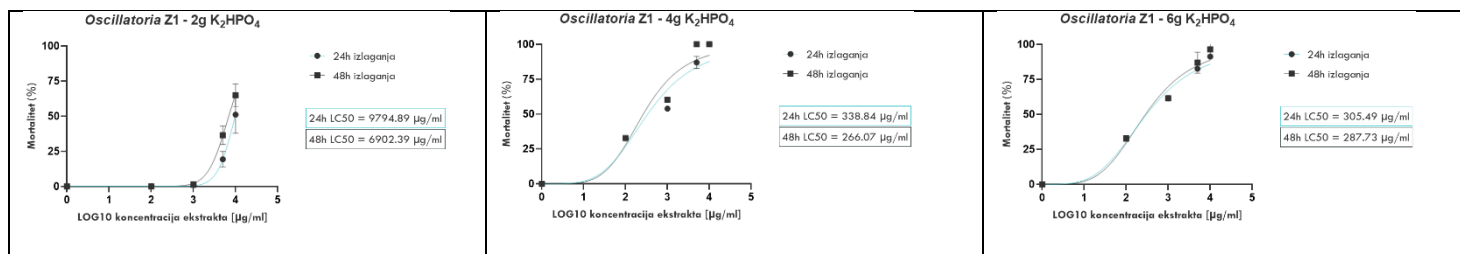
# Prilog 1

**Tabela 1.** Ispitivanje uticaja koncentracije azota na toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*

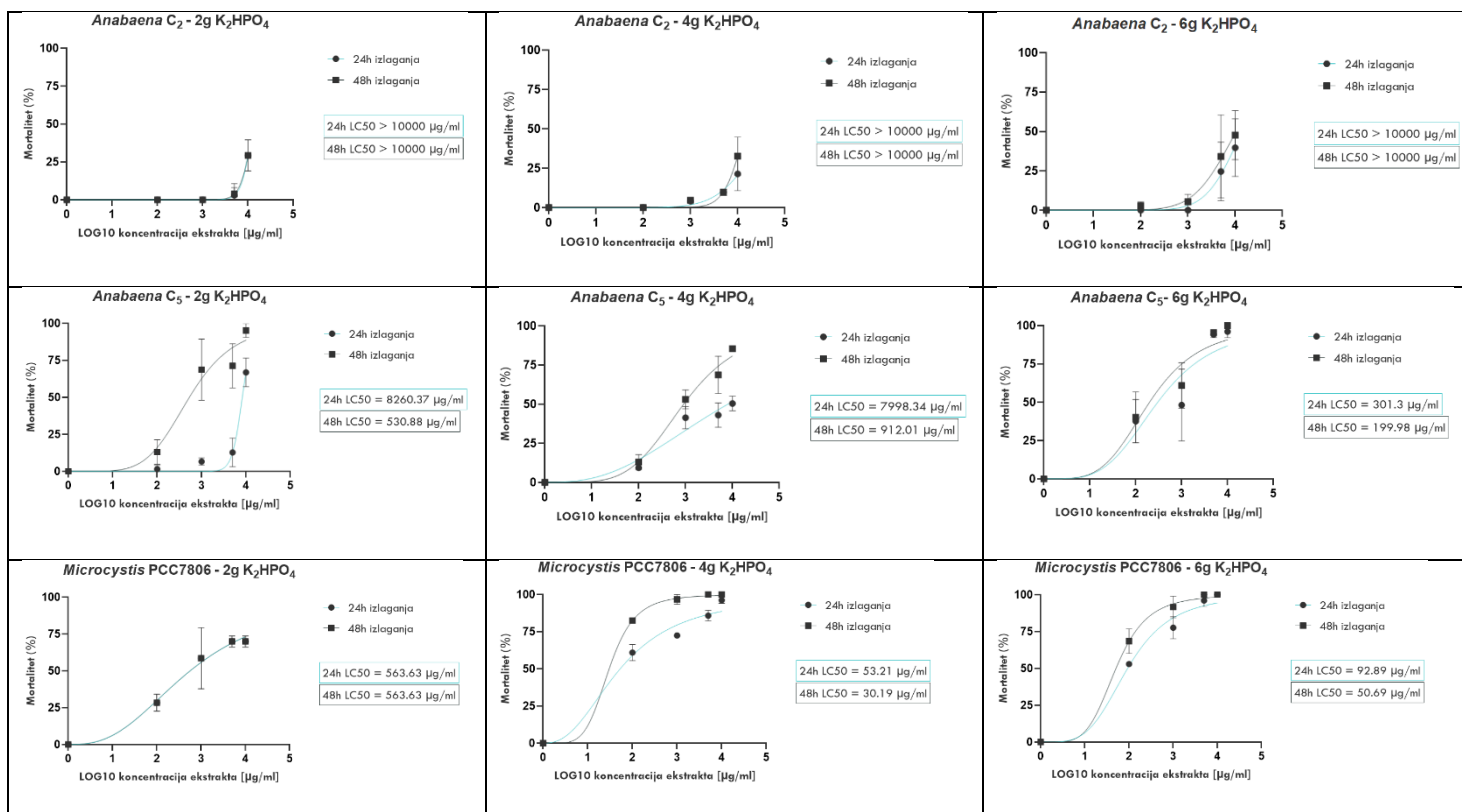


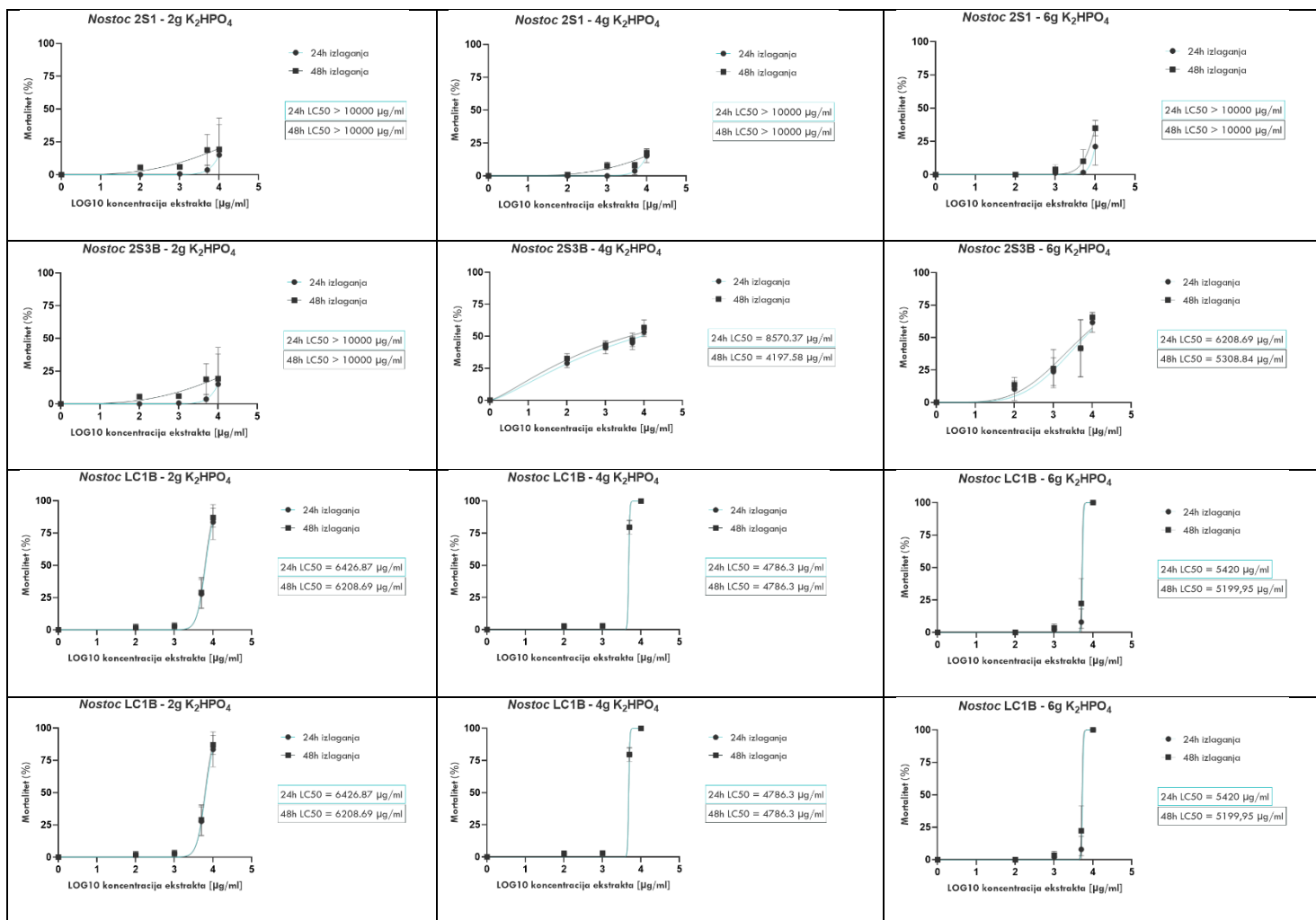


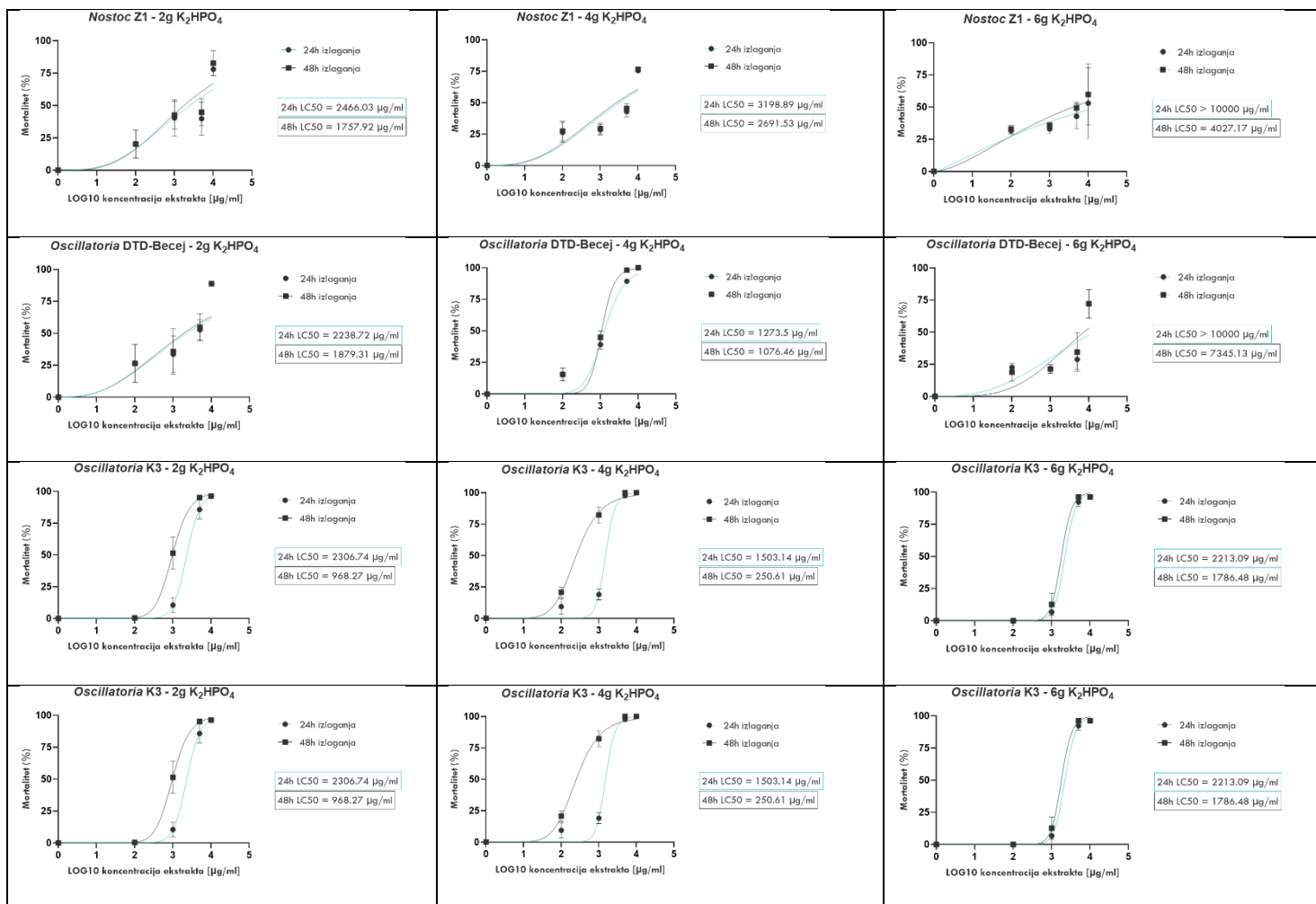


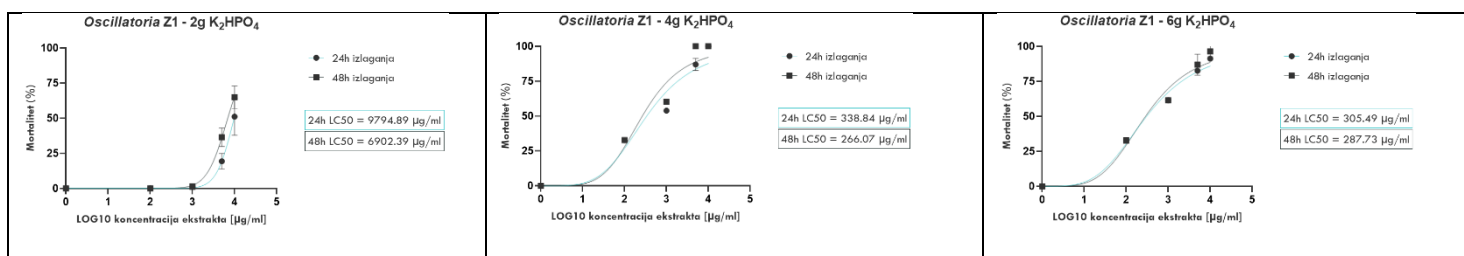


**Tabela 2.** Ispitivanje uticaja koncentracije fosfora na toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*

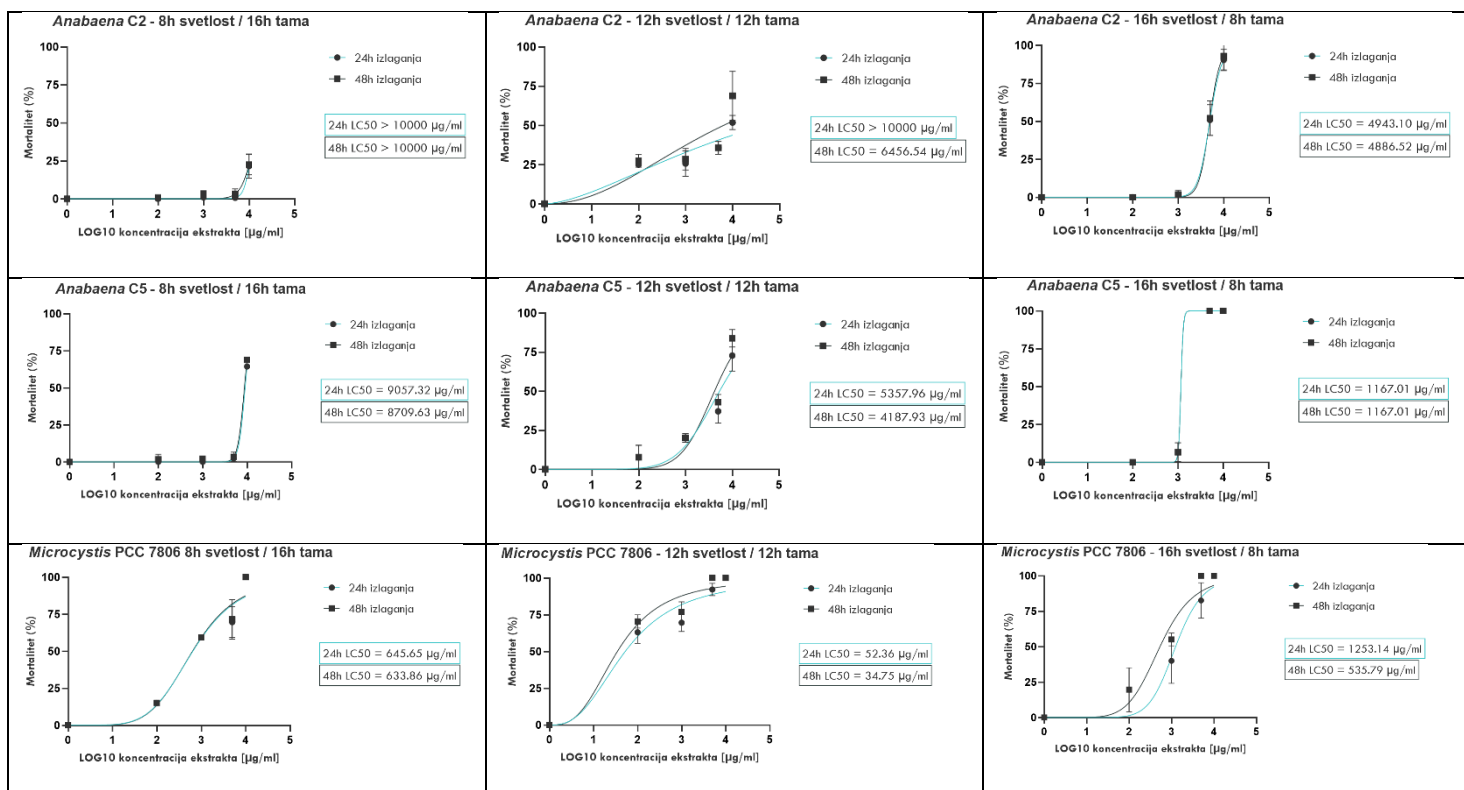


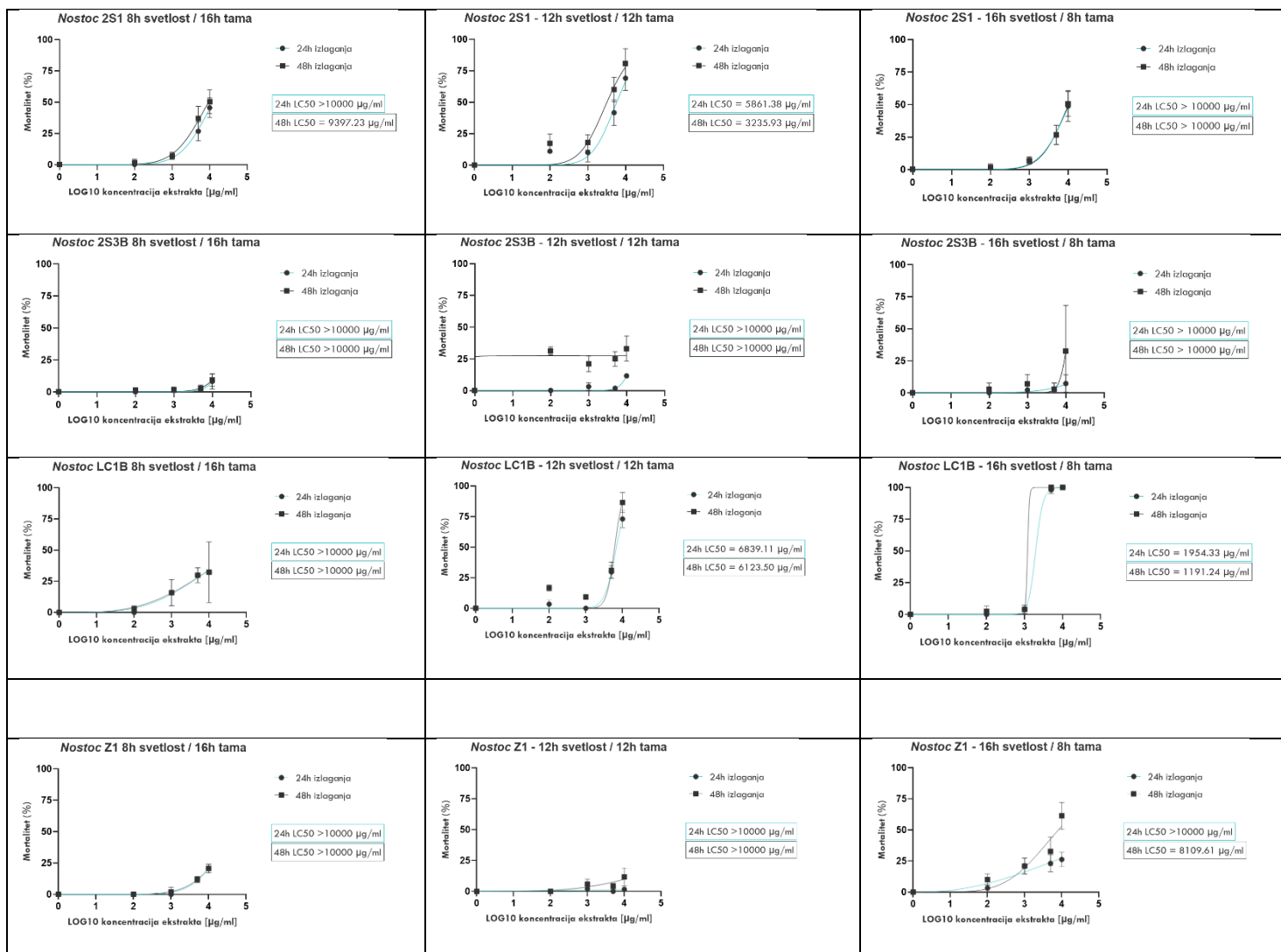




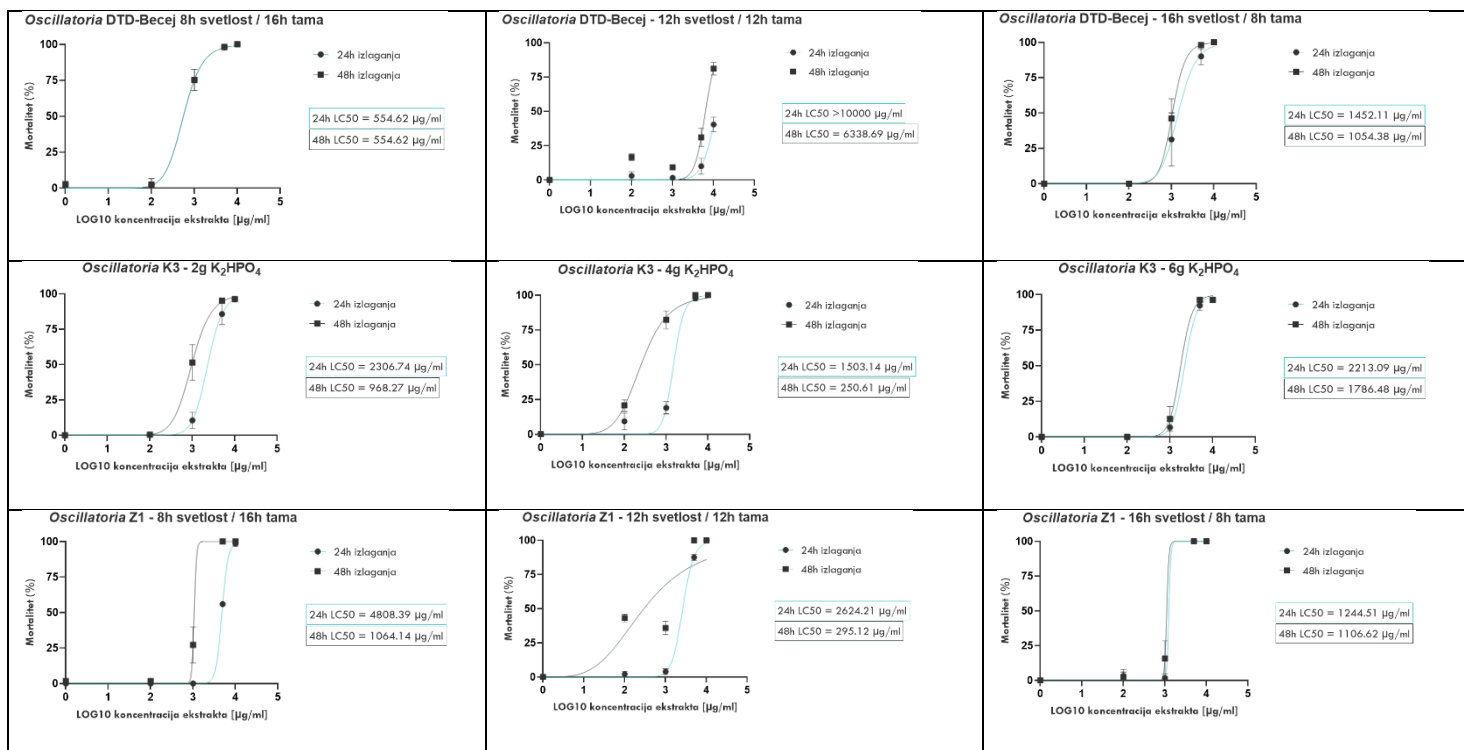


**Tabela 3.** Ispitivanje uticaja perioda osvetljenosti na toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*

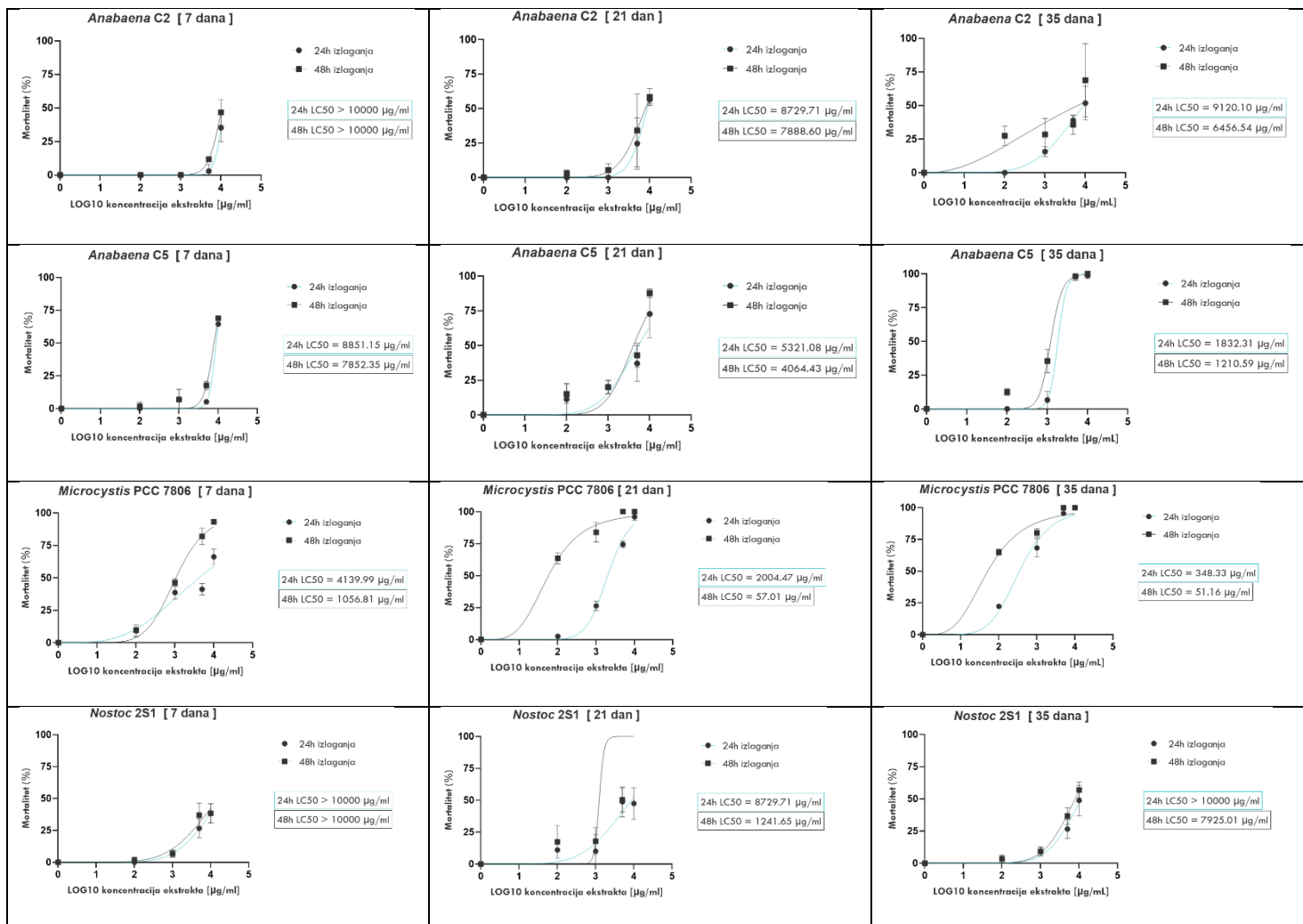


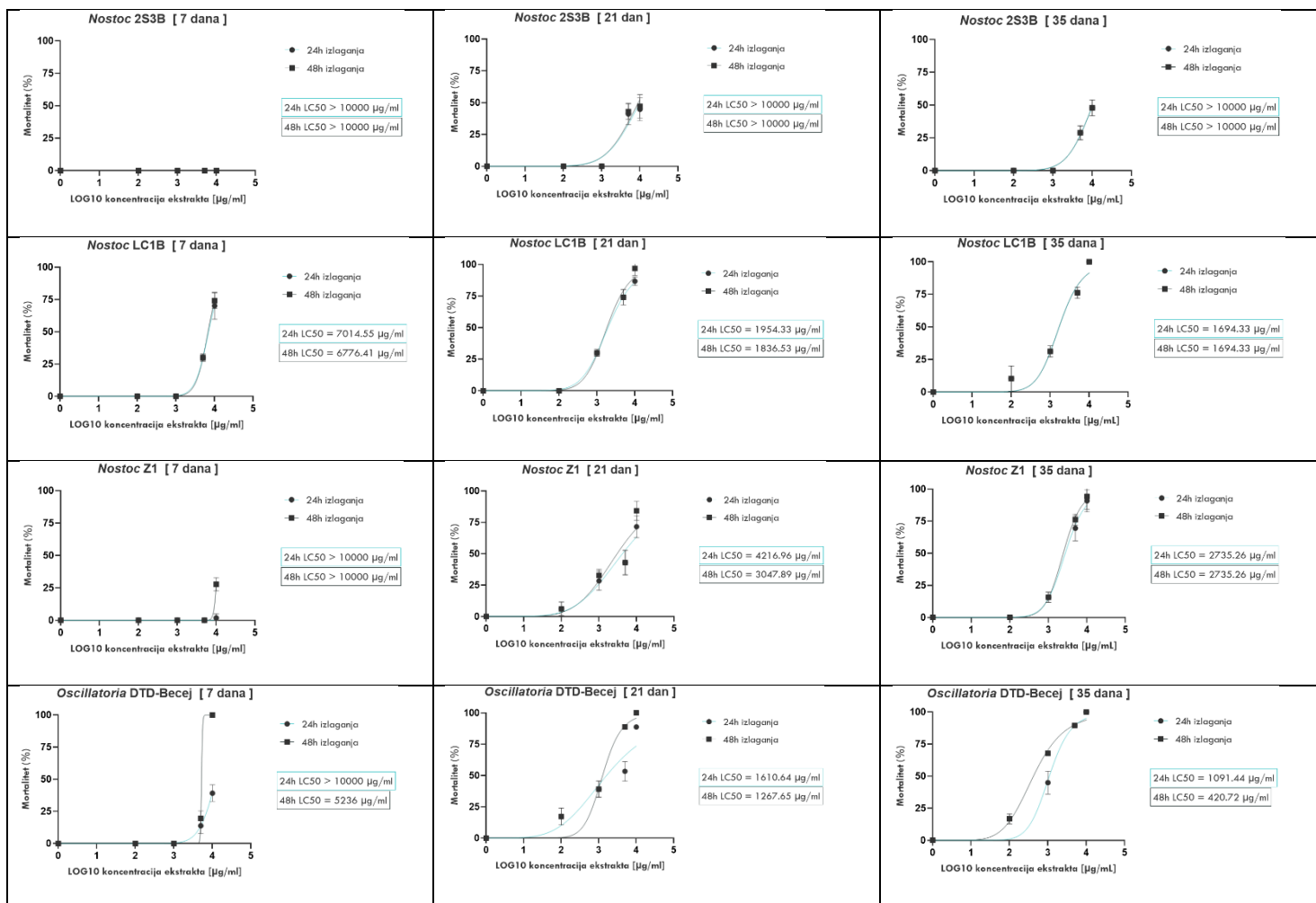


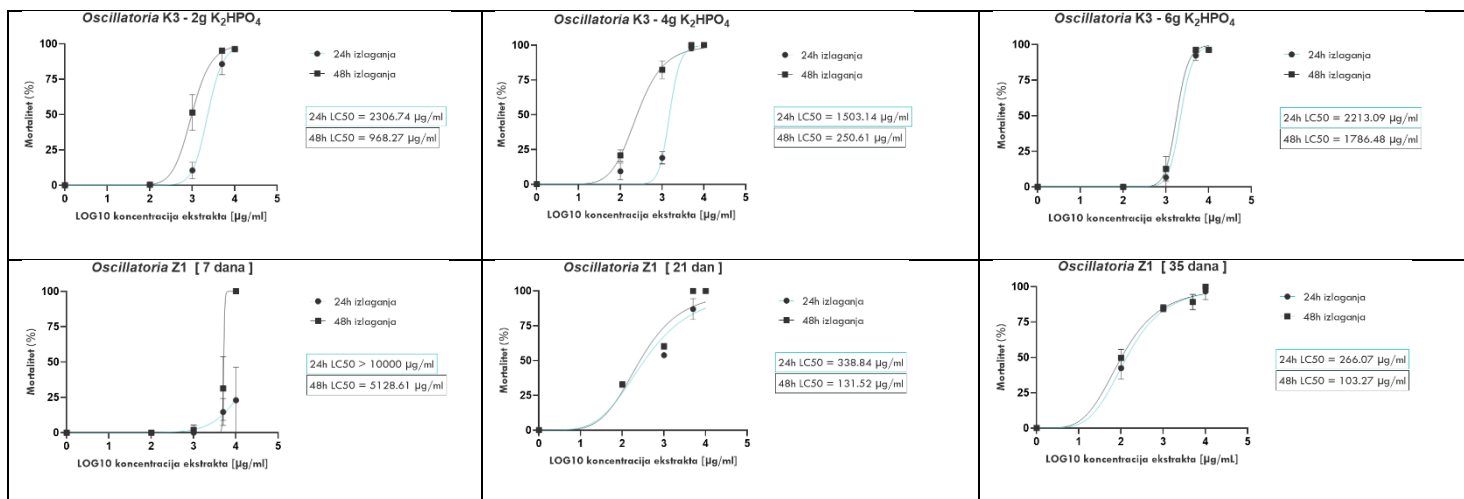




**Tabela 4.** Ispitivanje uticaja faze rasta na toksičnost odabranih sojeva u biotestu *Artemia salina*







## BIOGRAFIJA



Petar Davidović je rođen 22.04.1993. godine u Novom Sadu. Osnovne akademske studije pohađao je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju, smer Diplomirani ekolog. Nakon završenih osnovnih akademskih studija 2016. godine, na istom fakultetu upisao je master studije program master biolog, modul Mikrobiologija. Master studije je završio 2017. godine odbranom završnog rada pod nazivom "Ispitivanje uticaja zemljišnih sojeva cijanobakterija na ekspresiju gena kod vrste *Daphnia magna*". Doktorske akademske studije iz naučne oblasti Ekologija (uža naučna oblast Mikrobiologija) upisao je 2017. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. U 2018. godini je dobio zvanje istraživač pripravnik i zaposlio se na Departmanu za biologiju i ekologiju u okviru programa Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija, a 2021. godine je stekao zvanje istraživač saradnik. U toku doktorskih studija je učestvovao u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju u okviru predmeta Biologija algi i gljiva i Mikrobiološki praktikum za studente osnovnih akademskih studija, kao i na predmetu Antimikrobni agensi za studente master akademskih studija. Učestvovao je u realizaciji 3 nacionalna i 2 internacionalna naučno-istraživačka projekta. U okviru projekta pod nazivom „Molecular Methods for Supporting Microalgae as Biofactories”, finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, 2022. godine je bio u istraživačkoj poseti Školi bioloških nauka na Univerzitetu Kvinslend (Australija). Svoje naučne rezultate publikovao je u 3 naučna rada objavljena u međunarodnim časopisima, jednom radu u časopisu od nacionalnog značaja i dvanaest saopštenja sa skupova od međunarodnog i nacionalnog značaja. Pored istraživačkog rada, član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Federacije evropskih mikrobioloških društava (FEMS).

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
„Токсичност одабраних сојева цијанобактерија у <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> тестовима“
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију б) Школа биолошких наука, Универзитет у Квинсленду, St. Lucia, Аустралија в) Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
а) Програм научноистраживачког рада Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Ев.бр. 451-03-47/2023-01/200125) б) „Molecular Methods for Supporting Microalgae as Biofactories“ (MORAB) Број пројекта 6445349. Фонд за науку РС – Програм сарадње српске науке са дијаспором: Ваучери за размену знања, учесници ПМФ (Нови Сад) и Школа биолошких наука, Универзитет у Квинсленду, Аустралија. Трајање: 2021.-2023. Руководилац: Јелица Симеуновић.
<b>1. Опис података</b>
<b>1.1 Врста студије</b>  У оквиру студије су коришћени <i>in vivo</i> тестови токсичности са бескичмењачким ( <i>Artemia salina</i> , <i>Daphnia magna</i> ) и кичмењачким ( <i>Danio rerio</i> ) акватичним модел организмима са циљем детекције и карактеризације акутне токсичности екстраката одабраних цијанобактеријских сојева. Спроведене су <i>in vitro</i> анализе релативних промена у експресији одабраних гена код модел организама <i>Daphnia magna</i> и <i>Danio rerio</i> , како би се прикупили подаци о одговору акватичних организама на токсичност на молекуларном нивоу. Поред тога је испитан цитотоксични и неуротоксични потенцијал цијанобактеријских сојева у тесту са ћелијском линијом хуманог неуробластома, као и утицај релевантних еколошких фактора и фаза раста на токсичност сојева у <i>Artemia salina</i> биотесту. У циљу карактеризације испитиваних екстраката и утврђивање потенцијала за продукцију познатих цијанотоксина, примењен је ЕЛИСА тест и секвенцирани су и окарактерисани геноми сојева уз примену биоинформатичких алата за идентификацију и испитивање биосинтетских генских кластера.
<b>1.2 Врсте података</b> <b>а) квантитативни</b> <b>б) квалитативни</b>

### 1.3. Начин прикупљања података

Фотографије штетних промена регистрованих код изложених експерименталних јединки, записи након мерења промене релативне експресије гена на одговарајућем уређају, записи са спектрофотометарских мерења, , преглед доступне научне литературе.

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

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

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли: од 4 до 15 у зависности од методе
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): Мерење сваког параметра је извршено са три или четири репликата, док је број испитаних јединки по репликату износио 3 до 20 у зависности од употребљене методе.

#### 1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) не**

Напомене: \_\_\_\_\_

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

- a) Да**

б) Не

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

#### 2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

**а) експерименти**, квантификација штетних промена насталих након излагања одабраних модел организама дејству цијанобактеријских екстраката, анализа промена у експресији гена квантитативном „real time“ PCR (RT-PCR) методом, спектрофотометријска анализа потенцијалне цитотоксичности и неуротоксичности екстраката одабраних сојева, испитивање токсигеног потенцијала испитиваних сојева применом имунолошког есеја као и биоинформатичком анализом генских кластера одговорних за синтезу цијанотоксина.

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

спектрофотометар, уређај за мерење релативне експресије гена (qPCR), програмски пакети за биоинформатичку

### 2.2 Квалитет података и стандарди

#### 2.2.1. Третман недостајућих података

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

#### 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података?

Квалитет података је контролисан статистичким анализама, коришћењем контролних експеримената и поређењем добијених резултата са доступним литературним подацима из релевантних извора.

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

Поређењем добијених података са доступним 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

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

*Образложење*

Докторска дисертација са прилогом 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.

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](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**

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

### 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

**а) јавно доступни**

*б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области*

*ц) затворени*

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

Петар Давидовић; davidovicpetar93@gmail.com; petar.davidovic@dbe.uns.ac.rs

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

Петар Давидовић; davidovicpetar93@gmail.com; petar.davidovic@dbe.uns.ac.rs

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

Петар Давидовић; davidovicpetar93@gmail.com; petar.davidovic@dbe.uns.ac.rs